

BRAF V600E 変異膠芽腫に対する分子標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究

研究代表者 立石 健祐¹⁾
研究分担者 藤井 幸彦²⁾ 棗田 学²⁾ 山本 哲哉¹⁾

1) 横浜市立大学大学院医学研究科脳神経外科学 2) 新潟大学脳研究所 脳神経外科学

研究要旨

BRAF^{V600E} 変異を有する膠芽腫など、高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療の耐性機序を分子生物学的・遺伝学的に検討した。またドラッグスクリーニングなどの手法を通じて BRAF 阻害剤や MEK 阻害剤との相乗効果により分子標的薬の不応・耐性を克服する治療法を開発することを目指した。その結果、今回のトランスレーショナル研究を通じて、MAPK 経路を標的とした分子標的治療に対し薬剤抵抗性を引き起こす分子生物学的機序が見いだされた。また研究を通じて薬剤治療抵抗性を克服する標的分子 HSP90 を見出した。

A. 研究目的

本研究では BRAF^{V600E} 変異神経膠腫に対する薬剤治療後の耐性、抵抗性の機序の解明を図るとともに、抵抗性機序を克服する分子機序を明らかにし、さらには分子機序に基づく治療法の開発を目指した。臨床像を再現する質の高いモデルを活用することはこの研究を行う上で重要であるため、分子標的治療前後に採取した腫瘍検体から初代培養細胞、さらにはヒト由来脳腫瘍マウスモデル (patient-derived xenograft, PDX) を作成し、これらのモデルを活用して研究を進めた。

B. 研究方法

横浜市立大学倫理委員会(B220100017)承認のもと、分子標的前後に採取した2種類の腫瘍細胞 YMG62, YMG89 (P; 治療前, R; 治療後)と分子標的治療後に採取した新潟大学脳研究所にて樹立した NGT41R 腫瘍細胞に対して細胞培養を行ったところ、安定細胞株が樹立された。また腫瘍細胞を免疫不全マウス (SCID Beige) マウスの脳内に移植したところ、ヒト由来 BRAF 変異神経膠腫細胞株 (PDX) モデルの樹立に成功した。そこでこれらの細胞株を用いて以下の検討を行った。

1. 全エキソン解析を通じた耐性化に関わる遺伝子

異常の網羅的解析

2. High throughput drug screening による薬剤感受性試験を通じて生体分子経路を調節する標的分子の探索
3. BRAF^{V600E} 変異細胞株および PDX を用いた治療効果の検証

C. 研究結果

最初に ①患者腫瘍同様に、PDX マウスモデルで髄膜播種を主体とした腫瘍形成を呈する表現型の再現、②PDX モデルでも BRAF V600E、TERT 変異、CDKN2A 欠失といった遺伝子異常を有する遺伝型の再現、③*in vitro* での分子標的治療反応性／抵抗性の再現などを確認した。また、耐性株では分子標的薬投与下で MAP kinase 経路の再活性化や PI3 kinase 経路の活性化を Western blotting 法を通じて明らかにした。特に PI3K 経路の AKT と MAPK 経路下流の p90RSK が薬剤濃度、投与時間依存的に活性化することから、薬剤耐性化との関連が強く示唆された。このことから、BRAF^{V600E} 変異神経膠腫細胞における分子標的治療の耐性機序は RTK 経路、MAPK 経路や AKT-mTOR 経路のフィードバック機構による

活性化が主たる要因であることが判明した。

次に分子標的薬に耐性を示す YMG89R 細胞に対して BRAF 阻害剤との併用効果について 1,280 種類の化合物を用いて網羅的に検証したところ、65 種類の薬剤で BRAF 阻害剤との併用効果が認められた。中でも複数の HSP90 阻害剤が BRAF 阻害剤との併用効果を示したことから、HSP90 阻害剤は分子標的薬との併用効果を示す可能性を有すると考えられた。そこで複数の *BRAF^{V600E}* 変異神経膠腫細胞株において BRAF 阻害剤あるいは MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤 (BIIB021) との併用効果を検証したところ HSP90 阻害剤、BRAF 阻害剤、MEK 阻害剤単独での抗腫瘍効果は乏しく、一方で併用により強い相乗効果が生まれることが判明した。更に動物モデルで検証するため、複数の *BRAF^{V600E}* 変異神経膠腫細胞株をマウス皮下に移植し、PDX モデルを作成し治療したところ MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤の併用療法により腫瘍は退縮後に消失し、この所見は長期間に及びました。またマウス脳腫瘍モデルを用いて治療効果を検討したところ、皮下腫瘍モデル同様に MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤による併用療法により有意な生存期間の延長効果が確認された。

D. 考察

BRAF^{V600E} 変異高悪性度神経膠腫に対し、BRAF 阻害剤、MEK 阻害剤は治療上その効果が期待される分子標的薬である一方、分子標的薬に対する治療反応を示さない例 (不応) や治療後に耐性化を引き起こす例が多く報告されている。このことから薬剤耐性の機序や耐性化を克服する治療法の開発が望まれている。今回の研究では、分子標的治療前後の検体を活用するとともに、臨床像を広く模倣する細胞株、動物モデルを樹立したことで、病態の解明や治療標的分子を同定するなどといった詳細な検討が可能となった。その結果 *BRAF^{V600E}* 変異高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療後の主たる耐性化機序は、フィードバック機構による MAPK 経路や AKT-mTOR 経路の過剰な活性化であることが判明した。さらに、HSP90 は MAPK 経路を標的とした分子標的治療後の耐性化を克服する重要な標的分子であることが判明した。このことから分子標的治療による効果

が乏しい症例や耐性化を期待した症例では、HSP90 阻害剤を併用することで腫瘍抑制効果が得られることが期待できると考えられる。近年では血液脳関門を通過し中枢神経に移行しうる HSP90 阻害剤が開発されていることから臨床応用に向けた研究が進められています。しかしながら実際の臨床への応用には課題は残ることからも、次年度以降も多角的に研究を進める必要があると考えている。

E. 結論

臨床情報と腫瘍検体から樹立したヒト由来脳腫瘍マウスモデル (PDX モデル) を活用したトランスレーショナル研究を通じて、*BRAF^{V600E}* 変異高悪性度神経膠腫の分子標的治療法に対する薬剤抵抗性機序を解明するとともに、耐性化を克服する標的分子と治療候補薬剤を見出した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 Sasame J, Ikegaya N, Kawazu M, **Natsumeda M**, Hayashi T, Isoda M, Satomi K, Tomiyama A, Oshima A, Honma H, Miyake Y, Takabayashi K, Nakamura T, Ueno T, Matsushita Y, Iwashita H, Kanemaru Y, Murata H, Ryo A, Terashima K, Yamanaka S, **Fujii Y**, Mano H, Komori T, Ichimura K, Cahill DP, Wakimoto H, **Yamamoto T** and **Tateishi K**. HSP90 inhibition overcomes resistance to molecular targeted therapy in *BRAF^{V600E}* mutant high-grade glioma. *Clin Cancer Res (in press)*

2. 学会発表

1. 立石健祐: PCNSL における NF-κB 経路の重要性-マウスモデルを用いた検討-. 第 2 回 PCNSL Scientific Exchange Meeting (パネリスト). Online 形式. 2022.1.
2. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第 39 回日本脳腫瘍学会学術総会, 2021,12, 神戸.
3. 立石健祐, 笹目丈, 山本哲哉: *BRAF^{V600E}* 変異高悪性度グリオーマに対する分子

標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究. 2021 年度新潟大学脳研究所 共同研究成果報告.

2021,11, 新潟.

4. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第 80 回日本脳神経外科学会学術総会 (シンポジウム), 2021,11, 横浜.
5. 立石健祐: 中枢神経原発悪性リンパ腫の病態と遺伝子異常. 第 59 回日本癌治療学会学術集会 (臓器別シンポジウム), 2021,10, 横浜.
6. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 林貴啓, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第 80 回日本脳神経外科学会学術総会 (シンポジウム), 2021,10, 横浜.
7. 立石健祐, 三宅勇平, 本間博邦, 河津正人, 佐々木重嘉, 吉井幸恵, 脇本浩明, 永根基雄, 市村幸一, 山本哲哉: トランスレーショナルアプローチにて見えた中枢神経原発悪性リンパ腫の進展機序と治療標的. 第 21 回分子脳神経外科学会学術総会, 2021,9, 京都.
8. 立石健祐: PCNSL 症例に対するベレキシブル錠の使用経験. PCNSL web conference in Kanagawa (講演), 2021,6, 横浜.
9. 立石健祐: BRAF 変異脳腫瘍の臨床像と分子標的治療の展望. 第 62 回日本神経病理学会学術総会 (ワークショップ), 2021,5, 東京.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

プレスリリース

https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2021/20220330tateishi_ccr.html

※ 本研究を遂行する上で脳研究所が独自に樹立した BRAFV600E 変異膠芽腫細胞株 NGT41R を活用し、多角的に検証を行った。また脳研究所脳神経外科学が得た臨床情報を論文作成の資料として活用した。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし