

■受領No.1457

新規膵がん遺伝子型モデル動物に立脚した 膵がん個別化治療法の開発

代表研究者

園下 将大

北海道大学遺伝子病制御研究所 教授



Developing personalized therapy for pancreatic cancer leveraging a novel whole-animal platform

Principal Researcher

Masahiro Sonoshita,

Hokkaido University Institute for Genetic Medicine Professor

膵がんは、代表的な難治がんである。近年、患者の遺伝子型に合わせた個別化医療が注目を集めているが、膵がんにおける開発はいまだ十分ではない。我々は本研究で膵がんの遺伝子変異を模倣した初のショウジョウバエモデル群を作出・解析し、遺伝子型が腫瘍形質を規定することを見出すとともに、網羅的遺伝学解析により新規治療標的を同定することに成功した。これらの結果は、膵がんの個別化医療の実現に向けた基盤となるものである。

Pancreatic cancer is a typical intractable cancer. In recent years, personalized medicine based on the patient's genotype has been attracting attention, but its development in pancreatic cancer is still insufficient. In this study, we generated and analyzed the first *Drosophila* models that mimic the genetic mutations of pancreatic cancer. Analyzing them, we found that genotype determines tumor characteristics, and successfully identified novel therapeutic targets by comprehensive genetic analysis. These results provide the basis for achieving personalized medicine for pancreatic cancer.

1. 研究内容

1.1 新規膵がん遺伝子型モデルハエの作出

膵がん臨床検体では、がん遺伝子 *KRAS* の活性化や、がん抑制遺伝子群 *TP53*・*P16*・*SMAD4* の不活性化が単独あるいは組み合わせとして各々観察される。膵がんの病態の包括的な理解には多様なこれらの多様な遺伝子型を模倣した動物モデルが不可欠である。

そこで申請者らは、ハエを使用して新規モデル動物の作出を試みた。まず、非遺伝子組換えである *w* ハエから cDNA を得た。これを鋳型とし、PCR にてハエ野生型 *Ras* と *Cyclin E* (*CycE*) の全長

cDNA を得た。ハエゲノムには *P16* が存在しないため、哺乳類の *P16* 不活性化とハエにおいて機能的に等価な *CycE* の発現により、本研究では *P16* 不活性化を模倣した。これらの配列をハエ *p53* と *Smad4* のノックダウンのための shRNA とともにベクターに搭載して *w* ハエ受精卵に顕微注入し、これらの外来遺伝子を生殖系列に持つハエを作成した。このハエを *patched* (*ptc*)-*gal4-GFP* ドライバー系統と交配することで、これらの外来遺伝子が幼虫の翅原基を含む単層上皮組織で発現する *ptc>Ras^{G12D}* (1-hit) ハエや *ptc>Ras^{G12D}-p53^{shRNA}-CycE-Smad4^{shRNA}*

(4-hit) ハエを作出した。

これらのハエを 16°C にて飼育したところ、形質転換が発生した。特に 4-hit ハエは、致死表現型を呈した (図 1)。これは *Ras* のみを活性化した 1-hit モデルよりも重篤な表現型で、遺伝子変異が蓄積

すると患者の予後が悪化する報告と矛盾しない (Qian et al. *JAMA Oncol* 2018)。

以上の結果は、膵がんの遺伝子型を模倣した初のモデルハエの作出に申請者らが成功したことを示している。

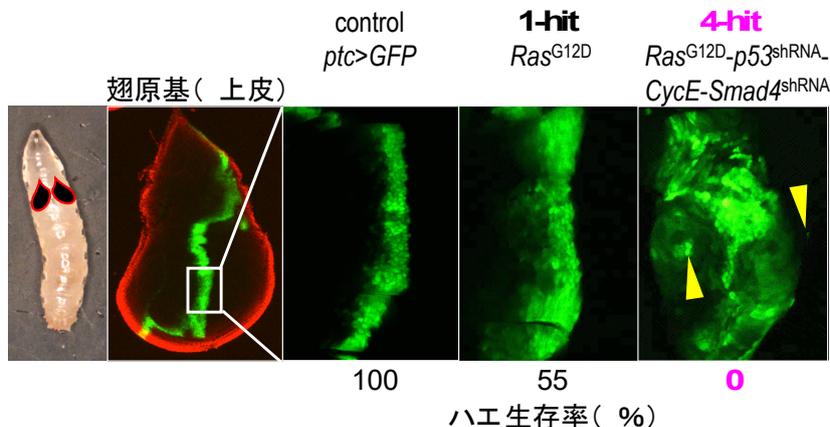


図 1：膵臓がん遺伝子型ハエモデル。

翅原基 (赤：輪郭) で、*patched* (*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。*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くなる (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。

1.2 新規膵がん治療標的の同定

申請者らは次に、膵がんの新規治療標的を遺伝子型ごとに同定すべく、まず 4-hit ハエを使用して網羅的遺伝学スクリーニングを実施した。本研究では、ハエのキノーム中の全キナーゼ (252 遺伝子) のヘテロ接合性変異体 (BDSC) を網羅した「キノーム変異体ライブラリ」を構築し、これらの変異体を各々 4-hit ハエと交配した。これにより、各々のキナーゼのヘテロ接合性変異を有する 4-hit ハエを作出した。そして、簡便な定量化が可能なハエ生存率を指標とし、これらの各系統の腫瘍形質を比較した (図 2)。

全てのキナーゼ遺伝子の機能を検索した結果、キナーゼ遺伝子 *X* のヘテロ接合性変異を 4-hit ハエに導入すると、導入しない場合と比較してハエの生存率が著明に改善することが分かった (図 3 A)。この結果は、*X* の活性の阻害が膵がん形質の抑制につながる可能性を示している。実際に *X* を

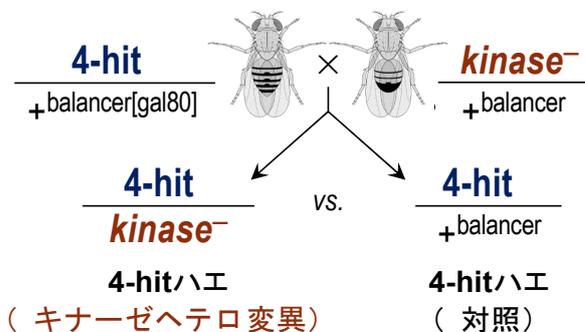


図 2：網羅的遺伝学解析による、膵がん形質を規定するキナーゼの探索。

キナーゼ遺伝子 (全 252 種) のヘテロ接合性変異 (*kinase*⁻) を 4-hit ハエに独立に導入し、ハエの生存率を対照ハエ (キナーゼ野生型) と比較する。あるキナーゼの変異により生存率が改善した場合、このキナーゼの本来の機能は膵がん形質の促進と判断できる。balancer, バランサー染色体 (変異遺伝子の発現やヘテロ接合性変異の維持に必要な染色体)。

阻害する化合物 A は、申請者らが別の実験で膵がん形質抑制効果を見出していた MEK キナーゼの阻害剤 (MEKi: 0.5 μ M) との同時投与により、

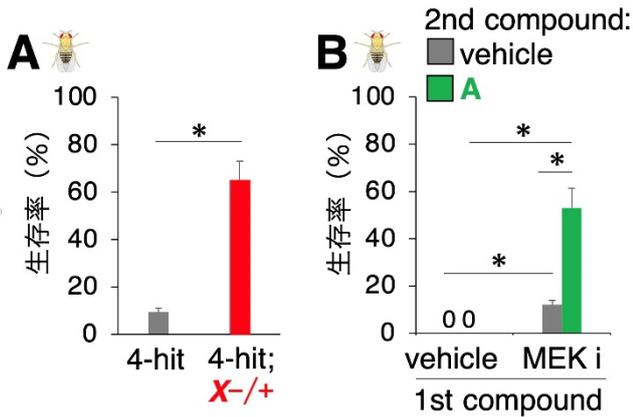


図3：膵がん形質促進キナーゼの同定。

A, キナーゼ遺伝子Xのヘテロ接合性変異は、4-hitハエの生存率を改善する。B, MEK阻害剤(MEK i)とXの阻害剤Aの併用は、4-hitハエの生存率を改善する。*、 $P < 0.05$ in Dunnett test。

4-hitハエの生存率の著明な改善をもたらした(図3B)。またAやこの組み合わせは、ヒト膵がん細胞株MIA Paca-2の増殖を著明に抑制した(図4)。申請者らは、同様の細胞増殖抑制効果をPanc-1やCapan-1など他のヒト膵がん細胞株でも確認した。これらの結果は、これらの結果は、XとRAS-MEK経路の同時阻害が膵がん形質を抑制することを示唆している。

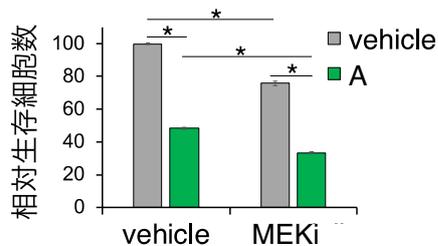


図4：化合物の併用によるヒト膵がん細胞の増殖抑制。

MIA Paca-2細胞にAとMEK阻害剤を添加し、3日後の相対生存細胞数を測定した。他のヒト膵がん細胞株Panc-1やCapan-1細胞においても同様の結果を得ている。*、 $P < 0.05$ in Dunnett test。

1.3 膵がんマウスモデルの作出

我々は現在、これらの結果が哺乳類個体レベルでも再現するか検討を進めている。この目的のため、まず4-hit変異を有するヒト膵がん細胞AsPC-1

にルシフェラーゼを導入した。そして、この細胞をBALB/cヌードマウスの膵臓に同所移植した。定期的にルシフェリンを腹腔内投与しIn Vivo Imaging System (IVIS)を使用してルシフェラーゼ活性を測定したところ、腫瘍由来の発光量が日数経過とともに増大することが分かった(図5A)。以上の結果より、ヒト膵がん細胞が個体内で生着・成長する膵がんマウスモデルの樹立に成功し、今後の実験の基盤を構築できたと言える。

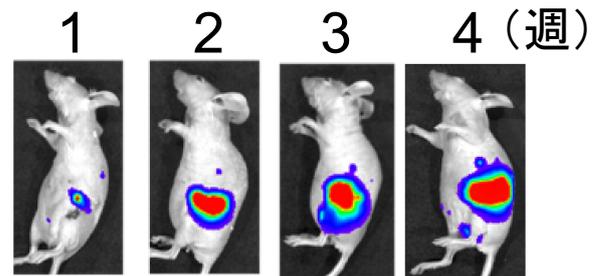


図5：ヒト膵がん細胞同所移植モデルマウスの作出。

ルシフェラーゼ標識したAsPC-1細胞をヌードマウスの膵臓に移植し、毎週IVIS(In Vivo Imaging System)にて腫瘍の成長を測定した。青から赤に変化するにつれて発光強度が高い。

1.4 考察と今後の展望

本研究により、膵がん形質を規定する機序の一端が明らかとなった。すなわち、遺伝子型の相違が膵がん形質に大きな影響を与えることが分かった。我々の知見は、悪性になるほど変異している遺伝子数が増加するという膵がん臨床検体の知見(Morris et al. *Nat Rev Cancer* 2010)や、4-hit膵がんを有する患者は1/2/3-hit膵がんを有する患者よりも予後が悪いとする報告(Qian et al. *JAMA Oncol* 2018)と矛盾せず、ハエが膵がん研究の重要なモデル生物となり得ることを示している。

また我々は本研究で、4-hit膵がんの新規治療標的や治療薬シーズを同定することに成功した。我々は最近他の遺伝子変異パターンを模倣したハエの作出にも成功しており、今後は、これらのハエで同様の解析を実施することで、患者の遺伝子型にあわせた膵がんの個別化医療の基盤を創出できると期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

2.1 論文

Yamamura R, Ooshio T, Sonoshita M. Tiny Drosophila makes giant strides in cancer research. Cancer Sci. 112:505-514, 2021.

2.2 学会発表

- Masahiro Sonoshita Determining therapeutic vulnerabilities in pancreatic cancer using a whole-animal platform. 第80回日本癌学会学術総会（2021年）
- 園下将大 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. 第25回日本がん分子標的治療学会（2021年）
- Masahiro Sonoshita Drosophila approaches to develop novel cancer drugs. The TARA International Symposium（2021年）
- Masahiro Sonoshita A whole-animal platform to advance drug discovery. Imperial College London Life Sciences Seminar（2021年）

謝辞

本研究は、公益財団法人日立財団の2020年度倉田奨励金により実施することができました。ご支援に深く感謝申し上げます。