

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 竹内 雄毅

### 論文題目

*In vivo* effects of short- and long-term MAPK pathway inhibition against neuroblastoma

### 論文内容の要旨

神経芽腫は神経堤細胞を起源とする悪性腫瘍で、小児頭蓋外固形腫瘍のなかではもっとも頻度の高い腫瘍である。低リスク群の治療成績はこの十数年で大きく改善したにも関わらず、高リスク群では未だに満足の得られる成績ではない。再発神経芽腫は、高リスク群の中でも特に治療に難渋するものであり、新規治療が望まれるところである。最近では、神経芽腫に関わる遺伝子変異を標的とした分子標的治療薬の研究が広く行われている。

RAS-RAF-MEK-ERK 経路としても知られる MAPK 経路は、細胞増殖に関わる重要なシグナル伝達経路であり、*RAS* 遺伝子や *RAF* 遺伝子などの遺伝子変異が種々の癌で報告されている。再発神経芽腫の約 80%がこの MAPK 経路に関わる遺伝子変異を示すことが近年報告されており、再発例を含む高リスク神経芽腫に対する MAPK 経路を標的とした分子標的治療薬の有効性が期待されている。トラメチニブは FDA で認可された MEK 阻害剤であり、MEK kinase 活性を選択的に阻害することで MAPK 経路を阻害する。一方、CH5126766 は RAF/MEK 複合体を形成することで、MEK だけでなく RAF も同時に阻害する MEK 阻害剤で、より優れた抗腫瘍効果を示すと報告されている。我々の先行研究では、トラメチニブと CH5126766 が、MAPK 経路活性をもつ神経芽腫細胞株に対して *in vitro* で増殖抑制効果を示し、その感受性をリン酸化 ERK (pERK) 免疫組織化学で同定できることを既に報告している。

本研究では、トラメチニブと CH5126766 の神経芽腫 xenograft モデルに対する *in vivo* での効果を解析し、pERK 免疫組織化学と薬剤感受性の相関を検討した。さらに薬剤耐性獲得に対する新たな知見を得るために、MEK 阻害剤の長期投与試験を行った。

実験には 3 種類の神経芽腫細胞株 (IMR5, CHP-212, SK-N-AS) を使用した。4 週齢メスのヌードマウス (KSN/Slc) の皮下に  $5 \times 10^6$  個の神経芽腫細胞を移植し、腫瘍サイズが  $100\text{mm}^3$  に達した時点でトラメチニブ群 (3mg/kg/day)、CH5126766 群 (3mg/kg/day)、control 群 (10%DMSO) の 3 群に無作為に振り分けて、薬剤投与試験 (短期および長期試験) を行った。薬剤効果判定には、腫瘍径の測定と治療終了時点の腫瘍組織に対する組織学的解析および pERK, Ki67 の免疫組織化学による解析を行った。

結果は以下の通りである。短期投与試験では、IMR5 は MEK 阻害剤に対して抵抗性を示した。それに対して、CHP-212 と SK-N-AS は感受性を示した。しかし、トラメチニブと CH5126766 の間には有意な治療効果の差は見られなかった。また治療開始前の腫瘍組織に対する pERK 免疫組織化学では、IMR5 は pERK 陰性、一方で CHP-212 と SK-N-AS は pERK 陽性であった。さらに CHP-212 および SK-N-AS では、治療終了時の pERK および Ki67 陽性細胞率は control に比して有意に低かった。(CHP-212;  $p < 0.001$ , SK-N-AS;  $p < 0.001$ )。

長期投与試験では、MEK 阻害剤は SK-N-AS に対する抗腫瘍効果を 5 週までは示していたが、6 週以降

に腫瘍の再増大を認めた。また 8 週の薬剤投与終了時点で、腫瘍組織の pERK および Ki67 陽性細胞率はともに再上昇を示した。さらに、長期投与試験中の組織学的解析として行った 2, 4, 6, 8 週投与時点における Hematoxylin & Eosin (HE) 染色では、4 週までは未分化な神経芽腫細胞を観察できたが、6 週時点での HE 染色では腫瘍の一部が神経節細胞様に分化していた。この神経節細胞様に分化した腫瘍細胞は pERK, Ki67 ともに陰性であった。

本研究の結果から、MEK 阻害剤は、MAPK 経路活性を示す神経芽腫に対して *in vivo* においても抗腫瘍効果を示した。また MEK 阻害剤感受性神経芽腫は、pERK 免疫組織化学陽性を示した。

さらに MEK 阻害剤の長期投与により、神経芽腫 xenograft は薬剤耐性を獲得した。再増大腫瘍の pERK 陽性細胞率が再上昇しており、耐性獲得が MAPK 経路の再活性化を介していると考えられた。また MEK 阻害剤は、神経芽腫細胞の一部に対して分化誘導効果を示しており、この効果を増強する併用療法を検討することで、薬剤耐性獲得を抑制し得ると考えられた。

本研究の結論として、先行研究の *in vitro* の結果と合わせると、MEK 阻害剤であるトラメチニブおよび CH5126766 は、MAPK 経路活性をもつ神経芽腫に対して抗腫瘍効果を示し、pERK 免疫組織化学は、MEK 阻害剤感受性神経芽腫患者を的確に選別するバイオマーカーとしての有用性が期待できる。しかしながら、MEK 阻害剤に対する薬剤耐性を克服するために更なる研究が必要である。