



Title	膵がんの新規治療戦略候補としてのGSK3とMEKの同時阻害法の同定 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	福田, 純己
Description	配架番号 : 2876
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16152号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93530
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUDA_Junki_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 福田 純己

学 位 論 文 題 名

膵がんの新規治療戦略候補としての GSK3 と MEK の同時阻害法の同定
(Concurrent targeting of GSK3 and MEK as a therapeutic strategy to treat pancreatic ductal adenocarcinoma)

【背景と目的】膵がんは、有効な治療法がほとんど存在しない代表的な難治がんであり、膵がん患者の死亡者数は、今後さらに増加することが全世界で確実視されている。膵がんの創薬研究における最大の問題点は、個体レベルでの効率的かつ網羅的なスクリーニングを可能とするモデル動物の欠如により、新規治療標的や治療薬の同定が難航していることである。

この課題を解決すべく申請者の所属研究室では、培養がん細胞やモデルマウスといった従来の実験系にショウジョウバエを相補的に組み合わせる新たな研究基盤を構築・活用している。まず所属研究室は先行研究で、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四つの遺伝子変異 {がん遺伝子 KRAS の活性化とがん抑制遺伝子群 TP53・CDKN2A・SMAD4 の不活性化 (以後 4-hit と呼称)} を模倣した「4-hit ハエ」を作出した。次に、この 4-hit ハエを用いた遺伝学的スクリーニングにより、Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK) と Aurora kinase B (AURKB) が膵がんの新規治療標的となることが分かった。さらに、これらのキナーゼに対する阻害剤である trametinib と BI-831266 の組み合わせが 4-hit ハエの生存率を改善するとともに、マウスに皮下移植した培養ヒト膵がん細胞の成長を抑制することが分かった (Sekiya et al, 2023)。これらの結果は、4-hit ハエを使用したスクリーニングが膵がんの新規治療薬候補の同定に有用であることを示している。そこで、本研究において申請者はこの膵がん研究基盤を活用し、新たな治療標的と治療薬候補の同定を目指した。

【材料と方法】まず、膵がんの新規治療標的を探索すべく、4-hit ハエを用いた遺伝学的スクリーニングを実施した。本スクリーニングでは、Serrate (Ser) ドライバーの活性で 4 種の外来遺伝子を発現する Ser-gal4,UAS-4-hit ハエ (以後 Ser>4-hit ハエと呼称) を使用した。この Ser>4-hit ハエに、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導入し、各キナーゼのヘテロ接合性変異を有する Ser>4-hit ハエの生存率を比較した。

次に、Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) のアイソフォームの一つである GSK3 β の発現と膵がん患者の予後との相関を解析するため、免疫組織化学染色 (immunohistochemistry : IHC) を実施した。86 例の膵がん患者の組織マイクロアレイを抗 GSK3 β 抗体で染色し、GSK3 β 陽性群 29 例と陰性群 57 例との間で全生存期間を比較した。

続いて、GSK3 阻害剤 23 種を MEK 阻害薬 trametinib と組み合わせる化合物スクリーニングを実施した。本スクリーニングでは UAS-4-hit ハエと Ser-gal4 ドライバーを有するハエを交配し、その仔である Ser>4-hit ハエに溶媒のみ、もしくは化合物を混入した餌を与え、生存率を測定した。

そして、4-hit ハエを用いたスクリーニングを通じて同定した CHIR99021 と trametinib の組み合わせの抗膵がん効果を哺乳類モデルで検証することを目的として、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、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト膵がん細胞 AsPC-1 を同所移植

したヌードマウスに、CHIR99021 と trametinib を単独であるいは同時に投与し、腫瘍発光強度を解析した。最後に、CHIR99021 と trametinib の併用投与の作用機序を解析するため、マウス同所性移植実験で採材した腫瘍検体の IHC とリン酸化抗体アレイ解析を実施した。

【結果】まず遺伝学的スクリーニングにおいて、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 Ser>4-hit ハエに導入した。その結果、GSK3 と MEK のヘテロ接合性変異の導入が Ser>4-hit ハエの致死性を救済することが分かった。

次に、GSK3 β の発現と予後との関連を、膵がん患者検体を用いて解析したところ、膵がん細胞において GSK3 β が陽性である患者群は、陰性群と比較して全生存期間が有意に短いことが分かった。

続いて、CHIR99021 と trametinib を組み合わせて Ser>4-hit ハエに経口投与したところ、この組み合わせは Ser>4-hit ハエの生存率を改善することが分かった。

次に、CHIR99021 と trametinib の併用投与が AsPC-1 細胞を同所移植したマウスの腫瘍（以後 AsPC-1 腫瘍と呼称）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。

最後に、AsPC-1 腫瘍検体を用いた IHC を実施した。細胞増殖のマーカーである Ki-67 の IHC において、CHIR99021 と trametinib の併用投与群は、溶媒のみの投与の対照群と比較して、各切片内の全膵がん細胞に占める Ki-67 陽性細胞の割合が有意に低いことが分かった。また、CHIR99021 と trametinib の併用投与は、リン酸化 Extracellular signal-regulated kinase (pERK) の発現を抑制することが分かった。さらに、リン酸化抗体アレイ解析において、CHIR99021 と trametinib の併用が、PLK1 (Polo-like kinase 1) の活性低下を招来することが分かった。

【考察】本研究において申請者は、4-hit ハエを用いた化合物スクリーニングにより CHIR99021 と trametinib の併用投与を新規の治療薬候補として同定し、この併用投与が同所性移植モデルマウスにおいても一貫して腫瘍の成長を抑制することを実証した。この併用投与は、所属研究室が先行研究で同定した trametinib と BI-831266 の併用投与に対する AsPC-1 腫瘍の治療耐性を克服する治療法の一つになり得るため、より多くの膵がん患者に適応可能な汎用性の高い新規膵がん治療法になると期待される。また申請者は、GSK3 と MEK の共阻害が KRAS の合成致死標的である PLK1 の活性低下を招来することで、KRAS を直接的な治療標的とすることなく抗膵がん効果を示したと推察した。

【結論】申請者は、4-hit ハエ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 GSK3 を同定し、このキナーゼに対する阻害剤である CHIR99021 と trametinib の併用が 4-hit ハエの生存率を改善することを見出した。さらに、この組み合わせは、細胞分裂制御因子である PLK1 の活性低下を招来することで AsPC-1 腫瘍の成長を抑制することが分かった。これらの結果は、GSK3 と MEK の同時阻害法が膵がんに対する新規治療候補になることを示唆している。