

論文内容要旨

論文題目

変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼに対する特異的モノクローナル抗体の開発

責任講座： 解剖学第二 講座

氏 名：辻本 雄太

【内容要旨】(1,200字以内)

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)は、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸へ変換する。IDH変異により、正常な α -ケトグルタル酸への変換活性が失われ、一方で α -ケトグルタル酸を癌代謝物である2-ヒドロキシグルタル酸に変換する酵素活性が獲得される。近年の報告により、様々な腫瘍組織においてIDH変異が生じることが明らかになった。IDH1変異は、酵素機能に重要な132番目のアルギニン(R132)をコードするシングルコドンに生じる。これまで、IDH1-R132GおよびR132Lに対する特異的抗体は報告されていない。本研究ではIDH1-R132LおよびIDH1-R132Gに対する特異的モノクローナル抗体の樹立を目的とした。

まず、IDH1-R132GおよびIDH1-R132Lの合成ペプチドをデザインし、ラットに免疫した。リンパ節内のリンパ球とミエローマ細胞を細胞融合し、「IDH1-R132Gに反応し、かつ野生型IDH1に反応しない抗体」ないしは「IDH1-R132Lに反応し、かつ野生型IDH1に反応しない抗体」を産生しているハイブリドーマを、ELISA法でスクリーニングした。限界希釈の後、IDH1-R132Gに対するGMab-r1と、IDH1-R132Lに対するLMab-1を樹立した。

ウェスタンブロット法を用いて、GMab-r1がIDH1-R132Gタンパクのみを認識し、他のタンパク(野生型IDH1, IDH1-R132L)を認識しておらず、GMab-r1がIDH1-R132Gタンパクに対する特異的抗体であることを示した。一方、LMab-1はIDH1-R132Lタンパクのみを認識し、他のタンパク(野生型IDH1, IDH1-R132G)を認識しておらず、LMab-1がIDH1-R132Lタンパクに対する特異的抗体であることを示した。

次に変異型IDH1を発現したCHO-K1細胞に対して、GMab-r1とLMab-1を用いて免疫細胞化学染色を施行した。GMab-r1がCHO/IDH1-R132Gのみと反応し、CHO/IDH1-R132Lと反応しないことを示した。一方、LMab-1はCHO/IDH1-R132Lのみと反応し、CHO/IDH1-R132Gと反応しなかった。これらの結果は、GMab-r1とLMab-1はIDH1-R132GおよびIDH1-R132Lを検出するための免疫組織化学染色にも有用である可能性を示唆する。

現在、IDH変異の検出は主にDNAダイレクトシーケンスにより行われているが、検体内のIDH変異タンパクの割合が少ない場合や、不均一に浸潤している腫瘍の場合には、抗体を用いた免疫組織化学染色法の方が有用だと考えられる。今後、樹立されたLMab-1とGMab-r1を用いて臨床サンプルを解析していく予定である。

平成 27 年 1 月 8 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：辻本 雄太

論文題目：変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼに対する
特異的モノクローナル抗体の開発

審査委員：主審査委員

浅尾 裕信



副審査委員

後藤 薫



副審査委員

飯野 光喜



審査終了日：平成 27 年 1 月 6 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

神経膠腫、急性骨髄性白血病、軟骨肉腫を含むいくつかの腫瘍では、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 1 や IDH2 の酵素活性に関わるアミノ酸をコードする部位の遺伝子変異が多数報告されている。IDH1 では 132 番目のアルギニンからヒスチジン、システイン、セリン、グリシン、ロイシンなどへの変異が知られている。IDH1 変異はこれら腫瘍の予後にも影響することから、腫瘍の組織学的なグレード分類に加えて、IDH1 変異を検出することは重要であると考えられる。現在、IDH1 の変異は標本組織から抽出した DNA をダイレクトシーケンスすることにより確認しているが、検体中に 20%以上の変異アレルが含まれることが必要である。そこで、抗体を用いた免疫組織化学染色法による変異の検出法を確立することが出来れば、1 細胞単位で検出することが可能となる。現在グリシンとロイシンへの変異 IDH1 (IDH1-R132G と IDH1-R132L) を認識する抗体は存在しないことから、申請者はその作成を試みた。

ラットにそれぞれの合成ペプチドを免疫する方法でハイブリドーマを作成し、変異 IDH 特異的抗体をスクリーニングした。その結果、IDH1-R132G に対するモノクローナル抗体 GMab-r1 と IDH1-R132L に対するモノクローナル抗体 LMaB-1 を樹立することに成功した。それぞれの変異 IDH1 に特異的なモノクローナル抗体であることを、リコンビナント変異 IDH1 蛋白や CHO 細胞に発現させた変異 IDH 蛋白に対するイムノプロット法と免疫細胞化学染色法で確認した。

今回樹立した抗体と、これまでに樹立されている他の変異 IDH1 に対するモノクローナル抗体を組み合わせることにより、今後、より感度の高い変異の検出が可能になると考えられる。腫瘍組織を用いた免疫組織化学染色での検討がまだ行われていない点は今後の課題と考えられるが、審査会での質疑応答は的確であり、学位論文審査委員会は本研究論文を博士 (医学) の授与に値すると判定した。

(1, 200 字以内)