

出國報告（出國類別：進修）

美國波士頓
Dana-Farber Cancer Institute
神經外科重症照護與神經醫學研究
進修心得報告

服務機關：衛生福利部豐原醫院神經外科

姓名職稱：張正一 醫師

派赴國家：美國波士頓

出國期間：中華民國 108 年 06 月 06 日至 07 月 02 日

報告日期：中華民國 108 年 09 月 27 日

摘要

美國波士頓 Dana-Farber Cancer Institute 為世界首屈一指的神經腫瘤治療與研究中心，在臨床治療上與 Brigham and Women's Hospital 合作照護病人，教學上則同屬哈佛醫學院教學醫院。此次出國進修，乃延續 104 年出國進修計畫，至 Dana-Farber Cancer Institute 進行為期約一個月的參訪與研究。

進修期間，臨床部分主要藉由參與各項臨床例行性會議、加護病房與一般病房查房、參觀手術過程，學習各種臨床知識與技能。研究部分，職本身研究專長主要為神經腫瘤標靶藥物治療與抗藥性研究，在美國相關專家指導，豐原醫院支持及台中榮民總醫院教研部研究團隊協助下，對神經腫瘤治療過程，對標靶藥物治療產生抗藥性的作用機轉，及相關研究亦有所突破。回國後將進一步研究，期待未來提供神經腫瘤患者治療上的參考。

目 錄

	頁 碼
壹、進修目的.....	4
貳、進修過程	
一、臨床部分	5
二、基礎研究部分	5-12
參、進修心得與建議.....	12

壹、 進修目的：

職張正一醫師，於 97 年 11 月 1 日起任職於衛生福利部豐原醫院神經外科，擔任主治醫師，同時兼任神經外科主任。於 100 年 6 月自中興大學生命科學研究所畢業，取得博士學位，研究專長為神經腫瘤與神經炎症反應相關基礎研究。自任職於豐原醫院除一般神經外科臨床工作，亦努力於建立各項神經外科病患臨床照顧常規及外科加護病房深化整合治療制度，於基礎研究部分，在院方與台中榮總教學研究部支持下，仍持續從事神經醫學相關基礎研究，於每年均投稿至國際期刊。如何在國內有限的醫療資源下提供優質的神經外科臨床照護品質予民眾，並於基礎研究上有所突破，進一步結合產官學界的力量，跟上現代醫學發展的腳步，在未來提供照護民眾健康更多的選擇，一向為院方與職努力的目標。美國波士頓 Dana-Farber Cancer Institute 醫院是世界級的神經腫瘤研究中心，中心主任 Dr. Patrick Y. Wen 為美國神經腫瘤醫學會主席與學會發行雜誌主編，在豐原醫院賴慧貞院長支持及台中榮民總醫院沈炯祺主任推薦下，有幸至波士頓跟隨 Dr. Patrick Y. Wen 學習。出國進修目的，在於習得最新神經醫學基礎研究的進展，藉由實驗及討論的過程，對過去研究過程所面臨的瓶頸期待有所突破，並藉由參與臨床工作與會議的過程了解美國照顧神經外科病患的內容，回國後作為臨床照顧病人的參考。

貳、進修過程

一、臨床部分

受限當地醫療法令相關規定，於美國停留期間，臨床部分主要內容為參加每週例行性臨床討論會，參與並觀察 Dr. Patrick Y. Wen 每天的門診及查房工作。手術部分，在 Dr. Patrick Y. Wen 協助下，參與 Brigham and Women's Hospital 神經外科部門會議與並參觀手術過程。

二、基礎研究部分，

1. 研究計畫的背景及相關研究情況

膠質瘤(glioma)是源自於中樞神經系統的神經膠細胞，是常見的惡性神經系統腫瘤之一。臨床上分類，依細胞型態及分化生長狀況而定，從細胞型態上可分為星狀細胞瘤、寡樹突細胞瘤、室鼓膜瘤、混合瘤。其中又以第四級星狀細胞瘤[多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma)]最為惡性 (Louis et al., 2007)。組織病理學上，惡性膠質瘤的高度增生、浸潤式侵襲、血管新生、核心壞死、外圍缺氧特性，造就膠質瘤病患治療的困難。多數病患接受傳統的手術治療、放射線治療及化學治療，仍無法獲得理想控制。從被診斷出開始，惡性膠質瘤患者的平均存活期約 1 年(Klingler et al., 2015; Navis et al., 2013; Schiff et al., 2015)。因此，發展早期偵測診斷膠質瘤的技術，治療方式及藥物，更有效的對抗治療抗性治療模式及策略是一刻不容緩的課題。生長因子及細胞膜受體酪胺酸激酶調控腫瘤細胞的生物特性，包括生長、存活、移行侵襲、抗凋亡、抗性等。近年來許多研究發現膠質瘤在基因及細胞訊息傳遞有明顯的變異，而這些變異會促使腫瘤細胞成長不受控制、腫瘤血管增生、使細胞更具侵犯性，終使腫瘤不斷增生導致臨床治療反應不佳。突變活化、過量表現、移位等是常見生長因子受體變異的方式。膠

質瘤可發現 EGFR、VEGFR、PDGFR、c-MET、RET、AXL 等受體酪胺酸激酶及相關上下游分子 HGF、TP53、INK4、PTEN、Mst1 等的變異。而這些基因或訊息傳遞狀況的變異，亦成為設計並開發以分子或基因治療為標的的研究契機(Chao et al., 2015; Greenall et al., 2015; Klingler et al., 2015; Navis et al., 2013; Schiff et al., 2015; Wykosky et al., 2015)。

EGF/EGFR 傳遞相關的訊息對中樞神經系統的發育、神經膠細胞的生成扮演著重要的角色。研究指出，EGFR 在惡性度最高的多形性膠質母細胞瘤上，可發現約三至四成有基因異常表現/擴大表現跡象。這些 EGFR 基因異常表現的惡性膠質瘤細胞中，又有約有近 40%的受體有特殊變異的跡象，這類變異型的 EGFR 又稱為第三型變異 EGFR (EGFR variant III, EGFR vIII)。EGFR 基因的異常表現常使得腫瘤細胞生長加快、周遭血管增生、使腫瘤對治療的抵抗力愈高、病患的預後更差(Aldape et al., 2004)。這些現象暗示著也許藉由抑制此 EGFR 異常表現可部份達成治療腫瘤的目的。

Gefitinib 及 Erlotinib 等藉由可逆性的抑制細胞內酪胺酸激酶磷酸化的過程，使訊號無法繼續傳遞達成抑制腫瘤的目的。治療的效果常與 EGFR 基因的變異情況有關，但某些無此等基因變異的患者，亦發現對此藥物顯現出一定程度的效果(Stegmaier et al., 2005)。許多研究顯示 gefitinib 等對惡性膠質瘤細胞具有抑制細胞生長的功效，而此等抑制效果與 EGFR 的表現程度無關(Guillamo et al., 2009; Rich et al., 2004)。病患對 EGFR 抑制劑的反應療效與 EGFRvIII 致癌基因及 PTEN 腫瘤抑制蛋白有關，具備同時表現 EGFRvIII 及 PTEN 者，對藥物有較好的反應(Mellinghoff et al., 2005)。部份臨床研究亦顯示 gefitinib 等亦可強化病患對放射治療的效果。然而令人失望的是以此藥物用於治療惡性膠質瘤病患，目前許多第一及第二期人體治療實驗結果顯

示，約 10%至 20%的惡性膠質瘤病患對 gefitinib 等的治療有較明顯的助益，但病患的整體預後卻未見改善(Rich et al., 2004)。依目前臨床試驗的結果，單以此藥物作為化學治療的選擇顯然是不夠的，若仍希望藉由抑制 EGFR 相關的訊號改善病人的預後，可能必須對腫瘤細胞產生的抗藥性及潛在的作用機轉作進一步的研究，期待篩選出藥物敏感度高的腫瘤，或嘗試與其他抗癌藥物並用提高腫瘤治療的效果。

細胞癌化及惡化過程牽涉多重基因的變異，這些變異可能導致抗性或代償性拮抗變化。除了起始的基因突變外，惡性膠質瘤患者約有 80%會出現繼發性(acquired alteration)受體酪胺酸激酶及 PI3K/Akt/mTOR 路徑的變異。其中 EGFRvIII 更會進而促使 c-MET、AXL、PDGFR、VEGFR、FGFR 的變異及活化(Greenall et al., 2015; Klingler et al., 2015; Wykosky et al., 2014)。此外，惡性膠質瘤多數會有 Bcl-2 抗凋亡蛋白質的過度表現(Ganigi et al., 2005)。因此，其他受體酪胺酸激酶的同時變異活化、gefitinib 等處理過程衍生的受體酪胺酸激酶代償性變異活化、凋亡的抑制等，應該是 gefitinib 等藥物使用濃度過高及抗性的原因。同時，這些也應該是尋求對抗 gefitinib 等抗性的合理標的。研究顯示，PI3K/Akt/mTOR 抑制劑、細胞自噬(autophagy)抑制劑、HDAC 抑制劑、促凋亡蛋白質活化劑、mGluR 抑制劑等，可提高膠質瘤細胞的 EGFR 受體酪胺酸激酶抑制劑敏感性(Cheng et al., 2012; Eimer et al., 2011; Kaur and Tikoo, 2013; Klingler et al., 2015; Wykosky et al., 2014)。也陸續發現 AXL 受體酪胺酸激酶抑制劑、metformin、AMPK 活化劑、DUSP1、miRNA、Hippo 活化劑等，可協同 EGFR 受體酪胺酸激酶抑制劑的肺癌細胞作用(Chao et al., 2015; He et al., 2013; Li et al., 2014; Orr et al., 2011; Panner et al., 2010; Qj et al., 2013; Sato et al., 2012; Schiff et al., 2015; Shen et al., 2013;

Silginer et al., 2015; Ye et al., 2009)。除了 EGFR 受體酪胺酸激酶抑制劑外，PDGFR、VEGFR、c-MET、RET、AXL 等受體酪胺酸激酶抑制劑單獨使用，也會產生抗膠質瘤惡化效果(Navis et al., 2013; Popescu et al., 2015)。其他細胞內的媒介分子如 Yes-associated protein 1 (YAP1)、PI3K/Akt/mTOR、AMPK、FoxO3、Mst1、ubiquitin-specific protease 8 (USP8)、leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1 (LRIG1)、DUSP1、AhR 等也是膠質瘤控制的介入標的(Chao et al., 2015; He et al., 2013; Orr et al., 2011; Panner et al., 2010; Qj et al., 2013; Sato et al., 2012; Schiff et al., 2015; Shen et al., 2013; Silginer et al., 2015; Ye et al., 2009)。但是這些研究仍顯示單一治療策略無法提供長時期的膠質瘤控制，藥物的合併使用預期將發揮更好的抗癌效果，目前亦是研發的重點。

2. 結果與討論：

臨床實務及學理上顯示，釐清膠質瘤治療抗性的原因、探討產生抗性的細胞內因子、找尋增加細胞敏感性的藥物及策略，是研究發展的主要方向也是可行的策略。合併治療或多重標靶藥物可降低細胞增生、改善抗藥性的產生、減少復發、延緩/逆轉轉端轉移。針對治療抗性的膠質瘤患者，合併治療或多重標靶藥物治療等策略正廣泛被探討研究。但是目前合併治療或多重標靶藥物治療有效的原因、媒介分子、作用機制等問題，尚待釐清補強。

膠質瘤患者的高血管增生特性與 HGF/c-MET 有關。同時抑制 c-MET、VEGFR2、RET、AXL 等的多重受體酪胺酸激酶抑制劑 cabozantinib 是熱門的標靶治療藥物。Cabozantinib 膠質瘤的單獨治療或合併治療，也是目前臨

床及細胞動物實驗的重要藥物。膠質瘤細胞的 cabozantinib 反應多樣，部份反應後多會出現抗性問題(Navis et al., 2013; Schiff et al., 2015)。通常 EGFR 受體酪胺酸激酶抑制劑抗性的癌細胞會出現高 ERK、PI3K/Akt/mTOR、c-MET、PDGFR、AXL 等特性(Greenall et al., 2015; Klingler et al., 2015; Wykosky et al., 2015)。Cabozantinib 應該是改善膠質瘤細胞 gefitinib 等藥物抗性的潛在合併治療藥物。目前尚無文獻顯示 cabozantinib 與 gefitinib 合併使用的效果。以人類膠質瘤細胞株 U87 為實驗模式，我們發現 cabozantinib 確實會增加膠質瘤細胞 gefitinib 的敏感性，包括細胞存活抑制及移行抑制。透過酵素分析發現，cabozantinib 與 gefitinib 合併使用會提升 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性。結果顯示，細胞凋亡是合併治療細胞傷害的作用模式。

外源性受體訊號(Fas、TRAIL 或 TNF- 受體)及內源性粒線體訊號可活化起始 caspase-3 媒介的細胞凋亡。不同路徑過程中，caspase-8 與死亡受體訊號有關，caspase-9 與粒線體訊號有關，caspase-10 與 granzyme B 訊號有關，caspase-12 與 ER 訊號有關(Adams and Cory, 2007)。Bcl-2 蛋白家族對於這一路徑的調控扮演重要角色。Bcl-2 家族蛋白依據功能可區分為三類，第一類為抗凋亡蛋白質，可保護細胞免於傷害，促進細胞存活，成員包括，Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等。第二類為凋亡蛋白質，可誘發細胞凋亡，成員包括，Bax、Bak 等。第三類為 BH3 促凋亡蛋白質(BH3-only proteins)，參與誘發細胞凋亡，成員包括，Bad、Bid、Bim、Noxa、Puma 等(Adams and Cory, 2007)。BH3 促凋亡蛋白質可直接活化凋亡蛋白質以造成細胞凋亡。另一方面，也可能是透過抑制抗凋亡蛋白質，促使凋亡蛋白質在粒線體膜上形成寡聚體，而導致細胞凋亡的進行。細胞內 caspase 活性也會受到另一類的調控，inhibitor of apoptosis protein (IAP)類例如 XIAP 及 survivin 會結合及抑制 caspase 活性，

而 IAP 的拮抗分子例如 Smac/DIABLO 會結合抑制 IAP 活性(Adams and Cory, 2007)。臨床檢體分析發現，惡性膠質瘤復發患者會增加 Bcl-2、Mcl-1 等抗凋亡蛋白質表現卻降低 Bax 等凋亡蛋白質表現(Strik et al., 1999)。進一步分析更發現，不論是抑制 Bcl-2 等抗凋亡蛋白質表現或促進 Bim 等 BH3 促凋亡蛋白質表現，都可造成惡性膠質瘤細胞凋亡(Jiang et al., 2003, 2004)。這些研究結果說明，惡性膠質瘤細胞尚保有進行細胞凋亡的機制，如何適當引發細胞凋亡機制應該是對抗惡性膠質瘤的一種治療策略。研究顯示，ER 會適應性的啟動一連串機制以克服細胞變動壓力，即稱為 ER stress。通常 ER 可透過 ATF-6、PERK、IRE-1 等三項路徑來啟動 ER stress。變動促成 ATF-6 脫離 GRP78 分子的結合，游離的 ATF-6 分子會被切割，切割後的 ATF-6 片段可轉位至細胞核，具有轉錄因子功能。IRE-1 分子被磷酸化後具有活性，可切割修飾 XBP1 mRNA，剪接後的 XBP1 mRNA 會轉譯出具有轉錄因子功能的蛋白質。而磷酸化的 PERK 分子可磷酸化 eIF2 分子，進而誘發 ATF-4 及 CHOP 等轉錄因子表現。這些過度的 ER stress 變化及轉錄因子可影響 Akt 活性、DR5 表現、Bcl-2 相關基因表現、Atg 相關基因表現等，進而參與細胞增生、凋亡、自噬、基因表現等調控(Cao et al., 2015; Dandekar et al., 2015; Johnson et al., 2014; Pan et al., 2015; Zhang et al., 2015)。TRAF2 也是 ER stress 啟動的轉接蛋白質之一(Johnson et al., 2014)，TRAF2 可透過蛋白質結合方式來啟動訊息傳遞，包括 IKK 及 Ask1 等。而 Ask1 更可串聯活化 JNK/p38 家族分子，以起始促凋亡蛋白表現及促成細胞凋亡。累積的研究也指出，ROS 是媒介 ER stress 及促凋亡蛋白表現的重要介質(Jung et al., 2015; Wang et al., 2015)。細胞凋亡的不活化是腫瘤治療抗性的關鍵，而促凋亡蛋白的活化是解決 gefitinib 等抗性的有效策略(Wykosky et al., 2014)。已知，ROS/ER stress

是誘發促凋亡蛋白表現及 p38/JNK 活化的路徑之一(Jung et al., 2015; Wang et al., 2015)。我們推論，ROS/ER stress/p38, JNK/Bim, Puma, Noxa 應該是 gefitinib/cabozantinib 誘發細胞凋亡的媒介路徑。本年度計畫重點將探討 gefitinib/cabozantinib 作用下，細胞凋亡路徑的活化特性、促凋亡蛋白角色及表現調控特性、ROS/ER stress/p38, JNK 路徑的角色及活化調控特性。我們發現，gefitinib 及 cabozantinib 的處理會降低抗凋亡蛋白質 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 蛋白質含量；增加 BH3 促凋亡蛋白質 Bad、Bim、Noxa、Puma 蛋白質含量，降低 Bad 磷酸化幅度及 Bnip3 蛋白質含量；增加促凋亡蛋白質 Bax 蛋白質含量及粒線體分佈；增加外源性細胞凋亡路徑分子 DR4、DR5、FADD 蛋白質含量，降低對抗性 FLIP 蛋白質含量；caspase 抑制劑性分子 XIAP、survivin 蛋白質含量。這些分析結果顯示，gefitinib/cabozantinib 合併的膠質瘤毒殺作用牽涉外源性及內源性細胞凋亡路徑。

關於 ER stress 方面，gefitinib 及 cabozantinib 的處理會增加 GRP78、CHOP 蛋白質含量，增加 PERK、IRE1、eIF2 蛋白質磷酸化幅度。顯示 ER stress 的產生。進一步分析也發現，ER stress 衍生的下游分子，包括 TRAF2 蛋白質含量，Ask1、p38、JNK 蛋白質磷酸化幅度等，都會因為 gefitinib 及 cabozantinib 的處理而上升。同時也發現，抗氧化劑 NAC、ER stress 抑制劑 salubrinal、p38 抑制劑 SB203580、JNK 抑制劑 SP600125，都可緩解 gefitinib/cabozantinib 的膠質瘤細胞傷害。

除了 ER stress 路徑的活化外，實驗分析也觀察到 ERK 蛋白質磷酸化幅度上升及 Akt 蛋白質磷酸化幅度下降。ERK 抑制劑 U0126 及 Akt 抑制劑 LY294002，更加惡化 gefitinib/cabozantinib 的膠質瘤細胞傷害。意即，ERK 活化應該是細胞對抗 gefitinib/cabozantinib 膠質瘤細胞傷害的內源性機制。

而 Akt 活性低下也與 Bad 磷酸化幅度低下，變化吻合，說明 Akt/Bad 路徑的變動。

此外，實驗也發現，gefitinib 及 cabozantinib 的處理會增加 LKB1、AMPK 蛋白質磷酸化幅度及 FoxO3a 蛋白質含量。已知 LKB1、AMPK、FoxO3a 等也都是調控細胞凋亡的重要分子。結果顯示，gefitinib/cabozantinib 膠質瘤細胞傷害的細胞凋亡機制複雜。

參、進修心得與建議

人類惡性膠質瘤有高度的侵襲性，對於常見的癌症治療有抗性，原因在於細胞凋亡機制的缺陷或抑制，若能找尋有效方法來重新啟動細胞凋亡機制或釐清其他控制細胞死亡的作用方式，應該有助於膠質瘤的治療。

Gefitinib 可降低膠質瘤細胞生長及造成細胞傷害。雖然 gefitinib 可誘發細胞凋亡，但是細胞凋亡過程似乎有抗性問題。癌患者個體上的差異和癌細胞本身複雜的調控機轉，單一藥物治療也可能產生回饋性抗性及代償性基因活化，因此找尋更深入的作用路徑，將有助於促使癌細胞走向細胞凋亡，也是癌症治療上一個重要的方向。雖然 cabozantinib 可改善膠質瘤細胞 gefitinib 抗性。Gefitinib/cabozantinib 的膠質瘤細胞凋亡伴隨著促凋亡蛋白表現上升、ER stress、LKB1/AMPK、FoxO3a 等路徑變化，ROS、ER stress 的詳細調控等過程，仍持續進行中。詳細問題仍待我們持續釐清。