

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10762

研究課題名(和文) 悪性グリオーマのBRAF V600E遺伝子変異を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment targeting BRAF V600E mutation in malignant glioma

研究代表者

黒田 順一郎 (Kuroda, Jun-ichiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90536731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：RAS-MAPキナーゼ経路の活性化を起こすBRAF遺伝子のV600E変異が近年、悪性グリオーマにおいても報告されている。この変異を有す悪性グリオーマの中には摘出術、放射線治療、化学療法からなる標準治療を施行しても髄液播種や他臓器転移を来し予後不良な症例がある。本研究の目的はBRAFV600E変異膠芽腫細胞株を樹立し、前臨床試験でBRAF阻害薬の薬効・薬理を明らかにし将来の臨床展開を目指すものであった。細胞株としてはBRAF V600E変異を有する膠芽腫からの細胞株の樹立に成功したがIn vivo実験では細胞株の移植モデルの確立には至らず今後の検討事項とした。一方で臨床検体の解析から知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍は脳の臓器特異性から手術や薬剤を使用した治療法に制限を受け、予後も不良である。一方で脳腫瘍研究の進歩から治療ターゲットとなりうる遺伝子変異も多数、報告されてきている。本研究ではBRAFV600E変異に注目して、悪性脳腫瘍の臨床例から本変異を有する細胞株を樹立した。この成果によってBRAF阻害薬の薬効検討や耐性獲得機序の解明の研究に資するという学術的意義を持つ、また、研究成果から悪性脳腫瘍に有効な新規治療法開発につながるという社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：BRAF V600E mutation causes activation of the RAS-MAP kinase pathway has also been recently reported in malignant glioma. Some malignant gliomas with this mutation have a poor prognosis due to cerebrospinal fluid dissemination and metastasis to other organs even after standard treatment consisting of removal, radiation therapy and chemotherapy. The purpose of this study is to establish the BRAF V600E mutant glioblastoma cell line, clarify the efficacy and pharmacology of BRAF inhibitors in preclinical studies, and future clinical development. We succeeded in establishing one cell line from glioblastoma with BRAF V600E mutation, but in vivo experiments did not lead to the establishment of orthotopic transplantation model and metastasis model of the cell line. We obtained new findings by analyzing clinical specimens.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 BRAFV600E変異 BRAF阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

本研究に関連する研究動向および位置づけ

悪性グリオーマはその治療に摘出術、放射線治療と化学療法からなる集学的治療を必要とする予後不良の疾患であり、既存の標準治療を上回る効果的な新規治療法の開発が精力的に進められている。

セリン - スレオニンキナーゼである BRAF において 600 番目のアミノ酸がバリンからグルタミン酸に変化する変異 BRAF V600E (図 1) は全固形癌の約 8% でみられ、転移性悪性黒色腫では約 50%、甲状腺癌では 30 ~ 70%、卵巣癌では 30%、結腸・直腸癌では 10% の割合で認められている。近年、脳腫瘍においても pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA) の 65%、PXA with anaplasia の 65%、ganglioglioma の 18%、anaplastic ganglioglioma の 50%、extracerebellar pilocytic astrocytoma の 9% に認められることが報告された (Schindler G, Capper D, Meyer J et al. *Acta Neuropathol.* 2011; **121**: 397-405)。また、epithelioid glioblastoma の 50% 強にも認められる (Kleinschmidt-DeMasters BK et al. *Am J Surg Pathol.* 2013; **37**: 685-698.)

BRAF V600E の特異的阻害薬であるベムラフェニブ vemurafenib は海外で、BRAF V600E 変異を有する根治切除不能な 期/ 期の悪性黒色腫患者を対象とした第 相臨床試験において、対照薬群に対し全生存期間及び無増悪生存期間を有意に延長した。これを受けて本邦でも BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫でベムラフェニブは承認されている。

これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

研究代表者はこれまでに 2 例の BRAF V600E 変異を有する膠芽腫 (epithelioid glioblastoma) を経験した。1 例目は 26 歳の女性の症例であり、右前頭葉腫瘍を全摘出後に標準治療を行い、局所コントロールは良好であったものの術後 2 ヶ月目に広範な髄液播種をきたし失った (図 2)。HE 病理組織所見では類上皮状の細胞間接着が疎な腫瘍細胞より構成され播種を来しやすい性状が形態学的に示唆された。また、血管に沿った腫瘍進展や血管内への腫瘍浸潤が通常より強い傾向であった (図 3)。本症例については論文報告を行った (Kuroda JI, *Neuropathology.* 2015 Sep 16.)。2 例目は 38 歳女性の左前頭葉病変であったが診断時より後頭蓋窩・脊髄に至る広範な髄液播種を伴っていた。生検術を行い、BRAF V600E 変異を伴う epithelioid glioblastoma と診断された。放射線治療とテモゾロミド内服による治療を行ったが奏功せず術後 3 ヶ月で失った。何れの症例についても膠芽腫のなかでも極めて予後不良な経過をたどり、BRAF V600E との関連が示唆された。2 例目の組織検体からは細胞株の樹立に成功した。BRAF V600E 変異膠芽腫細胞株は研究対象として大変貴重であり、将来の臨床展開を念頭に本細胞株とベムラフェニブを用いた前臨床試験を着想した。

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

1. *in vitro* においては、BRAF V600E 変異膠芽腫株の性状を精査するため野生型 BRAF 膠芽腫株との比較でマイクロアレイを行う、遊走能、浸潤能に関するアッセイを行う。ベムラフェニブ存在下での増殖抑制効果を調べる。また、遊走能、浸潤能の変化を評価する。ベムラフェニブに対する耐性能獲得の機序について研究を展開する。
2. *in vivo* においては、同所移植マウスで治療実験を行い以下のことを明らかにする。ベムラフェニブ・テモゾロミド併用群の治療効果を評価する。コントロールはテモゾロミド単剤投与群とする。薬剤投与後の組織、髄液検体を採取し病理学的、分子生物学的に作用機作を検討する。
- 3.

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

今日、分子生物学診断法の発展に伴い、悪性脳腫瘍の分子分類は治療に直結する情報として大変重要な位置をしめた。BRAF V600E 変異悪性グリオーマに関しても将来的にベムラフェニブの臨床応用が試みられることは大いに予想される。その際に前臨床試験でのデータの蓄積は大変重要となる。

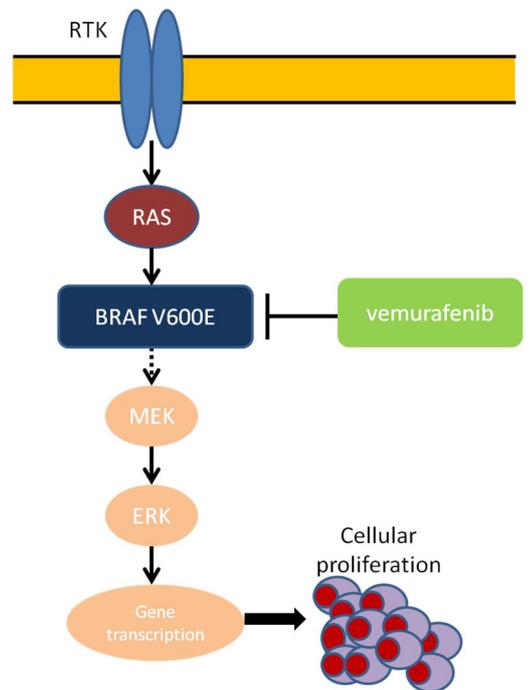


図 1 . BRAF V600E は恒常活性型でありリガンド不在でRAS-MAPK系を活性化し細胞増殖を促進する。vemurafenibはこのBRAF V600Eを特異的に阻害する。

図 4. 症例 2 の初診時造影 MRI 検査及び病理組織。A. 左前頭葉の脳室内に露出する病変を認める。B. 第 4 脳室壁、橋前面に播種に伴う造影効果を認める。C. 細胞は類円形で細胞間接着に乏しい。D. 類円形の腫瘍細胞

2. 研究の目的

RAS-MAP キナーゼ経路の活性化は多くの腫瘍で報告されている。活性化を起こす分子機構の一つに BRAF 遺伝子変異があるが、BRAF の 600 番目のアミノ酸がバリンからグルタミン酸に変化する変異 (V600E) に対する分子阻害薬ベムラフェニブ vemurafenib はメラノーマに対して臨床応用され、約 80% という高い奏効率を示す。翻って、近年、悪性グリオーマにおいても BRAF V600E 変異が報告されている。まだ、症例の蓄積は少ないがこの変異を有する悪性グリオーマには摘出術、放射線治療、テモダール投与からなる標準治療を施行しても髄液播種や他臓器への転移を来し予後不良な症例があり、新規の治療法が望まれる。本研究の目的は当施設で樹立した BRAFV600E 変異膠芽腫細胞株を用いた前臨床試験でベムラフェニブの薬効・薬理を明らかにし将来の臨床展開を目指すものである。

3. 研究の方法

In vitro 実験では培養細胞株の遊走能・浸潤能の評価と遺伝子発現の解析を行なうこと、また *In vivo* 実験では細胞株の同所移植モデルおよび他臓器転移モデルの確立を行う計画であったが 2016 年 4 月の熊本地震により研究施設および細胞株に大きな損傷を受け研究計画の変更を要した。研究期間内に経験した神経膠腫臨床検体からの新規細胞株樹立を目指した。また、採取した組織の免疫組織学的検討、分子生物学的、臨床的な検討を行った。

4. 研究成果

Table 1 に BRAFV600E 変異を認めた 4 症例の特徴を示す。若年発症、腫瘍内出血、病変に石灰化を含む特徴があった。また、no3,4 症例は研究期間中に新規追加された症例であり各々について初代細胞株の樹立を試みたが成功に至らなかった。

Table 1. Case list with clinical and radiological features.

case no.	age/Sex	KPS %	Symptom	Symptom duration	location	Intratumoral hemorrhage	calcification
1	26F	90	headache	1 week	Frontal lobe, rt	no	Yes
2	38F	70	headache	1 month	Frontal lobe, lt	no	No
3	17M	90	headache	1 month	Temporal lobe, lt	yes	No
4	51F	90	Cons. disturbance	Sudden-onset	Parietal lobe, rt	yes	Yes

Table 2 に各症例検体の免疫組織学的所見 (GFAP, Olig2, p53, CAM5.2, ATRX, INI1, MIB1LI) と pyrosequencing から得られた所見 (MGMT methylation, IDH1/2 mutation, BRAFV600E mutation) を示す。押しなべて初発膠芽腫の所見を示した。標準治療抗がん剤 (テモゾロミド) の効果予測因子となる MGMT プロモーターのメチル化は no3 に認め、他の症例と比較して予後が良好であった (Table 3)。

Table 2. Immunohistochemical and molecular features.

case no.	GFAP	Olig2	p53	CAM5.2	ATRX	INI1	MIB1LI(%)	MGMT methylation	IDH1 mutation	BRAF V600E
1	focal	focal	NA	-	+	+	80	UM	No	Yes
2	-	+	±	-	NA	NA	20	NA	No	Yes
3	+	+	+	-	+	+	30	M	No	Yes
4	+	+	-	-	+	+	15	UM	No	Yes

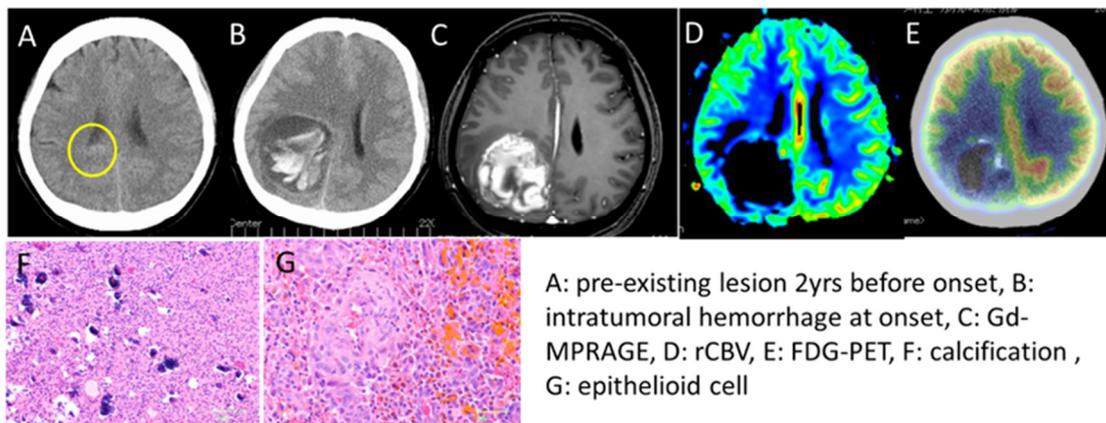
Table 3 に臨床的特徴を示す。予後を規定する因子として早期の播種 (dissemination) の有無が重要であることが示唆された。BRAFV600E 変異に加えて播種を規定する因子があることが考えられ、この因子が特定できれば有望な治療標的となると考えられる。

Table 3. Treatment and outcomes.

case no.	Histology	extent of resection	Radiation, Dose	chemotherapy	Local recurrence	dissemination	Clinical outcomes
1	E-GBM DA	GTR	Extended local 60Gy	TMZ	No	Yes post op 1m	Dead, 2 months
2	E-GBM	Biopsy	Whole neuro Brain: 60Gy Spinal: 30Gy	TMZ	No	Yes pre op	Dead, 3 months
3	E-GBM	GTR	Extended local 60Gy	TMZ	No	No	Alive at 20 months
4	DA, G3	GTR	Extended local 60Gy	TMZ	No	No	Alive at 6 months

治療標的の探索を目的として Case no 3 について更に追加検討を加えた。DNA sequencing の結果、本症例では CDKN2A/B loss, TERT promotor 124C>T 変異を認めた。症例を蓄積しての検討が必要であるが、この所見からは CDKN2A/B loss を標的とした CDK4/6 阻害薬が治療薬の候補となる可能性が示唆された。

Figure 1. Case no 3.



今後の展開

上記知見は論文化を行う予定である。なお、新規 BRAF 阻害薬、MEK 阻害薬が開発され BRAFV600E 変異を有する悪性神経膠腫治療への臨床試験も始まっている。本研究期間では達成ができなかった細胞株を用いた耐性機構の解明や *in vivo* 前臨床研究は有用と考えられ、継続して行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田順一郎
2. 発表標題 Epithelioid feature を伴ったhigh-grade diffuse astrocytomaの臨床病理像
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田順一郎
2. 発表標題 Epithelioid feature を伴ったhigh-grade diffuse astrocytoma の臨床病理像
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田順一郎
2. 発表標題 予後不良若年成人膠芽腫の臨床像
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第76回学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒田順一郎
2. 発表標題 予後不良であった若年成人膠芽腫症例の検討
3. 学会等名 第75回日本脳神経外科学術総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 英夫 (Nakamura Hideo) (30359963)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	篠島 直樹 (Shinojima Naoki) (50648269)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	牧野 敬史 (Makino Keishi) (90381011)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	