



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15899
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93228
Type	doctoral thesis
File Information	SEKIYA_Sho.pdf, この論文の全文



学 位 論 文

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)

2 0 2 4 年 3 月

北海道大学

関 谷 翔

学 位 論 文

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)

2 0 2 4 年 3 月

北海道大学

関 谷 翔

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	6 頁
緒言	9 頁
実験方法	12 頁
実験結果	28 頁
考察	63 頁
総括および結論	67 頁
謝辞	69 頁
利益相反	70 頁
引用文献	71 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。

1. Sho Sekiya, Junki Fukuda, Ryodai Yamamura, Takako Ooshio, Yusuke Satoh, Shinya Kosuge, Reo Sato, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Toru Nakamura, Yoshihiro Matsuno, Satoshi Hirano, and Masahiro Sonoshita
Drosophila Screening Identifies Dual Inhibition of MEK and AURKB as an Effective Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
Cancer Research, 83 巻 16 号、2023 年

2. 小菅信哉、平田大賀、関谷翔、山村凌大、園下将大
ショウジョウバエを活用した膵がんの創薬研究
Bio Clinica, 38 巻 10 号、2023 年

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. 関谷翔、山村凌大、大塩貴子、園下将大、平野聡
遺伝学に立脚した膵がん新規組み合わせ療法の開発
第 122 回北海道がん談話会、2020 年 10 月 17 日・札幌

要旨

【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 **gemcitabine** をはじめとする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り、これにより治療標的の探索が不十分な状況が続いている。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することを目的とした。

【材料と方法】

野生型のハエより抽出した mRNA の逆転写によって相補的 DNA (complementary DNA : cDNA) を作製し、これを鋳型として増幅したハエの *Ras* (*dRas*) を元に、二塩基置換を行った *dRas*^{G12D} を作製した。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製し、ハエの受精卵に顕微注入して *UAS-dRas*^{G12D}, *UAS-p53*^{shRNA} ハエを作製した。同様にハエ *Cyclin E* (*dCycE*) に haemagglutinin (HA) 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}* ハエを作製した。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（以後 *UAS-4-hit* ハエと呼称）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*、以降 *ptc>4-hit* と呼称) 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 (*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、孵化し各化合物を摂取して成長した *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 Aurora kinase B (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 (immunohistochemistry : IHC) を実施した。86 例の膵がん組織マイクロアレイを抗リン酸化ヒストン H3 (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 Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK) 阻害薬 trametinib と 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 日目の細胞数をテトラゾリウム塩 (MTS) アッセイにて測定した。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質や細胞死関連タンパク質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、ハエが有する 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 IHC による予後解析により、*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リン酸化 Extracellular signal-regulated kinase (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。加えて申請者は、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物候補を同定する上で有望な新規研究手法となり得ることを示唆している。

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。

α -Tub	α -tubulin
<i>aurA</i>	<i>aurora A</i>
<i>aurB</i>	<i>aurora B</i>
A.U.	arbitrary unit
<i>AURK</i>	<i>Aurora kinase</i>
<i>AURKA</i>	<i>Aurora kinase A</i>
<i>AURKB</i>	<i>Aurora kinase B</i>
<i>AURKC</i>	<i>Aurora kinase C</i>
B8	BI-831266
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
cDNA	complementary DNA
CI	confidence interval
<i>CILK1</i>	<i>Ciliogenesis associated kinase 1</i>
CST	Cell Signaling Technology
CycD	Cyclin D
<i>CyO-Tb-RFP</i>	a balancer chromosome to prevent recombination on the second chromosome
Cys-fs	cysteine to frameshift
<i>DCLK1</i>	<i>Doublecortin like kinase 1</i>
<i>dCycE</i>	<i>Drosophila Cyclin E</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
<i>dRas</i>	<i>Drosophila Rat sarcoma viral oncogene</i>
<i>dRet</i> ^{M955T}	an active M955T isoform of <i>Drosophila Rearranged</i> <i>during transfection</i>
<i>Dsor1</i>	<i>Downstream of raf1</i>
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
<i>FM7c-Tb-RFP</i>	a balancer chromosome to prevent recombination on the sex chromosome
<i>FRK</i>	<i>Fyn related Src family tyrosine kinase</i>

G12D	G to D missense mutation in <i>KRAS</i> or <i>dRas</i>
GEMM	genetically-engineered mouse model
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HD	homozygous deletion
HE	hematoxylin-eosin
HH3	histone H3
HR	hazard ratio
HRP	horseradish peroxidase
ICR	Institute of Cancer Research
IF	immunofluorescence
IHC	immunohistochemistry
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
LC3	light chain 3
LOF	loss of function
M	mol/L
<i>Med</i>	<i>Medea</i>
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
mRNA	messenger RNA
MTC	medullary thyroid cancer
MTD	maximum tolerated dose
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
NS	not significant
OS	overall survival
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PARP	poly ADP-ribose polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDX	patient-derived xenografts
<i>Pkc98E</i>	<i>Protein C kinase 98E</i>
pMLKL	phospho-Mixed lineage kinase domain-like protein
pRIP3	phospho-Receptor interacting protein 3
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
RFS	recurrence-free survival
<i>ROCK1</i>	<i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1</i>
<i>rok</i>	<i>Rho kinase</i>

RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTK	receptor tyrosine kinase
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
<i>Src42A</i>	<i>Src oncogene at 42A</i>
<i>STK33</i>	<i>Serine/threonine kinase 33</i>
<i>Stlk</i>	<i>Ste20-like kinase</i>
<i>STRADA</i>	<i>STE20 related adaptor alpha</i>
<i>Tb</i>	<i>Tubby</i>
<i>TM6B</i>	a balancer chromosome to prevent recombination on the third chromosome
TMA	tissue microarray
TNM	tumor, node, metastasis
T-PBS	phosphate-buffered saline with 0.1% Triton X-100
tram	trametinib
<i>tub-GAL80</i>	<i>GAL80</i> driven by the <i>alphaTub84B</i> promoter
<i>UAS</i>	<i>Upstream activation sequence</i>
<i>UAS-4-hit</i>	<i>UAS-dRas^{G12D}, UAS-p53^{shRNA}, UAS-dCycE, UAS-Med^{shRNA}</i>
UICC	Union for International Cancer Control
<i>w⁻</i>	<i>w¹¹¹⁸</i>
WB	western blotting
Wt	wild type

緒言

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2015年からの膵がん患者の5年相対生存率は13.1%にとどまり、2021年のがん部位別死亡者数の第4位である（国立がん研究センター、2021年がん統計）。膵がん患者の死亡数は今後増加することが確実視され、例えば米国における臓器別がん関連死亡数の第3位を占めているが、罹患率の増加と共に2025年までに第2位に浮上すると予想されている（Rahib et al, 2021）。膵がんに対する標準治療は外科的切除と **gemcitabine** をはじめとする殺細胞性抗がん剤の併用であるが、唯一根治の期待できる手術が可能な症例は膵がん患者の3割未満に留まる。また、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。近年は術前および術後の補助療法として化学療法や放射線療法の有用性が報告されており、これらと手術を組み合わせる集学的治療の重要性が認識されているが、いまだ満足できる成績は得られていない。これらの治療に加えて分子標的薬の開発も進められているが、保険承認されている **epidermal growth factor receptor (EGFR)** 阻害剤の **erlotinib** は **gemcitabine** との併用で患者生存に寄与しなかった（Moore et al, 2007）。また、免疫チェックポイント阻害剤も膵がん患者の大多数に無効であった（Leinwand and Miller, 2020）。以上の状況から、膵がん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、これにより新規治療標的の探索が不十分な状況が続いている。すなわち、一般的に薬物スクリーニングに用いられる培養ヒト膵がん細胞は、がんの発生・進展に関与する細胞間・臓器間の相互作用や、薬力学・薬物動態等、生物個体特有の現象を再現・評価することが困難である。一方、遺伝子改変モデルマウス（**genetically-engineered mouse model : GEMM**）ではこれらの解析が可能であるが、その作出や維持、解析には時間・労力・コストの面で多大な研究資源を要し、網羅的な遺伝学的スクリーニングおよび薬物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、さらに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。例えば、甲状腺髄様がん（**medullary thyroid cancer : MTC**）を模倣し、原因遺伝子である **RET** に対応するハエの **Ret** に点変異を持つ

Ret^{M955T} モデルハエを作出した (Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019; Yamamura et al, 2021)。このハエでは、将来成虫の翅となる幼虫の翅原基に特異的に活性化するドライバー配列を活用して発現させた外来遺伝子が、翅原基の上皮細胞に形質転換を起こし、その結果ハエ個体は致死となる。所属研究室では、このモデルハエを用いた遺伝学的キナーゼスクリーニングや *in silico* モデリング、薬物スクリーニングを連動させることによって、キナーゼ阻害薬ソラフェニブの副作用の原因となる標的「anti-target」を同定し、ソラフェニブの構造改変によってこの anti-target への親和性を低下させることでその副作用を大きく軽減して、MTC に対するより有効な新規リード薬物を創出することに成功した (Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019; Yamamura et al, 2021)。MTC 以外のがん種についても、肺がんや大腸がん、口腔がん等の遺伝子型を模倣したモデルハエを活用したスクリーニングが治療標的や新規シーズの同定に有用であることが証明されている (Levine and Cagan, 2016; Bangi et al, 2019, 2021)。

これらの背景から、申請者は膵がんの新規治療標的探索において膵がんの遺伝子型を模倣したモデルハエを作出する着想を得て、膵がん患者で最も発生頻度の高い4つの遺伝子変異、すなわちがん遺伝子である *KRAS* の活性化、およびがん抑制遺伝子群である *TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* の不活性化に着目した。これらは主に膵管上皮細胞から膵がんの前がん病変である膵上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia: PanIN) の発生に *KRAS* と *CDKN2A* の変異が、また浸潤がんへの進行に *TP53* と *SMAD4* の変異が関与している (図1、Morris et al, 2010)。

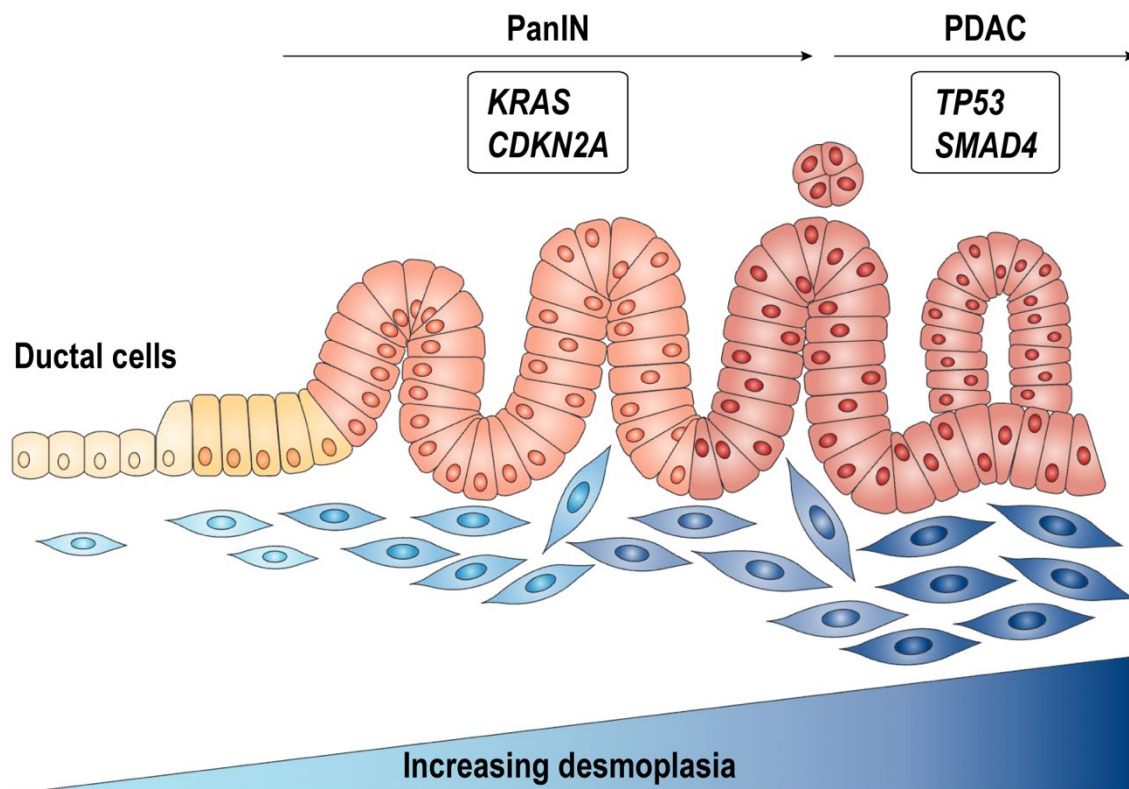


図 1. 膵がん患者における遺伝子変異と前がん病変の発生および膵がんの進行
膵がん患者に認められる遺伝子変異と膵管上皮細胞の形態変化および腫瘍周囲の結合組織繊維の増生。PanIN、pancreatic intraepithelial neoplasia。PDAC、pancreatic ductal adenocarcinoma。(Morris et al, 2010)より引用改変。

興味深いことに、これら 4 つの遺伝子変異数が増加するほど、患者予後が悪化する傾向が示唆されている (Qian et al, 2018)。しかし、これら 4 つ全ての遺伝子変異を有し内因性に膵腫瘍を発生する GEMM はいまだ存在しない。そこで申請者は本研究において、この 4 遺伝子異常を模倣した初のモデル動物として *4-hit* ハエを作出し、このモデルの表現型を解析し膵がんのモデル動物として適切かを検証した。続いて、これを活用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実施することにより、膵がんの新規治療標的や治療薬候補の同定を試みた。最後に、ハエから得た知見について、哺乳類における抗腫瘍効果や作用機序の解析を行うことを本研究の目的とした。

実験方法

1. ハエの飼育と餌の作製

全てのハエの実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に則って実施した（承認番号 2019-007 および 2022-029）。ハエの餌は Brewer's yeast (MP Biomedicals ; Santa Ana, CA)、yeast extract (Sigma Aldrich ; St. Louis, MO)、bactocastone (BD ; Franklin Lakes, NJ)、寒天、スクロース、グルコース、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、プロピオン酸、mold inhibitor (10% methyl-4-hydroxybenzoate in 95% ethanol) (Fujifilm Wako ; Osaka, Japan) を逆浸透水に溶解し、沸騰させた後にプラスチックバイアル (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA) に分注して作製した。ハエはバイアルに入れ、バイアルは各温度のインキュベーター内に留置し飼育した。

2. 膀胱がん遺伝子型を模倣した 4-hit ハエの作出

はじめに、非遺伝子組換えハエ *w¹¹¹⁸* {以降 *w*、Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC ; Bloomington, IN)} から RNeasy Mini Kit (Qiagen ; Hilden, Germany) を用いて mRNA を抽出し、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Toyobo ; Osaka, Japan) を用いてそれらの cDNA を逆転写によって作製した。続いて、この cDNA からヒト *KRAS* のオルソログであるショウジョウバエ *Ras85D* (*dRas85D*) を PCR (polymerase chain reaction) で増幅し、これを鋳型として QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent ; Santa Clara, CA) を用いてコドン 12 の GGA を GAT に置換した *dRas^{G12D}* を作製した。次に、この *dRas^{G12D}* を 2 つの *UAS* クローニングカセットおよび 1 つの short hairpin RNA (shRNA) クローニングカセットを有する pWALIU (Bang et al, 2019) にクローニングした。また、同ベクターに *p53* (ヒト *TP53* に対するオルソログ) に対する shRNA ノックダウン配列 (TGCTGAAGCAATAACCACCGA) もクローニングした。*UAS* 配列下にこの *dRas^{G12D}* と *p53^{shRNA}* を有するベクターを *y1w67c23;P{CaryP}attP2* の受精卵に顕微注入することで、3 番染色体の左腕に *UAS-dRas^{G12D}* と *UAS-p53^{shRNA}* を有する *UAS-dRas^{G12D},UAS-p53^{shRNA}* ハエを作出した。

一方、*dCycE* を cDNA より取得し、これに HA タグを付加した HA-*dCycE* を作製して pWALIU にクローニングした。そして、同ベクターに *Medea* (*Med*、ヒト *SMAD4* に対するオルソログ) に対する shRNA ノックダウン配列 (TTCAGTGCGATGAACATTGCT) もクローニングし、このベクターを *PBac{yellow[+]-attP-9A}VK00027* の受精卵に顕微注入することで、3 番染色体の右腕に *UAS-dCycE* と *UAS-Med^{shRNA}* を有する *UAS-dCycE,UAS-Med^{shRNA}* ハエを作

出した。最後に、4 外来遺伝子を同一染色体上に有するハエを作出するため、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、目的の *UAS-dRas^{G12D}*, *UAS-p53^{shRNA}*, *UAS-dCycE*, *UAS-Med^{shRNA}* ハエ (*UAS-4-hit* ハエ) を作出した。

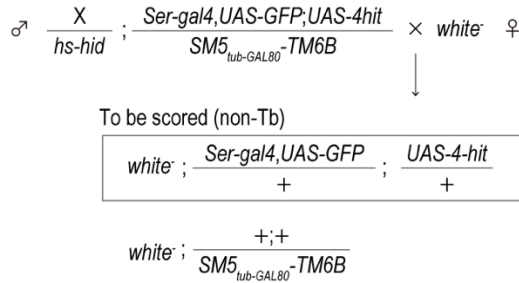
3. *4-hit* ハエを用いた遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエは、1～4 番の 4 染色体を有し、1 番染色体の 2 本が性染色体である。まず、遺伝学的スクリーニングにおけるハエの交配様式を図 2 に示す。各キナーゼの遺伝子変異や small interfering RNA (siRNA) によるノックダウンを有するハエは BDSC、京都ストックセンター、国立遺伝学研究所より入手した。各遺伝子変異を有するハエの一部は、遺伝子組換えを抑制するための balancer 染色体を保有しており、これらの染色体をハエの体長を短くする *Tubby* (*Tb*) 遺伝子を発現する balancer 染色体に置換 (リバランス) した。具体的には、性染色体の balancer 染色体である *FM6*、*FM7a*、*FM7c*、*FM7i* を有するハエは *FM7c-Tb-RFP* (*FTR*) にリバランスした。同様に 2 番染色体の balancer 染色体である *CyO*、*SM5*、*SM6a* を有するハエは *CyO-Tb-RFP* (*CTR*) に、また 3 番染色体の balancer 染色体である *TM3*、*TM6C*、*MKRS* を保有するハエは *TM6B* にリバランスした。これは次世代のうちキナーゼの遺伝子変異を有する個体を *Tb* を保有せず体長が短くない個体として識別するためである (図 2 A-I)。性染色体上のキナーゼ遺伝子の機能評価には、*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) の雄と *w* もしくは各キナーゼの遺伝子変異を有する雌を交配した (図 2 A、C、D)。また、2-4 番染色体のキナーゼ遺伝子の評価には *Ser>4-hit* ハエの雌と *w* もしくは各キナーゼの変異を有する雄を交配した (図 2 B、E-I)。これらを通じ、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、対照であるキナーゼ野生型 *Ser>4-hit* ハエとの間で生存率を比較した。親世代の交配および次世代の飼育は 27°C で行い、交配開始から 11 日目に蛹の総数と羽化した空の蛹の個数を計測し、その割合から生存率を算出した。

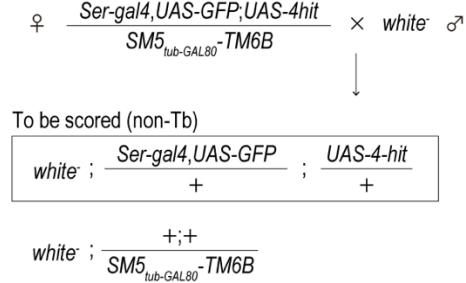
キナーゼのノックダウンによる遺伝学的スクリーニングにおいては、*Ser>4-hit* ハエの雌と各キナーゼ遺伝子に対する siRNA を *UAS* 配列下に有する *UAS-siRNA* ハエの雄を交配し、*Ser* ドライバー活性のある細胞で各キナーゼをノックダウンした *4-hit* ハエを産生して、対照であるキナーゼ野生型の *4-hit* ハエとの間で生存率を比較した (図 2 J)。上記のヘテロ接合性変異の実験と同様に、親世代の交配および次世代の飼育は 27°C で行い、交配開始から 11 日目に生存率を算出した。ハエの遺伝子に対応するヒトオルソログは *Drosophila* RNAi Screening Center Integrative Ortholog Predictive Tool (DIOPT: <https://www.flyrnai.org/cgi->

bin/DRSC_orthologs.pl) で検索し、weighted score が最も高いヒト遺伝子をオルソログとした。

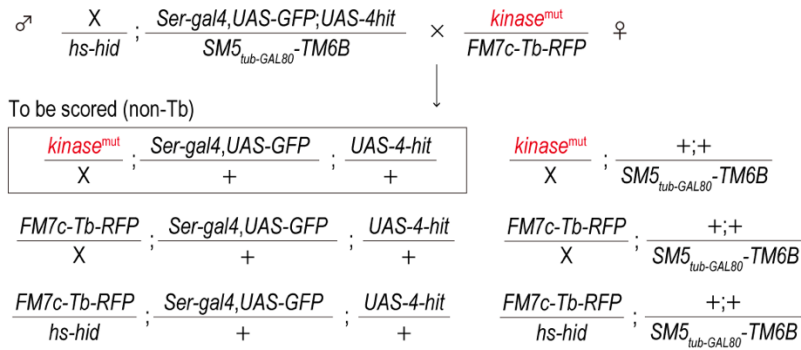
A Control (genetic screening for X chr)



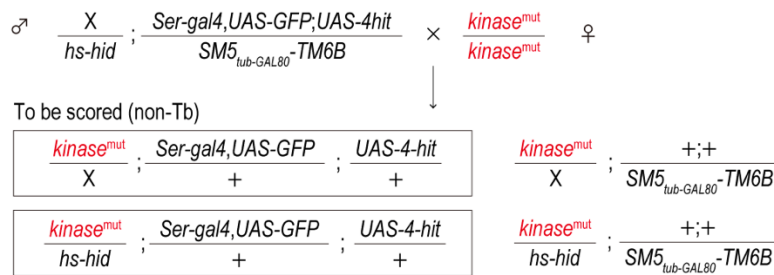
B Control (genetic screening for 2nd, 3rd, and 4th chr)



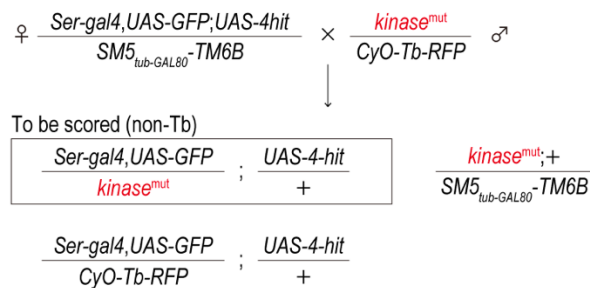
C Balanced mutant (X chr)



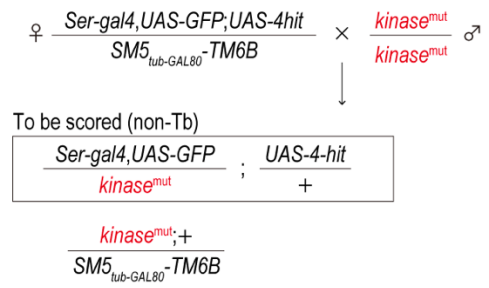
D Homozygote (X chr)



E Balanced mutant (2nd chr)



F Homozygote (2nd chr)



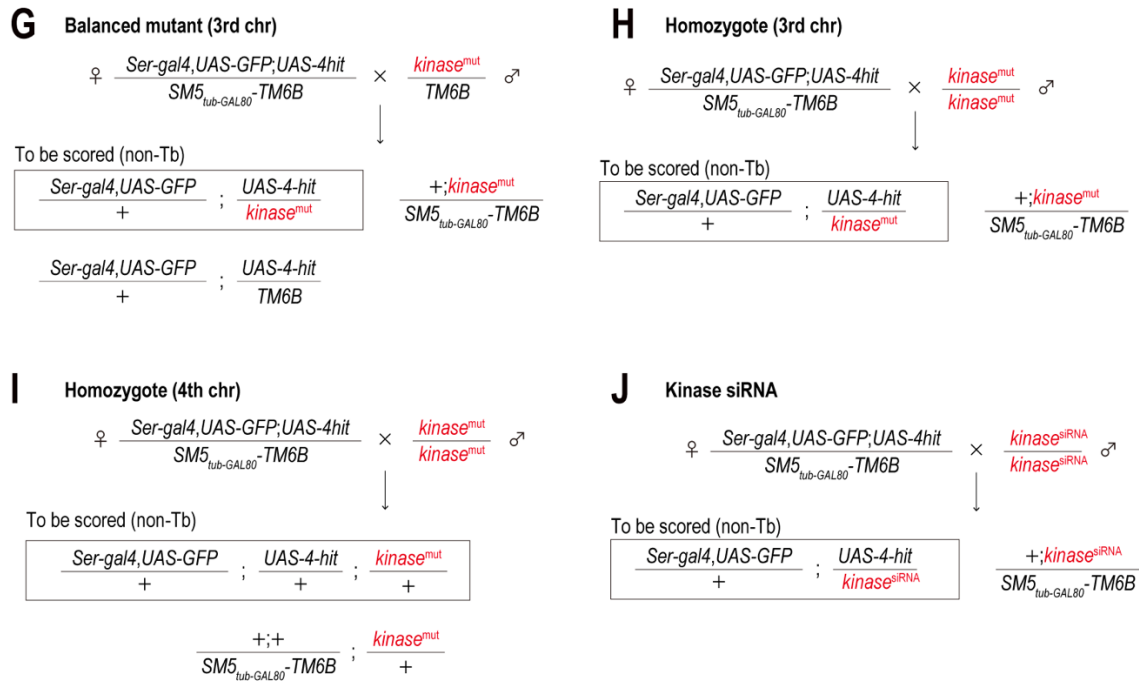


図 2. 遺伝学的スクリーニングにおけるハエの交配様式

(A–I) *4-hit* ハエを、キナーゼ遺伝子変異を有さない対照ハエ (A、B) または性染色体 (C、D)、2 番染色体 (E、F)、3 番染色体 (G、H)、もしくは 4 番染色体 (I) 上の各キナーゼの遺伝子変異を有するハエと交配した。親世代が有するキナーゼ遺伝子変異は visible marker である *Tubby* (*Tb*) を含む balancer 遺伝子と対立させたヘテロ接合型 (C、E、G) もしくはホモ接合型 (D、F、H、I) のハエを用いた。次世代のうち、*Tb* を保有していないハエ (四角枠内) が目的のキナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異を有するハエであり、これらのハエの生存率を算出して (B) の対照ハエと比較した。(J) キナーゼ遺伝子の siRNA ノックダウンによる遺伝学的スクリーニングにおける交配様式。*4-hit* ハエと各キナーゼに対する siRNA をホモ接合性に有するハエを交配し、siRNA をヘテロ接合性に有する次世代と (B) の対照ハエの生存率を比較した。

4. 幼虫の翅原基と成虫の羽の解析

(1) 翅原基の GFP 標識形質転換細胞の観察

実験に使用したハエの交配様式を図 3 に示す。*ptc* ドライバーハエの雄と非遺伝子組換えハエの雌、*UAS-Ras*^{G12D} (*UAS-l-hit*) ハエの雌、もしくは *UAS-4-hit* ハエの雌を交配し、解析に用いる次世代の対照ハエ、*ptc-gal4,UAS-Ras*^{G12D} (*ptc>l-hit*) ハエ、*ptc-gal4,UAS-4-hit* (*ptc>4-hit*) ハエを産生した。それぞれの三齢幼虫から翅原基を採取し、4%パラホルムアルデヒド (PFA ; Nacalai Tesque ; Kyoto、

Japan) で室温にて 20 分間、続いて 70%エタノールで 10 分間固定した。次に、固定した翅原基を Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、Vectashield Vibrance Antifade Mounting Medium (Vector Biolabs ; Malvern, PA) に 3%ヨウ化プロピジウム (Fujifilm Wako) を混入した固定液に封入して観察標本を作製した。固定後 2 時間以内に観察することで、ヨウ化プロピジウムを翅原基の辺縁の細胞だけに取り込ませ、翅原基の輪郭を描出した。翅原基全体の面積と、*ptc* 遺伝子のドライバー活性によって発現する GFP の陽性領域の面積を ImageJ software (NIH ; Bethesda, MD) で測定し、これらの比を算出した。また、それぞれのハエの生存率を測定した。

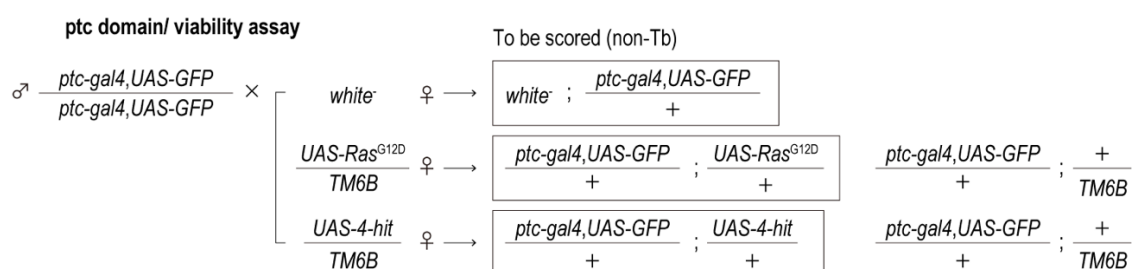


図 3. 翅原基の GFP 標識形質転換細胞の解析に使用するハエを得るための交配様式

ptc ドライバーハエと非遺伝子組換えハエもしくは *UAS-Ihit* ハエ、*UAS-4-hit* ハエを交配し、それぞれの次世代の幼虫から採取した翅原基を解析し、また成虫の生存率を測定した。*Tb* を保有せず体長が短くなっていない個体を、次世代のうち外来遺伝子を有する個体として識別した (四角枠内)。

(2) 翅原基の免疫蛍光染色

実験に用いたハエの交配様式を図 4 に示す。採取した翅原基を 4% PFA で室温にて 20 分間固定した後、0.1% Triton X-100 を含む PBS (T-PBS) で洗浄し、0.5% の blocking reagent (Roche ; Basel, Switzerland) 中で室温にて 45 分間のブロッキングを行った。続いてこの翅原基に、表 1 に記載の濃度に blocking reagent で希釈した一次抗体を加え、4 °C にて一晩反応させた。続いて T-PBS で翅原基を洗浄し、T-PBS で 500 倍に希釈した anti-rabbit IgG with Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific) を加え、室温にて 2 時間反応させた。そして、T-PBS で翅原基を洗浄し、上記と同様に観察標本を作製した。翅原基内の蛍光強度は ImageJ software を用いて測定した。すなわち、まず *Ser* ドライバーによって発現する GFP の陽性領域の輪郭を freehand sections でトレースし、これを *Ser* ドライバー活性化領域と定めた。この領域の輪郭を免疫蛍光染色した翅原基を撮像した写真と重ね合わせることで、*Ser* ドライバー活性化領域の蛍光強度を計測し、標的タンパク質

の発現量とした。



図 4. 翅原基の免疫蛍光染色に使用するハエを得るための交配様式

Ser ドライバーハエと非遺伝子組換えハエもしくは *4-hit* ハエを交配し、それぞれの次世代から採取した翅原基を免疫蛍光染色で解析した。

表 1. 抗体リスト

本研究で使用した抗体のリスト。Designation (抗体名)、source (入手元)、identifier (製品コード)、application の列にそれぞれを用いた実験系と希釈濃度を示す。CST、Cell Signaling Technology。WB、western blotting。IF、immunofluorescence。TMA、tissue microarray。HRP、horseradish peroxidase。

Designation	source	identifiers	apprications
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	CST	#4695	WB (1:1,000)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb	CST	#4370	WB (1:2,000), IF (1:100)
dCycE (8B10) Mouse monoclonal antibody	Richardson , 2015		IF (1:10)
Histone H3 (D1H2) XP® Rabbit mAb	CST	#4499	WB (1:2,000)
Phospho-Histone H3 (Ser10) Antibody	CST	#9701	WB (1:1,000), IF (1:500)
Phosphohistone H3 (PHH3) Rabbit Polyclonal Antibody	Sigma Aldrich	369A-15- RUO	TMA (1:100)
IR626 Ki-67 Antigen, MIB-1, Unconjugated, FLEX RTU	Agilent	IR62661-2	ready to use
Caspase-3 Antibody	CST	#9662	WB (1:1,000)
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb	CST	#9664	WB (1:500)
PARP (46D11) Rabbit mAb	CST	#9532	WB (1:1,000)
Cleaved PARP (Asp214) (D64E10) XP® Rabbit mAb	CST	#5625	WB (1:1,000)
Phospho-RIP3 (Ser227) (D6W2T) Rabbit mAb	CST	#93654	WB (1:1,000)
Phospho-MLKL (Ser358) (D6H3V) Rabbit mAb	CST	#91689	WB (1:1,000)

Cleaved Gasdermin D (Asp275) (E7H9G) Rabbit mAb	CST	#36425	WB (1:1,000)
Cleaved-IL-1 β (Asp116) (D3A3Z) Rabbit mAb	CST	#83186	WB (1:1,000)
LC3B (E5Q2K) Mouse mAb	CST	#83506	WB (1:1,000)
SQSTM1/p62 (D5L7G) Mouse mAb	CST	#88588	WB (1:1,000)
α -Tubulin (11H10) Rabbit mAb	CST	#2125	WB (1:1,000)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	CST	#7074	WB (1:10,000)
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	CST	#7076	WB (1:10,000)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 594	Thermo Fisher	A32740	IF (1:500)

(3) 翅原基の遺伝子発現解析

実験に用いたハエの交配様式を図5に示す。三齢幼虫から翅原基を20–30個採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてRNAを抽出し、このうち20–100 ngをReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて逆転写してcDNAを作製した。逆転写反応は、37℃で15分間、50℃で5分間、98℃で5分間の連続インキュベーションにて実施した。RT-qPCRは、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) と StepOnePlus real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施し、95℃での1分間のインキュベーション後、95℃ 15秒間と60℃ 45秒間のサイクルを40回繰り返した。比較定量は、*alphaTub84B*を内在性コントロールとする $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行った。プライマーは、primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を使用して設計した(表2)。

$$\begin{array}{l} \text{♂ } \frac{765\text{-}gal4}{765\text{-}gal4} \times \left[\begin{array}{l} \text{white}^- \quad \text{♀} \longrightarrow \frac{+}{765\text{-}gal4} \\ \frac{UAS\text{-}4\text{-}hit}{UAS\text{-}4\text{-}hit} \quad \text{♀} \longrightarrow \frac{UAS\text{-}4\text{-}hit}{765\text{-}gal4} \end{array} \right. \end{array}$$

図5. 翅原基の遺伝子発現解析に使用するハエを得るための交配様式

765 ドライバーハエを非遺伝子組換えハエもしくは *4-hit* ハエと交配し、それぞれの次世代から翅原基を採取し、RNAを抽出した。

表 2. プライマーリスト

ハエの RT-qPCR ならびにヒト膀胱がん細胞株のゲノムシーケンスに用いたプライマーを示す。

Assay	Gene	Exon	Forward	Reverse
RT-qPCR (<i>Drosophila</i>)	<i>alphaTub84B</i>		TGTCGCGTGTGAAACACTTC	AGCAGGCGTTTCCAATCTG
	<i>p53</i>		GGATCGGAATTGACCACGGA	GTCCTGCAGCATCATTTTCGC
	<i>Med</i>		CCGCGTGCATAAAGGTGTTT	TGCTGTCATGCTCCTTCCG
sequencing (ヒト)	<i>KRAS</i>	2	GTTTGTATATAAAGGTACTGGTGGA	ATCAAAGAATGGTCCTGCAC
		3	AGGTGCACTGTAATAATCCAGACT	GCATGGCATTAGCAAAGACTCA
	<i>TP53</i>	3	CCTGGTCTCTGACTGCTCT	AAGTCTCATGGAAGCCAGCC
		4, 5	CTGAGGTGTAGACGCCAACT	TTGCACATCTCATGGGGTTA
		6	TGCTTGCCACAGGTCTCC	GGTCAGAGGCAAGCAGAGG
		7	CAAGGGTGGTTGGGAGTAGA	TAAGTGCACCCCTGGTCTCC
	<i>CDKN2A</i>	2	ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG	AACTTCGTCCTCCAGAGTCG
		3	CTCTACACAAGCTTCCTTTC	ACTTTCTGTGCTGGAAAAT
		4	GTAGGGACGGCAAGAGAGG	CCTGTAGGACCTTCGGTGAC
	<i>SMAD4</i>	2	CCTTGCAACGTTAGCTGTTGT	AATCTGCCACCATAGAGGGT
		3, 4	AGGTCTGATGTATGACATGGCC	CCTGCCGCTCACACAACTA
		5	TGCTGGAGGCTGTTGAAACA	CCAAGTGATTGTGCATACCTGT
		6, 7	ACCTGATAGGCCATGGGTGA	ACAGAAAACAAAGCCCTACCA
		8	TGAAAGTTTATGATTAGACA	TTCAATCACCATAAATCAA
		9	TTTCTCATGGGAGGATGTTC	CAATTTTTTAAAGTAACTATCTGAC
		10	AAGCATGCTATACAATCTGAACTAAAA	CAATTCTTTTGACAACAAATAGAGC
		11	GAATTTTCTTTATGAATCATAG	TTTAAAAAGAATGAAAAGCATAC
		12	AGGGAGGATGGGAAGAGATCA	TAAGGTTAAGGGCCCCAACG

5. 4-hit ハエを用いた化合物スクリーニング

使用した化合物を表 3 に示す。全ての化合物は DMSO (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) に溶解して -80 °C で保存した。DMSO の最終濃度は、化合物を単独で投与する場合は 0.1% に、一方化合物を二剤組み合わせで投与する場合は 0.12% となるよう調製した。これらを 15 ml コニカルチューブに分注して餌を入れ、ボルテックスミキサーで十分に攪拌したのちハエ飼育バイアルに分注した。全ての化合物は事前に非遺伝子組換えハエを使用して最大耐量 (maximum tolerated

dose : MTD) 試験を実施した。すなわち、最終濃度 10、100、500 μM の化合物を溶解した餌で *w* を飼育し、通常餌と比較して生存率や蛹の個数が有意に低下しない最大濃度を各化合物の MTD と定め、続く化合物スクリーニングで用いる最大濃度とした。DMSO への溶解度が低い化合物は、溶解度に応じてより低い化合物濃度で MTD 試験を実施した。化合物スクリーニングで使用したハエの交配様式を図 6 に示す。*UAS-4-hit* ハエの雌と *Ser-gal4* を有するハエ (*Ser* ドライバーハエ) の雄を通常餌を入れたバイアル中で 3 日間交配し、化合物入りの餌を入れたバイアル中に 2–3 匹の雌のみを移した後、50 個程度の卵が確認できた時点でそれらの雌を取り除いた。親世代の交配および次世代の飼育は 22–23.5 $^{\circ}\text{C}$ で行い、交配開始から 13 日目に生存率を測定した。

表 3. 化合物リスト

Designation (化合物名)、target (標的タンパク質)、source (入手元)、identifier (製品コード) を示す。

<i>Designation</i>	<i>target</i>	<i>source</i>	<i>identifiers</i>
trametinib	MEK	MedChemExpress	HY-10999
Selumetinib	MEK	MedChemExpress	HY-50706
Refametinib	MEK	MedChemExpress	HY-14691
Myricetin	MEK	MedChemExpress	HY-15097
BI-847325	MEK	MedChemExpress	HY-18955
GDC-0623	MEK	MedChemExpress	HY-15610
APS-2-79	MEK	MedChemExpress	HY-100627
RGB-286638	MEK	MedChemExpress	HY-15504
Ro 5126766	MEK	MedChemExpress	HY-18652
Isorhamnetin	MEK	MedChemExpress	HY-N0776
HI-TOPK-032	MEK	MedChemExpress	HY-101550
Binimetinib	MEK	MedChemExpress	HY-15202
CI-1040	MEK	MedChemExpress	HY-50295
BIX02189	MEK	MedChemExpress	HY-12056
Pimasertib	MEK	MedChemExpress	HY-12042
MEK inhibitor	MEK	MedChemExpress	HY-12202
TAK-733	MEK	MedChemExpress	HY-13449
AZD8330	MEK	MedChemExpress	HY-12058

PD318088	MEK	MedChemExpress	HY-12062
Honokiol	MEK	MedChemExpress	HY-N0003
cobimetinib	MEK	LC Laboratories	C-1100
PD0325901	MEK	LC Laboratories	P-9688
PD 98059	MEK	LC Laboratories	P-4313
U0126	MEK	LC Laboratories	U-6770
PD-198306	MEK	TOCRIS	2605
PD-334581	MEK	TOCRIS	4824
BI-831266	Aurora kinase	Boehringer Ingelheim	OpnMe
alisertib	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10971
CCT137690	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10804
CCT129202	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-12049
CCT241736	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-18161
SNS-314 mesylate	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-12003
Hesperadin	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-12054
Tozasertib	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10161
MK-5108	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-13252
MLN8054	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10180
ZM-447439	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10128
Danuserib	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10179
PF-03814735	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-14574
AT9283	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-50514
GSK-1070916	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-70044
PHA-680632	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10178
Reversine	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-14711
CYC-116	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10558
ENMD-2076 Tartrate	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10987
TAK-901	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-12201
AMG-900	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-13253
MK-8745	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-13819
JNJ-7706621	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10329

SCH-147375	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-10482
Ilorasertib	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-16018
TCS7010	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-70061
LY3295668	Aurora kinase	MedChemExpress	HY-114258
adavosertib	WEE1	MedChemExpress	HY-10993
AD80	SRC, RET, RAF, S6K	MedChemExpress	HY-101963
Y-27632	ROCK inhibitor	MedChemExpress	HY-10071

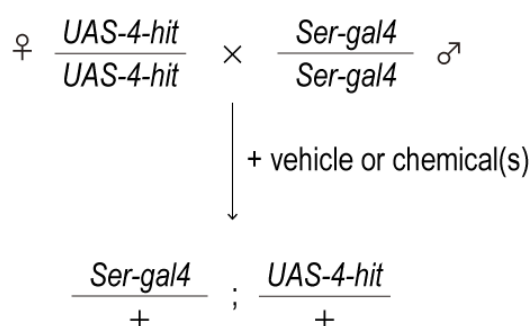


図 6．化合物スクリーニングに使用したハエの交配様式

Ser ドライバーハエと *UAS-4-hit* ハエを交配し、次世代を溶媒のみ、もしくは化合物を混入した餌を与えて飼育し、生存率を測定した。

6．組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学染色

(1) 対象患者とサンプル

本研究は「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従い、北海道大学病院自主臨床試験（北海道大学病院倫理審査委員会承認番号 019-0154）として実施し、全ての対象患者より術前に書面で同意を得た。2000 年から 2010 年までに膵がんと診断され北海道大学消化器外科Ⅱで外科切除が行われた患者の手術検体から同科で作製済みの組織マイクロアレイ（tissue microarray : TMA）を使用した。TMA に含まれる症例のうち、手術前後の補助化学療法を施行していない 87 症例について、電子カルテと病理レポートから臨床病理学的データを後方視的に収集し、情報が不十分であった 1 例を除外して合計 86 症例を解析した。

(2) TMA の免疫組織化学染色

TMA ブロックから病理切片を薄切してキシレン中で脱パラフィン処理し、段階的エタノール系列を用いて脱水した。次に、高 pH 抗原賦活緩衝液（Agilent）を用いて熱誘導抗原賦活化を行った後、3%過酸化水素水を添加し室温で 5 分間、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。続いて、表 1 に記載の濃度に

希釈した pHH3 や Ki-67 に対する一次抗体を病理切片に滴下し、室温にて 30 時間反応させた。最後に、EnVision FLEX system (Agilent) を用いて標識二次抗体と色素発色による検出を行い、ヘマトキシリンで対比染色し、エタノール中で脱水したのちキシレンで透徹した。各コア中の pHH3 または Ki-67 が腫がん細胞内に存在する割合は MIB-1 index を参照し (Keshgegian and Cnaan, 1995)、2 人の研究者 (申請者と共同研究者の北海道大学病院ゲノム・コンパニオン診断研究部門 畑中佳奈子先生) がそれぞれ計測した。解析の結果、pHH3 が陽性である腫瘍細胞の割合が低いことが分かったため、pHH3 については症例を陽性群と陰性群に 2 群化し (カットオフ値 : 0%)、この両群間で患者背景を比較し、また全生存期間 (overall survival : OS) と無再発生存期間 (recurrence-free survival : RFS) を Log-rank 検定で解析した。また 2 群間における OS と RFS のハザード比と 95% 信頼区間、および *P* 値は Cox 比例ハザードモデルで算出した。

7. マウスを用いた薬物動態試験

マウスにおける BI-831266 の薬物動態試験は、Medicilon (Shanghai, China) にて実施した。すなわち、6 週齢の雄の ICR (Institute of Cancer Research) マウスに、DMSO に溶解した 10 mg/kg の BI-831266 を生理食塩水で 20 倍に希釈して経口投与し、0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24 時間後の血中濃度を各群 3 匹ずつ測定した。

8. マウスを用いた最大耐量試験

本研究の全てのマウス実験は、北海道大学動物実験に関する規程に準じて実施した (承認番号 19-0121、2022-0117、2022-0118)。マウスは点灯と消灯を 12 時間おきに繰り返す環境下で飼育した。各群 6 匹ずつ雌の BALB/c-*nu/nu* マウス (6 週齢、CLEA) に溶媒である DMSO、または溶解した化合物の trametinib、BI-831266 をそれぞれ生理食塩水で 20 倍希釈し、0.1 mg/kg/日から開始して経口投与した。その後、2～3 日間の観察期間で体重減少などの副作用がないことを確認し、投与量を漸増した。副作用が出た時点、もしくは溶解の限界濃度 (trametinib : 20 mg/kg/日、BI-831266 : 100 mg/kg/日) の投与時点で試験を終了した。

9. マウス異種移植実験

(1) 移植実験のマウスの準備

全ての外科的処置と腹腔内投与は 15 mg/kg の塩酸メドトミジン (Kyoritsuseiyaku ; Tokyo, Japan)、200 mg/kg のミダゾラム (Astellas pharma ; Tokyo, Japan)、250 mg/kg の酒石酸ブトルファノール (Meiji Seika Pharma ; Tokyo,

Japan) を混注した三種混合皮下麻酔下に実施した。処置終了後に 150 mg/kg の塩酸アチバメゾール (Kyoritsuuseiyaku) を皮下投与し、麻酔を拮抗して覚醒させた。化合物投与期間中、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって示された下記の徴候を認めた場合において、頸椎脱臼法でマウスを安楽死させた：(i) 強い苦痛の徴候、(ii) 多量の腹水もしくは腫瘍の遠隔転移、消化管出血、(iii) 15%を超える体重減少、(iv) 2 cm を超える腫瘍径。

(2) 異所性移植腫瘍の作製

PBS で 2 倍希釈した Matrigel (Corning ; Tewksbury, MA) 100 μ L 中に 5×10^6 個の MIA PaCa-2 を懸濁し、この懸濁液を雌の BALB/c-*nu/nu* マウス (6 週齢、CLEA) の右側腹部に皮下注射した。実験における真の体重は、測定した体重から腫瘍重量 (mm^3 を mg に換算) を減算して算出した。腫瘍体積は (腫瘍長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径) / 2 で算出した。腫瘍体積が 100 mm^3 に達した時点で、各群の平均腫瘍体積が均等になるようにグループ割りを行った。経口投与は 1 日 1 回を週 5 回、DMSO に溶解した化合物を生理食塩水で 20 倍希釈し、経口ゾンデで胃内に直接投与した。①溶媒、②trametinib 1 mg/kg/日、③BI-831266 10 mg/kg/日、④trametinib 1 mg/kg/日と BI-831266 10 mg/kg/日の併用、の 4 群 (8 匹/群) に合計 4 週間投与した。

(3) ルシフェラーゼを安定発現する AsPC-1 (AsPC-1-Luc) の樹立

レンチウイルスベクター (pLV5IN-EF1 α -IRES-ZsGreen1) は Takara Bio (Otsu, Japan) より購入した。ViafectTM (Promega ; Madison, WI) を用いて、HEK293T (RIKEN BRC) に、ルシフェラーゼの cDNA を挿入した pLV5IN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 と Lentiviral High Titer Packaging Mix (Takara Bio) を同時にトランスフェクションした。48 時間後にウイルスを含んだ培養液の上清を回収し、0.45 μ m のフィルターで濾過した。濾過した上清は、4.0 μ g/ml のポリブレン (Nacalai Tesque) と共に、培養ヒト膵がん細胞株である AsPC-1 を播種した培地に添加した。添加して 24 時間後に AsPC-1 をトリプシン処理し、 10^3 個の細胞を 100 mm ディッシュに播種した。蛍光顕微鏡を用いて、ZsGreen を発現するコロニーを同定してクローニングを実施した。

(4) 同所性移植腫瘍の作製

AsPC1-Luc 1×10^6 個を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS、Thermo Fisher Scientific) で 2 倍希釈した Matrigel 30 μ L 中に懸濁し、雌の BALB/c-*nu/nu* マウス (6 週齢、CLEA) の左側腹部を切開して露出した膵尾部に接種した。懸濁液の腹腔内への漏出を予防するため刺入部を綿棒で 30 秒間圧迫し、開腹創は筋膜と皮膚を 2 層で閉腹した。腫瘍の体積は、150 mg/kg の D-luciferin (BioVision、Palo Alto, CA) を腹腔内投与して 15 分後に IVIS Spectrum Imaging System (Caliper Life Science ; Mountain View, CA) を用いて測定した発光強度を指標に、相対値

を算出した。マウスは移植後 1 4 日目に平均発光強度が均等になるようにグループ割りを行い、各群のマウスには①溶媒、②trametinib 0.5 mg/kg/日、③BI-831266 10 mg/kg/日、④trametinib 0.5 mg/kg/日と BI-831266 10 mg/kg/日の併用、の 4 群（6 匹／群）に、合計 4 週間経口投与を実施した。化合物投与期間中は、週 1 回 IVIS で腫瘍発光強度を測定した。

（５） 腫瘍検体の免疫組織化学染色

移植腫瘍を化合物投与開始後 3 日目に採取して 4% PFA 中で固定し、HistoCore PEARL（Leica Biosystems；Nussloch、Germany）を用いてパラフィンブロックを作製した。薄切したパラフィン切片はキシレンで脱パラフィンし、段階的エタノール系列で脱水した。次に、非特異的免疫反応を SuperBlocking Blocking Buffer（Thermo Fisher Scientific）中で室温にて 3 0 分間ブロッキングし、続いて表 1 に記載する濃度に同 Buffer で希釈した一次抗体を添加して 4 °C で一晩反応させた。次に、EnVision+ System-HRP labeled polymer（Agilent）を用いて、標識二次抗体と切片を室温で 3 0 分間反応させ、ImmPACT DAB peroxidase substrate（Vector Biolabs）で抗体の局在を可視化した。続いて核をヘマトキシリンで対比染色し、エタノールで脱水後、キシレンで透徹した。解析には Keyence BZ-X800 Analyzer（Keyence；Osaka、Japan）を用いた。

1 0．細胞増殖実験

（1） ヒト膵がん細胞株の入手と培養方法

MIA PaCa-2 と PANC-1 は、ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて理化学研究所バイオリソース研究センター（RIKEN BRC）より入手した。Capan-1 と AsPC-1 は、ATCC（American Type Culture Collection）から購入した。PCI-55 は北海道大学病院で外科的切除された患者検体より樹立した細胞株で、北海道大学大学院医学研究院病理学講座統合病理学教室より提供を受けた。全ての細胞株は表 4 に示すように 1%ペニシリン-ストレプトマイシン（Nacalai Tesque；Kyoto、Japan）を加えた培地中で、3 7 °C、5% CO₂ にて培養した。

表 4. 本研究で用いた細胞株

各細胞株の medium (培地)、FBS (Fetal Bovine Serum ; ウシ胎児血清の濃度)、
 抗生剤の濃度を示す。DMEM、Dulbecco's Modified Essential Medium。RPMI-1640、
 Roswell Park Memorial Institute 1640。IMDM、Iscove's Modified Dulbecco's Medium。

<i>Cell line</i>	<i>Medium</i>	<i>FBS</i>	<i>Penicillin/streptomycin</i>
MIA PaCa-2	DMEM	10%	1%
PCI-55			
HEK293T			
PANC-1	RPMI-1640	10%	1%
AsPC-1			
Capan-1	IMDM	20%	1%

(2) 細胞増殖能解析

細胞 $1 \sim 3 \times 10^3$ 個を懸濁した培地 100 μ L を 96 ウェルプレートに分注し、24 時間培養した。次に、DMSO に溶解した各化合物 (DMSO 最終濃度 0.2%) を 3 ウェルに 20 μ l ずつ添加した。その後 72 時間培養し、CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega) を添加して 2 時間培養したのち、microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc. ; Hercules, CA) で各ウェルの吸光度を測定し、対照群に対する相対的細胞数を算出した。

1.1. 膵がん細胞株のゲノムシーケンス

各膵がん細胞株のゲノム DNA は、DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) を用いて抽出した。*KRAS* のエキソン 2 と 3、*TP53* のエキソン 3-7、*CDKN2A* のエキソン 2-4、*SMAD4* のエキソン 2-12 をシーケンスするためのプライマーは primer3Plus を使用して設計した。シーケンスは、北海道大学遺伝子病制御研究所の石川晋先生に依頼し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR 法で標的エキソンを増幅し、直接塩基配列を読み取った。目的の遺伝子の増幅が得られない場合はホモ接合体欠損と判断した。用いたプライマーを表 2 に示す。

1.2. 培養細胞のウェスタンブロッティング

Trametinib または BI-831266 を添加して 24 時間または 48 時間後の培養細胞を PBS で洗浄し、phenylmethylsulfonyl fluoride (Fujifilm Wako) を加えた Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology ; Danvers, MA) で細胞溶解液を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法で測定した。続いて、20-40 μ g のタンパク質を 10-13%

SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore ; Billerica, MA) に転写した。次に、転写した膜を Blocking One もしくはリン酸化タンパク質に対しては Blocking One P (Nacalai Tesque) の各液を用いて室温にて 20 分間ブロッキングを行い、これらの液で表 1 に記載の濃度に希釈した標的タンパク質の一次抗体と 4 °C にて一晩反応させた。続く二次抗体反応は転写した膜と、Blocking One で 1×10^4 倍に希釈した horse anti-mouse IgG, HRP-linked antibody または goat anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (CST) を室温にて 1 時間反応させた。最後に、Immobilon Forte Western HRP substrate (Millipore) と転写した膜を室温で 5 分間反応させ、ChemiDoc XRS+ と Image Lab software (Bio-Rad) を用いてシグナルを解析した。シグナル強度は α -tubulin を内在性コントロールとし、リン酸化タンパク質については当該タンパク質全量との比を算出した。

1 3. 統計解析

全ての統計解析は、R ver. 4.1.1 を用いて両側検定を行い、有意水準を $P < 0.05$ とした。化合物組み合わせ投与実験における Bliss synergy score は、SynergyFinder (version 3.0.14) を用いて平均スコアと P 値を算出した。

実験結果

1. 膵がんの遺伝子変異を模倣した *4-hit* ハエの作出

膵がん患者では、がん遺伝子 *KRAS* の活性化とがん抑制遺伝子 *TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* の不活性化の 4 つの体細胞遺伝子変異の組み合わせが頻繁に認められる。膵管上皮細胞において、これらの遺伝子変異が段階的に発生することにより、上皮細胞の異型性変化、上皮内がん、そして浸潤がんへと進行するとの仮説が提唱されている (Morris et al, 2010)。加えて臨床では、これらの遺伝子の変異が増えるほど膵がん患者の予後が悪化する傾向があり、4 遺伝子全ての変異 (*4-hit*) をもつ患者は 3 つ以下の遺伝子変異をもつ患者と比較し予後不良である (Qian et al, 2018)。

これらの遺伝子変異を有し内因性に腫瘍を発症するモデルマウスは、膵がんの発生機序の解明や新規治療標的の探索に重要な貢献をしてきた (Aguirre et al, 2003; Hingorani et al, 2003, 2005; Bardeesy et al, 2006; Izeradjene et al, 2007)。しかし、現時点でこれら *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* 全ての遺伝子変異を有する GEMM は主に技術的な課題のためにいまだ作出されていない。ここで申請者は、*4-hit* を模倣したショウジョウバエを作出することで最も予後が悪い *4-hit* の膵がんの発症メカニズムの解析や新規治療標的の探索をより効率的に行う着想を得た。

4-hit ハエを作出するにあたり、まず申請者はヒトの膵がんでは 95% に変異を認める *KRAS* に着目し、最も頻度の高い活性型変異である *KRAS*^{G12D} を模倣するために、二塩基置換したハエ *Ras* (*dRas*^{G12D}) を外来性に発現させた (図 7)。がん抑制遺伝子 *CDKN2A* の欠損についてはこの遺伝子のハエオルソログが存在しなかったため、この欠損が招来するシグナルの変化を模倣することとした。すなわち、ヒトでは *CDKN2A* 欠損によって Cyclin D (CycD) の分解が抑制されこの活性が向上するが、ハエにおいて dCycE は細胞の G1 期から S 期への進行を促進するというヒト CycD と同等の機能を持つことが報告されており (Richardson et al, 1995)、本研究では外来性に dCycE を過剰発現させることで *CDKN2A* 欠損と同等の状況を作成した。一方、*TP53* と *SMAD4* の欠損はそれぞれハエのオルソログである *p53* と *Med* を各遺伝子特異的な shRNA を導入しノックダウンすることで模倣した (図 7)。

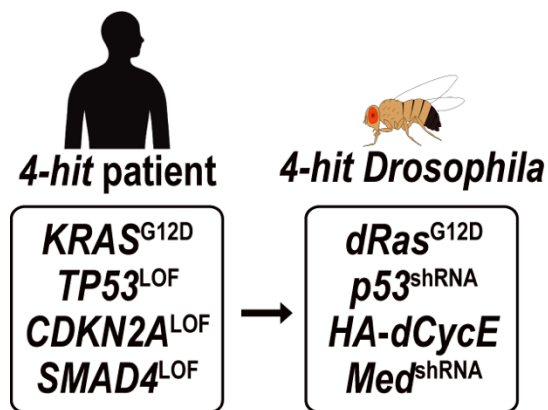


図 7. 膵がん患者の遺伝子型を模倣したモデルショウジョウバエの作出

ヒト膵がん患者に認められる 4 遺伝子の変異とそれらに対応するハエオルソログ。CDKN2A の変異については、ハエにヒト CDKN2A に対応するオルソログが存在しないため、細胞周期において CDKN2A 変異と同等の影響をもたらすと考えられる dCycE の過剰発現を実施することで模倣した。LOF、loss of function。

これらの導入遺伝子の発現は、ハエの実験で一般的に用いられる *GAL4-UAS* 転写制御系を利用している。これは、「ドライバー」ハエと「*UAS*」ハエを交配し、生まれる仔ハエにおいて外来遺伝子を発現させる制御系である (図 8)。ドライバーハエは温度依存的に活性が変化する酵母由来の転写因子 *GAL4* をコードする遺伝子を有しており、特定の遺伝子のエンハンサー配列の活性を利用して任意の細胞・臓器特異的に *GAL4* を発現させることができる系統である。一方、*UAS* ハエは、*GAL4* が結合する *UAS* 配列の下流に発現させたい外来遺伝子を配置した系統である (Yamamura et al, 2021)。

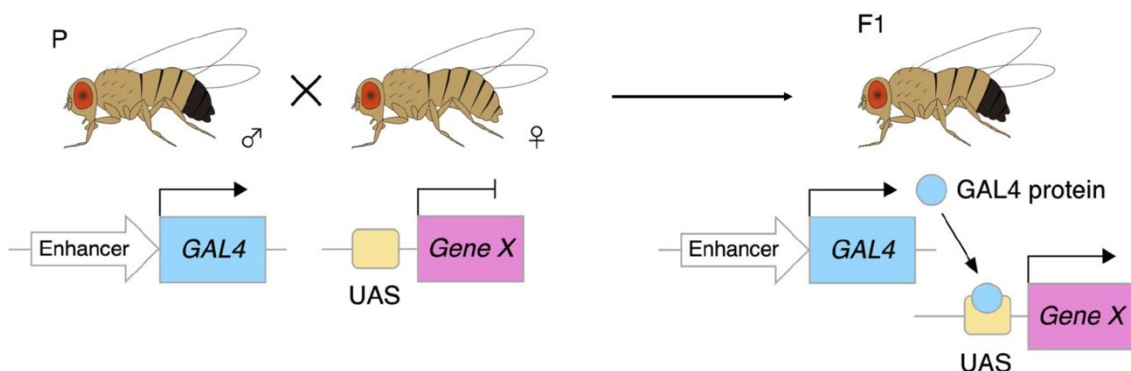


図 8. 導入遺伝子の発現を制御するハエの *GAL4-UAS* 転写制御系

特定のドライバーによって細胞・臓器特異的に発現する酵母由来の転写因子 *GAL4* と、その標的配列である *UAS* によって成り立つ。P は親世代、F1 は子世

代を示す。(Yamamura et al, 2021)より引用改変。

所属研究室の先行研究では、受容体型チロシンキナーゼ (Receptor tyrosine kinase : RTK) -Ras 経路の活性化によって引き起こされる上皮細胞の形質転換能の評価において、ハエ幼虫の翅原基が有用なモデル組織となることを報告してきた(Vidal et al, 2005; Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019)。すなわち、単層上皮細胞で構成される翅原基を使用することで、RTK-Ras 経路を含む様々なシグナル経路に参与するキナーゼの阻害剤の効果を評価することが可能である。

そこで本研究において申請者は、ドライバーとして *ptc-GAL4* を使用して外来遺伝子を翅原基中央の細胞 10 個程度の幅の領域 (*ptc* ドメイン) に特異的に発現させることで、先行研究と同様に、形質転換した細胞の増殖能や遊走能を評価した。まず、*dRas^{G12D}* のみを発現する *ptc>dRas^{G12D}* (*ptc>l-hit*) ハエを作出してその翅原基を観察したところ、*ptc* ドメインの上皮細胞が形質転換を起こして細胞の増殖性が亢進し、*ptc* ドメインの幅が対照の *ptc>GFP* ハエと比較して広がった (図 9 A、B)。続いて、*ptc* ドメインに 4 つ全ての外来遺伝子を発現する *ptc>4-hit* ハエは、*ptc>l-hit* ハエと比較して増殖能が更に亢進してドメインの幅が有意に広がるだけでなく、遊走能の亢進も見られることでドメインの形態がより無秩序となった (図 9 A、B)。

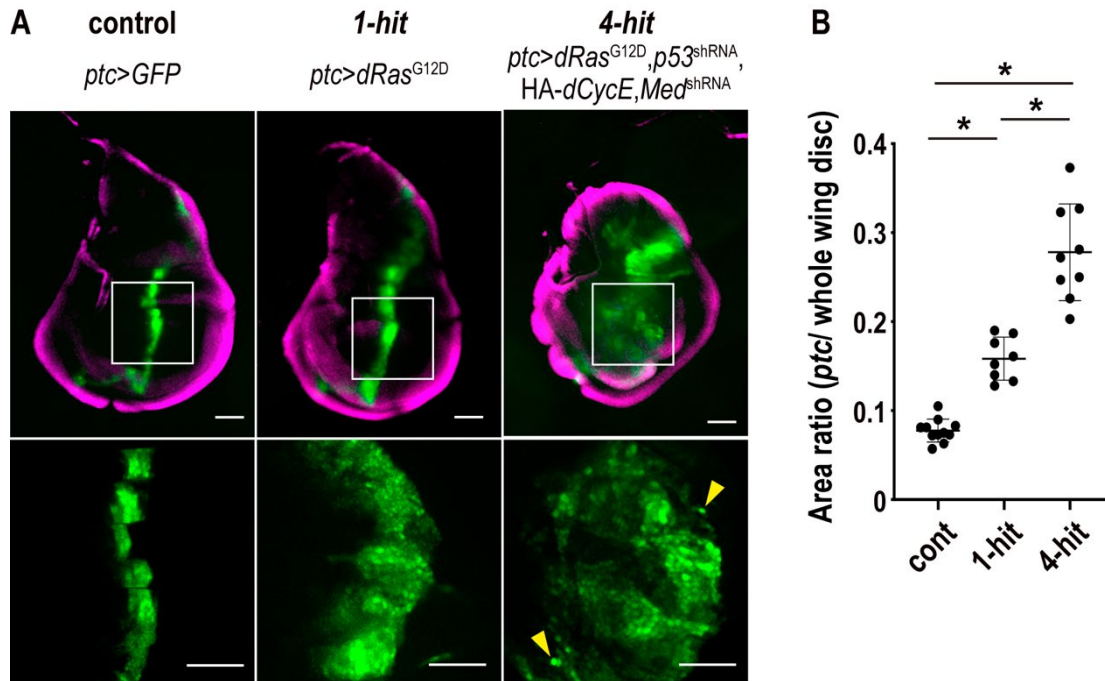


図 9. 再現した遺伝子変異数の蓄積に伴う *ptc* ドメインの形態異常の進行

(A) 解析した幼虫の翅原基において、中央に GFP で標識された上皮細胞が帯状に存在している (*ptc* ドメイン)。矢頭は遊走能が亢進した細胞を示し、スケールバーは 50 μm を示す。(B) 翅原基全体の面積に対する *ptc* ドメインの面積比。

* $P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定)。

上記の *ptc* ドメインの表現型と一致し、対照のハエがほぼ全数生存するのに対して *ptc>1-hit* ハエの生存率はほぼ半減し、*ptc>4-hit* ハエの生存率は 0%であった (図 10)。これは、臨床において 4 遺伝子の変異数が増加するほど患者の予後が悪化することと矛盾しない結果であった。

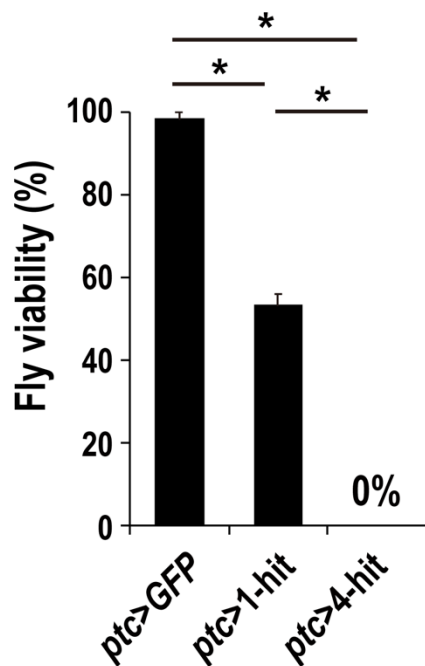


図 1 0. 再現した遺伝子変異数の蓄積に伴うハエ生存率の低下

ptc>GFP (対照)、*ptc>1-hit*、*ptc>4-hit* の各ハエの 16 °C における生存率を示す。

* $P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定)。

なお、以降で実施する 4 外来遺伝子の発現解析や遺伝学的スクリーニングにおいて、申請者は *ptc* ドライバーではなく *Ser* ドライバーを用いた。*Ser>4-hit* ハエは、*ptc>4-hit* ハエと比較して同じ飼育条件下で生存率が高く、大規模なサンプル採取やスクリーニングなどをより効率的に実施することが可能であったためである。

ここで申請者は、*4-hit* ハエにおける外来遺伝子の発現量を解析すべく、まず *dRas* の活性化についてシグナル経路下流の pERK を、また dCycE の過剰発現について dCycE 自体の発現量を指標とし、それぞれ免疫蛍光法で解析した (図 1 1 A、B)。すなわち、ドライバーとして *Ser-GAL4* を使用して翅原基中央を短軸方向に走向する領域 (*Ser* ドメイン) に 4 外来遺伝子を発現させた *Ser>4-hit* ハエで、この *Ser* ドメインにおける pERK と dCycE の蛍光強度を解析した。その結果、*Ser>4-hit* ハエの *Ser* ドメイン内の両者の発現量が、対照となる *Ser>GFP* ハエと比較して大幅に増加していることが分かった (図 1 1 C)。

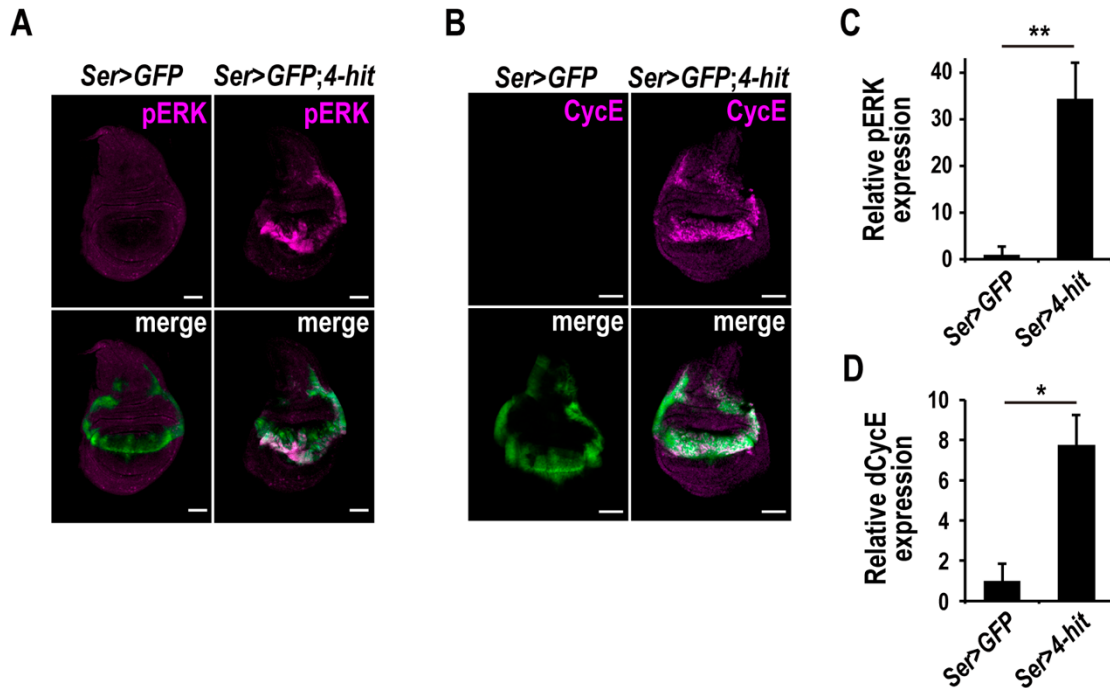


図 1 1. *4-hit* ハエにおける *dRas* の機能亢進と *dCycE* の発現の増加

(A、B) *Ser>GFP* ハエ (対照) と *Ser>4-hit* ハエの幼虫から翅原基を摘出し、*dRas* の活性の指標となる pERK (A)、ならびに *dCycE* (B) の発現を免疫蛍光染色により解析した。(C、D) *Ser* ドメイン内における pERK (C) と *dCycE* (D) の蛍光強度を、ImageJ software を用いて定量した。スケールバーは 50 μ m を示す。* $P < 0.01$ 、** $P < 0.001$ (Student *t* 検定)。

続いて申請者は、*p53* と *Med* の mRNA の発現量を解析したところ、翅原基の上皮細胞における内因性の *p53* と *Med* の発現が弱く、pERK と同様の免疫蛍光染色による発現解析が困難であることを見出した。このため既報を参照し、765 ドライバーを活用して RT-qPCR 法にて *p53* と *Med* の mRNA の発現量を定量した (Bang et al, 2019)。翅原基全体から mRNA を抽出する場合、*Ser* ドメインの細胞のみの遺伝子発現解析は困難である。これを踏まえ本研究では、翅原基を構成する大部分の上皮細胞で遺伝子変異を発現する 765 ドライバーを選択した。RT-qPCR 解析の結果、対照である 765-*gal4* ドライバーハエと比較して、765-*gal4,UAS-4-hit* (765>4-hit) ハエでは *p53* は 74%、*Med* は 60%、mRNA の発現が低下していることが分かった (図 1 2)。完全なノックダウンを示す結果とならなかったのは、今回の解析では 765>4-hit ハエの翅原基全体から mRNA を抽出しており、このために外来遺伝子を持たない正常上皮細胞を解析対象に含んでいるためと考えた。

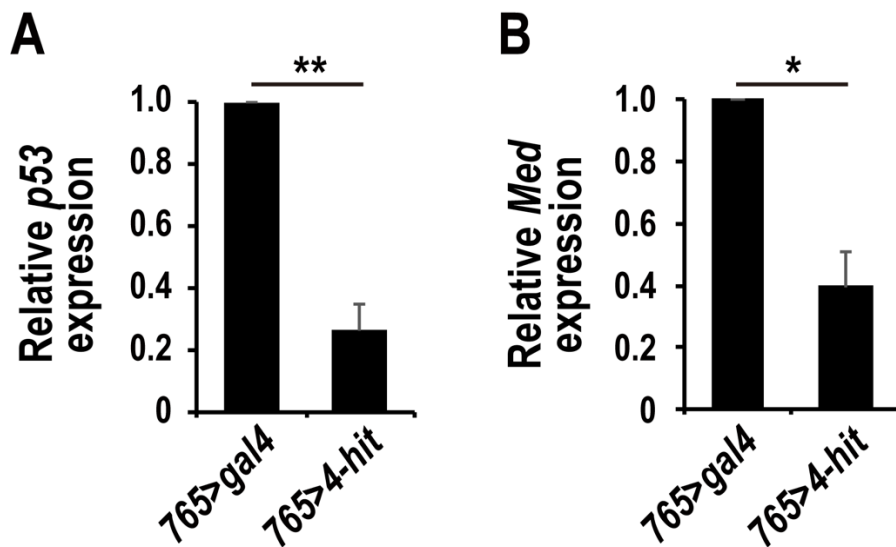


図1 2.shRNA ノックダウンによる、4-hit ハエにおける *p53* および *Med* の遺伝子発現の抑制

(A、B) 申請者は、765>*gal4* ハエ（対照）と 765>4-*hit* ハエの幼虫の翅原基より mRNA を摘出し、RT-qPCR 法で翅原基全体の *p53* (A) と *Med* (B) の発現を定量した。* $P < 0.01$ 、** $P < 0.001$ (Student *t* 検定)。

これらの結果から、4-*hit* ハエは翅原基上皮細胞の増殖能と遊走能の亢進および個体致死の表現型を示すヒト膵がんの 4-*hit* 遺伝子型を模倣するモデル動物となりうると判断し、以降の実験に使用した。

2. 4-*hit* ハエを用いた全キナーゼの網羅的な遺伝学的スクリーニング

キナーゼは生体の恒常性維持に関わる重要な酵素である。キナーゼは多くのがん種において頻繁に変異が観察され、がんの発生と進展において中心的な役割を果たすため、これまでもがんの有用な治療標的とされてきた (Knight et al, 2010)。そこで申請者は本研究で特にキナーゼに着目し、ショウジョウバエの遺伝学において主流の手法の一つである「dominant modifier screening」を活用し、膵がんの新規治療標的の探索を行った。これは、各キナーゼの遺伝子変異を有するハエと種々のモデルハエを交配することで、モデルハエにキナーゼのヘテロ接合性変異を導入し、キナーゼが個体レベルで特定の形質に与える影響を評価する方法である。この手法により、特定のキナーゼの機能抑制が全身性に起こるため、薬物投与によるキナーゼの機能抑制を模倣することが可能となる。先行研究において、このスクリーニングによって生体の発生や発がんなどの生物学的な過程において重要な遺伝子が同定されてきた。所属研究室も MTC の遺伝子型を模倣したモデルハエを用いたスクリーニングから、MTC の治療標的となるキ

ナーゼの同定に成功している (Sonoshita et al, 2018; Yamamura et al, 2021)。

本研究の遺伝学的スクリーニングにおいて、申請者は *Ser* ドライバーを活用して 4 外来遺伝子を発現させ、27℃での蛹の段階における生存率を 80-90%低下させた。これは先行研究において、形質転換表現型の発現を抑制する「サプレッサー遺伝子」と、促進する「エンハンサー遺伝子」の双方を同定するための実用的な基準となることが判明しており、本研究における *4-hit* ハエを用いたスクリーニングにおいてもこの基準を適用した (Sonoshita et al, 2018)。本研究で申請者は、ハエの全キナーゼ遺伝子の約 90%をカバーする 220 のキナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異をそれぞれ独立に *Ser>4-hit* ハエに導入した。その結果、*Dsor1* (*Downstream of raf1*、ヒト *MEK* のハエオルソログ。以下同様に記載) のヘテロ接合性変異が *4-hit* ハエの致死性をほぼ完全に救済することを見出した (図 1 3)。同様に、*Src42A* {*Src oncogene at 42A*、*FRK* (*fyn related Src family tyrosine kinase*)}、*wee* (*WEE1*)、*rok* {*Rho kinase*、*ROCK1* (*Rho associated coiled-coil containing protein kinase I*)}、*aurA* {*aurora A*、*AURKA* (*Aurora kinase A*)} のヘテロ接合性変異も *4-hit* ハエの生存率を有意に改善した (図 1 3)。すなわち、これらの遺伝子は *4-hit* ハエ表現型のサプレッサー遺伝子と言える。

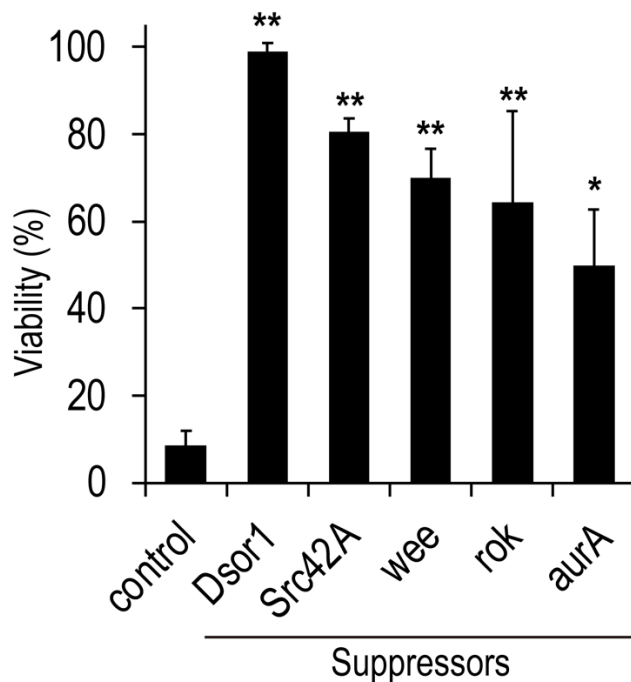


図 1 3. キナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異を導入した遺伝学的スクリーニングによるサプレッサー遺伝子の同定

Ser>4-hit ハエと各キナーゼの変異を有するハエを交配し、各キナーゼのヘテロ接合性変異を有する *4-hit* ハエの生存率を測定した。 $*P < 0.001$ (Dunnett 検定、対照との比較)。

ここで、ヘテロ接合性変異ハエがストックセンターに存在しないキナーゼ 34 種についても機能解析を実施するため、申請者はキナーゼをノックダウンする siRNA を保有するハエを活用した。これらのハエは、各キナーゼ遺伝子に対する siRNA を *UAS* 配列下に有するため、ヘテロ接合性変異のように全身性ではなく、形質転換細胞特異的にキナーゼがノックダウンされることが先のヘテロ接合性変異のスクリーニングとの重要な違いである。解析の結果、*Stlk* {*Ste20-like kinase*、*STRADA* (*STE20 related adaptor alpha*)}、*CG17528* {*DCLK1* (*doublecortin like kinase 1*)}、*CG10177* {*STK33* (*serine/threonine kinase 33*)}、*CG42366* {*CILK1* (*ciliogenesis associated kinase 1*)}、*aurB* {*aurora B*、*AURKB* (*Aurora kinase B*)} のノックダウンが *4-hit* ハエの生存率を有意に改善させることを見出し、これら 5 種もサプレッサー遺伝子であることが分かった (図 1 4)。

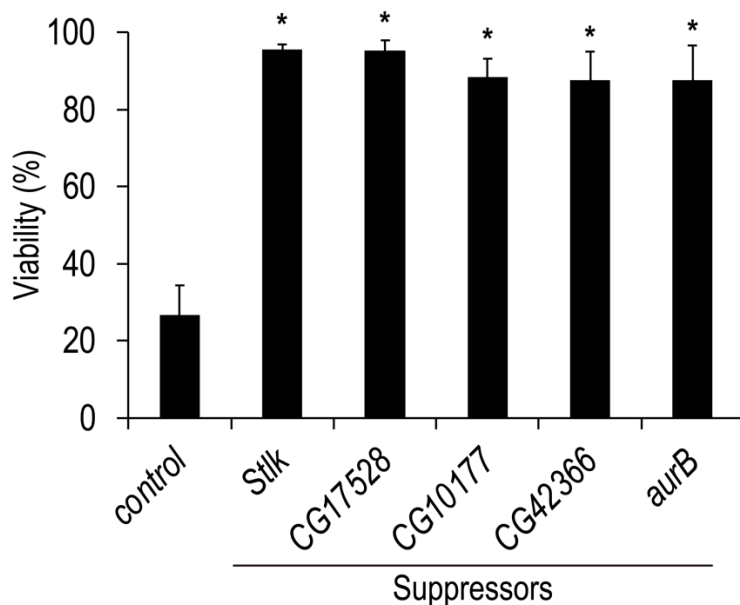


図 1 4. キナーゼ遺伝子のノックダウンを導入した遺伝学的スクリーニングによるサプレッサー遺伝子の同定

Ser>4-hit ハエと各キナーゼに対する siRNA を有するハエを交配し、各キナーゼのノックダウンを有する *4-hit* ハエの生存率を計測した。* $P < 0.001$ (Dunnett 検定、対照との比較)。

続いて申請者は、サプレッサー遺伝子の変異やノックダウンの導入による、*ptc>4-hit* ハエにおける腫瘍形質の変化を解析した。上記の生存率の改善と一致して *Dsor1* のヘテロ接合性変異や *aurB* のノックダウンは *ptc>4-hit* ハエにおける *ptc* ドメインの形態を、4 外来遺伝子非導入の *ptc>GFP* ハエにおける同ドメインの形態に近づけた (図 9、1 5)。これらの結果より、網羅的なキナーゼの遺伝学的スクリーニングが形質転換に重要な影響を及ぼす遺伝子群の個体レベルでの同定に有用であることを見出した。

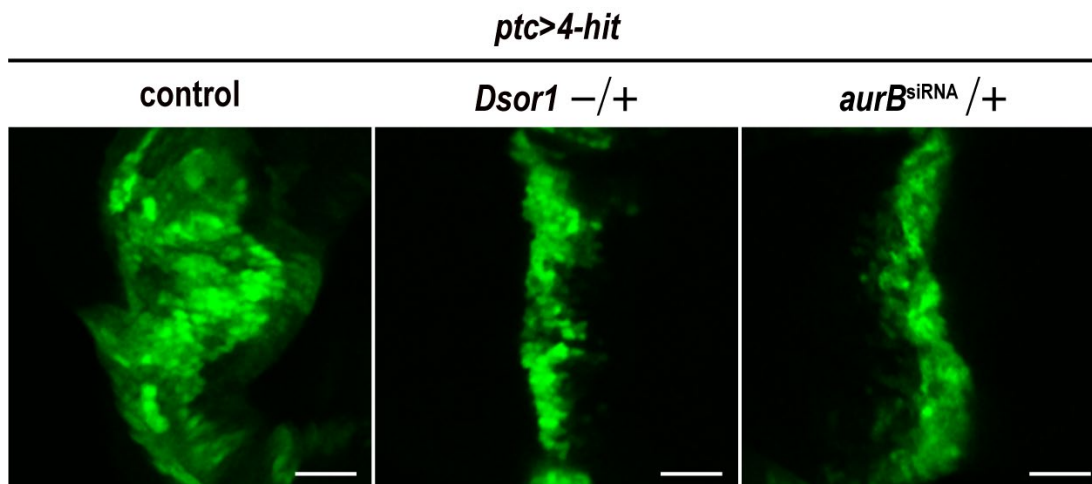


図 1 5. 各キナーゼの機能抑制による *ptc* ドメインの形態異常の救済

ptc>4-hit ハエ（対照）に *Dsor1* のヘテロ接合性変異や *aurB* のノックダウンを導入し、翅原基の *ptc* ドメインの形態変化を解析した。スケールバーは 20 μ m を示す。

3. *4-hit* ハエを用いたキナーゼ阻害剤のスクリーニング

上記の結果を踏まえ申請者は、先の遺伝学的スクリーニングにおいてサプレッサー遺伝子として同定したキナーゼに対する阻害剤は、キナーゼ機能抑制によって *4-hit* ハエの生存率を改善する可能性があるかと推察した。そこで、同定したキナーゼに対する阻害剤を *4-hit* ハエに単剤あるいは組み合わせて経口投与することで、*4-hit* ハエの生存率を改善する化合物の探索を行った。まず、ヘテロ接合性変異のスクリーニングで *4-hit* ハエの生存率改善効果が最も大きかった *Dsor1* (MEK) に着目し、MEK を阻害する入手可能な全ての化合物 26 種のスクリーニングを行った。これに先立ち申請者は、非遺伝子組換えハエを用いて各化合物の MTD 試験を実施し、ハエの生存率に影響を与えない各化合物の MTD を決定した（図 1 6）。

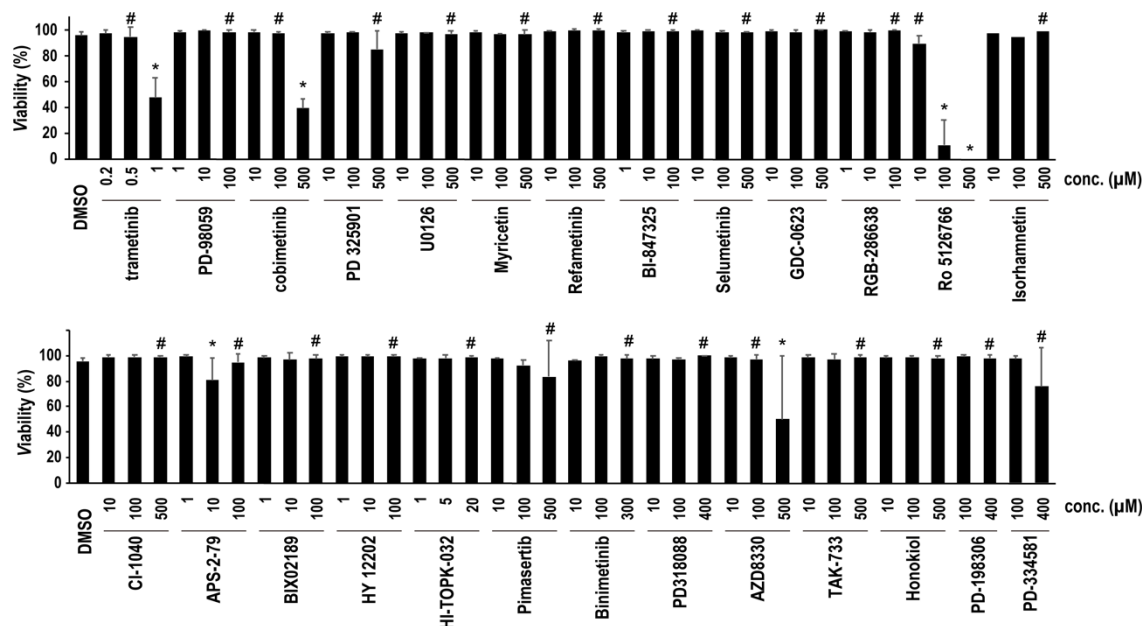


図 16. MEK 阻害剤 26 種の MTD の決定

各化合物の投与濃度を溶解度に応じて設定し、餌に混ぜて *w* に経口投与することで、生存率を測定した。ここで、生存率に影響が出ない最高濃度 (#) を各化合物の MTD と定めた。conc、化合物濃度。* $P < 0.001$ (Dunnett 検定、対照との比較)。

次に、申請者は MTD を最大濃度として各化合物の 2 濃度を定め、これらを *Ser>4-hit* ハエにそれぞれ経口投与した。ここでは、化合物の生存率改善の効果を明瞭化するため、化合物を摂取しない *4-hit* ハエの生存率がほぼ 0% となる 22℃ で化合物スクリーニングを実施した。その結果、trametinib (1 μM)、PD-334581 (100, 300 μM)、TAK-733 (500 μM)、AZD8330 (300 μM) が対照と比較して有意に *Ser>4-hit* ハエの生存率を改善することが分かった (図 17)。

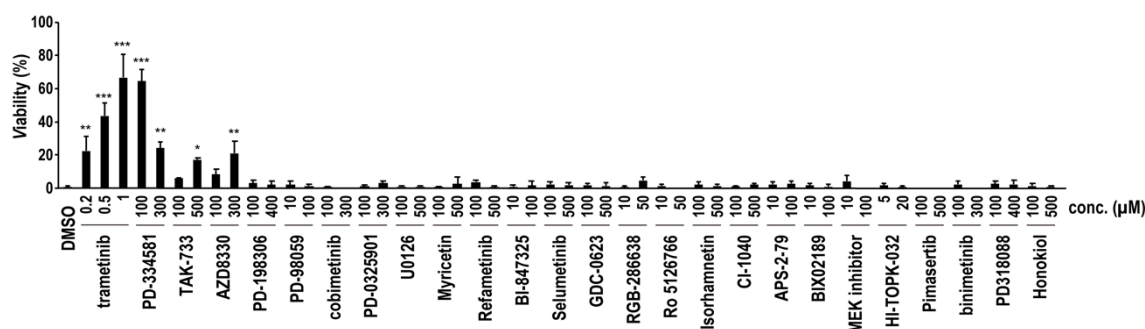


図 1 7. 3 種の MEK 阻害剤による *4-hit* ハエ生存率の改善

MEK 阻害剤 26 種を各々餌に混入して *Ser>4-hit* ハエに経口投与し、生存率を測定した。conc、化合物濃度。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ (Dunnett 検定、対照との比較)。

この結果から申請者は、最も生存率改善の効果が高かった trametinib に着目した。trametinib は dabrafenib との併用で *BRAF* 遺伝子変異を有する悪性黒色腫と非小細胞性肺癌に保険適応のある MEK 阻害薬である (Flaherty et al, 2012; Planchard et al, 2016)。KRAS 変異を有する膵がん患者への臨床研究も実施されたが、膵がんの標準治療薬である gemcitabine との併用において、trametinib の上乘せ効果は認められなかった (Infante et al, 2014)。そこで申請者は、trametinib と併用することで *4-hit* ハエの生存率をより効果的に改善する化合物を探索した。

申請者は、上記の遺伝学的スクリーニングにおいてサプレッサー遺伝子として同定したキナーゼに対する阻害剤を trametinib と組み合わせることで、各々の単独処置よりも高い効果を得ることができるとの仮説を立てた。特に、ヘテロ接合性変異の遺伝学的スクリーニングにおいて *aurA* を、また siRNA によるノックダウンのスクリーニングにおいては *aurB* をそれぞれサプレッサー遺伝子として同定したことから、Aurora kinase (AURK) の阻害剤に着目した。なお、AURK はハエの研究で見つかった遺伝子であり、ヒトには *AURKA*、*AURKB*、*aurora kinase C* (*AURKC*) の 3 つのオルソログが存在し、*AURKA* は *aurA* の、また *AURKB* は *aurB* のオルソログに対応するが、*AURKC* のハエオルソログは存在しない (Glover et al, 1995)。

本解析において申請者は、これら 3 つのオルソログのいずれか、もしくは複数に阻害効果を有する入手可能な全ての化合物 28 種を trametinib と組み合わせて *Ser>4-hit* ハエに経口投与した。その結果、BI-831266 (200 μM)、MK-8745 (500 μM)、ZM-447439 (100 μM) が trametinib との併用で、trametinib 単剤と比較して有意に生存率を改善した (図 1 8)。

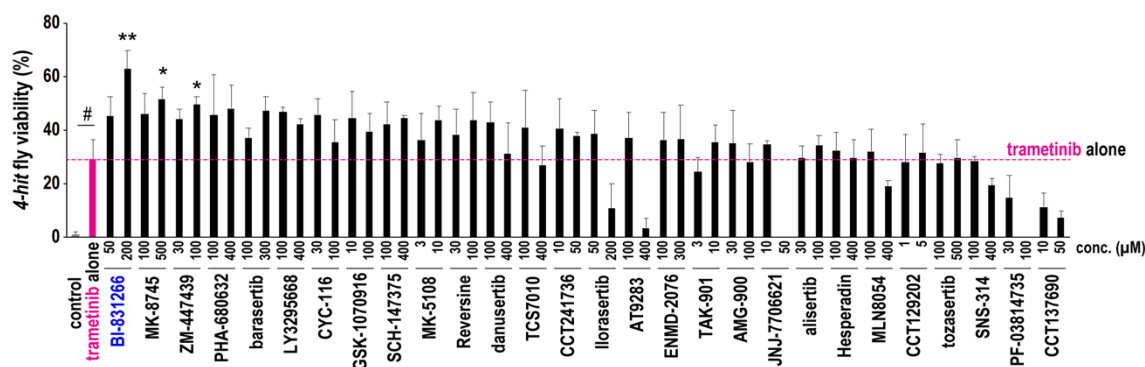


図 1 8. trametinib と組み合わせた 3 種の AURK 阻害剤による 4-hit ハエ生存率の改善

0.5 μM の trametinib と AURK 阻害剤 28 種を各々組み合わせて *Ser>4-hit* ハエに経口投与した。図中でマゼンタの破線は trametinib 単剤での生存率を示す。conc、化合物濃度。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Dunnett 検定、trametinib 単剤との比較)、# $P < 0.05$ (Student *t* 検定、対照と trametinib 単剤との比較)。

ここで申請者は、最も生存率を改善した組み合わせである trametinib と BI-831266 に着目した。BI-831266 は AURK の中でも特に AURKB に対して選択性が高い阻害剤で、第一相試験で安全性と抗腫瘍効果が認められたが、新たな化合物の開発を理由に臨床応用が終了していた (Dittrich et al, 2015)。二剤の効果の解析にあたり申請者は、組み合わせ効果が頭打ちとならないよう、飼育温度を 23.5 °C に上げて温度依存性に活性が向上する性質を持つ酵母由来の転写因子 GAL4 の活性を高め (図 8)、4 外来遺伝子の発現を強めることで *Ser>4-hit* ハエの生存率を低下させた。この解析の結果、二剤の生存率改善効果がそれぞれの濃度依存的に向上するとともに、両者の併用の効果が相乗的であることを見出した (図 1 9)。

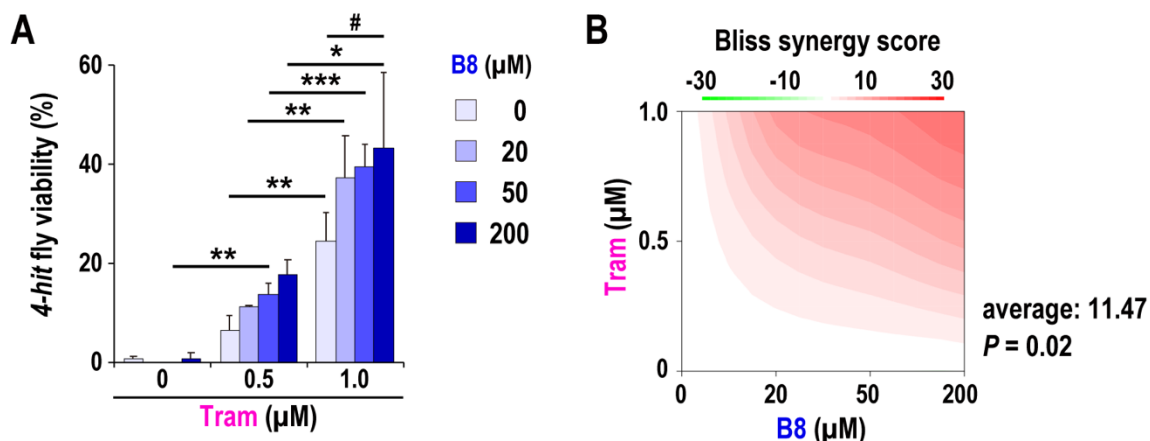


図 19. trametinib と BI-831266 の組み合わせによる *4-hit* ハエ生存率の相乗的な改善

(A) 23.5℃で *Ser>4-hit* ハエに trametinib (Tram : 0, 0.5, 1 μM) と BI-831266 (B8 : 0, 20, 50, 200 μM) を経口投与した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定、BI-831266 の濃度を一定とした際の trametinib の上乗せ効果)、 $\#P < 0.05$ (Dunnett 検定、trametinib 単剤と比較した BI-831266 の上乗せ効果)。(B) この組み合わせ投与の効果を SynergyFinder で統計解析した。各濃度の組み合わせにおいて、赤が相乗的、白が相加的、緑が相反的であることを示す。マップ全体の Bliss synergy score の平均値と P 値も同ソフトで算出した。

次に申請者は、*4-hit* ハエ成虫の腫瘍形質に対する、trametinib と BI-831266 の併用の効果を解析した。先の化合物スクリーニングは飼育温度を 22 または 23.5℃で実施したが、この範囲の温度では化合物を摂取しない *Ser>4-hit* ハエの生存率はほぼ 0%であったため、成虫の羽の採材が困難であった。そこで、飼育温度を 16℃まで下げることで導入した外来遺伝子の発現を低下させ、化合物を投与していない *4-hit* ハエが羽化できるよう条件を調整した。その結果、*4-hit* ハエ成虫の羽が縮小し、一部に嚢胞様の構造が出現することを見出した (図 20)。また、BI-831266 単剤処置ではこの形態に大きな変化を与えなかったが、trametinib 単剤処置はこの形態異常を一部改善した。さらに二剤の併用は、*4-hit* ハエの羽の形態を野生型ハエの羽に近い形態に戻した (図 20)。

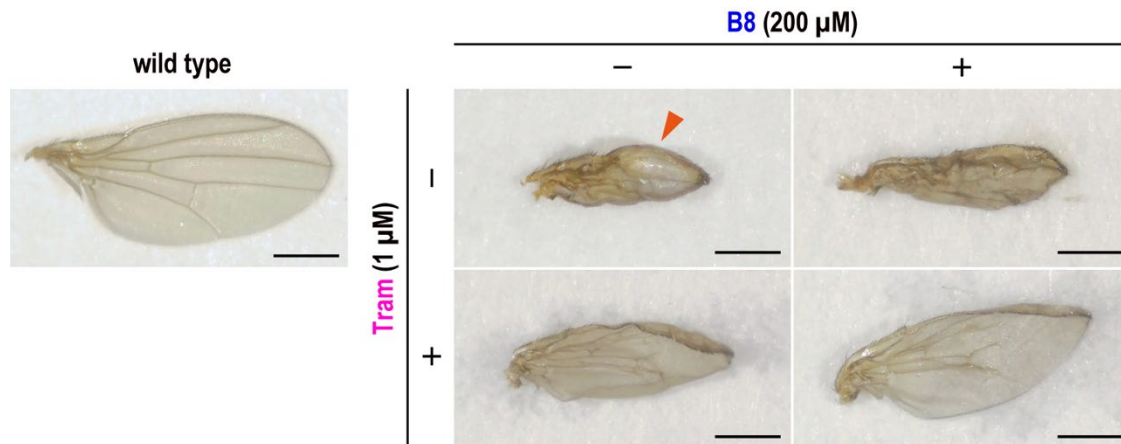


図 20. trametinib と BI-831266 の組み合わせ投与による *4-hit* ハエ成虫の羽の形態異常の救済

16℃で *Ser>4-hit* ハエに 1 μM の trametinib と 200 μM の BI-831266 を単剤または組み合わせて経口投与し、それぞれの成虫の羽を解析した。矢頭は嚢胞様の構造を示す。スケールバーは 500 μm を示す。

次に申請者は、AURKB 以外に遺伝学的スクリーニングでサプレッサー遺伝子として同定したキナーゼ（サプレッサーキナーゼ）に対する阻害剤も trametinib の効果を高めるか検討した。まず、ヘテロ接合性変異の遺伝学的スクリーニングで同定した *FRK*、*WEE1*、*ROCK1* のそれぞれに対する阻害剤である AD80、adavosertib、Y-27632 は、単剤で *4-hit* ハエの生存率を改善しなかった。一方で、trametinib とそれぞれの阻害剤を組み合わせる投与により、trametinib 単剤と比較していずれのキナーゼ阻害剤も有意に *4-hit* ハエの生存率を改善した（図 21）。これらの結果から、遺伝学的スクリーニングと化合物スクリーニングで同定したサプレッサーキナーゼの阻害剤の組み合わせ投与は、*4-hit* ハエの生存率と羽の形態異常を改善することを見出した。

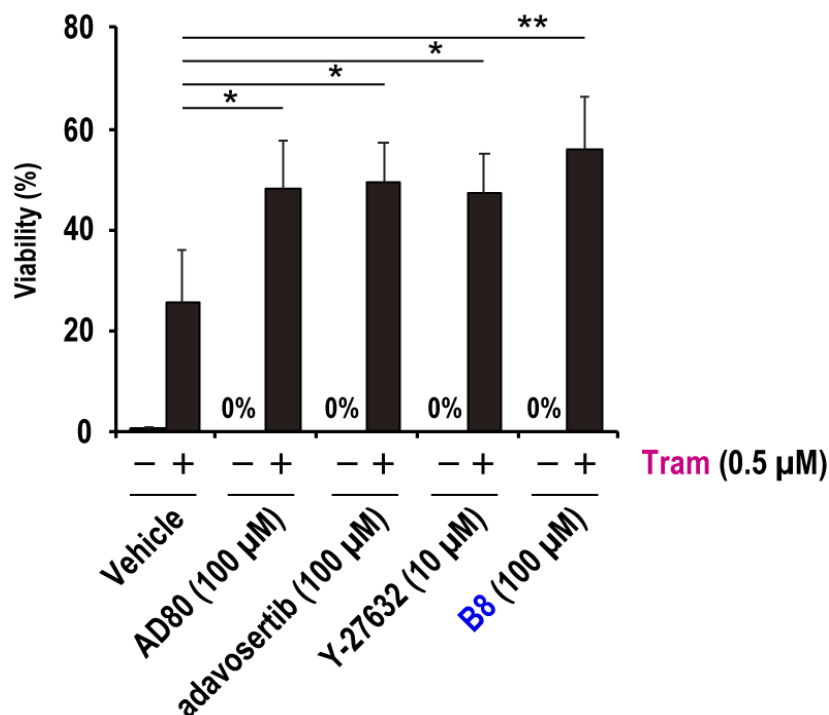


図 2 1. trametinib とサプレッサーキナーゼの阻害剤の組み合わせ投与による 4-hit ハエ生存率の改善

FRK 阻害剤 AD80、WEE1 阻害剤 adavosertib、ROCK1 阻害剤 Y-27632、もしくは AURKB 阻害剤 BI-831266 を、0.5 μM の trametinib と組み合わせて *Ser>4-hit* ハエに経口投与した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Dunnett 検定)。

4. AURKB と膵がん患者の予後の相関

上記の 4-hit ハエを用いた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、申請者は trametinib と BI-831266 の組み合わせを膵がんの新規治療法の候補として同定した。次に、この二剤の組み合わせ療法の哺乳類における抗腫瘍効果や作用機序の解析を実施した。本研究で申請者が着目した AURK の 3 つのオルソログのうちの 1 つである AURKB は、細胞周期の M 期に発現量が増加し、その基質である HH3 の 10 番目のセリン残基のリン酸化を介して染色体の形成や分配、細胞質分裂などを制御するセリンスレオニンキナーゼである (Wei et al, 1999; Hsu et al, 2000)。AURKB は、肝細胞がんや非小細胞性肺がん、口腔がんにおいて腫瘍組織内における発現の増加と患者予後不良の関連が報告され (Qi et al, 2007; Lin et al, 2010; Yu et al, 2018)、膵がん組織においても正常膵組織と比較して発現が高いことが知られている (図 2 2)。しかし、AURKB の活性と膵がん患者の予後の関連性は不明であったため、まず申請者は患者検体を用いて AURKB の活性と膵がん患者の予後との相関を解析した。

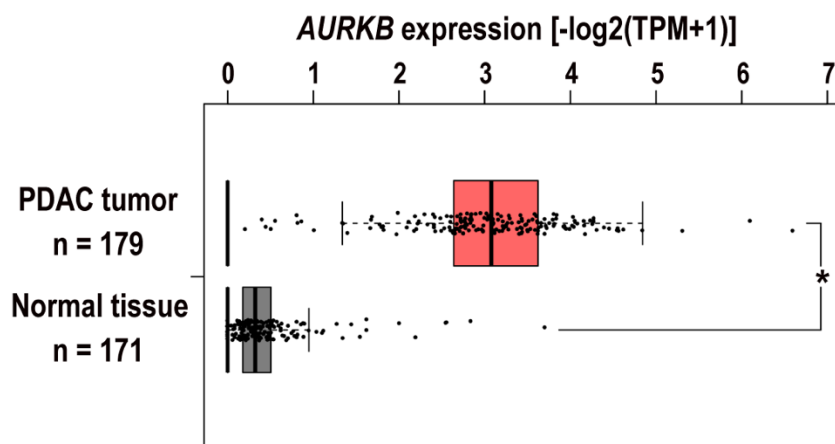


図 2 2. 正常膵組織と比較しての膵がん組織中の *AURKB* の発現量の増加

正常膵組織と比較し膵がん組織で有意に *AURKB* の mRNA の発現量が高かった。RNA シークエンスのデータは The Cancer Genome Atlas と Genotype-Tissue Expression のデータベースを用い、GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) を利用しグラフを作製した。* $P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定)。

申請者は、2000 年からの 10 年間に北海道大学病院で切除された 86 症例 (表 5) の病理組織から作製された TMA を使用し、*AURKB* の活性化によって生じる pHH3 に対する抗体を用いて IHC を実施し、*AURKB* の活性を評価した。

表 5. 対象患者の臨床病理学的背景

本研究で検討した 86 症例の性別、年齢、TNM (tumor、node、metastasis) 分類 {Union for International Cancer Control (UICC) 第 8 版}、組織分化度を示す。それぞれの項目は症例数 (括弧内は百分率)、*は中央値 (括弧内は四分位) を示す。

	症例数 (n = 86)
性別	
男性	52 (60.5%)
女性	34 (39.5%)
年齢	67.5 (60-73)*
pT (腫瘍サイズ)	
1/ 2/ 3/ 4	13/ 48/ 24/ 1
1+2	61 (70.9%)
3+4	25 (29.1%)
pN (領域リンパ節転移)	
0/ 1/ 2	23/ 35/ 28
陰性	23 (26.7%)
陽性	63 (73.3%)
pM (遠隔転移)	
陰性	79 (91.9%)
陽性	7 (8.1%)
病理学的病期分類	
IA/ IB/ IIA/ IIB/ III/ IV	9/ 8/ 5/ 32/ 26/ 6
IA-IIB	54 (62.8%)
III-IV	32 (37.2%)
組織分化度	
高分化-中分化	77 (89.5%)
低分化またはその他	9 (10.5%)

申請者は、TMA 検体の各コア内の全腫瘍細胞に対する pHH3 陽性細胞の割合を計測し、pHH3 陽性群 70 例と陰性群 16 例との間で臨床病理学的背景と生存率を比較した。2 群間では、年齢、性別、TNM 分類、組織分化度に有意差を認めなかった (表 6)。

表 6. pHH3 陽性群と陰性群の臨床病理学的背景の比較

8 6 症例を pHH3 陽性群（7 0 症例）と陰性群（1 6 症例）に分類し、2 群間の性別、年齢、TNM 分類（UICC 第 8 版）、組織分化度を比較した。各項目は症例数（括弧内は百分率）を示す。*：中央値（括弧内は四分位）。*P* 値はカイ 2 乗検定または Fisher の直接検定で算出し、年齢の比較は Wilcoxon 検定（**）を実施した。

	pHH3		
	陽性群 (n = 70)	陰性群 (n = 16)	
年齢			
	67.5 (60-73)*	67 (56.5-73.3)*	<i>P</i> = 0.48**
性別			
男性	41 (58.6%)	11 (68.8%)	<i>P</i> = 0.45
女性	29 (39.5%)	5 (31.5%)	
pT			
1+2	50 (71.4%)	11 (68.8%)	<i>P</i> = 0.83
3+4	20 (28.6%)	5 (31.5%)	
pN			
negative	19 (27.1%)	4 (25.0%)	<i>P</i> = 0.86
positive	51 (72.9%)	12 (75.0%)	
pM			
negative	64 (91.4%)	15 (93.7%)	<i>P</i> = 1.00
positive	6 (8.6%)	1 (6.3%)	
pStage			
IA-IIIB	46 (65.7%)	8 (50.0%)	<i>P</i> = 0.24
III-IV	24 (34.3%)	8 (50.0%)	
組織分化度			
高分化-中分化	64 (91.4%)	13 (81.2%)	<i>P</i> = 0.36
低分化またはその他	6 (8.6%)	3 (18.8%)	

pHH3 陽性群と pHH3 陰性群の膵がん病理切片の代表的な写真を図 2 3 に示す。抗 pHH3 抗体は細胞分裂期の凝集染色体を標識した。

PDAC patient specimens

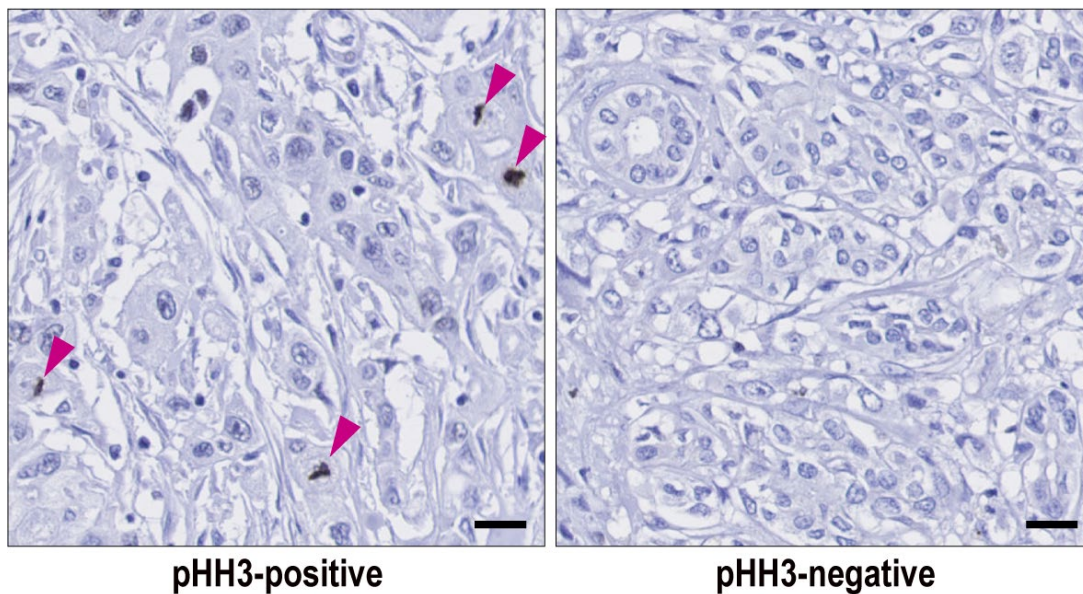


図 2 3. pHH3 陽性群における染色体に一致した pHH3 の標識

陽性群において、抗 pHH3 抗体は腫瘍細胞の核内の凝集染色体を標識した（矢頭）。スケールバーは 20 μm を示す。

次に申請者は、pHH3 陽性群と陰性群の全生存期間と無再発生存期間を比較した（図 2 4）。OS については、陽性群の 5 年生存率は 9.6%、陰性群は 31.3%で、陽性群の OS が陰性群よりも有意に短かった（ $P=0.021$; Log-rank 検定）。一方、陽性群の 5 年 RFS は 12.3%、陰性群は 26.9%で、陽性群の RFS が陰性群よりも短い傾向にあるものの、有意差は無かった（ $P=0.32$; Log-rank 検定）。

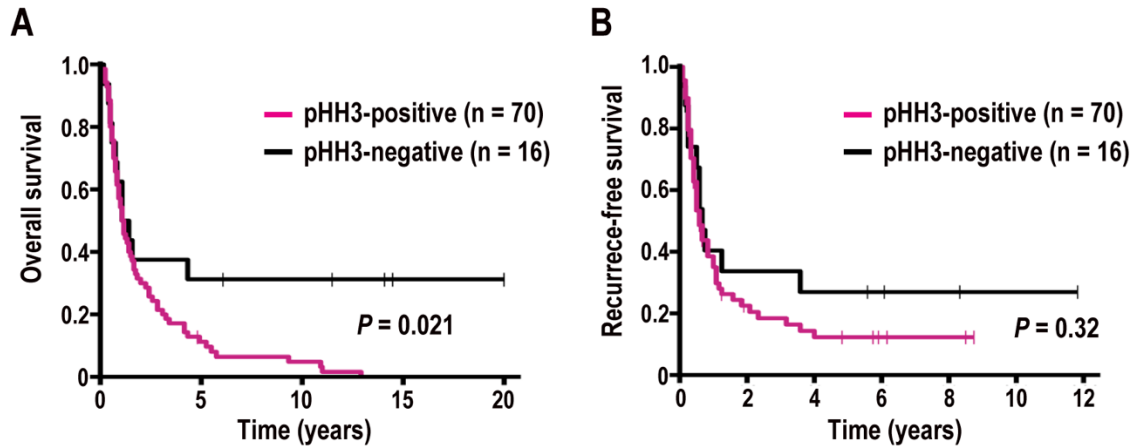


図 2 4 . pHH3 陰性群と比較しての陽性群の全生存期間および無再発生存期間の短縮

pHH3 陽性群と陰性群における (A) OS および (B) RFS の Kaplan-Meier 曲線を作製した。P 値は Log-rank 検定で算出した。

なお、*AURKB* は細胞周期に関わる遺伝子であるため、*AURKB* の活性化は膀胱がん腫瘍細胞の増殖亢進を介して予後不良と関わっている可能性がある。そのため、同 TMA を用いて細胞増殖のマーカーである Ki-67 の免疫組織化学染色 (IHC) を実施し、pHH3 と同様に陽性細胞の割合をスコア化して、Ki-67 が交絡因子となりうるか検討した。Ki-67 陽性群ならびに陰性群の代表写真を図 2 5 に示す。

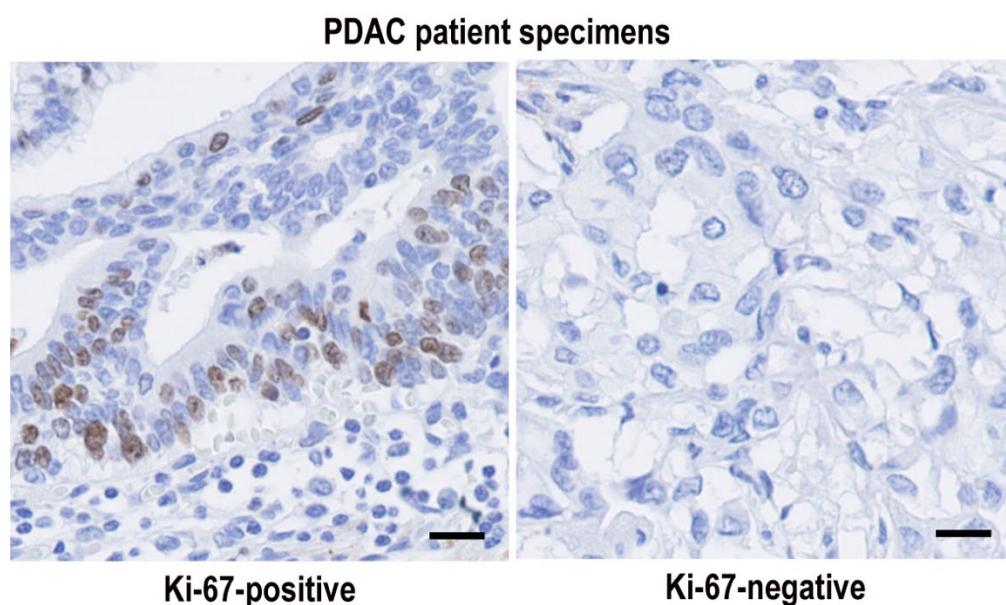


図 2 5 . Ki-67 陽性群における、核内の Ki-67 の検出

陽性群において抗 Ki-67 抗体は腫瘍細胞の核を標識した。スケールバーは 20 μm を示す。

申請者が予想した通り、Ki-67 陽性細胞の割合が高いほど膵がん患者の OS と RFS が不良となり（表 7 model 1）、この結果は年齢と性別で調整しても変わらなかった（表 7 model 2）。これらの結果より申請者は、膵がん細胞の高い増殖活性が膵がん患者の予後不良と関連することを見出した。

表 7 . Ki-67 陽性細胞の割合と膵がん予後の関連

Model 1 : Ki-67 陽性細胞の割合と OS および RFS の関連を、患者因子による調整をせずに解析した。

Model 2 : Ki-67 陽性細胞の割合と OS および RFS の関連を、患者の年齢と性別による調整を実施し解析した。

ハザード比（hazard ratio : HR）と 95%信頼区間（confidence interval : CI）、 P 値は Cox 比例ハザードモデルで算出した。

	model	OS (months)			RFS (months)		
		HR	(95% CI)	P -value	HR	(95% CI)	P -value
Ki-67	1	1.05	(1.00 - 1.10)	0.042	1.05	(1.00 - 1.10)	0.042
	2	1.07	(1.01 - 1.13)	0.013	1.07	(1.01 - 1.13)	0.013

続いて申請者は、先に検討した pHH3 と膵がん患者予後の関連について、年齢、性別、および Ki-67 スコアで調整した上で再解析を実施した。その結果、患者因子での調整を行わない解析（表 8 model 1）、患者の年齢と性別を調整した解析（表 8 model 2）、患者の年齢と性別および Ki-67 陽性細胞の割合で調整した解析（表 8 model 3）のいずれにおいても、有意差はないものの pHH3 陽性群で膵がん患者の OS が悪化する傾向は変わらなかった。RFS についても先の検討と同様に、pHH3 との有意な相関を認めなかった。これより、AURKB の活性化が Ki-67 で示した細胞増殖率と独立して膵がん患者の予後不良に関わることが分かった。

表 8. 細胞増殖率と独立した pHH3 と膵がん患者予後不良との関連

Model 1 : pHH3 と患者 OS の関連を患者因子での調整をせずに解析した。

Model 2 : pHH3 と患者 OS の関連を患者の年齢と性別で調整して解析した。

Model 3 : pHH3 と患者 OS の関連を患者の年齢と性別および Ki-67 陽性細胞の割合で調整して解析した。

HR と 95% CI、P 値は Cox 比例ハザードモデルで算出した。

	model	OS (months)			RFS (months)		
		HR	(95% CI)	P-value	HR	(95% CI)	P-value
pHH3	1	2.12	(1.10 - 4.08)	0.026	1.38	(0.72 - 2.66)	0.331
	2	2.16	(1.12 - 4.19)	0.022	1.36	(0.71 - 2.61)	0.360
	3	1.87	(0.95 - 3.69)	0.069	1.18	(0.61 - 2.30)	0.623

5. 異種移植モデルマウスを用いた trametinib と BI-831266 組み合わせ投与の検討

先の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、申請者は trametinib と BI-831266 の組み合わせが 4-hit ハエの生存率を改善することを見出した。そこで、異種移植モデルマウスにおける二剤組み合わせ投与の抗腫瘍効果を検討した。

まず、trametinib と BI-831266 のヌードマウス (BALB/c-nu/nu) への投与量を設定するために、trametinib と BI-831266 をそれぞれ単剤でヌードマウスに経口投与し、2～3 日間の経過観察の後に投与量を漸増する MTD 試験を行った。その結果、trametinib は溶解度の上限となる 20 mg/kg/日まで、BI-831266 も実験の最大濃度に設定した 100 mg/kg/日までの投与において、マウスに体重減少（図 2 6）や異常行動、血便などの副作用を引き起こさないことが分かった。

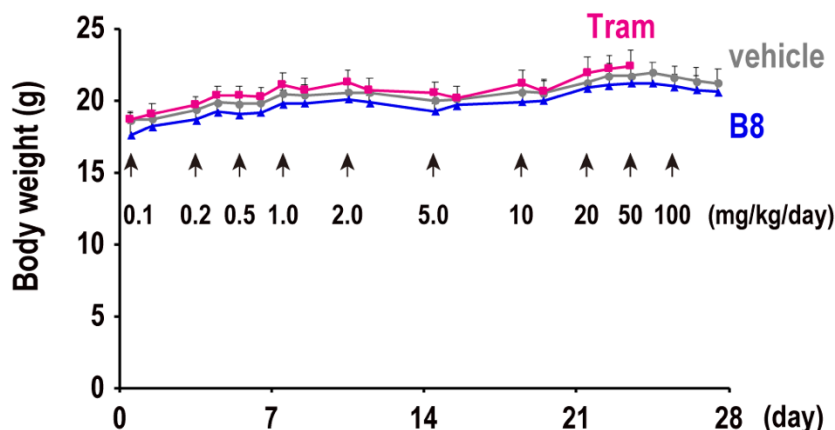


図 2 6. ノードマウスにおける trametinib と BI-831266 の MTD 試験

6 週齢の雌のノードマウスに 0.1 mg/kg/日の trametinib と BI-831266 を経口投与し、2～3 日間の経過観察で副作用が出ないことを確認後、投与量を漸増した。矢印は各化合物投与のタイミングを示す。vehicle、溶媒のみの投与。Tram、trametinib。B8、BI-831266。

trametinib はマウスにおける薬物動態試験の結果が既に公表されている (Center for Drug Evaluation and Research、MEKINIST® (trametinib) tablets, for oral use)。既報でマウス実験における trametinib の経口投与量は 0.3-1.0 mg/kg/日であり (Kawaguchi et al, 2017; Kinsey et al, 2019)、また、本研究において同定した MTD が 20 mg/kg/日であることから、1 mg/kg/日の投与は十分に忍容性があると判断し、これを本解析における移植モデルマウスへの trametinib の投与量とした。一方で BI-831266 は薬物動態が解明されていないため、BI-831266 の薬物動態試験を実施した。既報を参考に BI-831266 の投与量を 10 mg/kg/日に設定し (Sini et al, 2016)、ICR マウスに経口で単回投与して 24 時間以内に 8 回 BI-831266 の血中濃度を測定した。測定値から算出した BI-831266 の最高血中濃度は 296 nM で、この濃度は後述する培養ヒト膵がん細胞の実験において効果を有する濃度の範囲内であったため、マウスへの投与量を 10 mg/kg/日に設定した (図 2 7)。

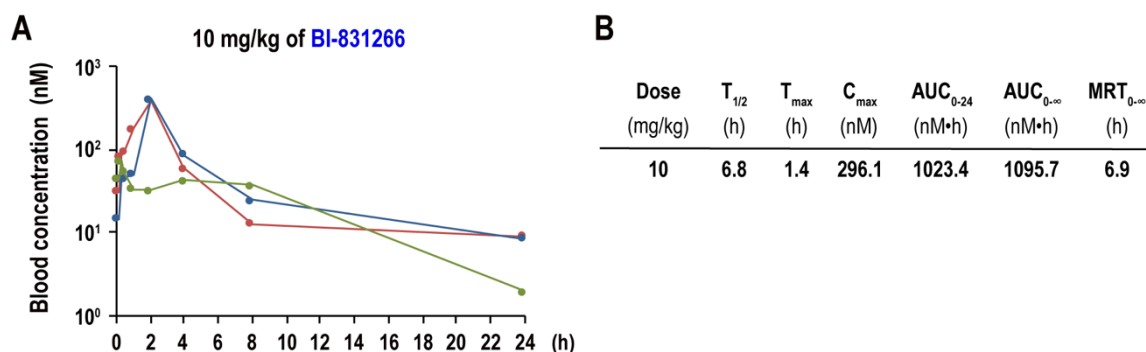


図 2 7. BI-831266 の経口投与の薬物動態試験

(A) 3 匹の ICR マウスに 10 mg/kg の BI-831266 を単回経口投与し、24 時間以内に 8 回血中濃度を測定した。各線はマウス 1 個体を示す。(B) 3 匹の平均値から算出した薬物動態試験の各種パラメーターを示す。 $T_{1/2}$ は半減期、 T_{max} は最大血中濃度到達時間、 C_{max} は最高血中濃度、 AUC_{0-24} は投与 24 時間後までの血中濃度時間曲線下面積、 $AUC_{0-\infty}$ は無限時間までの血中濃度時間曲線下面積、 $MRT_{0-\infty}$ は無限時間までの平均滞留時間を示す。

次に申請者は、培養ヒト膵がん細胞の MIA PaCa-2 の皮下移植腫瘍を有するマウスに trametinib と BI-831266 を単剤、もしくは組み合わせて 4 週間経口投与した。その結果、投与開始後 3 週間の時点で両者が単剤でも対照と比較して腫瘍体積の増大を抑制し、二剤の併用が単剤と比較して有意に高い抗腫瘍効果を示すことが分かった (図 2 8 A)。さらに申請者は、二剤併用群の 1 匹が完全寛解を、4 匹が部分寛解を達成したことを見出した (図 2 8 B)。なお、今回の検討で、4 週間の投与実験において投与開始 3 週時点で腫瘍体積の解析を行なった。これは、3 週目以降に 2 cm 以上となった腫瘍をもつマウスが対照群に 2 匹出現し、投与実験の継続が困難になったためである。以上の結果は異種移植モデルマウスにおいて trametinib と BI-831266 の組み合わせ投与が各化合物単剤の投与と比較して有意に高い抗腫瘍効果を有することを示している。

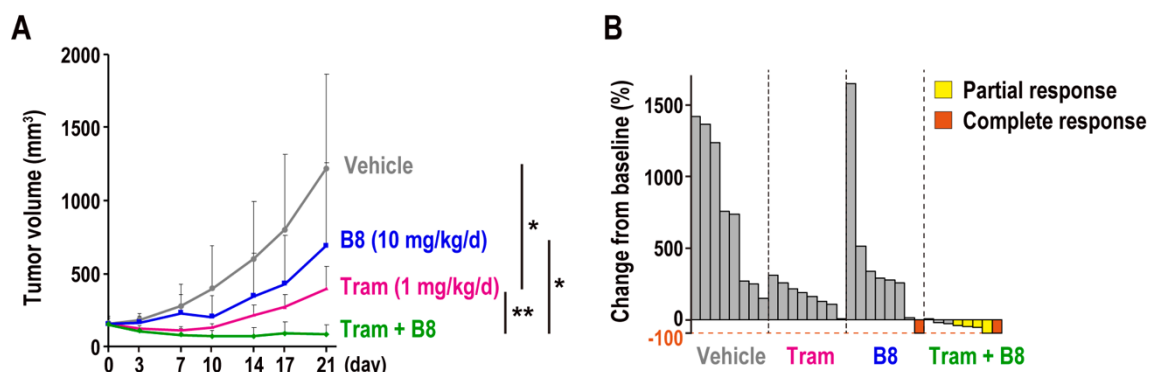


図 28. trametinib と BI-831266 の経口投与による MIA PaCa-2 皮下腫瘍の成長の抑制

(A) 各群 8 匹の雌のヌードマウスに MIA PaCa-2 を皮下移植し、trametinib と BI-831266 を単剤または組み合わせて投与した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ (Mann–Whitney U 検定)。(B) 化合物投与開始時の腫瘍体積を基準とし、3 週間時点での腫瘍体積の増加率を Waterfall plot で示した。各縦棒はマウス 1 個体の腫瘍体積増加率を表す。橙色は完全寛解を、黄色は部分寛解を示す {Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 分類} (Eisenhauer et al, 2009)。

投与期間中、trametinib と BI-831266 併用群のマウスの平均体重が一過性に減少したものの、4 週間の投与終了時点では対照群との間に有意な差を認めなかった (図 29)。この結果は、本実験で使用した投与量において、trametinib と BI-831266 に忍容性があることを示している。

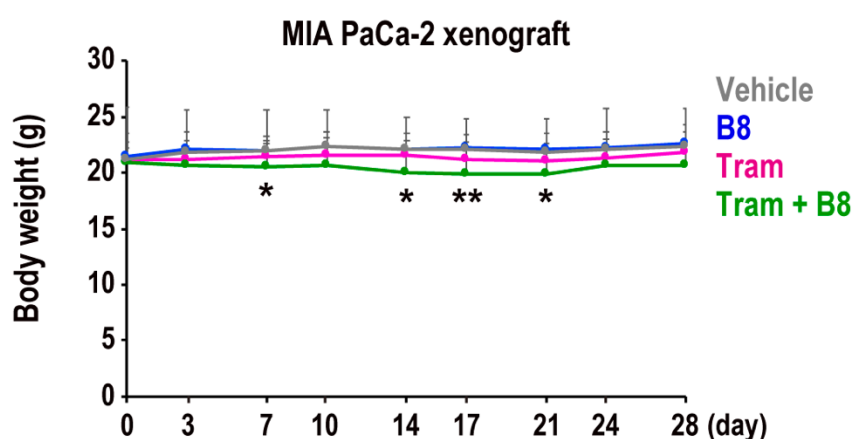


図 29. trametinib と BI-831266 の経口投与時の体重の経時変化

trametinib と BI-831266 の投与実験における、各群のマウスの平均体重の変化を示す。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ (Dunnett 検定、対照との比較)。

この異種異所性移植モデルは、使用した MIA PaCa-2 細胞は *SMAD4* が野生型である *3-hit* の遺伝子変異プロファイルを有する点、また同所性移植モデルと比較して異所性移植モデルは臓器特異的な微小環境や薬物の組織移行性の面で臨床の膵がんとは異なる点が問題となる。そのため、スクリーニングに使用したハエと同じ *4-hit* の変異プロファイルを有するヒト膵がん細胞 AsPC-1 を同所性に移植したモデルを作出・使用して trametinib と BI-831266 の抗腫瘍効果を解析した。ここでは、AsPC-1 にルシフェラーゼ遺伝子を導入して作製した AsPC-1-Luc をヌードマウスの膵臓に移植し、trametinib や BI-831266 を経口投与して抗腫瘍効果を解析した。その結果、4 週間の投与期間内の解析においては trametinib か BI-831266 の単剤投与群、または両者組み合わせ投与群のいずれの群も対照と比較して有意な腫瘍発光強度の抑制効果を確認できなかった（それぞれ $P=0.13$ 、 $P=0.81$ 、 $P=0.23$; Mann-Whitney U 検定、図 3 0 A）。一方、腫瘍重量の解析において、trametinib の単剤投与が対照や BI-831266 単剤投与と比較して、また両者の組み合わせ投与が BI-831266 の単剤投与と比較して有意に腫瘍の成長を抑制したが、組み合わせ投与は trametinib の単剤投与と比較して有意な抗腫瘍効果を確認できなかった（それぞれ $P=0.045$ 、 $P=0.031$ 、 $P=0.045$ 、 $P=0.94$; Mann-Whitney U 検定、図 3 0 B）。

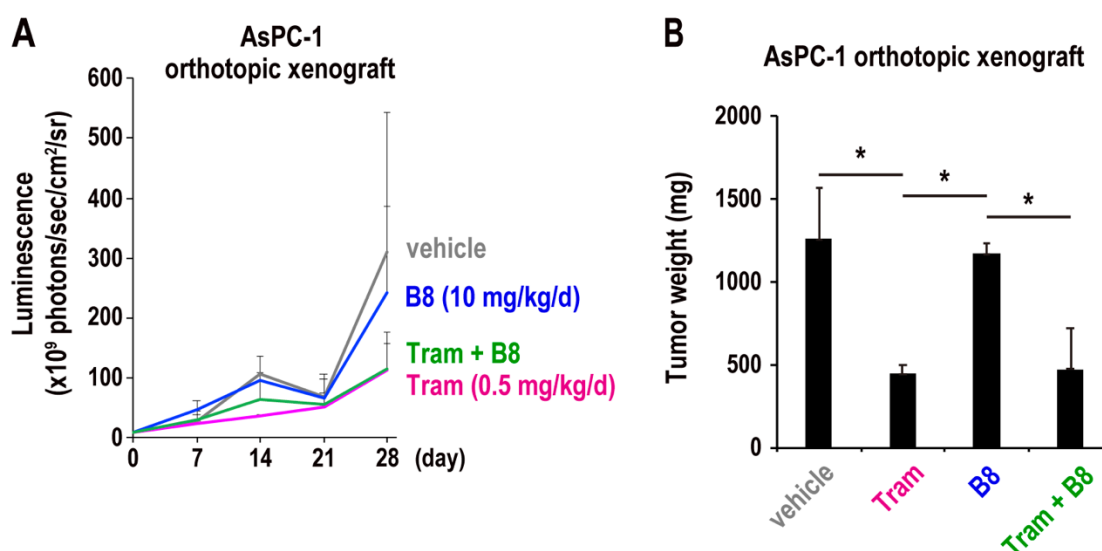


図 3 0. trametinib 単剤または trametinib と BI-831266 の併用による AsPC-1 同所性移植腫瘍の成長の抑制

(A) 各群 6 匹の雌のヌードマウスの膵臓に AsPC-1-Luc を移植し、14 日後から trametinib と BI-831266 を単剤または組み合わせて投与して 4 週目まで週 1 回腫瘍発光強度を測定した。(B) 申請者は、4 週目に各群から腫瘍を摘出してそ

これらの重量を測定した。 $*P < 0.05$ (Mann–Whitney U 検定)。

ここで申請者は、AsPC-1-Luc 腫瘍に対する trametinib と BI-831266 の併用療法の抗腫瘍効果が不十分であったため、trametinib と BI-831266 がそれぞれの標的に作用しているか検討すべく、腫瘍検体の IHC を実施した。その結果、trametinib が pERK の発現を抑制した一方で、BI-831266 は pHH3 の発現を抑制していないことを見出した (図 3 1)。この結果から、AsPC-1 の同所性移植モデルにおいて BI-831266 が抗腫瘍効果を有さなかった原因は、標的である AURKB の活性を十分に抑制できなかったためであると推察した。

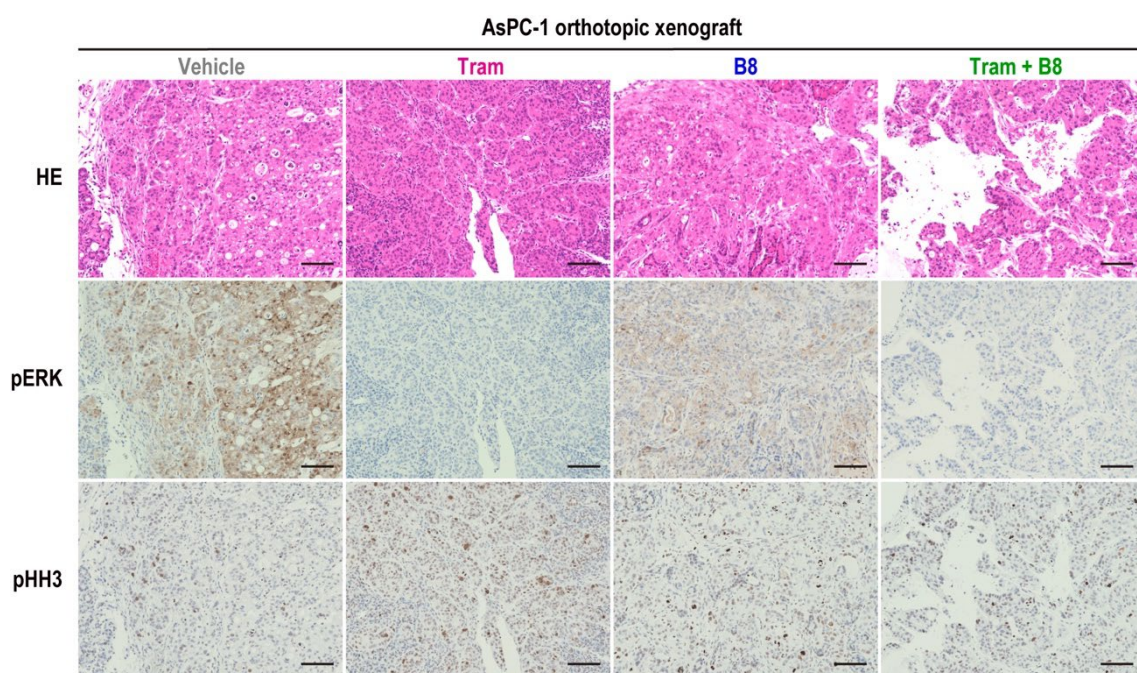


図 3 1. AsPC-1 同所性移植マウスの腫瘍における trametinib による pERK 発現の抑制

同所性移植マウスへの trametinib と BI-831266 の投与開始 3 日後に移植腫瘍を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin : HE) 染色と IHC による解析を行った。スケールバーは 100 μm を示す。

これらの結果から申請者は、MIA PaCa-2 皮下移植モデルマウスにおいて trametinib と BI-831266 の併用がそれぞれの単剤投与と比較して有意な腫瘍の成長抑制を示すことを見出した。一方で、AsPC-1 同所性移植モデルマウスの腫瘍重量の解析において、trametinib 単剤が対照と比較して有意な腫瘍成長の抑制効果を示すものの、trametinib 単剤と比較して二剤の組み合わせ投与は有意な腫瘍成長の抑制効果を示さないことが分かった。

6. 培養ヒト膵がん細胞を用いた trametinib と BI-831266 併用療法の作用機序解析

最後に申請者は、*4-hit* ハエを用いて見出した化合物組み合わせ投与の作用機序を培養ヒト膵がん細胞を用いて解析した。事前検討として、使用した各種培養ヒト膵がん細胞株より抽出したゲノム DNA を PCR 法で増幅し、本研究で着目している 4 遺伝子の塩基配列を直接シーケンスした。この際、再現性をもって増幅されない遺伝子はホモ接合体欠損と判断した。その結果、既報（Explore the Cancer Dependency Map）と同様に MIA PaCa-2 と PANC-1 は *SMAD4* 野生型の *3-hit* の変異プロファイルを、また Capan-1、PCI-55、AsPC-1 は *4-hit* の変異プロファイルを有することを確認した（表 9）。

表 9. 各種ヒト膵がん細胞株の遺伝子変異プロファイル

Cys-fs, cysteine to frameshift. HD, homozygous deletion. Wt, wild type.

Cell line		<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>SMAD4</i>	No. of mutation
MIA PaCa-2	<i>Alteration</i>	12 GGT-TGT	248 CGG-TGG	HD	none	3
	<i>Product</i>	Gly to Cys	Arg to Trp	absent	Wt	
Capan-1	<i>Alteration</i>	12 GGT-GTT	159 GCC-GTC	HD	343 TCA-TGA	4
	<i>Product</i>	Gly to Val	Ala to Val	absent	Ser-Stop	
PANC-1	<i>Alteration</i>	12 GGT-GAT	273 CGT-CAT	HD	none	3
	<i>Product</i>	Gly to Asp	Arg to His	absent	Wt	
PCI-55	<i>Alteration</i>	12 GGT-GAT	237 ATG-ATA	HD	HD	4
	<i>Product</i>	Gly to Asp	Met to Ile	absent	absent	
AsPC-1	<i>Alteration</i>	12 GGT-GAT	135 TGC-GC	27 ACT-A	100 AGG-ACG	4
	<i>Product</i>	Gly to Asp	Cys-fs	Thr-fs	Arg-Thr	

続いて申請者は、これらの細胞株を用いて trametinib と BI-831266 が細胞増殖能に与える効果を解析した。すなわち、各種膵がん細胞に、trametinib と BI-831266 をそれぞれ単剤または両者の組み合わせとして添加し、72 時間後の細胞数を MTS アッセイにて測定した。その結果、trametinib と BI-831266 がそれぞれ単剤で細胞増殖を濃度依存性に抑制し、二剤が特定の濃度での併用により MIA PaCa-2、PANC-1 または Capan-1 の細胞増殖を相乗的に抑制することを見出した（図 32）。

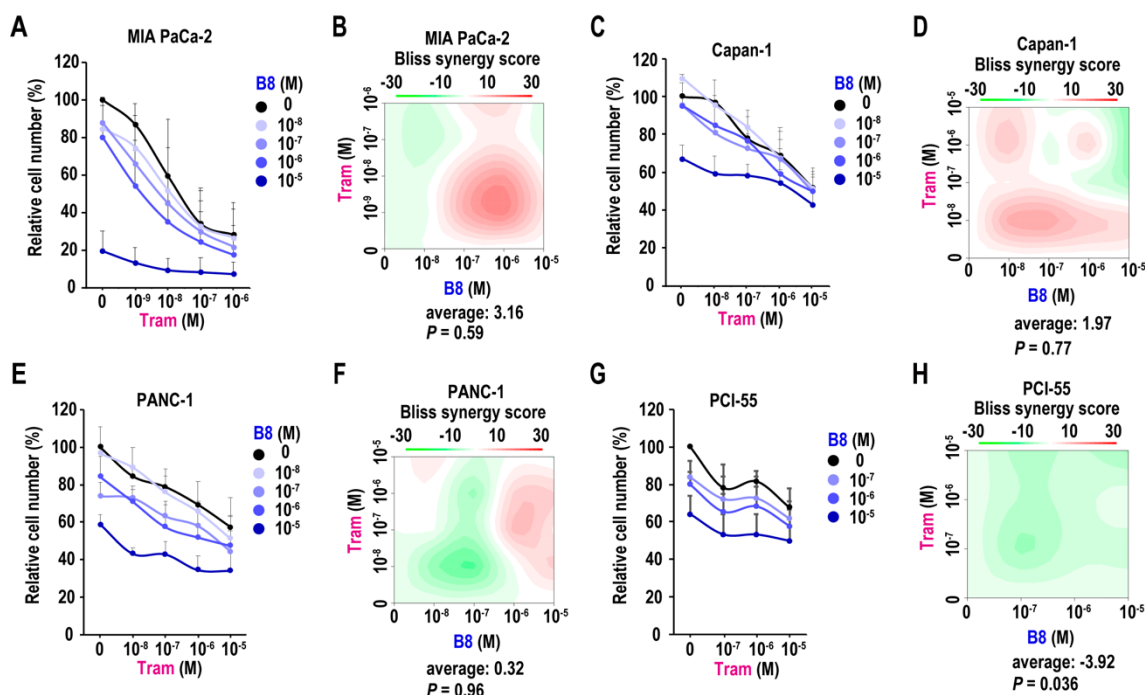


図 3 2. trametinib と BI-831266 によるヒト膵がん細胞の増殖の抑制

(A–H) 申請者は、MIA PaCa-2 (A)、Capan-1 (C)、PANC-1 (E) および PCI-55 (G) に trametinib と BI-831266 を添加し、7 2 時間後の細胞数を MTS アッセイにて測定した。また、SynergyFinder を用いてそれぞれの併用効果が相乗的か解析した (B、D、F、H)。マップの表示は図 1 9 B に準ずる。

次に申請者は、BI-831266 以外のサプレッサーキナーゼの阻害剤が、trametinib との併用でこれらの細胞の増殖を抑制するか解析した。申請者は 4-hit ハエでも使用したサプレッサーキナーゼの阻害剤である AD80、adavosertib および Y-27632 を、それぞれ単剤または trametinib と組み合わせて MIA PaCa-2 に添加した。その結果申請者は、AD-80 と adavosertib が単剤処置で細胞増殖を抑制し、また trametinib との組み合わせが細胞増殖を相乗的に抑制する一方で、Y-27632 と trametinib との組み合わせは trametinib 単剤との比較で有意な増殖抑制効果の向上を示さないことを見出した (図 3 3)。

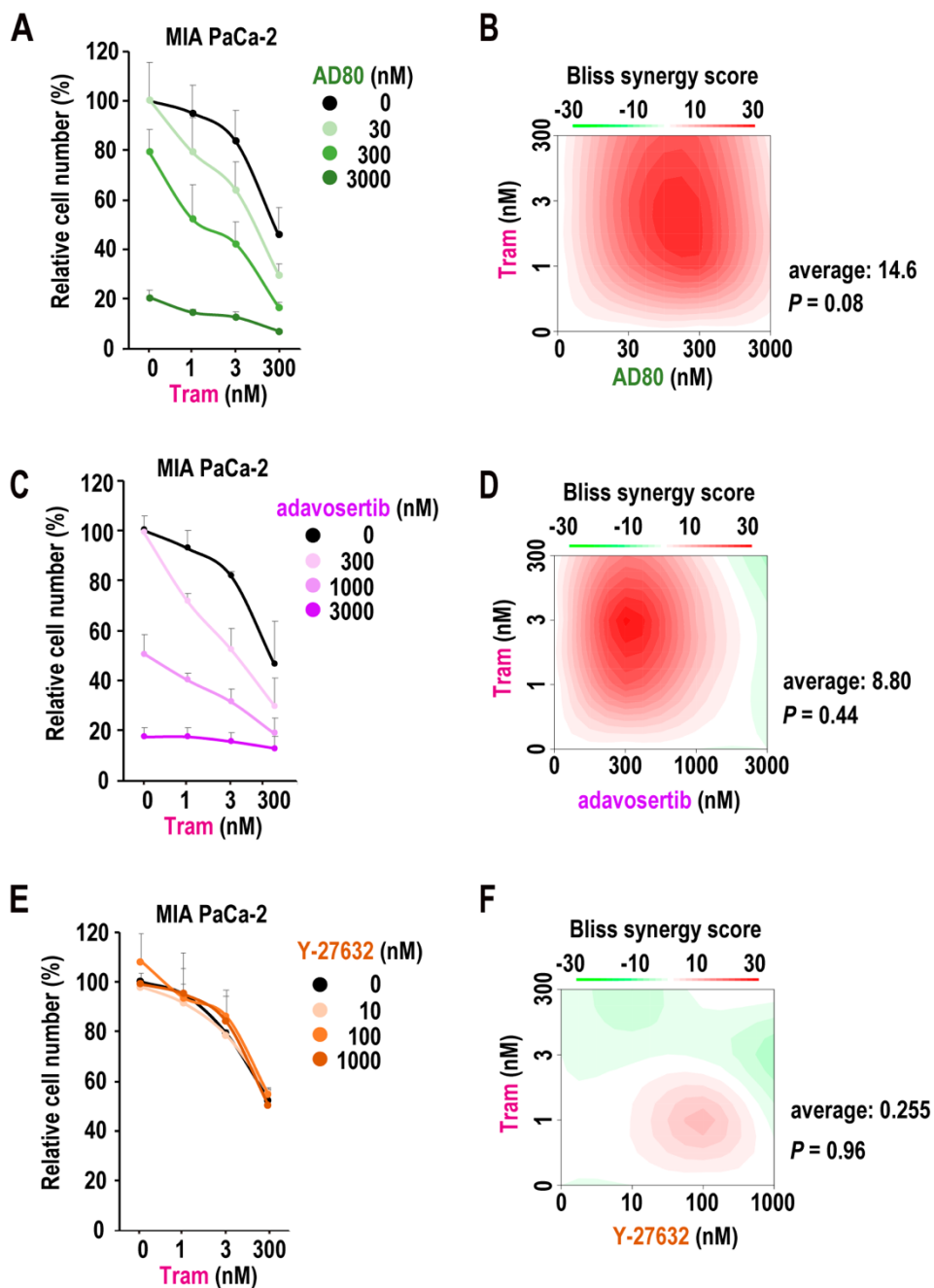


図 3 3. trametinib と AD80 または adavosertib による MIA PaCa-2 の増殖の抑制 (A–F) 申請者は、MIA PaCa-2 に trametinib と AD80 (A、B)、adavosertib (C、D)、Y-27632 (E、F) を組み合わせて添加し、MTS アッセイによる細胞増殖能 (A、C、E) とそれぞれの組み合わせの効果 (B、D、F) を解析した。

これらの結果より、サプレッサーキナーゼの阻害剤 BI-831266、AD80 または adavosertib と trametinib との併用は、膵がん細胞の増殖を抑制することが分かった。続いて申請者は、trametinib と BI-831266 がそれぞれの標的に作用している

か検討すべくウェスタンブロッティングを実施した。すなわち、trametinib と BI-831266 を添加したヒト膵がん細胞よりタンパク質を抽出し、pERK と pHH3 の発現を定量した。その結果、MIA PaCa-2、Capan-1、PANC-1 および PCI-55 において trametinib が ERK のリン酸化、BI-831266 が HH3 のリン酸化を抑制し、さらに二剤を併用すると両者の発現を抑制することを見出した（図 3 4）。なお、trametinib 単剤処置が HH3 のリン酸化を抑制する傾向を示すこと、一方で BI-831266 単剤処置は ERK のリン酸化を増加させる傾向を示すことも分かった。

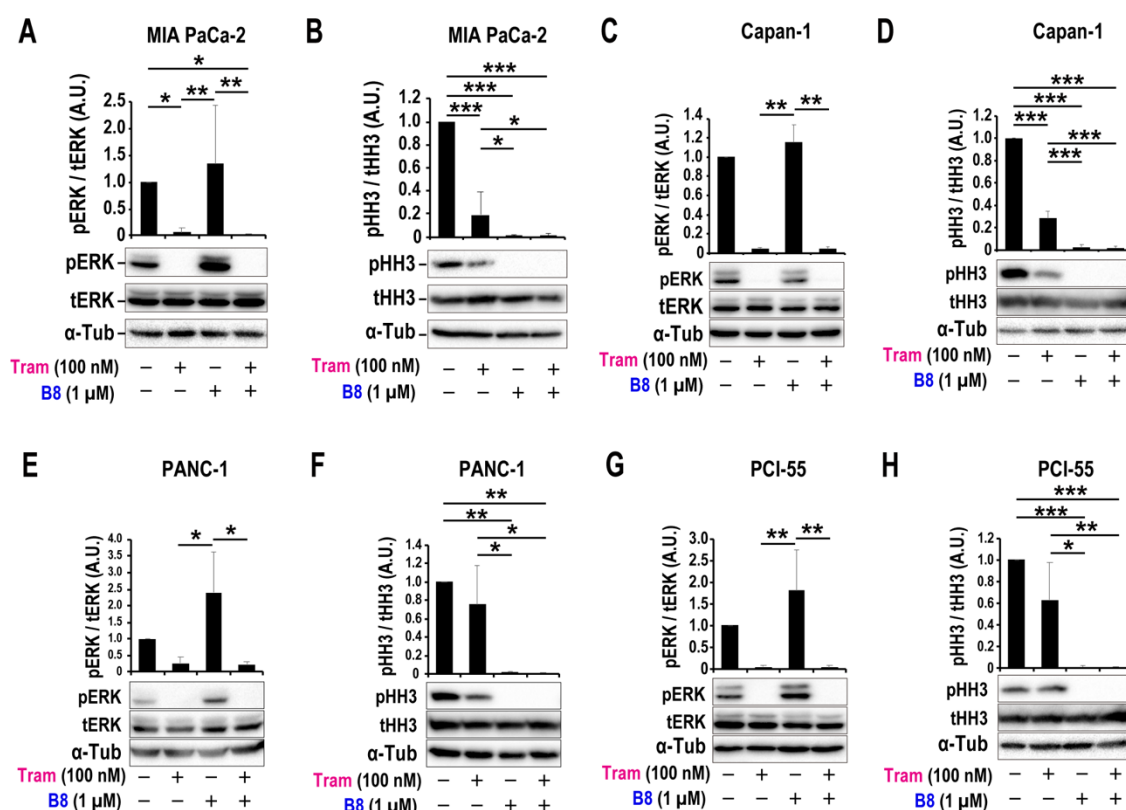


図 3 4. 各種ヒト膵がん細胞株における、trametinib と BI-831266 による pERK および pHH3 の発現の抑制

(A-H) MIA PaCa-2 (A、B)、Capan-1 (C、D)、PANC-1 (E、F)、PCI-55 (G、H) にそれぞれ trametinib と BI-831266 を添加し、pERK (A、C、E、G) と pHH3 (B、D、F、H) の発現量を、それぞれ全 ERK (tERK) と全 HH3 (tHH3) のタンパク質量に対する比で示した。ローディングコントロールとして α チューブリン (α -Tub) を用いた。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定)。A.U.、arbitrary unit。

続いて申請者は、trametinib と BI-831266 をヒト膵がん細胞に添加すると、細胞の腫大と液胞形成が起こることを見出し、化合物によって何らかの種類の細

胞死が引き起こされていると推察した (図 3 5)。既報においては、trametinib を含む MEK 阻害剤が細胞にアポトーシスやオートファジーを誘導すること (Chao et al, 2019; Kinsey et al, 2019)、また AURKA 阻害剤 CCT137690 がネクローシスを誘導することが報告されている (Xie et al, 2017)。

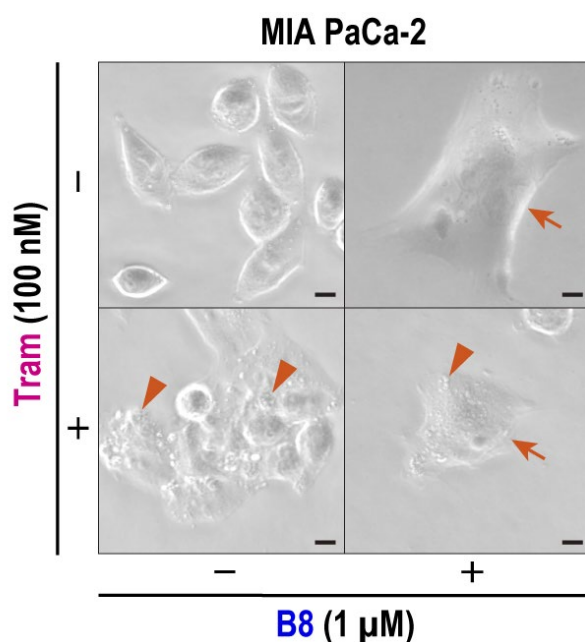


図 3 5. trametinib と BI-831266 による液泡形成と細胞腫大

MIA PaCa-2 に trametinib と BI-831266 を添加 4 8 時間後の細胞形態を解析した。矢印は細胞の腫大を、矢頭は液泡を示し、スケールバーは 10 μ m を示す。

そこで申請者はウェスタンブロッティングを実施し、trametinib や BI-831266 で処置した細胞の細胞死関連タンパク質の発現量を解析した。すなわち、MIA PaCa-2 に二剤を添加して 4 8 時間後にタンパク質を抽出し、Cleaved Caspase-3、Cleaved Poly ADP-ribose polymerase (cPARP。以上アポトーシス関連タンパク質。以下同様に記載)、リン酸化 Receptor interacting protein 3 (pRIP3)、リン酸化 Mixed lineage kinase domain-like protein (pMLKL。以上ネクローシス)、Cleaved Gasdermin D、Cleaved-IL-1 β (以上パイロトーシス)、Light chain 3 (LC3)、p62 (以上オートファジー) の発現量の変化を解析した。その結果、trametinib 単剤が cPARP の発現を増加させる一方、p62 および LC3-I/LC3-II 比を低下させることを見出した (図 3 6)。また、trametinib と BI-831266 の併用が p62 および LC3-I/LC3-II 比を一層低下させることも分かった (図 3 6)。なお申請者は、trametinib 処置によってアポトーシス関連タンパク質である Cleaved Caspase-3 の発現が増加することでも予備的に見出したが、そのシグナルのシグナル/ノイズ比が低かったため本

研究で定量化することは困難であった。また、pRIP3、pMLKL、Cleaved Gasdermin D、Cleaved-IL-1 β のシグナルは検出できなかった。以上より、trametinib と BI-831266 の併用療法がアポトーシスおよびオートファジーを誘導して抗腫瘍効果をもたらす可能性を見出した。

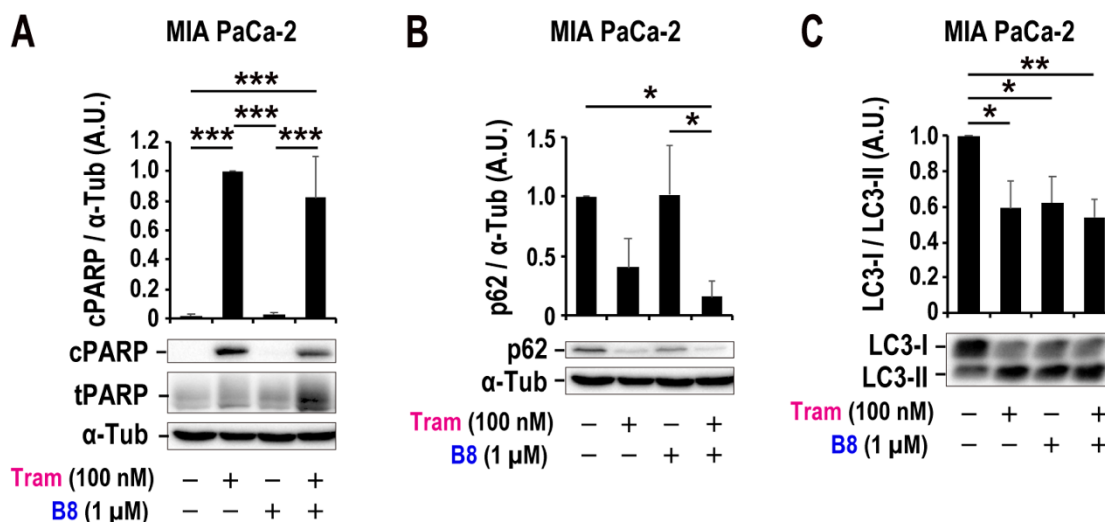


図 3 6 . trametinib と BI-831266 によるアポトーシスとオートファジーの誘導

(A、B) trametinib と BI-831266 添加 4 8 時間後の (A) cPARP、(B) p62 の発現量をローディングコントロールの α チューブリン (α -Tub) との比で定量した。

(C) オートファジーの過程で LC3-I は LC3-II に変換されることから、LC3-I/LC3-II 比の低下をオートファジーの指標とした。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定)。A.U.、arbitrary unit。

考察

本研究で申請者は、膵がん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、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。そして申請者は、この療法が哺乳類実験系である MIA PaCa-2 の異種移植マウスにおいても顕著な抗腫瘍効果を示し、さらに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アポトーシスおよびオートファジーの誘導であることを見出した。

膵がんに対する治療薬の探索は現在までに大きな進歩を遂げ、特に内因性発がんモデルである GEMM は *1-hit* (*Kras* 変異)、*2-hit* (*Kras-Trp53*, *Kras-Cdkn2a*, *Kras-Smad4*)、*3-hit* (*Kras-Trp53-Cdkn2a*) の各モデルが作出され、これらの GEMM を活用して *Kras* の活性化が前がん病変の発生に及ぼす影響や、*Trp53* の機能低下ががん細胞の浸潤能や転移能を向上させる機序が解明されてきた (Aguirre et al, 2003; Hingorani et al, 2003, 2005; Bardeesy et al, 2006; Izeradjene et al, 2007)。また、患者腫瘍組織移植マウス (patient-derived xenografts ; PDX) も薬効評価に利用され、PDX モデルで同定された分子標的薬 *saracatinib* が臨床試験に進んだ例もある (Renouf et al, 2012)。しかし、GEMM や PDX などのモデルマウスは遺伝学的・薬物スクリーニングの実施に時間・労力・費用の面で多大な資源を要するという欠点を有し、また現時点では *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、そして *SMAD4* の4つ全ての遺伝子変異を有する *4-hit* モデルとなる GEMM は主に技術的な課題のため作出されていない。これらの課題を克服するために、本研究で申請者は、時間やコストの面からスクリーニングに有用であるハエを活用して *4-hit* モデルを作出し、既存の哺乳類の実験系と相補的に活用することによって、膵がんの新規治療標的や治療薬候補の探索を効率的に進めた。

申請者は非遺伝子組換えハエや *dRas* のみの変異を有する *1-hit* ハエと *4-hit* ハエとの間で生存率を比較し、遺伝子変異を模倣するために導入した外来遺伝子の数が増加するほどハエの生存率が段階的に低下することを見出し、これは臨床において4つの遺伝子変異数が増加するほど患者予後が悪化することと矛盾しない結果であった。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を通じ、*MEK* や *AURKB* を始めとする10のサプレッサーキナーゼの機能抑制が *4-hit* ハエの生存率を改善すること、そしてこれらサプレッサーキナーゼの阻害剤が *4-hit* ハエの生存率を改善することが分かった。さらに申請者は、*MEK* 阻害薬 *trametinib* と *AURKB* 阻害剤 BI-831266 の併用療法が MIA PaCa-2 の異種移植マウスの腫瘍の成長を抑制することを見出した。新規シーズの同定

に至ったこれら一連の結果は、*4-hit* ハエが膵がんの新規治療薬候補を開発する上で有効な基盤となることを示唆している。

なお申請者は、*4-hit* ハエが致死に至る機序を本研究の中で解明できていない。現在、可能性の一つとして、翅原基内で起こる増殖能や遊走能の亢進などの腫瘍形質により翅原基の発生が阻害されることで、個体の発生が停止する機序を想定している。また、ハエにおいて *Ras* によって形質転換を起こした細胞が IL-6 を分泌することで細胞競合を抑制することが報告されており (Ohsawa et al, 2012)、申請者はこれが *4-hit* ハエの形質転換細胞の異常増殖を介し生存率低下を招来する可能性も想定している。さらに別の可能性として、IL-6 が悪液質誘導因子であるため (Webster et al, 2020)、申請者は 4 外来遺伝子の引き起こす悪液質がハエ個体のホメオスタシスを維持困難な状態に導くことも推察している。

本研究の核となる実験は、*4-hit* ハエを用いた全キナーゼの網羅的な遺伝学的スクリーニングである。同様の手法は、所属研究室の成果を含め他のがん種において腫瘍形成の機序解析や治療薬候補の同定に有用であることが証明されてきた (Vidal et al, 2005; Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019; Yamamura et al, 2021)。本研究においても申請者は、スクリーニングで同定した MEK、FRK、WEE1、ROCK1、そして AURKB に対する阻害剤は、組み合わせて *4-hit* ハエに投与することでその生存率を相乗的に改善し、同じ組み合わせ処置がヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 の増殖を抑制することを見出した。一方、過去の臨床研究において、trametinib と膵がんの代表的な治療薬である gemcitabine とを併用することによる予後改善効果は証明されなかった (Infante et al, 2014)。すなわち、これまでの膵がん研究では治療効果の高い薬物の組み合わせの効率的な同定が困難であることが課題であったが、本研究で申請者は *4-hit* ハエを用いた化合物スクリーニングを通じて、trametinib と組み合わせて最も生存率の改善効果の高い AURKB 阻害剤 BI-831266 を同定することに成功した。申請者は、今後もこのスクリーニング手法を既存の研究基盤と組み合わせることでより有効な治療薬やその効果を高める組み合わせの探索が可能になると推察している。

MEK と AURKB を同時にがんの治療標的とする研究は既に報告がある。MEK と AURKB を共阻害する化合物 BI-847325 は異種移植マウスにおける悪性黒色腫や肺がんの成長を抑制した一方で、第一相試験において標的となる MEK と AURKB に対する作用が不十分であることから開発が中止された (Schöffski et al, 2016)。この点について申請者は、本研究で見出した trametinib と BI-831266 の併用は用いる薬物が異なることから標的の阻害効率や標的以外のキナーゼへの阻害作用に大きな違いがあり、薬物動態や組織移行性などの観点からも BI-847325 とは異なる治療効果が期待できると推察している。

申請者は、*4-hit* ハエを用いた遺伝学的スクリーニングで MEK を治療標的と

して同定した。続く MEK 阻害剤 26 種の化合物スクリーニングにおいては、その一部が *4-hit* ハエの生存率を有意に改善したものの、その他多数の MEK 阻害剤は *4-hit* ハエの生存率を改善しないことが分かった。同様に申請者は、遺伝学的スクリーニングで同定した AURKA と AURKB に関しても、一部の AURK 阻害剤が trametinib の効果を有意に高めた一方で、大多数の AURK 阻害剤はそのような効果を示さないことを見出した。さらに、BI-831266 の単剤投与は *4-hit* ハエの生存率を改善しないことも分かった。このように遺伝学的スクリーニングと化合物スクリーニングの結果が乖離した理由として、申請者は標的に対する化合物の特異性の観点から以下の通り考察している。大部分のキナーゼ阻害剤は標的以外のキナーゼ活性も低下させることが多く、これら標的以外のキナーゼの中には阻害することで薬物の効果を高める「pro-target」や毒性を高める「anti-target」が含まれる (Sonoshita et al, 2018)。そのため申請者は、本研究の薬物スクリーニングに用いた MEK 阻害剤や AURK 阻害剤の多くは pro-target や anti-target に対する作用の差異によって、生存率の改善効果に大きな違いが生じたと推測した。この課題に関し、所属研究室では遺伝学と創薬化学を融合した手法によって既存薬ソラフェニブの anti-target である MNK1 を同定し、MNK1 へのソラフェニブの結合能が低下するようソラフェニブの構造を改変することでソラフェニブの副作用を大きく低下させた新たな薬物を創出することに成功している (Sonoshita et al, 2018)。このことから申請者は、同手法を BI-831266 に応用することで治療効果を更に高めることができると考えている。

また申請者は、ハエと培養細胞の実験における trametinib と BI-831266 の相乗的な効果について以下のように考察している。培養ヒト膵がん細胞を用いたウェスタンブロッティングで見出した、BI-831266 の単剤処置が pERK の発現量を増加させる傾向は、MAPK 経路の活性化を示唆している (図 3 4)。この結果から、膵がん細胞においてこの処置により活性化する MAPK のバイパス経路を trametinib が遮断し、より効果的な細胞増殖抑制を達成したと推察する。また、悪性黒色腫において MAPK 経路は AURKB の mRNA を増幅することが報告され (Bonet et al, 2012)、本研究のヒト膵がん細胞のウェスタンブロッティングにおいて trametinib が HH3 のリン酸化を低下させた結果に一致した (図 3 4)。なお、RAS 変異がんにおいて長期間の MEK 阻害剤の使用は MAPK 経路の再賦活化を引き起こすことが知られている (Samatar and Poulikakos, 2014)。申請者は本研究においても trametinib による MAPK 経路再賦活化が起こり、増幅された AURKB の活性を BI-831266 が効果的に抑制したことも組み合わせ投与が有効であった要因の一つであると考えている。

本研究では、*4-hit* の遺伝子変異を有する AsPC-1 の同所性移植モデルにおいて trametinib が腫瘍の成長を抑制した一方で、BI-831266 は単剤でも trametinib と BI-

831266 との併用においても抗腫瘍効果を示さなかった。申請者は、AsPC-1 が *FBXW7* の変異を有していることがこの原因の一つであると考えている。*FBXW7* はタンパク質をユビキチン化するユビキチンリガーゼ複合体を構成する F-box ファミリーの一員で、がん抑制遺伝子として知られる遺伝子である (Fan et al, 2022)。なお、AsPC-1 が有する *FBXW7* の変異は 465 番目のアルギニンがシステインに置き換わるミスセンス変異で、ヒト膵がんにおいてもこの一塩基置換はホットスポットであり (Akhoondi et al, 2007)、興味深いことに *FBXW7* が分解を促進する標的には *AURKB* も含まれる (Teng et al, 2012)。これらの事実に基づき申請者は、AsPC-1 においては *FBXW7* が失活しているため、*AURKB* の分解が阻害されて *AURKB* が蓄積し、発現量の増加した *AURKB* の高い活性が BI-831266 によって十分に抑制されず、薬物感受性を低下させたと推察した。申請者は今後の展望として、モデルハエを用いた薬物耐性に関する分子機序の解明が、将来的に患者の遺伝子変異に基づく個別化医療へ繋がる可能性があると考えている。

総括および結論

①本研究により、申請者は以下の新知見を得た。

1. 申請者は、ヒト膵がんでは最も変異頻度の高い遺伝子変異である *KRAS* の活性化、および *TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* の不活性化を模倣した *4-hit* ハエを作出し、同モデルが致死表現型を呈することを明らかにした。
2. 申請者は、*4-hit* ハエを用いた遺伝学的スクリーニングによって *MEK* と *AURK* をサプレッサーキナーゼとして同定した。また、化合物スクリーニングによって *MEK* 阻害薬 trametinib と *AURKB* 阻害剤 BI-831266 の組み合わせ投与が *4-hit* ハエの生存率を改善することを見出した。
3. 申請者は、trametinib と BI-831266 の併用がマウスに移植した培養ヒト膵がん細胞 MIA PaCa-2 が形成する腫瘍の成長を抑制することを明らかにした。

②新知見の意義

膵がんに対する治療薬開発の課題として、モデル動物を用いた個体レベルでの治療標的や薬物のスクリーニングの研究基盤が十分ではない点が挙げられていたが、本研究で作出した *4-hit* ハエは既存の哺乳類の実験系と相補的に活用することで新規治療標的や治療薬候補の探索に有用である。また、*4-hit* ハエを活用し新規治療標的として *MEK* と *AURKB*、並びに治療薬候補としてそれらの阻害剤 trametinib および BI-831266 を同定したが、これらは今後の膵がん患者の治療薬開発に有用であると推察する。

③本研究で得た新知見から今後どのような研究が展開されうるか

今後、本研究で申請者が同定した trametinib と BI-831266 の併用療法が *4-hit* 変異を有する膵がん患者に有効性を示すか検証する臨床研究を進めていきたい。また、キナーゼに限らず幅広い新規治療標的の探索や、副作用軽減に向けた化合物の構造改変などの研究展開により、より有効性が高く副作用の少ない治療薬候補の開発を加速できる可能性がある。

④今後の課題

本研究で申請者は、*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* の4遺伝子変異を模倣した *4-hit* ハエを作出・解析した。一方で、様々な遺伝子変異プロファイルを有する患者それぞれに最適な治療を提供する個別化医療への発展性を考慮する場合、上記の4遺伝子に限らず様々な遺伝子変異の組み合わせのモデルハエを作出し、

それぞれにおいて治療標的や薬物の探索を行う必要がある。また、モデルハエを活用して同定した新規治療が対応する遺伝子変異プロファイルを有する膵がん患者に有効か、今後臨床研究で検証することも必要である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会をいただき丁寧かつ熱心にご指導いただいた北海道大学遺伝子病制御研究所がん制御学分野の園下将大教授、および本研究の機会をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの平野聡教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり様々な方々のご指導、ご協力を賜りました。研究全般の手技をご指導いただきました北海道大学遺伝子病制御研究所 大塩貴子助教、山村凌大助教、膵がん検体の免疫組織染色のご指導をいただきました北海道大学病院病理診断科松野吉宏教授、三橋智子診療教授、北海道大学病院先端診断技術開発センター畑中佳奈子特任講師、北海道大学病院ゲノムコンパニオン診断研究部門畑中豊特任准教授、培養ヒト膵がん細胞株 PCI-55 を提供いただきました北海道大学大学院医学研究院病理学講座統合病理学教室の宮武由甲子助教に深く感謝申し上げます。また、様々なご協力をいただいた北海道大学遺伝子病制御研究所がん制御学分野の皆様、そして北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの皆様に心から感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS and DePinho RA (2003) Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 17, 3112–3126.

Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, Cepeda D, Fiegl H, Dafou D, Marth C, et al (2007) FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res*, 67, 9006–9012.

Bangi E, Ang C, Smibert P, Uzilov AV, Teague AG, Antipin Y, Chen R, Hecht C, Gruszczynski N, Yon WJ, et al (2019) A personalized platform identifies trametinib plus zoledronate for a patient with KRAS-mutant metastatic colorectal cancer. *Sci Adv*, 5, eaav6528.

Bangi E, Smibert P, Uzilov AV, Teague AG, Gopinath S, Antipin Y, Chen R, Hecht C, Gruszczynski N, Yon WJ, et al (2021) A *Drosophila* platform identifies a novel, personalized therapy for a patient with adenoid cystic carcinoma. *iScience*, 24, 102212.

Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng K-H, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, et al (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 5947–5952.

Bonet C, Giuliano S, Ohanna M, Bille K, Allegra M, Lacour J-P, Bahadoran P, Rocchi S, Ballotti R and Bertolotto C (2012) Aurora B is regulated by the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling pathway and is a valuable potential target in melanoma cells. *J Biol Chem*, 287, 29887–29898.

Chao M-W, Chang L-H, Tu H-J, Chang C-D, Lai M-J, Chen Y-Y, Liou J-P, Teng C-M and Pan S-L (2019) Combination treatment strategy for pancreatic cancer involving the novel HDAC inhibitor MPT0E028 with a MEK inhibitor beyond K-Ras status. *Clin Epigenetics*, 11, 85.

Dittrich C, Fridrik MA, Koenigsberg R, Lee C, Goeldner R-G, Hilbert J and Greil R

(2015) A phase 1 dose escalation study of BI 831266, an inhibitor of Aurora kinase B, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 33, 409–422.

Explore the Cancer Dependency Map. In depmap portal, <https://depmap.org/portal/> (2023 年 11 月 14 日 参照)

Fan J, Bellon M, Ju M, Zhao L, Wei M, Fu L and Nicot C (2022) Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers. *Mol Cancer*, 21, 87.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, et al (2012) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367, 1694–1703.

Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA and Parry H (1995) Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 81, 95–105.

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, et al (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4, 437–450.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S and Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7, 469–483.

Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, et al (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 102, 279–291.

Infante JR, Somer BG, Park JO, Li C-P, Scheulen ME, Kasubhai SM, Oh D-Y, Liu Y, Redhu S, Stepkowski K, et al (2014) A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*, 50, 2072–2081.

Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, Deng C-X,

Hruban RH, Adsay NV, Tuveson DA, et al (2007) Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell*, 11, 229–243.

Kawaguchi K, Igarashi K, Murakami T, Kiyuna T, Lwin TM, Hwang HK, Delong JC, Clary BM, Bouvet M, Unno M, et al (2017) MEK inhibitors cobimetinib and trametinib, regressed a gemcitabine-resistant pancreatic-cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX). *Oncotarget*, 8, 47490–47496.

Keshgegian AA and Cnaan A (1995) Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol*, 104, 42–49.

Kinsey CG, Camolotto SA, Boespflug AM, Guillen KP, Foth M, Truong A, Schuman SS, Shea JE, Seipp MT, Yap JT, et al (2019) Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med*, 25, 620–627.

Knight ZA, Lin H and Shokat KM (2010) Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer*, 10, 130–137.

Leinwand J and Miller G (2020) Regulation and modulation of antitumor immunity in pancreatic cancer. *Nat Immunol*, 21, 1152–1159.

Levine BD and Cagan RL (2016) *Drosophila* Lung Cancer Models Identify Trametinib plus Statin as Candidate Therapeutic. *Cell Rep*, 14, 1477–1487.

Lin Z-Z, Jeng Y-M, Hu F-C, Pan H-W, Tsao H-W, Lai P-L, Lee P-H, Cheng A-L and Hsu H-C (2010) Significance of AuroraB overexpression in hepatocellular carcinoma. AuroraB Overexpression in HCC. *BMC Cancer*, 10, 461.

MEKINIST® (trametinib) tablets, for oral use. In [accessdata.fda, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/204114s024lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/204114s024lbl.pdf) (2023 年 11 月 14 日参照)

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P,

Walde D, Wolff RA, et al (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, 25, 1960–1966.

Morris, JP 4th, Wang SC and Hebros M (2010) KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*, 10, 683–695.

Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A and Igaki T (2012) Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature*, 490, 547–551.

Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet P-J, Quoix E, Baik CS, Barlesi F, Kim TM, Mazieres J, Novello S, et al (2016) Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 17, 984–993.

Qian ZR, Robinson DA, Nowak JA, Morales-Oyarvide V, Dunne RF, Kozak MM, Welch MW, Brais LK, Da Silva A, Li T, et al (2018) Association of Alterations in Main Driver Genes With Outcomes of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol*, 4, e173420.

Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BSMS, Shimamoto F, Tatsuka M and Takata T (2007) Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch*, 450, 297–302.

Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM and Nead KT (2021) Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open*, 4, e214708.

Renouf DJ, Moore MJ, Hedley D, Gill S, Jonker D, Chen E, Walde D, Goel R, Southwood B, Gauthier I, et al (2012) A phase I/II study of the Src inhibitor saracatinib (AZD0530) in combination with gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *Invest New Drugs*, 30, 779–786.

Richardson H, O’Keefe LV, Marty T and Saint R (1995) Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the *Drosophila*

eye imaginal disc. *Development* , 121, 3371–3379.

Samatar AA and Poulikakos PI (2014) Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 928–942.

Schöffski P, Aftimos P, Dumez H, Deleporte A, De Block K, Costermans J, Billiet M, Meeus M-A, Lee C, Schnell D, et al (2016) A phase I study of two dosing schedules of oral BI 847325 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 77, 99–108.

Sini P, Gürtler U, Zahn SK, Baumann C, Rudolph D, Baumgartinger R, Strauss E, Haslinger C, Tontsch-Grunt U, Waizenegger IC, et al (2016) Pharmacological Profile of BI 847325, an Orally Bioavailable, ATP-Competitive Inhibitor of MEK and Aurora Kinases. *Mol Cancer Ther*, 15, 2388–2398.

Sonoshita M, Scopton AP, Ung PMU, Murray MA, Silber L, Maldonado AY, Real A, Schlessinger A, Cagan RL and Dar AC (2018) A whole-animal platform to advance a clinical kinase inhibitor into new disease space. *Nat Chem Biol*, 14, 291–298.

Teng C-L, Hsieh Y-C, Phan L, Shin J, Gully C, Velazquez-Torres G, Skerl S, Yeung S-CJ, Hsu S-L and Lee M-H (2012) FBXW7 is involved in Aurora B degradation. *Cell Cycle* , 11, 4059–4068.

Ung PMU, Sonoshita M, Scopton AP, Dar AC, Cagan RL and Schlessinger A (2019) Integrated computational and *Drosophila* cancer model platform captures previously unappreciated chemicals perturbing a kinase network. *PLoS Comput Biol*, 15, e1006878.

Vidal M, Wells S, Ryan A and Cagan R (2005) ZD6474 suppresses oncogenic RET isoforms in a *Drosophila* model for type 2 multiple endocrine neoplasia syndromes and papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 65, 3538–3541.

Webster JM, Kempen LJAP, Hardy RS and Langen RCJ (2020) Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. *Front Physiol*, 11, 597675.

Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA and Allis CD (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97, 99–109.

Xie Y, Zhu S, Zhong M, Yang M, Sun X, Liu J, Kroemer G, Lotze M, Zeh HJ 3rd, Kang R, et al (2017) Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma. *Gastroenterology*, 153, 1429–1443.e5.

Yamamura R, Ooshio T and Sonoshita M (2021) Tiny *Drosophila* makes giant strides in cancer research. *Cancer Sci*, 112, 505–514.

Yu J, Zhou J, Xu F, Bai W and Zhang W (2018) High expression of Aurora-B is correlated with poor prognosis and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers*, 33, 215–221.

最新がん統計. In 国立がん研究センター, がん情報サービス
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html (2023 年 9 月 8 日参照)