

論文内容の要旨

論文提出者氏名 富 樫 佑 一

論文題目

Anti-relapse effect of trametinib on a local minimal residual disease neuroblastoma mouse model

論文内容の要旨

【背景】高リスク神経芽腫は、現在でも予後不良であり、新規治療法の開発が喫緊の課題である。そのため、神経芽腫の治療薬として様々な分子標的薬の研究成果が報告されてきた。MAPK 経路（以下、本経路）は細胞増殖に関わる重要なシグナル伝達経路のひとつで、再発神経芽腫の約 80%に本経路を亢進させる遺伝子変異が報告されていることから、とくに有望な治療標的と考えられている。我々もこれまでに MEK 阻害剤であるトラメチニブの神経芽腫に対する *in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍効果を確認し、報告してきた。しかし、長期投与実験では、耐性獲得による腫瘍の再増大を防ぐことができなかった。また、予備実験において、トラメチニブは腫瘍サイズが小さい場合にしか抗腫瘍効果を発揮できないことも確認され、腫瘍量が大きくなると奏功しにくくなるのではないかと推察した。そこで本研究では、トラメチニブの神経芽腫に対する治療効果を高めるために局所微小残存病変（local-minimal residual disease ; 以下、L-MRD）モデルを作成し、腫瘍全摘後にトラメチニブを投与して抗腫瘍効果を検討した。

【方法】実験は以下の方法で行なった。まずホタルルシフェラーゼを遺伝子導入した神経芽腫細胞株(SK-N-AS)を、ヌードマウスの左腎被膜下に移植し、その 14 日後に腫瘍全摘手術（左腎摘出術）を行い L-MRD モデルを作成した（対照群は 14 日後に sham 手術を行なった）。これらのマウスにトラメチニブまたは DMSO を術後 2 日目から 1 日 1 回 8 週間経口投与し、腫瘍サイズおよび生存率を解析した。腫瘍サイズについては週に 1 回、*in vivo* imaging system を用いて測定した。また *in vitro* で SK-N-AS にトラメチニブ（500nM）を投与して、フローサイトメトリーにて細胞周期解析およびアポトーシス解析を行った。

【結果】①腫瘍摘出+トラメチニブ群は局所再発を有意に抑制でき、投与期間中はほとんど局所再発を認めなかったのに対し、その他の群においては有意に短期間で腫瘍の局所再発を認めた。②腫瘍摘出+トラメチニブ群ではトラメチニブ投与期間中はすべてのマウスが生存したのに対し、他のすべての群では局所再発腫瘍の増大のために死亡し、以下のような生存率となった（sham+トラメチニブ群；20%、腫瘍摘出+DMSO 群；17%、sham+DMSO 群；0%）。Log-rank 検定を行った結果、腫瘍摘出+トラメチニブ群は、腫瘍摘出+DMSO 群（ $p=0.002$ ）および sham+トラメチニブ群（ $p=0.007$ ）の両方と比較して生存率を有意に改善した。一方、sham+DMSO 群と比較すると sham+トラメチニブ群では生存率が有意に向上し（ $p=0.010$ ）、腫瘍摘出+DMSO 群では有意な差が認められなかった（ $p=0.082$ ）。③しかしながら、腫瘍摘出+トラメチニブ群でも、トラメチニブ投与を中止すると、直後から急激な腫瘍局所再発が確認された。④フローサイトメトリーでは、トラメチニブを投与した SK-N-AS で G1 期の細胞がコントロールでの 42%に対しトラメチニブ（500nM）で治療

後は 76%と増加し（ $p=0.030$ ）、有意な G1 arrest を認めた。一方アポトーシス解析では、早期アポトーシス細胞数はコントロールにおける 3.8%に対し、トラメチニブ（500nM）治療後は 7.0%（ $p=0.13$ ）で、明らかなアポトーシスは認められなかった。

【考察】トラメチニブに代表される MEK 阻害剤は高リスク神経芽腫に対する有望な治療薬の一つであるが、我々の *in vivo* での前研究においては、トラメチニブ長期投与による増殖抑制効果は一時的で最終的に耐性誘導されること、治療効果が腫瘍量に逆相関することが limitation として示された。したがって、トラメチニブの臨床応用を考える際には、耐性獲得の抑制が最も重要であり、さらに腫瘍量が小さいほどトラメチニブの抗腫瘍効果が高発現すると推測されるため、本研究では腫瘍全摘後の微小残存病変に対するトラメチニブの投与効果を検討することとした。Jackson らが報告した神経芽腫微小残存病変モデルに準じてモデルを作成し研究を行った。結果として、我々の仮説通り、腫瘍摘出術とトラメチニブ投与の併用療法を受けたマウスでは、投与期間は 100%の生存率を得られ、トラメチニブ投与のみのマウスに比べて有意に生存期間が延長した。現在の本邦の高リスク神経芽腫に対する治療プロトコルは、寛解導入療法、地固め療法、維持療法の 3 段階に分かれており、本研究の結果から、腫瘍摘出後の維持療法期にトラメチニブを併用することで、さらなる予後の改善を期待できると考えられる。

今後の課題として、腫瘍全摘後にトラメチニブを投与した群においても、トラメチニブ投与を中止するとすぐに腫瘍の増大を認めたことから、投与終了後の再発を抑制する併用薬の選定が必要である。本研究の結果から、トラメチニブの抗腫瘍効果はアポトーシスではなく、細胞周期の停止によって得られることが示唆されたため、併用薬の候補としては、アポトーシスを誘導できるものが挙げられる。また、耐性獲得を抑制する薬剤も、有用な併用薬と考えられる。前者としては抗 GD2 抗体やイリノテカン/テモゾロミドなど、後者としては耐性獲得メカニズムとして報告されている Hippo 経路の阻害剤などが候補となりうる。現在、我々は、次のステップとしてこれらの薬剤のなかから最適な候補薬の選定をすすめている。