



Title	患者由来異種移植モデルマウスを用いたメルケル細胞癌の病態解明と新規治療に関する研究
Author(s)	宮本, 航大
Description	配架番号 : 3005
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16912号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16912
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99757
Type	doctoral thesis
File Information	MIYAMOTO_Kodai.pdf, 全文



学 位 論 文

患者由来異種移植モデルマウスを用いた
メルケル細胞癌の病態解明と新規治療に
関する研究

(Establishment of Novel Patient-Derived
Xenograft Mouse Models for
Pathophysiological and Therapeutic Studies in
Merkel Cell Carcinoma)

2 0 2 6 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 本 航 大

学 位 論 文

患者由来異種移植モデルマウスを用いた
メルケル細胞癌の病態解明と新規治療に
関する研究

(Establishment of Novel Patient-Derived
Xenograft Mouse Models for
Pathophysiological and Therapeutic Studies in
Merkel Cell Carcinoma)

2026年3月

北海道大学

宮本航大

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
患者由来異種移植モデルマウスを用いたメルケル細胞癌の病態解明と新規治療に関する研究	
緒言	7 頁
実験方法	1 9 頁
実験結果	3 2 頁
考察	6 4 頁
結語	6 8 頁
謝辞	6 9 頁
利益相反	7 0 頁
引用文献	7 1 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Miyamoto K, Yanagi T, Maeda T, Kitamura S, Nishihara H, Iwamoto R, Takahashi K, Ujiie H. Eribulin inhibits tumor growth of two novel patient-derived xenograft models of Merkel cell carcinoma.

Journal of Dermatological Science 119: 83-89, (2025)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Kodai Miyamoto, Teruki Yanagi, Takuya Maeda, Shinya Kitamura, Hideyuki Ujiie
Eribulin has anti-tumor activity in a preclinical model of merkel cell carcinoma.

The International Societies for Investigative Dermatology, 2023.5. (Tokyo).

Kodai Miyamoto, Teruki Yanagi, Kenzo Takahashi, Hideyuki Ujiie

Eribulin has anti-tumor activity in two novel preclinical models of Merkel cell carcinoma

The 54th Annual Meeting of The European Society for Dermatological Research, 2025.9.
(Antwerpen).

要旨

【背景と目的】

皮膚悪性腫瘍は高齢化や紫外線曝露の増加を背景に、2000 年以降その患者数が急速に増加している。近年、免疫チェックポイント阻害薬の登場により、進行例でも長期生存が得られる症例が報告されるなど、治療成績は大きく向上している。一方、稀少皮膚悪性腫瘍は発症頻度が極めて低く、症例の集積が困難であるため、疾患ごとの生物学的特徴や治療感受性に関する研究は十分に進んでいない。そのため、これら稀少皮膚悪性腫瘍に対する有効な治療法の確立には、臨床データの蓄積とともに、再現性の高い前臨床モデルの開発が不可欠である。

メルケル細胞癌 (Merkel cell carcinoma、以下 MCC) は、高齢者に好発する稀な皮膚原発の神経内分泌腫瘍である。発症要因として、かつては紫外線による発がんが主とされていたが、近年メルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus、以下 MCPyV) の発見により、ウイルス陽性例と陰性例で異なる発がん経路が存在することが推測されている。MCC における MCPyV の感染率は欧米では約 80%とされ、MCPyV 陽性・陰性で腫瘍の分子学的特徴が異なることが示唆されているが、臨床的特徴への影響は未だ明確ではない。

MCC は再発・転移が多く、予後不良な腫瘍である。進行または転移性 MCC に対しては、免疫療法や細胞障害性化学療法による全身治療が行われている。しかし、いずれの治療法においても一定の奏効率を認めるものの、再発や治療抵抗性を示す症例が多く、新規治療法の開発が強く求められている。

近年、患者由来異種移植 (patient-derived xenograft、以下 PDX) モデルが多くの癌種で報告されており、原発腫瘍の病理学的・遺伝学的特徴を保持したまま薬剤評価やバイオマーカー探索に活用できる点で有用とされている。しかし、MCC における PDX モデルの報告は極めて限られており、腫瘍の生物学的特性や治療法の検討は十分に進んでいない。したがって、多様な遺伝学的背景を有する MCC-PDX モデルの構築と、それを用いた前臨床的評価系の確立が急務である。

エリブリンは微小管阻害薬であり、G2/M 期から M 期にかけて細胞周期を停止させて細胞死を誘導することにより抗腫瘍効果を発揮する。これまでに、in vitro および in vivo の実験において複数のがん細胞株で強力な増殖抑制効果を示すことが報告されている。我々北海道大学皮膚科の研究グループも、皮膚有棘細胞癌 (cutaneous squamous cell carcinoma、以下 cSCC) および乳房外パジェット病 (extramammary Paget's disease、以下 EMPD) の PDX モデルにおいて、エリブリンが顕著な抗腫瘍効果を示すことを報告してきた。MCPyV 陽性 MCC では、腫瘍関連タンパク (T 抗原)、特に Large T antigen (以下、LTA) により *RB transcriptional*

corepressor 1（以下、*Rb1*）および *tumor protein p53*（以下、*TP53*）経路が抑制され、G1/S 期チェックポイントの破綻を介して異常な細胞増殖が促進されることが知られている。このため、微小管動態を阻害し、G2/M～M 期の細胞周期停止を誘導するエリブリンは、MCC に対する有効な治療選択肢となり得ると考えられる。

本研究の目的は、①MCC 臨床検体における MCPyV 感染の有無や Rb1、p53 の発現と臨床的特徴との関連を明らかにすること、②日本人由来の MCC-PDX モデルを新たに樹立し、エリブリンの治療効果を評価することである。

【対象と方法】

当科で保存している MCC 19 検体を対象とし、MCPyV、p53、Rb1 に対して免疫組織化学染色を行い、それぞれの発現と臨床情報との関連を解析した。

PDX モデルの樹立には、NOD/SCID マウスに患者腫瘍組織を移植した。樹立した PDX 腫瘍については、患者原発腫瘍と同様の病理組織像および免疫染色パターンを確認した。さらに、PDX 腫瘍から *in vitro* での細胞株樹立を試みた。また、がん関連遺伝子の検索を実施した。

樹立した2種類の MCC-PDX モデル(MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2)を用いて、エトポシド、シスプラチン、ドセタキセル、エリブリンの4薬剤による治療実験を行った。治療実験終了後に摘出した PDX 腫瘍に対して terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling（以下、TUNEL） assay および Ki-67 免疫染色を行い、抗腫瘍効果について評価した。

【結果】

解析した 19 例の MCC 検体では、免疫組織化学染色による発現を評価した。すべての腫瘍が MCPyV 感染陽性または p53 あるいは Rb1 の発現喪失のいずれかを示していた。

日本人患者由来の MCC 組織を NOD/ShiJic-scid Jcl（以下、NOD/SCID）マウスに移植した結果、2 例の腫瘍が生着し、安定した継代が可能な 2 種類の PDX モデル（MCC-PDX-MK1、MCC-PDX-MK2）を樹立した。これらの PDX 腫瘍は、原発腫瘍と病理組織学および遺伝学的に一致しており、数世代の継代後も安定して増殖した。

治療実験の結果、エリブリン投与群では MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 のいずれにおいても腫瘍が著明に退縮し、特に MCC-PDX-MK1 腫瘍は 24 週間にわたり再発を認めなかった。エリブリン治療後に摘出した腫瘍では MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 とともに Ki-67 陽性率がコントロール群に比して有意に低下し、TUNEL 陽性率は有意に上昇していた。

一方、PDX 腫瘍からの細胞株樹立は、初代培養では増殖を認めたものの、継代後は増殖を認めなかった。

また、エリブリン治療後の MCC-PDX-MK1 腫瘍では、約 24 週後に腫瘍の再発が確認された。その後、継代したマウスに対してもエリブリン投与を継続したが、腫瘍は増大傾向を示し、エリブリンに耐性を獲得したマウスが樹立された。

【考察】

我々の臨床検体に対する免疫組織学的解析の結果、MCC 腫瘍は MCPyV 陽性であるか、あるいは主要な腫瘍抑制因子である p53 または Rb1 のタンパク発現を喪失していた。このことは、MCPyV 陽性腫瘍では MCPyV-LTA が Rb1 および p53 を不活化することにより腫瘍形成を助長する可能性が示唆された。一方、MCPyV が陰性の腫瘍では、Rb1 または p53 の喪失が MCC 腫瘍の形成に関与している可能性が考えられた。

樹立した MCC-PDX モデルは、いずれも原発腫瘍に認められた遺伝子変異と一致していた。また、原発腫瘍とほぼ同一の病理学的所見を認めた。

MCC-PDX モデルは原発腫瘍の遺伝学的な特徴を再現しており、病態解析や治療評価において信頼性の高い前臨床モデルであることが示された。

エリブリンは、遺伝子変異の種類に関わらず、いずれの MCC-PDX モデルにおいても顕著な抗腫瘍効果を示した。*RBI* や *TP53* の機能喪失が MCC の発癌に関与するとともに、エリブリンの抗腫瘍効果発現においても重要な役割を果たしていると考えられた。

【結論】

本研究で樹立した 2 種類の MCC-PDX モデルは、MCC の病態解明および新規治療法の評価に有用であることが示された。エリブリンは、MCPyV 陽性・陰性を問わず、MCC に対する新たな有望な治療選択肢となる可能性がある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

CK20	cytokeratin 20
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOR	the duration of response
EMPD	Extramammary Paget's disease
FBS	fetal bovine serum
G	generation
HE	hematoxylin and eosin
LOH	loss of heterozygosity
LTA	large T antigen
NeuroCult	NeuroCult NS-A Human Proliferation Kit
NOD-SCID	NOD/ShiJic-scid Jcl
MCC	Merkel cell carcinoma
MCPyV	Merkel cell polyomavirus
MEM α	Minimum Essential Medium α
ORR	overall response rates
OS	overall survival
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death protein 1-ligand
PDX	patient-derived xenograft
PFS	Progression-Free Survival,
PHH3	phospho-Histon H3
RB1	RB transcriptional corepressor 1
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
SCC	Squamous cell carcinoma

SD	standard deviation
STA	small T antigen
TP53	tumor protein p53
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV	ultraviolet
VAF	variant allele frequency

緒言

皮膚悪性腫瘍について

皮膚悪性腫瘍は、高齢化や紫外線曝露の増加などを背景として、本邦において増加傾向にある。2000 年以降、患者数は急速に増加しており、この増加は社会的な高齢化が主な要因の一つと考えられている（石原和之, 2008）。

皮膚悪性腫瘍は、その発生母地となる細胞（上皮、色素細胞、神経内分泌細胞など）により分類され、代表的な腫瘍として悪性黒色腫、基底細胞癌、有棘細胞癌、乳房外パジェット病、メルケル細胞癌などが挙げられる。

近年、悪性黒色腫においては免疫チェックポイント阻害薬（例：抗 PD-1/PD-L1 抗体）の導入により、進行例でも長期生存を得る症例が増加するなど、生命予後が飛躍的に改善している。この成果を背景に、稀少皮膚悪性腫瘍に対しても免疫療法、分子標的療法、併用療法などの新たな治療アプローチが注目されており、将来的にはこれらの腫瘍にも適用可能な治療戦略の確立が期待されている。

一方で、稀少皮膚悪性腫瘍は発生頻度が低く、症例数が限られていることから研究の進展が遅れており、確立された治療レジメンや保険適用薬を持たない腫瘍も少なくない。化学療法においても、しばしば小規模な症例報告や限られた臨床試験の結果に基づいて治療が行われているのが現状である。

本邦の「皮膚悪性腫瘍診療ガイドライン」では、cSCC、基底細胞癌、EMPD、悪性黒色腫、MCC、皮膚血管肉腫の 6 種が主に取り扱われ、それぞれに診療指針が示されている。しかし、メルケル細胞癌や皮膚血管肉腫などの稀少皮膚悪性腫瘍については、その稀少性から治療法が確立されておらず、十分なエビデンスに基づかない治療が行われているのが現状である。そのため、これらの腫瘍に対する腫瘍生物学的理解の深化および新規治療法の開発を目的とした臨床・基礎研究のさらなる発展が強く求められている。

MCC について

MCC は、稀な皮膚原発の神経内分泌腫瘍であり 1972 年に Toker らによって初めて報告された (Toker C, 1972)。稀な腫瘍ではあるものの、近年明らかな増加傾向にあり主に高齢者の露光部に好発しやすい (Amaral T et al, 2017)。

MCC 発症の危険因子としては加齢、紫外線暴露、人種/皮膚色、免疫抑制などである。特に MCC では加齢による発生が特に特徴的である。他癌腫では 85 歳以上では発症率が減少するものが多いが、MCC では一貫して増加する。また紫外線曝露の影響を受けやすい白人は、黄色人種である日本人と比べて発症リスクが高い。米国では、発症率は、2000 年には 0.5 人/10 万人・年であったが 2013 年には 0.7 人/10 万人・年と報告され、年々徐々に増加している

(Paulson KG et al, 2018)。本邦においては、2016 年度の発症率は 0.2 人/10 万人・年であり、米国と比較すると少ない (Ogata D et al, 2023)。

MCC の病因として、以前は有棘細胞癌や悪性黒色腫と同様に慢性の紫外線暴露による紫外線発がんとなっていた。近年、新たに MCC の腫瘍組織から MCPyV が同定され、発症に関連することが明らかとなった (Sunshine JC et al, 2018; Pedersen EA et al, 2024)。この発見により、MCPyV 陽性例と陰性例では、発がんの分子機序が異なることが示唆されている。

MCC は淡紅色～紫紅色の弾性硬のドーム状結節を呈し、自覚症状はなく急速に拡大することが多い。また、非特異的な臨床像のために他の皮膚疾患との鑑別に難渋することがある。病理組織学的には、一般に表皮とは連続せず、真皮内から皮下脂肪織にかけて細胞質が少なく、類円形の核をもつ小型の腫瘍細胞が索状に密に浸潤増殖する。腫瘍細胞の核/細胞質 (N/C) 比は高く、微細顆粒状のクロマチンを有する核を有し、有糸分裂像も多く認める。免疫組織学的には cytokeratin 20 (以下、CK20) が細胞質に dot 状に染色されるのが特徴的である。他に、クロモグラニン A や神経特異的エノラーゼが陽性になる (Moll R et al, 1992)。

MCC は再発転移が多く予後不良である。病期 I、II と比較的早期であれば手術による根治手術を望めるが、切除不能な遠隔転移病変のような進行症例における 5 年生存率は 20%未満と報告されており、その予後は悪性黒色腫よりも不良である (Harms KL et al, 2016)。

転移性または切除不能な MCC に対しては全身治療が推奨されている。免疫療法が登場する以前は、白金製剤、エトポシド、トポテカン、アントラサイクリン系薬剤、タキサン系薬剤などの細胞障害性化学療法が MCC の標準的治療として

用いられてきた。これらの化学療法は高い奏効率（objective response rate, 以下 ORR）を示す一方で、奏効期間（duration of response, 以下 DOR）は短く、副作用の発現頻度も高いことが知られている。系統的レビューの報告によると、一次化学療法を受けた患者の ORR は 53～61%と比較的高いものの、中央値 DOR は 8 か月以下であった（Nghiem P et al, 2017）。したがって、化学療法には一定の有効性があるものの、再発率が高く持続的効果が得られにくいという課題がある。

近年、programmed cell death 1（以下、PD-1）および CD274（以下、PD-L1）を標的とした免疫チェックポイント経路に対する免疫療法が、進行期 MCC に対して、高い奏効率を示している（Shalhout SZ et al, 2021）。Garza-Davila らの報告によると、免疫療法を受けた進行 MCC 患者では、治療 6 か月後の ORR は 51%、3 か月後の全生存率（以下、OS）は 86%と高値を示した（Garza-Davila VF et al, 2022）。一方で、36 か月後の OS は 47%にとどまり、長期的な奏効を示す患者は一部に限られることが示唆されている。

上記の通り、化学療法、免疫療法ともに進行期 MCC に対して ORR は 50-60%と一定の治療効果を認める。一方で再発率が高いため、新規治療の開発が望まれている。

MCPyV について

MCPyV は二本鎖 DNA ウイルスであり、その感染は紫外線曝露と並んで MCC の発がんに関与している。MCPyV はウイルス粒子の構造蛋白である VP1、VP2、VP3 に加えて、スプライシングにより腫瘍関連タンパク (T 抗原) をコードしており、その中には Large T antigen (以下、LTA) および Small T antigen (以下、STA) が含まれる (図 1, 中村ほか, 2009)。

LTA のヘリカーゼドメインはウイルス複製を制御するが、MCC 腫瘍由来の MCPyV では LTA 遺伝子の 3'末端にナンセンス変異が生じている (Lui W et al., 2016)。その結果、複製能を失う一方で、細胞周期の G1/S 期進行を制御する腫瘍抑制遺伝子 *RB1* を不活化する能力を保持した LTA タンパク質が産生される。*RB1* の不活化により G1/S チェックポイントの制御が破綻し、異常な細胞増殖が誘導され、腫瘍形成に寄与すると考えられている (Linn P et al, 2021; Knudsen ES et al, 2019; Tanaka Y et al, 2020)。

さらに、MCPyV-LTA の C 末端領域には p53 を介した抗腫瘍活性が存在するが、MCC に感染した MCPyV ではこの領域が欠失しており、p53 経路による細胞増殖抑制機構が失われる。その結果、細胞増殖が促進され、発がんに関与すると考えられている (図 2) (Lui T et al, 2016)。

MCPyV の MCC における感染率は、米国およびヨーロッパにおいて約 80% と報告されている (Santos-Juanes J et al., 2015)。一方で、MCPyV は正常皮膚にも潜伏感染しており、健常人皮膚から約 60~80% の頻度で検出されることが報告されている (Martel-Jantin C et al, 2013)。また、cSCC、悪性黒色腫、基底細胞癌など他の皮膚悪性腫瘍からも検出されるが、正常皮膚との比較では有意な相関は認められていない (Costa PVA et al., 2021)。MCC では、正常皮膚と比較して有意に高い頻度で MCPyV が検出されており、MCPyV 感染が MCC 発生に特異的に関与している可能性が示唆されている。

これまでの研究により、MCPyV 陽性および陰性の MCC 腫瘍では分子学的特徴が異なることが明らかにされつつあるが、臨床的特徴が MCPyV の有無に依存するかどうかは明確ではない (Pedersen EA et al., 2024; Moshiri AS et al., 2017)。本研究では、臨床検体を用いて MCPyV 感染の有無を検査し、予後や発生部位などの臨床的特徴との関連を検討した。

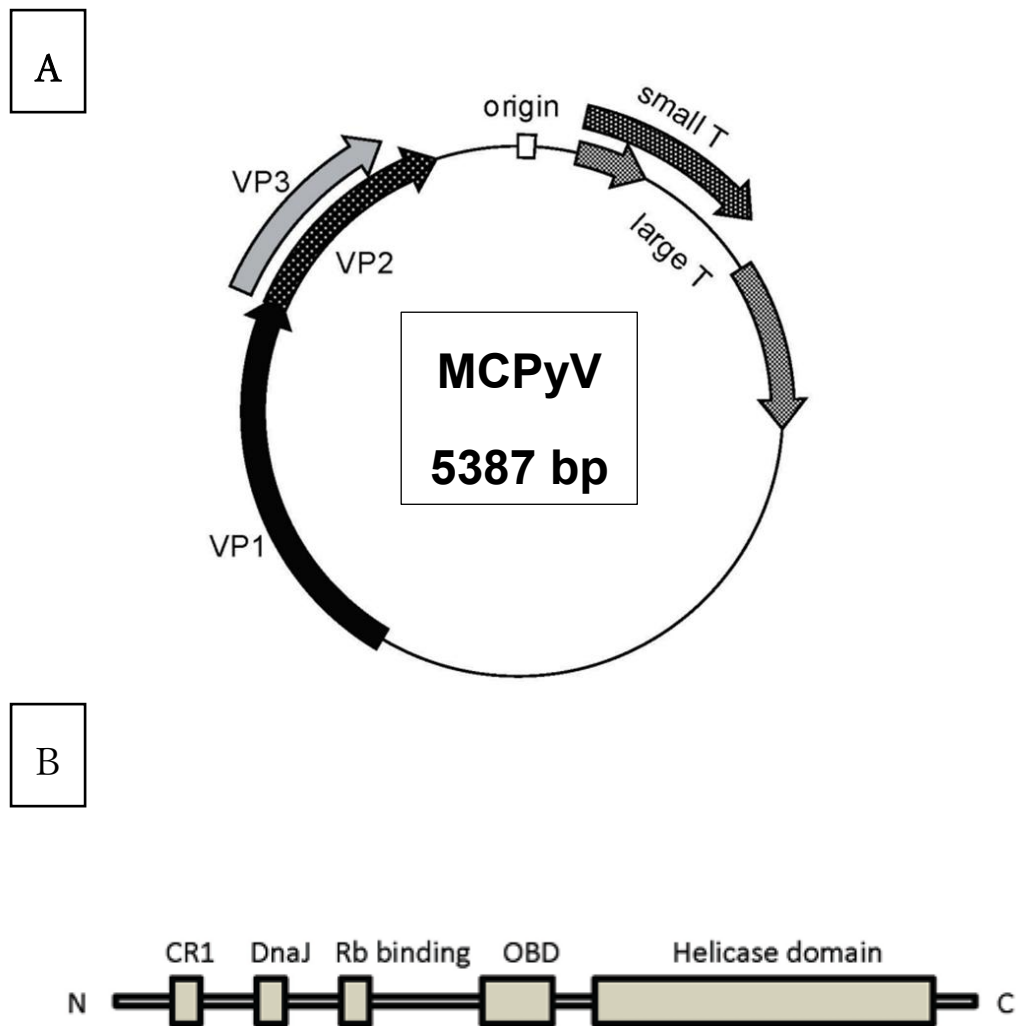


図 1. MCPyV の模式図

(A) MCPyV のゲノム構造

MCPyV は約 5.4kbp のゲノムであり、ウイルスの複製に関与する LTA、STA とウイルスカプシドタンパクである VP1、VP2、VP3 をコードしている。

(B) LTA の遺伝子構造

N 末端から順に CR1、DnaJ、Rb binding site、origin binding domain、helicase domain をコードする。メルケル細胞癌由来の MCPyV では LT の Rb binding domain から helicase domain の間に休止コドンに伴う変異が見られる。(中村ほか, 2009 年より引用)

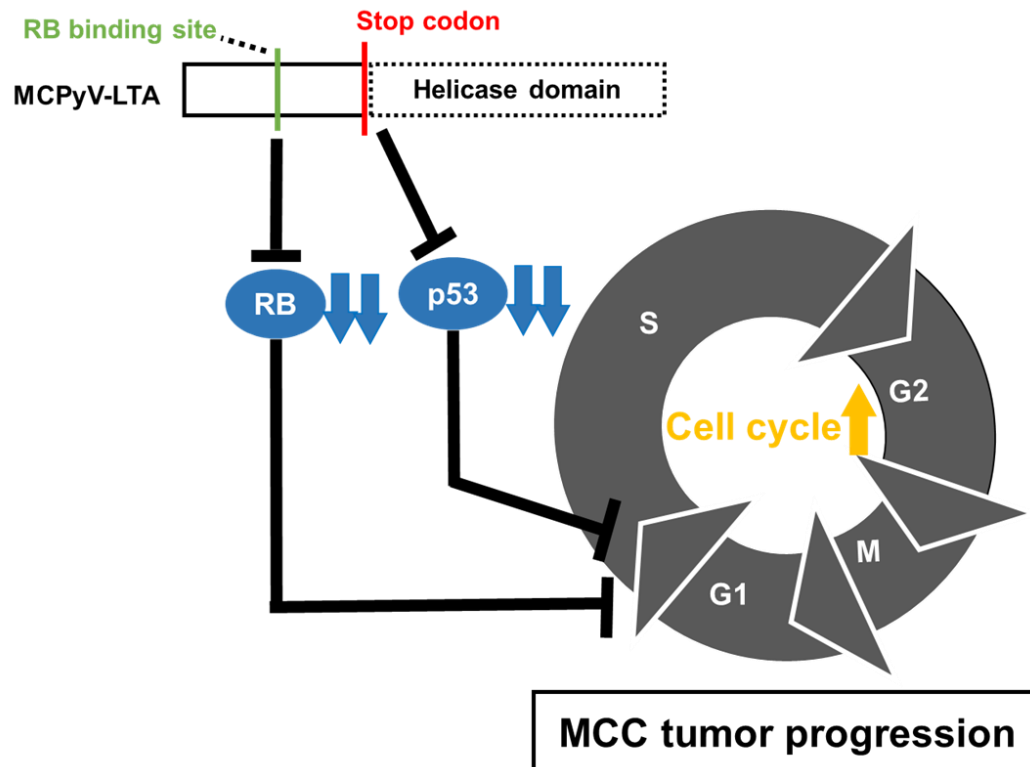


図 2. MCPyV-LTA による MCC 発癌機序

MCPyV-LTA の 3'末端にナンセンス変異が生じるとヘリカーゼドメインは機能を失い、複製能を欠く一方で、RB1 を不活化する能力を保持したタンパク質が産生される。RB1 が不活化されることで、異常な細胞増殖が生じ、腫瘍形成に寄与する。また、3'末端領域には p53 を介した抗腫瘍活性が存在するが、MCC に感染した MCPyV-LTA では欠失しているため、p53 経路による細胞増殖抑制機構が失われている。

MCC の PDX モデルについて

悪性腫瘍に対する新たな治療戦略を開発するためには、複数の前臨床モデルの確立が不可欠である。近年では、さまざまな癌種において PDX モデルが多数報告されている (Hsu CY et al, 2023; Maeda T et al, 2020; Bertotti A et al, 2011; Hidalgo M et al, 2019; Koga Y et al, 2019; Tsumura R et al, 2024)。これらのモデルは、患者腫瘍組織を免疫不全マウスに移植して維持される *in vivo* 腫瘍モデルであり、原発腫瘍の病理組織学および遺伝学的特徴を保持している。そのため、前臨床段階での薬剤評価、バイオマーカー探索、作用機序の解明、さらには個別化医療の開発において極めて有用である (Bertotti A et al, 2011)。

MCC に関しても、これまでにいくつかの細胞株が報告されているが (Leonard JH et al, 1993; Houben R et al, 2010; Dresang LR et al, 2013; Schrama D et al, 2019)、それらの多くは *in vitro* で長期間継代培養されているものであり、その過程で原発腫瘍の特徴を十分に保持していないことが指摘されている (Daily K et al, 2015)。

これまでに確立された MCC-PDX モデルはごく少数であり、報告例はわずか 10 例にとどまっている (表 1) (Lee PC et al, 2022; Lee JH et al, 2023; Fang B et al, 2020)。したがって、腫瘍の生物学的特性の理解や治療法開発に向けた研究は依然として十分に進展していないのが現状である。実際、既存の MCC-PDX モデルを用いた治療研究は、限られた分子標的薬の有効性を示すにとどまっている。

このような背景から、MCC に対して臨床的に有効な治療戦略を確立するためには、より多様な遺伝学的背景を有する PDX モデルの構築と、それを活用した前臨床的評価系の整備が強く求められている。

表 1. これまでに報告された MCC-PDX モデル

Case	Sex	MCPyV expression	Treatment experiment	Reference
1	M	+		
2	M	—		
3	F	—		
4	M	+	-	Lee PC <i>et al.</i>
5	F	—		
6	M	+		
7	F	+		
8	Unknown	+	Palbociclib	Lee JH <i>et al.</i>
9	Unknown	Unknown		
10	Unknown	Unknown	Copanlisib	Fang B <i>et al.</i>

エリブリンについて

エリブリン (Eribulin) は、海綿動物クロイソカイメン (*Halichondria okadai*) から単離された抗がん物質ハリコンドリン B (halichondrin B) の合成誘導体である (図 3)。エリブリンは微小管阻害薬に分類されるが、従来のタキサン系薬剤などとは作用機序が異なる (Schoffski P et al, 2016; Yamada H et al, 2024)。

微小管は、 α と β のチューブリン 2 量体から構成される。集合して微小管が形成される過程を重合、微小管がチューブリンに戻る過程を脱重合という。重合が進行している側を伸長端または (+) 端, 脱重合が進行している側を短縮端または (-) 端と呼ぶ。

微小管阻害薬は、微小管上の結合部位の違いによって作用様式が分類される (図 4, 小川ほか, 2011 年)。タキサン系薬剤であるパクリタキセルは、微小管の内側に広く結合し、異常な重合を促進することで、微小管の伸長や脱重合による短縮を阻害する。一方、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビンなどのビンカアルカロイド系薬剤は、微小管の外側に結合して、重合および脱重合の双方を阻害する。

これに対し、エリブリンは微小管の伸長端に選択的に結合し、微小管の重合のみを特異的に阻害し、脱重合には影響を及ぼさないという特徴を有する (図 5, 小川ほか, 2011 年)。さらに、エリブリンは微小管重合部位への高い親和性と選択性を示すため、極めて少ない分子数で効率的に微小管形成を阻害することができる。その結果、細胞周期を G2/M 期で停止させ、細胞死を誘導して抗腫瘍効果を発揮する (Yamada H et al, 2024)。

近年、エリブリンの抗腫瘍作用は単なる微小管ダイナミクスの阻害にとどまらず、腫瘍微小環境の改変 (Roma-Rodrigues C et al, 2019)、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition、以下 EMT) の抑制または可逆化 (Yoshida T et al, 2014)、血管リモデリング (Funahashi Y et al, 2014)、腫瘍の浸潤・転移の抑制 (Watanabe K et al, 2019)、さらにはテロメラーゼ逆転写酵素 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (TERT-RdRP) の阻害 (Takahashi M et al, 2019) など、多様な作用機構を有することが示唆されている。

in vitro の検討では、エリブリンは多様ながん細胞株に対して強力な増殖抑制効果を示し、in vivo においても乳がん、大腸がん、悪性黒色腫、卵巣がんなど複数の腫瘍モデルで腫瘍進展の抑制および縮小効果が確認されている。さらに、TP53 変異を有する平滑筋肉腫患者においては、PFS の延長も報告されている (Wozniak A et al, 2021)。我々の研究グループもこれまでに、cSCC および EMPD

の異種移植モデルにおいて、エリ布林が顕著な抗腫瘍効果を示すことを報告している（Hsu CY et al, 2023; Maeda T et al, 2020）。実際にエリ布林は、本邦においても乳癌と軟部悪性腫瘍に対し保険適用（ハラヴェン[®]：エーザイ）となり広く臨床応用されている。

これまでのところ、MCCに対するエリ布林の有効性に関する報告はないが、これらの知見から、細胞周期関連遺伝子変異を有する腫瘍に対する新たな治療薬候補として、エリ布林が有望であることが示唆される。

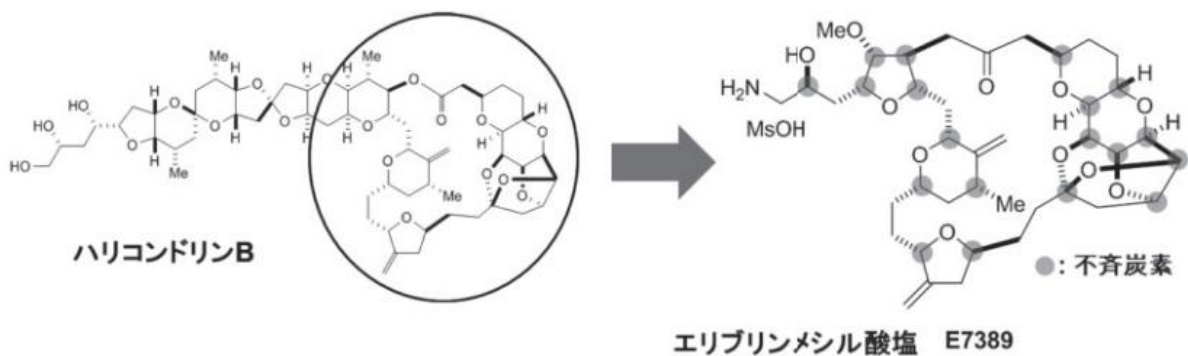


図3：ハリコンドリンBと単離されたエリブリンの構造
(小川ほか，2011年から引用)

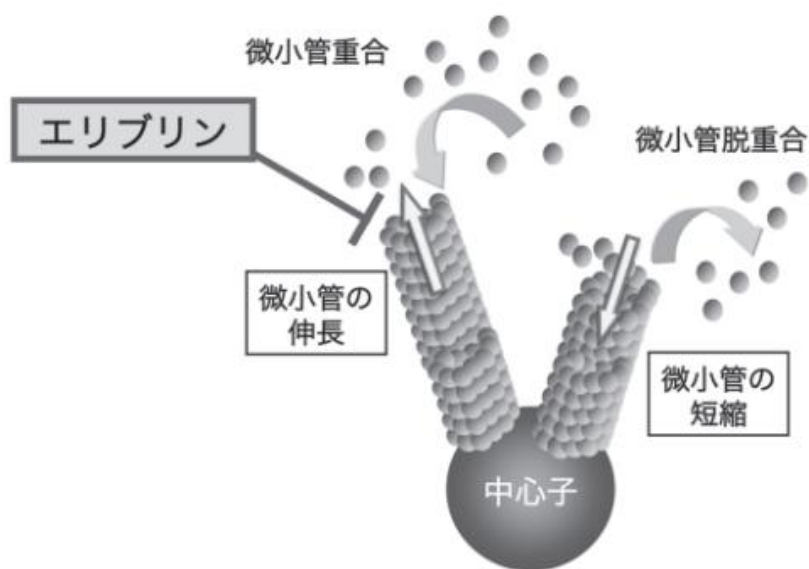


図4：エリブリンの微小管阻害のメカニズム
(小川ほか，2011年から引用)

エリブリンは微小管の伸長端のみに選択的に結合し、微小管の重合のみを特異的に阻害する。脱重合の際に結合せず、影響を及ぼさない。

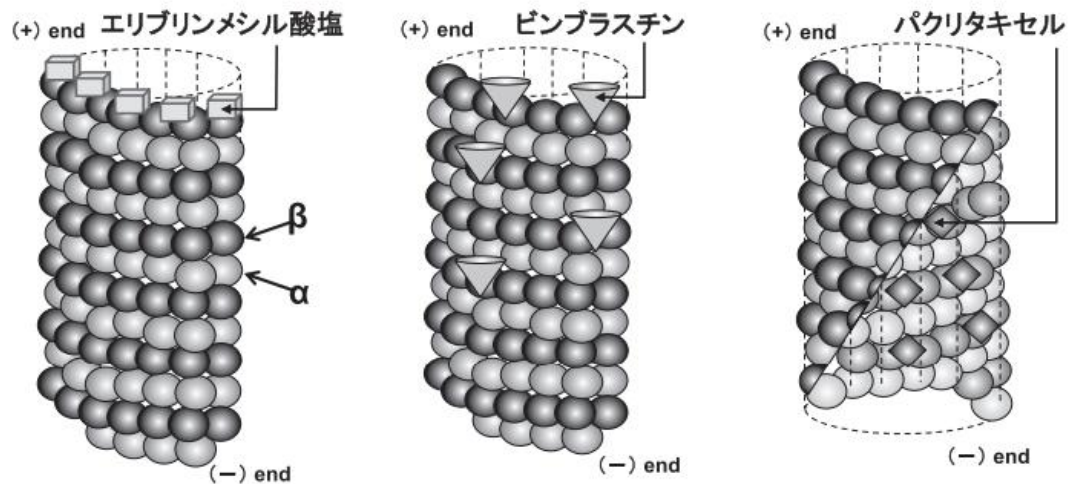


図 5：微小管阻害薬（エリブリン、ビンブラスチン、パクリタキセル）の微小管への結合部位の違い

（小川ほか，2011 年から引用）

パクリタキセルは微小管の内側に広範に結合し，微小管に異常な重合を促進する。ビンカアルカロイドであるビンブラスチンは微小管の外側に結合し，微小管の重合と脱重合を阻害する。エリブリンは，微小管の伸長端のみに結合し脱重合は阻害しない。

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学病院倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 018-0424, 022-0036）。また、本研究は患者から書面による同意を得て施行した。臨床検体の取り扱いに関しては、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則って行われた。動物実験については、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受け（承認番号 22-0037, 23-0125）、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則して行った。

1. MCC 患者からの検体

MCC-PDX の樹立は以下の患者から得られた腫瘍組織を使用した。

症例 1：82 歳日本人女性。前医受診時に皮膚生検を行い MCC と診断された。根治手術目的に当科を受診した。

現症：右臀部中央に 10x10mm の紅色結節を認め、皮下には連続して 45x47mm の硬結を触知した（図 6）。

家族歴・既往歴に特記すべき事項はなかった。

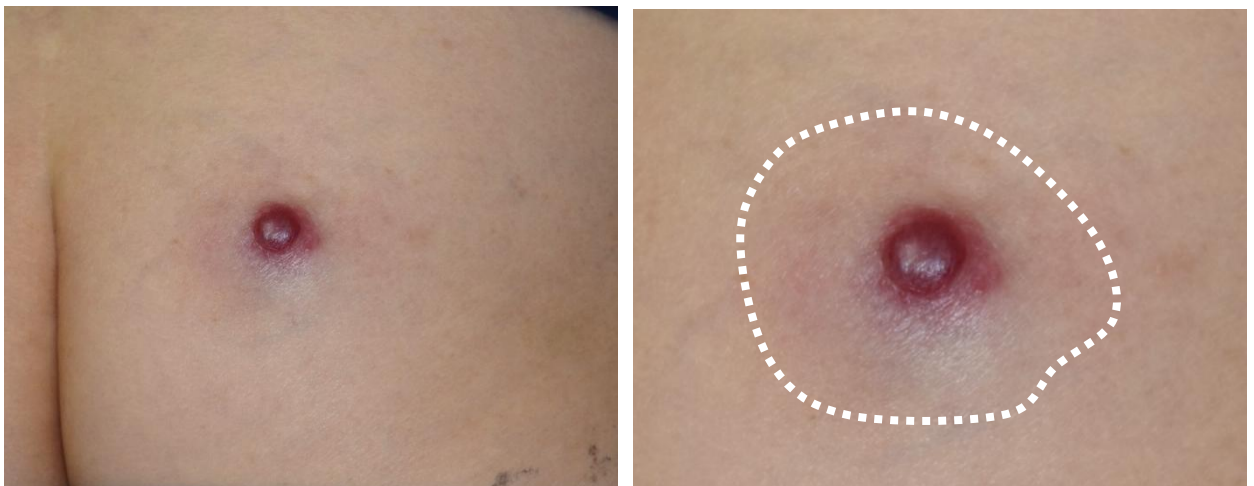


図 6：症例 1 の臨床写真
右臀部に紅色結節と皮下に硬結を触れる（白点線）。

症例 2：82 歳日本人女性。3 か月前より左耳介に紅色腫瘤を自覚した。拡大傾向のため前医を受診し、皮膚生検により MCC と診断された。根治手術目的に当科を受診した。

現症：左耳介に 17x17x25mm の弾性硬な紅色結節を認める（図 7）。

家族歴・既往歴に特記すべき事項なし。



図 7：症例 2 の臨床写真

左耳垂を貫通するように紅色結節を認める。

これら 2 例の切除腫瘍のうち、診断や切除断端判定に使用しない部分を直径 5 mm の小片に分割した。各症例のうち 1 片は氷上で速やかに輸送し、移植に使用した。他の腫瘍片はホルマリン固定後、病理診断のためパラフィン包埋された。

2. PDX マウスモデルの確立

5 週齢のメス NOD/SCID マウスを使用した。マウスは北海道大学医学部の動物実験施設にて管理され、搬入されたマウスは少なくとも 5 日間当施設で飼育し、環境に適応したことを確認して実験に用いた。また、マウスは特定病原体不在 (SPF) 条件下で飼育した。

直径 5 mm の MCC 腫瘍片に、Matrigel (BD Bioscience) を添加し、NOD/SCID マウスの両側背部皮下に移植した (図 8)。

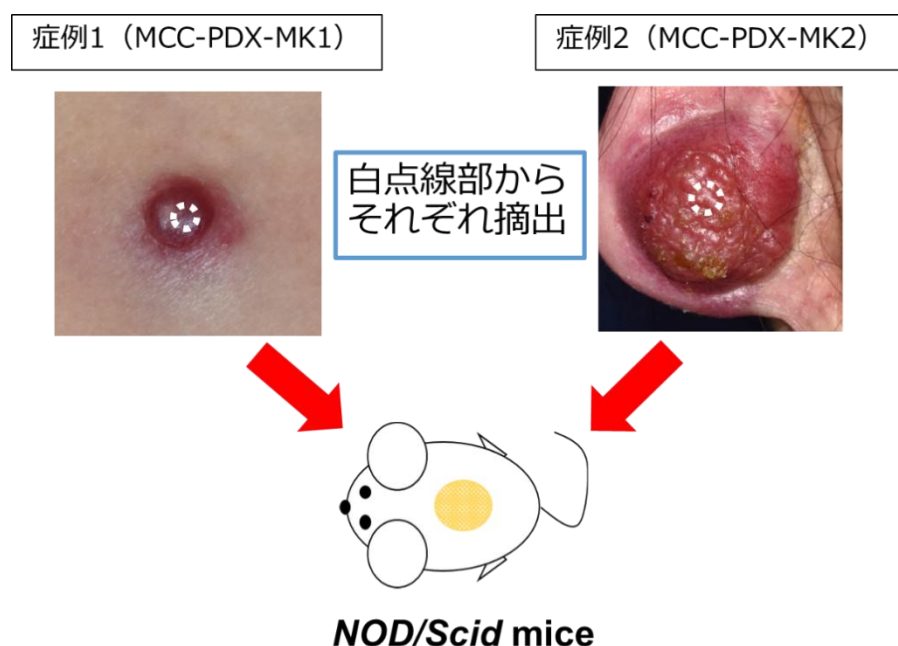


図 8 : Xenograft 作成の模式図

腫瘍から直径 5mm の腫瘍片を摘出し、NOD/SCID マウスの皮下に移植した。

MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 の腫瘍を移植したマウスは週 2 回観察し、腫瘍径を週 1 回ノギスで測定した。腫瘍体積は以下の式で算出した：(長径 × 短径²) / 2。

腫瘍が 500~1000mm³ に達したら腫瘍を摘出し、次世代のマウスに皮下移植した。なお、マウスは頸椎脱臼により安楽死させ、頸椎脱臼の前には、イソフルランによる麻酔を行った。継代をくりかえし、第 3 世代より腫瘍の増大速度がおよそ一定となった。治療実験は、MCC-PDX-MK1 では第 6~第 8 継代、MCC-PDX-MK2 では第 3~第 5 継代の腫瘍を用いて実施した。図 9 に概略図を示す。

また、第4世代（G4）の腫瘍は5週齢の雌ヌードマウス（nu/nu, Clea）にも移植した。

さらに、第4（G4）および第5世代（G5）のMCC-PDX-MK1、MCC-PDX--MK2の新鮮腫瘍サンプルの一部をそれぞれ CryoStor® CS10（以下 CS10、BioLife Solutions）中で凍結保存し、-80℃で保管した。

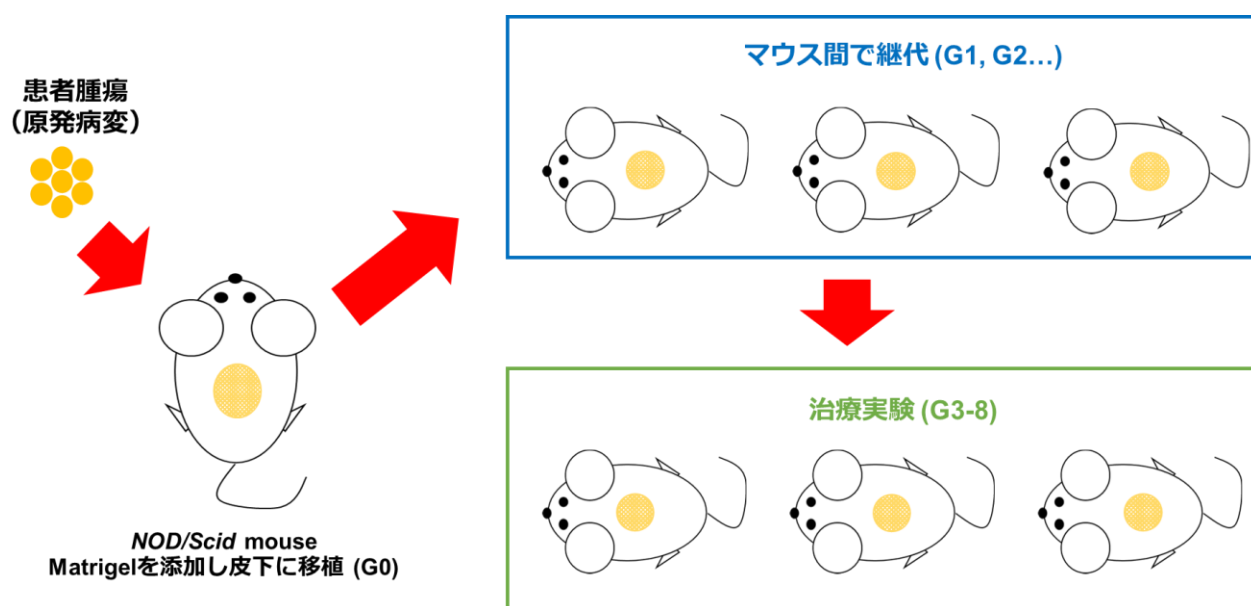


図9：研究方法の模式図

MCC 患者から得られた腫瘍組織を NOD/SCID マウスに移植し、初代（G0）PDX を作製した。増大した MCC-PDX 腫瘍は次世代のマウスへ継代移植した。治療実験には腫瘍の増大速度が安定した第三世代以降のマウスを使用した。

3. 臨床、病理学的解析における患者選定

本研究には、北海道大学病院皮膚科で 2005 年 10 月 1 日から 2022 年 4 月 30 日までに診断および治療した MCC 患者 19 名の腫瘍検体を使用した。

なお、MCC の病理組織学的確定診断は、当院病理部にてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色に加え、サイトケラチン 20（CK20）、クロモグラニン A、および甲状腺転写因子 1（TTF-1）の免疫染色に基づいて行われていた。

臨床病期は、AJCC の作成した分類に準じて決定した（Harms KL et al., 2016）。TNM 分類、病期分類については表 2、表 3 にそれぞれ示す。

臨床情報として、年齢、性別、原発巣の部位、臨床病期、治療法、予後をカルテから抽出した。臨床情報については表 4 に示す。

表 2 : MCC の TNM 分類

T : 原発腫瘍	
Tx	原発腫瘍の評価が不可能
T0	原発腫瘍が認められない
Tis	in situ (表皮内)
T1	腫瘍径が 2 cm 以下
T2	腫瘍径が 2 cm より大きく 5 cm 以下
T3	腫瘍径が 5 cm より大きい
T4	原発腫瘍が骨, 筋肉, 筋膜, 軟骨に浸潤している
N : 領域リンパ節 (臨床分類)	
Nx	領域リンパ節の評価不能
N0	領域リンパ節転移なし
N1	領域リンパ節転移あり
N2	in-transit 転移あり, 領域リンパ節転移なし
N3	in-transit 転移あり, 領域リンパ節転移あり
M : 遠隔転移	
M0	遠隔転移なし
M1	遠隔転移あり

表 3 : MCC の病期分類

	T	N	M
0 期	Tis	N0	M0
I期	T1	N0	M0
IIA 期	T2~3	N0	M0
IIB 期	T4	N0	M0
	Any T	N1a	M0
IIIA 期	T0	N1b	M0
IIIB 期	Any T	N1b~3	M0
IV期	Any T	Any N	M1

表 4 : MCC 患者 19 名の臨床情報

Case	Clinical information							Treatment			PDX model
	Age/Sex	Location	Stage	T	M	N	Metastasis	Surgical resection	Radiation therapy	Chemo therapy	
#1	87/F	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	+	-	-	MCC-MK2
#2	81/F	Lt cheek	IIIB	4	0	0	-	+	+	-	
#3	85/F	Lt cheek	IIIB	4	0	0	-	+	+	-	
#4	78/F	Rt upper arm	I	1	0	0	-	+	+	-	
#5	82/F	Rt hip	IIA	2	0	0	-	+	+	+	
#6	81/F	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	+	+	-	
#7	89/M	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	+	+	-	MCC-MK1
#8	79/M	Rt leg	IIIB	3	3	0	Lymph	+	+	-	
#9	82/F	Lt auricular	IIA	2	0	0	-	+	+	-	
#10	94/F	Lt cheek	IIA	2	0	0	-	+	+	-	
#11	85/F	forehead	I	1	0	0	-	+	+	-	
#12	89/F	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	+	-	-	
#13	83/F	Lt cheek	IIIA	1	1a	0	Lymph	+	+	-	
#14	84/F	Rt cheek	I	1	0	0	-	+	-	-	
#15	81/F	Lt leg	IV	4	4	1	Lymph, Spleen	+	-	+	
#16	77/F	Lt cheek	I	1	0	0	-	+	+	-	
#17	83/F	Lt auricular	I	1	0	0	-	+	-	-	
#18	82/F	Rt back	IIIA	2	1a	0	Lymph	+	+	-	
#19	80/F	Nasal tip	IIA	2	0	0	-	+	+	-	

4. 試薬と抗体

本研究に用いた試薬および抗体は以下の通りである.

抗 phospho-Histon H3 (以下、PHH-3) 抗体 (rabbit, #3377, Cell Signaling Technology)

抗 Ki-67 抗体 (mouse, ab8191; Abcam)

抗 TUNEL 抗体 (mouse, #1168487910, Roche)

抗 CK20 抗体 (mouse, NCL-L-CK20; Leica Biosystems)

抗 MCPyV-LTA 抗体 (mouse, sc-136172; clone: CM2B4; Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz)

抗 Rb1 抗体 (mouse, G3-245; BD Pharmingen)

抗 p53 抗体 (mouse, M7001; Dako)

シスプラチン (FUJIFILM Wako)

エトポシド (FUJIFILM Wako)

エリブリン (Halaven; Eisai)

ドセタキセル (FUJIFILM Wako)

5. 病理組織学的解析

患者臨床検体、原発腫瘍および PDX 腫瘍についてホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を 4 μm 厚に薄切し、HE 染色および免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色の評価は、すべての切片において同じ観察者 (筆者) が行った。

MCPyV-LTA、Rb1、および p53 の発現レベルは、陽性細胞の割合に基づいて評価した (表 5)。これらの評価基準およびスコアは、既報の研究に基づいたものである (Haymerle G, et al, 2017; Sihto H et al, 2011)。

核内 Ki-67 発現については、高倍率レンズ (400 倍視野) を用いて観察した。無作為に選んだ 3 視野の癌細胞 100 個のうち、陽性細胞の割合を算出した。

表 5 : MCPyV-LTA、Rb1、および p53 の発現の評価法

◆CM2B4 (MCPyV-LTA)

Negative (-): 0-10% nuclei positive

Moderately positive (+): 10-60% nuclei positive

Strongly positive (++) : 61-100% nuclei positive

◆p53, Rb1

Negative (-)

Weakly positive (+): 1-20% nuclei positive

Strongly positive (++) : 20-100% nuclei positive

6. 細胞死の評価

細胞死は TUNEL 法で評価した。In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, #11684817910) を用いて手順通りに行った。核内 TUNEL 発現は、高倍率レンズ（400 倍視野）を用いて観察した。無作為に選んだ 3 視野の癌細胞 100 個のうち、陽性細胞の割合を算出した。

7. 細胞株と細胞培養

本研究では MCC-PDX 腫瘍を用いた。採取した腫瘍は氷上で No.11 メスを用いて細片した。細片した腫瘍は、60mm ディッシュに 50 μ L ごとに播種した。

細胞培養は、37 度 5%CO₂ 条件下のインキュベーターで行われた。10%ウシ胎児血清（Fetal bovine serum, 以下 FBS, Life Technology）を添加した、Dulbecco's modified Eagle's medium（以下 DMEM, Nacalai Tesque）、Minimum Essential Medium α （以下 MEM α , ThermoFisher）、Roswell Park Memorial Institute 1640（以下 RPMI, Nacalai Tesque）、NeuroCult NS-A Human Proliferation Kit（以下 NeuroCult, Stemcell Technologies）を培養液として使用した。

細胞の継代は、細胞の割合が 70-80%コンフルエントに達した時点で行った。PBS で 3 回洗浄した後、300 μ L の 0.25%Trypsin-EDTA（Thermo Fisher Scientific）に浸し、37°Cで 3 分間静置した。ピペッティングしながら、顕微鏡下で細胞がディッシュから剥がれていることを視認した後、培養液を 3ml 加えて十分に懸濁し、新しい 60mm ディッシュに培養液を 3ml 添加しておき、懸濁液 4cc を一様になるように添加・混和して、10:1 の細胞比で播種した（図 11）。

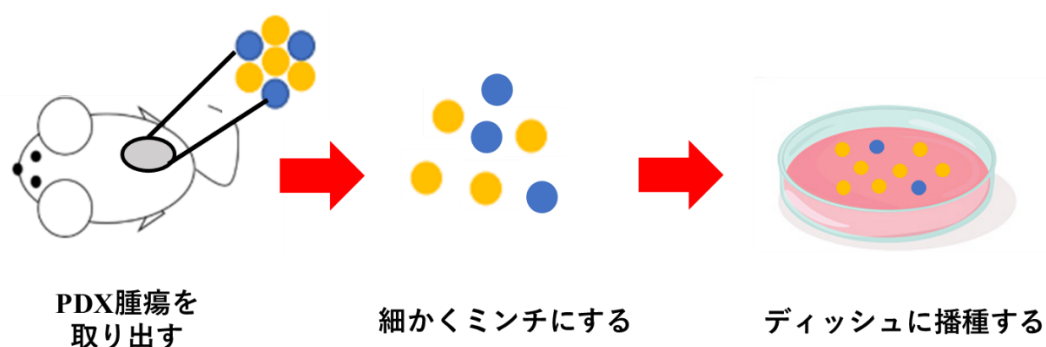


図 11：細胞培養の模式図

細胞培養には通常の表面処理がされていないポリスチレン製 Dish (IWAKI) に加え、Collagen Type I coated Dish (IWAKI) を使用した。また、宮武博士 (Miyatake et al, 2018) から供与された micro/nano plate を通常 Dish 上に設置し細胞培養を行った (図 12)。

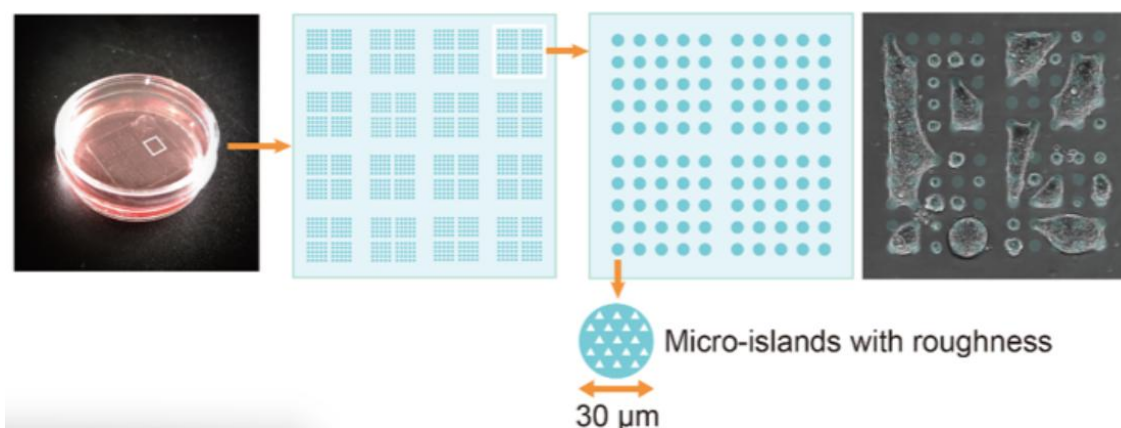


図 12：使用した micro/nano plate の模式図

正方形のスライドガラスは 20mm であり、細かなニードルが設置されている (Miyatake et al, 2018 から引用)。

8. 遺伝子変異解析

DNA 抽出前に、原発腫瘍および PDX 腫瘍の病理組織学的評価を行い、十分な腫瘍細胞量が存在し、顕著な壊死が認められないことを確認した。ゲノム DNA は、患者血液および組織検体から DNA Mini Kit (51304; Qiagen) または GeneRead FFPE DNA Kit (180134; Qiagen) を用いて抽出した。DNA サンプルの量と純度は、Nanodrop ND-1000 UV/VIS 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で評価した。DNA 断片の完全性は 1%アガロースゲル電気泳動により確認した。DNA サンプルの濃度は 20 ng/μL に調整し、使用時まで -20°C で保存した。

ゲノム解析は慶應義塾大学がんゲノムセンター (東京) で実施した。DNA の質については Agilent 2000 TapeStation (Agilent Technologies) により算出された DNA インテグリティナンバー (DNA integrity number; DIN) を基準として評価した。続いて、160 種類のがん関連遺伝子 (表 4) を対象とした amplicon exome sequencing を Illumina MiSeq シーケンサー (Illumina, San Diego) で行った。解析には DIN 値が 3.1 を超える 50 ng 以上の DNA を使用した。得られたシーケンスデータは、独自のバイオインフォマティクスパイプライン「GenomeJack」(三菱

スペース・ソフトウェア、東京）を用いて解析した。

表 6：包括的ながん関連遺伝子を対象とした次世代シーケンス解析リスト

ABL1	ACTN4	AKT1	AKT2	AKT3	ALK	APC	AR
ARAF	ARID1A	ARID2	ASXL1	ATM	ATRX	AXIN1	AXL
BAP1	BARD1	BCL2L11	BRAF	BRCA1	BRCA2	BRIP1	CARD11
CCND1	CD274	CD79B	CDH1	CDK12	CDK4	CDKN2A	CHEK2
CREBBP	CRKL	CSF1R	CTNNB1	CUL3	DDR2	DNMT3A	ECT2L
EGFR	ENO1	EP300	EPCAM	ERBB2	ERBB3	ERBB4	ESR1
EZH2	FANCA	FANCD2	FANCE	FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3
FGFR4	FH	FLT3	GNA11	GNAQ	GNAS	GRIN2A	HRAS
IDH1	IDH2	IGF1R	IGF2	IL7R	JAK1	JAK2	JAK3
KDM6A	KDR	KEAP1	KIT	KMT2D	KRAS	MAP2K1	MAP2K2
MAP2K4	MAP3K1	MAP3K4	MDM2	MDM4	MET	MLH1	MSH2
MSH6	MTOR	MYC	MYCN	MYD88	NF1	NF2	NFE2L2
NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NPM1	NRAS	NRG1	NT5C2	NTRK1
NTRK2	NTRK3	PALB2	PBRM1	PDGFRA	PDGFRB	PIK3CA	PIK3R1
PIK3R2	PMS2	POLD1	POLE	PRKCI	PTCH1	PTEN	RAC1
RAC2	RAD51C	RAF1	RB1	RET	RHOA	ROS1	SETBP1
SETD2	SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	SMO	SPOP	SRC	STAT3
STK11	TP53	TSC1	TSC2	VHL	WT1	XPC	

9. MCC-PDX-MK1 および MK2 を用いた治療実験

PDX 腫瘍を皮下移植したのち、約 4 週間にわたり腫瘍増殖を観察した。マウスの腫瘍体積が $50-100\text{mm}^3$ に達したことを確認後、治療実験を開始した。無作為に 5 群に分け治療実験を行った。各治療には少なくとも 4 匹のマウスを使用した。対照群には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を $200\text{ }\mu\text{L}$ 腹腔内投与（4 日ごとに 3 回、または 1～5 日ごとに 3 回投与、 $n=4$ ）または $150\text{ }\mu\text{L}$ 静脈内投与（週 1 回、 $n=4$ ）した。

殺細胞抗がん剤を用いた治療実験では、シスプラチン（ 5 mg/kg ）を腹腔内に 4 日ごとに 3 回投与した（Schlagbauer-Wadl H et al, 2000）。エトポシド（ 10 mg/kg ）は初回から 5 日間連続で腹腔内投与した（Fichtner I et al, 2008）。ドセタキセル（ 20 mg/kg ）およびエリブリン（ 0.5 mg/kg ）は、いずれも週 1 回静脈内投与した（図 13）（Maeda T et al, 2020）。

腫瘍体積は週 1 回ノギスで測定した。腫瘍の長径が 2 cm に達した時点、または治療開始 28 日後に腫瘍を摘出した。腫瘍体積および重量の測定は盲検下

で実施した。

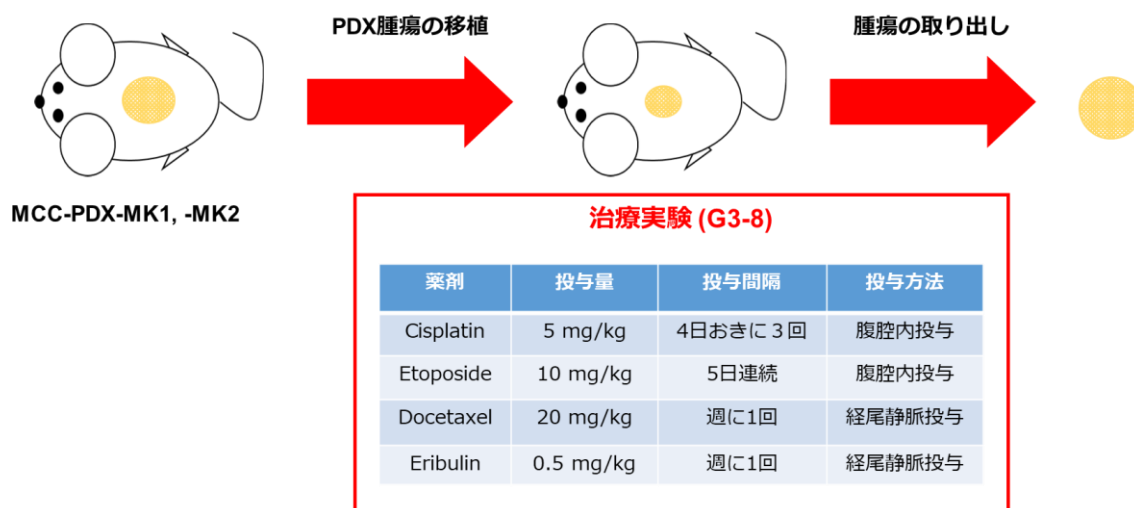


図 13 : MCC-PDX マウスを用いた殺細胞性抗がん剤による治療実験の模式図

MCC-PDX 腫瘍を有する NOD/SCID マウスを無作為に 5 群（コントロール、シスプラチン、エトポシド、ドセタキセル、エリブリン）に振り分けた。

腫瘍細胞の細胞死および増殖能を評価するため、治療実験終了後に摘出した PDX 腫瘍に対して TUNEL assay および Ki-67 免疫染色を行った。

MCC-PDX-MK1 では、コントロール群、シスプラチン治療群、エトポシド治療群、ドセタキセル治療群の腫瘍を、治療開始後 21 日に摘出して解析に用いた。

MCC-PDX-MK2 では、コントロール群、シスプラチン治療群、エトポシド治療群の腫瘍を治療開始後 14 日に、ドセタキセル治療群およびエリブリン治療群の腫瘍を治療開始後 28 日に摘出して使用した。

さらに、MCC-PDX-MK1 のエリブリン治療群については、エリブリン投与 48 時間後に腫瘍を摘出し、PHH3 染色、TUNEL assay、および Ki-67 染色を実施した。

10. 治療薬の投与量の設定

シスプラチンについては、Schlagbauer-Wadl らがマウスに 5 mg/kg を投与した際に体重が約 10%減少したと報告している (Schlagbauer-Wadl H et al, 2000)。エトポシドについては、Fichtner らにより 10 mg/kg がマウスにおける最大耐用量と報告されている (Fichtner I et al, 2008)。ドセタキセルの投与量に関しては、20 mg/kg を超えた濃度での静脈内投与では体重が 80%未満に減少するなどの有

害事象が高頻度で報告されている (Xu M et al, 2021)。本研究ではこれらの報告を踏まえ、シスプラチン 5mg/kg、エトポシド 10mg/kg およびドセタキセル 20mg/kg をそれぞれ最大耐用量として設定した。

一方、エリブリンについては、既報においてマウス実験での投与量が 0.5–1.5 mg/kg の範囲であることが報告されている (Hsu CY et al, 2023; Watanabe K et al, 2019; Pandey K et al, 2022)。我々の以前の研究では、PDX マウスに対して 0.45 mg/kg が最小有効量であった (Maeda T et al, 2020)。動物実験の「3R 原則」

(特に Reduction の原則) に基づき、本研究では 0.5 mg/kg を最小有効量とみなし、用量漸増試験は実施しなかった。

11. 統計学的解析

本研究での定量データはすべて平均±標準偏差で示した。統計学的解析には Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Washington, U.S.A.) を用いて行った。クロス集計表の解析にはカイニ乗検定を用い、群間の比較は Student の t 検定を用いた。また、サンプル数は少なくとも $n \geq 3$ とした。コントロール群と治療群の腫瘍体積の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。全ての統計学的解析において、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

実験結果

1. 19 例の MCC 臨床検体の臨床病理学的解析

19 例のメルケル細胞癌 MCC 原発腫瘍検体を解析し、その臨床的および病理組織学的特徴を検討した。

MCPyV-LTA および腫瘍抑制遺伝子である p53 と Rb1 の免疫組織化学染色による発現を評価した。19 例中、MCPyV-LTA 陽性は 13 例（68%：2+が 12 例、1+が 1 例）、p53 陽性は 14 例（74%：2+が 7 例、1+が 7 例）、Rb1 陽性は 16 例（84%：2+が 12 例、1+が 4 例）であった（表 7）。

MCPyV-LTA 陽性例はすべて p53 および Rb1 陽性と正に相関していた。一方、MCPyV-LTA 陰性例では、p53 および/または Rb1 の発現が陰性であった。これらの免疫染色結果は、MCC 腫瘍が MCPyV 感染を伴っているか、あるいは腫瘍抑制因子（p53 または Rb1）の発現を喪失していることを示唆している。

表 7 : MCC 臨床検体における臨床情報と免疫組織化学染色の結果

Case	Clinical information							Protein expression		
	Age/Sex	Location	Stage	T	M	N	Metastasis	MCPyV-LTA	p53	Rb1
#1	87/F	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	++	++	++
#2	81/F	Lt cheek	IIIB	4	0	0	-	++	++	++
#3	85/F	Lt cheek	IIIB	4	0	0	-	++	++	++
#4	78/F	Rt upper arm	I	1	0	0	-	++	++	++
#5	82/F	Rt hip	IIA	2	0	0	-	++	++	++
#6	81/F	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	++	++	++
#7	89/M	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	++	+	++
#8	79/M	Rt leg	IIIB	3	3	0	Lymph	++	+	++
#9	82/F	Lt auricular	IIA	2	0	0	-	++	+	++
#10	94/F	Lt cheek	IIA	2	0	0	-	++	+	++
#11	85/F	forehead	I	1	0	0	-	++	+	++
#12	89/F	Rt cheek	IIA	2	0	0	-	++	+	+
#13	83/F	Lt cheek	IIIA	1	1a	0	Lymph	+	++	+
#14	84/F	Rt cheek	I	1	0	0	-	-	+	-
#15	81/F	Lt leg	IV	4	4	1	Lymph, Spleen	-	-	++
#16	77/F	Lt cheek	I	1	0	0	-	-	-	+
#17	83/F	Lt auricular	I	1	0	0	-	-	-	+
#18	82/F	Rt back	IIIA	2	1a	0	Lymph	-	-	-
#19	80/F	Nasal tip	IIA	2	0	0	-	-	-	-

次に、MCPyV-LTA 発現と遠隔転移との関連を検討した。MCPyV 陽性で遠隔転移を有する症例は 2 例、MCPyV 陽性で遠隔転移を認めない症例は 11 例、MCPyV 陰性で遠隔転移を有する症例は 2 例、MCPyV 陰性で遠隔転移を認めない症例は 4 例であった。統計解析の結果、MCPyV-LTA 発現と遠隔転移との間に有意な関連は認められなかった (χ^2 検定, $p=0.3845$) (表 8)。

表 8 : MCC 臨床検体における MCPyV 発現と遠隔転移の相関関係

転移	MCPyV		<i>p</i> Values
	陽性	陰性	
あり	2	2	<i>p</i> =0.3845
なし	11	4	

さらに、MCPyV-LTA 発現と腫瘍発生部位との関連を検討した。MCPyV 陽性例は日光曝露部位 11 例、非曝露部位 5 例、MCPyV 陰性例は日光曝露部位 2 例、非曝露部位 1 例であった。統計解析の結果、MCPyV-LTA 発現と発生部位との間にも有意な関連は認められなかった (χ^2 検定, $p=0.94$) (表 9)。

表 9 : MCC 臨床検体における MCPyV 発現と腫瘍発生部位との相関関係

腫瘍発生 部位	MCPyV		<i>p</i> Values
	陽性	陰性	
露光部	11	2	<i>p</i> =0.94
非露光部	5	1	

2. 2 種類の MCC-PDX の樹立

MCC は、80%で MCPyV が陽性であることが知られている。本研究では、図 6 の症例 (MK1) および図 7 の症例 (MK2) の腫瘍を用いて、日本人患者由来としては初めてとなる MCPyV 陽性 MCC-PDX モデルの樹立を試みた。

MCC-PDX の樹立に際しては、手術により切除した腫瘍組織を NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。移植後約 6 か月で、MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 のいずれにおいても、移植部位に直径 10 mm 以上の硬い結節が形成され、腫瘍の増大が確認された (初代: G0) (図 14)。腫瘍体積が 1000~1500 mm³ に達した時点で、MCC-PDX 腫瘍を次世代の NOD/SCID マウスに継代し、G3 以降では腫瘍の増殖速度が安定した。

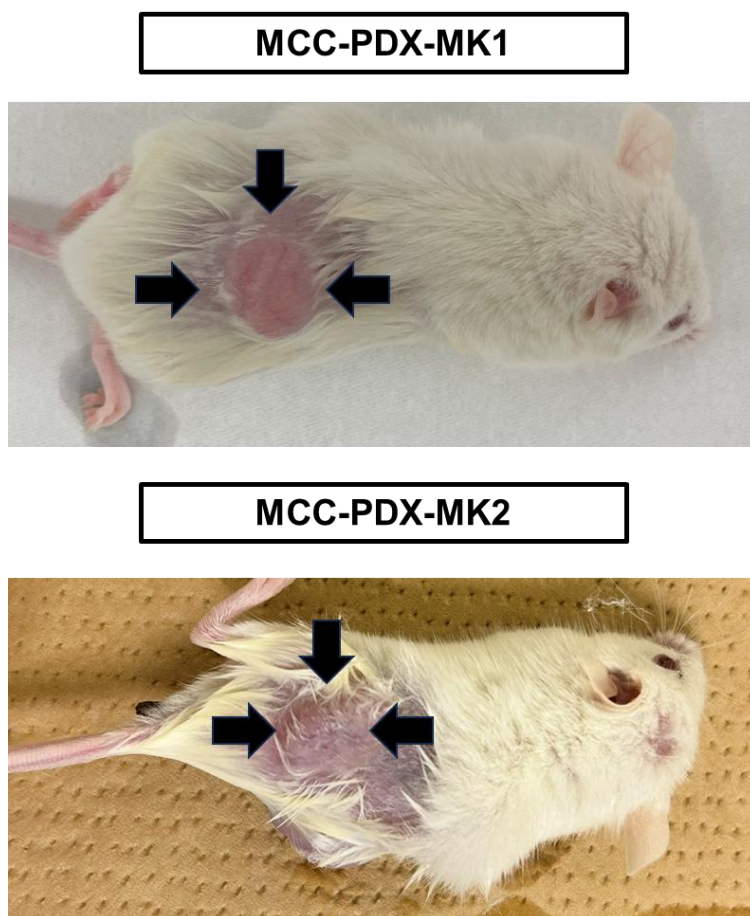


図 14 : 樹立した MCC-PDX-MK1、MCC-PDX-MK2 モデル (G0)
いずれも背部に 7mm 大の皮下結節を認めた (黒矢印)。

G0 で得られた MCC-PDX 組織について、HE 染色および CK20 免疫染色を行ったところ、MCC-PDX-MK1 および-MK2 腫瘍はいずれも原発腫瘍と同様の形態を示し、CK20 染色においても核周囲の点状陽性像が観察された (図 15、16)。

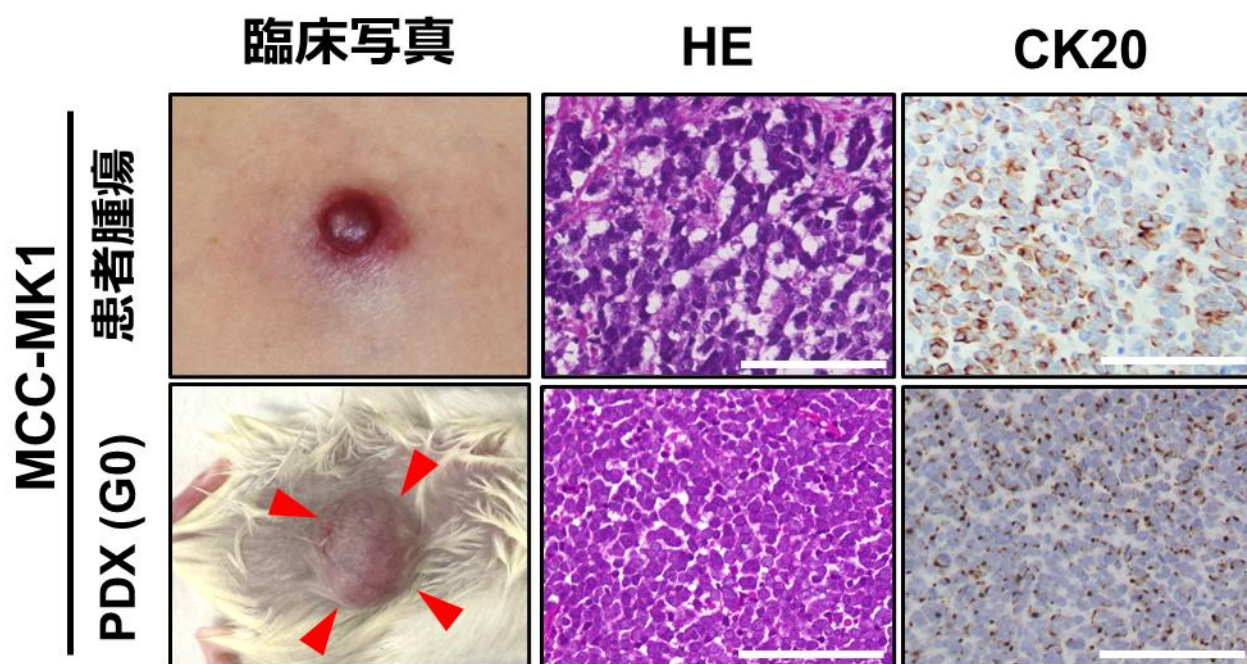


図 15：患者腫瘍および MCC-PDX-MK1(G0)における臨床的特徴と HE 所見、抗 CK20 抗体による免疫組織病理学的所見 (scale bar = 100 μ m)

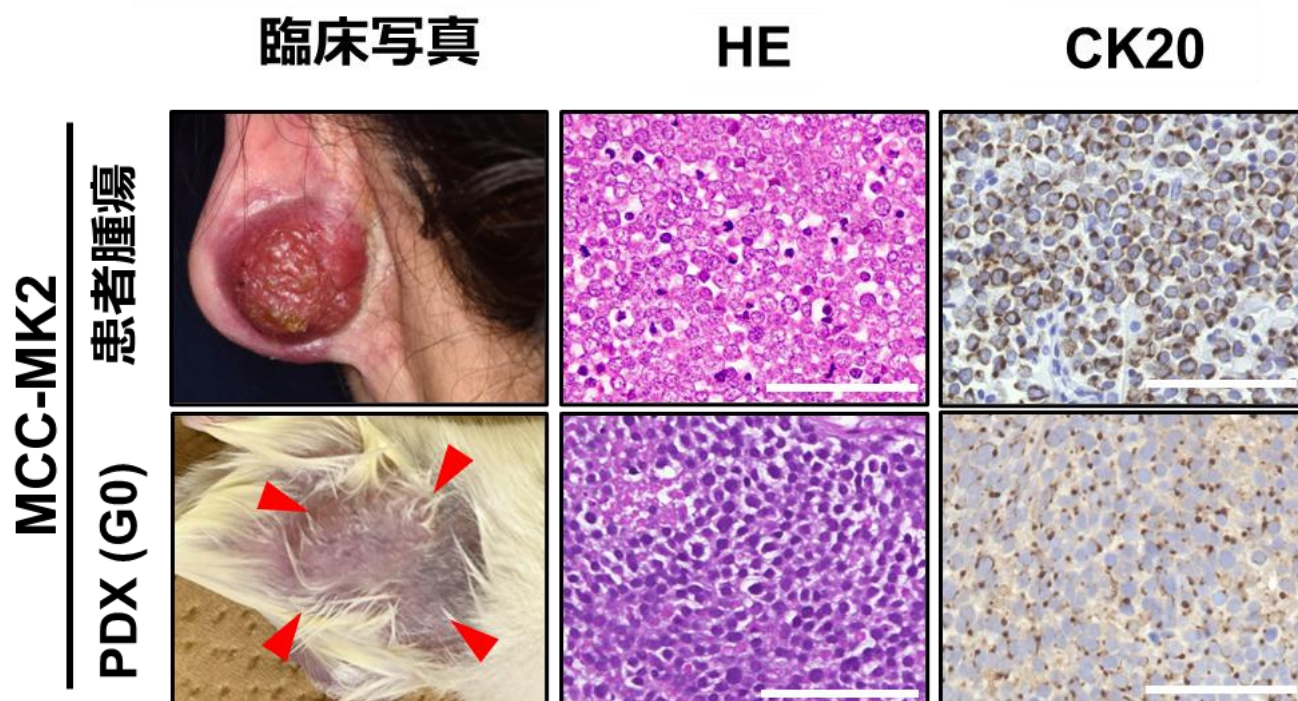


図 16：患者腫瘍および MCC-PDX-MK2（G0）における臨床的特徴と HE 所見、抗 CK20 抗体による免疫組織病理学的所見（scale bar = 100 μ m）

MCPyV-LTA および p53 の発現パターンは、いずれの PDX 腫瘍においても原発腫瘍とほぼ同様であった（図 17、図 18）。MCC-PDX-MK1 腫瘍および対応する患者腫瘍では、MCPyV-LTA が強陽性（++）、p53 が中程度陽性（+）として核内に染色が認められた。MCC-PDX-MK2 では、MCPyV-LTA、p53 いずれも強陽性（++）を示し、核内に染色が確認された。Rb1 の免疫染色では、MCC-PDX-MK2 は原発腫瘍と同様に強陽性（++）の核内染色を示した（図 18）。一方、MCC-PDX-MK1 では、原発腫瘍で Rb1 は強陽性（++）の強い核内染色を示したのに対し、PDX 腫瘍では主に細胞質に Rb1 強陽性（++）の染色が観察され、異なる発現局在を示した（図 17）。

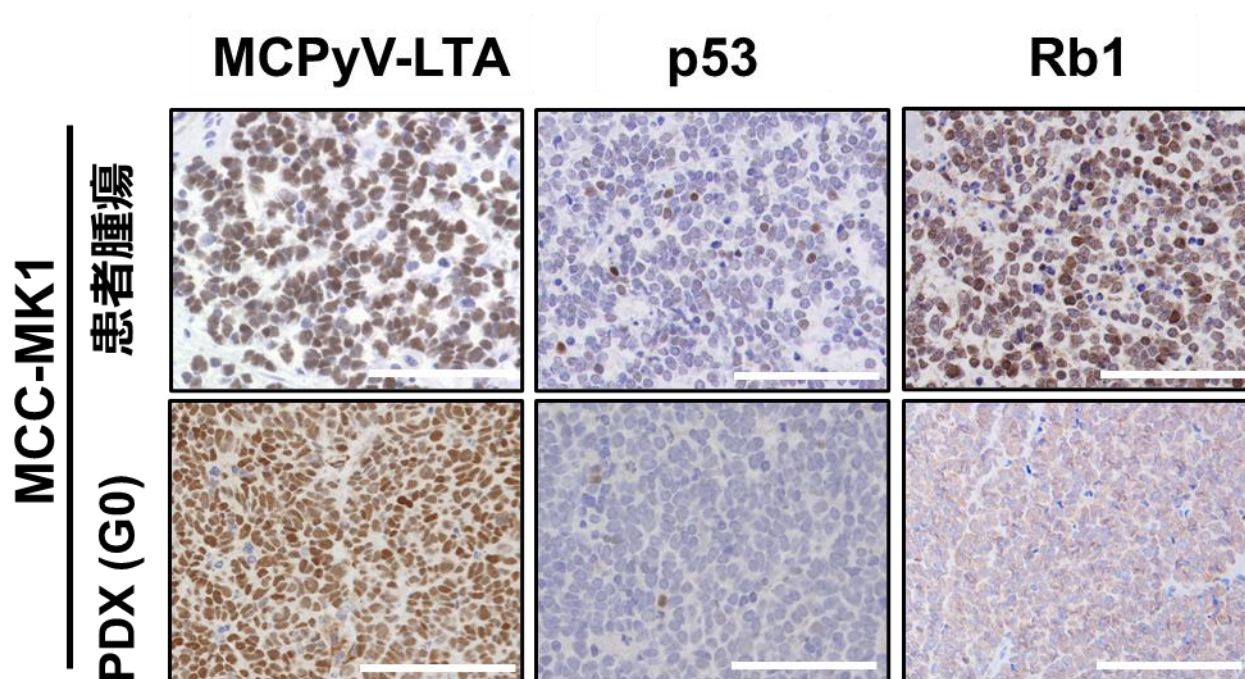


図 17：患者腫瘍および MCC-PDX-MK1（G0）の免疫組織病理学的所見
（MCPyV、p53、Rb1）

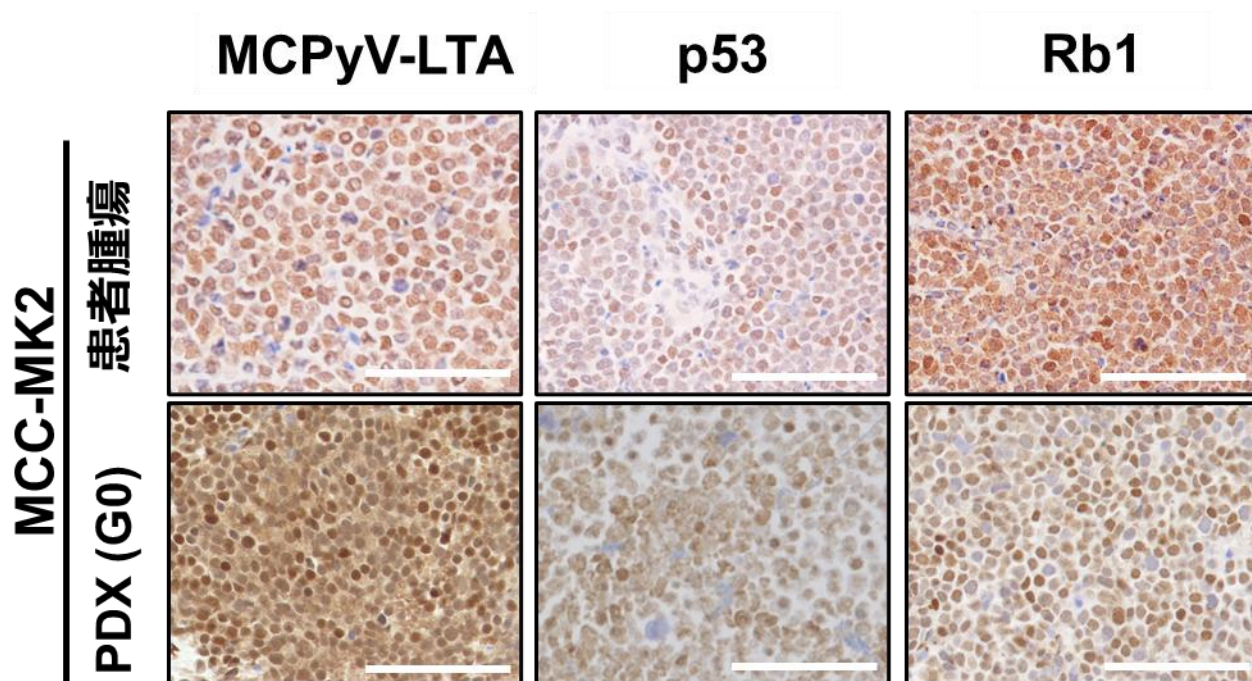


図 18：患者腫瘍および MCC-PDX-MK2（G0）の免疫組織病理学的所見
（MCPyV、p53、Rb1）

また、MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 腫瘍をヌードマウス (nu/nu) に移植した結果、MCC-PDX-MK2 では移植が成功し腫瘍が形成されたが (図 19)、MCC-PDX-MK1 では腫瘍形成が認められなかった。

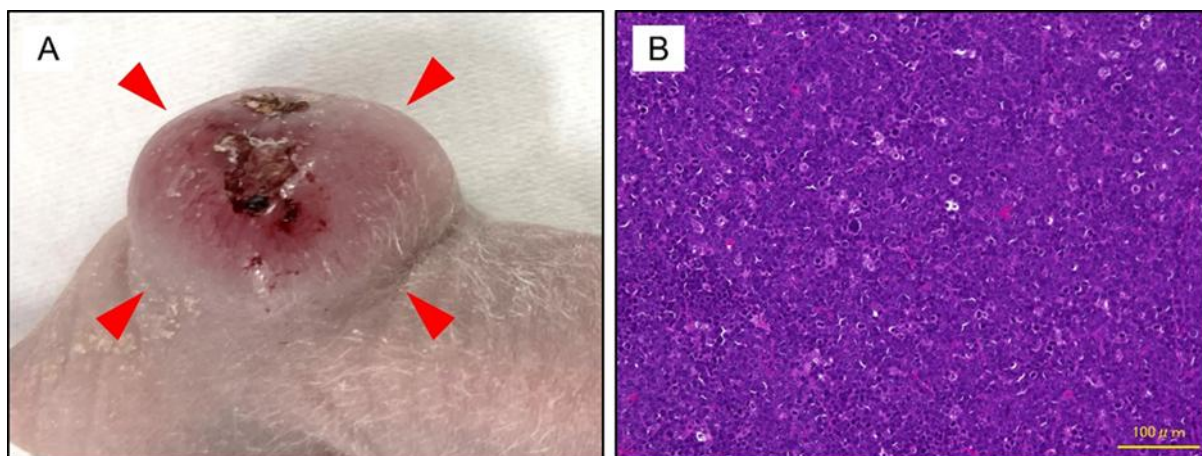


図 19 : MCC-PDX-MK2 腫瘍 (G4) のヌードマウスへの移植

(A) MCC-PDX-MK2(G4)腫瘍は、ヌードマウスへの移植に成功し、移植部位で増大が確認された。赤い矢頭は移植された腫瘍を示す。

(B) ヌードマウスから摘出した腫瘍の組織病理学的所見 (HE 染色、scale bar = 100 μm)。

CryoStor10 (CS10^B) で-80℃凍結保存されていた MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 腫瘍を NOD/SCID マウスに再移植したところ、いずれの腫瘍も生着し、再増殖が確認された (図 20)。

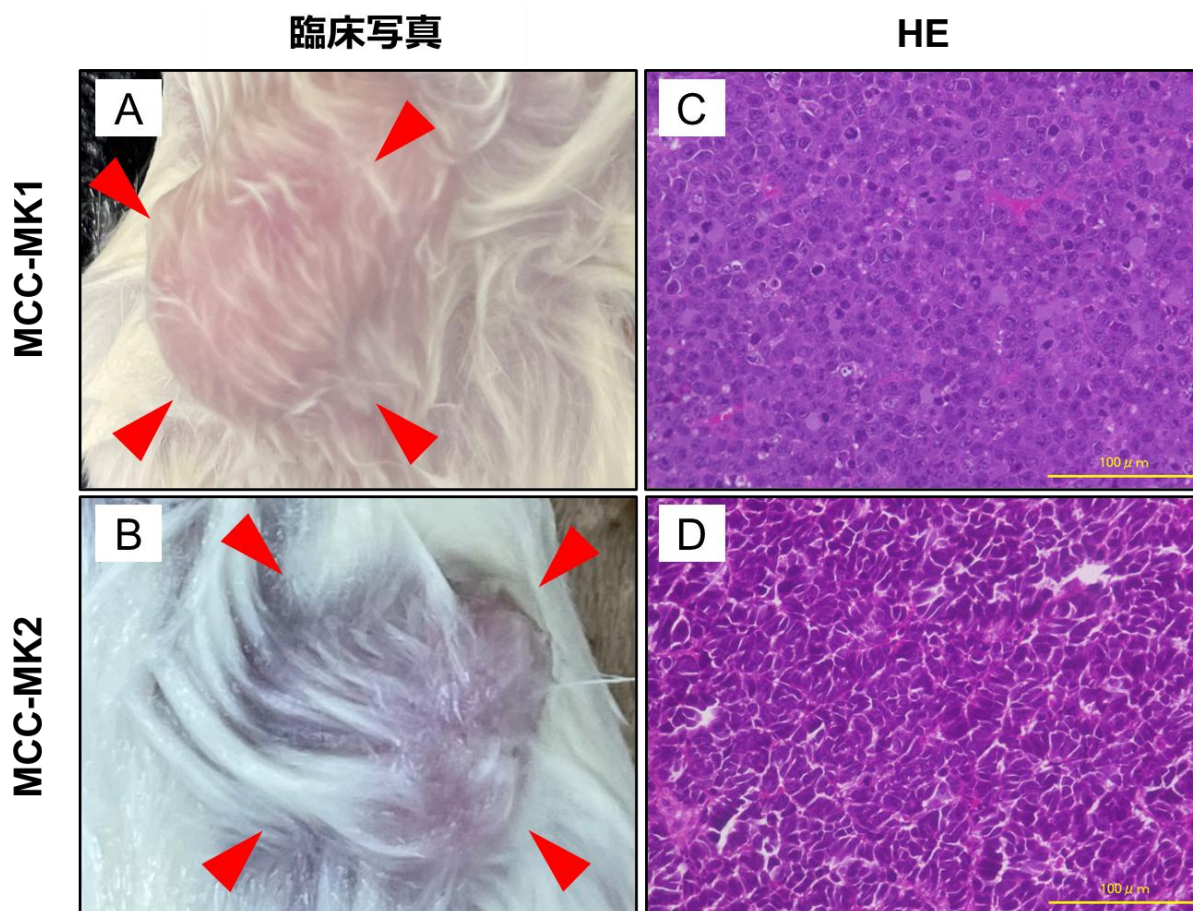


図 20 : 凍結保存していた MCC-PDX-MK1、MCC-PDX-MK2 腫瘍の NOD/SCID マウスへの再移植

(A, B) 凍結保存していた MCC-PDX-MK1 および MK2 腫瘍はいずれも NOD/SCID マウスへの再移植に成功した。赤い矢頭は移植され再増大した腫瘍を示す。

(C, D) 移植から約 6 週間後に、増大した腫瘍を摘出し、組織学的に評価した (HE 染色、scale bar = 100 μ m)。

3. MCC-PDXにおけるがん関連遺伝子変異は、患者原発腫瘍と同一であった

患者原発腫瘍と対応する PDX 腫瘍のがん関連ゲノムプロファイルを比較するため、包括的ながんパネル 160 遺伝子を用いたディープシーケンス解析を実施した。MCC-PDX-MK1 では、G1 および G2 腫瘍の両方で、患者原発腫瘍に認められた *RBI* (p.E323*) 変異が保持されていた (表 10)。不明な意義のバリエントを含むマイナーな遺伝子変異は、患者腫瘍および PDX 腫瘍のいずれにも認められなかった。

一方、MCC-PDX-MK2 では、G2 および G3 腫瘍においても患者原発腫瘍と同様に、マイナーな遺伝子変化を含めて有意な変異は認められなかった (表 11)。

表 10：患者腫瘍と MCC-PDX-MK1（G1, G2）腫瘍の主な遺伝子変異
(VAF: variant allele frequency)

MCC-PDX-MK1	
サンプル	Major gene alterations (VAF, %)
患者血液	None
患者原発腫瘍	<i>RB1</i> p.E323* (32.9%)
PDX 腫瘍(G1)	<i>RB1</i> p.E323* (47.4%)
PDX 腫瘍(G2)	<i>RB1</i> p.E323* (46.1%)

表 11：患者腫瘍と MCC-PDX-MK2（G2, G3）腫瘍の主な遺伝子変異
(VAF: variant allele frequency)

MCC-PDX-MK2	
サンプル	Major gene alterations (VAF, %)
患者血液	None
患者原発腫瘍	None
PDX 腫瘍(G2)	None
PDX 腫瘍(G3)	None

4. MCC-PDX-MK1 腫瘍からの二次元細胞株樹立は困難であった。

まず、MCC-PDX-MK1 腫瘍を細かく細片し、通常の表面処理がされていないポリスチレン製 Dish および Collagen TypeI coated Dish に播種し、DMEM に 10%FBS を添加した培養液で細胞培養を試みたが、生着は認められなかった。次に、表 12 に示すように、組み合わせ①～④の異なる培養液組成を用いて培養を試みたが、いずれの条件でも細胞の定着や増殖を認められなかった。

表 12：細胞培養時の組み合わせ一覧

①～④を組み合わせで培養を試みた。

- | |
|-----------------------------------|
| ① 培養液の変更
(DMEM、RPMI、NeuroCult) |
| ② 添加するFBSの割合の変更
(10%、15%、20%) |
| ③ 培養液の交換頻度を変更
(毎日、1日毎、3日毎) |
| ④ 5% L-glutamineの添加 |

このため、micro/nano plate を Dish 上に設置し、その上に PDX 細胞を播種した。播種後 1 週間後に細胞は plate 上に定着し、3 週間には細胞増殖がみられた (図 21)。

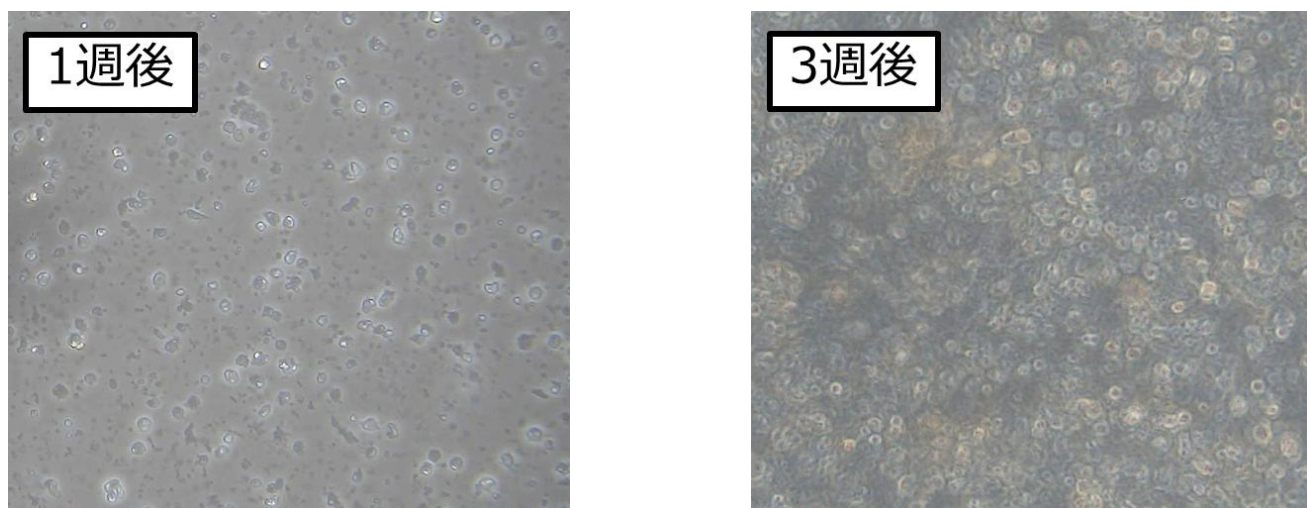


図 21 : micro/nano plate 上に播種した細胞
播種 1 週後に細胞の定着が見られ、3 週間には細胞の増殖を認める。培養液は RPMI+10%FBS+5% L-glutamine を使用した。

次に図 15 で増殖した細胞にトリプシン処理を行った後、micro/nano plate が設置された新たな Dish に細胞継代を試みた。播種後 1 週間で細胞は plate 上に定着が確認されたが、その後細胞増殖は見られなかった（図 21）。

細胞継代時のトリプシン処理に問題があると考え、トリプシン処理時間を短縮したり、トリプシンを用いずにピペッティング処理のみで細胞継代を試みた。しかし、いずれの条件でも細胞は micro/nano plate 上に定着したものの、その後の増殖は認められなかった。

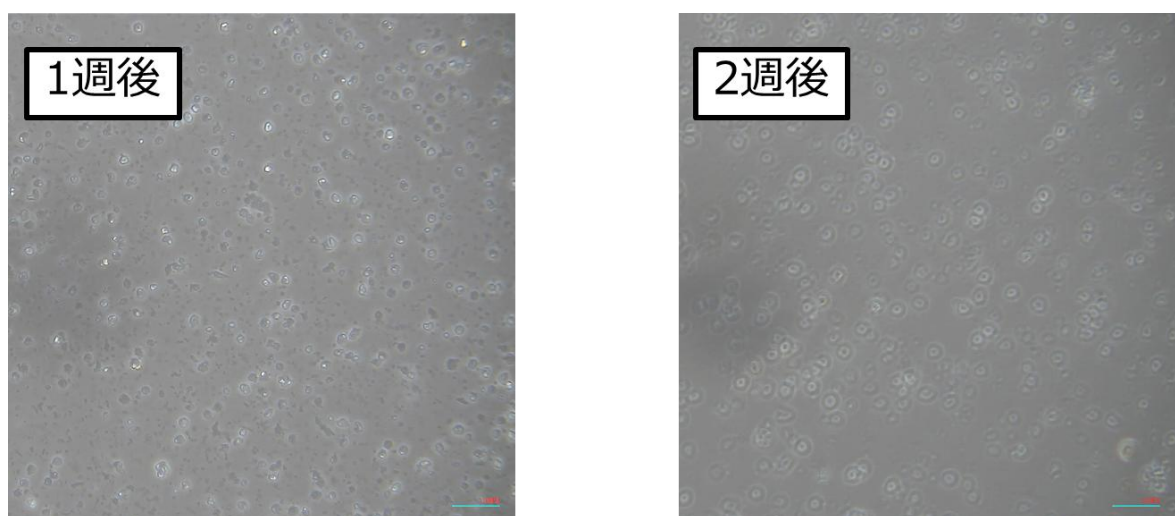


図 22 : 図 21 の Dish から細胞継代を行った後の細胞
micro/nano plate 上に細胞播種した。継代 2 週後も細胞増殖は見られなかった。培養液は RPMI+10%FBS+5% L-glutamine を使用した。

4. エリブリンは MCC-PDX-MK1、MCC-PDX-MK2 とともに腫瘍成長を抑制する

MCC-PDX-MK1 および-MK2 モデルに対する殺細胞性抗がん剤の感受性を評価するために殺細胞性抗がん剤を用いた治療実験を行った。腫瘍を有する NOD/SCID マウスを無治療群（コントロール）および 4 種類の治療群に無作為に分けた。各治療は以下の通りである：シスプラチン（5 mg/kg、4 日ごとに腹腔内投与）、エトポシド（10 mg/kg、初回 5 日間腹腔内投与）、ドセタキセル（20 mg/kg、週 1 回静脈内投与）、およびエリブリン（0.5 mg/kg、週 1 回静脈内投与）。治療期間中、マウスの運動性および体重変化を観察したが、いずれの治療群においても体重減少が 10%を超える個体や死亡例は認められなかった。

MCC の標準的な細胞障害性化学療法薬であるシスプラチンおよびエトポシドはいずれのモデルにおいても効果を示さなかった（図 23、図 24）。

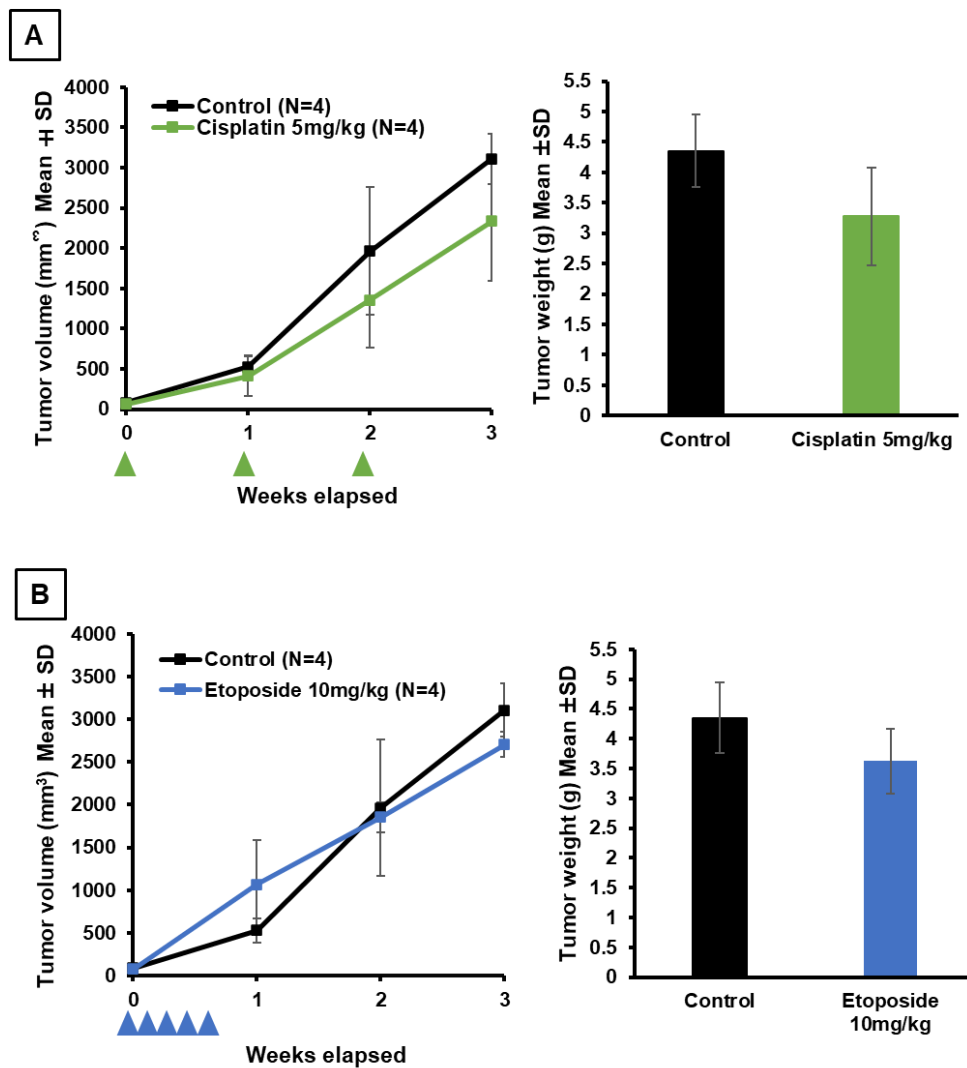


図 23：シスプラチンおよびエトポシド治療群における MCC-PDX-MK1 腫瘍サイズの推移

緑、青の矢頭はそれぞれシスプラチン（5 mg/kg、4 日ごとに腹腔内投与）、エトポシド（10 mg/kg、初回 5 日間腹腔内投与）の投与時期を示す。腫瘍体積はノギスを用いて週 1 回測定した。腫瘍体積は（長軸×短軸²）/2 の計算式で近似した。データは平均値で表示し、エラーバーは平均値からの標準偏差を表す。無治療群およびシスプラチン、エトポシド投与群の腫瘍は、治療開始 21 日後に摘出した。

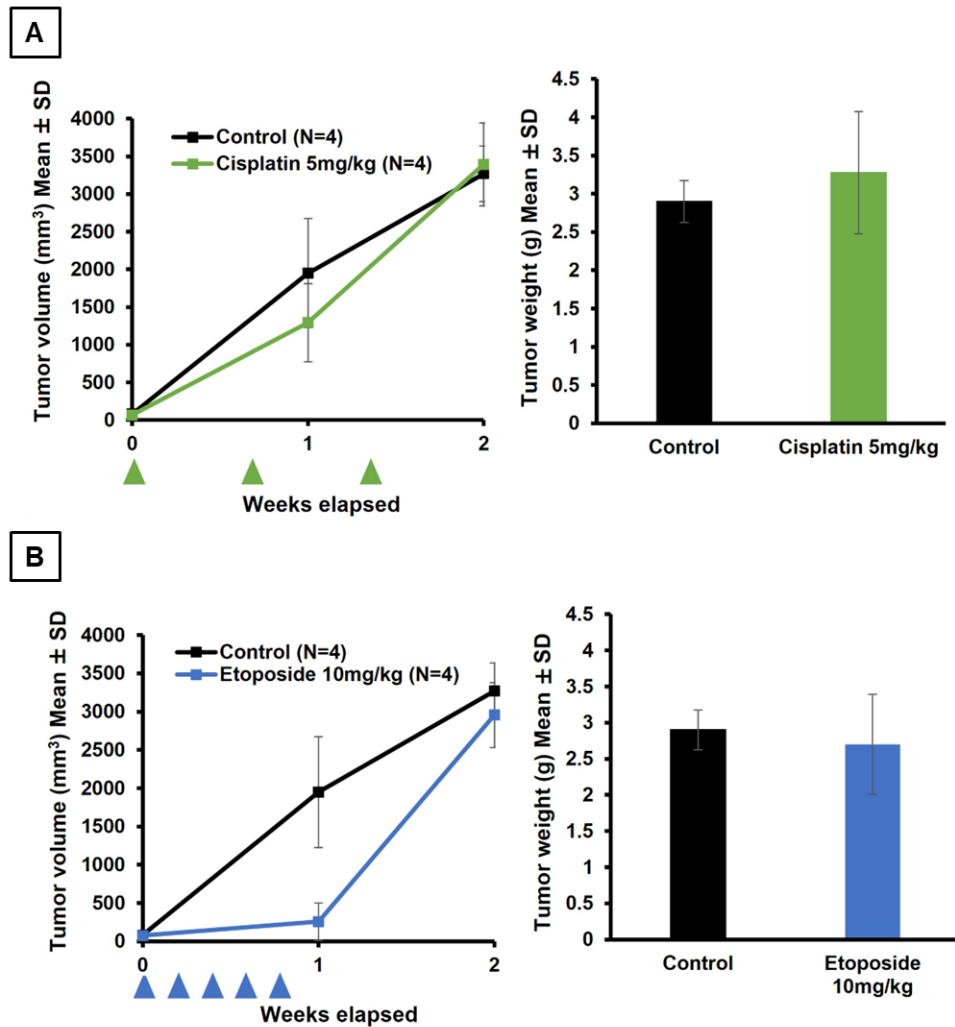


図 24：シスプラチンおよびエトポシド治療群における MCC-PDX-MK2 腫瘍サイズの推移

緑、青の矢頭はそれぞれシスプラチン（5 mg/kg、4 日ごとに腹腔内投与）、エトポシド（10 mg/kg、初回 5 日間腹腔内投与）の投与時期を示す。腫瘍体積はノギスを用いて週 1 回測定した。腫瘍体積は（長軸×短軸²）/2 の計算式で近似した。データは平均値で表示し、エラーバーは平均値からの標準偏差を表す。無治療群およびシスプラチン、エトポシド投与群の腫瘍は、治療開始 14 日後に摘出した。

また、ドセタキセルも MCC-PDX-MK1 腫瘍には無効であった。一方、エリブリンによる治療では MCC-PDX-MK1 腫瘍が完全に消失し、その後 2 週間の観察期間中に再発は認められなかった（図 25）。

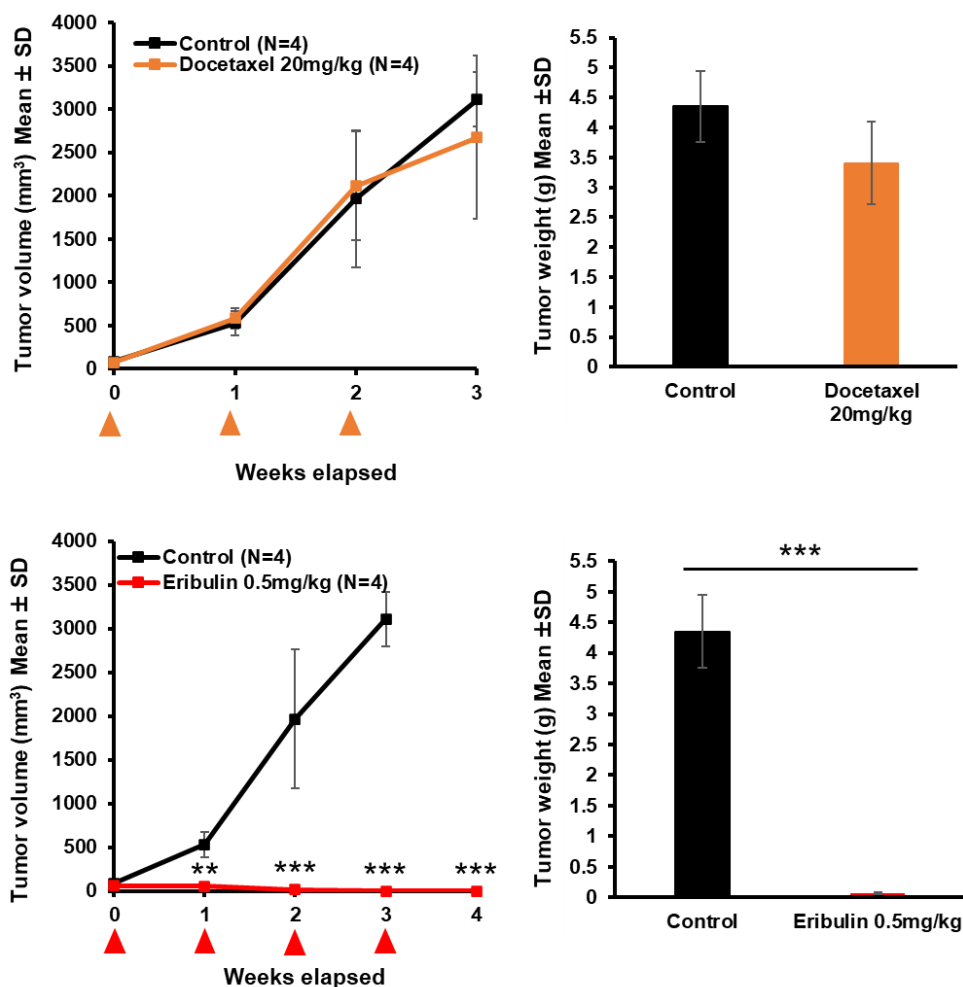


図 25：ドセタキセルおよびエリブリン治療群における MCC-PDX-MK1 腫瘍サイズの推移

橙、赤の矢頭はそれぞれドセタキセル（20 mg/kg、週 1 回静脈内投与）、およびエリブリン（0.5 mg/kg、週 1 回静脈内投与）の投与時期を示す。腫瘍体積はノギスを用いて週 1 回測定した。腫瘍体積は（長軸×短軸²）/2 の計算式で近似した。データは平均値で表示し、エラーバーは平均値からの標準偏差を表す。無治療群およびドセタキセル投与群の腫瘍は、治療開始 21 日後に摘出した。エリブリン投与群では 28 日間の治療後も腫瘍の再増殖は認められなかった。エリブリン投与群と無治療群の間では、いずれの比較においても統計学的に有意な差を認めた。** $p < 0.01$ ；***, $p < 0.001$ （t 検定、コントロール群との比較）。

MCC-PDX-MK2 腫瘍は、ドセタキセルおよびエリブリンの単剤治療のいずれにも良好に反応した（図 26）。

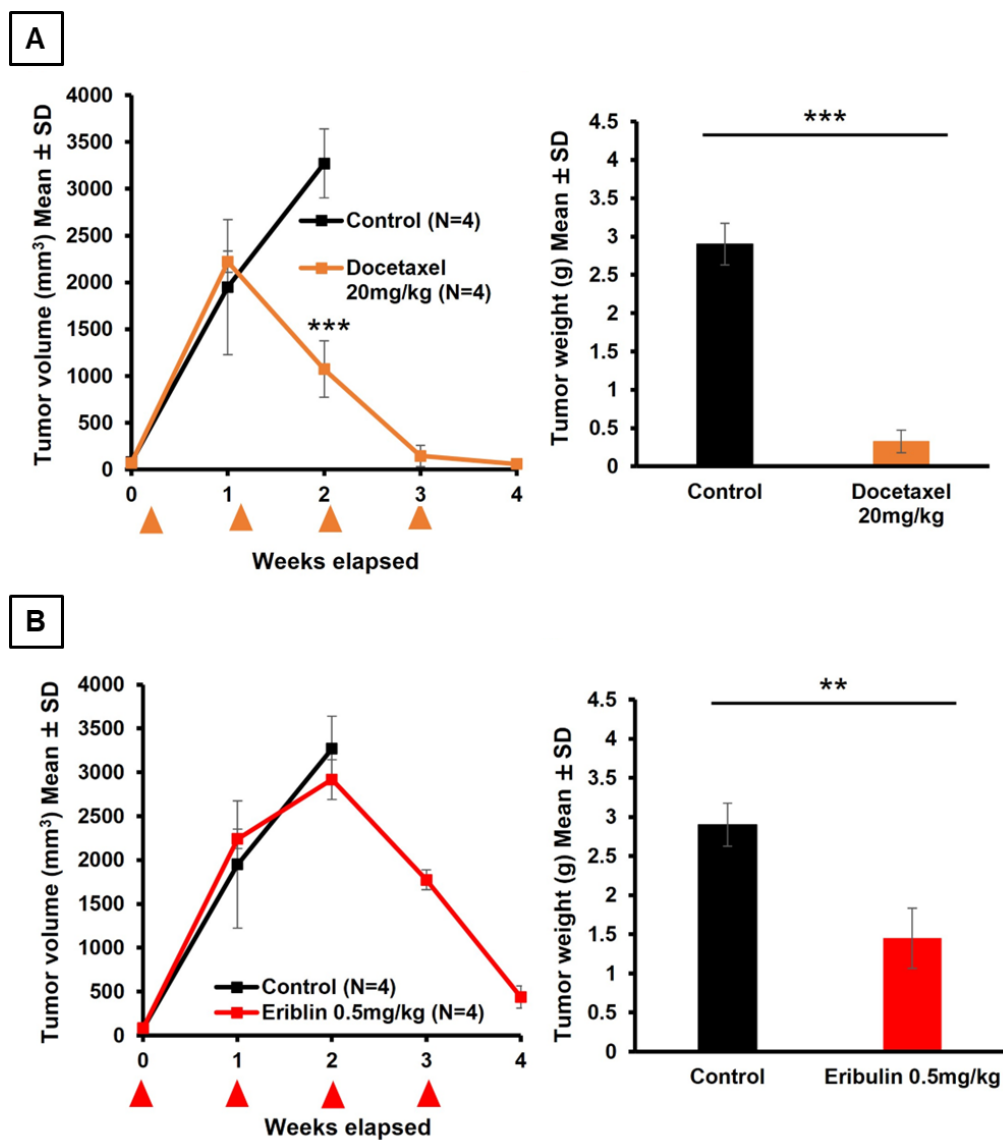


図 26：ドセタキセルおよびエリブリン治療群における MCC-PDX-MK2 腫瘍サイズの推移

橙、赤の矢頭はそれぞれドセタキセル（20 mg/kg、週 1 回静脈内投与）、およびエリブリン（0.5 mg/kg、週 1 回静脈内投与）の投与時期を示す。腫瘍体積はノギスを用いて週 1 回測定した。腫瘍体積は（長軸×短軸²）/2 の計算式で近似した。データは平均値で表示し、エラーバーは平均値からの標準偏差を表す。無治療群の腫瘍は治療開始 14 日後に摘出した。ドセタキセル投与群およびエリブリン投与群の腫瘍は、治療開始 28 日後に摘出した。ドセタキセル投与

群、エリブリン投与群はいずれも無治療群の間に統計学的に有意な差を認めた。 ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (t 検定、コントロール群との比較)。

次に、摘出した腫瘍について、腫瘍増殖抑制効果を評価した。摘出した腫瘍は図 27 に示す。

摘出した腫瘍標本は、有糸分裂活動の指標として PHH3、増殖マーカーとし Ki-67、および細胞死評価のための TUNEL assay を用いて解析した。

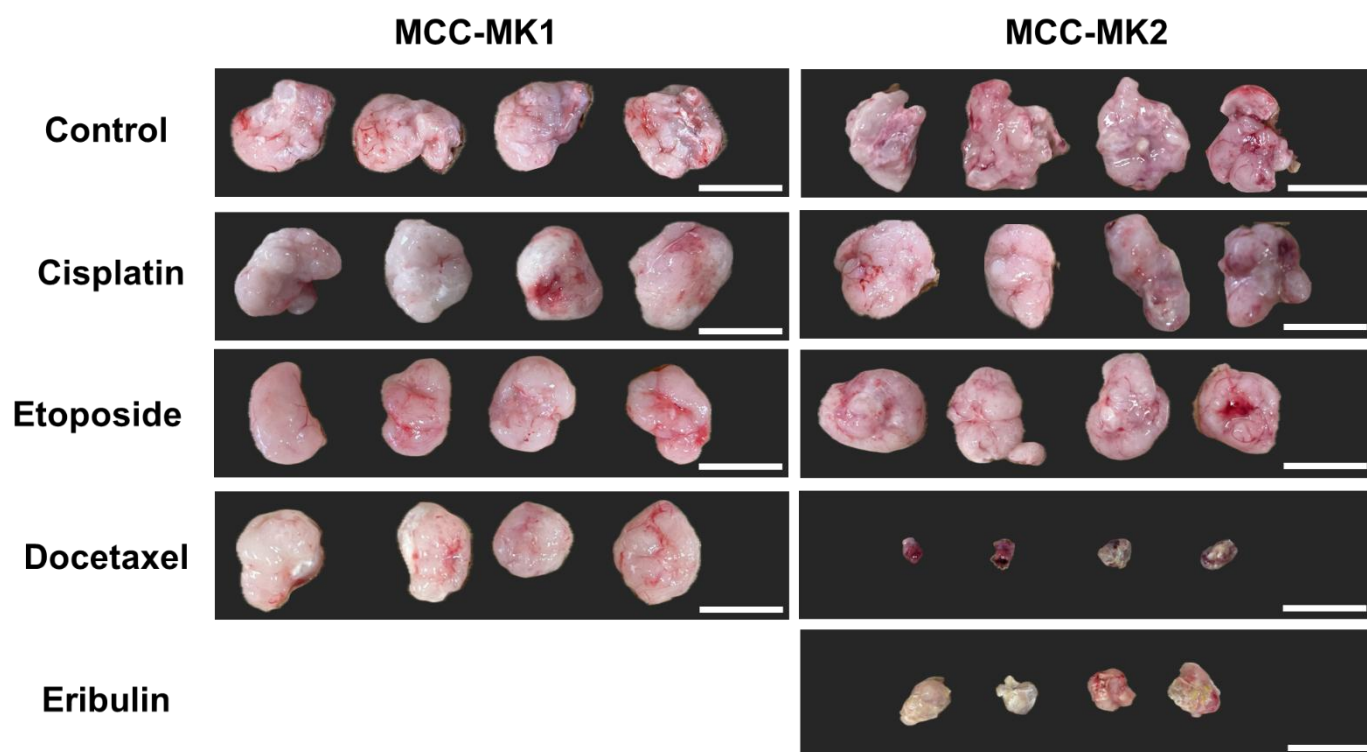


図 27：摘出した腫瘍

各治療群から摘出した腫瘍の外観を示す。MCC-PDX-MK1 のコントロール、シスプラチン治療群、エトポシド治療群、ドセタキセル治療群の腫瘍は治療開始後 21 日で摘出している。エリブリン投与群では、治療により腫瘍が完全に消退したため、摘出標本は得られず写真は提示していない。

MCC-PDX-MK2 のコントロール、シスプラチン治療群、エトポシド治療群の腫瘍は治療開始後 14 日で摘出した。ドセタキセル治療群、エリブリン投与群の腫瘍は治療開始後 28 日で摘出した。 (scale bar = 1 cm)

MCC-PDX-MK1 腫瘍において、シスプラチン、エトポシド、ドセタキセル投与群はいずれも TUNEL 陽性細胞比率と Ki-67 陽性細胞比率に影響を与えていなかった (図 28)。なお、エリブリン投与群では治療により腫瘍が完全に消退したため、摘出標本は得られていない。

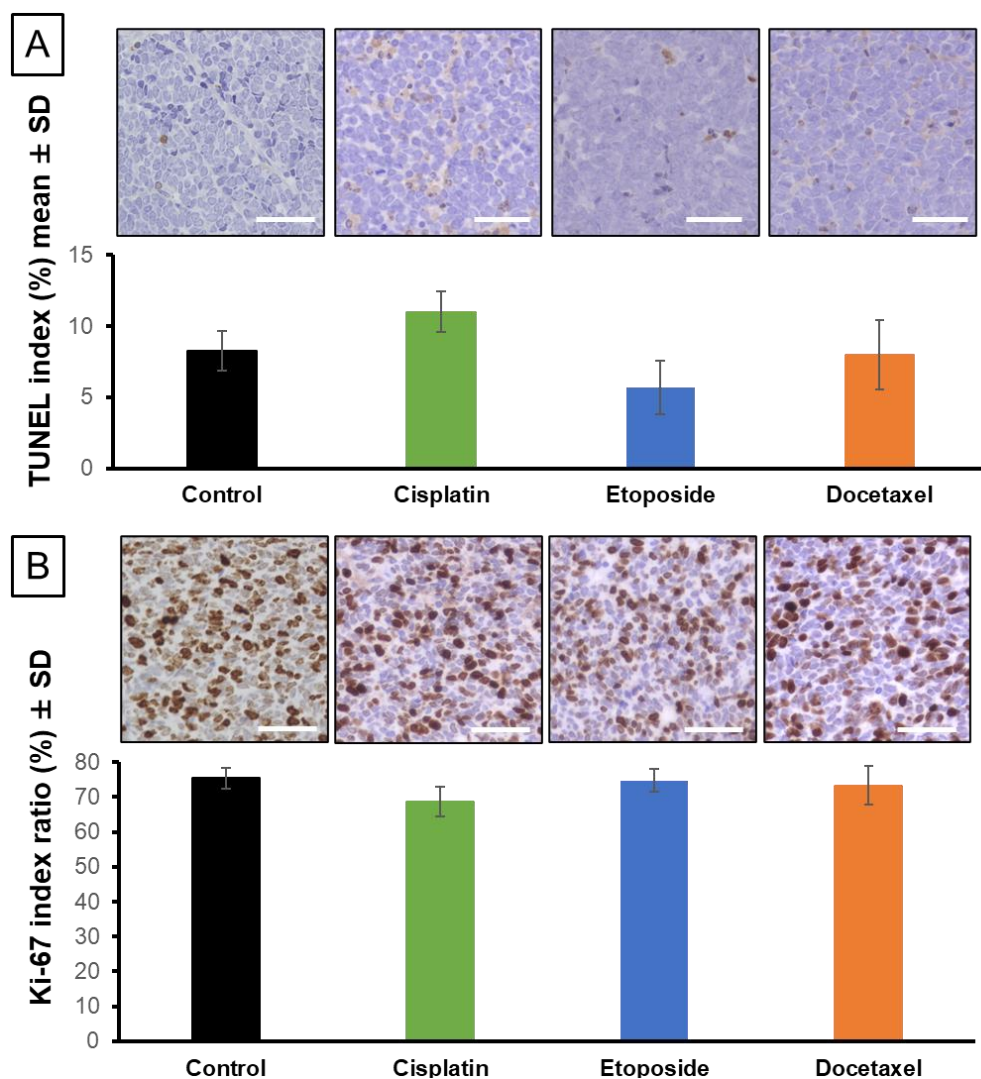


図 28 : エリブリン治療群以外の殺細胞性抗がん剤治療群における MCC-PDX-MK1 腫瘍の TUNEL assay および Ki-67 の染色率

治療開始後 21 日経過した MCC-PDX-MK1 腫瘍をそれぞれ摘出し、TUNEL assay (A) および Ki-67 抗体 (B) を用いた免疫組織化学染色を行った。各群における陽性細胞の割合を算出した (column : 100 個の腫瘍細胞中の陽性細胞の平均値、エラーバー : 標準偏差、各群 $n=3$ 、scale bar = 100 μm)。** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (t 検定、コントロール群との比較)。

MCC-PDX-MK2 腫瘍では、エリブリンおよびドセタキセル投与群と非投与群で TUNEL と Ki-67 陽性細胞比率に有意差が認められた (図 29)。

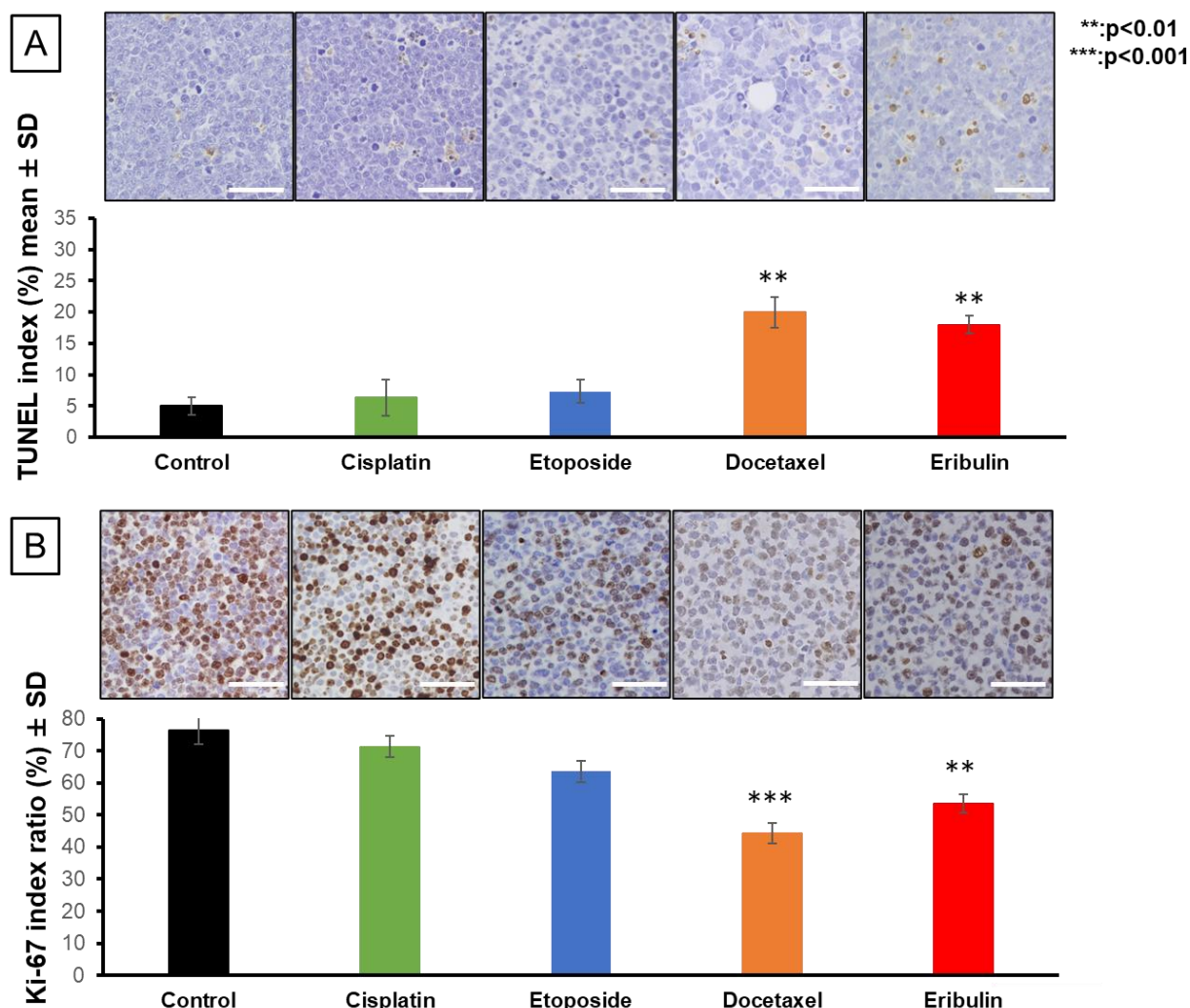


図 29：各殺細胞性抗がん剤治療群における MCC-PDX-MK1 腫瘍の TUNEL assay および Ki-67 の染色率

無治療群、シスプラチン、エトポシド投与群の腫瘍は、治療開始 14 日後に摘出した。ドセタキセル、エリブリン投与群の腫瘍は治療開始 28 日後に摘出した。摘出された MCC-PDX-MK2 腫瘍はそれぞれ、TUNEL assay (A) および Ki-67 抗体 (B) を用いた免疫組織化学染色を行った。各群における陽性細胞の割合を算出した (column: 100 個の腫瘍細胞中の陽性細胞の平均値、エラーバー: 標準偏差、各群 n=3、scale bar=100 μ m)。**p<0.01; ***, p<0.001 (t 検定、コントロール群との比較)。

著明な治療効果を認めたエリブリン治療群の MCC-PDX-MK1 腫瘍については、治療開始 21 日後のでは細胞死の評価は難しいと考え、治療開始 48 時間後の病理学的評価を行った。エリブリン投与群での PHH3 陽性細胞比率は非投与群と比較し有意に高かった (図 30)。

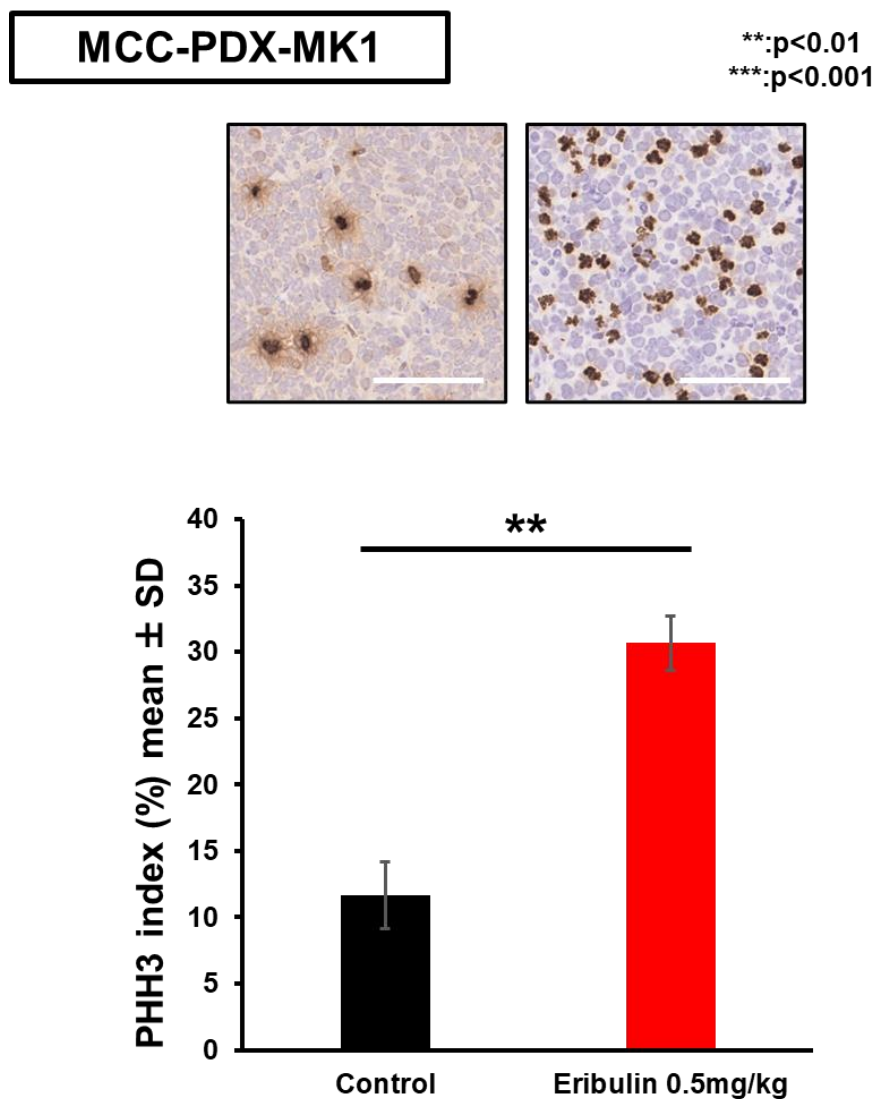


図 30 : MCC-PDX-MK1 のコントロール群およびエリブリン治療群における PHH3 陽性細胞比率の比較

エリブリン投与群の MCC-PDX-MK1 腫瘍を摘出し、抗 PHH3 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。PHH3 陽性細胞の割合を算出した (column : 100 個の腫瘍細胞中の陽性細胞の平均値、エラーバー : 標準偏差、各群 $n=3$ 、scale bar=100 μm)。** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (t 検定、コントロール群との比較)。

MCC-PDX-MK1 腫瘍において、TUNEL 陽性細胞比率は、エリブリン投与群

で非投与群より有意に高かった。また、Ki-67 陽性腫瘍細胞比率は、エリブリン投与群で非投与群より有意に低下していた（図 31）。

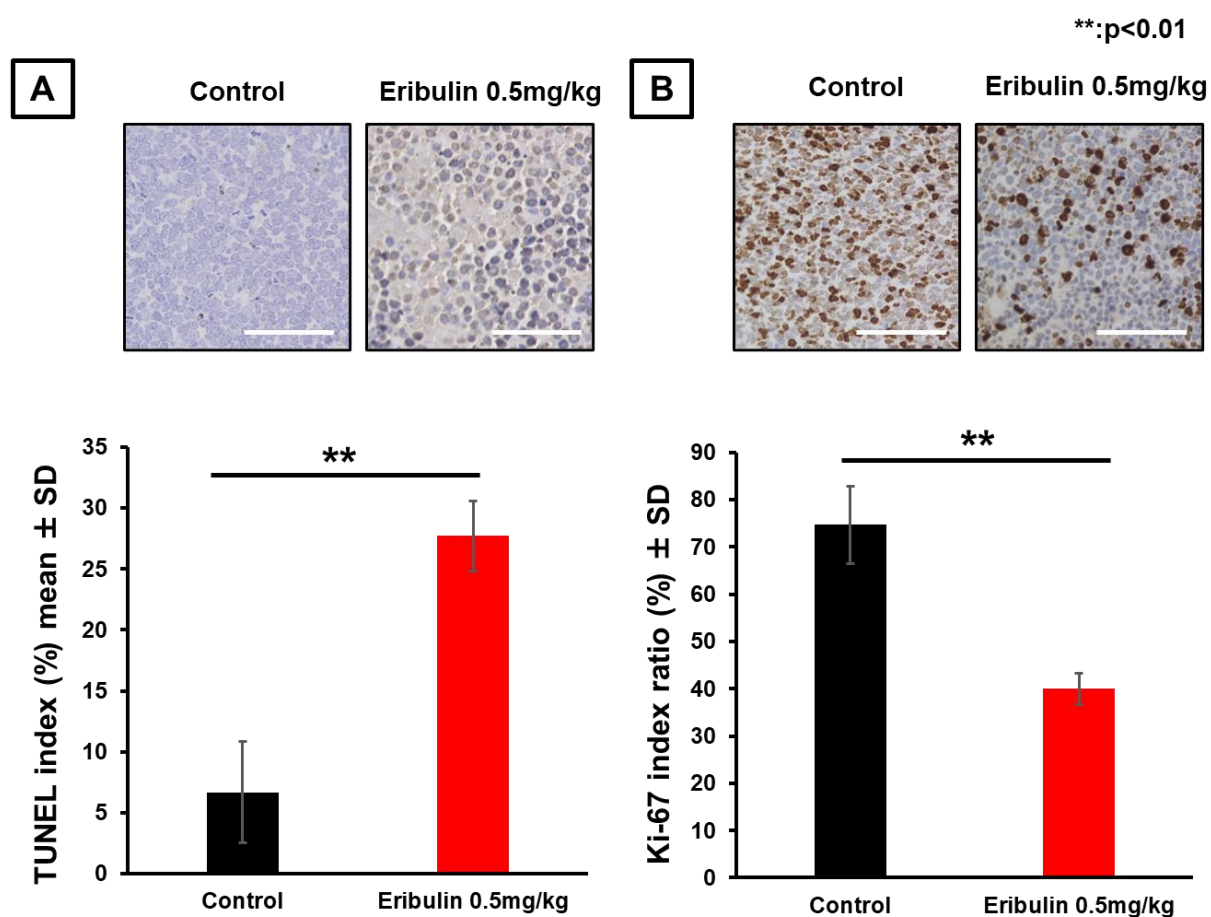


図 31:エリブリン治療群における MCC-PDX-MK1 腫瘍の TUNEL assay および Ki-67 染色

エリブリン投与 48 時間後に MCC-PDX-MK1 腫瘍を摘出し、TUNEL assay (A) および Ki-67 抗体 (B) を用いた免疫組織化学染色を行った。各群における陽性細胞の割合を算出した (column : 100 個の腫瘍細胞中の陽性細胞の平均値、エラーバー : 標準偏差、各群 $n=3$ 、scale bar = 100 μm)。** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (t 検定、コントロール群との比較)。

5. エリブリン抵抗性 PDX マウスの樹立

MCC-PDX-MK1 のエリブリン治療群（以下、MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 と略す）において、治療開始 24 週後に腫瘍の再発を認めた（図 32）。

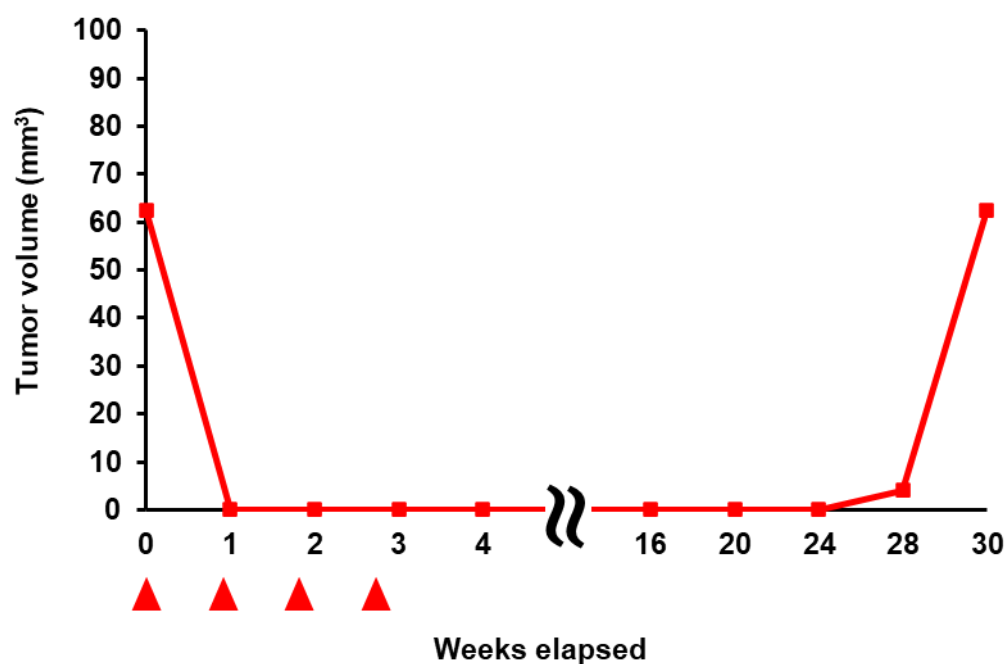


図 32 : MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 腫瘍の経過

エリブリン投与 2 週後に腫瘍は消退し再発なく経過していたが、治療開始 24 週目に再発した。その後腫瘍は増大傾向を認めた。

再発後、MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 腫瘍は増大傾向を認めたため、34 週後にエリブリン 0.5 mg/kg の静脈内投与を行った。投与後、腫瘍は縮小したがわずかに浸潤を触れるのみであったが、再投与 5 週後に再増大を認めた。増大を待ったのち、エリブリン 0.5 mg/kg の再投与を行った。再投与後も腫瘍は増大を認めたことから、追加投与を行ったが増大を続けたため、腫瘍を摘出した（図 33）。

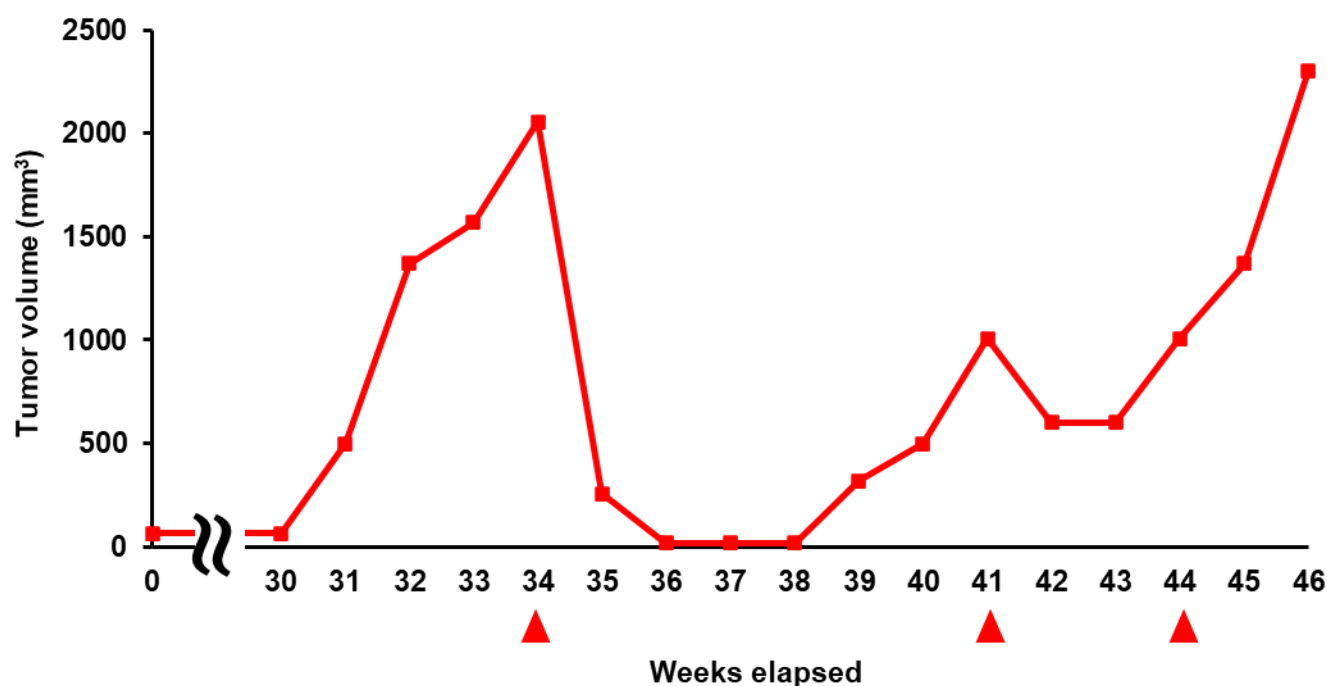


図 33 : MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 腫瘍の再増大後の治療経過

腫瘍が 2000mm³ 以上まで十分に増大したのを待ったのちエリブリン(0.5 mg/kg)の投与を行った。腫瘍はいったん消退したものの、投与して 4 週後に再増大し 41 週、44 週目に再度エリブリン(0.5 mg/kg)を投与した。投与後も腫瘍は増大したため、46 週目に継代をおこなった。赤の矢頭はそれぞれエリブリン (0.5 mg/kg) の投与時期を示す。

摘出した MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 腫瘍の病理学的所見を確認し、MCCであることを確認した（図 34）。

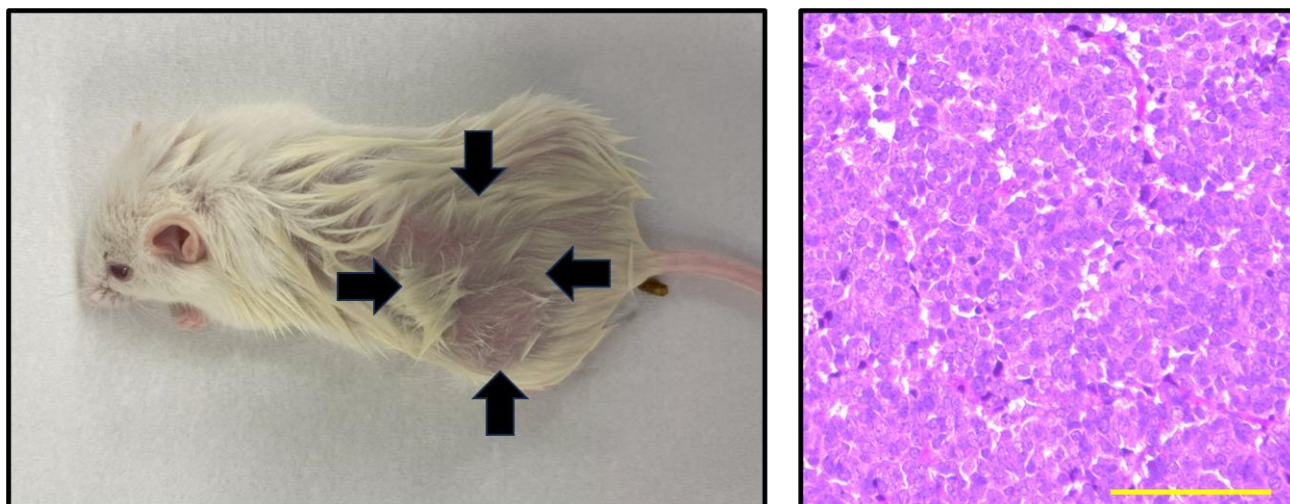


図 34 : MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 腫瘍と病理組織学的所見。

エリブリン治療後の MCC-PDX-MK1 腫瘍はエリブリン再投与後も治療抵抗性に再増大が確認された。黒矢印は増大した腫瘍を示す。

摘出した腫瘍の組織病理学的所見（HE 染色、scale bar=100 μ m）を確認すると MCC に一致した所見を認めた。

MCC-PDX-MK1-Eri-resist G0 腫瘍を2匹のマウスに継代をおこなった（MCC-PDX-MK1-Eri-resist G1）。継代した腫瘍は定着し、増大を確認したのち、エリブリン 0.5 mg/kg の静脈内投与を開始した。2匹とも腫瘍は横ばい～緩徐な増大傾向であったため、2週目にエリブリン 1.0 mg/kg に増量し投与した。投与後、腫瘍は縮小傾向なく経過したため同量で投与を継続した。投与開始2週後より腫瘍は増大傾向を示し、4週目に継代した（図 35）。

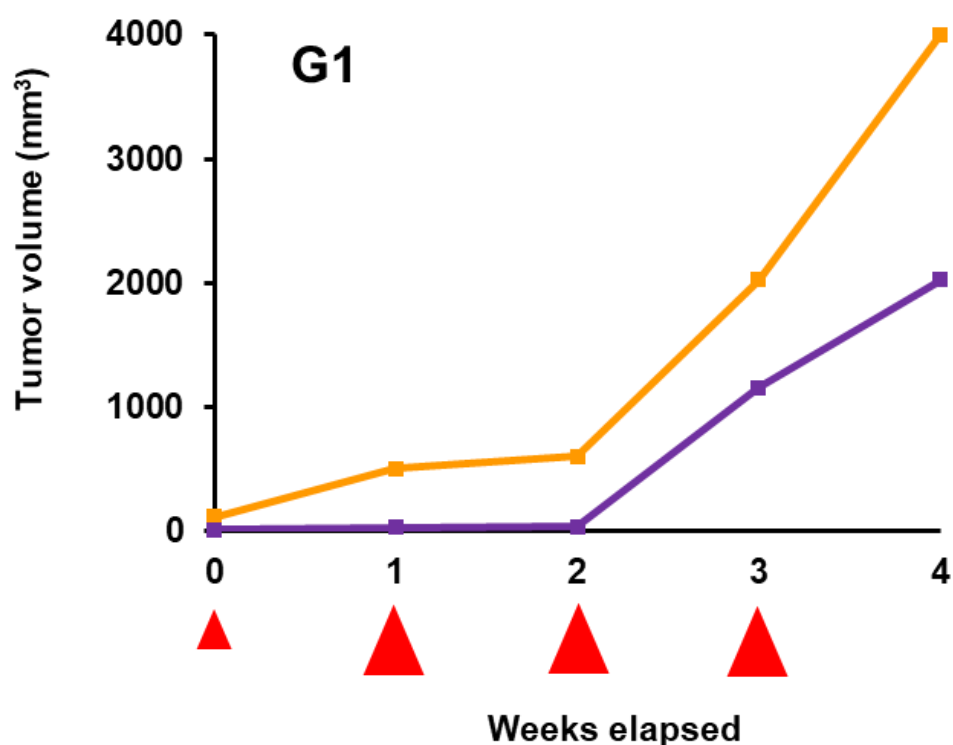


図 35 : MCC-PDX-MK1-Eri-resist G1 の治療経過

2例の MCC-PDX-MK1-Eri-resist G1 についてエリブリン 0.5 mg/kg で投与を開始した。腫瘍は横ばい～緩徐な増大傾向であったため、2週目にエリブリン 1.0 mg/kg に増量している。腫瘍は治療開始後4週目に摘出し継代した。赤の小矢頭、大矢頭はそれぞれエリブリン（0.5 mg/kg）、エリブリン（1.0 mg/kg）の投与時期を示す。

MCC-PDX-MK1-Eri-resist G1 腫瘍を2匹のマウスに継代をおこなった (MCC-PDX-MK1-Eri-resist G2)。継代した腫瘍は定着し、増大を確認したのち、エリブリン 1.0 mg/kg で治療を開始した。腫瘍は治療に反応せず増大傾向を認めた (図 36)。治療開始3週目に腫瘍を摘出した。現在、エリブリン耐性機序に関する研究を予定している。

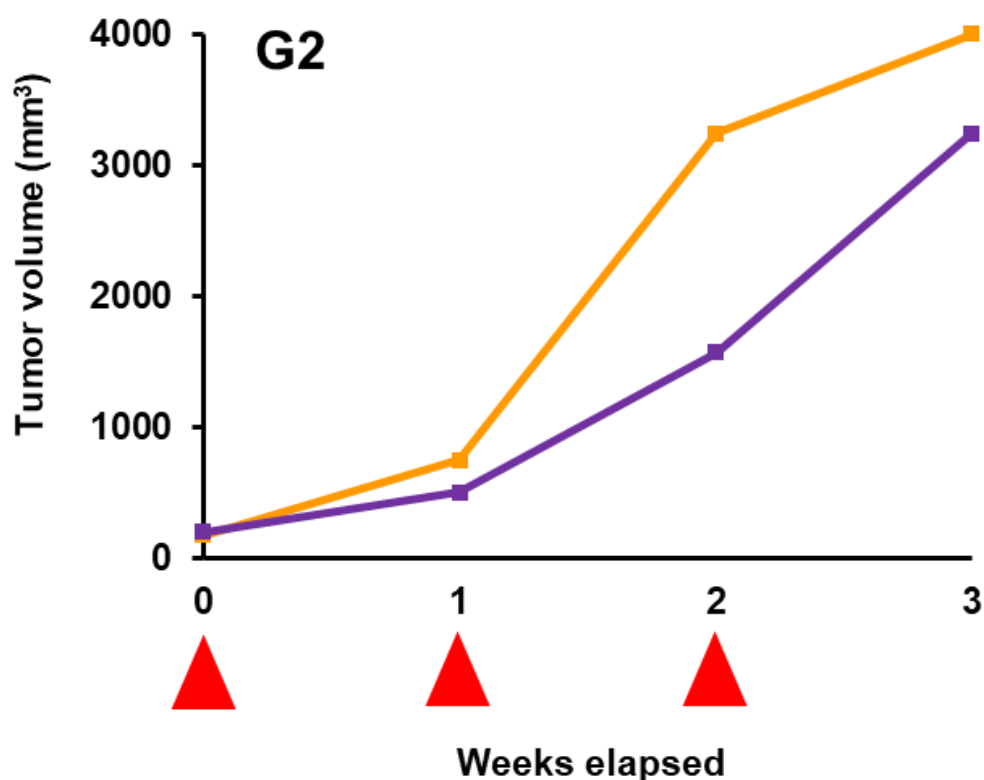


図 36 : MCC-PDX-MK1-Eri-resist G2 の治療経過

2 例の MCC-PDX-MK1-Eri-resist G2 についてエリブリン 1.0 mg/kg で投与を開始した。腫瘍は治療反応性なく、増大傾向を示した。赤の大矢頭はエリブリン (1.0 mg/kg) の投与時期を示す。

考察

本研究では、原発腫瘍の組織学的および遺伝学的特徴を忠実に再現する 2 種類の MCC-PDX モデルの樹立に成功した。また、エリブリンは遺伝子変異の異なる MCC-PDX-MK1 および MCC-PDX-MK2 腫瘍のいずれにおいても単剤で有効な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。これらのモデルは日本人患者由来のものであり、日本人 MCC 患者から初めて確立された PDX モデルであることも重要な成果である。

我々の臨床検体に対する免疫組織学的解析の結果、MCC 腫瘍は MCPyV 陽性であるか、あるいは主要な腫瘍抑制因子である p53 または Rb1 のタンパク発現を失っていた。このことは、MCPyV 陽性腫瘍では MCPyV-LTA が Rb1 および p53 を不活化することにより細胞周期の進行を促進し、腫瘍形成を助長することを示唆している。一方、MCPyV が陰性の腫瘍では、Rb1 または p53 の喪失により同様に細胞周期の進行が促進され、MCC 腫瘍の形成に寄与していると考えられた。

MCC-PDX モデルは、いずれも原発腫瘍に認められた遺伝子変異と一致していた。MCC-PDX-MK1 では、原発腫瘍に存在していた *RB1* の病原性変異 (p.E323*) が保持されていた。一方、MCC-PDX-MK2 においても、原発腫瘍と比較して新たな顕著な遺伝子変異は認められなかったことから、両モデルとも遺伝学的には原発腫瘍の特徴を忠実に反映していることが示唆された。また、両 MCC-PDX モデルにおいて免疫組織化学的解析で MCPyV 陽性が確認されたことから、MCPyV 由来の LTA が *RB1* を不活化することにより、細胞周期制御が破綻し、腫瘍形成が促進されたと考えられた。これらの結果は、MCC-PDX モデルが原発腫瘍の遺伝学的およびウイルス依存性の特徴を再現していることを示しており、MCC の病態解析および治療評価において信頼性の高い前臨床モデルとして利用可能であることを示している。

免疫組織化学的所見の結果、MCC-PDX-MK2 は原発腫瘍とすべての染色パターンにおいて一致していた。一方、MCC-PDX-MK1 では、原発腫瘍と PDX 腫瘍における Rb1 タンパク発現の様式に違いが認められた。原発腫瘍では Rb1 が強く核内に染色されていたのに対し、PDX 腫瘍では弱い細胞質染色が主体であった。この差異にもかかわらず、遺伝子解析では、原発腫瘍に存在していた *RB1* の病原性変異 (p.E323*) は PDX 腫瘍でも保持されていたことが確認された。これらの結果から、PDX 腫瘍における Rb1 タンパク発現パターンの変化は、RNA 発現の変化やタンパク質発現制御の機構による可能性が示唆された。具体的には、エピジェネティック制御、タンパク質の分解や安定性の変化、あるいは細胞内輸送機構の違いなどが関与して、Rb1 の局在や量が変化したことが考えられる。

PDX モデルにおいて遺伝子変異は保持されていても、タンパク質レベルでの発現様式は腫瘍微小環境や細胞内調節機構の影響を受ける可能性が考えられた。

本研究では、MCC-PDX から摘出した腫瘍を用いて *in vitro* での細胞株樹立を試みたが、いずれの条件においても安定した細胞増殖を確認できなかった。これは、PDX 腫瘍細胞が *in vivo* の微小環境に依存して増殖しているため、従来の二次元培養条件下では生着や増殖が困難であることを示唆している。以前我々は EMPD の PDX モデルを作成した (Maeda et al, 2022) が、こちらも *in vitro* での細胞株樹立はできなかった。PDX モデル腫瘍においては、微小環境を模倣した培養条件や三次元培養系の導入が今後の課題である。

本研究により、エリブリンが両 MCC-PDX モデルにおいて単剤で顕著な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。また、MCC-PDX-MK2 はエリブリンに加え、ドセタキセルに対しても治療効果を示した。両薬剤はいずれも微小管阻害薬であるが、微小管への結合様式および薬物動態学的特性が異なる。エリブリンは微小管の伸長端に高親和性かつ特異的に結合するのに対し、ドセタキセルは微小管全体に複数の結合部位を持つ (Bai R et al, 2011)。さらに、ドセタキセルは強い疎水性を有し、脂質やタンパク質への非特異的吸着が強く、血清アルブミンや α 1-acid glycoprotein に高率に結合するため、血中および腫瘍内における遊離型分画は極めて限られる (Sheu MT et al, 2017)。一方、エリブリンは非特異的結合が少ないことから遊離型比率が高いと考えられ、結果として細胞内への集積が起こりやすい特性を有する。これらの薬物動態学的特性により、エリブリンは腫瘍細胞内で有効濃度を維持しやすく、持続的かつ安定した微小管阻害作用を発揮することで、高い抗腫瘍効果に寄与している可能性が示唆されている (Sheu MT et al, 2017)。

MCPyV は *RBI* および *TP53* を不活化することで細胞周期の進行を促進し、MCC の腫瘍形成に寄与するとされている。エリブリンが微小管の伸長を阻害すると、*RBI* や *TP53* などの腫瘍抑制因子を欠損したがん細胞は、細胞周期を適切に制御できず、エリブリンによる微小管阻害があっても分裂を継続してしまう (Pandey K et al, 2022)。その結果、異常な有糸分裂が生じ、最終的にアポトーシスが誘導される (図 37)。このように、*RBI* や *TP53* の機能喪失が MCC の発癌に関与するとともに、エリブリンの抗腫瘍効果発現においても重要な役割を果たしている可能性がある。

我々の知る限り、MCC に対するエリブリンの有効性を PDX や *in vitro* での細胞株など前臨床モデルで検証した報告は本研究が初である。また、ドセタキセルの MCC に対する効果を検討した報告もこれまで存在しない。そのため、微小管阻害薬が MCC に与える影響については、いまだ十分に明らかにされていない。MCC は予後不良な疾患であることから、今回の結果は、エリブリンが MCC

に対する新たな治療選択肢となり得る可能性を示している。

本研究ではさらに、エリブリン耐性を示す MCC-PDX-MK1-Eri-resist モデルを確立した。エリブリン治療により一時的に腫瘍は消退したが、24 週後に再発が認められた。この現象は、臨床における MCC の高い治療感受性と高再発率という特徴をよく反映しており、耐性獲得機構の解析や新たな治療戦略の開発に有用なモデルと考えられる。

一方で、PDX モデルを用いた研究にはいくつかの限界が存在する。マウスへの移植および継代を繰り返す過程で、腫瘍の遺伝的变化や腫瘍内不均一性など、腫瘍の特徴が変化したり失われたりする可能性がある。実際、MCC-PDX-MK1 における免疫組織化学的所見は、患者の原発腫瘍と完全には一致せず、これらの腫瘍特性の変化が影響していると考えられた。一方で、PDX 腫瘍は従来の *in vitro* 細胞株に比べると腫瘍の組織学的・遺伝学的特徴を比較的維持しやすく、原発腫瘍の性質を反映したモデルとして、前臨床試験や薬剤評価において重要なツールとなりうる。

また、PDX マウスモデルは、機能的な免疫系が欠如している。Oya らは、エリブリンの抗腫瘍効果の一部が CD103⁺T 細胞などの免疫系構成要素に依存することを報告しており、免疫応答がその治療効果に関与する可能性が示唆されている (Oya K et al, 2023)。臨床においては、エリブリンの直接的な細胞障害作用に加え、免疫学的機序も抗腫瘍効果に寄与している可能性がある。そのため、機能的な免疫系を有する患者においては、エリブリンの効果がより顕著に現れる可能性がある。近年では、ヒト免疫系を再構築したマウスに PDX を生着させる新たなマウスモデルも開発されている (Capasso A et al, 2019)。今後は、このような免疫系を反映した PDX モデルを用いることで、免疫チェックポイント阻害薬やエリブリンなどの薬剤が腫瘍免疫に及ぼす影響を詳細に解析できると期待される。

本研究では、原発腫瘍の組織学的および遺伝学的特徴を再現する 2 種類の新規 MCC-PDX モデルを樹立した。これらのモデルは、MCC の腫瘍形成メカニズムの解明に加え、効果的な治療法の開発に貢献する有用な前臨床モデルになりうる。また、エリブリンが MCC に対して有効であることを初めて前臨床レベルで示し、今後の治療開発における重要な基盤を提供するものである。

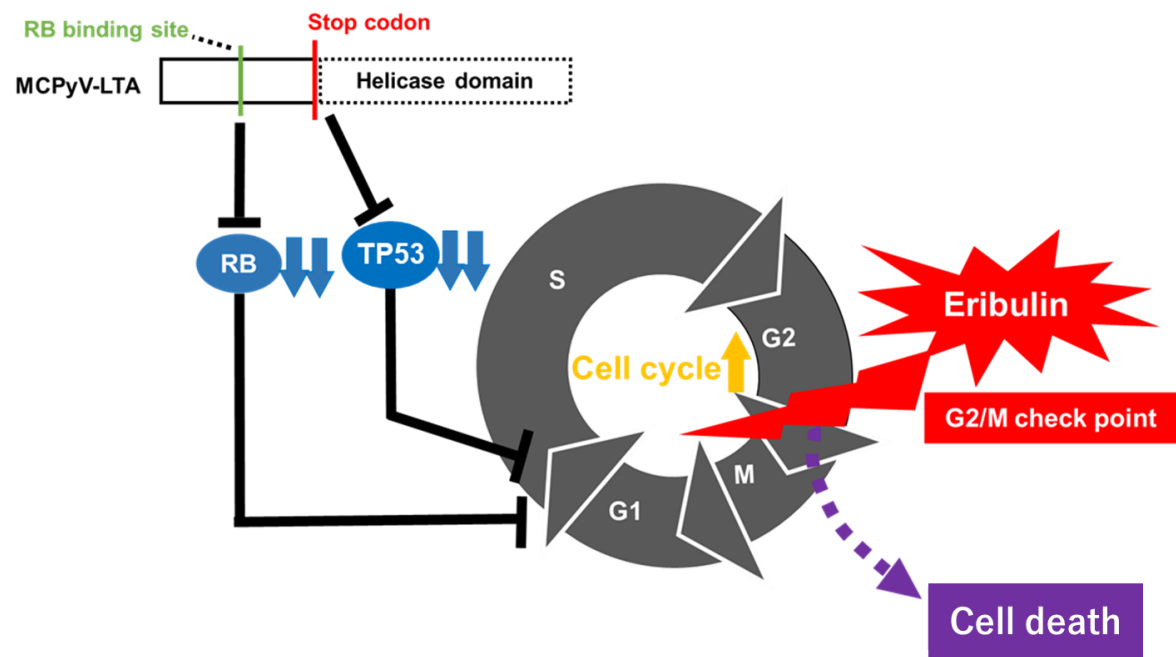


図 37 : エリブリンの MCC-PDX 腫瘍に対する抗腫瘍機序の模式図。

RB1 および TP53 は G1/S 期移行の主要な制御因子であり、細胞周期進行を厳密に調節している。MCC-PDX は MCPyV 感染を伴い、*RB1* および *TP53* の機能喪失が認められるため、細胞周期チェックポイント制御が破綻し、腫瘍の進展が促進されていると考えられる。エリブリンは微小管伸長の阻害を介して G2/M 期での細胞周期停止および細胞死を誘導し、抗腫瘍効果を発揮する薬剤である。この作用機序は、RB1 や TP53 などの腫瘍抑制遺伝子の機能を欠損した腫瘍において、特に有効に作用すると考えられる。

結語

- ・MCC 臨床検体の病理所見から、MCC は MCPyV に感染しているか、腫瘍抑制因子（p53 または Rb1）の発現を喪失していることが明らかとなった。
- ・日本人由来の MCC から 2 種類の PDX モデルを樹立した。
- ・PDX 腫瘍は、原発腫瘍の組織学および遺伝学的特徴を維持していた。
- ・PDX 腫瘍から二次元細胞株を樹立することはできなかった。
- ・エリブリンは、遺伝子変異の種類に関係なく MCC-PDX に対して単剤で有効な抗腫瘍効果を示す。
- ・樹立した 2 例の新規 MCC-PDX モデルは、さらなる新規治療法の開発に有用である可能性がある。

臨床検体に対する免疫組織学的解析の結果、MCC は MCPyV の陽性の有無にかかわらず、Rb1 または p53 が腫瘍形成に関与していることが示唆された。

新たに樹立した 2 例の MCC-PDX モデルは、いずれも原発腫瘍に認められた遺伝子変異と一致していたが、免疫組織化学的所見には一部違いが認められた。今後は、継代を繰り返す過程で新たな遺伝子変異を獲得する可能性を考慮する必要がある。また、MCPyV 陰性の MCC-PDX を樹立し、Rb1 や p53 などの腫瘍抑制因子の発現と癌化との関連を解明していくことが求められる。

本研究では、MCC-PDX 腫瘍からの二次元細胞株樹立には至らなかった。今後は、3T3-J2 との共培養や *in vivo* 環境を模倣した培養条件、三次元培養系などを導入し、樹立に向けた検討を進めていきたい。

本研究により、2 例の MCC-PDX を用いることで、遺伝子変異の種類にかかわらずエリブリンの治療効果が示された。ただし、今回の MCC-PDX モデルはいずれも MCPyV 陽性であるため、MCPyV 陰性 MCC に対する効果は現時点では不明である。今後、MCPyV 陰性 PDX の樹立と効果検証が必要である。また、エリブリン抵抗性の MCC-PDX マウスを樹立したことから、耐性獲得に関連する新規遺伝子変異の探索も重要である。これらの結果に基づき、MCPyV 感染の有無や遺伝子変異の状況に応じて、MCC 患者に最適な薬剤を組み合わせた新たな治療戦略を検討できる可能性が示された。

将来的には、患者ごとに MCC-PDX モデルを作成し、MCPyV の有無や遺伝子変異に基づいたオーダーメイド治療の実現を目指す。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くのご指導とご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 氏家英之教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導いただきました琉球大学病院皮膚科 柳輝希准教授に心より深謝いたします。そして、本研究にご協力くださいましたすべての患者様に深く御礼申し上げます。また、最後になりましたが、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室および琉球大学皮膚科学教室の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Amaral T, Leiter U, Garbe C (2017) Merkel cell carcinoma: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and therapy. *Rev Endocr Metab Disord* 18, 517-532.

Bai R, Nguyen TL, Burnett JC, Atasoylu O, Munro MH, Pettit GR, Smith AB 3rd, Gussio R, Hamel E (2011) Interactions of halichondrin B and eribulin with tubulin. *J Chem Inf Model* 51, 1393-1404.

Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Corà D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C, et al (2011) A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 1, 508-523.

Capasso A, Lang J, Pitts TM, Jordan KR, Lieu CH, Davis SL, Diamond JR, Kopetz S, Barbee J, Peterson J, et al (2019) Characterization of immune responses to anti-PD-1 mono and combination immunotherapy in hematopoietic humanized mice implanted with tumor xenografts. *J Immunother Cancer* 7, 37.

Daily K, Coxon A, Williams JS, Lee CR, Coit DG, Busam KJ, Brownell I (2015) Assessment of cancer cell line representativeness using microarrays for Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 135, 1138-1146.

Dresang LR, Guastafierro A, Arora R, Normolle D, Chang Y, Moore PS (2013) Response of Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma xenografts to a survivin inhibitor. *PLoS One* 8, e80543.

Fang B, Kannan A, Zhao S, Nguyen QH, Ejadi S, Yamamoto M, Camilo Barreto J, Zhao H, Gao L (2020) Inhibition of PI3K by copanlisib exerts potent antitumor effects on Merkel cell carcinoma cell lines and mouse xenografts. *Sci Rep* 10, 8867.

Feng M, Bi P, Kang Y, Yang D, Ren S, Lu X, Xie G, Lei H, Mo D (2024) Real world analysis of the efficacy and safety of eribulin compared to utidelone in combination with capecitabine for the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Cell Int* 24, 416.

Fichtner I, Rolff J, Soong R, Hoffmann J, Hammer S, Sommer A, Becker M, Merk J (2008) Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res* 14, 6456-6468.

Funahashi Y, Okamoto K, Adachi Y, Semba T, Uesugi M, Ozawa Y, Tohyama O, Uehara T, Kimura T, Watanabe H, et al (2014) Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Cancer Sci* 105, 1334-1342.

Garza-Davila VF, Valdespino-Valdes J, Barrera FJ, Ocampo-Candiani J, Garza-Rodríguez V (2022) Clinical impact of immunotherapy in Merkel cell carcinoma patients: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 87, 121-130.

Harms KL, Healy MA, Nghiem P, Sober AJ, Johnson TM, Bichakjian CK, Wong SL (2016) Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System. *Ann Surg Oncol* 23, 3564-3571.

Harms PW, Harms KL, Moore PS, DeCaprio JA, Nghiem P, Wong MKK, Brownell I (2018) International Workshop on Merkel Cell Carcinoma Research (IWMCC) Working Group. The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 763-776.

Haymerle G, Janik S, Fochtmann A, Pammer J, Schachner H, Nemec L, Mildner M, Houben R, Grasl MC, Erovic BM (2017) Expression of Merkelcell polyomavirus (MCPyV) large T-antigen in Merkel cell carcinoma lymph node metastases predicts poor outcome. *PLoS One* 12, e0180426.

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Mælandsmo GM, et al (2014) Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 4, 998-1013.

Hsu CY, Yanagi T, Maeda T, Nishihara H, Miyamoto K, Kitamura S, Tokuchi K, Ujiie H (2023) Eribulin inhibits growth of cutaneous squamous cell carcinoma cell lines and a novel patient-derived xenograft. *Sci Rep* 13, 8650.

Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, Chang Y, Moore PS, Becker JC (2010) Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol* 84, 7064-7072.

Ivanics T, Bergquist JR, Liu G, Kim MP, Kang Y, Katz MH, Perez MVR, Thomas RM, Fleming JB, Truty MJ (2018) Patient-derived xenograft cryopreservation and reanimation outcomes are dependent on cryoprotectant type. *Lab Invest* 98, 947-956.

Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Kato M, Nagata K, Murakami I, Hayashi K (2015) Phosphohistone-H3 (PHH3) is prognostic relevant in Merkel cell carcinomas but Merkel cell polyomavirus is a more powerful prognostic factor than AJCC clinical stage, PHH3, Ki-67 or mitotic indices. *Pathol Int* 65, 404-409.

Kawamura T, Kasai H, Fermanelli V, Takahashi T, Sakata Y, Matsuoka T, Ishii M, Tanigawara Y (2018) Pharmacodynamic analysis of eribulin safety in breast cancer patients using real-world postmarketing surveillance data. *Cancer Sci* 109, 2822-2829.

Knudsen ES, Pruitt SC, Hershberger PA, Witkiewicz AK, Goodrich DW (2019) Cell Cycle and Beyond: Exploiting New RB1 Controlled Mechanisms for Cancer Therapy. *Trends Cancer* 5, 308-324.

Koga Y, Ochiai A (2019) Systematic Review of Patient-Derived Xenograft Models for Preclinical Studies of Anti-Cancer Drugs in Solid Tumors. *Cells* 8, 418.

Lee JH, Lee JD, Paulson K, Voillet V, Berndt A, Church C, Lachance K, Park SY, Yamamoto NK, Cromwell EA, et al (2023) Enhancing immunogenic responses through CDK4/6 and HIF2 α inhibition in Merkel cell carcinoma. *Heliyon* 10, e23521.

Lee PC, Klaeger S, Le PM, Korthauer K, Cheng J, Ananthapadmanabhan V, Frost TC, Stevens JD, Wong AY, Iorgulescu JB, et al (2022) Reversal of viral and epigenetic HLA class I repression in Merkel cell carcinoma. *J Clin Invest* 132, e151666.

Leonard JH, Bell JR, Kearsley JH (1993) Characterization of cell lines established from Merkel-cell ("small-cell") carcinoma of the skin. *Int J Cancer* 55, 803-810.

- Linn P, Kohno S, Sheng J, Kulathunga N, Yu H, Zhang Z, Voon D, Watanabe Y, Takahashi C (2021) Targeting RB1 Loss in Cancers. *Cancers (Basel)* 13, 3737.
- Lui W, MacDonald M, You J (2016) Merkel cell polyomavirus infection and Merkel cell carcinoma. *Curr Opin Virol* 20, 20-27.
- Maeda T, Kitamura S, Nishihara H, Yanagi T (2020) Extramammary Paget's disease patient-derived xenografts harboring ERBB2 S310F mutation show sensitivity to HER2-targeted therapies. *Oncogene* 39, 5867-5875.
- Martel-Jantin C, Pedergrana V, Nicol JT, Leblond V, Trégouët DA, Tortevoe P, Plancoulaine S, Coursaget P, Touzé A, Abel L, et al (2013) Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol* 582, 88-91.
- Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW (1992) Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 140, 427-447.
- Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, Blom A, Lachance K, Shinohara MM, Delaney M, Chang O, McArdle S, Thomas H, et al (2017) Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol* 137, 819-827.
- Nghiem P, Kaufman HL, Bharmal M, Mahnke L, Phatak H, Becker JC (2017) Systematic literature review of efficacy, safety and tolerability outcomes of chemotherapy regimens in patients with metastatic Merkel cell carcinoma. *Future Oncol* 13, 1263-1279.
- Ogata D, Namikawa K, Nakano E, Fujimori M, Uchitomi Y, Higashi T, Yamazaki N, Kawai A (2023) Epidemiology of skin cancer based on Japan's National Cancer Registry 2016-2017. *Cancer Sci* 114, 2986-2992.
- Oya K, Nakamura Y, Watanabe R, Tanaka R, Ichimura Y, Kubota N, Matsumura Y, Tahara H, Okiyama N, Fujimoto M, et al (2023) Eribulin mesylate exerts antitumor effects via CD103. *Oncoimmunology* 12, 2218782.

Pandey K, Katuwal NB, Park N, Hur J, Cho YB, Kim SK, Lee SA, Kim I, Lee SR, Moon YW (2022) Combination of Abemaciclib following Eribulin Overcomes Palbociclib-Resistant Breast Cancer by Inhibiting the G2/M Cell Cycle Phase. *Cancers (Basel)* 14, 210.

Paulson KG, Park SY, Vandeven NA, Lachance K, Thomas H, Chapuis AG, Harms KL, Thompson JA, Bhatia S, Stang A, et al (2018) Merkel cell carcinoma: Current US incidence and projected increases based on changing demographics. *J Am Acad Dermatol* 78, 457-463

Pedersen EA, Verhaegen ME, Joseph MK, Harms KL, Harms PW (2024) Merkel cell carcinoma: updates in tumor biology, emerging therapies, and preclinical models. *Front Oncol* 14, 1413793.

Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, and Fernandes AR (2019) Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 20, 840.

Saini AT and Miles BA (2015) Merkel cell carcinoma of the head and neck: pathogenesis, current and emerging treatment options. *Onco Targets Ther* 8, 2157–2167.

Santos-Juanes J, Fernández-Vega I, Fuentes N, Galache C, Coto-Segura P, Vivanco B, Astudillo A, Martínez-Camblor P (2015) Merkel cell carcinoma and Merkel cell polyomavirus: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 173, 42-49.

Schlagbauer-Wadl H, Klosner G, Heere-Ress E, Waltering S, Moll I, Wolff K, Pehamberger H, Jansen B (2000) Bcl-2 antisense oligonucleotides (G3139) inhibit Merkel cell carcinoma growth in SCID mice. *J Invest Dermatol* 114, 725-730.

Schöffski P, Chawla S, Maki RG, Italiano A, Gelderblom H, Choy E, Grignani G, Camargo V, Bauer S, Rha SY, et al (2016) Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* 387, 1629-1637.

Schrama D, Sarosi EM, Adam C, Ritter C, Kaemmerer U, Klopocki E, König EM, Utikal J, Becker JC, Houben R (2019) Characterization of six Merkel cell polyomavirus-positive

Merkel cell carcinoma cell lines: Integration pattern suggest that large T antigen truncating events occur before or during integration. *Int J Cancer* 145, 1020-1032.

Sheu MT, Wu CY, Su CY, Ho HO (2017) Determination of total and unbound docetaxel in plasma by ultrafiltration and UPLC-MS/MS: application to pharmacokinetic studies. *Sci Rep* 7, 14609.

Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, Tolstov Y, Gjoerup O, Mansukhani MM, Swerdlow SH, et al (2009) Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer* 125, 1243-1249.

Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H (2011) Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 17, 4806-4813

Sunshine JC, Jahchan NS, Sage J, Choi J (2018) Are there multiple cells of origin of Merkel cell carcinoma? *Oncogene* 37, 1409-1416.

Takahashi M, Miki S, Fujimoto K, Fukuoka K, Matsushita Y, Maida Y, Yasukawa M, Hayashi M, Shinkyo R, Kikuchi K, et al (2019) Eribulin penetrates brain tumor tissue and prolongs survival of mice harboring intracerebral glioblastoma xenografts. *Cancer Sci* 110, 2247-2257.

Tanaka Y, Momose S, Tabayashi T, Sawada K, Yamashita T, Higashi M, Sagawa M, Tokuhira M, Rosenwald A, Kizaki M, et al (2020) Abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, exerts preclinical activity against aggressive germinal center-derived B-cell lymphomas. *Cancer Sci* 111, 749-759.

Toker C (1972) Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 105, 107–110.

Tsumura R, Anzai T, Koga Y, Takashima H, Matsumura Y, Yasunaga M (2024) Anti-tissue factor antibody conjugated with monomethyl auristatin E or deruxtecan in pancreatic cancer models. *Cancer Sci* 115, 3986-3996.

Xu M, Yao C, Zhang W, Gao S, Zou H, Gao J (2021) Anti-Cancer Activity Based on the

High Docetaxel Loaded Poly(2-Oxazoline)s Micelles. *Int J Nanomedicine* 16, 2735-2749.

Watanabe K, Yui Y, Sasagawa S, Suzuki K, Kanamori M, Yasuda T, Kimura T (2019) Low-dose eribulin reduces lung metastasis of osteosarcoma in vitro and in vivo. *Oncotarget* 10, 161-174

Wozniak A, Boeckx B, Modave E, Weaver A, Lambrechts D, Littlefield BA, Schöffski P (2021) Molecular Biomarkers of Response to Eribulin in Patients with Leiomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 27, 3106-3115.

Yamada H, Takada M, Ghone D, Yu M, Nagashima T, Fujimoto H, Sakakibara J, Hasegawa Y, Takao S, Yamada A, et al (2024) Eribulin induces micronuclei and enhances the nuclear localization of cGAS in triple-negative breast cancer cells. *Sci Rep* 14, 14146.

Yanagi T, Hata H, Mizuno E, Kitamura S, Imafuku K, Nakazato S, Wang L, Nishihara H, Tanaka S, Shimizu H (2017) PCTAIRE1/CDK16/PCTK1 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates p27 stability and cell cycle. *J Dermatol Sci* 86, 149-157.

Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, Uesugi M, Agoulnik S, Taylor N, Funahashi Y, et al (2014) Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states. *Br J Cancer* 110, 1497-1505.

石原和之 (2008) 皮膚悪性腫瘍の統計過去. *Skin Cancer* 22, 209-216.

小山則行, 徳永武志, 小笠原若菜, 村上美幸, 山下雄次 (2011) 新規乳がん治療薬エリブリン (ハラヴェン® 静注 1 mg) の抗腫瘍メカニズムと臨床効果. *日薬理誌* 138, 209-217.

中村智之, 片野晴隆 (2009) メルケル細胞癌ポリオーマウイルスとメルケル細胞癌. *ウイルス* 1, 37-42.