

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07558

研究課題名（和文）リボフラビン経路を標的とした新規膵臓がん治療法の開発

研究課題名（英文）Developing a novel therapy for pancreatic cancer targeting the riboflavin pathway

研究代表者

大塩 貴子（Ooshio, Takako）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：80723238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：代表者らは膵がんの新規治療法を開発すべく、膵がんで観察される4遺伝子変異を模倣した初の動物モデル、4-hitハエを作出した。この4-hitハエは、腫瘍細胞の異常な増殖により殆どが成虫になる前に死亡した。代表者らは4-hitハエを用いた遺伝学解析より、リボフラビン（RF）代謝の律速酵素であるRFキナーゼとMEKがこの致死性を促進することを明らかにした。さらに代表者らは、これらのキナーゼの阻害剤の組み合わせが4-hitハエの生存率を上昇させ、マウス膵臓におけるヒト膵がんゼノグラフトの成長を有意に抑制することも見出した。以上の結果は、この組み合わせが膵がんの新規治療法となり得ることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは、早期発見が困難で、かつ有効な治療法が殆ど存在しない代表的な難治がんである。その新規治療法の開発は極めて重要だが、長年の研究にもかかわらず膵がんの詳細な発生機序や有効な治療標的は十分に解明されていない。そこで、代表者らは本研究でショウジョウバエ遺伝学を駆使し、新規治療薬候補を見出すことに成功した。この結果は、4-hitハエが膵がん悪性化の分子機序の解明や新規治療法の開発に有用であることを示唆している。代表者らは今回同定した治療標的以外にも複数の標的候補を見出しており、これらを解析することで将来的に治療の選択肢を増やせる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To develop a novel therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), we established the first animal model, a 4-hit fly, that mimics the four-gene mutations observed in PDAC. Most of these flies died before reaching adulthood due to the abnormal proliferation of transformed cells. To clarify the signaling pathways involved in their decreased viability, we performed genetic screening with the 4-hit fly. As a result, we revealed that riboflavin (RF) kinase and MEK promote their malignant traits. RF kinase is a rate-limiting enzyme in RF pathway and unclear their roles in PDAC. Therefore, we conducted chemical testing and elucidated that a combination of RF pathway and MEK inhibitors markedly increased the viability of the 4-hit fly. Furthermore, the combination significantly suppressed tumor expansion in mice orthotopically implanted with human PDAC cells. These results indicate that the combination is a novel therapeutic candidate for PDAC.

研究分野：がん生物学

キーワード：膵がん 新規治療法開発 ショウジョウバエ リボフラビン

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因の第1位であり、今後も罹患率は増加すると予測されている。そこで代表者らは、がんの中でも特に予後の悪い膵がんの発生機序の解明と新規治療薬の開発を志した。膵がんでは、がん遺伝子 *KRAS* の活性化変異や、がん抑制遺伝子群 *TP53*・*CDKN2A*・*SMAD4* の不活性化変異がそれぞれ 40-90% の患者に観察され、最も予後が悪い患者群はこれら 4 遺伝子全ての変異を有する (Makohon-Moore et al. *Nat Rev Cancer* 2016)。この患者群に対する新規治療法を開発すべく、代表者らはこの 4 遺伝子変異を模倣した 4-hit ショウジョウバエを作成した (図 1)。この 4-hit ハエは、腫瘍細胞の過剰な増殖・浸潤により、成虫になる前に全個体が死亡した。代表者らは、このハエを使用して全キナーゼの遺伝学的スクリーニングを実施し、リボフラビン (RF) 代謝の律速酵素リボフラビンキナーゼ (*RFK*) のヘテロ接合性変異がこのハエの致死表現型を救済することを見出した (図 2A)。RF (別名ビタミン B2) は、細胞膜に局在する RF トランスポーター (RFT) を介して細胞内に取り込まれ、RFK によってリン酸化されてフラビンモノヌクレオチド (FMN) となり、FMN はさらに Flavin adenine dinucleotide (FAD) synthetase 1 (FLAD1) によって FAD に変換される (図 2B)。FMN や FAD は補酵素として様々なフラボタンパクと結合し、エネルギー産生や酸化還元反応、他のビタミンの合成など恒常性の維持に重要な各種代謝反応を調節する (Lienhart et al. *Arch Biochem Biophys* 2013)。代表者らはさらに、RF 経路の競合的阻害剤 roseoflavin (RoF) と MEK 阻害薬 trametinib (Tr) の組み合わせ投与も 4-hit ハエの致死性を救済することを見出した (図 2C)。これらの結果から、RAS-MEK 経路の活性化に起因する腫瘍において、RF 経路が腫瘍形質の発現を促進することが示唆された。しかし、「RF 経路はどのように膵がんの形成を促進するのか」、そして、「RF 経路は膵がんの治療標的となり得るか」の 2 つの重要な問いが依然存在していた。

2. 研究の目的

本研究では、RF 経路が膵がんを促進する作用機序を解明し、RF 経路や MEK の阻害が新規膵がんの治療法になり得るか検討する。

3. 研究の方法

(1) 4-hit ハエでの RF 代謝関連遺伝子のノックダウン

ノックダウンに必要なハエは Bloomington *Drosophila* Stock Center、国立遺伝学研究所、Vienna *Drosophila* RNAi Center から入手し、代表者がハエの生存率の増減を観察するのに適していることを確認済みである *Ser>4-hit/S80-T* ハエと交配して、それぞれの遺伝子を腫瘍細胞特異的にノックダウンした 4-hit ハエを得た。そしてこれらのハエを 27 度で 13 日間飼育し、羽化した個体の数を蛹の総数で除して生存率を算出した。

(2) ヒト膵がん細胞同所移植マウスにおける RoF と Tr の抗腫瘍効果の検討

BALB/cSlc nu/nu マウスの膵臓に *Luciferase* 遺伝子を組み込んだヒト膵がん細胞 (AsPC-1) を 1×10^6 個移植した。そして、Luciferin (150 mg/kg mouse body weight) 投与後の Luciferase 活性を指標に、IVIS Imaging System を用いてがん細胞の増殖を経時的に計測し、その測定値が一定に達した時点で溶媒 (DMSO、生理食塩水) もしくは 0.2 mg/kg Tr を経口投与、および溶媒 (エタノール、クレモフォール、生理食塩水) もしくは 10 mg/kg RoF を週 5 日腹腔内投与した。投与を開始して 4 週間後に腫瘍を採取し、その重量を測定した。

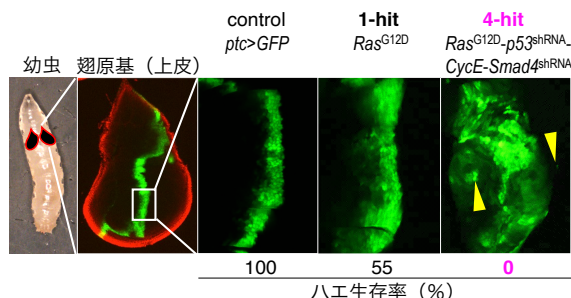


図 1：膵がん遺伝子型モデルハエ 幼虫の翅原基 (赤：輪郭) で、*patched* (*pit*) プロモーター活性を利用して約 10 細胞ぶんの幅の単層上皮細胞に遺伝子操作を施した (緑)。黒い領域は野生型細胞。*Ras* 遺伝子を活性化すると、形質転換細胞の増殖が亢進して帯が広がる (1-hit)。4 遺伝子異常ハエ (4-hit) では一層増殖が活発になり、遊走能が亢進した腫瘍細胞が出現し (右; 矢頭)、ハエは致死となる。

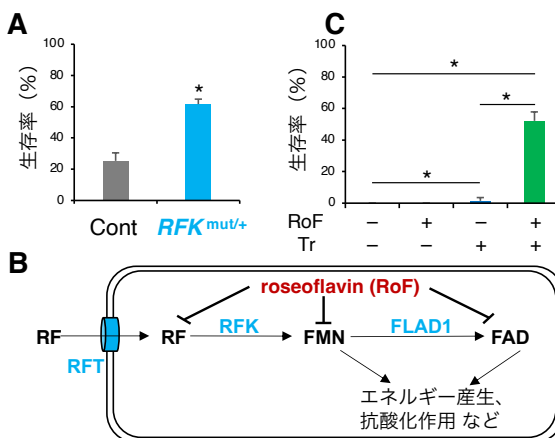


図 2：リボフラビン (RF) 経路の阻害による 4-hit ハエ生存率の改善 A, *RFK* ヘテロ接合性変異による 4-hit ハエ生存率の改善。B, RF 経路。roseoflavin (RoF) は、FMN や FAD と競合して本経路を阻害する。C, RoF と MEK 阻害薬 trametinib の併用による 4-hit ハエ生存率の改善。*、 $P < 0.05$ 。

(3) ヒト膵がん細胞のコロニー形成における RoF および Tr の影響の検討

5×10³個の AsPC-1 細胞を 1.8%メチルセルロース入り培地に懸濁し、下層を 0.48%アガロース入り培地でコートした 24 ウェルプレートに播種した。翌日に最終濃度が 10 μM RoF、1 nM Tr、10 μM RoF + 1 nM Tr となるように調製した培地 (DMSO 最終濃度 0.1%) を添加し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。そして 13 日後に培養液を追加し、23 日後に各群を撮像してコロニーの大きさおよび数を測定した。

4. 研究成果

(1) RF 代謝関連遺伝子のノックダウンはいずれも 4-hit ハエの致死性を救済する

代表者は、RF 代謝経路の律速酵素をコードする *RFK* のヘテロ接合性の変異が 4-hit ハエの生存率を回復させることを明らかにしていたが (図 2A)、RF 代謝に関わるその他の遺伝子の関与は不明であった。RF 経路に関与するヒト遺伝子のハエオルソログを DIOPT Ortholog Finder で検索したところ、*RFT* は *Rift*、*RFK* は *RFK*、*FLAD1* は *FADS* と *CG16848* の 2 つの遺伝子が対応することが分かった (図 3A)。そこで代表者は、これらの遺伝子を 4-hit ハエの腫瘍細胞特異的にノックダウンした。その結果、いずれの遺伝子のノックダウンも 4-hit ハエの生存率を有意に回復させた (図 3B)。これらの結果より、RF 経路に関わることが報告されている全ての遺伝子が 4-hit ハエの悪性形質を促進していることが明らかになった。

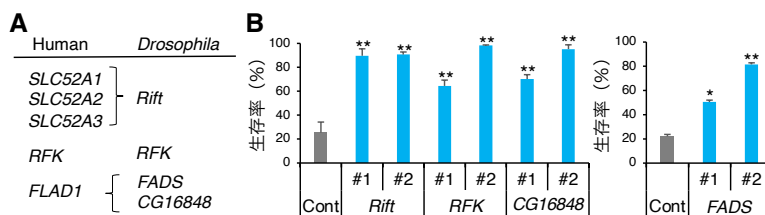


図 3: RF 経路関連遺伝子のノックダウンによる 4-hit ハエ生存率の回復 A, ヒトとハエにおける RF 経路関連遺伝子。B, ハエ RF 経路関連遺伝子の腫瘍細胞特異的ノックダウンによる 4-hit ハエの生存率の上昇。*, $P < 0.05$ 。**, $P < 0.01$ 。(Cont との比較)

(2) RoF と Tr の組み合わせ投与はヒト膵がん細胞ゼノグラフトの成長を抑制する

4-hit ハエの生存率を RoF と Tr が有意に回復させたことから (図 2C)、代表者はこの組み合わせが哺乳類モデルでも抗腫瘍効果を示すか検討した。まず代表者は 4 遺伝子変異を持つヒト膵がん細胞株 AsPC-1 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入した。そして、免疫不全マウスの膵臓に同所移植し、RoF や Tr を 4 週間投与しながら IVIS イメージング法によってゼノグラフトの成長を観察した。その結果、RoF と Tr の組み合わせは投与開始 2 週間後より溶媒投与のコントロール群と比べて有意に腫瘍の成長を抑制すること、一方 RoF や Tr の単独投与は影響を与えないことが分かった (図 4A)。さらに、RoF と Tr の組み合わせ投与 4 週後の膵腫瘍の重量は、溶媒投与群と比較して有意に低下していた (図 4B)。以上の結果より、RoF と Tr の併用はヒト膵がんゼノグラフトの成長を抑制することが示された。

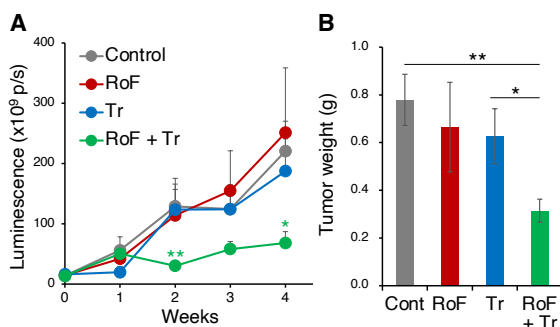


図 4: RoF と Tr 併用によるヒト膵がん腫瘍の成長抑制 A, IVIS イメージング法による腫瘍の成長の経時的計測。*, $P < 0.05$ 。(Control との比較) B, RoF および Tr 投与 4 週目の腫瘍の重量。*, $P < 0.05$ 。**, $P < 0.01$ 。

(3) RoF と Tr の組み合わせ添加はヒト膵がん細胞のコロニー形成を抑制する

膵がんは間質の豊富な腫瘍であり、その成長は線維芽細胞や血管などが微小環境の影響を受ける。したがって、前項で見出した RoF と Tr の組み合わせによる抗腫瘍効果のがん細胞への直接の作用によるものなのか、あるいはがん微小環境への影響を介したものなのか、依然として不明であった。そこで、代表者は 3 次元培養した AsPC-1 に RoF や Tr を処置し、コロニー形成への影響を検討した。その結果、RoF や Tr の単独処置は対照群と比較して大きなサイズのコロニーを減少させたが、RoF と Tr の組み合わせ処置はコロニーのサイズだけでなく数も有意に減少した (図 5)。以上の結果より、RoF と Tr は少なくとも膵がん細胞自体に影響を与え、抗腫瘍効果を発揮していると考えられた。

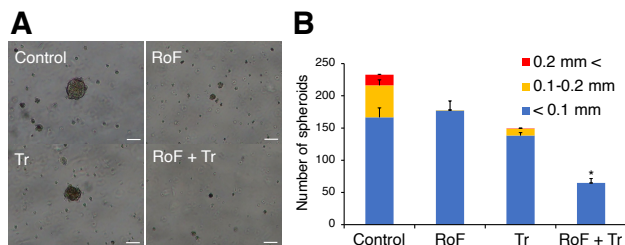


図 5: RoF や Tr 添加によるヒト膵がん細胞のコロニー形成の抑制 A, RoF および Tr 添加 23 日後の膵がん細胞の 3 次元培養像。Bar = 0.1 mm。B, RoF および Tr 添加 20 日後のコロニーの大きさごとの数。*, $P < 0.05$ 。(Control の総コロニー数との比較)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Liu Yang, Xin Bing, Yamamoto Masahiro, Goto Masanori, Ooshio Takako, Kamikokura Yuki, Tanaka Hiroki, Meng Lingtong, Okada Yoko, Mizukami Yusuke, Nishikawa Yuji	4. 巻 112
2. 論文標題 Generation of combined hepatocellular cholangiocarcinoma through transdifferentiation and dedifferentiation in p53 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3111~3124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ooshio Takako, Yamamoto Masahiro, Fujii Kiyonaga, Xin Bing, Watanabe Kenji, Goto Masanori, Okada Yoko, Suzuki Akira, Penninger Josef M., Nishina Hiroshi, Nishikawa Yuji	4. 巻 73
2. 論文標題 Hepatocyte Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 7 Contributes to Restoration of the Liver Parenchyma Following Injury in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 2510~2526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nomura Naho, Ito Chiaki, Ooshio Takako, Tadokoro Yuko, Kohno Susumu, Ueno Masaya, Kobayashi Masahiko, Kasahara Atsuko, Takase Yusuke, Kurayoshi Kenta, Si Sha, Takahashi Chiaki, Komatsu Masaaki, Yanagawa Toru, Hirao Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81076-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goto Masanori, Ooshio Takako, Yamamoto Masahiro, Tanaka Hiroki, Fujii Yumiko, Meng Lingtong, Kamikokura Yuki, Okada Yoko, Nishikawa Yuji	4. 巻 1869
2. 論文標題 High levels of Myc expression are required for the robust proliferation of hepatocytes, but not for the sustained weak proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166644 ~ 166644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2023.166644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大塩 貴子
2. 発表標題 生体内での網羅的なビタミン解析基盤の確立
3. 学会等名 第6回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takako Ooshio, Yusuke Satoh, Kiyonaga Fujii, Junki Fukuda, Tomoki Ishihara, and Masahiro Sonoshita
2. 発表標題 Identifying a novel therapeutic candidate for pancreatic cancer using a Drosophila model
3. 学会等名 Serendipity Workshop 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 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 国立大学法人北海道大学、学校法人都築学園
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-026434	出願年 2022年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 AGENT FOR TREATING OR PREVENTING CANCER, AND COMBINATION OF RF PATHWAY INHIBITOR AND MEK INHIBITOR FOR TREATING OR PREVENTING CANCER	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 国立大学法人北海道大学、学校法人都築学園
産業財産権の種類、番号 特許、米国出願番号：17/680,97	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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	園下 将大 (Sonoshita Masahiro) (80511857)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	
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	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)	

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
---------	---------