

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 金丸 優
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 917 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy
(BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法が奏功した類上皮性膠芽腫の1例より樹立した患者由来細胞株を用いた治療効果の検討)
論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 榎本 隆之
副査 准教授 武井 延之

博士論文の要旨

【背景と目的】脳腫瘍分類第4版改訂 (WHO 2016) より分子・遺伝子診断が加わり大幅な変更がなされた。類上皮性膠芽腫は新たに追加された膠芽腫の一亜型で、髄膜播種が高頻度にみられ、生存期間中央値6ヶ月と極めて予後不良の稀な腫瘍型である。遺伝子解析により、BRAF V600E (50-93%)、TERT プロモーター変異 (70%)、CDKN2A/2B 欠失 (79%) の3つの遺伝子変異が多いことが報告されている。これらの変異はいずれも腫瘍形成に重要な因子で、腫瘍増殖に関わる BRAF 変異を標的とした BRAF 阻害剤及び下流の MEK 阻害剤の併用療法は難治性・転移性悪性黒色腫において劇的な効果を示している。申請者らは放射線治療とテモゾロミド化学療法中に髄膜播種をきたし、BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法により劇的な画像上の改善を認めた BRAF V600E 変異を有する類上皮性膠芽腫の1例を経験した。また、同腫瘍より患者由来細胞株を樹立し、in vitro, in vivo における BRAF 阻害剤・MEK 阻害剤の治療効果を検討した。

【方法】手術検体、剖検組織、および患者由来細胞株をヌードマウスに移植して作成した腫瘍組織について、病理学的検討を行った。凍結生組織より遺伝子を抽出し、BRAF V600E、TERT プロモーター変異はサンガー法を、CDKN2A/2B は MLPA 法 (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) を用いて解析した。既知の神経膠腫細胞株として BRAF V600E 変異を有する AM38、DBTRG-05MG を、BRAF 変異陰性株として U87MG、T98G を、樹立した NGT41 細胞株とともに治療実験に用いた。コントロール群、BRAF 阻害剤単独群、MEK 阻害剤単独群、BRAF・MEK 阻害剤併用群の4群にわけ、細胞生存分析、アポトーシス分析、細胞周期解析、および蛋白発現解析を行った。さらに、免疫不全マウスを用いて皮下腫瘍モデルおよび脳腫瘍モデルを作成し、in vivo における BRAF・MEK 阻害剤併用療法の治療効果を検証した。

【症例】57歳男性、手術で左前頭葉脳腫瘍を亜全摘し、類上皮性膠芽腫の病理診断を得た。放射線とテモゾロミド化学療法を行ったが、治療中に両下肢麻痺をきたし、脊髄 MRI で広範な髄膜造影効果および脊

髄空洞症の所見を認めた。癌ゲノムパネルを用いた 435 癌関連遺伝子検索の結果、BRAF V600E, TERT プロモーター変異, CDKN2A/2B 欠損のみが同定された。院内倫理委員会の承認のもと、BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法を放射線治療と併用で 4 週間行ったところ、劇的な画像上の改善を認めたが、併用療法中止後に再発をきたし約 8 ヶ月で永眠、剖検を行った。

【結果】剖検組織より樹立した NGT41 細胞株は、粘液性の背景を持ち、類上皮性細胞から形成されており、手術検体、剖検検体と形態的に類似していた。遺伝子上、BRAF V600E, TERT プロモーター変異, CDKN2A/2B 欠損が確認された。NGT41 を含む BRAF V600E 変異陽性株において、BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法は、細胞生存率を減少させ、BRAF 下流の蛋白発現を抑制した。皮下腫瘍モデルでも、併用療法は有意に腫瘍細胞の増殖を抑制し、病理学的に腫瘍細胞の減少、蛋白発現の抑制を確認した。脳腫瘍モデルにおいて、わずかながら生存期間の延長効果を示した。

【考察】黒色腫において、BRAF 阻害剤単独では MAP キナーゼ経路の活性化、PDGFRB の発現増加や NRAS 変異などの別経路の活性化を起こすことで耐性が生じることが知られており、下流にあたる MEK 阻害剤を併用することが望ましいとされる。脳腫瘍に対する同治療の有効性を示唆する報告はあるものの、BRAF 変異を有する脳腫瘍を対象としたバスケット研究では、組織型により有効性が異なる可能性が示され、その適応は不明である。申請者らが樹立した細胞は、形態・遺伝子学的に BRAF V600E 変異を有する類上皮細胞性膠芽腫株と考えられた。また、申請者らの結果は、BRAF V600E 変異を有する類上皮性膠芽腫において BRAF 変異は腫瘍の発生・増殖に重要な役割を果たすドライバー変異で、BRAF・MEK 阻害剤併用療法は有効な可能性が示唆された。脳腫瘍モデルにおいて、わずかな治療効果に留まったのは、治療後の剖検組織から樹立した細胞であることが関係すると考えられた。

【結論】BRAF V600E 変異を有する類上皮性膠芽腫に対する BRAF を標的とした分子標的療法は、有効な可能性がある。申請者らが樹立した BRAF V600E 変異陽性の類上皮性膠芽腫細胞株は、新たな治療戦略の発展や、治療抵抗性の機序解明および克服に有用である。

審査結果の要旨

類上皮性膠芽腫は近年新たに分類された膠芽腫の一亜型であり、生存期間の中央値が 6 か月と極めて予後不良の腫瘍である。類上皮性膠芽腫では、3 つの遺伝子変異 (BRAF V600E 変異、TERT プロモーター変異、CDKN2A/2B 欠損) が高頻度に認められる。BRAF とその下流シグナル分子の MEK の阻害剤併用療法は、難治性の悪性黒色腫において劇的な効果を示すことが知られており、申請者らは、この併用療法に対して画像上で劇的な改善を示した類上皮性膠芽腫の 1 例を担当した。類上皮性膠芽腫に対する BRAF 阻害剤・MEK 阻害剤併用療法の奏功メカニズムを詳細に解析するために、脊髄の剖検組織から類上皮性膠芽腫のがん細胞株 (NGT41) を樹立した。NGT41 細胞は、類上皮性膠芽腫で高頻度に認められる上記の 3 つの遺伝子変異を有していた。培養 NGT41 細胞を BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤で同時に処理したところ、対照群と比較して細胞生存率が有意に低下し、BRAF・MEK の下流シグナル分子 ERK の活性化 (リン酸化 ERK) が低下していることが認められた。さらに、NGT41 細胞を免疫不全マウスに移植した皮下腫瘍および脳腫瘍モデルにおいて、阻害剤併用投与により腫瘍細胞の増殖が低下し、マウスの生存期間がわずかに延長した。これらの結果は、樹立した類上皮性膠芽腫 NGT41 細胞においても BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法が一定の効果を示している。NGT41 細胞株は、類上皮性膠芽腫に対する新たな治療戦略の確立や治療抵抗性の分子機序解明に貢献することが期待される。

本研究は、実際の症例から類上皮性膠芽腫の細胞株を樹立し、分子標的薬ががん細胞の増殖を抑える作用メカニズムの一端を明らかにした点に学位論文としての価値を認める。