



Title	膵がん遺伝子型モデルショウジョウバエを用いたスクリーニングによるMEKとAURKBを標的とする膵がんの新規組み合わせ療法の同定〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	関谷, 翔
Description	配架番号 : 2833
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15899号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92389
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SEKIYA_Sho_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 関谷 翔

学 位 論 文 題 名

膵がん遺伝子型モデルショウジョウバエを用いたスクリーニングによる
MEK と AURKB を標的とする膵がんの新規組み合わせ療法の同定

(Identifying a novel combination therapy utilizing *Drosophila* screening to target
MEK and AURKB for pancreatic ductal adenocarcinoma)

【背景と目的】膵がんは、患者の予後が最も不良な難治がんの一つである。我が国における膵がん患者の5年相対生存率は13.1%にとどまる。現在膵がんは部位別死亡数の第4位だが、死亡数は今後増加することが確実視されている。膵がんに対する標準治療は外科的切除と殺細胞性抗がん剤の併用であるが、現在使用されている抗がん剤は効果が不十分である一方で重篤な副作用が問題となり、患者への利益は限定的である。以上の状況から、膵がんの治療成績向上は喫緊の福祉課題となっている。膵がんの治療薬開発の最も大きな問題点の一つは、動物を用いた個体レベルでの効率的かつ網羅的なスクリーニング基盤の欠如である。一般的に、薬物スクリーニングにおいて使用される培養ヒト膵がん細胞は、細胞間および臓器間の相互作用や薬力学・薬物動態等の生物個体特有の現象を再現・評価することが困難である。また、遺伝子改変モデルマウスは、その作出や維持、解析に時間・労力・コストの面で多大な研究資源を要し、網羅的なスクリーニングを実施することが極めて難しい。そこで申請者は、哺乳類との間で高度に保存された遺伝子とシグナル伝達経路を有しており、また繁殖能力が高く約10日間で次世代を産生でき、哺乳類と比較して飼育も容易なショウジョウバエを活用する着想を得た。実際に申請者の所属研究室では、ハエを哺乳類実験系と連動させ、発がんの機序解明や治療薬候補の同定の実績を積み重ねている。本研究ではハエを活用し、膵がん患者の中でも最も予後が悪い患者群で観察される4遺伝子異常、すなわち *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* の異常を模倣した新規モデル動物「4-hit ハエ」を作出して、遺伝学的スクリーニングと化合物スクリーニングを通じ膵がんの新規治療標的と治療薬候補の同定を実施した。

【材料と方法】野生型のハエより抽出した mRNA から相補的 DNA を作成し、これを鋳型として増幅したハエの *Ras* (*dRas*) を元に、一塩基置換を行った *dRas*^{G12D} を作成した。この *dRas*^{G12D} と、ハエ *p53* に対する shRNA ノックダウン配列を *Upstream activation sequence* (UAS) 配列下にクローニングしたベクターを作成し、ハエの受精卵に顕微注入して *UAS-dRas*^{G12D}, *UAS-p53*^{shRNA} ハエを作成した。同様にハエ *Cyclin E* (*dCycE*) に haemagglutinin タグを付加した HA-*dCycE* と、*SMAD4* オルソログであるハエ *Med* に対する shRNA 配列をクローニングしたベクターを使用して *UAS-dCycE*, *UAS-Med*^{shRNA} ハエを作成した。次に、この2種のハエを交配して染色体の減数分裂性組換えを起こさせることで、*UAS-dRas*^{G12D}, *UAS-p53*^{shRNA}, *UAS-dCycE*, *UAS-Med*^{shRNA} ハエ (*UAS-4-hit* ハエ) を作出した。次に、*patched* (*ptc*) ドライバー活性を利用して幼虫の翅原基の上皮細胞でこれら4外来遺伝子を発現させたハエ (*ptc-gal4; UAS-4-hit*, *ptc>4-hit*) を使用し、形質転換能を評価した。続いて、膵がんの新規治療標的を探索するため、*Serrate* (*Ser*) ドライバーの活性で4外来遺伝子を発現する *Ser-gal4; UAS-4-hit* ハエ (*Ser>4-hit* ハエ) を用いて網羅的な遺伝学的スクリーニングを実施した。ここでは、4-hit ハエとキナーゼの変異を有するハエを交配することで、各キナーゼのヘテロ接合性変異をそれぞれ有する4-hit ハエを産生し、生存率を測定した。化合物スクリーニングでは、*UAS-4-hit* ハエと *Ser-gal4* を有するハエを交配した後、化合物入りの餌の上で産卵させ、各化合物を摂取して成長した *Ser>4-hit* ハエ

の生存率を測定した。次に、この遺伝学的スクリーニングで同定した新規治療標的 AURKB の活性と膵がん患者の予後の相関を検討するため、免疫組織化学染色を実施した。86例の膵がん組織マイクロアレイを pHH3 抗体で染色し、陽性群70例と陰性群16例の患者背景と生存期間の相関を解析した。そして、ハエの解析で得た結果が哺乳類を用いた実験系で再現するか検討するため、異種移植モデルマウスを用いた投薬実験を実施した。ここでは、ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を皮下移植したヌードマウスに MEK 阻害薬 trametinib と Aurora kinase B (AURKB) 阻害剤 BI-831266 を単独あるいは同時に経口投与し、皮下腫瘍の体積変化とマウスが呈する副作用を経時的に解析した。最後に、trametinib と BI-831266 の作用機序を解析するため、MIA PaCa-2 に trametinib と BI-831266 を添加し、添加3日目の細胞数を測定した。また、ウェスタンブロッティングにより trametinib と BI-831266 添加後の MEK や AURKB のシグナル伝達経路に関わるタンパクや細胞死関連タンパクの発現量の変化を解析した。

【結果】 *ptc>4-hit* ハエの翅原基で上記の4外来遺伝子を発現させると、野生型ハエや *dRas^{G12D}* を発現する *1-hit* ハエと比較して、形質転換を起こした上皮細胞の増殖能と遊走能が亢進した。また、発現させた外来遺伝子の数が増加するほどハエの生存率が低下した。続いて *4-hit* ハエを用いた個体レベルでの遺伝学的スクリーニングでは、220種類のキナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異をそれぞれ *4-hit* ハエに導入した。その結果、MEK と AURKA のヘテロ接合性変異が *4-hit* ハエの生存率を改善した。また、siRNA によるノックダウンのスクリーニングでは AURKB の機能抑制も同様に *4-hit* ハエの生存率を改善した。そこで、trametinib 単剤または trametinib と BI-831266 を組み合わせて *4-hit* ハエに経口投与したところ、遺伝学的にこれらのキナーゼを阻害した場合と同様にハエ生存率が改善し、翅原基内の形質転換細胞の増殖能が低下した。次に、膵がん患者の病理切片を用いた予後解析により、AURKB の活性化で生じる pHH3 が膵がん細胞の核内に存在する患者群は陰性群と比較して全生存期間が有意に短縮することが分かった。続いてマウスの実験により、trametinib と BI-831266 の併用療法が MIA PaCa-2 移植マウスの腫瘍の成長をそれぞれの単剤投与と比較して有意に抑制することが分かった。この投与が終了した時点で、有意な副作用は認められなかった。最後に、培養ヒト膵がん細胞を用いた機序解析において、trametinib と BI-831266 を組み合わせて添加することで、MIA PaCa-2、Panc-1、Capan-1 の増殖を相乗的に抑制することを見出した。また、それぞれのシグナル下流分子である pERK と pHH3 の発現を低下させることで細胞増殖を抑制することが分かった。加えて、これら二剤の組み合わせ処置によりアポトーシスとオートファジーが誘導されることを見出した。

【考察】本研究において申請者は、膵がん患者の遺伝子変異を模倣したモデルショウジョウバエである *4-hit* ハエを世界で初めて作出し、このハエを用いた表現型スクリーニングを通じ、新規の膵がん治療薬候補となる trametinib と BI-831266 の併用療法を同定した。この療法は膵がんモデルマウスにおいても顕著な抗腫瘍効果を示し、培養細胞の実験を通じてこの療法の作用機序が細胞増殖の抑制と細胞死の誘導であることが分かった。従来、膵がん研究において一般的に活用されてきた遺伝子組換えモデルマウスや患者腫瘍組織移植マウスは、発がん過程や治療薬候補となる薬物の探索において重要な役割を果たしてきた。本研究では、これら既存の哺乳類の実験系に、時間やコストの面から有用であるハエを相補的に組み入れることによって、膵がん新規治療標的や治療薬候補の探索をより効率的に進めることに成功した。新規シーズの同定に至った結果から、今後、膵がんの新規治療薬候補を開発する上で本手法が有効な基盤になると考えられる。

【結論】ヒト膵がんの遺伝子変異を模倣した *4-hit* ハエを作出し、これを用いたスクリーニングにより膵がんの新規治療標的として MEK と AURKB を同定した。これらのキナーゼに対する阻害剤である trametinib と BI-831266 の組み合わせは *4-hit* ハエの生存率を改善するとともに、マウスに移植した MIA PaCa-2 の増殖を抑制した。これらの結果は、*4-hit* ハエを使用した表現型スクリーニングが膵がん新規治療薬候補を同定する上で有望な新規研究手法となりうることを示唆している。