

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03524

研究課題名（和文）膵臓がんの頑健性の分子基盤の解明とその破壊による新規治療法の確立

研究課題名（英文）Identifying the basis for the robustness in pancreatic cancer to develop novel therapeutics

研究代表者

園下 将大（Sonoshita, Masahiro）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：80511857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓がんは、代表的な難治がんである。膵臓がん死は今後さらに増加することが確実視されており、有効性の高い新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。代表者らは本研究で、ショウジョウバエを用いて膵臓がんの新規モデル動物を作出し、これを活用することで、治療に対する膵臓がんの頑健性を規定する因子としてMEKとAURKBを同定した。AURKBは膵臓がんの臨床検体でも活性化しており、患者の予後悪化と関連していた。代表者らはさらに、これらの知見を活用し、マウスにおけるヒト膵臓がんゼノグラフトの成長を効率良く抑制する化合物組み合わせの候補を見出すことに成功した。以上の研究により、膵臓がんの頑健性の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんの治療法としては外科的切除が唯一根治の期待できる治療法であるが、切除可能症例は膵臓がん患者の3割未満に留まる。また、化学療法や放射線療法も施行されるが、これらは治癒を期待して実施するものではなく、延命と症状緩和が主目的である。このような背景から、膵臓がんに対して有効性の高い新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。本研究は、これまで詳細が不明であった膵臓がんの薬物抵抗性の成立機序の一端を明らかにするとともに新規治療法候補を提示するもので、学術振興と福祉向上の双方に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer represents a typical intractable cancer. The number of pancreatic cancer deaths has been rising, therefore the development of new, highly effective therapies is an urgent clinical unmet need. In this study, we generated a novel animal model of pancreatic cancer using *Drosophila melanogaster* and used it to identify MEK and AURKB as critical factors that determine the robustness of pancreatic cancer against chemical treatment. We further leveraged these findings to identify a candidate compound combination that efficiently inhibits the growth of human pancreatic cancer xenografts in mice. These results reveal key mechanisms of how the robustness of pancreatic cancer develops.

研究分野：がん生物学、創薬科学

キーワード：膵臓がん ショウジョウバエ モデル動物 キナーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵がんは、代表的な難治がんである。現在膵がんは我が国におけるがん部位別死亡者数の第6位で、その死亡者数は今後さらに増加することが確実視されており、米国でも2030年までにがん死の第2位に浮上すると予測されている。膵がんの治療法としては外科的切除が唯一根治の期待できる治療法であるが、切除可能症例は膵がん患者の2~3割に留まる。また、化学療法や放射線療法も施行されるが、これらは治癒を期待して実施するものではなく、延命と症状緩和が主目的である。このような背景から、膵がんに対して有効性の高い新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。

膵がんの特徴の一つに、薬物治療に対する顕著な頑健性が挙げられる<sup>1</sup>。投与された薬物に対する応答性を向上させることができれば患者予後の改善できると期待されるため、これまで主に遺伝子改変マウスや培養ヒト膵がん細胞などの哺乳類実験系でこの頑健性の成立機序が解析されてきた。その結果新規治療標的の候補が見出されてきたが、頑健性成立の詳細な機序の解明はいまだ不明な点が多く、治療薬の開発も期待されたほどの進捗が得られていない。これらの状況から、「治療に対する頑健性を膵がんにもたらし機序は何か」、そして「どうすれば膵がん脆弱性を誘導できるか」という2つの極めて重要な未解決の問いが存在していると言える。

一方申請者は近年、臨床検体や遺伝子改変マウス、培養ヒト細胞をショウジョウバエと融合したがん研究を展開し、がん発生機序の解明や新規治療薬リードの開発を実施してきた<sup>2-15</sup>。ハエは、遺伝学的な解析ツールが個体レベルで充実している(8割以上の遺伝子のノックアウト系統や全遺伝子のノックダウン系統が入手可能)、繁殖が迅速・容易で安価に研究を推進できる(約10日間で次世代が生まれ、飼育費用もマウスの1/1,000未満)など、哺乳類を補完する多数の利点を備えている。加えて、哺乳類との間で遺伝子やシグナル伝達経路の保存度が高く、患者の遺伝子型を模倣することにより患者に類似した表現型を呈することから、疾患研究の有用なモデルとして近年注目を集めている<sup>12, 15</sup>。以上より申請者は、ハエと哺乳類実験系を連動させることで、迅速・安価かつ多段階で結果の検証が可能な新規の研究基盤を構築できるのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

治療に対する膵がんの頑健性の分子機序を明らかにして新規膵がん治療法を確立し、膵がんの本態解明と福祉向上の両面に貢献することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵がん遺伝子型モデルハエ群の構築

膵がん患者で観察される遺伝子群(*KRAS*活性化、*TP53*・*CDKN2A*・*SMAD4*の不活性化)を模倣すべく、外来遺伝子としてハエ*Ras*<sup>G12D</sup>、*p53*<sup>shRNA</sup>、ハエ*CycE*、*Med*<sup>shRNA</sup>をUASベクターに単独あるいは組み合わせて搭載し、これらのベクターをハエ胚に顕微注入した。そして、生殖系列にこれらの遺伝子を有する系統をそれぞれ単離し、翅原基を含む組織で酵母由来転写因子GAL4を発現する*Ser-GAL4*ハエとこれらを交配することで、膵がん遺伝子型モデルハエを作成した。特に本研究では、*Ser*エンハンサー制御下でこれら4つの外来遺伝子を全て発現するハエを4-hitハエと呼称する。

#### (2) 遺伝学スクリーニング

ハエの全キナーゼ253遺伝子について、ヘテロ接合性あるいはホモ接合性変異体、あるいはノックダウンshRNA系統を収集し、ハエキヌームライブラリを構築した。次にこれをそれぞれ前項の4-hitハエに交配し、各キナーゼのヘテロ接合性変異あるいはshRNAを有する4-hitハエを作成して、成虫まで生存した割合(生存率)を指標に各系統間で腫瘍形質を比較した。

#### (3) 4-hitハエへの投薬試験

寒天・ビール酵母・酵母抽出物・ショ糖・ブドウ糖を沸騰させ、液温が50℃まで低下した段階で化合物を混入し、冷やし固めた。この餌上に4-hitハエの胚を静置して生まれた幼虫に化合物を摂餌投与し、前項と同様に表現型を解析した。

#### (4) 臨床検体解析

北海道大学病院にて2000年から2010年に外科切除された検体(インフォームドコンセント取得済み)の組織アレイから薄切片を作成し、抗原特異的抗体を使用して免疫組織染色を実施した。その後、染色性と全生存期間の相関を解析した。

#### (5) 膵がんモデルマウスへの投薬試験

ヒト膵がん細胞MIA PaCa-2をヌードマウスの皮下組織に移植したのち、腫瘍の体積を経

時的に測定した。その際、化合物群を経口投与あるいは腹腔内投与し、これらが腫瘍の成長に与える影響を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 膵がん遺伝子型モデルハエの作出

膵がんにおいては、*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4*の各遺伝子の変異が病態に関与していることが示唆されている<sup>1</sup>。そして、これら4つの遺伝子全てに変異を有する膵がん患者は、膵がん患者の中で最も予後が悪いことが明らかとなっている<sup>16</sup>。しかし、これら4つの遺伝子の変異全てを再現した内因性発がんモデルマウスは未だ報告されていない。そこで代表者は、これら4つの遺伝子変異を模倣した世界初のモデル動物となる4-hitハエを作出した。変異の様々な組み合わせがもたらす影響を比較した結果、導入遺伝子の数が増加するにつれてハエの生存率は低下し、4-hitハエは致死表現型を呈することが分かった。これは変異遺伝子の数が増加するほど患者の予後が悪くなるという臨床報告<sup>16</sup>と矛盾しないもので、4-hitハエが腫瘍形質を発現する新規モデル動物であることを示唆している。

##### (2) 新規治療標的の同定

続いて代表者は、膵がんの新規治療標的を同定すべくこの4-hitハエを用いて全キナーゼ遺伝子の遺伝学スクリーニングを実施した。その結果、*Dsor1* (ヒトMEKのハエオルソログ) と *aurA* (ヒトオーロラキナーゼ *AURK* のハエオルソログ) を含む複数の遺伝子のヘテロ接合性変異が4-hitハエの生存率を顕著に改善することが分かった。この結果はハエに全身性ヘテロ接合性変異を導入することで得たものだったが、形質転換細胞特異的にこれらの遺伝子の発現を低下させた場合も同様の結果が得られた。以上の結果は、MEKとAURKが膵がんの治療標的候補であることを示唆している。

AURKは、ヒストンH3 (HH3) をリン酸化することで細胞の有糸分裂を制御する。AURKの発現は非小細胞肺癌や肝細胞がんにおける予後の悪化と相関することが報告されているが、膵がん患者における十分な解析はなされていない。そこで代表者らは、膵がん患者組織中のAURKの活性を評価すべく、リン酸化HH3 (pHH3) の免疫組織化学染色を実施した。その結果、86検体中70検体 (81.4%) にpHH3陽性のがん細胞を認めた (図1A)。さらに、Ki-67染色で調整した後もpHH3陽性患者は陰性患者と比較して有意な生存期間の短縮を示すことが分かった (図1B)。この結果は、AURKの活性化が膵がん患者の予後の悪化と相関することを示している。

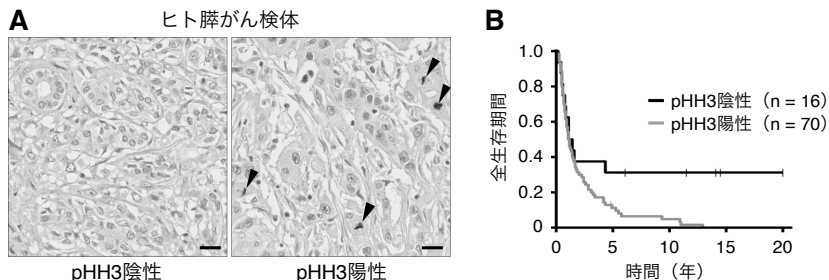


図1：膵がん臨床検体におけるAURKB活性化状態の解析。A, AURKB活性化の指標であるリン酸化ヒストンH3 (pHH3) の検出。矢頭：pHH3陽性がん細胞。Scale bars：20  $\mu$ m。B, pHH3発現と膵がん患者予後の相関。pHH3陽性患者は陰性患者と比較して全生存期間の短縮を示した。

代表者らはこれらの結果に基づき、膵がんの新規治療法候補としてMEK阻害剤 trametinib (以下Tr) とAURK阻害剤 BI-831266 (以下B8) に着目した。Trは、進行膵がん患者を対象とした第II相臨床試験においてゲムシタピンとの併用の効果が検討されたが、有意な生存期間延長効果は認められていない。一方B8は、A/B/Cの三つのAURKファミリーメンバーのうち特にB (AURKB) を阻害する活性を有する。まず代表者らはこれらを4-hitハエに単独あるいは組み合わせで混餌投与し、特に両者の組み合わせが相乗的に4-hitハエの生存率を改善することを発見した。そこで代表者らは、このTrとB8の併用療法 (以下TB) の哺乳類における有効性を検証するために、ヒト膵がん培養細胞MIA PaCa-2を用いて皮下異種移植膵がんモデルマウスを作成した。このモデルにTrおよびB8を単独あるいは組み合わせで4週間胃内投与したところ、TBは単剤投与と比較し有意に高い効果を示した (図2)。同時に代表者らは、これらの処置がマウスの体重や行動に影響を与えないことも確認した。

これらから代表者らは、膵がんがTrに対して示す抵抗性の成立にAURKBが重要な役割を果たし

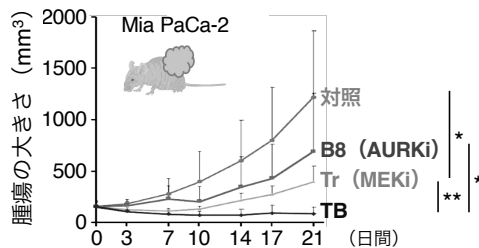


図2：トラメチニブとBI-831266 (B8) の併用療法による腫瘍の成長抑制。ヒト膵がん培養細胞MIA PaCa-2を用いて皮下異種移植モデルマウスを作成し、トラメチニブおよびB8それぞれの単剤投与、ならびにトラメチニブ/B8併用療法 (TB) の抗腫瘍効果を検証した。マウスは各群8匹ずつで、エラーバーは標準偏差を示す。i: inhibitor (阻害剤)。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  in Mann-Whitney U test。

ており、この頑健性の破壊に AURKB の追加阻害が有効で、TB 療法が新規膀胱がん治療法の有力な候補になると結論した。併せて代表者らは、頑健性を規定する他の候補因子を同定するとともに、個体にかかる重力の低下といった環境の変化も頑健性を向上させることを見出している。今後は、これらの詳細な分子機序を解明するとともにその知見を創薬研究に活用し、新規治療薬を創出することを目指す。

<引用文献>

1. Morris et al. *Nat Rev Cancer* 10:683 (2010).
2. Takaku, Sonoshita et al. *J Biol Chem* 275:34013 (1999).
3. Sonoshita et al. *Nat Med* 7:1048 (2001).
4. Sonoshita et al. *Cancer Res* 62:6846-6849 (2002).
5. Taketo, Sonoshita. *Biochim Biophys Acta* 1585:72 (2002).
6. Takeda, Sonoshita et al. *Cancer Res* 63: 4872 (2003).
7. Kawada, Sonoshita et al. *Cancer Res* 64: 4010 (2004).
8. Sonoshita et al. *Cancer Cell* 19:125-137 (2011).
9. Sonoshita et al. *Cancer Discov* 5:198 (2015).
9. Itatani, Sonoshita et al. *J Biochem* 159:133 (2016).
10. Kakizaki, Sonoshita et al. *Cancer Sci* 107:1622 (2016).
11. Okada, Sonoshita et al. *Cancer Sci* 108:744 (2017).
12. Sonoshita et al. *Fly models of human diseases* pp287 (2017).
13. Sonoshita et al. *Nat Chem Biol* 14:291 (2018).
14. Ung\*, Sonoshita\* et al. *PLoS Comput Biol* 15:e1006878 (2019). [\*equal contribution]
15. Yamamura et al. *Cancer Sci* 112:505-514 (2021).
16. Qian et al. *JAMA Oncol* 4:e173420 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamura Ryodai, Ooshio Takako, Sonoshita Masahiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Tiny Drosophila makes giant strides in cancer research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 505 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jiang Hui, Kimura Taku, Hai Han, Yamamura Ryodai, Sonoshita Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Drosophila as a toolkit to tackle cancer and its metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 982751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.982751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 園下将大
2. 発表標題 個体表現型スクリーニングが加速する新規がん治療薬開発
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Sonoshita
2. 発表標題 A whole-animal platform to advance drug discovery
3. 学会等名 Imperial College London Life Sciences Seminar（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園下将大
2. 発表標題 個体表現型スクリーニングによる新規がん治療薬開発の加速
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園下将大
2. 発表標題 ショウジョウバエを活用したがん治療薬の探索
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「細胞ダイバース」第6回領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Sonoshita
2. 発表標題 Determining therapeutic vulnerabilities in pancreatic cancer using a whole-animal platform
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Sonoshita
2. 発表標題 Drosophila approaches to develop novel cancer drugs
3. 学会等名 The TARA International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Sonoshita
2. 発表標題 Whole-animal approaches using Drosophila to develop novel therapeutic candidates for pancreatic cancer treatment
3. 学会等名 The 7th JCA-AACR Special Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Sonoshita
2. 発表標題 Whole-animal approaches using Drosophila to develop novel drugs for cancer treatment
3. 学会等名 The 12th AACR-JCA Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 抗がん剤をスクリーニングする方法及び膵がんの治療のためのキナーゼ阻害剤の組み合わせ	発明者 園下将大、関谷翔、 平野聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/007651	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 がんの治療又は予防剤、及びがんの治療又は予防のためのRF経路阻害剤とMEK阻害剤との組み合わせ	発明者 大塩貴子、園下将大、 市川聡、佐藤悠介、 藤井清永	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-29585	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 蛍光顕微鏡	発明者 園下将大、平松光太 郎、合田圭介ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-109240	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究代表者所属研究室HP  
<https://bmoncology.wixsite.com/mysite>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤井 清永  (Fujii Kiyonaga)  (10278327)	第一薬科大学・薬学部・教授    (37107)	
研究分担者	小沼 剛  (Konuma Tsuyoshi)  (10631682)	横浜市立大学・生命医科学研究科・助教    (22701)	
研究分担者	市川 聡  (Ichikawa Satoshi)  (60333621)	北海道大学・薬学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	大塩 貴子  (Ooshio Takako)  (80723238)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------