



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16152
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93532
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUDA_Junki.pdf



学 位 論 文

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)

2024 年 9 月

北海道大学

福 田 純 己

学 位 論 文

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)

2024 年 9 月

北海道大学

福 田 純 己

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
緒言	8 頁
実験方法	14 頁
実験結果	31 頁
考察	59 頁
総括および結論	63 頁
謝辞	64 頁
利益相反	65 頁
引用文献	66 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. Junki Fukuda, Shinya Kosuge, Yusuke Satoh, Sho Sekiya, Ryodai Yamamura, Takako Ooshio, Taiga Hirata, Reo Sato, Kanako C. Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Toru Nakamura, Yoshihiro Matsuno, Yutaka Hatanaka, Satoshi Hirano, and Masahiro Sonoshita

Concurrent targeting of GSK3 and MEK as a therapeutic strategy to treat pancreatic ductal adenocarcinoma

Cancer Science, 115 • 1333-1345, (2024)

要旨

【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 の組み合わせの抗腫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腫がん細胞 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、腫がん患者検体を用いて解析したところ、腫がん細胞において 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、各切片内の全腫がん細胞に占める 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、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。

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。

<i>aurB</i>	<i>aurora B</i>
Arg to His	Arginine to Histidine
Arg to Thr	Arginine to Threonine
ATCC	American Type Culture Collection
<i>AURKB</i>	<i>Aurora kinase B</i>
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
C9	CHIR99021
CST	Cell Signaling Technology
<i>CTR</i>	<i>CyO-Tb-RFP</i>
<i>CyO</i>	<i>Curly of Oster</i>
Cys-fs	cysteine to frameshift
<i>dCycE</i>	<i>Drosophila Cyclin E</i>
DMSO	dimethyl sulfoxide
<i>dRas</i>	<i>Drosophila Rat sarcoma viral oncogene</i>
<i>Dsor1</i>	<i>Downstream of raf1</i>
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
<i>FM6</i>	<i>First Multiple 6</i>
<i>FM7a</i>	<i>First Multiple 7a</i>
<i>FM7c</i>	<i>First Multiple 7c</i>
<i>FTR</i>	<i>FM7c-Tb-RFP</i>
FOLFIRINOX	a combination of fluorouracil, leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin
G12D	G to D missense mutation in <i>KRAS</i> or <i>dRas</i>
GEMM	genetically-engineered mouse model
GnPa	combination of gemcitabine and nab-paclitaxel
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HA	hemagglutinin tag
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HD	homozygous deletion
HE	hematoxylin-eosin

HPF	high power field
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
ICR	Institute of Cancer Research
IHC	immunohistochemistry
LOF	loss of function
LSK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
ATF2	Activating transcription factor 2
M	mol/L
<i>Med</i>	<i>Medea</i>
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
mRNA	messenger RNA
MSI-H	microsatellite instability-high
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
Ns	Non-silencing siRNA
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PBS	Phosphate-buffered saline
PDX	patient-derived xenografts
PLK	Polo-like kinase 1
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
p/s/cm ² /sr	photons/sec/cm ² /steradian
RTK	Receptor tyrosine kinase
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>
<i>Sgg</i>	<i>shaggy</i>
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
<i>SM5</i>	<i>Second Multiple 5</i>
<i>SM6a</i>	<i>Second Multiple 6a</i>

<i>Tb</i>	<i>Tubby</i>
Thr-fs	Threonine to frameshift
<i>TM6B</i>	<i>Third Multiple 6B</i>
TMA	tissue microarray
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</i> ^{G12D} , <i>UAS-p53</i> ^{shRNA} , <i>UAS-dCycE</i> , <i>UAS-Med</i> ^{shRNA}
UICC	Union for International Cancer Control
<i>w⁻</i>	<i>w¹¹¹⁸</i>
Wt	wild type

緒言

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る。我が国における膵がん患者の5年相対生存率は約13%にとどまり、2021年のがん部位別死亡者数の第4位である（国立がんセンター、2021年がん統計）。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おり、米国では部位別がん関連死亡者数の第3位から2030年までに第2位に浮上すると予測されている（Rahib et al, 2021）。膵がんに対する現在の標準治療は、外科的切除とFOLFIRINOX療法（fluorouracil、leucovorin、irinotecan、oxaliplatinの組み合わせ）やGnP療法（gemcitabineとnab-paclitaxelの組み合わせ）などの全身化学療法である。しかし、唯一根治を期待できる外科的切除に関しては、切除可能な症例は患者全体の3割未満に留まる（Halbrook et al, 2023）。また、現在適用されているこれらの化学療法は従来のgemcitabine単剤と比較して抗膵がん効果が高い一方で、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（Conroy et al, 2011; Von Hoff et al, 2013）。そして、分子標的薬であるEpidermal growth factor receptor（EGFR）阻害剤erlotinibとgemcitabineの併用療法はgemcitabine単剤と比較して、患者生存に大きく寄与しなかった（Moore et al, 2007）。さらに免疫チェックポイント阻害剤についても、治療適応となる高頻度マイクロサテライト不安定性変異（microsatellite instability-high : MSI-H）を有する患者の割合が1～2%程度にとどまるという問題点がある。このような状況から、膵がんの治療成績向上は世界的に喫緊の福祉課題となっている。

これを解決すべくこれまでに、培養ヒト膵がん細胞や遺伝子改変モデルマウス（genetically-engineered mouse model : GEMM）などの実験系を用いた解析が行われ、膵がん発生の素過程解明に大きく貢献してきた。例えば、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）の発生に活性型変異であるKRASが関与していること（Hingorani et al, 2003）や、KRASやTP53の変異が浸潤がんへの進行や転移を惹起していること（Hingorani et al, 2005）が、GEMMを用いた解析で見出された。しかし、培養がん細胞では臨床における臓器間相互作用や薬物応答性の再現が容易でないこと、またモデルマウスの解析は膨大な時間や経費などの研究資源を必要とすることが障害となり、膵がんの本態解明や治療法開発は期待されたほど進捗していない。このことから膵がんの創薬研究においては、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一層の拡充と、新規治療標的や治療薬の同定が極めて重要な課題となっている。

この状況を打破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。これは、哺乳類実験系を補完するハエの数々の利点を活用したものである。すなわちハエは、ヒト疾患に関わる遺伝子やシグナル伝達経路の遺伝的保存度が高く、遺伝子改変系統や解析手法が充実している。またハエは繁殖能力が高く約 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であるため、実験を効率的に進める事が可能である。実際に申請者の所属研究室では、甲状腺髄様がん (medullary thyroid cancer : MTC) 患者に認められる *RET* 活性化変異を模倣する、点変異ハエ *Ret* (*Ret*^{M955T}) を発現するモデルハエを作出した

(Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019; Yamamura et al, 2021)。そしてこのモデルハエを用いた遺伝学的スクリーニングを行い、キナーゼ阻害薬ソラフェニブの標的の中で阻害することで副作用を招来する標的「anti-target」として、MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1 (MKNK1) を同定した。さらに *in silico* モデリングを活用し、MKNK1 への親和性が低下するようにソラフェニブを構造改変することで、MTC モデルマウスにおいてより効果的で副作用の少ない新規リード化合物を開発することに成功した

(Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019; Yamamura et al, 2021)。この他にも、肺がんや大腸がん、口腔がん等多様ながんの遺伝子型を模倣した新規モデルハエを作出し、治療標的や新規治療薬候補を同定した成果が報告されている (Levine and Cagan, 2016; Bangi et al, 2019, 2021)。

これらの背景を踏まえ申請者の所属研究室では、この研究基盤を膵がん研究にも活用する着想を得た。まず、膵がん患者で高頻度に観察される四つの遺伝子の変異である、がん遺伝子 *KRAS* の活性化とがん抑制遺伝子群 *TP53*・*CDKN2A*・*SMAD4* の不活性化に着目した。膵がんにおいて、*KRAS* と *CDKN2A* の変異は、主に膵管上皮細胞から前がん病変である PanIN の発生に、一方で *TP53* と *SMAD4* の変異は前がん病変から浸潤がんへの進行に関与することが示唆されている (Morris et al, 2010)。さらに、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再現した内因性発がんモデル動物は現在までに存在していない。そこで申請者の所属研究室ではこの問題を解決すべく、この 4 遺伝子変異パターンを模倣した世界初のモデル動物である「4-hit ハエ」を作出した (Sekiya et al, 2023)。

この 4-hit ハエでは、膵がん患者の 9 割以上に認められる *KRAS* の活性化型変異である *KRAS*^{G12D} を、同様に一塩基置換したハエオルソログ *Drosophila Ras* (*dRAS*^{G12D}) を外来性に発現させることで模倣した。また、*p53* (*TP53* のハエオルソログ) と *Med* (*SMAD4* のハエオルソログ) の発現を、各遺伝子特異的な shRNA によりノックダウンした。一方 *CDKN2A* については、ハエオルソログが存在しないため、*Drosophila Cyclin E* (*dCycE*) の過剰発現によりその欠損を機能的に模倣した (Richardson et al, 1995) (図 1)。

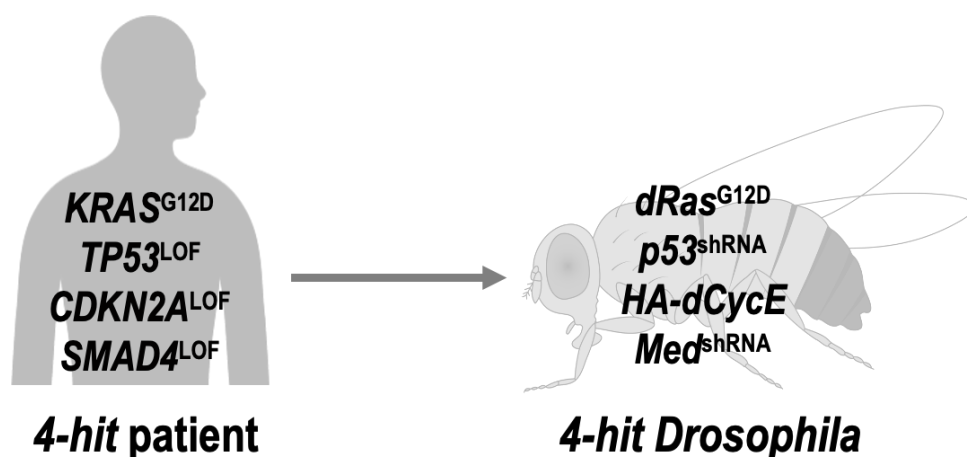


図 1. 膵がん患者で観察される 4 遺伝子変異パターンを模倣したモデルショウジョウバエの作出

膵がんでは最も予後不良の患者群が有する 4 遺伝子変異をショウジョウバエで模倣した。具体的には、*KRAS* の活性化を *dRas*^{G12D} の発現により、また *TP53* と *SMAD4* の機能欠損変異を遺伝子特異的な shRNA によるノックダウンで再現した。*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、*dCycE* の過剰発現により代替した。LOF、loss of function。HA、hemagglutinin tag。

なお、これらの導入遺伝子の発現には、ハエ実験で頻用される *GAL4-Upstream Activating Sequence* (UAS) 転写制御系を活用した。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 2)。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)。

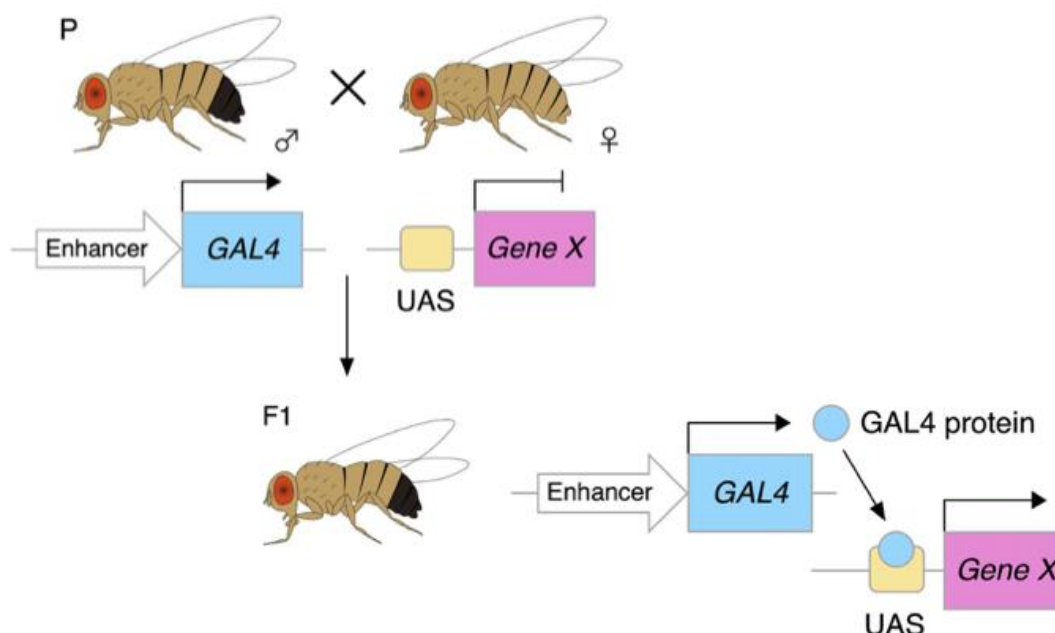


図 2. GAL4-UAS 転写制御系を活用したハエにおける外来遺伝子発現

特定のエンハンサー配列の活性によって細胞・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 から成る。P は親世代、F1 は子世代を示す。Yamamura et al, 2021 より改変。

これまで、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、翅原基が有用なモデル組織となることが報告されている (Vidal et al, 2005; Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019)。そこで申請者の所属研究室では、ドライバーとして *patched* (*ptc*) -GAL4 を使用して、翅原基中央の 10 細胞程度の幅の領域 (以後 *ptc* ドメインと呼称) に外来遺伝子を特異的に発現させ、形質転換した細胞の増殖能や遊走能の変化を解析した (図 3)。その結果、4 外来遺伝子非導入の *ptc-gal4;UAS-GFP* 対照ハエ

(*ptc>GFP* ハエ) と比較し、*dRas* 遺伝子の活性化のみ施した *ptc-gal4;UAS-dRas^{G12D}* ハエ (以後 *ptc>1-hit* ハエと呼称) では形質転換した細胞の増殖が亢進して *ptc* ドメインの幅が広がることが分かった。さらに、4 外来遺伝子を発現する *ptc-gal4;UAS-dRas^{G12D},p53^{shRNA},HA-dCycE,Med^{shRNA}* ハエ (以後 *ptc>4-hit* ハエと呼称) の翅原基では、形質転換した細胞の増殖が一層活発になり、*ptc* ドメインから離脱する細胞も現れた (図 3) (Sekiya et al,

2023)。加えて、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 3）

（Sekiya et al, 2023）。これらは、遺伝子変異数の蓄積に伴い患者の予後が悪くなるとの臨床報告（Qian et al, 2018）と矛盾しない結果であった。以上の結果より申請者らは、*4-hit* ハエはヒト膵がんの遺伝子変異パターンを模倣した、上皮細胞の増殖能や遊走能の亢進、致死表現型といった悪性の形質を呈する新規モデル動物になりうると判断した。

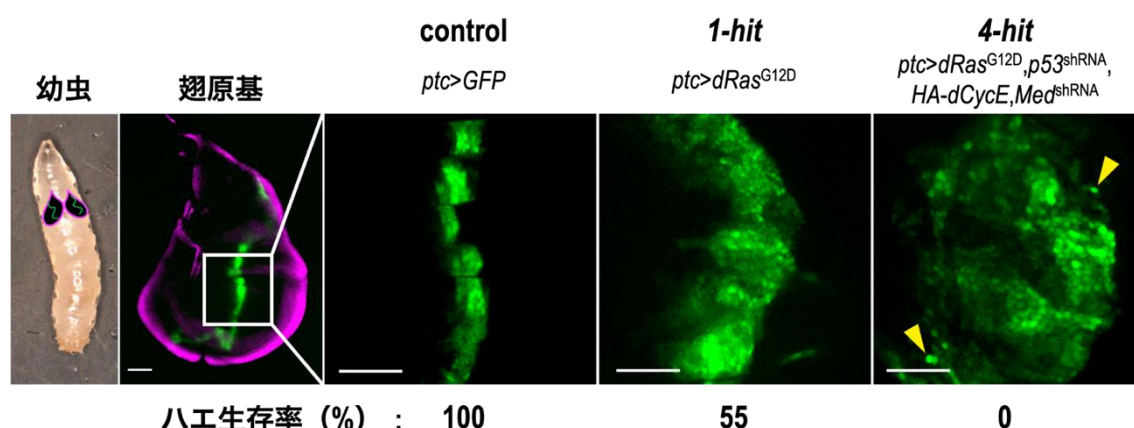


図 3．膵がんの遺伝子変異の蓄積による形質転換の促進

ハエ幼虫の翅原基（マゼンタ：輪郭）で、*ptc* プロモーター活性を利用して約 10 細胞ぶんの幅の単層上皮細胞に遺伝子操作を施した。黒い領域は野生型細胞を示す。*dRas* のみを活性化（*1-hit*）すると、細胞の増殖が亢進して帯が広がった。*ptc>4-hit* ハエでは一層増殖が活発になり、遊走能が亢進した細胞を認めた（矢頭）。ハエの生存率は、対照（control）の *ptc>GFP* ハエでは 100%だったのに対して、*ptc>4-hit* ハエでは 0%であった。スケールバーは 50 μ m を示す。Sekiya et al, 2023 より改変。

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、膵がんを含んだ多くのがん種において遺伝子変異が頻繁に観察される。キナーゼは、がんの発生や進展において中心的な役割を果たすことから、がんの有用な治療標的とされてきた（Knight et al, 2010）。そこで所属研究室の先行研究では、膵がんの新規治療標的を探索すべくキナーゼに着目し、*4-hit* ハエを用いた遺伝学的スクリーニングを実施した。本遺伝学的スクリーニングにおいて、*Ser-gal4* ドライバーを用いた。*Ser-gal4* ドライバーは幼虫の翅原基中央を短軸方向に走行する領域に存在する上皮細胞において *gal4* の活性を示すドライバーである。*ptc-gal4* ドライバーではなく *Ser-gal4* ドライバーを

用いた理由として、*Ser-gal4* ドライバーの活性で 4 外来遺伝子を発現する *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、大規模な試料採取やスクリーニング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。具体的には、*Ser>4-hit* ハエと各キナーゼの遺伝子変異を有するハエを交配することで、*4-hit* ハエにキナーゼのヘテロ接合性変異を導入し、各キナーゼの活性低減が腫瘍形質に与える影響を個体レベルで評価した。同様の手法は所属研究室の成果を含め、肺がんや大腸がん、口腔がんなど多様ながん種の研究において、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実証されている（Vidal et al, 2005; Sonoshita et al, 2018; Ung et al, 2019; Yamamura et al, 2021; Levine and Cagan, 2016; Bangi et al, 2019, 2021）。所属研究室の先行研究では、ハエが有する全 252 種類のキナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異やノックダウンをそれぞれ *Ser>4-hit* ハエに導入したところ、ヒト *MEK* のハエオルソログである *Dsor1* (*Downstream of raf1*) のヘテロ接合性変異や、ヒト *AURKB* のハエオルソログである *aurB* (*Aurora kinase B*) のノックダウンが、*4-hit* ハエの致死性を救済することを見出した。さらに、*MEK* 阻害薬 *trametinib* と *AURKB* 阻害剤 *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も分かった（Sekiya et al, 2023）。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の同定に有用な新規研究手法であることを示している。

本研究において申請者は、この *4-hit* ハエを用いたスクリーニングによる膵がんの新たな治療標的と治療薬候補の同定を目指した。さらに、臨床検体や哺乳類モデルを相補的に活用することで、ハエから得た新規治療薬候補の抗膵がん効果の検証や、作用機序の解明を実施した。

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）。アッセイ用のハエの餌（以後アッセイ餌と呼称）を、以下の手順で作製した。まず、Brewer's yeast（MP Biomedicals ; Santa Ana, CA）、yeast extract（Sigma Aldrich ; St. Louis, MO）、bacto casitone（BD ; Franklin Lakes, NJ）、寒天（Fujifilm Wako ; Osaka, Japan）、スクロース（Fujifilm Wako）、グルコース（Fujifilm Wako）を超純水に入れ、加熱・冷却を3回繰り返して溶解した。次にこの溶液に、塩化マグネシウム（Fujifilm Wako）、塩化カルシウム（Fujifilm Wako）、プロピオン酸（Fujifilm Wako）、mold inhibitor（10% methyl-4-hydroxybenzoate in 95% ethanol）（Fujifilm Wako）を混合した。この溶液をプラスチックバイアル（Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA）に分注することで、アッセイ餌を作製した。ハエはこれらのバイアル中で飼育し、各温度のインキュベーター内に保管した。

2. 腭がん遺伝子型を模倣した 4-hit ハエの作出

申請者の所属研究室の先行研究（Sekiya et al, 2023）において用いた、4-hit ハエの作出方法を以下に示す。はじめに、非遺伝子組換えハエ *w1118* {以後 *w*、Bloomington *Drosophila* Stock Center（BDSC ; Bloomington, IN）} から RNeasy Mini Kit（Qiagen ; Hilden, Germany）を用いてメッセンジャーRNAを抽出し、これを ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix（Toyobo ; Osaka, Japan）を用いて逆転写して cDNA を作製した。続いて、この cDNA からヒト *KRAS* のオルソログである *Drosophila Ras85D* (*dRas85D*) を PCR 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 に置換して *dRas*^{G12D} を作製した。そしてこの *dRas*^{G12D} を、2つの UAS クローニングカセットおよび1つの shRNA クローニングカセットを有する pWALIUM（Bangi et al, 2019）にクローニングした。また、同ベクターに *Drosophila p53* (*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* ハエ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。同様に、*Drosophila Cyclin E* (*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、これら 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スクリーニング

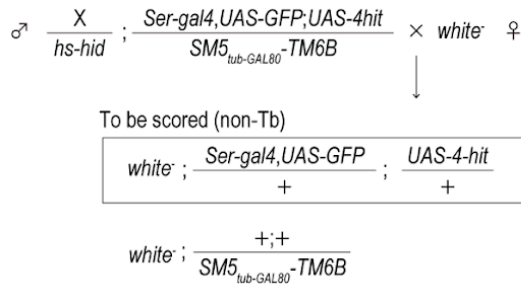
遺伝学スクリーニングにおけるハエの交配様式を図 4 に示す。本スクリーニングは、申請者の所属研究室の先行研究 (Sekiya et al, 2023) と同様の手法で実施した。各キナーゼの遺伝子変異や siRNA によるノックダウンを有するハエ系統を、Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC)、京都ストックセンター、国立遺伝学研究所より入手した。各遺伝子変異を有するハエ系統の一部は、遺伝子組換えを抑制するための balancer 染色体を保有しており、これらの染色体を、蛹の体長が短くなる *Tubby* (*Tb*) 遺伝子を発現する balancer 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 *First Multiple 6* (*FM6*)、*First Multiple 7a* (*FM7a*)、*First Multiple 7c* (*FM7c*)、*First Multiple 7i* (*FM7i*) を有するハエ系統は *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 *Curly of Oster* (*CyO*)、*Second Multiple 5* (*SM5*)、*Second Multiple 6a* (*SM6a*) を有するハエ系統は *CyO-Tb-RFP* (*CTR*) に、また 3 番染色体の balancer 染色体である *Third Multiple 3* (*TM3*)、*Third Multiple 6c* (*TM6C*)、*Minute-Karmoisin-Rosy-Stubble* (*MKRS*) を保有するハエ系統は *Third Multiple 6B* (*TM6B*) にリバランスした。これらの操作は、次世代のうちキナーゼの遺伝子変異を有する個体を、核酸増幅等による遺伝子型検定を行うことなく、*Tb* を保有せず体長が短くなっていない個体として肉眼的に簡便に識別するために実施した (図 4 A-I)。

ショウジョウバエは、1 ~ 4 番の 4 染色体を有し、1 番の対の染色体が性染色体を、そして 2 番から 4 番までの 3 対 6 本の染色体が常染色体を担う。本研究では、性染色体上のキナーゼ遺伝子の機能評価には、*Ser>4-hit*

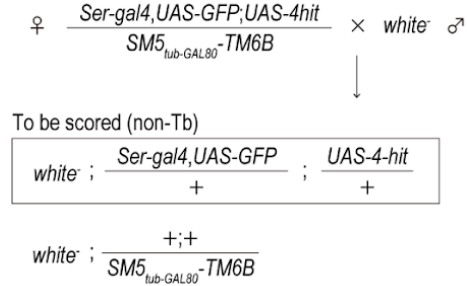
ハエの雄と、*w*もしくは各キナーゼの遺伝子変異を有する雌を交配した（図 4 A、C、D）。また、2～4 番染色体のキナーゼ遺伝子の機能評価には、*Ser>4-hit* ハエの雌と、*w*もしくは各キナーゼの変異を有する雄を交配した（図 4 B、E-I）。また、キナーゼのノックダウンによる遺伝学的スクリーニングにおいては、*Ser>4-hit* ハエの雌と、各キナーゼ遺伝子に対する siRNA を UAS 配列下に有する UAS-siRNA ハエの雄を交配した（図 4 J）。

これらの操作を通じ、各キナーゼのヘテロ接合性変異または siRNA ノックダウンをそれぞれ保有する *Ser>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。ここでは、27°C で親世代の交配および次世代の飼育を実施、産卵開始から 11 日目に蛹の総数と羽化した空の蛹の個数を計測して、その割合から生存率を算出した。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、機能的に相同であるヒト遺伝子をオルソログとした。

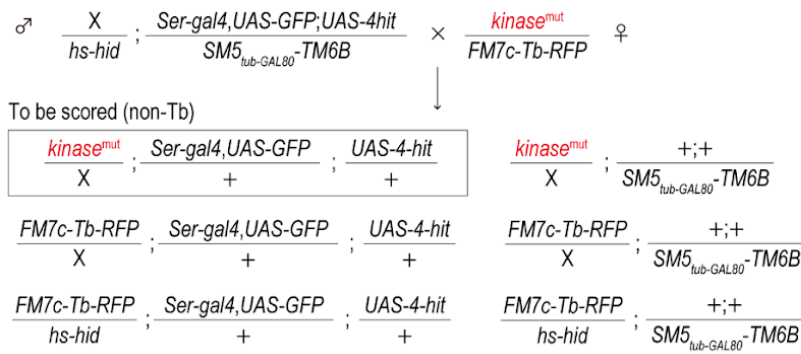
A Control (genetic screening for X chr)



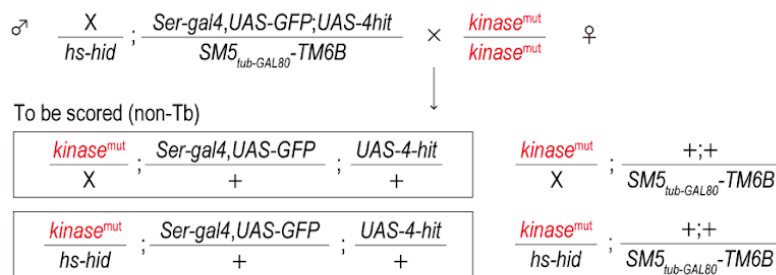
B Control (genetic screening for 2nd, 3rd, and 4th chr)



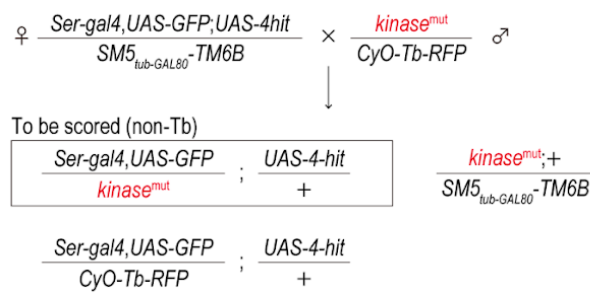
C Balanced mutant (X chr)



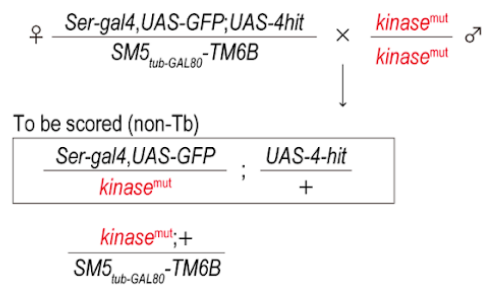
D Homozygote (X chr)



E Balanced mutant (2nd chr)



F Homozygote (2nd chr)



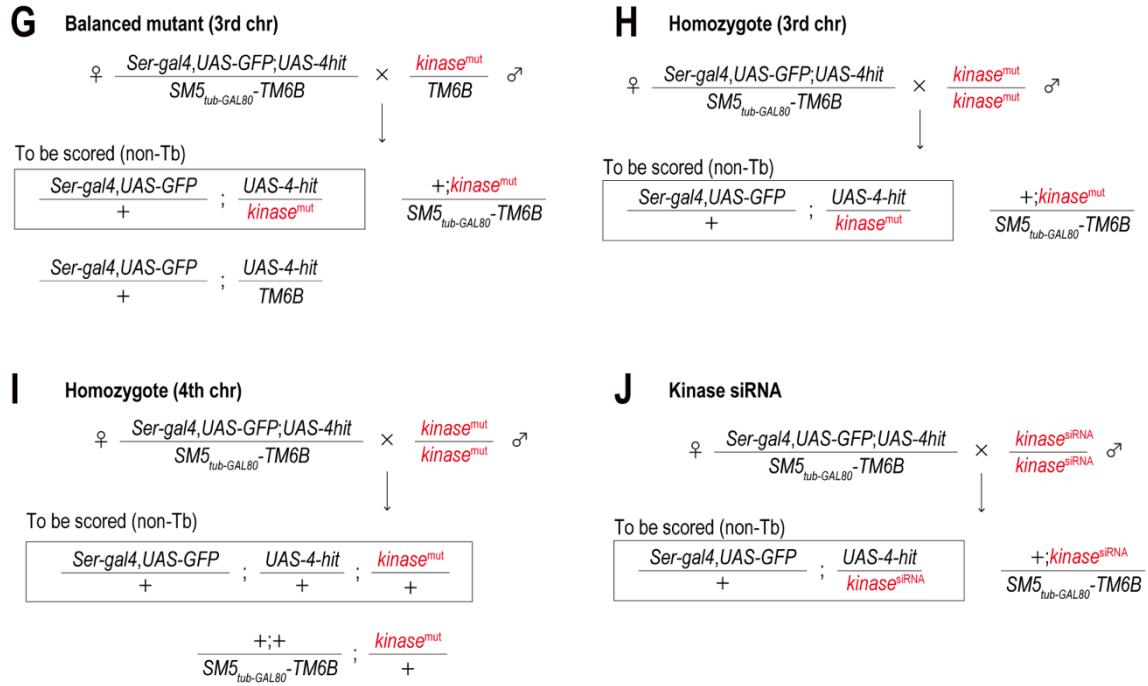


図 4. 遺伝学的スクリーニングにおけるハエの交配様式

(A–I) *4-hit* ハエを、キナーゼ遺伝子変異を有しない対照ハエ (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 *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対照ハエ (A、B) 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対照ハエ (B) の生存率を比較した。Sekiya et al, 2023 より引用。

4. 幼虫の翅原基の表現型解析

まず、*patched* (*ptc*) ドライバーハエの雄と *UAS-4-hit* ハエの雌を交配し、4 外来遺伝子を発現する *ptc>4-hit* ハエを産生した。実験に使用したハエの交配様式を図 5 に示す。次に、*ptc>4-hit* ハエの雄と、*w* または、キナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異もしくは siRNA ノックダウンを有するハエの雌を交配し、*Tb* を保有せず体長が短くなっていない三齢幼虫を、*4-hit* 遺

伝子を有する個体として同定した。そして、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 分間固定した。最後に、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、共焦点レーザー顕微鏡 DMI8（Leica；Wetzlar、Germany）を用いて観察した。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 Green fluorescent protein（GFP）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。

Wing disc analysis

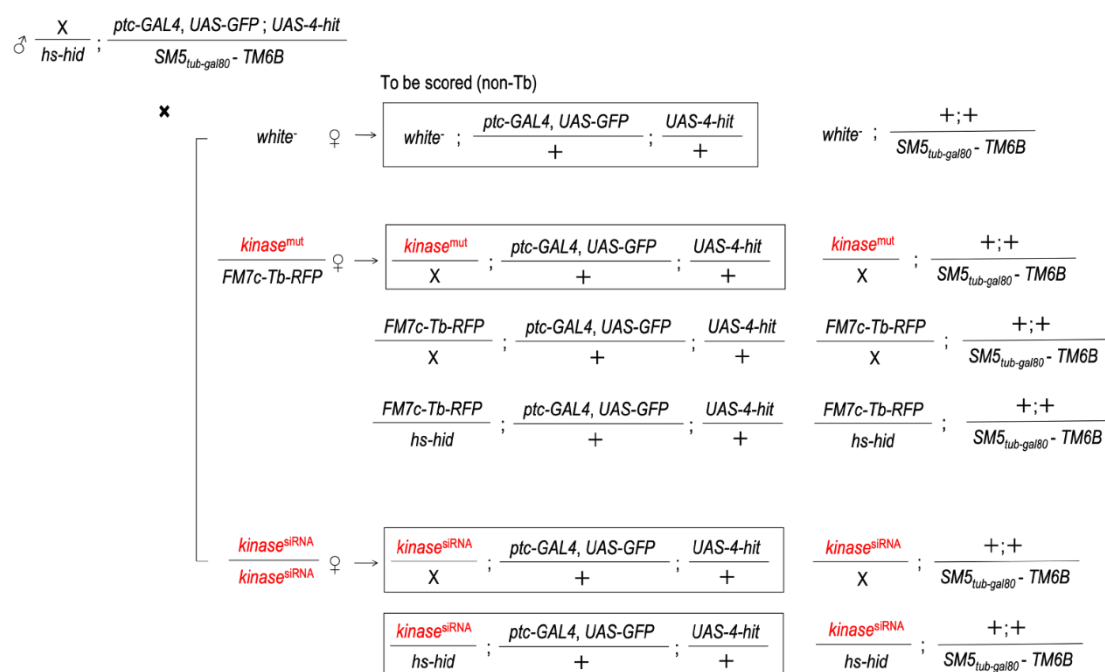


図 5．翅原基の表現型解析に使用するハエを得るための交配様式

ptc>4-hit ハエの雄と、キナーゼ遺伝子変異を有しない対照、キナーゼのヘテロ接合性変異または siRNA ノックダウンを有するハエの雌を交配し、それぞれの次世代の幼虫から採取した翅原基を解析した。*Tb* を保有せず体長が短くなっていない幼虫を、次世代のうち *4hit* 遺伝子を有する個体として識別した（四角枠内）。

5．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 年まで北海道大学消化器外科Ⅱで外科的切除が行われた膵がん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）を用いて解析を行った。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、最終的に合計 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 GSK3 β に対する一次抗体（表 1）を病理切片に滴下し、室温にて 30 分間反応させた。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、GSK3 β が膵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。GSK3 β の発現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%）、この両群間で生存率やその他の患者背景を比較した。また全生存期間（overall survival）を Log-rank 検定で解析した。また 2 群間における全生存期間のハザード比と 95%信頼区間、および P 値を Cox 比例ハザードモデルで算出した。

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）、Antigen（標的タンパク）、Host（免疫動物）、Source（入手元）、RRID、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。mAb、monoclonal antibody。CST、Cell Signaling Technology。IHC、immunohistochemistry。TMA、tissue microarray。

Designation	Antigen	Host	Source	RRID	Identifiers	Applications
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb	Phospho-ER (Thr202/Tyr204)	Rabbit	CST	AB_ 2315112	4370	IHC (1:500)
GSK-3β (D5C5Z) XP® Rabbit mAb	GSK3β	Rabbit	CST	AB_ 2636978	12456	TMA (1:400)
Ki-67 (SP6) Rabbit mAb	Ki-67	Rabbit	Nichirei Bioscience	Not available	418071	IHC (1:10)
β-catenin (D10A8) XP® Rabbit mAb	β-catenin	Rabbit	CST	AB_ 11127855	8480	IHC (1:200)

6. GSK3 特異的 RNA 干渉による培養ヒト膵がん細胞の増殖能の解析

(1) 培養ヒト膵がん細胞株の入手と培養方法

AsPC-1 と Capan-1 を、ATCC (American Type Culture Collection) から購入した。PANC-1 を、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。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。全ての細胞株を、表 2 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、37°C、5 %CO₂ にて培養した。

表 2. 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。

Cell line	Medium	FBS	Penicillin/streptomycin
PANC-1	Roswell Park Memorial Institute 1640	10%	1%
AsPC-1			
HEK293T	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	10%	1%
PCI-55			
Capan-1	Iscove's Modified Dulbecco's Media	20%	1%

(2) 培養ヒト膵がん細胞における GSK3 のノックダウンと siRNA 導入効率の評価

事前準備として、*GSK3 α* と *GSK3 β* に対する 2 種類ずつの低分子干渉 RNA (small interfering RNA : siRNA) と、対照の Non-silencing siRNA を、Thermo Fisher Scientific より入手した (表 3)。まず、 2×10^5 個の AsPC-1 を懸濁した培地 2 mL を 6 ウェルプレートに分注し、24 時間培養した。次に、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いてそれぞれの siRNA をトランスフェクションし、*GSK3 α* と *GSK3 β* をノックダウンした。

続いて、トランスフェクション 48 時間後のノックダウン細胞に Isogen II (Nippon Gene; Tokyo, Japan) を添加し、細胞溶解液を回収した。次に、スピнкаラム法で RNA を抽出し、このうち 1 μ g を ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて逆転写し cDNA を作製した。逆転写反応は 37°C で 15 分間、50°C で 5 分間、98°C で 5 分間の連続インキュベーションにて実施した。Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (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°C での 1 分間のインキュベーション後、95°C 15 秒間と 60°C 45 秒間のサイクルを 40 回繰り返した。比較定量は、 *β -actin* 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 4)。

表 3. siRNA リスト

RNA 干渉実験で使用した siRNA の配列を示す。

siRNA	Sequence	Identifiers
<i>GSK3α</i> validated siRNA s6236	GAAAGACGAGCUUUACCUATT	# 4390824
<i>GSK3α</i> validated siRNA s6238	GGCUUACACGGACAUCAAATT	# 4390824
<i>GSK3β</i> validated siRNA s6239	CUCAAGAACUGUCAAGUAATT	# 4390824
<i>GSK3β</i> validated siRNA s6241	GCUAGAUCACUGUAACAUATT	# 4390824
Select Negative Control #2 siRNA	Not available	# 4390847

表 4. プライマーリスト

遺伝子ノックダウン効率評価の RT-qPCR ならびに培養ヒト膵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>GSK3α</i>		CCCTGGACAAAGGTGTTCA	CCAGCACTGAAGTTGAAGAGAG
	<i>GSK3β</i>		AAGTAATCCACCTCTGGCTACC	AGAAGCAGCATTATTGGTCTGTC
Genomic sequencing	<i>KRAS</i>	2	GTTTGATTAAAAAGGTACTGGTGGA	ATCAAAGAATGGTCCTGCAC
		3	AGGTGCACTGTAATAATCCAGACT	GCATGGCATTAGCAAAGACTCA
	<i>TP53</i>	3	CCTGGTCCTCTGACTGCTCT	AAGTCTCATGGAAGCCAGCC
		4, 5	CTGAGGTGTAGACGCCAACT	TTGCACATCTCATGGGGTTA
		6	TGCTTGCCACAGGTCTCC	GGTCAGAGGCAAGCAGAGG
		7	CAAGGGTGGTTGGGAGTAGA	TAAGTCACCCCTTGGTCTCC
	<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	TGAAAGTTTTAGCATTAGACA	TTCAATCACCCTAAATCAA
		9	TTTCTCATGGGAGGATGTTT	CAATTTTTTAAAGTAACTATCTGAC
		10	AAGCATGCTATACAATCTGAACTAAAA	CAATTCCTTTGACAACAAATAGAGC
		11	GAATTTTTCTTTATGAACTCATAG	TTTAAAAAAGAATGAAAAGCATAC
		12	AGGGAGGATGGGAAGAGATCA	TAAGGTAAAGGGCCCCAACG

(3) *GSK3* ノックダウン細胞の増殖能解析

GSK3 をノックダウンした細胞の増殖能を評価するため、ソフトアガーコロニー形成アッセイを実施した。まず、Agar (Fujifilm Wako ; Osaka, Japan) と超純水を使用して 3%寒天溶液を作製した。次に、ヒートブロックで 3%寒天溶液を 100℃、30 分間加熱した。この溶液を培地で 6 倍希釈し、1 ウェルあたり 400 μ L ずつ 12 ウェルプレートに分注した後に、室温で 1 時間静置してボトムレイヤーを作製した。最後に、3%寒天溶液と、siRNA をトランスフェクションして 48 時間後の AsPC-1 8×10^3 個を含んだ培地で 10 倍希釈し、1 ウェルあたり 400 μ L ずつボトムレイヤーの上層に分注した。37℃、5% CO₂ にて、7 日間培養した後に、光学顕微鏡下での 4

視野 [400 high power field (HPF)] の合計における各コロニーの長径を計測し、コロニー数をカウントした。1 HPF は 0.1962 mm^2 に相当し、コロニーの長径 (ϕ) は $\phi < 60 \text{ }\mu\text{m}$ 、 $60 \leq \phi < 100 \text{ }\mu\text{m}$ 、 $100 \text{ }\mu\text{m} \leq \phi$ の 3 群に分類した。

7. 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 5 に示す。全ての化合物は dimethyl sulfoxide (DMSO、Sigma Aldrich ; St. Louis、MO) に溶解して -80°C で保存した。DMSO の最終濃度を、化合物を単独で投与する場合は 0.1% に、二剤投与する場合は 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アッセイ餌を入れ、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。また、全ての化合物について、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。具体的には、最終濃度 100、400 μM の化合物を溶解した餌でそれぞれ非組換えハエ (w) を飼育し、溶媒のみの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濃度で MTD 試験を実施した。化合物スクリーニングで使用するハエは、図 6 のように作出した。本スクリーニングでは、UAS-4-hit ハエの雌と Ser-gal4 を有するハエの雄を溶媒のみの餌を入れたバイアル中で 3 日間交配し、化合物を含む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 または 23.5°C で行い、産卵開始から 13 日目に蛹の総数と羽化した空の蛹の個数を計測して生存率を算出した。生存率 (%) は、羽化した蛹数 / 全ての蛹数 $\times 100$ とした。

表 5. 化合物リスト

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

Designation	Primary target	Source	Identifiers
trametinib	MEK	MedChemExpress	HY-10999
CHIR99021	GSK3	MedChemExpress	HY-10182
SB216763	GSK3	MedChemExpress	HY-12012
AR-A014418	GSK3	MedChemExpress	HY-10512
LY2090314	GSK3	MedChemExpress	HY-16294

CHIR-98014	GSK3	MedChemExpress	HY-13076
TWS119	GSK3	MedChemExpress	HY-10590
Tideglusib	GSK3	MedChemExpress	HY-14872
SB415286	GSK3	MedChemExpress	HY-15438
AZD2858	GSK3	MedChemExpress	HY-15761
AZD1080	GSK3	MedChemExpress	HY-13862
TDZD-8	GSK3	MedChemExpress	HY-11012
IM-12	GSK3	MedChemExpress	HY-12292
1-Azakenpaullone	GSK3	MedChemExpress	HY-59090
Bikinin	GSK3	MedChemExpress	HY-12524
BIO-acetoxime	GSK3	MedChemExpress	HY-15356
Indirubin-3'-monoxime	GSK3	MedChemExpress	HY-19807
A1070722	GSK3	MedChemExpress	HY-107531
BIP-135	GSK3	MedChemExpress	HY-111055
VP3.15	GSK3	MedChemExpress	HY-128879
BRD0705	GSK3	LC Laboratories	HY-116830
CP21R7	GSK3	LC Laboratories	HY-100207
paclitaxel	microtubule	LC Laboratories	P-9600

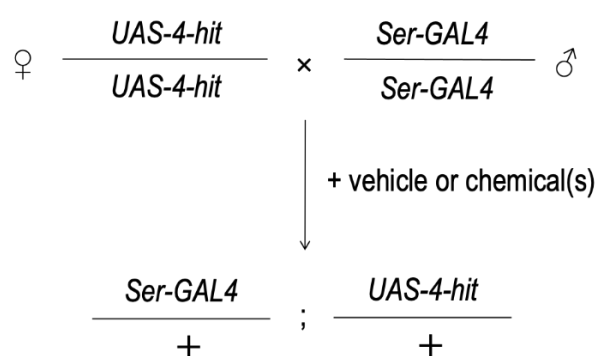


図 6．化合物スクリーニングに使用したハエの交配様式

UAS-4-hit ハエと *Ser* ドライバーハエを交配し、その仔ハエに溶媒のみ、もしくは化合物を混入したアッセイ餌を与え、生存率を測定した。

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。まず、各群 7 匹ずつの雌の BALB/c-nu/nu マウス（8 週齢、CLEA）に、溶媒である Cremophor EL とエタノール、または溶解した化合物の CHIR99021 を生理食塩水で 2 倍希釈し、4.0 mg/kg/日を腹腔内投与した。同時に、溶媒である DMSO、または溶解した 1.0 mg/kg/日の trametinib を生理食塩水で 20 倍希釈し、経口投与した。その後、7 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。最終的に、溶解度の上限（CHIR99021：40 mg/kg/日）まで投与した。

9. マウスを用いた薬物動態試験

マウスにおける CHIR99021 の薬物動態試験は、Medicilon（Shanghai, China）にて実施した。6 週齢の雄の ICR（Institute of Cancer Research）マウスに、1：1 の割合で配合した Cremophor EL（Nacalai Tesque）とエタノール（Fujifilm Wako）に溶解した 4 mg/kg と 10 mg/kg の CHIR99021 を生理食塩水で 2 倍に希釈して腹腔内投与し、0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24 時間後の CHIR99021 の血漿中濃度を各群 3 匹ずつ測定した。

10. 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）の三種混合皮下麻酔下に実施した。そして、処置終了後に 150 mg/kg の塩酸アチバメゾール（Kyoritsuseiyaku）を皮下投与し、麻酔を拮抗して覚醒させた。

（2）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（pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1）は Takara Bio（Otsu, Japan）より購入した。まず、ルシフェラーゼの cDNA を挿入した pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 と Lentiviral High Titer Packaging Mix（Takara Bio）を、ViafectTM（Promega；Madison, WI）を用いて HEK293T（RIKEN BRC）に同時にトランスフェクションした。48 時間後、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。そして濾過した上清を、4.0 μ g/mL のポリブレン（Nacalai Tesque）と共に、6 ウェルプレートに播種した培養ヒト膵がん細胞株 AsPC-1 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、10³ 個の細胞を 100 mm

ディッシュに播種した。最後に、蛍光顕微鏡を使用し、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。

(3) 同所性移植モデルマウスの作製と投薬実験

AsPC-1-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 (8 週齢、CLEA) の左側腹部を切開して露出した臍尾部に接種した。その際、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、絶対値を算出した。まず、同所性移植した AsPC1-Luc が、マウスの臍臓に生着していることを確認するため、移植後 28 日目までの週 1 回 IVIS で腫瘍発光強度を経時的に測定した。続いて投薬実験においては、移植後 14 日目に平均発光強度が均等になるようにマウスの群分けを行った。各群のマウスには、①溶媒 (Cremophor EL とエタノールの腹腔内投与と DMSO の経口投与)、② CHIR99021 (10 mg/kg/日、腹腔内投与)、③trametinib (1.0 mg/kg/日、経口投与)、④CHIR99021 (10 mg/kg/日、腹腔内投与) と trametinib (1.0 mg/kg/日、経口投与) 併用の 4 群 (7 匹/群) に、合計 21 日間の投与を実施した。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。化合物投与期間中は、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって示された下記の徴候のいずれか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。

(4) 腫瘍検体の免疫組織化学染色

pERK と Ki-67 の免疫組織化学染色の実施に向け、AsPC1-Luc を同所性移植した雌の BALB/c-*nu/nu* マウス (8 週齢、CLEA) を、移植後 14 日目に平均発光強度が均等になるように投薬実験と同様の投薬内容で 4 群 (5 匹/群) に分類し、化合物を投与した。また、 β -catenin の免疫組織化学染色では、①溶媒 (Cremophor EL とエタノールの腹腔内投与) と② CHIR99021 (10 mg/kg/日、腹腔内投与) の 2 群 (7 匹/群) に分類し、化合物を投与した。そして、化合物投与開始後 5 日目に腫瘍検体を採取して 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を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 SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific) 中で室温にて 30 分間ブロッキングし、続いて表 1 に記載する濃度に希釈した一次抗体を同 Buffer に添加して 4℃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 30 分間反応させ、ImmPACT DAB peroxidase substrate (Vector Biolabs) で抗体の局在を可視化した。最後に、核をヘマトキシリンで対比染色し、エタノールで脱水後にキシレンで透徹した。腫瘍検体の解析は Keyence BZ-X800 Analyzer (Keyence ; Osaka, Japan) を用いて行い、各組織切片内から無作為に抽出した 3 視野 (48 HPF) における、Ki-67、pERK、または β -catenin が存在する割合 (染色陽性腫瘍細胞と全腫瘍細胞の比) を算出した。

(5) 腫瘍検体のリン酸化抗体アレイ

雌の BALB/c-*nu/nu* マウス (8 週齢、CLEA) に AsPC1-Luc を同所性移植したのち、①溶媒 (DMSO の経口投与と Cremophor EL とエタノールの腹腔内投与) と②CHIR99021 (10 mg/kg/日の腹腔内投与) と trametinib (1.0 mg/kg/日の経口投与) 併用の 2 群 (5 匹/群) に分類し、化合物を 5 日間投与した。次に、各群 5 匹のマウスから腫瘍検体を合計 5 mg (1 mg/匹) 採取し、これらを使用してリン酸化抗体アレイ解析を実施した。この解析では、代表的な細胞シグナル伝達経路に含まれるタンパク 304 種それぞれに対するリン酸化タンパク特異的抗体と非リン酸化タンパク特異的抗体が対となり搭載されている Cell Signaling Phospho-Antibody Array (Full Moon Biosystems ; Sunnyvale, CA) を用いた。アレイのガラススライドを GenePix 4000B scanner (Axon Instruments ; Foster City, CA) でスキャンし、GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments) を用いて、各タンパクの蛍光シグナル強度を測定した。各群における、同一タンパクに対するリン酸化シグナル比 (リン酸化タンパク特異的抗体と非リン酸化タンパク特異的抗体のシグナル強度との比) を算出した後に対照群と比較し、Volcano plot を作成した。

1.1. 化合物添加による膵がん細胞の増殖能解析

(1) ソフトアガーコロニー形成アッセイ

上述 {実験方法、第 6 項 (3)} の方法で、ソフトアガーコロニー形成アッセイで用いるボトムレイヤーを作製した。次に、培養ヒト膵がん細胞 $6 \sim 8 \times 10^3$ 個を含んだ培地を 3%寒天溶液で 10 倍希釈し、1 ウェルあたり 400 μ L ずつボトムレイヤーに重層した。そして 37℃、5% CO₂ にて 72 時間培養し、DMSO に溶解した化合物 (DMSO 最終濃度 0.2%) を含む培地を

200 μ L ずつ添加した。そして7日後に、光学顕微鏡下での4視野(400 HPF)における各コロニーの長径(ϕ)を計測し、 $\phi < 60 \mu\text{m}$ 、 $60 \leq \phi < 100 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{m} \leq \phi$ の3群に分類した。

(2) スフェロイド形成アッセイ

膀胱がん培養細胞 1×10^2 個を懸濁した培地 200 μ L を CELLSTAR® PS Microplate 96 Well U-Bottom Cell-Repellent Surface (Greiner Bio-one ; Kremsmuster, Austria) に分注し、72 時間培養した。次に、培地のみ 100 μ L を吸引し、DMSO に溶解した各化合物 (DMSO 最終濃度 0.2%) を 100 μ L ずつ添加した。さらに 72 時間培養したのち、生育したスフェロイドを含んだ培地 100 μ L を吸引し、opaque-walled 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) に移した。最後に、CellTiter-Glo 3D Reagent (Promega) を添加して 30 分間培養したのち、microplate reader (Biotek ; Winooski, VT) で各ウェルの吸光度を測定し、対照群に対する相対的な生細胞数を算出した。

(3) MTS アッセイ

培養ヒト膀胱がん細胞 $1 \sim 3 \times 10^3$ 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な生細胞数を算出した。

1 2. 膀胱がん細胞株のゲノムシーケンス

まず、 3×10^5 個の各ヒト培養膀胱がん細胞を 35 mm ディッシュに播種し、24 時間培養した。その後、これらの細胞にトリプシン処理を施して細胞を回収した。次に、DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen) を用いて、スピンカラム法で各細胞の DNA を抽出した。そして、抽出した DNA の標的エクソンを PCR 法で増幅し、2%アガロースゲルで電気泳動を行なった。続いて、増幅した標的エクソンを含むゲルをメス刃で切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。最後に、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて標的エクソンの塩基配列を解析した (北海道大学遺伝子制御研究所受託解析)。ゲノムシーケンスで用いたプライマーは、primer3Plus を用いて設計した (表 4)。

1 3. 統計解析

全ての統計解析は、JMP Pro 16.0 および R ver. 4.1.1 を用いて行い、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 の算出は、SynergyFinder (version 3.0.14) を用いて行なった。

実験結果

1. *Ser>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

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°C での成虫の段階における生存率を約 10% まで低下させた。先行研究においてこの生存率は、ヘテロ接合性変異の導入により形質転換表現型を抑制する「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、本研究の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)。申請者は *Ser>4-hit* ハエに、ハエの全キナーゼ遺伝子の約 90% を網羅する 220 のキナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異を導入した (図 7 A)。その結果、ヒト *GSK3* のハエオルソログである *shaggy* (*sgg*) と、ヒト *MEK* のハエオルソログである *Dsor1* のヘテロ接合性変異の導入が *Ser>4-hit* ハエの生存率を顕著に改善することが分かった (図 7 B)。すなわち、これらの遺伝子は *4-hit* ハエの形質転換表現型のサプレッサー遺伝子と言える。

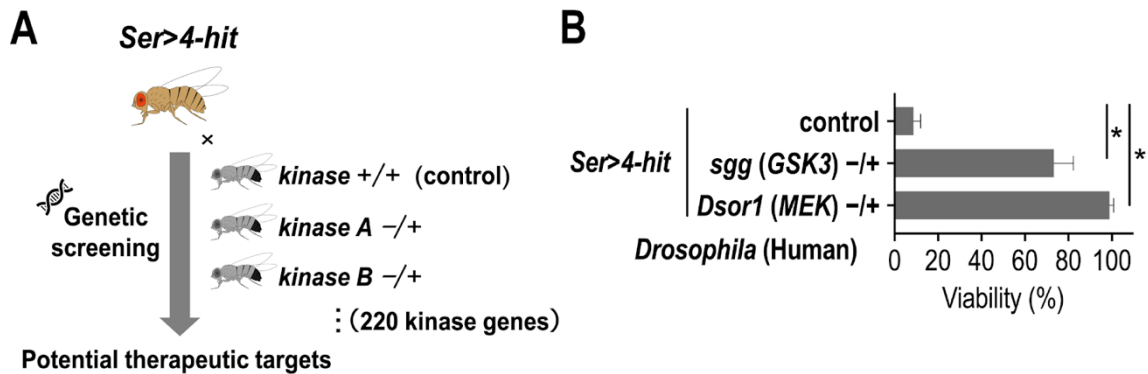


図 7. *Ser>4-hit* ハエを用いた網羅的遺伝学スクリーニングによるサプレッサー遺伝子 *sgg* の同定

(A) 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、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。(B) キナーゼのヘテロ接合性変異を導入していない、*Ser>4-hit* ハエ (対照) の生存率は 10% であった。一方で、*sgg* や *Dsor1* のヘテロ接合性変異は *Ser>4-hit* ハエの生存率を有意に改善した。* $P < 0.001$ (Dunnett 検定)。

続いて申請者は、*sgg* や *Dsor1* のヘテロ接合性変異が *ptc>4-hit* ハエの翅原基の *ptc* ドメインにおける腫瘍形質に与える影響を解析した。その結果、これらの遺伝子のヘテロ接合性変異の導入が *ptc* ドメインの形態異常を抑制することが分かった（図 8 A、B）。

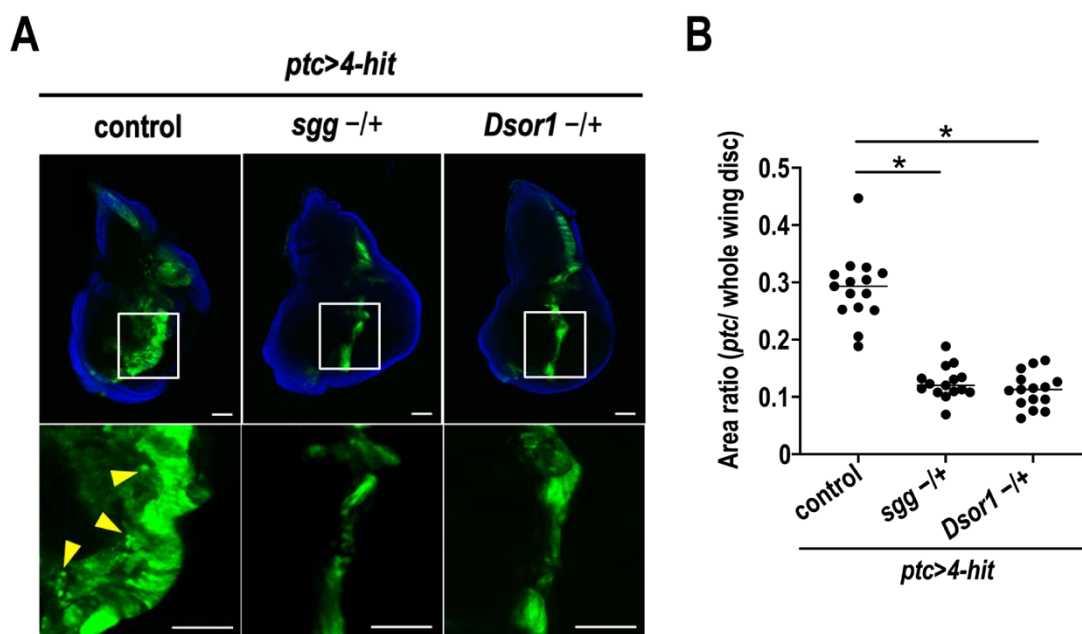


図 8. *sgg* や *Dsor1* のヘテロ接合性変異の導入による *ptc* ドメインの形態異常の救済

(A) *sgg* や *Dsor1* のヘテロ接合性変異の導入は、*ptc>4-hit* ハエの翅原基において、*ptc* ドメインの形態を 4 外来遺伝子非導入の対照 *ptc>GFP* ハエにおける同ドメインの形態（図 3）に近づけた。上段の四角枠で囲んだ部位を拡大した図を下段に示す。矢頭は遊走能が亢進した細胞を示し、スケールバーは 50 μ m を示す。(B) *sgg* と *Dsor1* のヘテロ接合性変異の導入により、翅原基全体の面積に対する *ptc* ドメインの面積の割合が低下した。 $*P < 0.001$ (Dunnett 検定)。

ここで申請者は、*sgg* や *Dsor1* がヘテロ接合性変異のように全身的ではなく、形質転換細胞特異的にノックダウンされた際にも *4-hit* ハエの表現型が抑制されるか検討するため、これらのキナーゼ遺伝子に対する siRNA を UAS 配列下に有するハエを *Ser>4-hit* ハエと交配した。その結果申請者は、*sgg* と *Dsor1* のノックダウンが *Ser>4-hit* ハエの致死性を救済すると共に（図 9 A）、*ptc>4-hit* ハエにおける翅原基の *ptc* ドメインの形態異常を改善することを見出した（図 9 B、C）。これらの結果は、*sgg* と *Dsor1* が少

なくとも形質転換細胞で腫瘍形成を促進する役割を果たしていることを示唆している。

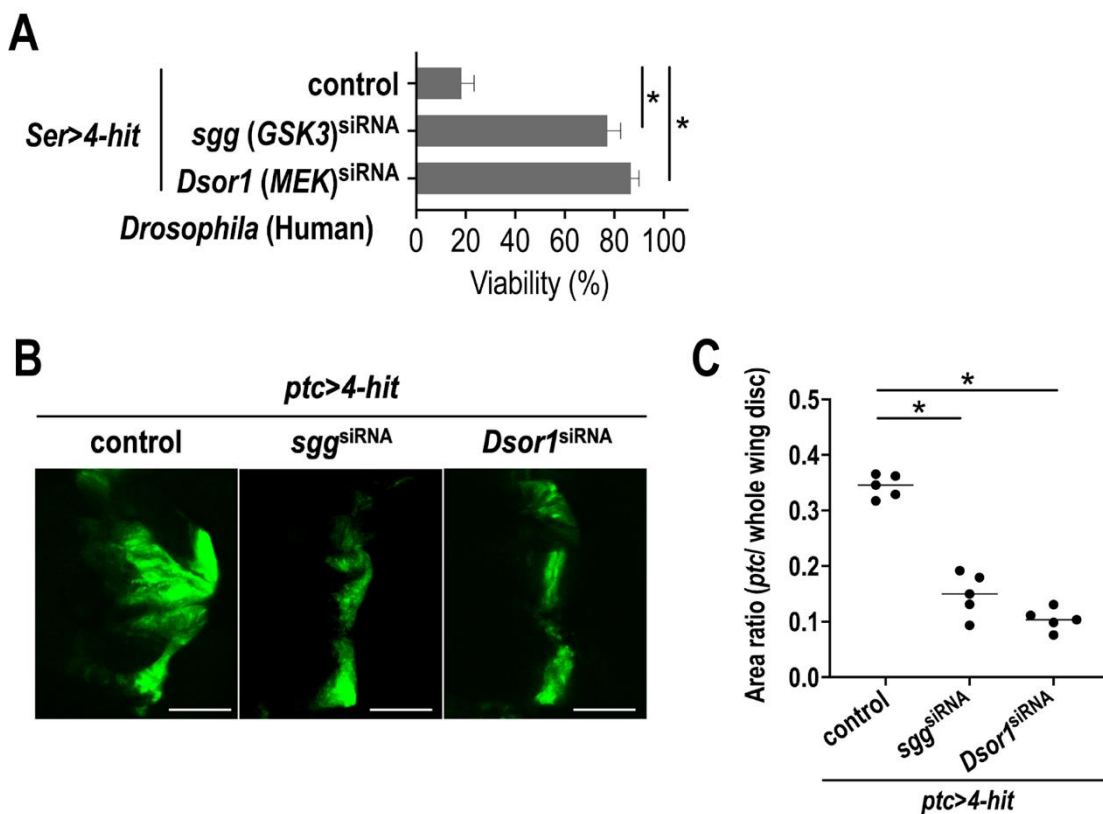


図 9. 各サプレッサー遺伝子のノックダウンによる *4-hit* ハエ表現型の抑制

(A) *sgg* や *Dsor1* のノックダウンは、*Ser>4-hit* ハエの生存率を有意に改善した。* $P < 0.001$ (Dunnnett 検定)。(B) *sgg* や *Dsor1* のノックダウンは、*ptc>4-hit* ハエの翅原基における *ptc* ドメインの形態異常を改善した。(C) 翅原基全体の面積に対する *ptc* ドメインの面積比。* $P < 0.001$ (Dunnnett 検定)。

2. GSK3 β と膵がん患者の予後の相関

申請者は、前項の遺伝学的スクリーニングにおいてその機能抑制により *4-hit* ハエの形質転換表現型の発現を抑制した GSK3 に着目した。GSK3 は GSK3 α と GSK3 β の 2 つのアイソフォームを有するセリンスレオニンキナーゼで、グリコーゲン代謝に関与する酵素として同定された (Embi et al, 1980)。データベースにおいて両者は共に、膵がん組織において正常膵組織と比較して mRNA の発現が亢進していることが知られている (図 10

A、B)。また、同データベースにおいて、 $GSK3\alpha$ の mRNA の発現量は患者予後と相関がないのに対して、 $GSK3\beta$ の mRNA の発現量は患者の予後不良と相関した（図 1 1 A、B）。 $GSK3\beta$ は、大腸がんや非小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、腎細胞がん、膀胱がんといった様々な固形腫瘍において、腫瘍組織内における発現量の増加と患者予後不良の関連が報告されている（Shakoori et al, 2005; Miyashita et al, 2009; Naito et al, 2010; Quintayo et al, 2012; Tsukigi et al, 2012; Salim et al, 2013; Vincent et al, 2014; Zhang et al, 2014; Bae et al, 2016; Zhao et al, 2017）。そこで、申請者は患者検体 TMA を用いて $GSK3\beta$ の発現の局在と、その発現と膵がん患者の予後との相関を解析した。

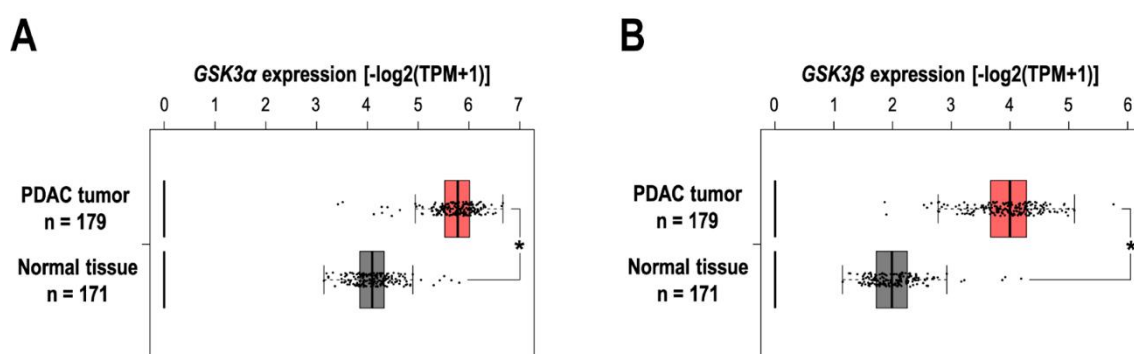


図 1 0．正常膵組織と比較しての患者膵がん組織中の $GSK3\alpha$ と $GSK3\beta$ の mRNA 発現量の増加

(A、B) $GSK3\alpha$ (A) と $GSK3\beta$ (B) の mRNA の発現量は、正常膵組織と比較し膵がん組織で有意に高かった。RNA シークエンスのデータを The Cancer Genome Atlas と Genotype-Tissue Expression のデータベースから取得し、GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) を利用してグラフを作成した。* $P < 0.001$ (one-way ANOVA 検定)。

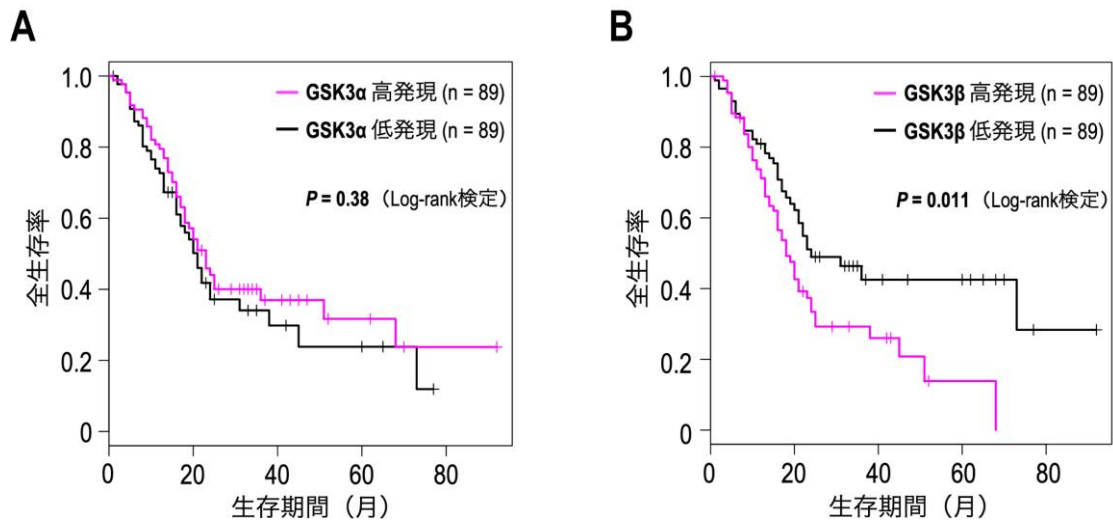


図 1 1. 患者膵がん組織中の *GSK3 α* と *GSK3 β* の mRNA の発現量と患者予後との関連

(A、B) *GSK3 α* (A) の mRNA の発現量は、膵がん患者の全生存期間と相関はなかった。*GSK3 β* (B) の mRNA の発現量は、膵がん患者の全生存期間の短縮と相関した。RNA シークエンスのデータを The Cancer Genome Atlas と Genotype-Tissue Expression のデータベースから取得し、GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) を利用してグラフを作成した。

まず申請者は、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 6) の病理組織から作製された TMA を使用し、*GSK3 β* に対する抗体を用いた IHC を実施して *GSK3 β* の発現を評価した。*GSK3 β* 陽性群と *GSK3 β* 陰性群の膵がん病理切片の代表的な写真を図 1 2 に示す。陽性群では、膵がん細胞の核内に *GSK3 β* の発現を認めた。この結果については、膵がんにおいて、前がん病変である PanIN から浸潤がんへ発生する過程において *GSK3 β* の核内発現が亢進するという報告と一致していた (Ougolkov et al, 2006)。

表 6. 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 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 (腫瘍進展度)	
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%)

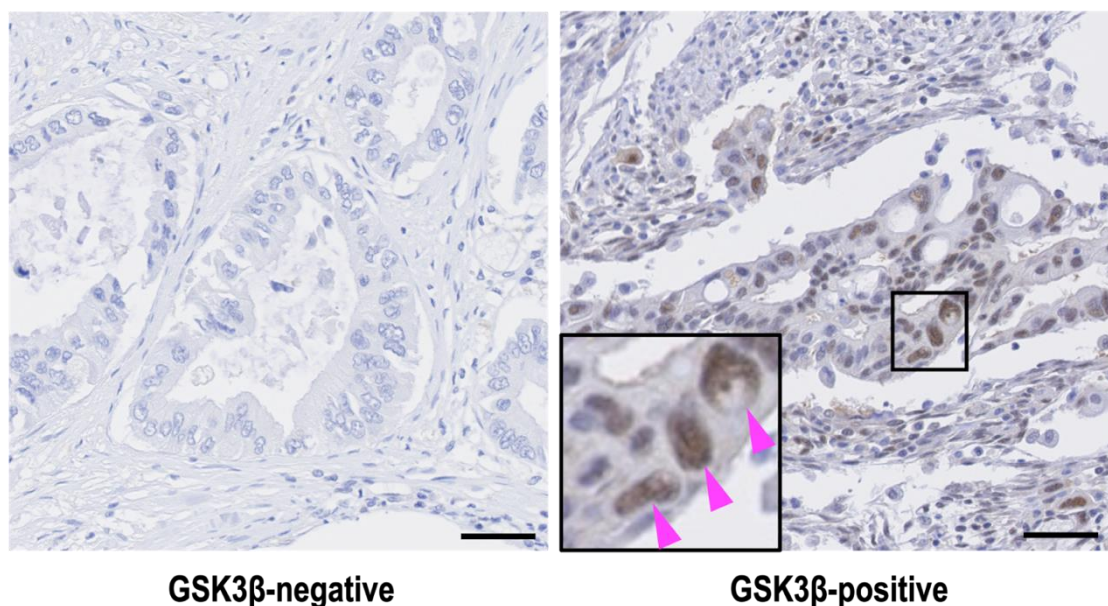


図 1 2. GSK3β 陽性群と GSK3β 陰性群における代表的な膵がん病理像
陽性群（右）では、膵がん細胞の核内に GSK3β の発現を認めた（矢頭）。スケールバーは 50 μm を示す。

次に申請者は、GSK3β 陽性群 29 例と陰性群 57 例との間で、TMA 検体の各コア内の全腫瘍細胞に対する GSK3β 陽性細胞の割合と臨床病理学的背景を比較した。その結果、陽性群の方が陰性群よりも病理学的病期分類 III と IV の占める割合が有意に高いことが分かった（表 7）。

表 7. GSK3β 陽性群と陰性群の臨床病理学的背景の比較

86 症例を GSK3β 陽性群（29 症例）と陰性群（57 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、*は中央値（括弧内は四分位）を示す。P 値はカイ 2 乗検定または Fisher の直接検定で算出し、年齢は Wilcoxon 検定（**）で比較した。

	GSK3β		P 値
	陽性群（n = 29）	陰性群（n = 57）	
年齢			
	66（60-72）*	68（59.5-73）	0.95 **
性別			
男性	18（62.1%）	34（59.7%）	0.83
女性	11（37.9%）	23（40.3%）	

pT			
1+2	17 (58.7%)	43 (75.4%)	0.11
3+4	12 (41.4%)	14 (24.6%)	
pN			
陰性	4 (13.8%)	19 (33.3%)	0.05
陽性	25 (86.2%)	38 (66.7%)	
pM			
陰性	26 (89.7%)	53 (93.0%)	0.59
陽性	3 (10.3%)	4 (7.0%)	
pStage			
IA-IIB	3 (10.3%)	19 (33.3%)	0.02
III-IV	26 (89.7%)	38 (66.7%)	
組織分化度			
高分化-中分化	26 (89.7%)	51 (89.5%)	1.00
低分化またはその他	3 (10.3%)	6 (10.5%)	

最後に申請者は、GSK3 β 陽性群と陰性群の全生存期間を比較した。その結果、陽性群の5年生存率は9%、陰性群は15%で、陽性群の方が陰性群よりも全生存期間が有意に短いことが分かった（図13）。

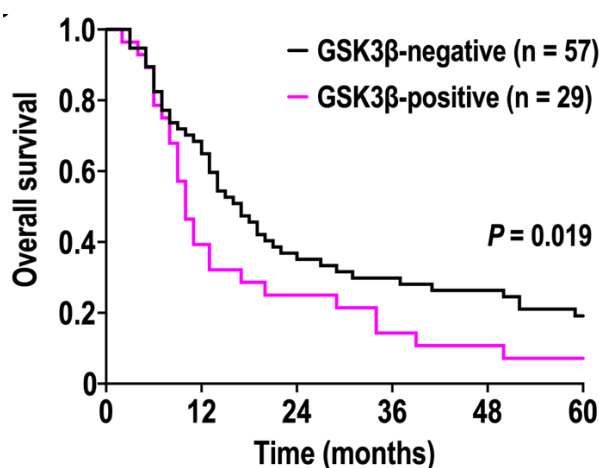


図13. GSK3 β 陰性群と比較しての陽性群の全生存期間の短縮

GSK3 β の核内発現は膵がん患者の全生存期間の短縮と相関した。GSK3 β 陽性群と陰性群における全生存期間の Kaplan-Meier 曲線。P 値は Log-rank 検定で算出した。

これらの結果から申請者は、4-hit ハエを活用した遺伝学的スクリーニングにより膵がんの治療標的候補として同定した GSK3 の発現が、膵がん患者の予後不良に関わることを見出した。

3. GSK3 のノックダウンが膵がん細胞の増殖能に及ぼす影響の解析

次に申請者は、GSK3 が膵がん細胞の増殖能に及ぼす影響を評価した。事前検討として、使用する培養ヒト膵がん細胞株から抽出したゲノム DNA を PCR 法で増幅し、本研究で着目している 4 遺伝子 (KRAS・TP53・CDKN2A・SMAD4) の塩基配列を解析した。その結果申請者は、既報 (Cancer Cell Line Encyclopedia) 通り AsPC-1 が 4-hit の変異プロファイルを有すること、一方 PANC-1 は SMAD4 が野生型の 3-hit の変異プロファイルを有することを確認した (表 8)。このうち申請者は、AsPC-1 に GSK3 α または GSK3 β の siRNA を導入した。その結果、AsPC-1 における GSK3 α や GSK3 β の mRNA の発現量は、対照と比較して有意に低下することが分かった (図 1 4 A、B)。

表 8. 各種ヒト膵がん細胞株の遺伝子変異プロファイル

申請者は、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、塩基配列を直接シーケンスした。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。Alteration の数字はコドン番号を示す。Gly to Asp、Glycine to aspartic acid。Cys-fs、cysteine to frameshift。Thr-fs、Threonine to frameshift。Arg to His、Arginine to Histidine。Arg to Thr、Arginine to Threonine。Met to Ile、Methionine to Isoleucine。Gly to Val、Glycine to Valine。Ala to Val、Alanine to Valine。Ser-Stop、Serine-Stop codon。HD、homozygous deletion。Wt、wild type。

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

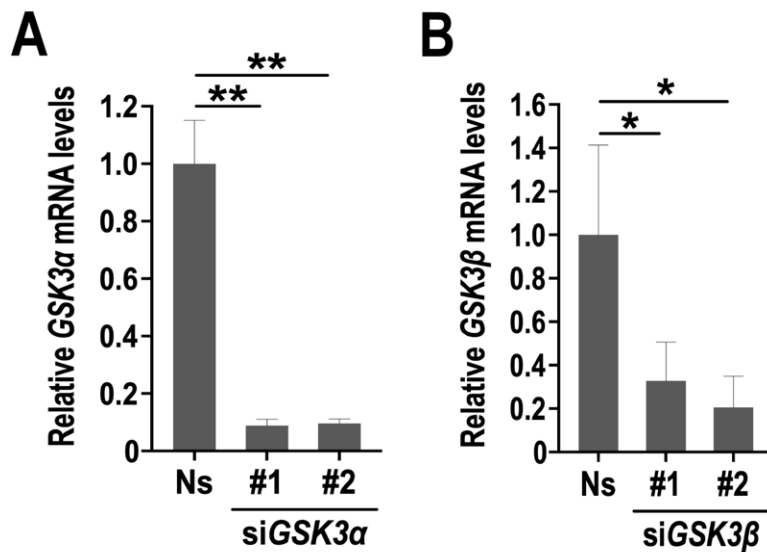


図 1 4. siRNA の導入による、培養ヒト膵がん細胞における *GSK3α* および *GSK3β* の遺伝子発現の抑制

(A、B) AsPC-1 細胞に、*GSK3α* (A) または *GSK3β* (B) に対するそれぞれ 2 種類の siRNA (si*GSK3α* #1 および #2、si*GSK3β* #1 および #2) を独立に導入し、48 時間後に mRNA の発現量を RT-qPCR 法で測定した。AsPC-1 における *GSK3α* や *GSK3β* の mRNA の発現量は、Non-silencing siRNA (Ns) を導入した対照と比較して有意に低下した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ (Dunnett 検定)。

次に申請者は、*GSK3α* ノックダウンあるいは *GSK3β* ノックダウン AsPC-1 細胞のソフトアガーコロニー形成能を解析した。*GSK3α* または *GSK3β* をノックダウンした AsPC-1 細胞は、対照と比較してコロニー形成数が有意に減少した (図 1 5 A、B)。興味深いことに、*GSK3α* と *GSK3β* を同時にノックダウンすると、*GSK3α* もしくは *GSK3β* を各々ノックダウンした場合と比較してコロニー形成数はさらに減少した (図 1 5 B)。これらの結果より申請者は、膵がん細胞において *GSK3α* と *GSK3β* を同時に阻害することで、より高い抗膵がん効果が得られる可能性があるかと推察した。

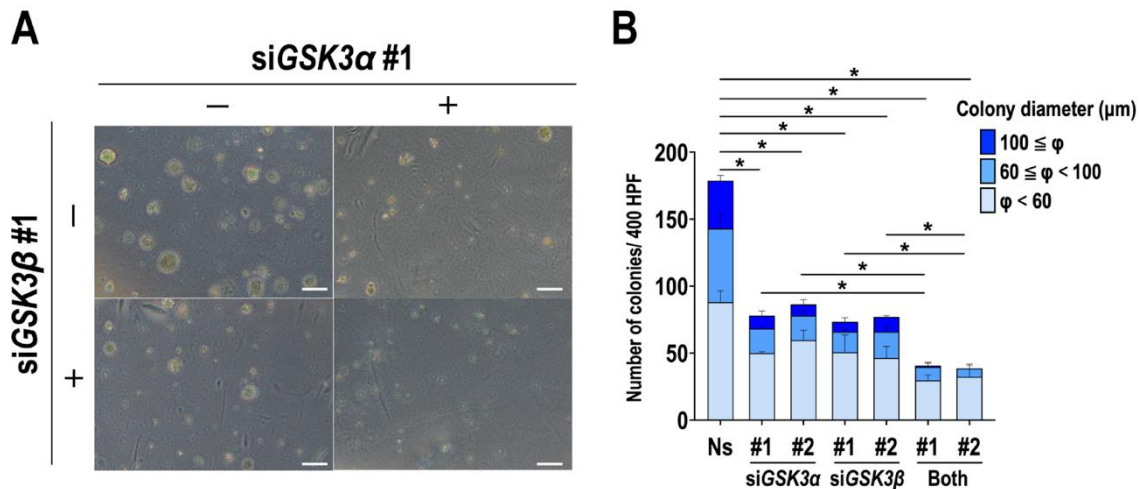


図 1 5. *GSK3α* または *GSK3β* のノックダウンによる培養ヒト膵がん細胞の増殖の抑制

(A) ソフトアガーコロニー形成アッセイにて、si*GSK3α* #1 または si*GSK3β* #1 を導入した AsPC-1 細胞における、培養 7 日目のコロニー数を測定した。スケールバーは 200 μm を示す。(B) *GSK3α* (si*GSK3α* #1、#2) または *GSK3β* (si*GSK3β* #1、#2)、*GSK3α* と *GSK3β* の同時ノックダウン (Both) は、AsPC-1 細胞のコロニー形成を抑制した。**P* < 0.001 (Dunnett 検定)。Ns、Non-silencing siRNA。HPF、high power field。

4. *Ser>4-hit* ハエを用いた GSK3 阻害剤の個体スクリーニング

これまでに所属研究室は先行研究で、入手可能な MEK 阻害剤 26 種を *Ser>4-hit* ハエに経口投与し生存率を評価する化合物スクリーニングを行い、trametinib が *Ser>4-hit* ハエの生存率を改善することを見出していた (Sekiya et al, 2023)。trametinib は *BRAF* 遺伝子変異を有する悪性黒色腫と非小細胞性肺がん保険適応のある MEK 阻害薬だが (Flaherty et al, 2012; Planchard et al, 2016)、膵がんにおいては標準治療薬 gemcitabine への上乗せ効果は認められなかった (Infante et al, 2014)。そこで申請者は、trametinib に GSK3 阻害剤を組み合わせることで各々の単剤投与よりも高い抗膵がん効果を得ることができると推察した。この仮説を検証すべく、まず申請者は、非遺伝子組換えハエを用いて入手可能な GSK3 阻害剤 23 種の MTD 試験を実施し、各化合物の MTD を決定した (図 1 6)。

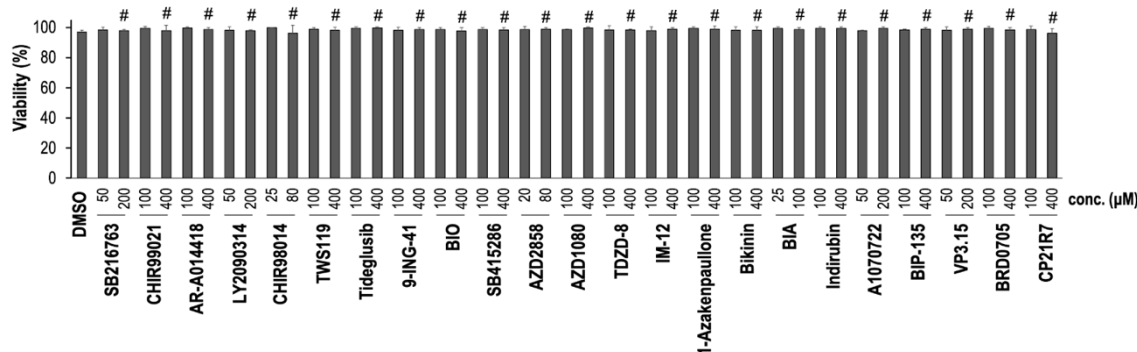


図 1 6．GSK3 阻害剤 23 種の MTD の決定

各化合物の投与濃度を溶解度に応じて設定し、アッセイ餌に混ぜ w⁻ハエに経口投与した生存率を測定した。そして、ハエ生存率に影響が出ない最高濃度 (#) を各化合物の MTD と定め、続く 4-hit ハエを用いた化合物スクリーニングに使用する最大濃度とした。conc、餌中の化合物濃度。

次に申請者は、これらの MTD を最大濃度として GSK3 阻害剤 23 種を trametinib と組み合わせ、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確に検出できるように、化合物を摂取しない Ser>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。その結果申請者は、CHIR99021 (100 μM、400 μM) と SB415286 (100 μM) が、trametinib と併用した際に trametinib 単剤より高い生存率改善効果を示すことを見出した (図 1 7)。

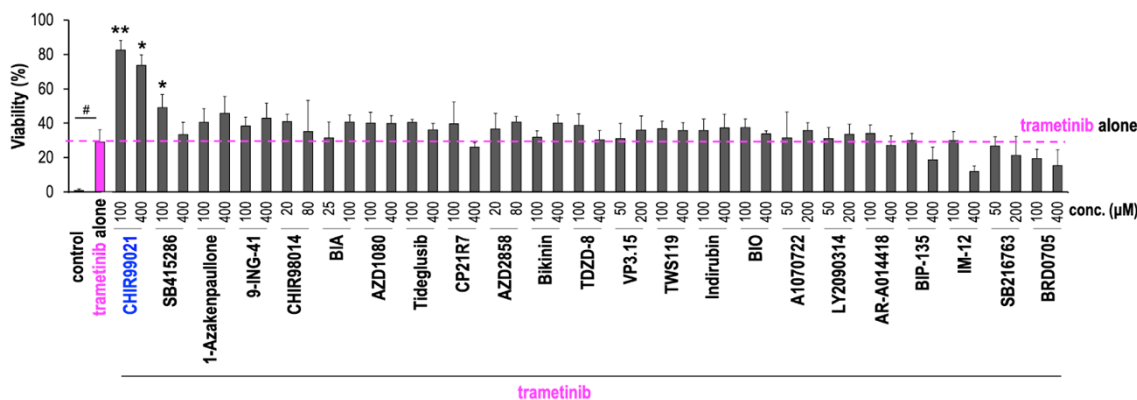


図 1 7．GSK3 阻害剤と trametinib の組み合わせが 4-hit ハエ生存率に与える影響

申請者は、0.5 μM の trametinib と GSK3 阻害剤 23 種を各々組み合わせてアッセイ餌に混入し、Ser>4-hit ハエに経口投与した。マゼンタの破線は trametinib 単独投与時の生存率を示す。conc、化合物濃度。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

0.01 (Dunnett 検定、trametinib 単剤との比較)、 $^{\#}P < 0.05$ (Student's *t* 検定)。

ここで申請者は、化合物スクリーニングにおいて最も *4-hit* ハエの生存率を改善した CHIR99021 と trametinib の組み合わせに着目した。CHIR99021 は GSK3 阻害剤の中で、特に GSK3 α と GSK3 β の両者に同等の選択性を示す阻害剤である (Wagman et al, 2004)。CHIR99021 と trametinib の併用投与の効果の解析にあたり申請者は、二剤の組み合わせ効果により *Ser>4-hit* ハエの生存率が 100%に達する、すなわち頭打ちの状態に達することのない条件下で解析することを目的とし、ハエの飼育温度を 22°C から 23.5°C に上げて化合物の投与試験を実施した。飼育温度を上げることによって、温度依存性である GAL4 の活性を高め (図 2)、*Ser>4-hit* ハエにおける 4 外来遺伝子の発現を強めた結果、対照である *Ser>4-hit* ハエの生存率が 1%以下まで低下した。この条件下で、CHIR99021 と trametinib を投与したところ、この組み合わせが *Ser>4-hit* ハエの生存率を濃度依存的に改善し (図 18A)、さらにこれら二剤が相乗効果を示すことが分かった (図 18B)。

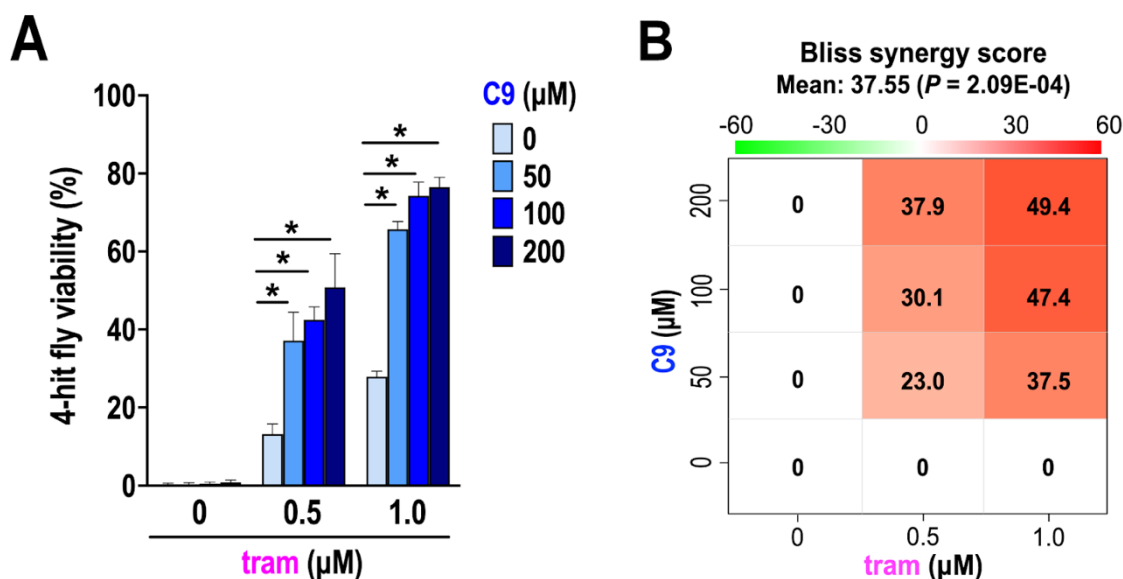


図 18. CHIR99021 と trametinib の組み合わせによる *4-hit* ハエ生存率の相乗的な改善

(A) CHIR99021 (C9) と trametinib (tram) の組み合わせ投与は濃度依存的に *Ser>4-hit* ハエの生存率を改善した。 $^{\ast}P < 0.001$ (Dunnett 検定)。

(B) 二剤の組み合わせ投与の効果は相乗的であった。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* 値は SynergyFinder で統計解析した。

これまで所属研究室は、阻害剤の薬効を評価する上で、ハエ成虫の羽が有用なモデル組織となることを報告してきた (Sonoshita et al, 2018; Sekiya et al, 2023)。そこで申請者は、*Ser>4-hit* ハエ成虫の羽を用いて、CHIR99021 と trametinib の併用の効果を評価した。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。そのため申請者は、飼育温度を 16℃ まで下げることで、導入した 4 つの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にした。その結果、化合物を投与しない場合は *4-hit* ハエ成虫の羽が縮小したが、二剤の併用により *4-hit* ハエの羽の形態が野生型ハエの羽に近い形態に戻ることが分かった (図 19 A、B)。これらの結果から申請者は、GSK3 と MEK の阻害剤の組み合わせ投与が *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。

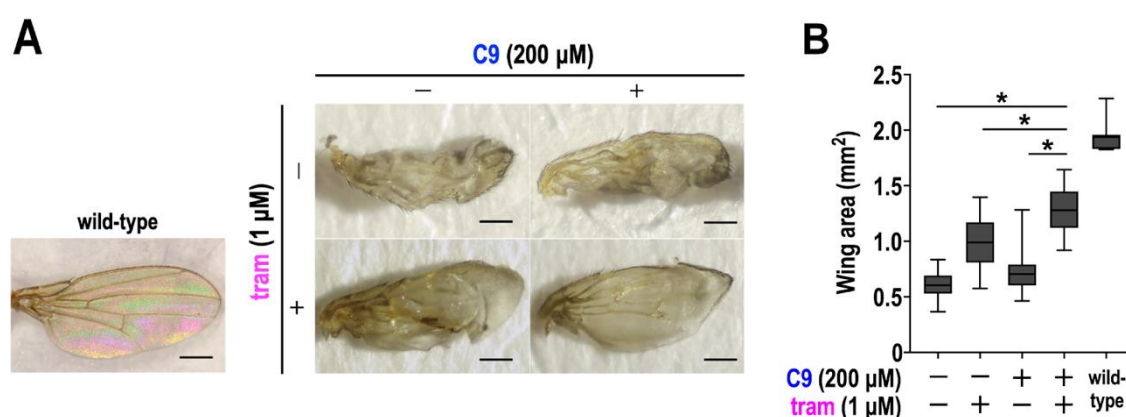


図 19. CHIR99021 と trametinib の組み合わせ投与による *4-hit* ハエ成虫の羽の形態異常の救済

(A) CHIR99021 (C9) と trametinib (tram) の組み合わせ投与によって、*Ser>4-hit* ハエの羽の形態が野生型ハエ (wild-type) の羽に近い形態に戻った。スケールバーは 250 μm を示す。(B) 成虫の羽の面積は、C9 と tram の併用投与によって、それぞれの単剤投与よりも増大した。**P* < 0.05 (Dunnett 検定)。

5. 同所性移植モデルマウスを用いた CHIR99021 と trametinib 組み合わせ投与の検討

続いて申請者は、CHIR99021 と trametinib の組み合わせの抗腫がん効果を哺乳類モデルで検証することを企図した。申請者は、ヒト膵がんの新規治療法の創出を最終的な目的としているため、哺乳類モデルとして培養ヒト膵がん細胞をマウスに移植する異種移植モデルを採用することとした。これにあたり、T細胞の機能不全により異種移植片の生着を拒絶しないヌードマウス（BALB/c-nu/nu）を使用することに決めた。

投薬実験に先立ち申請者は、ヌードマウスに体重減少や異常行動などの副作用を引き起こさない化合物投与量を決定するため、MTD 試験を実施した。具体的には、ヌードマウスに trametinib を 1.0 mg/kg/日の固定用量で経口投与し、CHIR99021 の腹腔内投与量を漸増する MTD 試験を行った。なお、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おり {Center for Drug Evaluation and Research、MEKINIST® (trametinib) tablets, for oral use}、所属研究室は先行研究において 1.0 mg/kg/日の投与が十分に忍容性があることを確認していたため (Sekiya et al, 2023)、申請者はこの濃度を本研究の MTD 試験における trametinib の投与量として選択した。その結果、CHIR99021 は 40 mg/kg/日まで trametinib と組み合わせて投与しても、マウスに体重減少（図 20）や異常行動などの副作用を引き起こさないことが分かった。

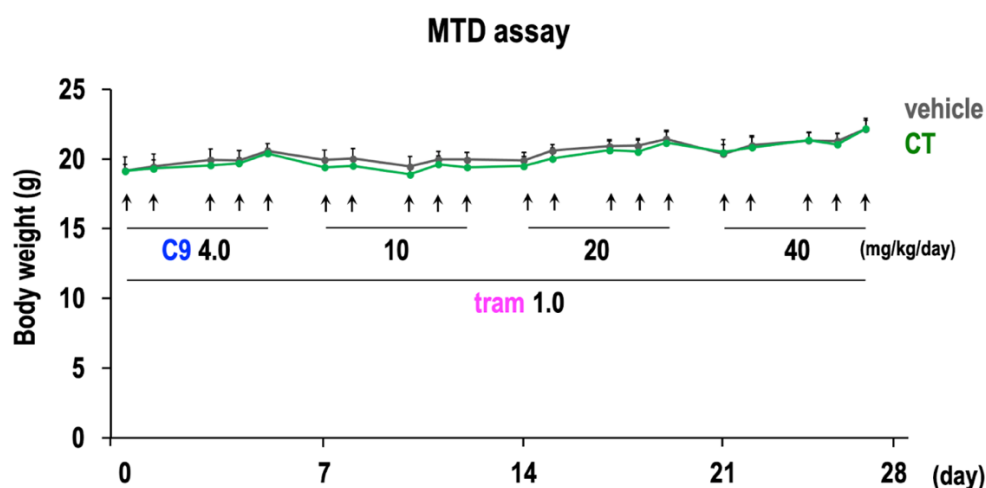


図 20. ヌードマウスにおける CHIR99021 と trametinib 併用投与の MTD 試験

6 週齢の雌のヌードマウスに 1.0 mg/kg/日の固定用量で trametinib (tram) を経口投与し、CHIR99021 (C9) を 4.0 mg/kg/日から腹腔内投与を

開始して、投与量を漸増した。C9 の投与量を 40 mg/kg/日まで増量したが、溶媒のみの投与群（vehicle）と比較して体重減少や副作用は認めなかった。矢印は週 5 回の化合物投与を示す。CT、CHIR99021 と trametinib の併用投与。

次に、MTD 試験で採用した投与量における CHIR99021 の薬物動態を明らかにするため、薬物動態試験を実施した。申請者は、4 mg/kg または 10 mg/kg の CHIR99021 を ICR マウスに単回腹腔内投与し、24 時間以内に 8 回 CHIR99021 の血漿中濃度を測定した。その結果、CHIR99021 の投与量を 10 mg/kg にした場合の最高血漿中濃度は 1765 nM であり、4 mg/kg の場合と比較して用量依存的に高値を示すことが分かった（表 9）。また、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も細胞増殖抑制効果を示すものであった（図 2 4）。以上の結果から申請者は、10 mg/kg の CHIR99021 がマウスに対する投薬実験における至適投与量であると判断した。

表 9. CHIR99021 の腹腔内投与の薬物動態試験

3 匹の ICR マウスに 4 mg/kg または 10 mg/kg の CHIR99021 を単回腹腔内投与し、24 時間以内に 8 回血漿中濃度を測定した。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} は最大血漿中濃度到達時間、C_{max} は最高血漿中濃度、AUC₀₋₂₄ は投与 24 時間後までの血漿中濃度時間曲線下面積、AUC_{0-∞}は無限時間までの血漿中濃度時間曲線下面積、MRT_{0-∞}は無限時間までの平均滞留時間を示す。

Dose (mg/kg)	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} (nM)	AUC ₀₋₄ (nM•h)	AUC _{0-∞} (nM•h)	MRT _(0-∞) (h)
4	0.41	1.0	533.8	790.3	824.8	1.01
10	0.35	0.83	1765.2	2945.1	2950.0	1.09

続いて申請者は、CHIR99021 と trametinib の組み合わせの投薬実験を実施するための異種移植モデルを作製した。ここで申請者は、臨床の膵がんの微小環境や薬物の組織移行性を再現可能な同所性異種移植モデルの作出を目指した。申請者は、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培養ヒト膵がん細胞 AsPC-1 にルシフェラーゼ遺伝子を導入した AsPC-1-Luc を、ヌードマウスの膵臓に同所性に移植した（図 2 1 A）。その結果、AsPC-1-Luc はマウスの膵臓に生着し、経時的に腫瘍が成長することが分かった（図 2 1 B）。そのため申請者は、この同

所性異種移植モデル（以後ゼノグラフトモデルと呼称）を投薬実験に用いることを決定した。

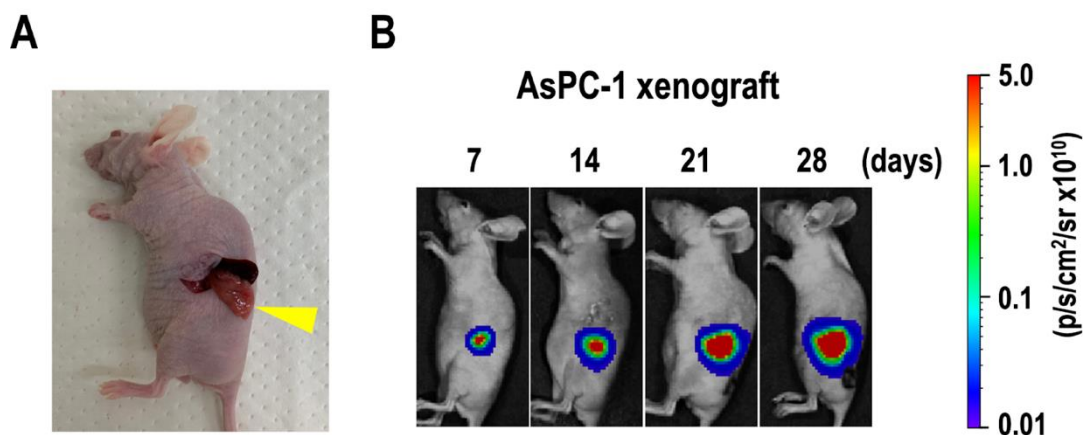


図 2 1. AsPC-1-Luc をマウスの脾臓に同所性移植した異種移植モデルの樹立

(A) AsPC-1-Luc 1×10^6 個をマウスの脾臓（矢頭）に移植した。(B) AsPC-1-Luc を移植した後に、28 日目まで週 1 回腫瘍発光強度 {photons/sec/cm²/steradian (p/s/cm²/sr)} を測定した。移植後 28 日目までの期間で、AsPC-1-Luc はマウスの脾臓に生着し、経時的に腫瘍が成長した。

最後に申請者は、このゼノグラフトモデルに、CHIR99021 と trametinib を組み合わせて投与する投薬実験を行った。MTD 試験と薬物動態試験の結果をもとに、申請者はゼノグラフトモデルへの trametinib の経口投与量を 1.0 mg/kg/日、CHIR99021 の腹腔内投与量を 10 mg/kg/日に設定した。その結果、投与開始後 21 日目の時点で組み合わせ投与群は、それぞれの単剤投与群と比較して有意に AsPC-1 腫瘍の成長を抑制することが分かった（図 2 2 A、B）。さらに、二剤の併用投与群 7 匹のうち 2 匹が部分寛解を達成した（図 2 2 C）。

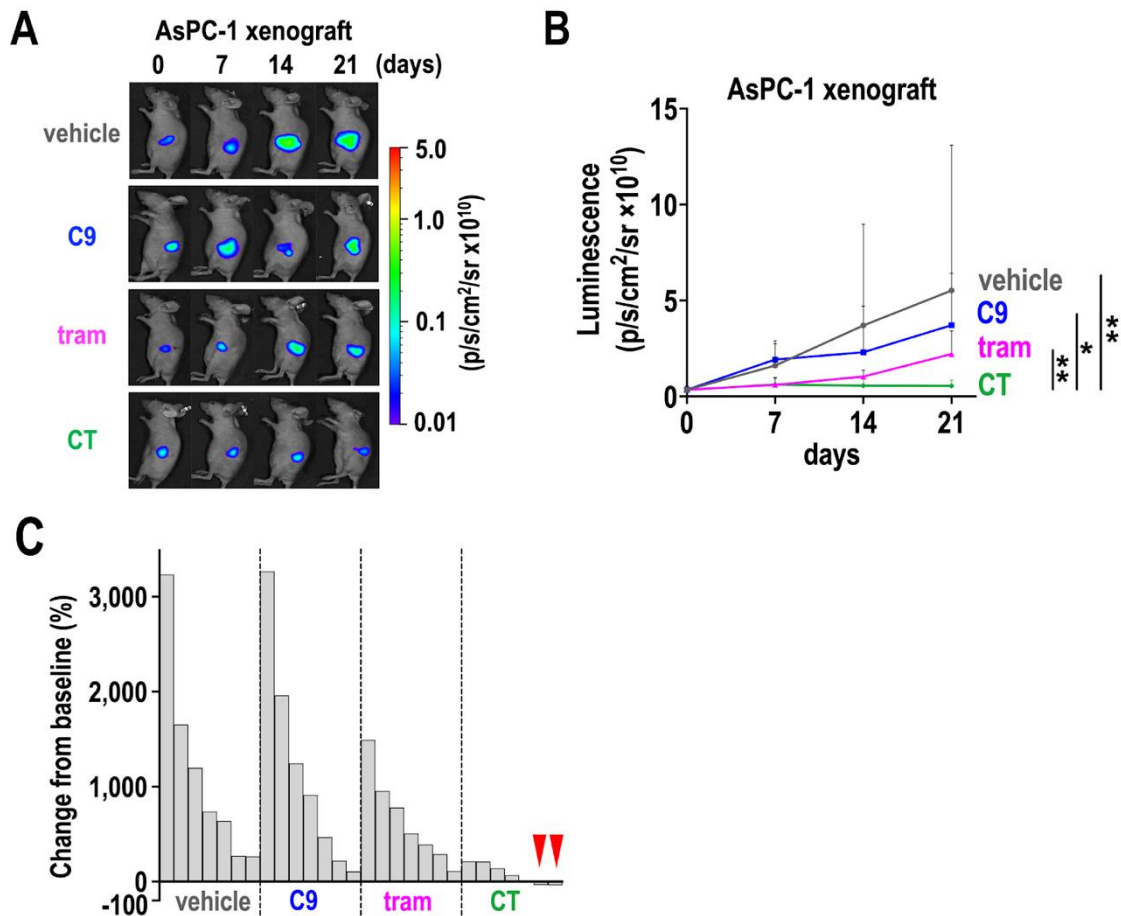


図 2 2. CHIR99021 と trametinib の併用による AsPC-1 腫瘍の成長の抑制

(A) 各群 7 匹の雌のヌードマウスの臍臓に AsPC-1-Luc を同所性移植し、溶媒のみの投与 (vehicle)、CHIR99021 (C9) と trametinib (tram) を単剤投与または併用投与 (CT) して、21 日目まで週 1 回腫瘍発光強度

{photons/sec/cm²/steradian (p/s/cm²/sr)} を測定した。(B) CHIR99021

(C9) と trametinib (tram) の併用投与 (CT) は、それぞれの単剤投与と比較して有意に腫瘍の成長を抑制した。**P* < 0.05、***P* < 0.01 (Mann-Whitney U 検定)。(C) 化合物投与開始時の腫瘍発光強度を基準とし、21 日目時点での発光強度の増加率を Waterfall plot で示した。各縦棒はマウス 1 個体の腫瘍発光強度増加率を表す。赤の矢頭は部分寛解を示す

{Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 分類:

(Eisenhauer et al, 2009)}。

また投与期間中、各化合物投与群におけるマウスの平均体重は減少しなかった (図 2 3)。この結果は、本実験で使用した投与量において、CHIR99021 と trametinib に忍容性があることを示している。

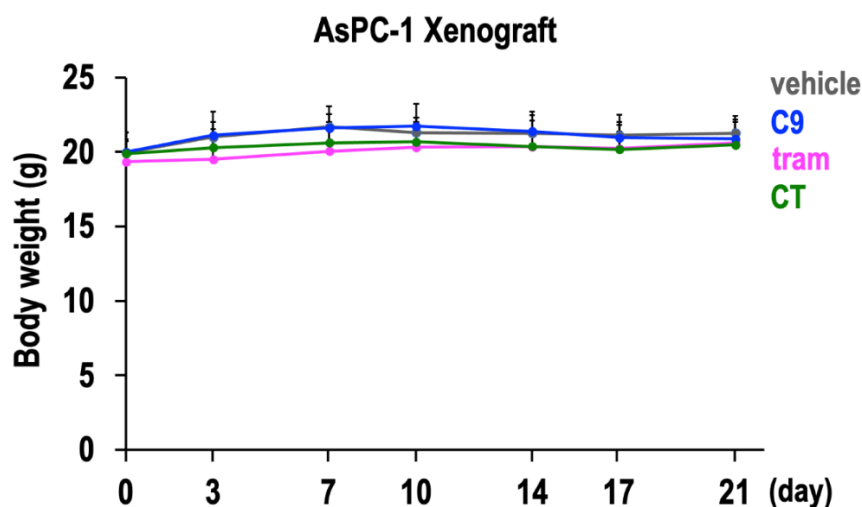


図. 2 3 CHIR99021 と trametinib の併用投与期間中における、ゼノグラフトモデルの体重の経時変化

CHIR99021 (C9) と trametinib (tram) の単独投与群とあるいは組み合わせ投与群のいずれにおいても、マウスの平均体重の変化を認めなかった。

以上の結果から申請者は、ゼノグラフトモデルにおいても CHIR99021 と trametinib の併用が高い抗膵がん効果を示すことを見出し、*4-hit* ハエのスクリーニングを通じて同定した本治療法が哺乳類モデルにおいても適用可能であることを実証した。

6. CHIR99021 と trametinib 併用療法の作用機序解析

最後に申請者は、CHIR99021 と trametinib の組み合わせ投与の作用機序を解析した。これまでの *4-hit* ハエや同所性移植モデルマウスを用いた個体レベルの解析で、CHIR99021 と trametinib の組み合わせが抗膵がん効果を示すことは明らかになったが、膵がん細胞の増殖能に与える影響は不明であった。そこで申請者は、*3-hit* や *4-hit* の遺伝子変異プロファイルを有する培養ヒト膵がん細胞を用いた 3 次元細胞培養であるソフトアガーコロニー形成アッセイやスフェロイドアッセイ、または 2 次元細胞培養である MTS アッセイを実施して、CHIR99021 と trametinib が膵がん細胞の増殖に与える影響を解析した。

まず申請者は、3 次元細胞培養であるソフトアガーコロニー形成アッセイを実施した。それぞれの培養ヒト膵がん細胞に、CHIR99021 と trametinib を単独であるいは同時に添加し、7 日間の培養後にコロニー数を

測定した。その結果申請者は、CHIR99021 と trametinib を単独および同時に添加することで、AsPC-1 細胞の増殖を抑制することを見出した（図 2 4 A、B）。また、3-hit の遺伝子変異プロファイルを有する PANC-1 細胞においても、CHIR99021 と trametinib の単独および組み合わせは増殖抑制効果を示すことが分かった（図 2 4 C、D）。

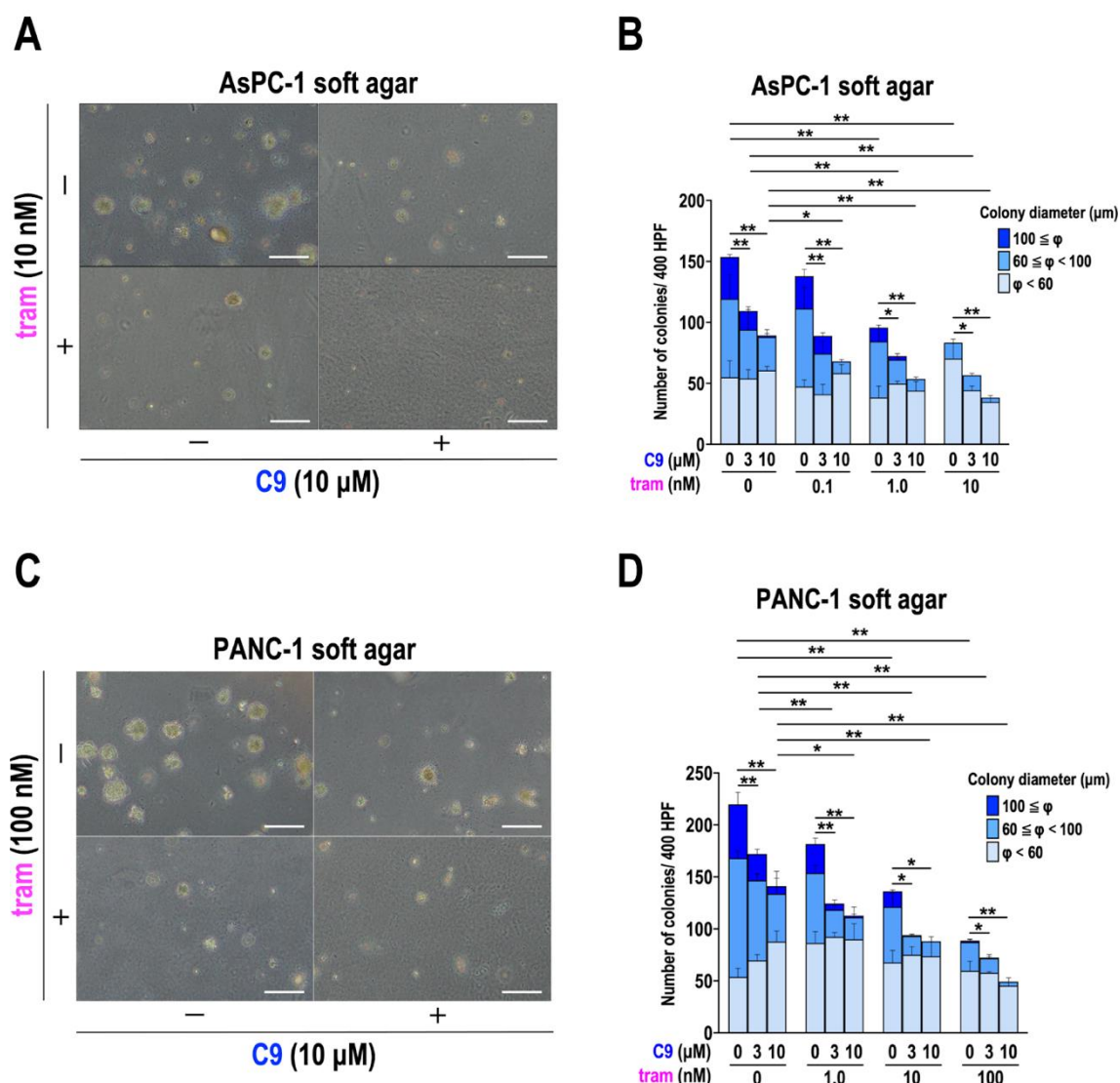


図 2 4. CHIR99021 と trametinib によるコロニー形成の抑制

(A、C) CHIR99021 と trametinib の添加後 7 日目における、AsPC-1 (A) や PANC-1 (C) のコロニーの大きさ。スケールバーは 200 μm を示す。

(B、D) CHIR99021 と trametinib の単独および組み合わせは、AsPC-1 (B) や PANC-1 (D) のコロニー形成を抑制した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Dunnett 検定)。HPF、high power field。

続いて申請者は、3次元細胞培養であるスフェロイド形成アッセイを実施した。その結果申請者は、CHIR99021 と trametinib を単独および同時に添加することで、ソフトアガーコロニー形成アッセイと同様に AsPC-1 の細胞増殖を抑制することを見出した（図 2 5）。

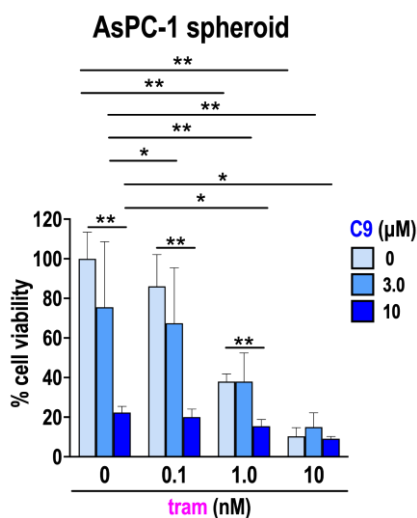


図 2 5. CHIR99021 と trametinib によるスフェロイド形成の抑制

CHIR99021 と trametinib の単独および組み合わせは、AsPC-1 のスフェロイド形成を抑制した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ （Dunnett 検定）。

さらに申請者は、2次元細胞培養である MTS アッセイを実施した。それぞれの培養ヒト膵がん細胞に、CHIR99021 と trametinib を単独であるいは同時に添加し、72 時間後の細胞数を測定した。その結果、CHIR99021 と trametinib を単独または同時に添加することで Capan-1、PCI-55、PANC-1 の細胞増殖を抑制することを見出した（図 2 6 A、B、C）。これらの結果から申請者は、CHIR99021 と trametinib の併用が膵がん細胞の増殖能を抑制することを見出した。

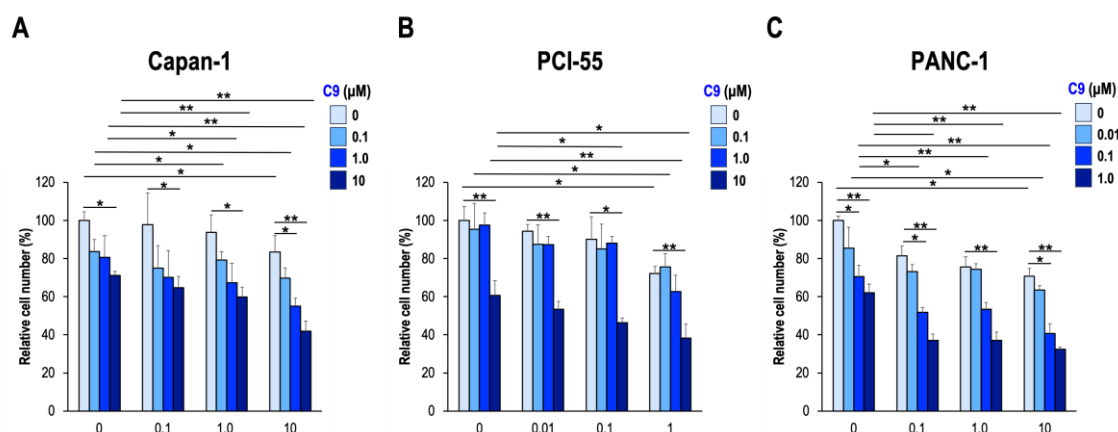


図 2 6． 2 次元細胞培養における CHIR99021 と trametinib による培養ヒト膵がん細胞の増殖の抑制

(A–C) CHIR99021 と trametinib の単独および組み合わせは、2 次元細胞培養において、Capan-1 (A)、PCI-55 (B)、PANC-1 (C) の細胞増殖を抑制した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Dunnnett 検定)。

続いて申請者は、化合物投与による抗膵がん効果を評価するため、前項のマウス同所性移植実験で採材した腫瘍検体の IHC を実施した。まず、細胞増殖のマーカーである Ki-67 の IHC を行った。その結果、CHIR99021 と trametinib の併用投与群では、溶媒のみの投与の対照群や、CHIR99021 の単剤投与群と比較して、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 (図 2 7 A、B)。また、MEK 阻害剤 trametinib が標的とする MAPK シグナル経路の活性化は膵がん細胞の増殖を促進するため、申請者は CHIR99021 や trametinib の投与がこの経路に与える影響を検討すべく、MEK の下流分子である ERK のリン酸化を定量した。その結果、trametinib の単剤投与や CHIR99021 と trametinib の併用投与が pERK の発現を抑制することが分かった。一方で、trametinib の単剤投与群と CHIR99021 と trametinib の併用投与群において、pERK の発現量は変化しないことが分かった (図 2 7 A、C)。前項の投薬実験において申請者は、CHIR99021 と trametinib の併用投与が trametinib の単剤投与と比較して AsPC-1 腫瘍の成長を抑制することを見出した。さらに、腫瘍検体の IHC において Ki-67 陽性細胞の割合が低くなる傾向を示した ($P = 0.066$) が、両群における pERK の発現抑制は同等であることが分かった。これらの結果から申請者は、CHIR99021 と trametinib の併用投与が、MAPK シグナル経路以外にも他のシグナル経路を阻害することで AsPC-1 腫瘍の成長を抑制していると推察した。

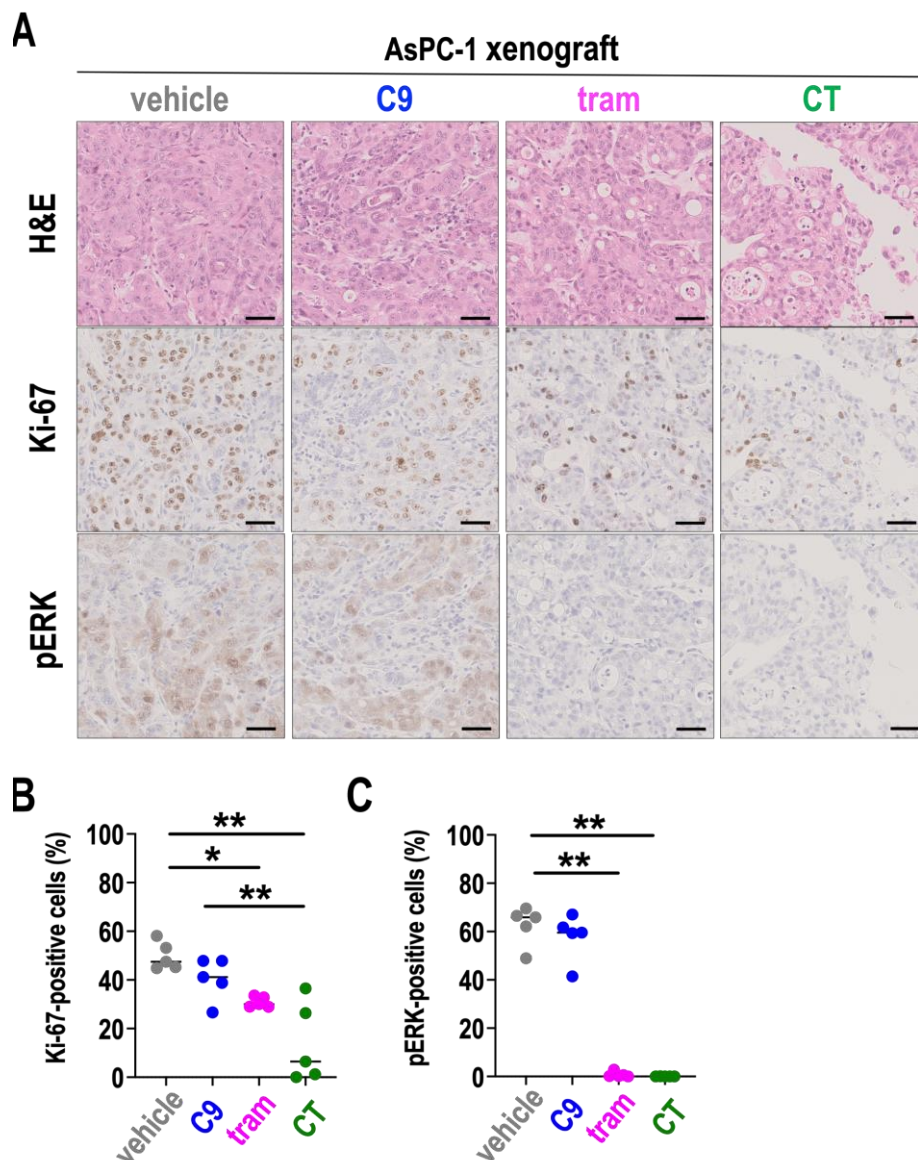


図 2 7 . AsPC-1 腫瘍における、CHIR99021 と trametinib の併用投与による
膵がん細胞の増殖抑制と MAPK 経路の不活性化

(A) AsPC-1 のゼノグラフトモデルへの CHIR99021 (C9) と trametinib (tram) の単独投与、あるいは C9 と tram の併用投与 (CT) 開始 5 日後に腫瘍検体を採材し、ヘマトキシリン・エオジン染色と IHC により解析した。スケールバーは 50 μ m を示す。(B) CT 群では、溶媒のみの投与 (vehicle) や C9 群と比較して、Ki-67 陽性細胞の割合が有意に低かった。(C) vehicle 群と比較して tram 群と CT 群では、pERK の発現量が有意に低かった。C9 群と CT 群では pERK の発現量に有意差を認めなかった。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (one-way ANOVA 検定)。

一方、GSK3 は細胞質内の β -catenin をリン酸化し分解することで核内に移行する β -catenin を減少させ、最終的に Wnt/ β -catenin 経路の活性化を抑制する役割を担っている。一般的に Wnt/ β -catenin 経路は、細胞増殖や分化を制御する他、この経路の活性化は大腸がんを含む様々な腫瘍の発生の要因になることが報告されている (Shaw et al, 2019)。しかしながら、Wnt/ β -catenin 経路の活性と膵がんにおける腫瘍形成との関連性の全貌は明らかになっていない。そこで申請者は、Wnt/ β -catenin 経路の活性化状態を評価するため、AsPC-1 腫瘍検体における、腫瘍部分とそれに隣接する正常膵組織での β -catenin の IHC を実施した。その結果、 β -catenin は正常膵管上皮細胞では細胞膜上に局在するが、膵がん細胞では細胞質や核内に局在することが分かった (図 2 8 A、B)。また、GSK3 阻害剤 CHIR99021 を投与したゼノグラフトモデルにおいて、膵がん細胞の β -catenin の細胞内局在は変化しないことが分かった (図 2 8 C)。これらの結果から、AsPC-1 腫瘍において Wnt/ β -catenin 経路は活性化していることが分かった。

子を網羅的に探索するため、腫瘍検体を用いたリン酸化抗体アレイ解析を実施した。この解析では、溶媒のみを投与した対照群と CHIR99021 と trametinib の併用投与群における、同一タンパクに対するリン酸化シグナル比（リン酸化タンパク特異的抗体と非リン酸化タンパク特異的抗体のシグナル強度との比）を算出した（表 10）。その結果申請者は、溶媒のみ投与した対照群と比較して CHIR99021 と trametinib の併用投与群で、Polo-like kinase 1（PLK1）、Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

（LCK）、Activating transcription factor 2（ATF2）、p38 α のリン酸化シグナル比が低下することを見出した（図 29A）。特に、PLK1 は細胞周期の分裂期において中心体の成熟や紡錘体の位置決定を担う細胞分裂制御因子であり、膵がん組織内における発現量の増加と患者の予後不良との関連が報告されている（Weichert et al, 2005）。さらに、PLK1 の阻害がアポトーシスを誘導し、培養ヒト膵がん細胞の増殖を抑制することも知られており（Gray et al, 2004）、PLK1 は膵がんにおける治療標的として注目されている。申請者は、PLK1 が GSK3 や MEK と同様に、4-hit ハエの表現型のサブレッサーキナーゼであるか検証した。その結果申請者は、ヒト PLK1 のハエオルソログである *polo* 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を見出した（図 29B）。

以上の結果より申請者は、GSK3 と MEK の同時阻害は細胞分裂制御因子 PLK1 の不活性化を招来することで抗膵がん効果を発揮すると結論した（図 29C）。

表 10. AsPC-1 腫瘍検体を用いたリン酸化抗体アレイ解析

溶媒のみを投与した対照群と CHIR99021 と trametinib の併用投与群における、同一タンパクに対するリン酸化シグナル比（リン酸化タンパク特異的抗体と非リン酸化タンパク特異的抗体のシグナル強度との比）を算出した。Antibody、抗体名。CT、CHIR99021 と trametinib の併用投与群。

S.D.、standard deviation。

Fold change in CT-treated xenografts as compared to control			Fold change in CT-treated xenografts as compared to control			Fold change in CT-treated xenografts as compared to control		
Antibody	Average	S.D.	Antibody	Average	S.D.	Antibody	Average	S.D.
4E-BP1	0.723	0.108	FGFR1	1.219	0.220	p53 (Ser15)	0.725	0.706
Abl1	1.043	0.316	FKHRL1/FOXO3A	0.637	0.122	p53 (Ser315)	1.641	1.735
ACC1	1.214	0.513	FOXO1/3/4-pan	0.953	0.252	p53 (Ser9)	1.579	1.878
Actin Pan (α/β/γ)	1.022	0.457	Gab1	0.658	0.066	P70S6K (Ser424)	0.773	0.105
AKT1 (Ser473)	0.786	0.051	Gab2	0.902	0.064	P70S6K (Thr421)	0.727	0.090
AKT1 (Thr308)	0.583	0.032	GRK2	0.792	0.065	P73	0.974	0.080
AKT1S1	1.002	0.058	GSK3β	0.640	0.071	P90RSK	1.213	0.101
AKT2	1.004	0.034	HDAC1	3.457	4.374	PAK1	0.977	0.034
AMPKβ1	1.208	0.669	HDAC2	0.711	0.237	PDGFR beta	0.819	0.027
ASK1	1.088	0.057	HER2	0.973	0.088	PKC δ	0.992	0.078
ATF2	0.424	0.136	HSP27	1.030	0.126	PI3-kinase p85-alpha	0.963	0.086
BAX	0.919	0.091	HSP90B	1.107	0.197	PKC δ	1.113	0.353
BCL-XL	0.570	0.032	IGF1R	0.899	0.159	PKC θ	0.715	0.095
BID	0.960	0.079	IkB-α	1.639	0.358	PLCG1	1.966	0.115
BLNK	0.773	0.343	IkB-ε	0.967	0.207	PLK1	0.376	0.045
B-RAF	0.917	0.130	IKK α/β	1.069	0.443	PP1α	1.211	0.225
BRCA1	0.534	0.078	IKK-β (Tyr188)	1.264	0.081	PP2A-α	1.493	0.146
c-Abl	0.869	0.061	IKK-β (Tyr199)	0.999	0.144	PPAR-γ	0.689	0.099
Calmodulin	1.066	0.102	IKK-γ	1.220	0.320	PTEN	0.968	0.138
CaMK2A	1.709	0.231	IL-10R-α	0.680	0.166	Raf1	1.918	1.458
CaMK2-β/γ/δ	0.703	0.139	IL-4R/CD124	0.931	0.090	Ras-GRF1	0.812	0.385
Caspase 1	0.857	0.077	Integrin β-3	0.771	0.058	Rb (Ser608)	0.767	0.042
Caspase 8	0.982	0.135	IFNγ receptor α	0.729	0.073	Rb (Ser807)	0.674	0.038
Caspase 9	0.734	0.056	IRS-1	0.899	0.077	RelB	0.348	0.015
Catalase	0.800	0.115	JAK1	0.826	0.086	RSK1/2/3/4	0.965	0.082
Catenin β	0.697	0.040	JAK2 (T1007)	0.671	0.070	SAPK/JNK	1.187	0.094
CDC25C	0.546	0.062	JAK2 (T221)	0.925	0.072	Shc	2.557	0.891
CDK1/CDC2	0.834	0.054	JunB	1.111	0.078	SHP-2	0.914	0.079
Chk1	0.911	0.108	Lamin A/C	1.029	0.283	Smad1	1.138	0.418
Chk2	0.718	0.028	LCK	0.443	0.037	Smad2	0.706	0.180
c-Jun	0.892	0.366	LKB1	0.790	0.107	Smad3	0.858	0.122
CPI17α	0.958	0.062	LYN	1.372	1.194	Src	1.863	0.241
CREB	0.724	0.040	MAP3K7/TAK1	1.009	0.125	SRF	0.763	0.066
Crkl	1.207	0.445	MDM2	0.876	0.064	STAT1	0.888	0.023
Cyclin D1	1.020	0.503	MEK1 (Ser217)	0.546	0.059	STAT2	0.679	0.154
Cyclin E1	0.842	0.079	MEK1 (Ser221)	0.576	0.052	STAT3	0.696	0.096
DARPP-32	1.172	0.167	Met	0.855	0.155	STAT4	1.244	0.131
EEF2	0.989	0.082	MITF	0.806	0.118	STAT5A	0.779	0.049
eEF2K	0.955	0.253	MKK4/SEK1	0.930	0.146	STAT5B	0.817	0.027
EGFR (Tyr1172)	1.081	0.041	MSK1	1.126	0.128	STAT6	1.098	0.106
EGFR (Tyr869)	0.967	0.049	mTOR (Ser2448)	0.688	0.034	SYK	1.114	0.094
EEF2	0.989	0.082	mTOR (Ser2481)	1.014	0.009	Synuclein α	1.277	0.112
eEF2K	0.955	0.253	Myc	1.241	0.034	Tau (Ser235)	1.274	0.215
EGFR (Tyr1172)	1.081	0.041	NFκB-p100/p52	1.200	0.156	Tau (Ser396)	1.209	0.121
EGFR (Tyr869)	0.967	0.049	NFκB-p105/p50	1.683	0.174	Trk B	1.410	1.693
eIF2A	1.381	0.088	NFκB-p65 (Ser311)	1.124	0.104	Tuberin/TSC2	0.746	0.094
eIF4E	0.917	0.072	NFκB-p65 (Ser529)	0.822	0.036	VASP	0.579	0.047
Elk1	0.519	0.090	p21Cip1 (Thr45)	1.069	0.014	VEGFR2 (Tyr1175)	0.859	0.053
eNOS	0.918	0.153	P38 MAPK	0.489	0.051	VEGFR2 (Tyr1214)	0.907	0.023
FAK	1.116	0.234	p44/42 MAP Kinase	0.911	0.071	Zap-70 (Tyr319)	0.978	0.067

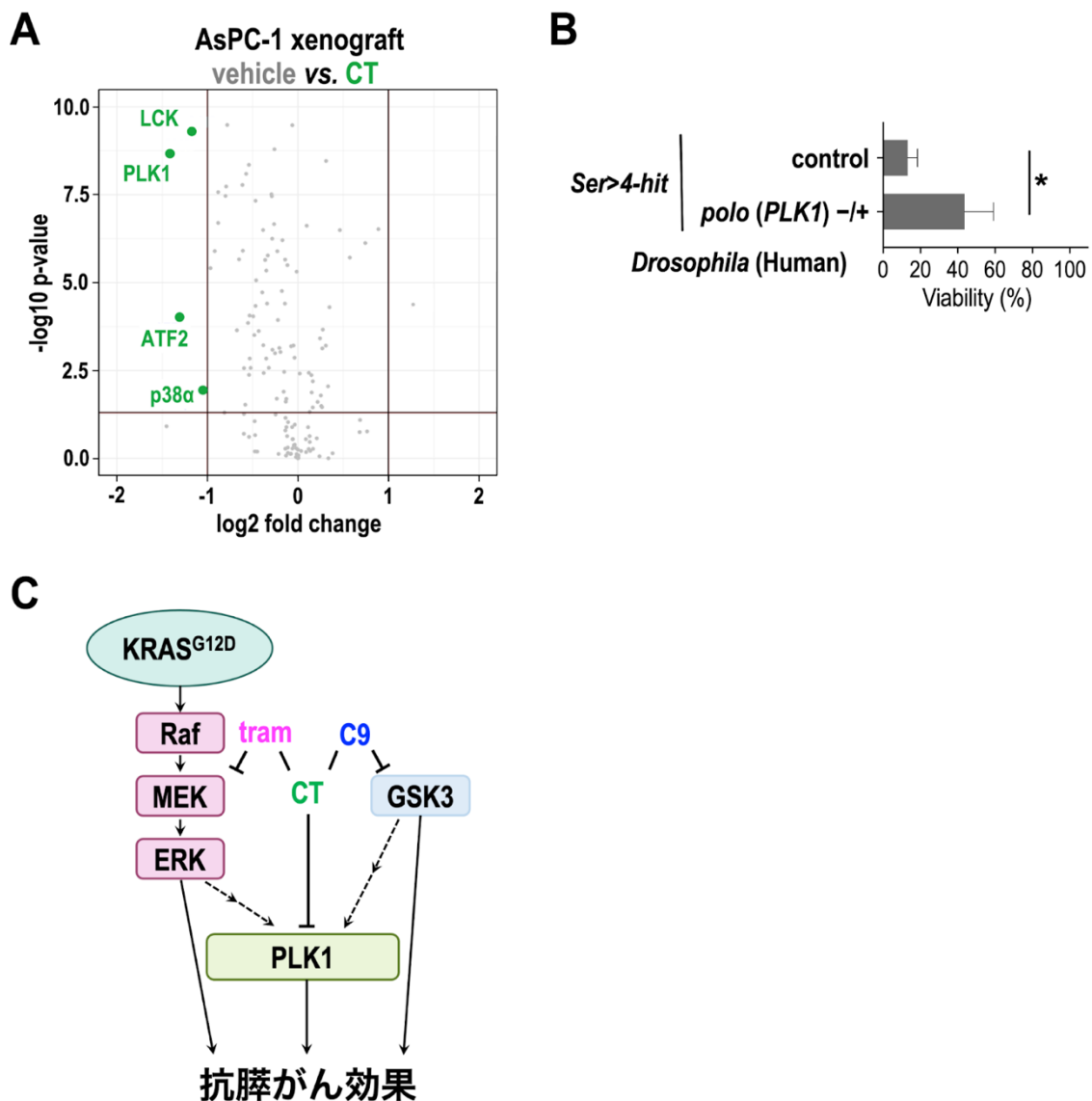


図 2 9. AsPC-1 腫瘍を用いたリン酸化抗体アレイ解析による PLK1 の同定

(A) 腫瘍検体におけるリン酸化抗体アレイ解析。各タンパクに対するリン酸化シグナル比を算出した後に、Volcano plot を作成した。CHIR99021 と trametinib を併用投与した群においてリン酸化シグナル比が有意に低下したタンパク (PLK1、LCK、ATF2、p38 α) を緑色で示す。(B) 対照ハエと比較して、*polo* のヘテロ接合性変異の導入は *Ser>4-hit* ハエの生存率を有意に改善した。* $P < 0.05$ (Student's *t* 検定)。(C) スキーム。GSK3 と MEK の同時阻害は PLK1 の活性低下を介して抗腫がん効果を示す。

考察

申請者の所属研究室では、代表的な難治がんの一つである膵がんの本態解明や治療法開発を目的に、膵がん患者の中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）を模倣した、内因性発がんモデルである *4-hit* ハエを作出した（Sekiya et al, 2023）。本研究で申請者は、この *4-hit* ハエと哺乳類モデルや患者臨床検体を相補的に組み合わせる独自の研究基盤を活用し、個体レベルでの新たな治療薬候補の同定を効率的に進めた。まず申請者は、*4-hit* ハエを活用した全キナーゼを対象とする遺伝学的スクリーニングを実施し、*GSK3* が新規の膵がん治療標的であることを見出した。そして申請者は、*4-hit* ハエを用いた化合物スクリーニングにより、*CHIR99021* と *trametinib* の組み合わせを新規の治療薬候補として同定し、この組み合わせ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。さらに申請者は、腫瘍検体を用いたリン酸化抗体アレイ解析を実施し、この組み合わせが細胞分裂制御因子である *PLK1* 活性の低下を招来することで、抗膵がん効果を発揮している可能性を見出した。

近年、膵がんに対する全身化学療法は、*FOLFIRINOX* 療法（*fluorouracil* と *leucovorin*、*irinotecan*、*oxaliplatin* の組み合わせ）や *GnP* 療法

（*gemcitabine* と *nab-paclitaxel* の組み合わせ）が標準治療であり、多剤併用療法による相乗的な治療効果が期待されている。しかしながら、これらのレジメンは従来の化学療法よりも高い抗腫瘍効果を示す一方で、患者の生活の質の低下に直結する重篤な副作用を招来するという問題点がある

（Conroy et al, 2011; Von Hoff et al, 2013）。また、過去の臨床研究において、膵がんの標準治療薬 *gemcitabine* と *trametinib* を併用することによる予後の改善は証明されなかった（Infante et al, 2014）。このように、これまでの膵がん治療の探索においては、副作用が少なく治療効果が高い薬物の組み合わせを効率的に同定できないことが課題であった。そこで申請者は、*trametinib* と 23 種の *GSK3* 阻害剤を組み合わせ、*4-hit* ハエに投与する化合物スクリーニングを実施することで、新規治療薬候補を網羅的かつ効率的に探索した。その結果申請者は、*GSK3* 阻害剤 *CHIR99021* と *trametinib* の併用投与が *4-hit* ハエの生存率を改善することを見出し、新規組み合わせ候補を効率的に同定することに成功した。*CHIR99021* は、当初 2 型糖尿病の治療薬として開発された *GSK3* 阻害剤である（Wagman et al, 2004）。最近の報告において *CHIR99021* は、非小細胞性肺がん（O’Flaherty et al,

2019) や類上皮肉腫 (Russi et al, 2021) の異種移植モデルにおいて、抗悪性腫瘍剤としての有効性も示されているが、膵がんに対する有効性は報告されていない。申請者が得た一連の結果は、*4-hit* ハエを活用した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膵がんの新規治療薬候補の探索を効率的に実施できることを示している。

ゼノグラフトモデルへの投薬実験において申請者は、CHIR99021 と trametinib の併用投与が AsPC-1 腫瘍の成長を抑制することを見出した。一方で、所属研究室の先行研究では、AURKB 阻害剤 BI-831266 は単剤投与でも trametinib との併用投与においても AsPC-1 腫瘍の成長を抑制しなかった。この点について先行研究では、AsPC-1 細胞が有する *FBXW7* のミスセンス変異によって BI-831266 に対する治療耐性が生じたため、trametinib と BI-831266 の併用投与が抗膵がん効果を示さなかったと推察している

(Sekiya et al, 2023)。この結果から申請者は、本研究で同定した CHIR99021 と trametinib の併用投与が、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と考えている。さらに申請者は、膵がん患者の TMA 検体を用いた解析において、患者全体の約 30% は GSK3 β の発現が陽性であり、その発現が膵がん患者の予後不良に関わることを見出した (図 1 3)。この陽性率は、免疫チェックポイント阻害剤の適応となる MSI-H の患者頻度が 1 ~ 2 % 程度であること (Le et al, 2017; Marabelle et al, 2020) と比較しても顕著に高く、申請者はより多くの膵がん患者に本治療法を適応できると推察した。これら一連の結果から、CHIR99021 と trametinib の組み合わせ投与は、多くの膵がん患者に適応可能な汎用性の高い新規治療法になる可能性がある。

本研究で申請者は、AsPC-1 腫瘍における Wnt/ β -catenin 経路の活性を評価した。その結果、正常膵管上皮細胞よりも膵がん細胞で核内の β -catenin 陽性細胞の割合が高く、AsPC-1 腫瘍において Wnt/ β -catenin 経路が活性化していることが分かった (図 2 8 A、B)。続いて申請者は、CHIR99021 を投与したゼノグラフトモデルにおける膵がん細胞の β -catenin の細胞内局在を評価した。申請者は、CHIR99021 による GSK3 阻害作用によって β -catenin の分解が抑制され、細胞質から核内に移行する β -catenin がさらに増加すると予想したが、これに反して β -catenin の細胞内局在に変化を認めなかった (図 2 8 C)。この結果について申請者は、Wnt/ β -catenin 経路は膵がんにおいてすでに十分に活性化した状態であり、CHIR99021 の投与が、さらにシグナル伝達経路を活性化する余地はなかったため、 β -catenin の細胞内局在が変化しなかったと推察した。一方で、Wnt/ β -catenin 経路の活性化が膵がんの腫瘍形成を促進するという報告もある (Liu et al, 2016)。そ

のため、CHIR99021 の投与が Wnt/ β -catenin 経路をさらに活性化し、AsPC-1 腫瘍の成長を促進する可能性もあった。しかしながら、本研究では CHIR99021 の投与が Wnt/ β -catenin 経路の活性に影響することなく AsPC-1 腫瘍の成長を抑制することも確認しており（図 2 2）、申請者は、CHIR99021 が PLK1 などの Wnt/ β -catenin 経路に含まれる因子以外を標的とすることで AsPC-1 腫瘍に対する抗膵がん効果を示したと推察した。

膵がん患者の 90%以上に *KRAS* 遺伝子の変異が認められ、その活性化が膵がんの発生や増殖を促進するとされている（Downward, 2003; Ying et al, 2012）。変異型 *KRAS* は表面が平滑な分子構造であり、阻害剤の結合可能なアロステリック部位が少ないため、*KRAS* に対する特異的阻害剤の開発の障壁となっていた。しかしながら近年、*KRAS*^{G12C} の新しいアロステリック部位の発見により、非小細胞性肺癌の治療薬として *KRAS*^{G12C} 特異的阻害剤 sotorasib と adagrasib が開発され（Ostrem et al, 2013; Jänne et al, 2022）、この阻害剤は臨床試験で良好な治療成績を示した。また、膵がんにおいても、最も頻度の高い活性型変異である *KRAS*^{G12D} に対する特異的阻害剤 MRTX1133 が開発段階であり（Hallin et al, 2022; Wang et al, 2022）、今後の臨床応用が期待されている。一方で、*KRAS* を特異的に阻害することで他のシグナル経路が活性化される負のフィードバック機構が作動し、*KRAS* 特異的阻害剤の治療効果が制限される問題点もある（Gurreri et al, 2023）。この課題を克服する治療戦略の一つに合成致死の理論に基づいた治療法がある。実際に、*KRAS* 変異を有する大腸がんにおいて、*KRAS* 遺伝子と *PLK1* 遺伝子は合成致死の関係にあり、*PLK1* の阻害によってがん細胞が死滅することが報告されている（Luo et al, 2009）。この知見から申請者は、CHIR99021 と trametinib の併用投与が、*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* 変異を有した膵がんにおいて抗膵がん効果を示したと推察した。また、膵がんに対する *PLK1* 阻害剤の臨床応用も進んでおり、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-L1 抗体薬を併用することで、抗 PD-L1 抗体薬の抗膵がん効果が高まることも報告されている（Zhang et al, 2022）。今後の展望として申請者は、本研究で同定した CHIR99021 と trametinib の併用投与に免疫チェックポイント阻害剤をさらに組み合わせることで、がん微小環境も治療標的としたより効果的な抗膵がん効果を発揮する治療法の開発も期待できると考えている。

本研究における課題として、申請者はリン酸化抗体アレイ解析のみを用いて CHIR99021 と trametinib の併用投与が *PLK1* の活性低下を招来し、4-hit 変異を有する AsPC-1 腫瘍の成長を抑制すると結論したが、本治療法がその他の標的やシグナル伝達経路を介して抗膵がん効果を発揮している可

能性もあるので、RNA シーケンスを用いた更なる網羅的な解析は必要である。

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、**4-hit** ハエを用いた遺伝学的スクリーニングによって **GSK3** をサプレッサーキナーゼとして同定した。また申請者は、化合物スクリーニングによって **GSK3** 阻害剤 **CHIR99021** と **MEK** 阻害薬 **trametinib** の併用投与が **4-hit** ハエの生存率を改善することを見出した。

2. 申請者は、**CHIR99021** と **trametinib** の併用投与が **PLK1** の活性低下を招来し、**4-hit** 変異を有する **AsPC-1** ゼノグラフトモデルにおけ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

難治性である膵がんにおいて、新規治療標的や治療法の同定が困難であることは重要な課題となっていたが、申請者は **CHIR99021** と **trametinib** の併用投与が膵がんの新規治療戦略となり得ることを見出した。将来的には、本治療法が膵がん患者の予後改善に寄与する可能性がある。

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、**CHIR99021** と **trametinib** の併用投与が、**4-hit** 変異を有する膵がん患者に対しても有効性を示すか検証すべく、臨床研究を展開していきたい。また、本治療法に免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせることで、がん微小環境を治療標的とした、より効果的な抗膵がん効果を発揮する新規治療法の開発も期待される。

④今後の課題

本研究で申請者が活用したモデルハエが保有する 4 遺伝子変異パターンに限らず、様々な遺伝子変異プロファイルのモデルハエやモデルマウスを活用して、**CHIR99021** と **trametinib** の併用投与の抗膵がん効果を検証する必要がある。

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客員臨床教授、三橋智子先生、北海道大学病院先端診断技術開発センター畑中豊特任准教授、畑中佳奈子特任講師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

国立がん研究センター、がん情報サービス、最新がん統計
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html (2024.5.27)

Center for Drug Evaluation and Research, 204114Orig1s000
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/204114orig1s000clinpharmr.pdf (2024.5.27)

Cancer Cell Line Encyclopedia
<https://sites.broadinstitute.org/ccle> (2024.5.27)

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 & Development* 17, 3112–3126.

Bae GY, Hong SK, Park JR, Kwon OS, Kim KT, Koo J, Oh E and Cha HJ (2016) Chronic TGF β stimulation promotes the metastatic potential of lung cancer cells by Snail protein stabilization through integrin β 3-Akt-GSK3 β signaling. *Oncotarget* 7, 25366–25376.

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. *Science Advances* 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.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, et al (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 364, 1817–1825.

Downward J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 11–22.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, et al (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 228–247.

Embi N, Rylatt DB and Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 107, 519–527.

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. *The New England Journal of Medicine* 367, 1694–1703.

Gray PJ, Bearss DJ, Han H, Nagle R, Tsao MS, Dean N and Von Hoff DD (2004) Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 641–646.

Gurreri E, Genovese G, Perelli L, Agostini A, Piro G, Carbone C and Tortora G (2023) KRAS-Dependency in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Mechanisms of Escaping in Resistance to KRAS Inhibitors and Perspectives of Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 9313.

Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M and Maitra A (2023) Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell* 186, 1729–1754.

Hallin J, Bowcut V, Calinisan A, Briere DM, Hargis L, Engstrom LD, Laguer J, Medwid J, Vanderpool D, Lifset E, et al (2022) Anti-tumor efficacy of a potent and selective non-covalent KRASG12D inhibitor. *Nature Medicine* 28, 2171–2182.

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.

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. *European Journal of Cancer* 50, 2072–2081.

Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, Heist RS, Ou S, Pacheco JM, Johnson ML, Sabari JK, Leventakos K, Yau E, et al (2022) Adagrasib in Non–Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation. *The New England Journal of Medicine* 387, 120–131.

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. *American Journal of Clinical Pathology* 104, 42–49.

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

Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS et al (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409–413.

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

Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, Wong KK and Elledge SJ (2009) A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* 137, 835–848.

Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, Chung HC, Kindler HL, Lopez-Martin JA, Miller WH, et al (2020) Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort,

open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *The Lancet Oncology* 21, 1353–1365.

Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, Mai W, Shakoory A, Fujisawa H, Hayashi Y, Hamada J and Minamoto T (2009) Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3 β inhibition against human glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 15, 887–897.

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. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1960–1966.

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

Naito S, Bilim V, Yuuki K, Ugolkov A, Motoyama T, Nagaoka A, Kato T and Tomita Y (2010) Glycogen synthase kinase-3 β : a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 16, 5124–5132.

O’Flaherty L, Shnyder SD, Cooper PA, Cross SJ, Wakefield JG, Pardo OE, Seckl MJ and Tavaré JM (2019) Tumor growth suppression using a combination of taxol-based therapy and GSK3 inhibition in non-small cell lung cancer. *PloS One* 14, e0214610.

Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA and Shokat KM (2013) K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 503, 548–551.

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC, Chari ST, Billadeau DD (2006) Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clinical Cancer Research* 12, 5074-5081.

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. *The Lancet Oncology* 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 Oncology* 4, e173420.

Quintayo MA, Munro AF, Thomas J, Kunkler IH, Jack W, Kerr GR, Dixon JM, Chetty U and Bartlett JM (2012) GSK3 β and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 136, 161–168.

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

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.

Russi S, Sgambato A, Bochicchio AM, Zoppoli P, Aieta M, Capobianco AML, Ruggieri V, Zifarone E, Falco G and Laurino S (2021) CHIR99021, through GSK-3 β Targeting, Reduces Epithelioid Sarcoma Cell Proliferation by Activating Mitotic Catastrophe and Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 11147.

Salim T, Sjölander A and Sand-Dejmek J (2013) Nuclear expression of glycogen synthase kinase-3 β and lack of membranous β -catenin is correlated with poor survival in colon cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 133, 807–815.

Sekiya S, Fukuda J, Yamamura R, Ooshio T, Satoh Y, Kosuge S, Sato R, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, et al (2023) *Drosophila* Screening Identifies Dual Inhibition of MEK and AURKB as an Effective Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research* 83, 2704-2715.

Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y and Minamoto T (2005) Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 1365–1373.

Shaw HV, Koval A and Katanaev VL (2019) Targeting the Wnt signalling pathway in cancer: prospects and perils. *Swiss Medical Weekly* 149, 20129.

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. *Nature Chemical Biology* 14, 291–298.

Tsukigi M, Bilim V, Yuuki K, Uolkov A, Naito S, Nagaoka A, Kato T, Motoyama T and Tomita Y (2012) Re-expression of miR-199a suppresses renal cancer cell proliferation and survival by targeting GSK-3 β . *Cancer Letters* 315, 189–197.

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 Computational Biology* 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 Research* 65, 3538–3541.

Vincent EE, Elder DJE, O’Flaherty L, Pardo OE, Dzien P, Phillips L, Morgan C, Pawade J, May MT, Sohail M, et al (2014) Glycogen synthase kinase 3 protein kinase activity is frequently elevated in human non-small cell lung carcinoma and supports tumour cell proliferation. *PloS One* 9, e114725.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, et al (2013) Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine* 369, 1691–1703.

Wagman AS, Johnson KW and Bussiere DE (2004) Discovery and development of GSK3 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Current Pharmaceutical*

Design 10, 1105–1137.

Wang X, Allen S, Blake JF, Bowcut V, Briere DM, Calinisan A, Dahlke JR, Fell JB, Fischer JP, Gunn RJ, et al (2022) Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* 65, 3123–3133.

Weichert W, Schmidt M, Jacob J, Gekeler V, Langrehr J, Neuhaus P, Bahra M, Denkert C, Dietel M and Kristiansen G (2005) Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer. *Pancreatology* 5, 259–265.

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

Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Coloff JL, et al (2012) Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell* 149, 656–670.

Zhang JS, Herreros-Villanueva M, Koenig A, Deng Z, de Narvajas AA, Gomez TS, Meng X, Bujanda L, Ellenrieder V, Li XK, et al (2014) Differential activity of GSK-3 isoforms regulates NF- κ B and TRAIL- or TNF α induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cell Death & Disease* 5, e1142.

Zhang Z, Cheng L, Li J, Qiao Q, Karki A, Allison DB, Shaker N, Li K, Utturkar SM, Atallah Lanman NM, et al (2022) Targeting Plk1 Sensitizes Pancreatic Cancer to Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Research* 82, 3532–3548.

Zhao J, Ou B, Han D, Wang P, Zong Y, Zhu C, Liu D, Zheng M, Sun J, Feng H, et al (2017) Tumor-derived CXCL5 promotes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK/Elk-1/Snail and AKT/GSK3 β / β -catenin pathways. *Molecular Cancer* 16, 70.