

# ゲムシタビン感受性を増強させる Aurora B 阻害剤の機能解析と前臨床試験的な統合的実験モデルによる検証

東京医科歯科大学

小野 宏 晃

## I 要 旨

膵臓癌は腫瘍特性としての生物学的悪性度が極めて高く、根治手術を施行しても術後再発率が高く、その疾患予後が極めて不良である。さらに再発性膵癌はより悪性度が高く治療抵抗性を示すことが臨床的に知られている。

このことから膵臓癌に対する集学的治療における抗がん剤治療の重要性が高くなっている。有効的な新規抗がん剤の開発が必要とされるが、基礎実験に基づく新規抗がん剤および多種類の抗がん剤治療の臨床効果の検証を可能とする予測実験モデルが確立されていない問題が挙げられる。より効果的な新規抗がん剤の開発にむけて実験モデルの確立が望まれる。

## II 目 的

申請者は、膵臓癌における新たな集学的治療の確立を目的とした新規抗がん剤および抗がん剤関連メカニズムを明らかにするトランスレーショナル研究を行ってきた。また膵臓癌細胞株を用いて 100 種類の独自のカスタムメイド阻害剤ライブラリーによる薬剤スクリーニングによる膵臓癌における新規抗がん剤としてキネシン阻害剤 Ispinesib の有用性を報告した (Murase Y and Ono H et al, C ancer Science 2021. Nov; 112(11): 4641-4654)。さらに阻害剤ライブラリーを用いて膵臓癌におけるキードラッグであるゲムシタビンの治療効果を増強する新規抗がん剤として Aurora B 阻害剤である

GSK1070916 を同定し、その分子メカニズムの解明し新規治療薬としての臨床応用性を従来の in vitro 解析に加えて膵癌オルガノイドや PDX (Panent-derived xenograft) マウスモデルを用いて新たな実験モデルを用いて検証した。

## III 方 法

### 1 膵臓癌カスタムライブラリーを用いたゲムシタビンの作用を増強させる GSK1070916 の同定と機能解析

膵臓癌細胞株を用いて 100 種類の独自のカスタムメイド阻害剤ライブラリーによるゲムシタビンの作用を増強する薬剤を選出し、候補薬剤として Aurora 阻害剤 GSK1070916 を同定した。GSK1070916 は膵臓癌細胞株に対して細胞増殖能を WST-8 アッセイによって濃度依存的に評価した。フローサイトメトリー解析によって GSK1070916 による細胞周期への影響を評価した。さらに GSK1070916 投与により膵臓癌細胞に対し DNA ダメージ蓄積をウエスタンブロットおよび蛍光免疫染色による  $\gamma$ -H2AX により評価検証した。また GSK1070916 のゲムシタビンの細胞増殖抑制ならびに DNA ダメージ蓄積といった抗腫瘍効果を濃度依存的にそれぞれ評価した。

### 2 ゲムシタビン薬剤メカニズムにおける Aurora B キナーゼの関連性評価

膵臓癌細胞株にゲムシタビン処理し Aurora B 発現変化をウエスタンブロットと蛍光免疫染

色法にてタンパク発現解析した。またゲムシタビン投与によりアポトーシスを生じた細胞と抵抗性をきたし生存している細胞にそれぞれ単離誘導し Aurora B 発現変化を解析しゲムシタビン薬剤メカニズムにおける Aurora B の関連性を評価した。

### 3 マウス皮下モデルによる皮下腫瘍モデルおよび膵臓癌オルガノイドを用いた抗腫瘍効果の検証

膵臓癌細胞株を用いて Nude マウス皮下腫瘍モデルを作成しゲムシタビン単剤およびゲムシタビン/GSK1070916 併用を腹腔内に投与し *in vivo* 腫瘍増殖能に対する影響を評価した。また膵臓癌患者の腫瘍組織から樹立した膵臓癌オルガノイドを用いてゲムシタビン薬剤メカニズムにおける Aurora B 発現変化を評価した。

## IV 結果

### 1 膵臓癌カスタムライブラリーを用いたゲムシタビンの作用を増強させる GSK1070916 の同定と機能解析

GSK1070916 は膵臓癌細胞株 MIAPaCa2 と PSN1 に対して WST-8 アッセイによって濃度依存的に癌細胞増殖能を抑制した (図1)。さらにフローサイトメトリー解析による細胞周期解析から G2/M 細胞周期停止を誘導し (図2)、GSK1070916 投与により膵臓癌細胞に対し DNA ダメージが顕著に上昇した (図3)。また GSK1070916 はゲムシタビンの細胞増殖抑制ならびに DNA ダメージ蓄積といった抗腫瘍効果を濃度依存的に増強させた (図4: WST-8 アッセイ、図5: コロニー増殖アッセイ、図6: ウエスタンブロット、\*:  $p < 0.05$ )。

図 1

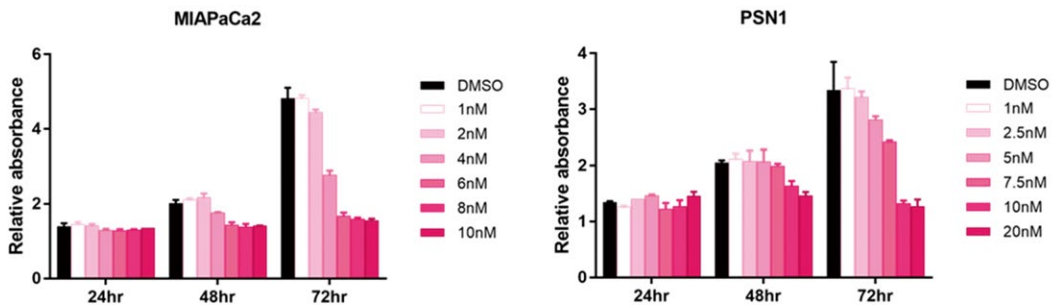


図 2

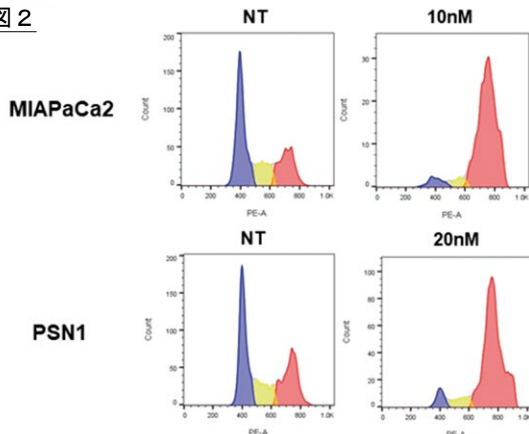


図 3

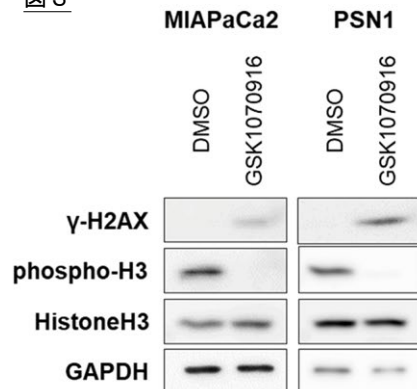


図 4

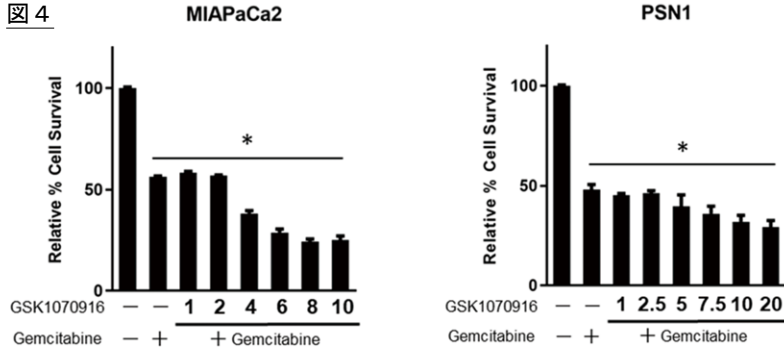


図 5

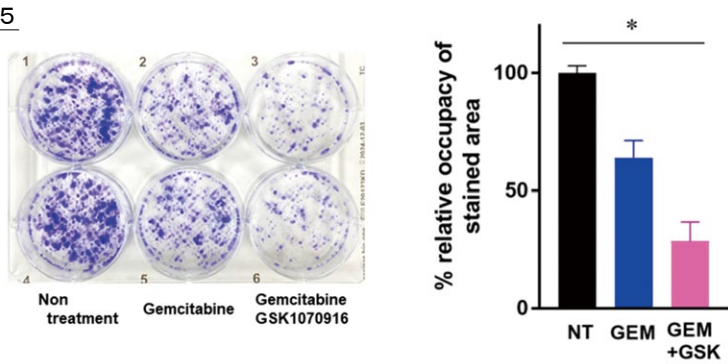
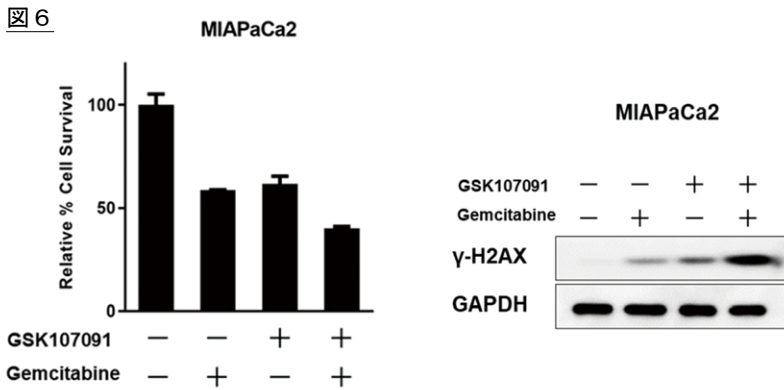


図 6



## 2 ゲムシタビン薬剤メカニズムにおける Aurora B キナーゼの関連性評価

膵臓癌細胞株 MIAPaCa2 と Panc1 を用いてゲムシタビン投与すると Aurora B 発現が有意に発現上昇することが明らかとなった (図 7-8, \*:  $p < 0.05$ )。さらにゲムシタビン投与に

よりアポトーシスを生じた死細胞フラクションと抵抗性をきたし viable な生存細胞フラクションに単離すると、接着しゲムシタビンに対して薬剤抵抗性を示す細胞において Aurora B が発現上昇していることが明らかとなった (図 9)。

図 7

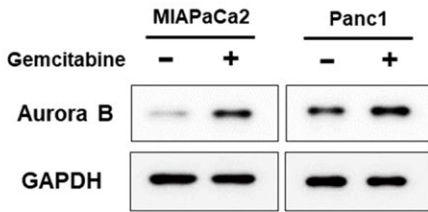


図 8

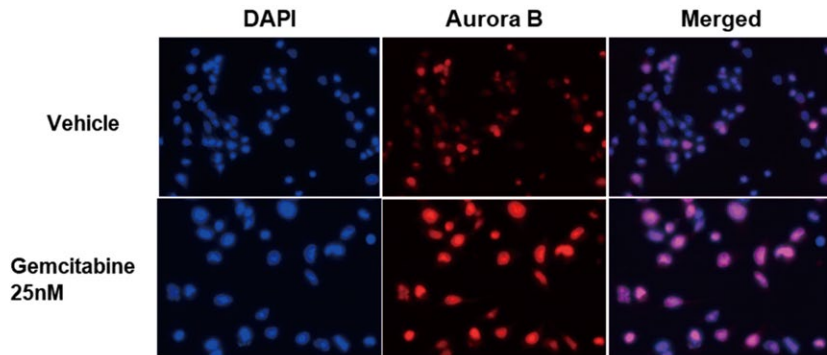
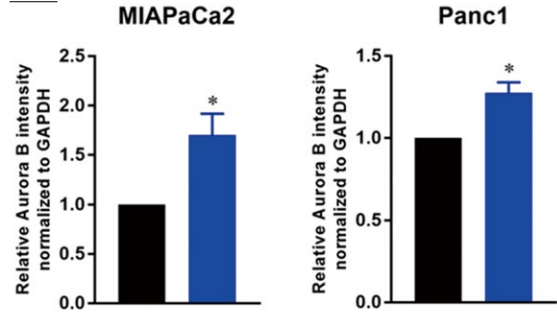
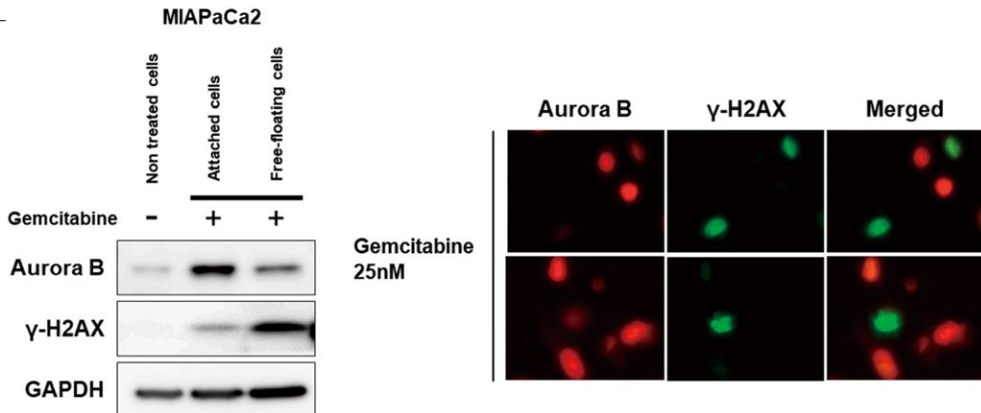


図 9



### 3 マウス皮下モデルによる皮下腫瘍モデルおよび膵臓癌オルガノイドを用いた抗腫瘍効果の検証

膵臓癌細胞株 MIAPaCa2 によるマウス皮下腫瘍モデルにおけるゲムシタビン単剤およびゲムシタビン/GSK1070916 併用投与での *in vivo* 腫瘍増殖能に対する影響に関しては、ゲムシタビン抗腫瘍効果は GSK1070916 併用投与により

作用が増強した (図 10)。また膵臓癌オルガノイドを用いてゲムシタビン薬剤メカニズムにおける Aurora B 発現変化に関しては、ゲムシタビンに対して DNA ダメージ蓄積が認められない濃度では Aurora B の発現が増強し、DNA ダメージが蓄積しアポトーシスを誘導する濃度では Aurora B が発現低下した (図 11)。

図 10

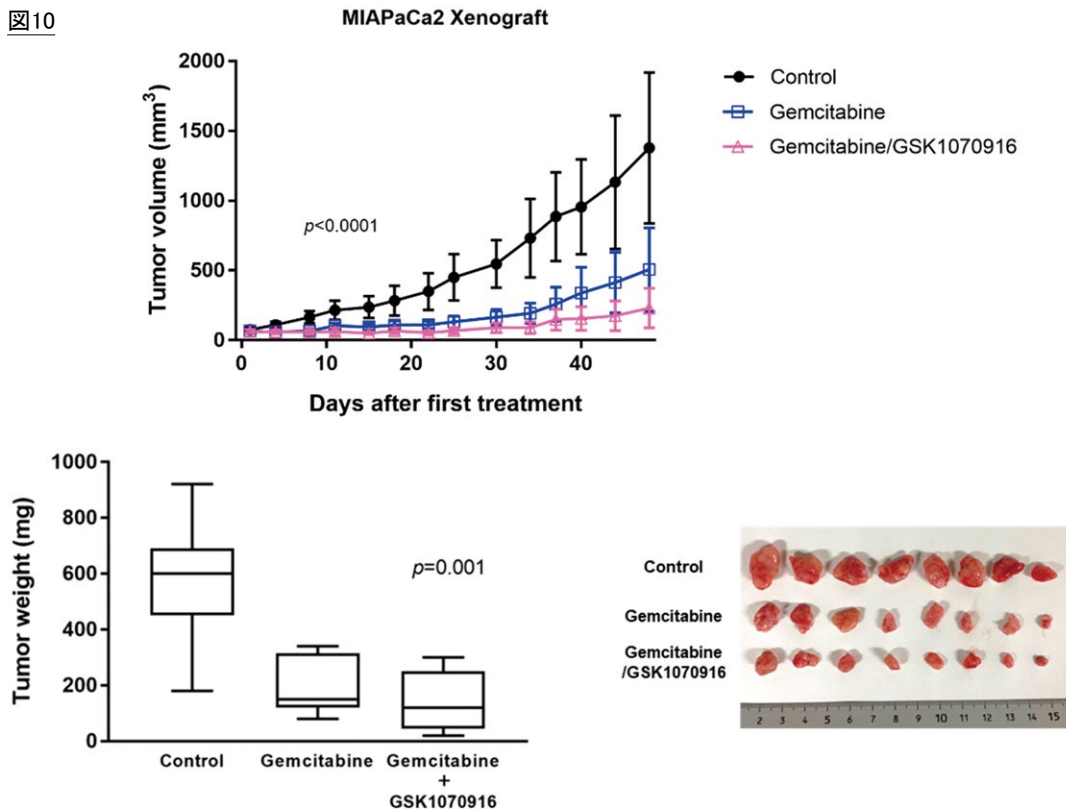
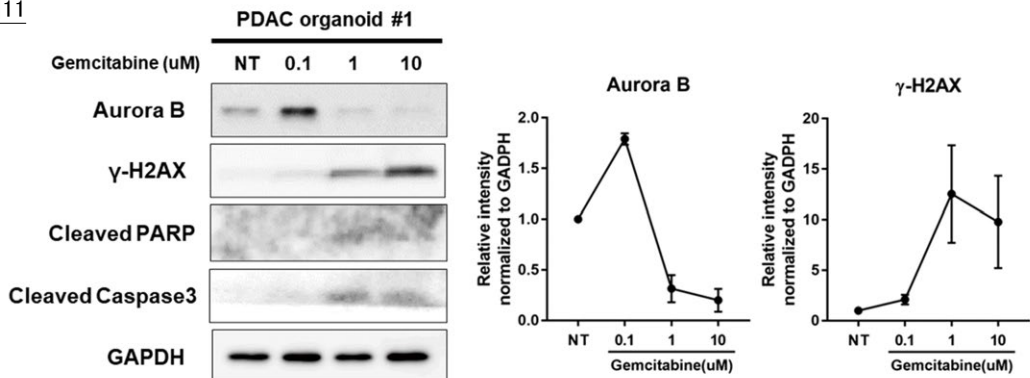


図 11



## V 考 察

当科独自でカスタムメイドした化合物ライブラリーによる薬剤スクリーニングによって膵臓癌においてゲムシタピンの薬剤効果を増強させる新規治療薬として Aurora 阻害剤である GSK1070916 を同定した。GSK1070916 の薬剤ターゲットである Aurora B はゲムシタピン投与により発現変化する。薬剤抵抗性をしめす生存細胞ではその発現が増強し、アポトーシスをきたした細胞では発現が低下している。このように Aurora B はゲムシタピン感受性メカニズムにおける耐性獲得に重要な分子であることが示唆された。

以前は *in vitro* 解析で得られた基礎研究結果を正確に評価反映する前臨床的実験モデルは存在しなかった。本研究では従来の免疫不全マウスを用いた *in vivo* 解析による抗腫瘍効果の検証にとどまらず、膵臓癌患者から新規に樹立した膵臓癌オルガノイドを用いて実際の膵臓癌細胞においても Aurora B の同様な発現変化が確認された。膵臓癌オルガノイドによる前臨床的試験モデルによりゲムシタピン関連メカニズムにおける Aurora B の関与が明らかとなることで、Aurora 阻害剤である GSK1070916 とゲムシタピン併用療法が実臨床での臨床的応用性の可能性が示された。

## VI 結 語

化合物ライブラリーによる薬剤スクリーニングによって膵臓癌においてゲムシタピンの薬剤効果を増強させる新規治療薬として Aurora 阻害剤である GSK1070916 を同定した。また膵臓癌におけるゲムシタピン薬剤メカニズムにおける Aurora B の関連性を明らかにした。膵臓癌オルガノイドを用いて前臨床的実験モデルにより検証を行ったが、今後は PDX マウスモデルによってもさらに検証を行い、統合的前臨床的モ

デルを用いて本薬剤の有用性の検証を行っている。

## 参考文献

Inhibitor library screening identifies ispinesib as a new potential chemotherapeutic agent for pancreatic cancers. Murase Y, Ono H, Ogawa K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Ueda H, Akahoshi K, Ban D, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M. *Cancer Sci.* 2021 Nov; 112(11): 4641-4654. doi: 10.1111/cas.15134. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34510663