

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11517

研究課題名(和文) 神経芽腫に対するMEK阻害剤の前臨床試験

研究課題名(英文) Preclinical antitumor efficacy of MEK inhibitor against neuroblastoma

研究代表者

東 真弓(Higashi, Mayumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10380453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MEK阻害剤2剤(trametinib、CH5126766)の2剤を神経芽腫細胞株接種ヌードマウスに投与した結果、いずれも短期予後ではpERK陽性神経芽腫細胞株接種モデルにおいて、MEK阻害剤投与群に有意に腫瘍抑制効果が認められた。長期投与では、腫瘍の再増大が認められた(Takeuchi J Pediatr Surg. 2018 Dec; 53(12):2454-2459.)。

また、神経芽腫臨床検体のpERK免疫染色を行い、初発腫瘍と化学療法後、再発時の比較等を行った。ERKの免疫染色は治療後、再発腫瘍において陽性である症例が認められ、MEK阻害剤の適応を考慮する上で有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫におけるRas-ERK経路阻害による抗腫瘍効果解析の報告はほとんど無く、新規の治療ターゲットとして期待される。MEK阻害剤は既に成人癌領域にて臨床で使用されており効果が認められているものであり、小児への応用が行いやすい。難治性神経芽腫において、再発症例は既存の治療薬のみでは予後の改善が望めず、新規治療薬が求められる。MEK阻害剤は、腫瘍において優位である特異的なシグナル伝達経路を標的とすることから、従来の治療に抵抗性である腫瘍にも効果を示す可能性がある。本研究の結果から、抗腫瘍効果が期待できる腫瘍の同定が可能であると考えられるが、長期投与時の治療抵抗性の獲得も課題として認められた。

研究成果の概要(英文)：In short-term observation, MEK inhibitors (trametinib or CH5126766) showed significant anti-tumor effects on pERK-positive neuroblastomas in vivo model. Neither MEK inhibitors showed anti tumor effects on pERK-negative neuroblastomas. Tumors obtained tolerance to MEK inhibitors and showed regrowth in long-term administration of drugs. (Takeuchi J Pediatr Surg. 2018 Dec;53(12):2454-2459.)

In the analyses of clinical neuroblastoma cases, some tumors showed pERK positive after chemotherapy or recurrence by immunohistochemistry. This result indicates that immunohistological analysis of pERK is useful for determination of MEK inhibitor administration.

研究分野：小児腫瘍

キーワード：神経芽腫 MEK阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで Ras-ERK 経路を阻害する Trametinib (MEK 阻害剤①) およびもう一剤の新規 MEK 阻害剤 (MEK 阻害剤②) (図 1)の神経芽腫細胞株に対する作用の解析を行ってきた。この結果、MEK 阻害剤は ERK の活性化が認められる細胞株において著明な細胞増殖抑制効果を示し、これは生体内においても効果が期待できる薬剤濃度であったことを報告した。(図 2、3、Tanaka T et al. J Pediatr Surg. 2016 Sep)。逆に、ERK 活性のない細胞株においては MEK 阻害剤の効果は低く、有効性を判断するためには腫瘍における ERK 経路の活性化を判断する必要があることを明らかにした。

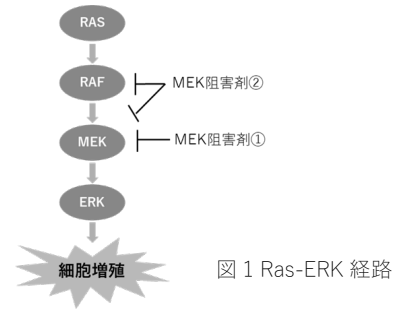


図 1 Ras-ERK 経路

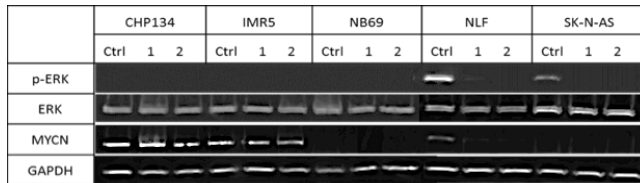


図 2 神経芽腫細胞株における pERK の解析

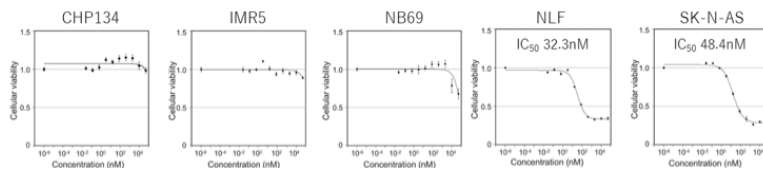


図 3 神経芽腫細胞株への MEK 阻害剤の有効性 (IC50)

我々は、臨床の場で MEK 阻害剤の効果を検測するためには腫瘍における ERK の活性化そのものを解析する方法が有効であると考えた。このため、細胞株における活性化 ERK(pERK)の免疫染色を行い、MEK 阻害剤への感受性と合致することを確認した。すなわち、pERK の染色の強い細胞株において MEK 阻害剤は著明な抗腫瘍効果をもたらした。このことから、MEK 阻害剤の臨床応用には腫瘍検体の pERK 免疫染色による感受性の推定が有用であると考えられる。

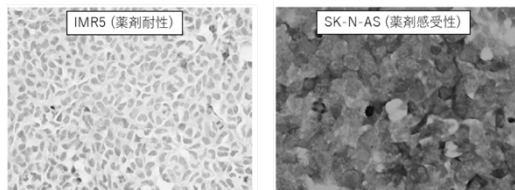


図 4 神経芽腫細胞株における pERK 免疫染色

2. 研究の目的

本研究において我々は、今後の MEK 阻害剤の神経芽腫への臨床応用を考慮し、以下の解析を目的とする。

- ① 腫瘍マウスモデルを用いた MEK 阻害剤の vivo での有効性の検討
- ② 腫瘍の MEK 阻害剤への感受性を予測する臨床マーカーの検討

3. 研究の方法

3.1. 神経芽腫マウスモデルにおける MEK 阻害剤の有効性の解析

○腫瘍モデルマウス作成および MEK 阻害剤投与

我々の先行研究で既に RAS/ERK 経路の解析をおこなっている神経芽腫細胞株 IMR5、CHP-212、SK-N-AS を各々 5×10^6 個、懸濁液としてヌードマウス(KSN/S1c)の腹部に皮下注射して腫瘍モデルを作成した。腫瘍が 100mm^3 に到達した時点よりマウスに薬剤を投与する。MEK 阻害剤①trametinib 3mg/kg/日、②CH5126766 3mg/kg/日、(control: DMSO のみ) の投薬をおこな

った。薬剤投与期間は、短期間投与群で2週間、長期間投与群で8週間とした。

○抗腫瘍効果の評価

抗腫瘍効果の評価は、①腫瘍サイズ測定、および、②腫瘍の組織学的および分子生物学的評価の比較を行った。①、②は別の群を設定する。

- ① 薬剤投与開始日より腫瘍サイズを計測し、薬剤投与群と control 群との比較を行う。
- ② 薬剤投与終了後にマウスを犠牲死させ、腫瘍組織を摘出し HE 染色および pERK 等の免疫組織化学染色を行い、薬剤投与群と非投与群の比較を行う。

3.2. 神経芽腫臨床検体における pERK 免疫染色

○検体および方法

当院で過去 30 年間に生検もしくは腫瘍摘出術が行われた神経芽腫患者の腫瘍組織および新規症例検体の HE 染色、pERK の免疫組織化学染色を行った。38 名（予後良好群 32 名、予後不良群 6 名）の神経芽腫患者の腫瘍 54 検体を用いた。

過去の神経芽腫組織はパラフィンブロック包埋された状態で保存されており、症例毎に研究利用の同意書を得ている。これらの検体よりプレパラート作成を行い、染色に用いた。

4. 研究成果

4.1. 神経芽腫マウスモデルにおける MEK 阻害剤の有効性の解析

(Takeuchi J *Pediatr Surg.* 2018 Dec;53(12):2454-2459.)

4.1.1. 短期治療

○MAPK 経路阻害は pERK 陽性神経芽腫細胞株の播種マウスにて腫瘍増殖を抑制する(図 5-1)

まず、我々は MEK 阻害剤 2 剤それぞれの 2 週間投与の治療効果の検討をおこなった。薬剤投与による死亡や 10%以上の体重減少は認められなかった。神経芽腫細胞株 IMR5 (pERK 陰性)接種モデルにおいては、腫瘍増殖抑制は認められなかった。これに対し、CHP-212 および SK-N-AS (いずれも pERK 陽性)の腫瘍は 2 週間の投薬で有意に縮小が認められた。Trametinib (TR)と CH5126766 (CH)で pERK 陽性、陰性いずれの細胞株由来モデルにおいても治療効果に有意な差は認められなかった。

○pERK の免疫染色は MAPK 経路阻害に対する感受性に相関する (図 5-2)

神経芽腫細胞株IMR5 (pERK陰性)、CHP-212およびSK-N-AS (いずれもpERK陽性)の播種モデルにおいて形成された腫瘍におけるpERKおよび細胞増殖マーカーKi67の免疫染色を行い、治療前後の比較検討をおこなった。In vitroの結果と同様に、CHP-212およびSK-N-ASの播種にて形成された腫瘍において、pERKは陽性であったが、IMR5接種モデルでは腫瘍でのpERKは陰性であった。CHP-212モデルでは、コントロール群ではpERK陽性細胞が65.5%であったが、治療群では trametinibおよびCH5126766いずれもpERK陽性細胞は0%であった。同様に、SK-N-ASモデルではコントロール群ではpERK陽性細胞は65.5%であったが、trametinib投与群では2.7%、CH5126766投与群では2.4%まで抑制された。Ki67陽性細胞は、CHP-212 モデルではコントロール55.4%に対して trametinib投与群では20.5%、CH5126766投与群では23.3%であり、SK-N-ASモデルではコントロール55.4%、trametinib投与群33.6%、CH5126766投与群31.1%といずれのモデルでも治療群において有意に細胞増殖の抑制が認められた。これに対し、pERK陰性のIMR5播種モデルにおいては、形成された腫瘍においてコントロール群と治療群にKi67細胞陽性率の差は認められなかった(コントロール: 69.6%、trametinib: 72.4%、CH5126766: 75.9%)。

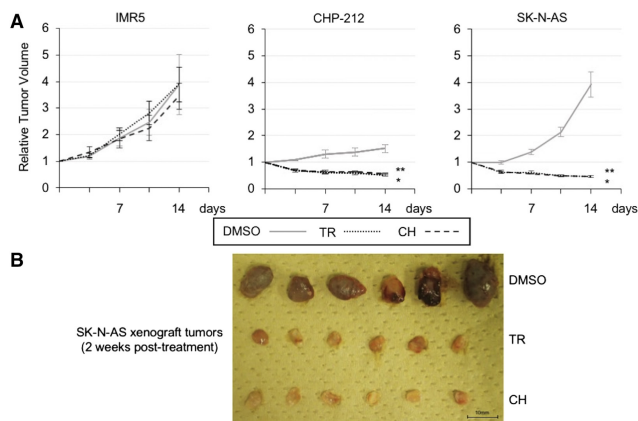


図 5-1

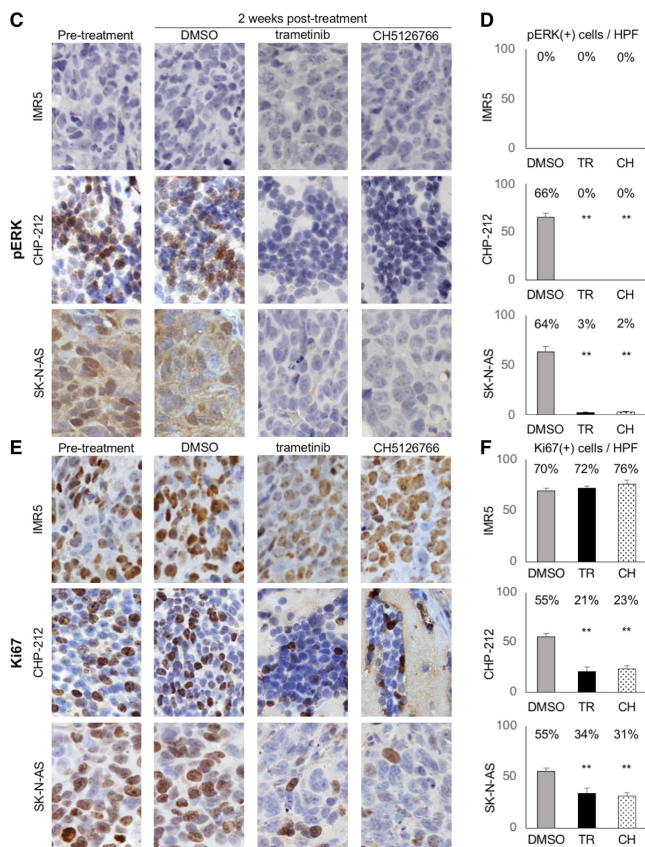


図 5-2

4.1.2. 長期治療

○神経芽腫細胞株播種モデルにおけるMEK阻害剤に対する耐性形成(図6)

SK-N-AS播種モデルを用いて、trametinibおよびCH5126766の8週間の長期投与における効果の解析をおこなった。腫瘍増殖は投薬開始から5週までは抑制されるが、以降徐々に腫瘍径の増大が認められた。再増大が認められた腫瘍の免疫染色において、pERK陽性細胞の増加が認められ(コントロール: 71.3%、trametinib: 53.2%、CH5126766: 50.1%)、Ki67陽性細胞も同様であった(trametinib: 70.5%、CH5126766: 67.2%、and DMSO: 66.2%)。

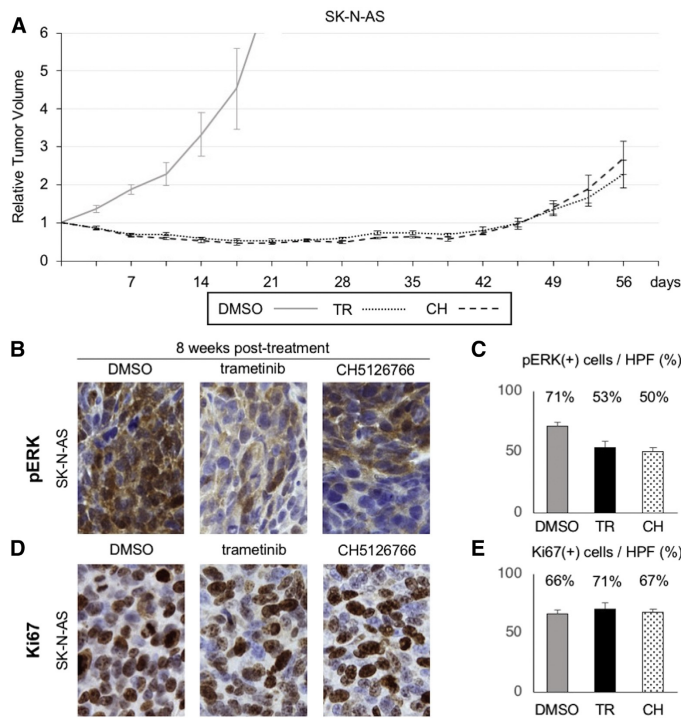


図 6

○長期間のMAPK経路阻害による腫瘍内部の部分的な分化誘導（図7）

我々はさらにCH5126766投与群の腫瘍の組織学的解析をおこなった。SK-N-AS由来腫瘍において、投薬開始後2週間、4週間の時点では組織学的に有意な所見は認めなかったが、6週目の組織では、一部にガングリオン様の細胞が認められた。これらの細胞はpERKおよびKi67は陰性であった。しかし、8週目の組織ではこれらのガングリオン様の細胞は減少していた。同様の結果は、trametinib投与群のHE染色による観察でも認められた。

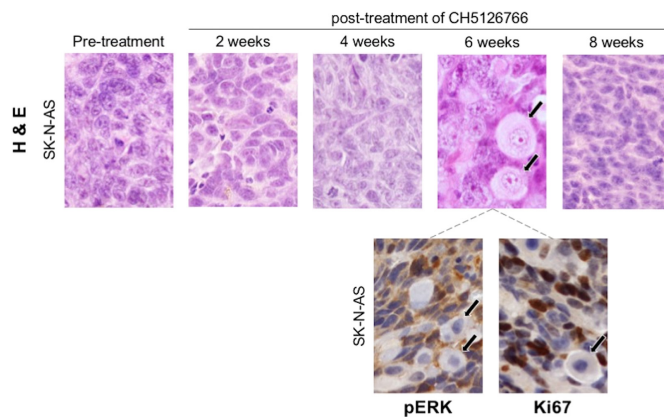


図 7

4.2. 神経芽腫臨床検体における pERK 免疫染色（田中 日本小児がん学会 2017）

- 予後良好患者の腫瘍 41 検体（化学療法前 31 検体、化学療法後 10 検体）では、化学療法前の検体では 25.8%で核に、54.8%で細胞質に pERK 陽性であった。化学療法後の検体では 20%で核に、50%で細胞質に pERK 陽性であった。同一患者の検体では 4 検体が化学療法後に pERK 陰性となった。
- 予後不良患者の腫瘍 10 検体（化学療法前 4 検体、化学療法後 6 検体、再発腫瘍 3 検体）では、化学療法前の 1 検体、化学療法後の 4 検体で pERK 陽性が認められており、このうち、同一患者の再発腫瘍のうち 2 検体で pERK 陽性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawakubo N, Tanaka S, Kinoshita Y, Tajiri T, Yonemitsu Y, Taguchi T	4. 巻 53
2. 論文標題 Sequential actions of immune effector cells induced by viral activation of dendritic cells to eliminate murine neuroblastoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 1615-1620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hishiki T, Matsumoto K, Ohira M, Kamijo T, Shichino H, Kuroda T, Yoneda A, Soejima T, Nakazawa A, Takimoto T, Yokota I, Teramukai S, Takahashi H, Fukushima T, Kaneko T, Hara J, Kaneko M, Ikeda H, Tajiri T, Nakagawara A	4. 巻 23
2. 論文標題 Results of a phase II trial for high-risk neuroblastoma treatment protocol JN-H-07: a report from the Japan Childhood Cancer Group Neuroblastoma Committee (JNBSG)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 965 ~ 973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-018-1281-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawakubo N, Harada Y, Ishii M, Souzaki R, Kinoshita Y, Tajiri T, Taguchi T, Yonemitsu Y	4. 巻 503
2. 論文標題 Natural antibody against neuroblastoma of TH-MYCN transgenic mice does not correlate with spontaneous regression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1666-1673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.07.097.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeuchi T, Tanaka T, Higashi M, Fumino S, Iehara T, Hosoi H, Sakai T, Tajiri T	4. 巻 53
2. 論文標題 In vivo effects of short-and long-term MAPK pathway inhibition against neuroblastoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg	6. 最初と最後の頁 2454-2459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2018.08.026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fumino S, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Yamagishi M, Inoue M, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T	4. 巻 27
2. 論文標題 Advanced surgical strategy for giant mediastinal germ cell tumor in children.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 51-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epsc.2017.09.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue M, Aoi S, Taniguchi A, Sakai K, Higashi M, Fumino S, Furukawa T, Tajiri T	4. 巻 3
2. 論文標題 Laparoscopic intraperitoneal onlay mesh for pediatric incisional hernia - a case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-017-0400-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 竹内雄毅, 田中智子, 東 真弓, 文野誠久, 家原知子, 細井 創, 酒井敏行, 田尻達郎
2. 発表標題 神経芽腫に対するMEK阻害剤臨床応用へ向けた臨床検体のリン酸化ERK免疫染色解析.
3. 学会等名 第51回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内雄毅, 田中智子, 東 真弓, 文野誠久, 家原知子, 細井 創, 酒井敏行, 田尻達郎
2. 発表標題 臨床応用に向けた神経芽腫 xenograft に対する MEK 阻害剤前臨床試験.
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内雄毅, 田中智子, 東 真弓, 文野誠久, 家原知子, 細井 創, 酒井敏行, 田尻達郎
2. 発表標題 MEK阻害剤感受性神経芽腫を予測するリン酸化ERK免疫組織化学の臨床応用へ向けた検討.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Togashi Y, Takeuchi Y, Higashi M, Fumino S, Tajiri T
2. 発表標題 MEK阻害剤の至適投与時期検討を目的とした神経芽腫MRDモデルの確立.
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maniwa J, Kimura K, Fumino S, Tanaka T, Higashi M, Sakai K, Aoi S, Furukawa T, Kishida T, Mazda O, Tajiri T
2. 発表標題 神経芽腫モデルマウスに対するマウス由来間葉系幹細胞を用いたdrug delivery systemの開発.
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumino S, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Yamagishi M, Inoue M, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T
2. 発表標題 Advanced Surgical Strategy for Giant Mediastinal Germ Cell Tumor in Children.
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakao J, Kishida T, Fumino S, Kimura K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Mazda O, Tajiri T
2. 発表標題 The Direct Conversion of Human Fibroblasts Toward the Myogenic Cell Lineage: The implications of Diaphragmatic Regeneration.
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka T, Takeuchi Y, Higashi M, Fumino S, Iehara T, Hosoi H, Sakai T, Tajiri T.
2. 発表標題 Immunohistochemical analysis of pre- and post-chemotherapeutic ERK phosphorylation in clinical neuroblastoma samples.
3. 学会等名 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeuchi Y, Tanaka T, Higashi M, Fumino S, Iehara T, Hosoi H, Sakai T, Tajiri T.
2. 発表標題 Preclinical study of novel MEK inhibitors on neuroblastoma and the biomarker for their therapeutic effects in neuroblastoma xenograft mice.
3. 学会等名 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fumino S, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Yamagishi M, Inoue M, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T
2. 発表標題 Current surgical intervention for pediatric giant mediastinal germ cell tumors.
3. 学会等名 49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 高松 英夫 田尻達郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 432
3. 書名 標準小児外科学 第7版 第22章小児腫瘍 B神経芽腫	

1. 著者名 高松 英夫 田尻達郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 432
3. 書名 標準小児外科学 第7版 G悪性リンパ腫	

1. 著者名 高松 英夫 田尻達郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 432
3. 書名 標準小児外科学 第7版 Iその他の良性腫瘍	

1. 著者名 田口 智章、黒田 達夫 田尻達郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 313
3. 書名 スタンダード小児がん手術 : 臓器別アプローチと手技のポイント	

1. 著者名 山岸 敬幸 田尻達郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 407
3. 書名 . 血液, 腫瘍 固形腫瘍 (神経芽腫)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	文野 誠久 (Fumino Shigehisa) (40405254)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	田尻 達郎 (Tajiri Tatsuro) (80304806)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	