京都大学	博士（医学）	氏　名	長　　博　之
論文題目	Trametinib plus 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects by ERK blockade and CD44 downregulation and affects PD1 and PD-L1 in malignant pleural mesothelioma (悪性胸膜中皮腫においてトラメチニブと 4ーメチルウンベリフェロンは，ERK を遮断し CD44 を下方制御することによって抗腫瘍効果を示し，PD1 及び PD-L1 の発現に影響を与える)		

（論文内容の要旨）

悪性胸膜中皮腫は非常に浸潤性の高い悪性腫瘍であり，診断後の生存期間中央値は 9～12 か月と極めて予後不良である。現在のところ手術・化学療法・放射線治療を組み合わせた集学的治療が行われているが比較的治療抵抗性である。それゆえこの腫瘍に対する新しい有効な治療法の開発が求められる。

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路は細胞の増殖，分化，生存の調節に重要な役割をもち，悪性胸膜中皮腫において恒常的に活性化している。MEK 阻害剤トラメチニブは V600E BRAF 変異陽性転移性悪性黒色腫の患者において有効性が証明され，FDA の承認を取得した初めての MEK 阻害剤である。

ヒアルロン酸 hyaluronic acid (HA)は細胞外マトリックスを構成する主要成分で，CD44 などの受容体と結合して細胞の増殖，浸潤，癌細胞の転移を促進する。悪性胸膜中皮腫は HA に富む腫瘍であり，HA の増加は悪性度及び予後不良に関与している。HA 合成阻害剤 4ーメチルウンベリフェロン(4-MU)は本邦において利胆剤として臨床で使用されていたが，HA の合成を抑制し，さまざまな悪性腫瘍において抗腫瘍効果を示すことが近年報告されている。

本論文の研究では，悪性胸膜中皮腫細胞において，トラメチニブと 4-MU，そしてこれら 2 剤による併用治療が抗腫瘍効果を示すかどうかを *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験にて検証した。またこれらの薬剤が免疫チェックポイント分子である PD1 及び PD-L1 の発現にどのような影響を与えるか検証した。方法は，*in vitro* 試験では細胞生存性試験，フローサイトメトリー，ウェスタンブロッティング，RNA 干渉を，*in vivo* 試験ではマウス中皮腫皮下腫瘍モデルを用いた。

in vitro 試験では，細胞生存性試験でトラメチニブ及び 4-MU は，悪性胸膜中皮腫細胞株に対し濃度依存性に細胞増殖活性を抑制した。フローサイトメトリーでこれら 2 剤がそれぞれ，悪性胸膜中皮腫細胞株に対し濃度依存性にアポトーシスを誘導した。ウェスタンブロッティングではトラメチニブは ERK のリン酸化及び CD44 の発現を濃度依存性に抑制した。siRNA による ERK のノックダウンによっても CD44 の発現が抑制された。またトラメチニブは ERK のリン酸化抑制及び CD44 の発現抑制に一致して，転写因子 AP-1 の構成体である Fra-1 の発現を抑制した。4-MU は CD44 の発現は抑制しなかったが，ERK のリン酸化を抑制した。

in vivo 試験では，マウス中皮腫皮下腫瘍モデルにおいて，トラメチニブ及び 4-MU は腫瘍の成長を抑制した。これら 2 剤による併用治療はより強力に腫瘍の成長を抑制した。摘出した腫瘍を用いたウェスタンブロッティング及び免疫組織化学染色法では，トラメチニブ, 4-MU, 2 剤併用治療は ERK のリン酸化を抑制した。またトラメチニブは PD-L1 の発現を抑制し，4-MU は PD1 及び PD-L1 の発現を増強した。2 剤併用治療は 4-MU 治療のみよりもさらにより強く PD1 及び PD-L1 の発現を増強した。

以上より，トラメチニブ及び 4-MU は悪性胸膜中皮腫細胞株に対し抗腫瘍効果を示した。さらに 2 剤併用治療では単剤治療それぞれよりもより強力な抗腫瘍効果を示した。トラメチニブ及び 4-MU はすでに臨床使用されている薬剤であるが，悪性胸膜中皮腫において将来有望な治療薬であり臨床への応用が期待される。

（論文審査の結果の要旨）

悪性胸膜中皮腫(MPM)は手術・化学療法・放射線治療を用いた集学的治療が行われているが治療抵抗性であり，極めて予後不良な疾患である。そのため，MPM の治療成績向上のためには有効な新規の治療方法の開発が必要である。

本研究では，MPM において MAPK pathway が腫瘍形成に重要な役割を持つこと，MPM がヒアルロン酸(HA)に富む腫瘍であることに着目し，他疾患で既に臨床応用されている MEK 阻害剤トラメチニブと HA 合成阻害剤 4ーメチルウンベリフェロン(4-MU)の MPM に対する抗腫瘍効果を検証した。

トラメチニブ及び 4-MU は，アポトーシスを誘導することによって MPM 細胞株の増殖活性を抑制し，マウス中皮腫皮下腫瘍モデルでは腫瘍の成長を抑制し，これら 2 剤の併用ではさらに強力に抑制することを示した。トラメチニブは ERK のリン酸化及び CD44 の発現を抑制し，これらに一致して転写因子 AP-1 の構成体である Fra-1 の発現を抑制したが，CD44 の発現は ERK のノックダウンによって抑制され, MPM における CD44 の発現はリン酸化 ERK に依存した Fra-1 の発現に関与することが示された。PD1 及び PD-L1 の発現は，トラメチニブは抑制し，4-MU は逆に増強し, 2 剤併用は 4-MU よりもさらに強く増強したが, これら 2 剤はともに MPM の免疫機能に影響を及ぼすことが示された。

以上の研究は，他疾患で既に臨床応用されている MEK 阻害剤トラメチニブ及び HA 合成阻害剤 4-MU が MPM に対して抗腫瘍効果を示すことを明らかにし，MPM の新規治療方法の開発に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（　医学　）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成２９年２月２４日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降