

学位論文

骨肉腫における変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現解析

Analyses on isocitrate dehydrogenase 2 mutation in

osteosarcoma

山形大学大学院医学系研究科（医学専攻）

責任講座 整形外科講座

指導講座 病理診断講座

指導講座 解剖学第一講座

劉興

目録

1. 緒言
2. 対象と方法
3. 結果
4. 考察
5. 参考文献

1. 緒言

骨肉腫は、小児および若年成人で最も多い原発性悪性骨腫瘍である。全身化学療法の進歩によってその生存率は改善したが、初発時から肺転移を伴う患者の生存率は原発巣のみの患者と比べて低いままである¹⁾。また、骨肉腫に対する多剤併用化学療法は、聴器毒性、心毒性、および二次悪性腫瘍の問題がある²⁾。これらの問題を含め、骨肉腫の治療成績をより向上させるために、高い腫瘍特異性を持つ分子標的薬の開発が模索され、期待されている。

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 1 と IDH2 は細胞質およびミトコンドリア³⁾でイソクエン酸の酸化的脱炭酸反応の触媒作用を担い、 α -ケトグルタル酸に変換する酵素である³⁾。一方、体細胞突然変異型に由来する IDH1 と IDH2 は α -ケトグルタル酸を癌代謝物 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) に変換する酵素活性を有することが示された。2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼは、2-HG を α -ケトグルタル酸に変換するが、2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼが先天的に欠損すると、2-HG が細胞内に蓄積され、遺伝性代謝性疾患 2-ヒドロキシグルタル酸尿症を生じることがも知られている⁴⁾。2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ欠損を有する患者は、脳内に 2-HG が蓄積し、白質脳症を発症し、脳腫瘍の発症リスクも増加することも知られている⁵⁾。また、脳内の 2-HG 濃度上昇は、活性酸素の濃度を増加させることにより、癌の発症リスクの増加に関わる⁵⁾。IDH1/2 変異は、神経膠腫で初めて

報告された⁶⁾。*IDH1/2*の変異は星細胞腫、乏突起膠腫、乏突起星細胞腫、および二次性神経膠芽腫でも同定されている⁶⁻⁹⁾。これに対して、原発性膠芽腫にはほとんど*IDH1/2*変異が認められない⁶⁻⁹⁾。*IDH1/2*変異は急性骨髄性白血病¹⁰⁾や良性の軟骨腫瘍¹¹⁻¹³⁾や軟骨肉腫でも報告されており、*IDH1/2*の変異は軟骨芽細胞腫と軟骨肉腫を区別するための有望なバイオマーカーとなる可能性も示唆されている¹⁴⁾。

*IDH1*変異は機能的に重要な132番目のアルギニン残基(R132)における単一コドンに起こることが特徴的である。これに対して、*IDH2*変異は172番目のアルギニン(R172)に起こる。また急性骨髄性白血病における*IDH2*変異は140番目のアルギニン(R140)で生じることも知られ、R172における変異よりも高頻度に認められる¹⁵⁾。ほとんどの変異はヘテロ接合である。最近、Jinらにより野生型*IDH1*対立遺伝子を失い、変異型*IDH1*遺伝子を有する2症例において世界保健機関(WHO)グレードIII未分化星状細胞腫からWHOグレードIVの神経膠芽腫への進行が報告された¹⁶⁾。この報告では、ヘテロ接合*IDH1*変異の神経膠芽腫と比較して、野生型*IDH1*を欠く神経膠芽腫では細胞内2-HGレベルが14倍低いことが報告されている。さらに、この研究では、癌細胞2-HG産生に野生型*IDH1*の関与を明らかにするためにWHOグレードIII未分化星状細胞腫から*IDH1*変異型の星細胞腫細胞株を確立している。彼らは、野生型*IDH1*対立遺伝子の破壊によって細胞内の2-HG

レベルが 87 分の 1 に低下することを明らかにし、野生型と変異型の対立遺伝子の両方の保持が 2-HG 産生に必要なことを示している。

神経膠腫における *IDH1* の変異の頻度は *IDH1*-R132H で 92.7% (664/716 例)、*IDH1*-R132C で 4.2% (29/716 例)、*IDH1*-R132S で 1.5% (11/716 例)、*IDH1*-R132G で 1.4% (10/716 例) および *IDH1*-R132L で 0.2% (2/716 例) であると報告されている¹⁷⁾。今まで、複数の変異型 *IDH1* に対するモノクローナル抗体が樹立され、*IDH1*-R132H に対する IMab-1/HMab-1^{18,19,23)}、*IDH1*-R132S に対する SMab-1²⁰⁾、*IDH1*-R132G に対する GMab-r1/GMab-m1 が報告されている^{21,22)}。一方、神経膠腫の *IDH2* の変異の頻度は *IDH2*-R172K で 64.5%(20/31 例)、*IDH2*-R172M で 19.3%(6/31 例)および *IDH2*-R172W で 16.2%(5/31 例)であったと報告されている¹⁷⁾。変異型 *IDH2* に対するモノクローナル抗体も樹立され、*IDH2*-R172K に対する KMab-1²¹⁾、*IDH2*-R172M に対する M Mab-1²¹⁾、*IDH2*-R172W に対する WMab-1²⁴⁾が樹立されている。最近、*IDH1/2* に対する多特異的な抗体 MsMab-1 が *IDH1/2* 変異型の神経膠腫の検出に有用であることも示されている²⁵⁾。

骨肉腫に対する変異型 *IDH1/2* の解析は、複数の研究で行われているが^{11,14)}、*IDH1/2* の変異はまだ報告されていない。本研究では、ダイレクト DNA シーケンス法により、骨肉腫における *IDH1/2* 変異の有無を検討、さらに複数 *IDH1/2* の多特異的検出が可能な抗

体 MsMab-1 を用いて骨肉腫組織における免疫反応性を検討することを目的とした。

2. 対象と方法

細胞株および組織

Chinese hamster ovary (CHO)–k1 細胞株 (ATCC、マナッサス、VA) を、10%の熱非動化ウシ胎児血清 (ライフテクノロジーズ社、カールスバッド、CA FBS)、2 mM L-glutamine (ナカライテスク、京都、日本) を含む RPMI1640 培地で、5%CO₂-95%の加湿条件下で 37°C で培養した。U-2 OS 骨肉腫細胞株 (ATCC、マナッサス、VA) は同様に Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地で培養した。また、山形大学医学部附属病院で手術を受けた 12 例の骨肉腫患者の生検組織を解析に用いた。骨肉腫の組織マイクロアレイは Cybrdi 社 (Frederick, MD) からアジア人由来のものを購入し用いた。

DNA ダイレクトシーケンス法による *IDH1/2* 変異およびサブクローニング DNA 配列の決定

プロトコールに従い、ゲノム DNA を MightyAmp (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を用いて、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織切片から抽出した。コドン R132、および隣接イントロン配

列をコード *IDH1* のエクソン 4 に対応するゲノム領域の polymerase chain reaction(以下 PCR)プライマーとしてヒト *IDH1* センス (5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3') およびヒト *IDH1* アンチセンス (5'GCAAAAATCACATTATTGCCAAC-3') を用いた。コドン R172、および隣接イントロン配列をコード *IDH2* エクソン 4 に対応するゲノム領域のための PCR プライマーはヒト *IDH2* のセンス (5'-CAAGCTGAAGAAGATGTGGAA-3') およびヒト *IDH2* アンチセンス (5'-CAGAGACAAGAGGATGGCTA-3') を用いた。PCR の条件は 98°C で 2 分 1 サイクル、続いて 98°C 10 秒、60°C 15 秒、68°C 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルを行った、MightyAmp DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ株式会社) を用い 68°C 10 分で伸長反応した。塩基配列決定は *IDH1* 配列プライマー(5'-CCATTATCTGCAAAAATATC-3')と *IDH2* 配列プライマー (5'-AGCCCATCATCTGCAAAAAC-3')を用いてサイクルシーケンス法で行った。また、PCR 産物を pCR4-TOPO ベクターにサブクローニングし、20 クローンについて DNA ダイレクトシーケンスにより R132/R172 の変異の有無を調べた²⁶⁾。

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

合成ペプチドは 1µg/ml の濃度で Nunc Maxisorp 96 穴免疫プレート (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) に 30 分かけて固定化した。SuperBlock T20 (PBS) ブロッキング緩衝液

(Thermo Fisher Scientific Inc.)で処理した後、プレートを培養上清または 1:1000 に希釈したモノクローナル抗体（ペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG Dako, Glostrup, Denmark）（1 μ g/ml）と反応させた。酵素反応は、1 段階 Ultra TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い、37°Cで 50 μ l の容量で、吸光度を iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Inc., Philadelphia, PA)を用い 655 nm で測定した。

プラスミド調整

完全長のオープンリーディングフレーム（Open reading frame; ORF）をコードするヒト *IDH1* cDNA(GenBank accession NO. AF113917/BC012846)およびヒト *IDH2* の cDNA(accession NO. NM_002168)は、ヒト肺 cDNA ライブラリー(Cosmobio Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用い、PCR を行って得た。それぞれのテンプレートには U373 神経膠芽腫細胞株に由来するものを用いた。*IDH1* については EcoRI-IDH1-F1: 5'-cacgaattcATGTCCAAAAAATCAGTGG-3' と Sall-IDH1-R1: 5'-gtggtcgacTTAAAGTTTGGCCTGAGCTA-3'をプライマーセットとして用いた。*IDH2* については EcoRI-IDH2.F1: 5'-ccgaattcgggATGGCCGGCTACCTGCGGG-3' と Sall-IDH2wterR1359: 5'-gccgtcgacCTACTGCCTGCCAGGGCTCT-3'を用いた。増幅さ

れた cDNA は pcDNA3.1/V5-His-TOPO ベクター (Life Technologies Inc.)を用いてサブクローニングした。QuikChange Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA)を用い、*IDH1*におけるアルギニン 132 (R132) を適切なアミノ酸のコドンに、また、*IDH2*におけるアルギニン 172 (R172) を適切なアミノ酸のコドンに置換した。全長 *IDH2* とそれぞれ変異した ORF は *EcoRI-IDH2.F1*: 5'-ccgaattcgggATGGCCGGCTACCTGCGGG-3' と IDH2woterR1356-XhoI: 5'-taactcgagcgCTGCCTGCCAGGGCTCTG-3'を用いて増幅した。これらの PCR 産物を *EcoRI*および *XhoI*制限酵素で消化し、12 アミノ酸、GVAMPGAEDDVV (PA タグ) をコードするヌクレオチド配列 (ctcgagTGGCGTTGCCATGCCAGGTGCCGAAGATGATGTGG TGTAAtctaga)とともに pcDNA3 ベクター(Life Technologies Inc.)にサブクローニングした^{21,24,25}。

哺乳類細胞を用いた蛋白質の発現

lipofectamine LTX(Life Technologies Inc.)のプロトコールに従い、CHO 細胞に *pcDNA3.1/IDH1-WT*、*pcDNA3.1/IDH1-R132H*、*pcDNA3.1/IDH1-R132C* 、 *pcDNA3.1/IDH1-R132S* 、 *pcDNA3.1/IDH1-R132G* 、 *pcDNA3.1/IDH1-R132L* 、

pcDNA3/IDH2-R172K 、 *pcDNA3/IDH2-R172M* 、
pcDNA3/IDH2-R172W 、 *pcDNA3/IDH2-R172G* 、
pcDNA3/IDH2-R172S のプラスミドをトランスフェクトした。
IDH1/2 の発現レベルはウェスタンブロット法を用いて確認した。

ウェスタンブロット分析

培養細胞ペレットを氷上で 30 分間、Radioimmunoprecipitation Buffer (RIPA) バッファー (Thermo Fisher Scientific Inc.) で溶解した。溶解液上清は細胞残渣を除去するために 15,000 rpm 15 分間で遠心分離した。総タンパク質 10 μ g を含む細胞溶解物を 2-メルカプトエタノール(2-ME)(Nacalai Tesque Inc.) を含む SDS 試料緩衝液で煮沸してウェスタンブロット解析に用いた。試料は、5~20% のポリアクリルアミドゲル (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) で電気泳動した。分離した蛋白質は、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (EMD Millipore Corp., Billerica, MA) に転写した。0.05% の Tween20 PBS を含む 4% スキムミルクで 15 分間ブロッキングした後、膜を MsMab-1 (1 μ g/ml)²⁵⁾、抗 PA タグ抗体(NZ-1)^{21,24,25)} および抗 V5 タグ(MBL Co. Ltd., Nagoya, Japan) と 30 分間反応させた。その後、膜をペルオキシダーゼ結合二次抗体(1:1,000 diluted; Dako) と共に 15 分間で反応させ、さらに、Sayaca-Imager (DRC Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用い、ImmunoStar LD 化学ルミネセンス試薬(Wako Pure Chemical

Industries Ltd.)を用いて発色させた。

免疫組織化学解析

山形大学医学部附属病院整形外科で治療を受けた 12 名の骨肉腫患者の生検標本を用い、*IDH1* と *IDH2* 変異を解析した。すべての組織標本は、生検により得られた化学療法を受ける前の原発性腫瘍組織を用いた。12 症例のうち 2 例は、化学療法前に肺転移を示していた (表 1)。パラフィン包埋した骨肉腫組織標本を用いて変異型 *IDH2-R172S* の蛋白質の発現を免疫組織化学的に検討した。即ち、厚さ 4 ミクロンの組織切片をキシレン中で脱パラフィン化し再水和した。さらに、クエン酸緩衝液 (pH 6.0; Dako) で 20 分間オートクレーブ処理を加えてから MsMab-1 (5 μ g/ml) 4 $^{\circ}$ C で一晩の反応させ、続いて LSAB キット (DAKO) を用いてビオチン化二次抗体を 30 分間反応させた。さらにペルオキシダーゼ (HRP) による酵素試薬で 30 分間二次抗体を標識した。最後に 3,3-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB; Dako) を用いて 10 分間で発色、ヘマトキシリンを用いて核染色した。MsMab-1 抗体の染色強度は細胞質の染色による腫瘍細胞の割合から染色性なし 0、10%未満+、10%~50%++、50%以上+++の 4 段階で評価した。

本研究の実験は山形大学医学部倫理委員会によって承認を受けた(承認番号第 174 号)。

3.結果

骨肉腫における変異型 *IDH1/2* の解析

DNAダイレクトシーケンス法により12例中3例(25%)に*IDH2*の変異が認められた。そのうち骨芽細胞型骨肉腫は2例、high grade surface osteosarcoma (HGS)は1例であった。変異型*IDH2*を持つ2例の骨芽細胞型骨肉腫の患者は、術前化学療法後にグレード3の壊死を示していた。変異型*IDH2*を有している3例すべてで無病生存が得られていた(OS10 177ヵ月, OS11 99ヵ月, OS12 155ヵ月)。この結果を確認するため、この3例のPCR産物のサブクローニングを行った。すべての標本で、*IDH2*-R172S変異配列、すなわちOS10では14/16クローン(87.5%)、OS11では2/17(11.8%)、OS12では6/17(35.3%)で変異クローンの存在が示された(図1B)。

ELISA及びウエスタンブロット法における変異型 *IDH1/2* に対するMsMab-1の特異性の解析

変異型*IDH1/2*を発現するCHO細胞で、ウエスタンブロット解析を行った。MsMab-1はCHO細胞における*IDH1*-R132Sと*IDH1*-R132Gに強く反応し*IDH1*-R132Hへの反応性は弱かった(図2A)。一方、MsMab-1は他の蛋白質(*IDH1*-WT、*IDH1*-R132C、*IDH1*-R132L)に反応しなかったため、哺乳動物細胞由来の変異型

IDH1-R132H/R132S/R132G の検出に有用であることが示された。
MsMab-1 は *IDH2-R172G* と *IDH2-R172S* に強く反応したが、
IDH2-R172M への反応はきわめて弱かった (図 2B)。

***IDH2-R172S* 変異を有する骨肉腫に対する MsMab-1 による免疫 組織化学解析**

MsMab-1 は哺乳動物細胞由来の *IDH2-R172S* 発現蛋白質を強く
認識することから (図 2B)、次に *IDH2-R172S* 陽性骨肉腫に対し
免疫組織染色を行った (図 3)。MsMab-1 によって *IDH2-R172S*
陽性骨肉腫 OS10 と OS11 の腫瘍細胞が染色された。しかし、OS12
は染色されなかった。MsMab-1 で染色するとほとんどすべての腫
瘍細胞は弱く染色されたが、いくつかの腫瘍細胞は、強く染色され、
特に細胞質が染色された (図 3C, 図 3D)。MsMab-1 による細胞質
の染色様式は、以前の報告に記載されたものと同様であった^{24,25)}。
一次モノクローナル抗体を含まない反応では陽性所見はなかった
(図 3E、図 3F)。骨肉腫組織中の内皮細胞は MsMab-1 で染色さ
れていなかったため、MsMab-1 は変異を保有する腫瘍細胞のみを
反応することが明らかとなった (図 3D)。これらの結果は、
MsMab-1 は免疫組織化学によって変異型 *IDH2-R172S* の検出する
に有用であることを示している。

骨肉腫の組織マイクロアレイに対する MsMab-1 による免疫組織

化学解析

変異型 *IDH1/2* の発現性を調べるため、MsMab-1 抗体を用いて骨肉腫の組織マイクロアレイに対する免疫組織染色を行った。患者の情報を表 5 に示した。MsMab-1 はマイクロアレイ組織 32 例のうち 9 例で腫瘍細胞を染色した (28.1%)。典型的な染色様式を図 4 の挿入図 (図右上) に示した。これらの結果は、MsMab-1 は、免疫組織染色によって骨肉腫における変異型 *IDH1/2* を検出するに有用であることを示している。

4. 考察

この研究では、骨肉腫で変異型 *IDH2* を有する例があることを初めて明らかにした (図 1)。一方、*IDH2*-R172S は原発性悪性骨腫瘍の一つである軟骨肉腫で頻繁に見い出されている¹¹⁾。また Amary らは変異型 *IDH1/2* は非軟骨性腫瘍では検出されなかったことを報告している¹¹⁾。この報告では、222 例の患者、19 種の骨肉腫細胞株、および 1 種の脊索腫細胞株由来の骨肉腫サンプルを high-throughput MassARRAY プラットフォームを用い、*IDH1/2* の変異について分析しているが、*IDH2* の変異は認められなかった。今回の研究では日本人およびアジア人由来のサンプルを用いている *IDH2* 変異の検出と過去の研究で認められなかった差は民族の

違いによる可能性がある。将来は、より多くの日本人を含む様々な民族の骨肉腫患者標本を用い、変異型 *IDH1/2* を解析する必要がある。今回の検討ではサブクローニング方法を用い、OS12 が変異型 *IDH2-R172S* を有することを確認したが（図 1）、MsMab-1 モノクローナル抗体の感度が十分に高くなかったためか、免疫組織化学的には OS12 の腫瘍細胞は染色されなかった（表 1）。図 3、4 に示すように、免疫組織化学による変異型 *IDH2-R172S* の染色様式は不均一であった。OS12 がパラフィン切片における変異型 *IDH2-R172S* がホルマリン固定により分解された可能性がある。

変異型 *IDH1/2* に対する多特異的なモノクローナル抗体 MsMab-1 は共同研究者により樹立されている²⁵⁾。MsMab-1 抗体は複数の変異型 *IDH1* (*R132H*, *R132S* 及び *R132G*) に反応するが、他の *IDH1/2* 変異に対する反応性がまだ明らかにされていない。そのため、変異型 *IDH1* の 20 ペプチドおよび変異型 *IDH2* の 20 ペプチドに対して MsMab-1 モノクローナル抗体の反応性を調べた（表 2）。抗 *IDH1-R132H* モノクローナル抗体 H Mab-1 は、*IDH1-R132H* のペプチドを認識し、単一特異的な抗体であった（表 3、表 4）。変異型 *IDH1-R132A* と *IDH1-R132T* に対する特異的な抗体は報告されていないが、抗 *IDH1-R132S* 抗体 S Mab-1 は、*IDH1-R132S* を認識するだけでなく、*IDH1-R132V*、*IDH1-R132A*、および *IDH1-R132T* も認識することができた。また、MsMab-1 は複数の変異型 *IDH2* を認識するが、*R172S* と

R172G の変異は神経膠腫や軟骨肉腫にあることが報告されており、これらの腫瘍に対しても有用かもしれない^{6,11)}。

以前、共同研究者は、複数の変異型 IDH1/2 に対するモノクローナル抗体、即ち IDH1-R132H に対する HMab-1¹⁹⁾、IDH1-R132S に対する SMab-1²⁰⁾、IDH1-R132G に対する GMab-r1²⁷⁾、IDH2-R172K に対する KMab-1²¹⁾、IDH2-R172M に対する MMab-1²¹⁾および IDH2-R172W に対する WMab-1²⁴⁾を樹立している。しかし、IDH2-R172S に対する単一特異的な抗体は樹立されていなかった。本研究では MsMab-1 を用い、骨肉腫患者における変異型 *IDH2-R172S* (25%) を検出することが可能であった(表 1)。また、MsMab-1 は神経膠腫における変異型 *IDH2-R172G* を認識することが報告されている⁶⁾。一方、MsMab-1 は、*IDH2-R172K* または *IDH2-R172W* に反応しない、また、*IDH2-R172M* への反応性が弱いため、全 *IDH1/2* 変異を検出するには KMab-1、MMab-1 および WMab-1 の単一特異的な抗体と MsMab-1 抗体を合わせた解析を行う必要がある。さらに将来、ELISA (表 3 および表 4) およびウエスタンブロット解析 (図 2) との MsMab-1 反応性の不一致を解決する必要がある。

本研究ではウエスタンブロット法 (図 2) によって MsMab-1 抗体はいくつかの変異型 IDH1/2 と反応するため、免疫組織化学的検討で良好な反応性を示すことが期待された。MsMab-1 は 32 例骨肉腫のうち 9 例で染色がみられ (28.1%) (図 4)、MsMab-1

は、免疫組織化学による骨肉腫における変異型 *IDH1/2* の存在をスクリーニングする際に有用な可能性があることを示している。また、*IDH2-WT* と他の変異型 *IDH2* には反応しないため、MsMab-1 は、免疫組織化学解析における変異型の *IDH2-R172S* の骨肉腫を検出に有用であると思われる。

最近、2つの変異型 *IDH1/2* に対する新規薬物が樹立された。変異型 *IDH1* の阻害剤、AGI-5198 は、特に変異型 *IDH1* の活性を抑制し、2-HG の産生を抑制した²⁸⁾。また、AGI-5198 は、2-HG 阻害の条件で神経幹細胞分化に関連する遺伝子の発現とヒストン H3K9me3 の脱メチル化を誘導した。変異型 *IDH1* の酵素活性を阻害することで、ゲノムワイド DNA メチル化における野生型 *IDH1* を有する神経膠腫細胞に障害を加えることなく、変異型 *IDH1* を有する神経膠腫細胞の増殖を抑制することが示されている²⁸⁾。変異型 *IDH2* の阻害剤、AGI-6780 は、選択的に腫瘍関連変異型 *IDH2-R140Q* を抑制した²⁹⁾。さらに、AGI-6780 は、細胞外で TF-1 赤白血球および原発性ヒト急性骨髄性白血病細胞の分化を誘導した。この研究では骨肉腫における変異型 *IDH2-R172S* が検討されているが、変異型 *IDH2-R172S* に対する阻害剤は発見されなかった。骨肉腫の薬物臨床試験では、骨肉腫で活性化されている分子に対する阻害薬が検討されている、即ち、イマチニブは難治性または再発性の固形腫瘍に対する PDGF-A を標的とするチロシンキナーゼ阻害剤で³¹⁾、ソラフェニブは、MAPK、VEGFR、PDGFRs お

よび KIT を標的として再発した切除不能骨肉腫に対するマルチキナーゼ阻害剤として試みられたが、効果は認められなかった³²⁾。またトラスツズマブは転移性骨肉腫患者による HER2 に対するモノクローナル抗体であるが、阻害効果は認められなかった³³⁾。このように骨肉腫患者の生存率を改善するために新しい薬剤の開発が期待されているが、これまでに劇的な効果は観察されていない^{30,31,32,33)}。さらに、骨肉腫の薬物治療を向上させるために、腫瘍細胞内に過剰発現した分子を標的とするだけでなく、変異型 IDH1/2 などの遺伝子変異に対する新たな薬剤を開発する必要もある。血清 2-HG は Ollier 病および Maffucci 症候群で上昇していることが知られている¹²⁾。また Dinardo らは、最近、血清 2-HG レベルが IDH 変異および急性骨髄性白血病における臨床予後を予測することができる³⁴⁾。これらの研究は癌代謝物 2-HG の血清測定が有用な診断および予後情報を提供する可能性を示している。今後変異型 *IDH1/2* モノクローナル抗体 MsMab-1 による検討および癌代謝物 2-HG の血清測定を併用することで、骨肉腫患者の予後層別化が可能となることも期待される。

5.参考文献

1. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant

- cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002; 20: 776-90.
2. Lewis MJ, DuBois SG, Fligor B, Li X, Goorin A, Grier HE. Ototoxicity in children treated for osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52: 387-91.
 3. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462: 739-44.
 4. Struys EA, Salomons GS, Achouri Y, Van Schaftingen E, Grosso S, Craigen WJ, et al. Mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene cause D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 358-60.
 5. Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, Okun JG, Hörster F, Mayatepek E, et al. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 21-8.
 6. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765-73.
 7. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 597-602.
 8. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al.

An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321: 1807-12.

9. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci* 2009; 100: 1996-8.
10. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010; 17: 225-34.
11. Amary MF, Bacsi K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol* 2011; 224: 334-43.
12. Amary MF, Damato S, Halai D, Eskandarpour M, Berisha F, Bonar F, et al. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet* 2011; 43: 1262-5.
13. Pansuriya TC, van Eijk R, d'Adamo P, van Ruler MA, Kuijjer ML, Oosting J, et al. Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nat Genet* 2011; 43: 1256-61.
14. Kerr DA, Lopez HU, Deshpande V, Hornicek FJ, Duan Z, Zhang Y, et al.

- Molecular distinction of chondrosarcoma from chondroblastic osteosarcoma through IDH1/2 mutations. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 787-95.
15. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3636-43.
 16. Jin G, Reitman ZJ, Duncan CG, Spasojevic I, Gooden DM, Rasheed BA, et al. Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res* 2013; 73: 496-501.
 17. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 469-74.
 18. Kato Y, Jin G, Kuan CT, McLendon RE, Yan H, Bigner DD. A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 547-51.
 19. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, et al. Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. *J Neurooncol* 2012; 108:

- 361-73.
20. Kaneko MK, Tian W, Takano S, Suzuki H, Sawa Y, Hozumi Y, et al. Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for IDH1-R132S mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406: 608-13.
 21. Kaneko MK, Morita S, Tsujimoto Y, Yanagiya R, Nasu K, Sasaki H, et al. Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432: 40-5.
 22. Kato Y, Natsume A, Kaneko MK. A novel monoclonal antibody GMab-m1 specifically recognizes IDH1-R132G mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432: 564-7.
 23. Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 599-601.
 24. Kato Y, Kaneko MK. Generation of a novel monoclonal antibody WMab-1 specific for IDH2-R172W mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433: 374-8.
 25. Kaneko M, Ogasawara S, Kato Y. Establishment of a novel multi-specific monoclonal antibody MsMab-1 recognizing both IDH1 and IDH2 mutations. *Tohoku J Exp Med* 2013; 230: 103-9.
 26. Takano S, Tian W, Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Kaneko MK,

- et al. Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28: 115-23.
27. Kaneko MK, Tsujimoto Y, Hozumi Y, Goto K, Kato Y. Novel monoclonal antibodies GMab-r1 and LMab-1 specifically recognize IDH1-R132G and IDH1-R132L mutations. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2013; 32: 224-8.
28. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 2013; 340: 626-30.
29. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 2013; 340: 622-6.
30. Gill J, Ahluwalia MK, Geller D, Gorlick R. New targets and approaches in osteosarcoma. *Pharmacol Ther* 2013; 137: 89-99.
31. Bond M, Bernstein ML, Pappo A, Schultz KR, Krailo M, Blaney SM, et al. A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 254-8.
32. Grignani G, Palmerini E, Dileo P, Asaftei SD, D'Ambrosio L, Pignochino Y, et al. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard

multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann Oncol* 2012; 23: 508-16.

33. Ebb D, Meyers P, Grier H, Bernstein M, Gorlick R, Lipshultz SE, et al. Phase II trial of trastuzumab in combination with cytotoxic chemotherapy for treatment of metastatic osteosarcoma with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2545-51.
34. DiNardo CD, Propert KJ, Loren AW, Paietta E, Sun Z, Levine RL, et al. Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 121: 4917-24.

表 1. 骨肉腫サンプルの臨床病理学的特性

番号	年齢	性別	部位	診断*	グレード**	転移***	Status [#]	IDH1	IDH2
OS1	22	F	Tibia	OB	Grade 0	-	CDF	Wild type	Wild type
OS2	16	M	Humerus	OB	Grade 0	+	DOD	Wild type	Wild type
OS3	12	M	Tibia	OB	Grade 3	-	CDF	Wild type	Wild type
OS4	56	F	Femur	OB	Grade 1	-	CDF	Wild type	Wild type
OS5	80	M	Mandible	OB	Grade 0	-	DOD	Wild type	Wild type
OS6	16	M	Humerus	CB	Grade 0	-	CDF	Wild type	Wild type
OS7	14	F	Humerus	OB	Grade 2	+	NED	Wild type	Wild type
OS8	10	M	Tibia	CB	Grade 1	-	CDF	Wild type	Wild type
OS9	71	M	Mandible	OB	No chemotherapy	-	CDF	Wild type	Wild type
OS10	6	M	Femur	OB	Grade 3	-	CDF	Wild type	R172S
OS11	10	M	Tibia	OB	Grade 3	-	CDF	Wild type	R172S
OS12	29	M	Femur	HGS	Grade 0	-	CDF	Wild type	R172S

*OB: 骨芽細胞型骨肉腫; CB: 軟骨芽細胞腫; HGS: high grade surface osteosarcoma

**術前化学療法後の組織学的壊死; グレード 0: 0-50%; グレード 1: 51-90%; グレード 2: 91-99%; グレード 3: 100%

***化学療法の前に肺転移が存在

CDF: 術後生存中; DOD: 原病死; NED: 無病生存

表 2. 酵素結合免疫吸着アッセイのための IDH1/2 合成ペプチド

Gene	Mutation	Sequence
IDH1	WT	GGVKPIIIGRHAYGDQYRA
	R132H	GGVKPIIIGHHAYGDQYRA
	R132C	GGVKPIIIGCHAYGDQYRA
	R132S	GGVKPIIIGSHAYGDQYRA
	R132G	GGVKPIIIGGHAYGDQYRA
	R132L	GGVKPIIIGLHAYGDQYRA
	R132K	GGVKPIIIGKHAYGDQYRA
	R132M	GGVKPIIIGMHAYGDQYRA
	R132W	GGVKPIIIGWHAYGDQYRA
	R132V	GGVKPIIIGVHAYGDQYRA
	R132Q	GGVKPIIIGQHAYGDQYRA
	R132P	GGVKPIIIGPHAYGDQYRA
	R132I	GGVKPIIIGIHAYGDQYRA
	R132A	GGVKPIIIGAHAYGDQYRA
	R132Y	GGVKPIIIGYHAYGDQYRA
	R132D	GGVKPIIIGDHAYGDQYRA
	R132T	GGVKPIIIGTHAYGDQYRA
	R132E	GGVKPIIIGEHAYGDQYRA
	R132F	GGVKPIIIGFHAYGDQYRA
	R132N	GGVKPIIIGNHAYGDQYRA
IDH2	WT	GGTKPITIGRHAHGDQYKA
	R172H	GGTKPITIGHHAHGDQYKA
	R172C	GGTKPITIGCHAHGDQYKA
	R172S	GGTKPITIGSHAHGDQYKA
	R172G	GGTKPITIGGHAHGDQYKA
	R172L	GGTKPITIGLHAHGDQYKA
	R172K	GGTKPITIGKHAHGDQYKA
	R172M	GGTKPITIGMHAHGDQYKA
	R172W	GGTKPITIGWHAHGDQYKA
	R172V	GGTKPITIGVHAHGDQYKA
	R172Q	GGTKPITIGQHAHGDQYKA
	R172P	GGTKPITIGPHAHGDQYKA
	R172I	GGTKPITIGIHAHGDQYKA
	R172A	GGTKPITIGAAHGDQYKA
	R172Y	GGTKPITIGYHAHGDQYKA
	R172D	GGTKPITIGDHAHGDQYKA
	R172T	GGTKPITIGTHAHGDQYKA
	R172E	GGTKPITIGEAHGDQYKA
R172F	GGTKPITIGFAHGDQYKA	
R172N	GGTKPITIGNHAHGDQYKA	

表 3. 変異型 IDH1 ペプチドに対する IDH1 モノクローナル抗体の反応性 (ELISA)

	WT	R132H *	R132C *	R132S	R132G *	R132L *	R132K	R132M	R132W	R132V *	R132Q	R132P	R132I	R132A	R132Y	R132D	R132T	R132E	R132F	R132N
MsMab-1	-	++	+	+++	+++	+	+	++	-	-	+++	-	-	+++	++	+++	+	+++	+	+++
HMab-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMab-1	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-
RMab-3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++

+++ : OD655 ≥ 1.0; ++ : 0.5 ≤ OD655 < 1.0; + : OD655 < 0.5; -: 対照

*既報告の変異

表 4. 変異型 IDH2 ペプチドに対する IDH1 モノクローナル抗体の反応性 (ELISA)

	WT	R172H	R172C	R172S*	R172G	R172L	R172K*	R172M	R172W*	R172V	R172Q	R172P	R172I	R172A	R172Y	R172D	R172T*	R172E	R172F	R172N
MsMab-1	-	-	++	+++	+++	++	-	++	-	-	+++	-	-	+++	++	+++	-	+++	+	-
HMab-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMab-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMab-3	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : OD655 ≥ 1.0; ++ : 0.5 ≤ OD655 < 1.0; + : OD655 < 0.5; -: 対照

*既報告の変異

表 5. 免疫組織染色に用いた組織マイロアレイ患者
の特徴 MsMab-1

患者番号	年齢	性別	Sample class	診断*	MsMab-1**
1	69	M	Primary	OB	-
2	37	M	Primary	OB	-
3	62	F	Primary	OB	+
4	29	M	Primary	OB	-
5	12	F	Primary	OB	++
6	13	F	Primary	OB	-
7	17	M	Primary	CB	-
8	19	F	Primary	OB	-
9	15	F	Primary	OB	-
10	33	M	Primary	OB	-
11	12	M	Primary	OB	-
12	19	M	Primary	OB	-
13	16	M	Primary	OB	+
14	10	F	Primary	OB	-
15	14	F	Primary	OB	++
16	31	F	Primary	OB	-
17	30	M	Primary	OB	-
18	18	M	Primary	OB	+++
19	14	M	Primary	OB	-
20	43	M	Primary	OB	-
21	28	M	Primary	CB	-
22	10	M	Primary	OB	-
23	7	F	Primary	OB	-
24	37	F	Primary	OB	++
25	34	M	Primary	OB	-
26	23	F	Primary	OB	+
27	14	F	Primary	OB	-
28	16	M	Primary	OB	-
29	60	M	Primary	OB	-
30	23	F	Primary	OB	-
31	16	M	Primary	OB	++
32	18	M	Primary	OB	+

*OB: 骨芽細胞型骨肉腫; CB: 軟骨芽細胞骨肉腫

**0, 染色なし; +, <10%; ++, 10-50%; and +++, >50%

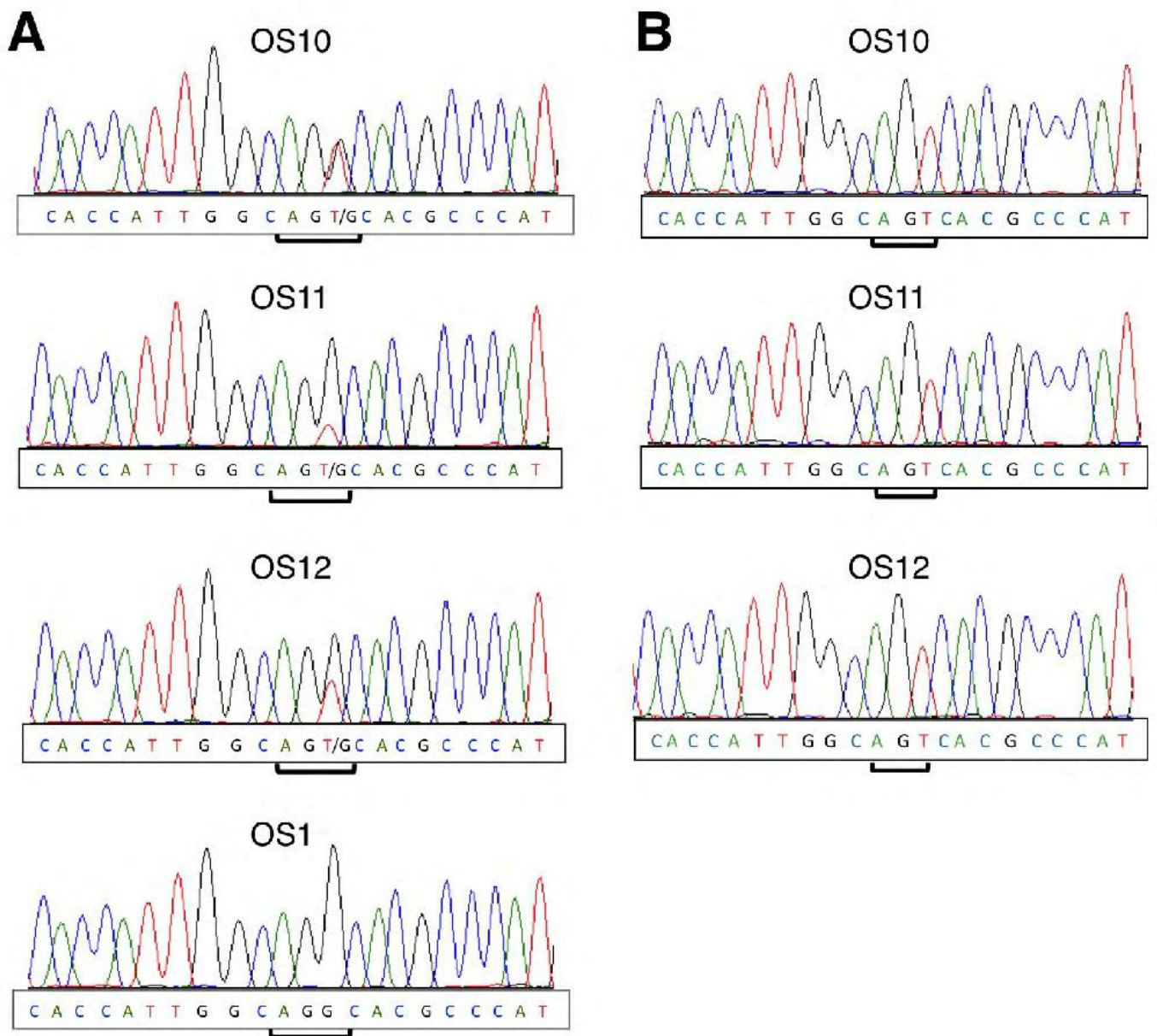


図1. 骨肉腫における変異型 IDH1/2 の解析 (A) OS10、OS11、OS12 及び OS1 に対し DNA
 ダイレクトシーケンスを行った。(B) OS10、OS11 及び OS1 における PCR 産物を pCR4-TOPO
 ベクターにサブクローニングした。それぞれのクローンにおいて IDH2-R172S の変異が確
 認された。

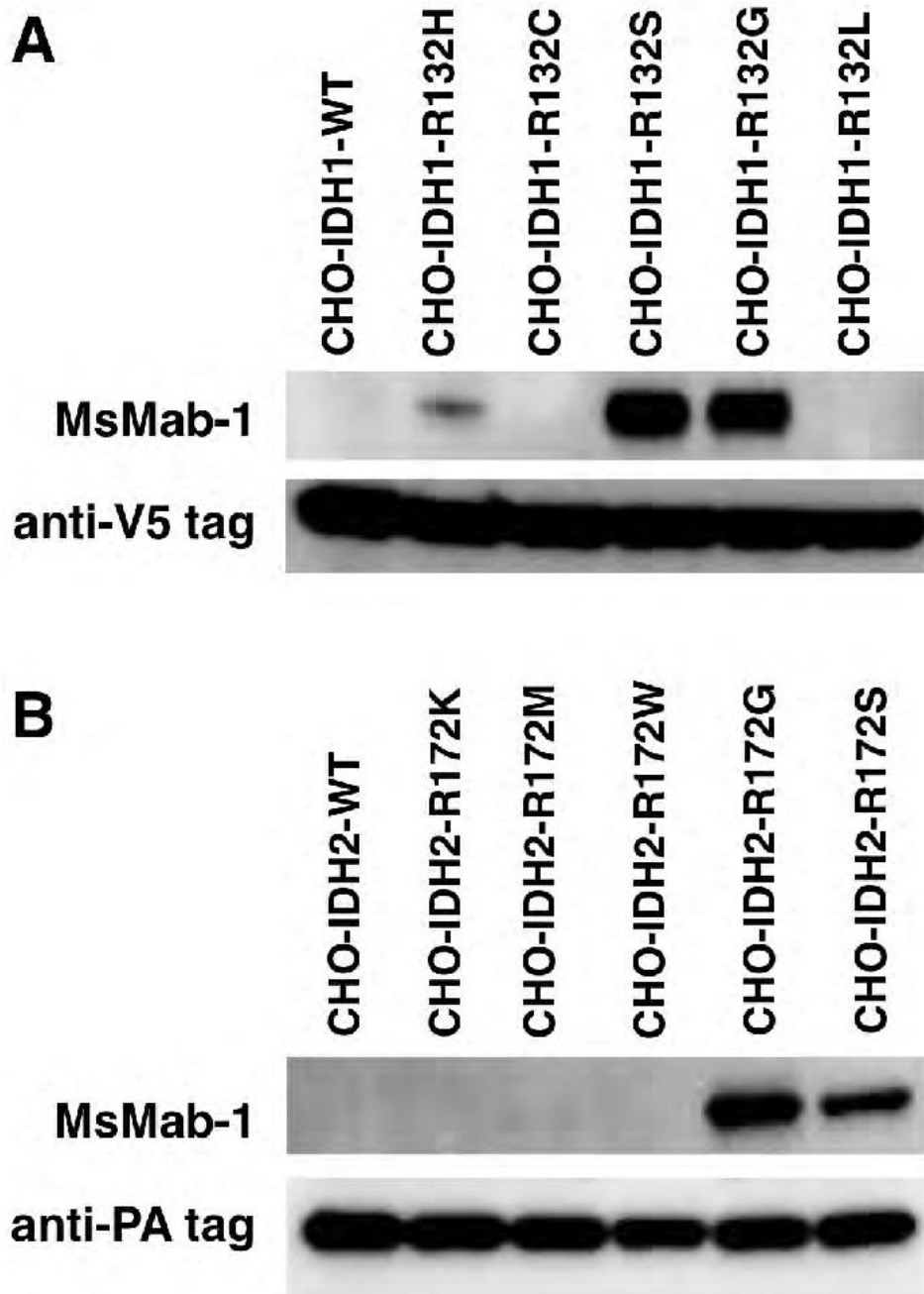


図 2. MsMab-1 によるウエスタンブロット法で変異型 IDH1/2 における CHO 細胞の解析

(A) CHO 細胞における野生型 IDH1 (WT, lane 1) 及び変異型 IDH1 (lane 2, IDH1-R132H; lane 3, IDH1-R132C; lane 4, IDH1-R132S; lane 5, IDH1-R132G; lane 6, IDH1-R132L) すべての細胞溶解物は 5%-20%のゲル用いて電気泳動し、MsMab-1 と抗 V5 タグ抗体によるウエスタンブロット法を行った。(B) CHO 細胞における野生型 IDH2 (WT, lane 1) 及び変異型 IDH2 (lane 2, IDH2-R172K; lane 3, IDH2-R172M; lane 4, IDH2-R172W; lane 5, IDH2-R172G; lane 6, IDH2-R172S)。すべての細胞溶解物は 5%-20%のゲル用いて電気泳動し、MsMab-1 と抗 PA タグ抗体 (NZ-1) によるウエスタンブロット法を行った。

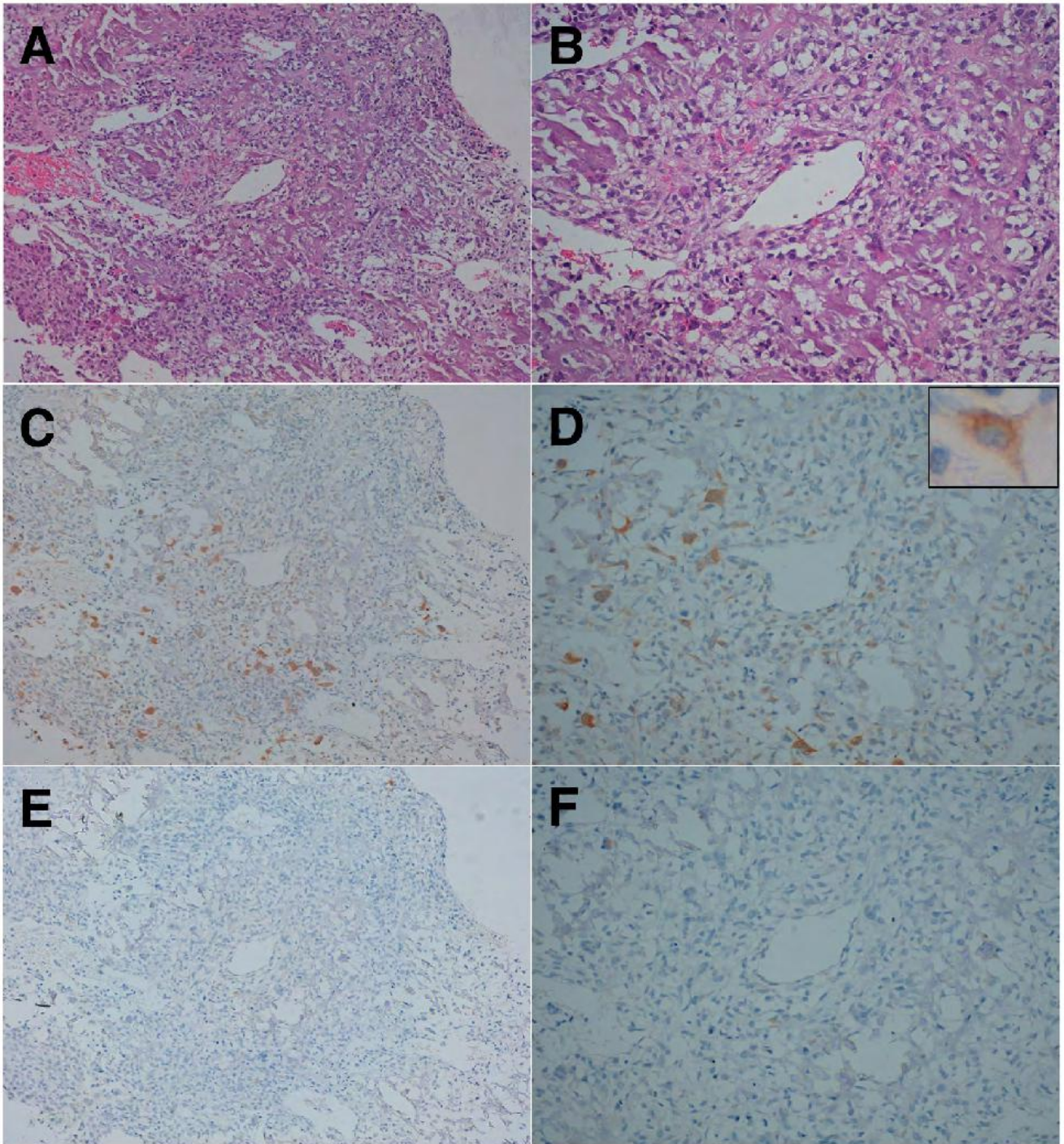


図 3. MsMab-1 による免疫組織染色

(A, B) 変異型 IDH2-R172S を有する骨肉腫組織 (OS10) のヘマトキシリン-エオジン染色。
(C, D) MsMab-1 により骨肉腫組織の腫瘍細胞が染色された。拡大した挿入図は MsMab-1 が細胞質を染色することを示す (D)。一次抗体なしでは染色されなかった (E, F)。倍率：
(A, C, E) x100, (B, D, F) x200。

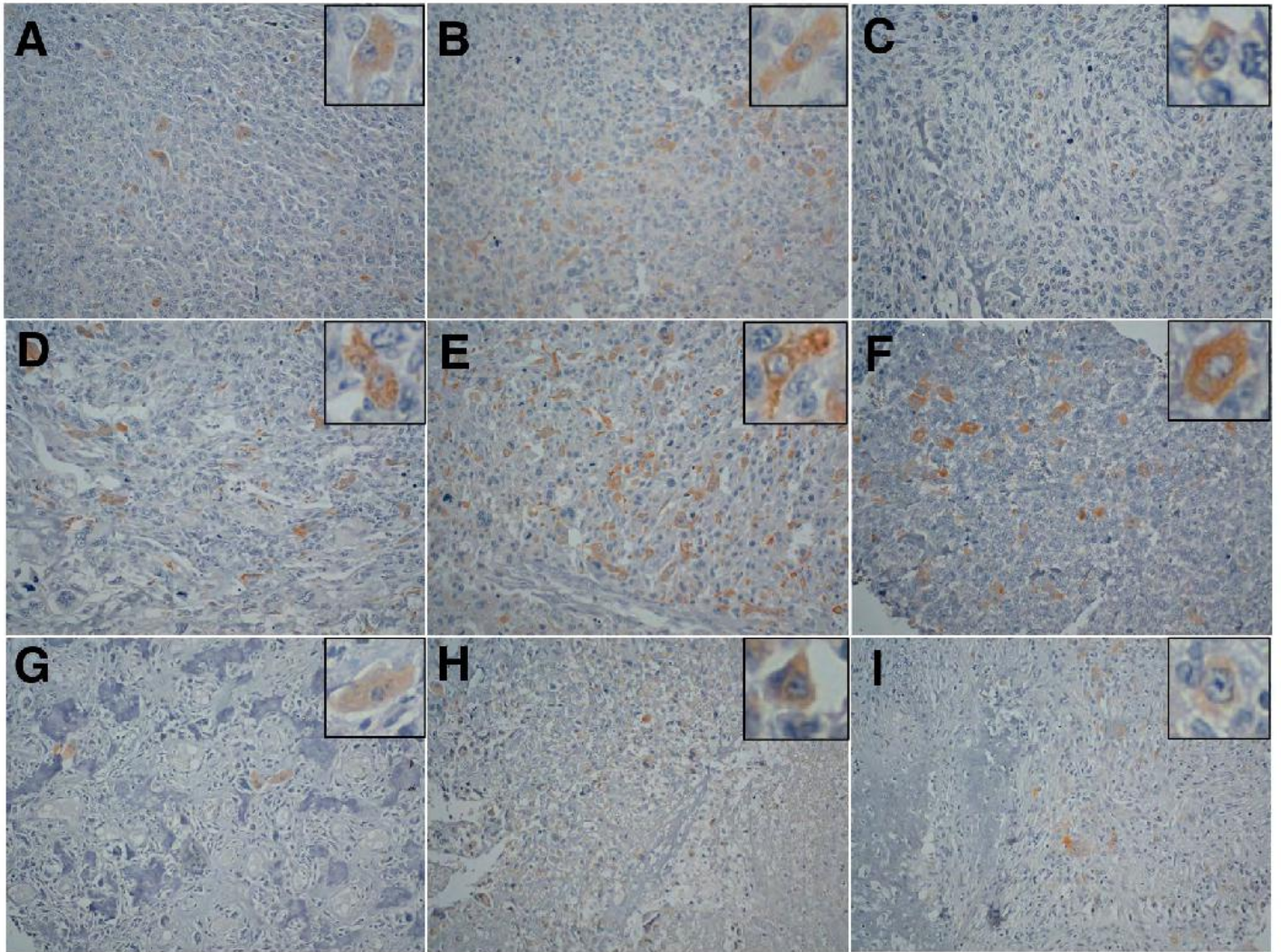


図 4. MsMab-1 による骨肉腫組織マイクロアレイ染色 MsMab-1 による LSAB キットで骨肉腫組織マイクロアレイが染色された。DAB による発色、ヘマトキシリンで核染色した。典型的な結果を示す (A) 3 番, (B) 5 番, (C) 13 番, (D) 15 番, (E) 18 番, (F) 24 番, (G) 26 番, (H) 31 番, (I) 32 番。それぞれの拡大挿入図は MsMab-1 は細胞質を染色することを示している (A-I)。倍率 : x200.

主論文

1. **Liu X**, Kato Y, Kaneko MK, Sugawara M, Ogasawara S, Tsujimoto Y, Naganuma Y, Yamakawa M, Tsuchiya T, Takagi M. Isocitrate dehydrogenase 2 mutation is a frequent event in osteosarcoma detected by a multi-specific monoclonal antibody MsMab-1. *Cancer Med.* 2013 Dec;2(6):803-14. doi: 10.1002/cam4.149.
2. Kato Kaneko M, **Liu X**, Oki H, Ogasawara S, Nakamura T, Saidoh N, Tsujimoto Y, Matsuyama Y, Uruno A, Sugawara M, Tsuchiya T, Yamakawa M, Yamamoto M, Takagi M, Kato Y. Isocitrate dehydrogenase mutation is frequently observed in giant cell tumor of bone. *Cancer Sci.* 2014 Jun;105(6):744-8. doi: 10.1111/cas.12413
3. Moriya K, Kaneko MK, **Liu X**, Hosaka M, Fujishima F, Sakuma J, Ogasawara S, Watanabe M, Sasahara Y, Kure S, Kato Y. IDH2 and TP53 mutations are correlated with gliomagenesis in a patient with Maffucci syndrome. *Cancer Sci.* 2014 Mar;105(3):359-62. doi: 10.1111/cas.12337.
4. **Liu X**, Ogasawara S, Kaneko MK, Oki H, Hozumi Y, Goto K, Takagi M, Kato Y. A novel monoclonal antibody SMab-2 recognizes endogenous IDH2-R172S of chondrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Apr 17;459(4):636-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.162.

共著論文

1. Ogasawara S, Kaneko MK, Tsujimoto Y, **Liu X**, Kato Y. Multi-specific monoclonal antibody MsMab-2 recognizes IDH1-R132L and IDH2-R172M mutations. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2013 Dec;32(6):377-81. doi:10.1089/mab.2013.0050.
2. Oki H, Kaneko MK, Ogasawara S, Tsujimoto Y, **Liu X**, Sugawara M, Takakubo Y, Takagi M, Kato Y. Characterization of Monoclonal Antibody LpMab-7 Recognizing Non-PLAG Domain of Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Jun;34(3):174-80. doi: 10.1089/mab.2014.0090.
3. Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, **Liu X**, Kaneko MK, Takano S, Kato Y. A high-sensitive HMab-2 specifically detects IDH1-R132H, the most common IDH mutation in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Oct 30;466(4):733-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.070.

4. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, **Liu X**, Ishikawa E, Kaneko MK, Ogasawara S, Matsuda M, Noguchi M, Matsumura A. Diagnostic advantage of double immunohistochemistry using two mutation-specific anti-IDH antibodies (HMab-1 and MsMab-1) in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015 Jul;32(3):169-75. doi: 10.1007/s10014-015-0214-8.
5. Honma R, Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, **Liu X**, Nakamura T, Kaneko MK, Takagi M, Kato Y. Establishment of Novel Monoclonal Antibody PMAb-32 Against Rabbit Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2016 Feb;35(1):41-7. doi: 10.1089/mab.2015.0066.
6. Kaneko MK, Oki H, Hozumi Y, **Liu X**, Ogasawara S, Takagi M, Goto K, Kato Y. Monoclonal Antibody LpMab-9 Recognizes O-glycosylated N-Terminus of Human Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Oct;34(5):310-7. doi: 10.1089/mab.2015.0022.
7. Oki H, Honma R, Ogasawara S, Fujii Y, **Liu X**, Takagi M, Kaneko MK, Kato Y. Development of Sensitive Monoclonal Antibody PMAb-2 Against Rat Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Dec;34(6):396-403. doi: 10.1089/mab.2015.004
8. Ogasawara S, Oki H, Kaneko MK, Hozumi Y, **Liu X**, Honma R, Fujii Y, Nakamura T, Goto K, Takagi M, Kato Y. Development of Monoclonal Antibody LpMab-10 Recognizing Non-glycosylated PLAG1/2 Domain Including Thr34 of Human Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Oct;34(5):318-26. doi: 10.1089/mab.2015.0018.

学術発表

1. 第33回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013年10月 神奈川県横浜市
骨肉腫における変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現解析
2. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014年6月 宮城県仙台市
骨肉腫における変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現解析

3. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月 愛知県名古屋市
新規 IDH2 抗体による軟骨肉腫における IDH2-R172S 変異の解析