明　細　書

発明の名称 ：

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医薬

技術分野

[0001] 本発明は、膵がんに対する抗がん剤をスクリーニングする方法、膵がんの治療のための少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ医薬、及び当該組み合わせ医薬における使用のためのキナーゼ阻害剤に関する。

背景技術

[0002] 膵がんは、最も治療が困難ながんの一つである。現在、膵がんはがん死因の第４位だが、今後１０年間で第２位に浮上すると予想されており、大きな社会問題となることが懸念されている。

[0003] 膵がんは、その90%以上が膵管に発生する膵管がんであり、発症しても自覚症状がないのが特徴である。このため患者が受診の機会を逸し、受診時には既にがん細胞が他臓器に転移してしまっていることが多い。転移は深刻な予後不良をもたらすため、膵がん患者の生存率はがん種の中で最低水準にあり、膵がんの予防や治療法の開発が長年極めて重要な課題とされている。

[0004] しかしながら、膵がんは極めて高い薬物治療抵抗性を示すことが知られており、新薬の開発は非常に難航している。数少ない認可薬である代謝拮抗剤ゲムシタビンやEGFR阻害薬エルロチニブ等も、効果が十分ではない、毒性が懸念される等の問題が指摘されている。

[0005] 膵がんでは、４種類の遺伝子変異、すなわちKRAS遺伝子変異によるKRAS活性化、TP53遺伝子変異によるTP53不活性化、CDKN2A遺伝子変異によるCDKN2A不活性化及びSMAD4遺伝子変異によるSMAD4不活性化が頻繁に発生しており、最も予後が不良な膵がん患者は上記４遺伝子変異の全てを有することが知られている（非特許文献１）。したがって、上記の４遺伝子変異を有するモデル動物及びこれを使用した治療法の研究は、膵がんの治療法の開発において

重要な意義を有する。しかし、現在までにこの４遺伝子異常を模倣した動物モデルは作出がなされておらず、研究の大きな障害となっている。

[0006] 近年、モデル動物としてのショウジョウバエ（Drosophila）の利用に関心が寄せられている。ショウジョウバエは、哺乳類との間で高い遺伝的保存度を有する（例えばヒト疾患における異常遺伝子の75%以上がハエにも存在する）、哺乳類に機能的に対応する体内構造（上皮構造、主要臓器等）を有する、遺伝学解析ツールが充実している（ほぼ全遺伝子のsiRNAノックダウン系統や変異体が入手可能である）、極めて迅速かつ安価な飼育が可能である（次世代を10日で産生できる、飼育費はマウスの約1/1000で済む）といった、モデル動物として有益な特質を備えている。

[0007] 本発明者らは、甲状腺髄様がんに関連する受容体チロシンキナーゼであるRETの変異型を発現するショウジョウバエ（ptc>dRet^{M955T}）をモデル動物とした、甲状腺髄様がんに関与するキナーゼの探索及び同キナーゼをターゲットとする抗がん剤のスクリーニングについて報告している（特許文献１、非特許文献２～４）。ptc>dRet^{M955T}は、ショウジョウバエ内で外来遺伝子を強制発現させることができるバイナリーシステムであるgal4-UASシステム及びptcプロモーターを利用して、RET変異体が幼虫の翅原基の限局された上皮細胞内で発現するように改変されたショウジョウバエであり、腫瘍様の病変を生じて成虫に至らずに全個体が死亡するという性質を示す。

[0008] このように、ショウジョウバエをモデル動物とするがん治療法の開発は有効な手段であるが、ptc>dRet^{M955T}は甲状腺髄様がんのモデル動物であるため、膵がんに対する治療法を探索するためには、膵がんのモデル動物を新たに作出する必要がある。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特表2019-528279

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Qian et al., JAMA Oncol. 2018; 4(3): e173420.

非特許文献2：Sonoshita et al., Curr. Top. Dev. Biol. 2017; 121:287-309.

非特許文献3：Sonoshita et al., Nat. Chem. Biol. 2018; 14(3): 291-298.

非特許文献4：Ung, Sonoshita et al., PLoS Comput. Biol. 2019; 15(4): e1006878.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] ヒトの膵がんで確認されている４種類の変異遺伝子のうち、CDKN2A遺伝子はショウジョウバエに存在しない。したがって、膵がんのショウジョウバエモデルは、甲状腺髄様がんのショウジョウバエモデルのように、ヒト膵がんで認められる遺伝子変異をそのままショウジョウバエで再現することによって作製することはできない。本発明は、膵がんのモデル動物となり得るショウジョウバエの創出、これを用いた膵がんの新たな治療手段の探索方法、及び膵がんの治療に用いるための医薬の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、ヒトの膵がんに関連する４種類の遺伝子変異に相当する特徴を有するショウジョウバエを創出し、これを用いたスクリーニングにより、複数種のキナーゼ阻害剤の組み合わせが膵がんの治療に有効であることを見出し、以下の発明を完成させた。

[0013] （１） 下記a）～d）：

a）配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸、バリン、又はシステインに置き換えられた変異型Ras85Dの発現、

b）p53遺伝子の欠失又は発現抑制、

c）Cyclin E遺伝子の過剰発現、及び

d）Med遺伝子の欠失又は発現抑制

の特徴を有するショウジョウバエに被験物質を摂取させるステップ；被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率を測定するステップ；並びに被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率が、被験物質を摂取しないショウジ

ョウバエの生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップを含む、抗がん剤をスクリーニングする方法。

（２）　変異型Ras85Dが、配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられたタンパク質であり、p53遺伝子の発現抑制が、p53遺伝子の発現を抑制する核酸の導入により行われ、Cyclin Eの過剰発現が、Cyclin Eをコードする核酸の導入により行われ、及びMed遺伝子の発現抑制が、Med遺伝子の発現を抑制する核酸の導入により行われる、（１）に記載の方法。

（３）　ショウジョウバエが、配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする核酸、p53遺伝子に対するノックダウン核酸、Cyclin E遺伝子をコードする核酸、及びMed遺伝子に対するノックダウン核酸が導入されたショウジョウバエである、（１）に記載の方法。

（４）　下記a'）～d'）：

a'）UAS配列の下流に配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする塩基配列を有する核酸、

b'）UAS配列の下流にp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸、

c'）UAS配列の下流にCyclin E遺伝子をコードする塩基配列を有する核酸、及び

d'）UAS配列の下流にMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸

が導入されたショウジョウバエとgal4遺伝子が導入されたショウジョウバエとの交配により産まれた卵を、被験物質を含有する餌料上で飼育するステップ；被験物質を含有する餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率を測定するステップ；並びに被験物質を含有する餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率が、被験物質を含有しない餌料上で飼育したショウジョウバエの

生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップを含む、抗がん剤をスクリーニングする方法。

（５）　ショウジョウバエの飼育温度を調節することによって、被験物質を摂取しないショウジョウバエ又は被験物質を含有しない餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率を制御する、（１）～（４）のいずれか一項に記載の方法。

（６）　下記a）～d）：

a）配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸、バリン、又はシステインに置き換えられた変異型Ras85Dの発現、

b）p53遺伝子の欠失又は発現抑制、

c）Cyclin E遺伝子の過剰発現、及び

d）Med遺伝子の欠失又は発現抑制

の特徴を有するショウジョウバエ。

（７）　下記a'）～d'）：

a'）UAS配列の下流に配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする塩基配列を有する核酸、

b'）UAS配列の下流にp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸、

c'）UAS配列の下流にCyclin E遺伝子をコードする塩基配列を有する核酸、及び

d'）UAS配列の下流にMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸

が導入されている、（６）に記載のショウジョウバエ。

（８）　膵がんの治療のための、MEK阻害剤、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ医薬。

（９）　膵がんの治療のための、MEK阻害剤と、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK

阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種のキナーゼ阻害剤との組み合わせ医薬。

（１０） MEK阻害剤がトラメチニブである、（８）又は（９）に記載の組み合わせ医薬。

（１１） FRK阻害剤がAD80であり、WEE阻害剤がアダボセルチブであり、AURK阻害剤がアリセルチブ又はBI-831266である、（８）～（１０）のいずれか一項の組み合わせ医薬。

（１２） 膵がんの治療においてMEK阻害剤と組み合わせるための、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択されるキナーゼ阻害剤。

（１３） MEK阻害剤がトラメチニブである、（１２）に記載のキナーゼ阻害剤。

（１４） FRK阻害剤がAD80であり、WEE阻害剤がアダボセルチブであり、AURK阻害剤がアリセルチブ又はBI-831266である、（１２）又は（１３）に記載のキナーゼ阻害剤。

（１５） 膵がんの治療においてFRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種のキナーゼ阻害剤と組み合わせるための、MEK阻害剤。

（１６） トラメチニブである、（１５）に記載のMEK阻害剤。

（１７） FRK阻害剤がAD80であり、WEE阻害剤がアダボセルチブであり、AURK阻害剤がアリセルチブ又はBI-831266である、（１５）又は（１６）に記載のMEK阻害剤。

発明の効果

[0014] 本発明によると、ヒトの膵がんに関連する４種類の遺伝子変異に相当する特徴を有するショウジョウバエを作製することができ、このショウジョウバエを膵がんモデル動物として用いることで、膵がんに対して治療効果を奏し得る物質を、効率的にかつ低コストで探索することができる。また、特定のキナーゼ阻害剤の２種以上の組み合わせを、膵がんの治療薬として提供する

ことができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]コントロールハエ（ptc>GFP）、膵がん細胞に頻出する変異型Ras85Dを発現するショウジョウバエ（1-hitハエ）及び膵がん細胞に頻出する4遺伝子変異を模したショウジョウバエ（4-hitハエ）の幼虫の翅原基を蛍光顕微鏡で観察したイメージである。

[図2]4-hitハエにキナーゼ遺伝子のヘテロ接合性変異を導入して、キナーゼヘテロ接合性変異4-hitハエを作出するプロトコールの概略を示す図である。

[図3]MEK、FRK、WEE、ROCK又はAURKのヘテロ接合性変異を有する4-hitハエの生存率を示すグラフである。

[図4]MEK阻害剤（トラメチニブ）、FRK阻害剤（AD80）、WEE阻害剤（MK-1775）、ROCK阻害剤（Y-27632）及びAURK阻害剤（BI-831266）を単独で、又はMEK阻害剤と他の４つのキナーゼ阻害剤のいずれかとの組み合わせを摂取させたときの、4-hitハエ（non-GFP）の生存率を示すグラフである。*p < 0.01。

[図5]1st compoundとしてのMEK阻害剤（トラメチニブ）と、2nd compoundとしてのFRK阻害剤（AD80）、WEE阻害剤（MK-1775）、又はAURK阻害剤（アリセルチブ、BI-831266）との組み合わせの存在下で培養したヒト膵がん細胞（MIAPaCa-2細胞）の相対的細胞数を示すグラフである。*、2nd compoundなし（0 nM）と比較して有意に減少（p < 0.05）。#、トラメチニブなし（0 nM）と比較して有意に減少（p < 0.05）。

[図6]22～29℃で飼育したときの4-hitハエ（non-GFP）の生存率を示すグラフである。

[図7A]MEK阻害剤（トラメチニブ）及びAURK阻害剤（BI-831266）を各々単独で、又は組み合わせて経口投与した担がんマウスにおける腫瘍体積の経時的変化を示すグラフである。*p < 0.05、**p < 0.01（いずれも投与21日目のMann-Whitney U test）。NS、not significant（有意差なし）。エラーバーは８匹の標準偏差を示す。

[図7B]MEK阻害剤（トラメチニブ）及びAURK阻害剤（BI-831266）を各々単独

で、又は組み合わせて経口投与した担がんマウスにおける、投与21日目の腫瘍体積を投与開始時の腫瘍体積と比較した変化率を示すウォーターフォールプロットである。１本の棒が１匹のマウスの腫瘍体積変化率を示す。

発明を実施するための形態

[0016] ヒト膵がんを模倣したショウジョウバエ

本発明の第１の態様は、下記a）～d）：

a）配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸、バリン又はシステインに置き換えられた変異型Ras85Dの発現、

b）p53遺伝子の欠失又は発現抑制、

c）Cyclin E遺伝子の過剰発現、及び

d）Med遺伝子の欠失又は発現抑制

の特徴を有するショウジョウバエに関する。

[0017] Ras85Dタンパク質は、ヒトKRASのショウジョウバエにおけるオルソログであり、そのアミノ酸配列（配列番号１）はNCBIにアクセッション番号NP_476699.1として、これをコードする塩基配列はNCBIにアクセッション番号NM_057351.5として、それぞれ登録されている。

[0018] ヒトKRAS遺伝子エクソン2のコドン12における変異はKRASの活性化をもたらすがん誘導性変異として知られており、膵がん細胞でも頻繁に観察されている。変異型Ras85Dは、Ras85Dにヒト KRASのがん誘導性変異に相当する変異を導入したもの、具体的には配列番号１に示されるアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸、バリン又はシステインに置換されたものであり、活性化KRASとして機能する。ショウジョウバエにおける変異型Ras85Dをコードする遺伝子の強制発現は、ヒト活性化KRASがもたらすものと同様の状況をショウジョウバエ上で模倣することを可能にするものと考えられる。

[0019] ショウジョウバエのp53は、ヒトTP53のオルソログであり、これをコードする塩基配列はNCBIにアクセッション番号NM_206545.2として登録されている。ヒトにおいて、TP53遺伝子の変異によるp53の機能低下が、がんの発生と進展を促進することが知られており、膵がん細胞でもp53変異は頻繁に観察されて

いる。ショウジョウバエにおけるp53遺伝子の機能的発現の抑制、例えばp53遺伝子の欠失又は発現抑制は、ヒト不活性化p53がもたらすものと同様の状況をショウジョウバエ上で模倣することを可能にするものと考えられる。

[0020] サイクリン依存性キナーゼ阻害2A（cyclin-dependent kinase inhibitor 2A、CDKN2A）は、P16とも呼ばれる、細胞周期の調節に関与するタンパク質である。CDKN2A遺伝子の変異によるCDKN2Aの不活性化は様々ながんの発生に関連していることが知られており、膵がん細胞でも頻繁に観察されている。ショウジョウバエにはヒトCDKN2Aのオルソログは存在しないことから、本発明においては、CDKN2A遺伝子変異に代えて、ショウジョウバエCyclin Eの過剰発現が用いられる。Cyclin Eは、細胞周期におけるG1期の進行及びS期への移行を制御する因子であり、cyclin dependent kinase 2（CDK2）と結合してこれを活性化することが知られている。ショウジョウバエにおけるCyclin Eの過剰発現は、CDKN2A不活性化を機能的に代替し、CDKN2A不活性化がもたらすものと同様の状況をショウジョウバエ上で模倣することが報告されている（Datar et al. EMBO J. 19:4543, 2000）。ショウジョウバエのCyclin Eをコードする塩基配列は、NCBIにアクセッション番号NP_476959.1として登録されている。

[0021] Med（Mothers against decapentaplegic）はヒトSMAD4のショウジョウバエにおけるオルソログであり、これをコードする塩基配列はNCBIにアクセッション番号NM_079871.4として登録されている。ヒトにおいて、SMAD4は細胞増殖を抑制的に制御するTGF-βシグナル伝達に関与している。SMAD4遺伝子の変異によるSMAD4不活性化はがんの発生に関連すると指摘されており、膵がん細胞において頻繁に観察されている。ショウジョウバエにおけるMed遺伝子の機能的発現の抑制、例えばMed遺伝子の欠失又は発現抑制は、ヒト不活性化SMAD4がもたらすものと同様の状況をショウジョウバエ上で模倣することを可能にするものと考えられる。

[0022] 本発明において、遺伝子への変異導入、遺伝子の欠失及び発現抑制は、当該技術分野で一般的に用いられる分子生物的手法を用いて行うことができる

。

[0023] 好ましい実施形態において、ショウジョウバエは、変異型Ras85Dが12番目のグリシンがアスパラギン酸に置換されたもの（Ras^{G12D}と表す）であり、p53遺伝子の発現抑制がp53遺伝子の発現を抑制する核酸の導入により行われ、Cyclin Eの過剰発現がCyclin Eをコードする核酸の導入により行われ、及びMed遺伝子の発現抑制がMed遺伝子の発現を抑制する核酸の導入により行われるショウジョウバエである。

[0024] 本発明において利用することができる遺伝子の発現を抑制する核酸としては、アンチセンス核酸やsiRNAのようなノックダウン核酸（アンチセンス核酸、siRNA、その前駆体であるshRNA、又はshRNAをコードするshDNA等）を挙げることができる。ノックダウン核酸は、標的遺伝子の塩基配列を元に、標的遺伝子に特異的であり、かつオフターゲット効果が低くなるように適宜設計することができる。より好ましい実施形態において、ショウジョウバエは、Ras^{G12D}をコードする核酸、p53遺伝子に対するノックダウン核酸、Cyclin E遺伝子をコードする核酸、及びMed遺伝子に対するノックダウン核酸が導入されたショウジョウバエである。この４つの核酸は、全てが１つの制御配列下に存在するように構成されてもよく、又はそれぞれが互いに異なる制御配列下に存在するように構成されてもよい。

[0025] 上記４つの核酸は、それらの発現のタイミングや程度を制御可能にする制御系を伴ってショウジョウバエのゲノムに組み込まれることが好ましい。これを実現するため、典型的にはgal4-UASシステムが利用される。gal4-UASシステムは、酵母の転写活性化因子gal4とその標的配列であるUAS（Upstream activating sequence）を組み合わせた、遺伝子の強制発現を誘導するバイナリーシステムである。例えば、UASの下流に上記４つの核酸を配置したコンストラクトがゲノムに組み込まれたショウジョウバエを、gal4タンパク質を発現するショウジョウバエ（gal4ドライバー系統）と交配することで得られたF1のショウジョウバエは、gal4タンパク質の発現パターンに従って上記４つの核酸の発現を制御することができるショウジョウバエである。gal4-UASシス

テムでは温度に依存してgal4タンパク質の転写能が変化するため、ショウジョウバエの飼育温度を調節することでgal4タンパク質の活性を制御し、上記４つの核酸の発現レベルを制御することができる。また、このF1のショウジョウバエにおける上記４つの核酸の発現の程度は、gal4の発現を制御するプロモーター／エンハンサー領域の活性を有する細胞種・組織や、それらの部位におけるプロモーター／エンハンサー領域の活性の強度によっても異なり得る。したがって、F1を作出するための親であるgal4ドライバー系統においてgal4発現を制御するプロモーター／エンハンサー領域を適宜設定することによっても上記４つの核酸の発現レベルを制御することができ、これらは全て当業者の実施能力の範囲内である。

[0026] ショウジョウバエゲノムにおける、上記４つの核酸が組み込まれる位置に特に制限はないが、常染色体である第二染色体又は第三染色体に組み込まれることが好ましい。

[0027] さらに好ましい実施形態において、ショウジョウバエは、下記a'）～d'）：

a'）UAS配列の下流に配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする塩基配列を有する核酸、

b'）UAS配列の下流にp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸、

c'）UAS配列の下流にCyclin E遺伝子をコードする塩基配列を有する核酸、及び

d'）UAS配列の下流にMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸

が導入されたショウジョウバエである。

[0028] a）～d）の特徴を有するショウジョウバエの作出は、非特許文献２～４に記載のptc>dRet^{M955T}の作出を参考にして行うことができる。作出プロトコールの一例の概略を以下（i）～（iii）に示すが、作出方法及びショウジョウバ

エは下記例には限定されない。

（i）変異型Ras85Dをコードする塩基配列とp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列とをUASの制御下に組み換えたショウジョウバエ用発現ベクターを用いてショウジョウバエゲノムを改変して、形質転換バエ1を作出する。

（ii）Cyclin E遺伝子の塩基配列とMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列とをUASの制御下に組み換えたショウジョウバエ用発現ベクターを用いてショウジョウバエゲノムを改変して、形質転換バエ2を作出する。

（iii）形質転換バエ1と2を交配して形質転換バエ3を作出し、さらにこれとgal4ドライバー系統とを交配して、a）～d）の特徴を有するモデルショウジョウバエを作出する。

[0029] a）～d）の特徴を有するショウジョウバエでは、細胞の異常増殖や遊走能が亢進した腫瘍細胞が発生する。これらの現象はヒト膵がんの形質が再現された結果と考えられることから、a）～d）の特徴を有するショウジョウバエは、ヒト膵がんのモデルとして利用可能である。また、このショウジョウバエと、任意の遺伝子のアレルの一方に欠失等の変異を導入して当該遺伝子の機能を低下させたヘテロ接合性変異ショウジョウバエとを交配して得られるF1の形質や生存率を調べることで、a）～d）の特徴を有するショウジョウバエが呈するヒト膵がん様の形質に影響を与える遺伝子の探索を行うこともできる。

[0030] 抗がん剤のスクリーニング方法

本発明は、上記のヒト膵がん模倣ショウジョウバエ、すなわち上記a）～d）の特徴を有するショウジョウバエに被験物質を摂取させるステップ；被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率を測定するステップ；及び被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率が、被験物質を摂取しないショウジョウバエの生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップを含む、抗がん剤をスクリーニングする方法を、別の態様として提供する。

[0031] 抗がん剤のスクリーニング方法は、上記のヒト膵がん模倣ショウジョウバ

エ、すなわち上記a）～d）の特徴を有するショウジョウバエに被験物質を摂取させるステップを含む。このステップは、典型的には、a）～d）の特徴を有するショウジョウバエに、被験物質を含有する餌料を摂取させることにより行うことができる。当該餌料は、適当量の被験物質を含有する他は、通常のショウジョウバエ用餌料を調製する方法及び材料を用いて調製することができる。被験物質の量や他の材料との混合方法は、被験物質の物性や期待される有効濃度等に応じて適宜調節すればよい。また、餌料を摂取させる期間は、ショウジョウバエが幼虫である期間、すなわちショウジョウバエが卵から孵化して蛹化するまでに相当する期間であればよい。本ステップにおいて、ショウジョウバエは、所望の生存率を得るために後述のように飼育温度が調節され、かつ餌料が乾燥しない程度に湿度が維持されるかぎり、実験動物としてのショウジョウバエを飼育する際に通常用いられる条件下で飼育すればよい。

[0032] 本ステップの好適な例の一つは、被験物質を含有する餌料の上に上記a）～d）の特徴を有するショウジョウバエの卵を置き、孵化した幼虫に餌ごと被験物質を摂取させるステップである。また別の好適な例は、被験物質を含有する餌料の上に上記a）～d）の特徴を有するショウジョウバエの幼虫を置き、餌ごと被験物質を摂取させるステップである。

[0033] 抗がん剤のスクリーニング方法は、被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率を測定するステップ、及び被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率が、被験物質を摂取しないショウジョウバエの生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップを含む。生存率は、蛹から羽化した個体の数を蛹の総数で割ることで算出することができる。

[0034] 上記a）～d）の特徴を有するショウジョウバエでは、細胞の異常増殖や遊走能が亢進した腫瘍細胞が発生し、生存率が低下する。また、gal4-UASシステムが利用されている場合、飼育温度を16～29℃の範囲内で上昇させると、このハエの幼虫が蛹から羽化することなく死亡する確率は上昇し、例えば実

施例３及び５に記載のSer-gal4;UAS-Ras^{G12D},UAS-p53^{shRNA},UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA} 4-hitハエ(non-GFP)の場合、25℃以上では生存率は実質的に0％となる。したがって、被験物質を摂取させて飼育したショウジョウバエの生存率が被験物質を摂取させずに同条件下で飼育したショウジョウバエの生存率よりも高い場合、例えば被験物質を摂取させずに飼育したショウジョウバエの生存率が0％であるのに対して、被験物質を摂取させて飼育したショウジョウバエの生存率が0％を上回る場合には、当該物質はa）～d）の特徴を有するショウジョウバエが呈するヒト膵がん様の形質の発現を抑制する作用を有すると推測されることから、当該物質を膵がんに対する抗がん剤の候補物質として選抜することができる。

[0035] gal4-UASシステムを利用した上記a）～d）の特徴を有するショウジョウバエでは、飼育温度を調節して上述の４つの核酸の発現レベルを制御することで、その生存率を制御することができる。例えば実施例３及び５に記載のSer-gal4;UAS-Ras^{G12D},UAS-p53^{shRNA},UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA} 4-hitハエ(non-GFP)は、25℃以上で飼育するとその生存率は実質的に0％であるが、22～24℃で飼育すると生存率を10～20％程度にまで上昇させることができる。22～24℃の飼育温度下で本スクリーニング方法を実施して選抜された被験物質は、25℃以上の飼育温度下で本スクリーニング方法を実施して選抜された被験物質と比べて、比較的緩やかな抗がん作用を有するものと期待することができる。

[0036] 本スクリーニング方法の好ましい実施形態は、下記a'）～d'）：

a'）UAS配列の下流に配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする塩基配列を有する核酸、

b'）UAS配列の下流にp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸、

c'）UAS配列の下流にCyclin E遺伝子をコードする塩基配列を有する核酸、及び

d'）UAS配列の下流にMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する

核酸

が導入されたショウジョウバエとgal4遺伝子が導入されたショウジョウバエとの交配により産まれた卵を、被験物質を含有する餌料上で飼育するステップ；被験物質を含有する餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率を測定するステップ；並びに被験物質を含有する餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率が、被験物質を含有しない餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップを含む、抗がん剤をスクリーニングする方法である。

[0037] 組み合わせ医薬

本発明の別の態様は、膵がんの治療のための、MEK阻害剤、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ医薬に関する。

[0038] MEK（MAPK（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ）/ERK（細胞外シグナル制御キナーゼ）キナーゼ）キナーゼ）は、MAPKカスケードを構成するプロテインキナーゼの１種である。MAPKカスケードは、細胞増殖、成長、分化及びアポトーシスといった多種多様な細胞プロセスを制御する複雑なシグナル伝達ネットワークを形成している。MEKを阻害することにより細胞増殖が停止してアポトーシスが誘導されることから、MEKは抗がん剤のターゲット分子として注目されており、様々なMEK阻害剤が報告されている。

[0039] 本発明において用いられるMEK阻害剤の例としては、トラメチニブ（Trametinib）、コビメチニブ（Cobimetinib）、ビニメチニブ（Binimetinib）、セルメチニブ（Selumetinib）、ピマセルチブ（pimasertib）、ミルダメチニブ（Mirdametinib）、レファメチニブ（Refametinib）、PD184352、PD98059、BIX02189、BIX02188、TAK-733、AZD8330、PD318088、Myricetin、BI-847325、GDC-0623、Ro 5126766、PD198306、RO4987655、HI TOPK 032等を挙げることができる。

[0040] FRK（Fyn related kinase、RAKとも呼ばれる）は、SRCサブファミリーメンバーに属する、核内に存在する非受容体型チロシンキナーゼであり、乳がん

細胞や腎臓がん細胞における発現上昇が知られている。

[0041] 本発明において用いられるFRK阻害剤の例としては、AD80、RAF709等を挙げることができる。

[0042] AURORAキナーゼ（AURK）は、細胞分裂を制御するセリン／スレオニンキナーゼであり、細胞分裂期における中心体の分離や双極紡錘体の形成に関与することが知られている。AURK-A、AURK-B、AURK-Cの３種類のアイソフォームが存在し、これらはC末端キナーゼドメインにおいて高い相同性を持つ。AURKは多くのがん細胞で高発現していることから抗がん剤のターゲット分子として注目されており、様々なAURK阻害剤が報告されている。

[0043] 本発明において用いられるAURK阻害剤の例としては、アリセルチブ（Alisertib、AURK-A阻害剤）、BI-831266（AURK-B阻害剤）、バラセルチブ（Barasertib、AURK-B阻害剤）、トザセルチブ（Tozasertib、AURK-A選択性が高い汎AURK阻害剤）、ダヌセルチブ（Danusertib、汎AURK阻害剤）、CCT137690（汎AURK阻害剤）CCT129202（AURK-A選択性が高い汎AURK阻害剤)、CCT241736（AURK-A, B阻害剤)、SNS-314（汎AURK阻害剤)、ヘスペラジン（Hesperadin、AURK-B阻害剤)、MK-5108（AURK-A阻害剤)、MLN8054（AURK-A阻害剤)、ZM 447439（AURK-A, B阻害剤)、PF03814735（AURK-A, B阻害剤)、AT9283（AURK-A, B阻害剤)、GSK1070916（AURK-B, C阻害剤)、PHA-680632（AURK-A選択性が高い汎AURK阻害剤)、リバーシン(Reversine、汎AURK阻害剤)、CYC116（AURK-A, B阻害剤)、ENMD-2076（AURK-A阻害剤)、TAK-901（AURK-A, B阻害剤)、AMG 900（汎AURK阻害剤)、MK-8745（AURK-A阻害剤)、JNJ-7706621（AURK-A, B阻害剤）、SCH-1473759（AURK-A, B阻害剤)、イロラセルチブ（Ilorasertib、AURK-B, C選択性が高い汎AURK阻害剤)、TCS7010（AURK-A阻害剤)、LY3295668（AURK-A阻害剤)、BI-811283（AURK-B阻害剤)、Chiauranib（AURK-B阻害剤)、NMI-900（AURK-B, C阻害剤)等を挙げることができる。

[0044] WEEキナーゼは、CDK-1／cyclin B複合体のリン酸化による不活性化を介して細胞分裂を負に制御する核内チロシンキナーゼであり、WEE1（WEE1A）、WEE2（WEE1B）及びMyt1（PKMYT1）の３種類が存在する。WEE1は、有糸分裂のG2

/Mチェックポイントで重要な役割を担っており、MYT1と共同して細胞をG2-M arrestに移行させる機能を持つ。がん細胞におけるWEE1阻害は、G1チェックポイントを不活性化して染色体不安定性を引き起こし、最終的に分裂期細胞死（mitotic catastrophe）に導くことから、WEEキナーゼ、特にWEE1は抗がん剤のターゲット分子として注目されている。

[0045] 本発明において用いられるWEE阻害剤の例としては、アダボセルチブ（Adavosertib、MK-1775又はAZD1775とも呼ばれる）、PD0166285、PD407824等を挙げることができる。

[0046] ROCK（Rho-associated protein kinase）は、細胞骨格を制御するセリン／スレオニンキナーゼであり、ROCK1とROCK2の２種類のアイソフォームが存在する。ROCKは低分子GTPaseRhoAの下流標的であり、数多くの基質をリン酸化して、細胞運動、細胞極性、細胞接着、細胞分裂、アポトーシス、転写制御といった多様な生命機能に関わっていることから、抗がん剤を含めた各種医薬のターゲット分子として注目されており、様々なROCK阻害剤が報告されている。

[0047] 本発明において用いられるROCK阻害剤の例としては、Y-27632（ROCK1阻害剤）、ファスジル（Fasudil、ROCK2阻害剤）、アザインドール1（Azaindole 1、汎ROCK阻害剤）、AT13148（汎ROCK阻害剤）、チアゾビビン（Thiazovivin）、Netarsudil、Ripasudil、Chroman 1、GSK429286A、RKI-1447、GSK269962A、Y-39983、KD025、SAR407899、BDP5290、SB-772077B、H-1152、LX7101、SR-3677、Y-33075、CMPD101、SLx-2119等を挙げることができる。

[0048] 本態様の組み合わせ医薬は、上で説明したキナーゼ阻害剤の少なくとも２種、すなわちMEK阻害剤、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせを含む医薬である。「少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ」は、２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ、３種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ、４種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ、５種全てのキナーゼ阻害剤の組み合わせを包含する。この用語は、同種のキナーゼ阻害剤の少なくとも２つの組み合

わせ、例えばMEK阻害剤に分類されるキナーゼ阻害剤の２つ以上の組み合わせを包含しない。したがって、例えば「２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ」は、MEK阻害剤とFRK阻害剤、MEK阻害剤とWEE阻害剤、MEK阻害剤とAURK阻害剤、MEK阻害剤とROCK阻害剤、FRK阻害剤とWEE阻害剤、FRK阻害剤とAURK阻害剤、FRK阻害剤とROCK阻害剤、WEE阻害剤とAURK阻害剤、WEE阻害剤とROCK阻害剤、及びAURK阻害剤とROCK阻害剤、の各組み合わせを意味する。

[0049] また、組み合わせを構成する各阻害剤は、１つの化合物には限定されない。例えばMEK阻害剤とFRK阻害剤の組み合わせは、１つのMEK阻害剤と１つのFRK阻害剤の組み合わせに限られず、１つのMEK阻害剤と２つ以上のFRK阻害剤の組み合わせ、２つ以上のMEK阻害剤と１つのFRK阻害剤の組み合わせ、及び２つ以上のMEK阻害剤と２つ以上のFRK阻害剤の組み合わせを包含する。

[0050] 本態様の組み合わせ医薬は、上記５種類のキナーゼ阻害剤のうちの２種以上のキナーゼ阻害剤から構成される任意の組み合わせを含み得る。ある実施形態において、組み合わせは、MEK阻害剤であるトラメチニブ、FRK阻害剤であるAD80、WEE阻害剤であるアダボセルチブ並びにAURK阻害剤であるアリセルチブ及びBI-831266よりなる群から選択される少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせである。また、組み合わせは、MEK阻害剤とその他の４種類のキナーゼ阻害剤から選択される少なくとも１種のキナーゼ阻害剤との組み合わせであってもよい。別の実施形態において、組み合わせは、MEK阻害剤であるトラメチニブと、FRK阻害剤であるAD80、WEE阻害剤であるアダボセルチブ並びにAURK阻害剤であるアリセルチブ及びBI-831266よりなる群から選択される少なくとも１種のキナーゼ阻害剤との組み合わせである。

[0051] 組み合わせ医薬に含まれる２種以上のキナーゼ阻害剤は、その必要がある、すなわち膵がんの治療が望まれる対象に、一緒に又は別々に、同時に又は逐次的に投与される。組み合わせ医薬は、２種以上のキナーゼ阻害剤を共に含有する製剤の形態であってもよく、それぞれのキナーゼ阻害剤の別個の製剤を組み合わせた形態であってもよい。組み合わせ医薬が別個の製剤の組み合わせである場合、それぞれの製剤の投与順序及び投与時期は特に制限され

ず、同時に投与されてもよく、時間を置いて異なる時間に又は異なる日に投与されてもよい。

[0052] 上記の組み合わせ医薬において用いられることが意図された個々のキナーゼ阻害剤もまた、本発明の別の態様である。

[0053] 上記の組み合わせ医薬は、膵がんの治療のために用いることができる。ここで用語「治療」は、疾患の治癒又は一時的寛解を目的とする医学的に許容される全てのタイプの治療的介入を包含する。すなわち、膵がんの治療とは、膵がんの進行の遅延又は停止、病変の退縮又は消失、再発の防止等を含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0054] 上記の組み合わせ医薬は、膵がんに罹患した対象、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモットを含むげっ歯類、ヒト、チンパンジー、アカゲザルを含む霊長類、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジを含む家畜、イヌ、ネコを含む愛玩動物といった哺乳動物に投与される。好ましい対象は、ヒトである。

[0055] 治療される膵がんとしては、外分泌腫瘍、例えば浸潤性膵管がん、膵腺房細胞がん、膵管内乳頭粘液性腫瘍等、及び内分泌腫瘍、例えば神経内分泌腫瘍等を挙げることができる。

[0056] 組み合わせ医薬における個々のキナーゼ阻害剤の量は、組み合わせを構成する他のキナーゼ阻害剤と組み合わされたときに膵がんを治療することができる量であればよく、一般に、単独で用いられる場合の量と同等であるか、又はこれより少ない。個々のキナーゼ阻害剤を単独で用いられる場合の量と同等の量で含む組み合わせ医薬は、膵がんに対するより強力な効果を発揮し、より短期間に、又は単独で用いても効果が確認できなかった対象において、膵がんを治療することができる。また、個々のキナーゼ阻害剤を単独で用いられる場合の量よりも少ない量で含む組み合わせ医薬は、膵がんに対する効果を維持しながら、個々のキナーゼ阻害剤の量を減らすことができるという利点を有する。

[0057] 上記の組み合わせ医薬及び組み合わせ医薬のためのキナーゼ阻害剤は、そ

れぞれ、キナーゼ阻害剤以外の薬物、緩衝剤、抗酸化剤、保存剤、タンパク質、親水性ポリマー、アミノ酸、キレート化剤、非イオン性界面活性剤、賦形剤、安定化剤、担体等の薬学的に許容される成分を含む医薬組成物の形態で使用することができる。薬学的に許容される成分は当業者において周知であり、当業者が通常の実施能力の範囲内で、例えば第十七改正日本薬局方その他の規格書に記載された成分から製剤の形態に応じて適宜選択して使用することができる。

[0058] 医薬組成物は、有効量の個々のキナーゼ阻害剤を含有する。ここで有効量とは、上で述べられたように、組み合わせを構成する他のキナーゼ阻害剤と組み合わされたときにがんを治療することができる量である。有効量は、組み合わされる個々のキナーゼ阻害剤の種類や割合、用法、対象の年齢、疾患の状態その他の条件に応じて適宜決定される。

[0059] 医薬組成物の剤形は任意であるが、経口剤（錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤等）及び非経口製剤（注射剤、点滴剤、経腸剤、経皮剤等）の形態を好ましい例として挙げることができる。また、医薬組成物の投与経路は特に制限されないが、非経口製剤である場合は、例えば血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与、標的部位への局所投与等を挙げることができる。好ましい実施形態において、医薬組成物は、経口投与又は静脈内投与により投与される。

[0060] がんの治療方法

本発明はまた、MEK阻害剤、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも２種の有効量のキナーゼ阻害剤の組み合わせを、一緒に又は別々に、同時に又は逐次的に、その必要がある対象に投与することを含む、膵がんの治療方法を別の態様として提供する。

[0061] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0062] 実施例１　ヒト膵がんショウジョウバエモデルの作出

ショウジョウバエw⁻（Bloomington Drosophila Stock Center）から常法にてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型として、Ras85D遺伝子を増幅するように設計されたプライマーDNAを用いてPCRを行い、Ras85D遺伝子の塩基配列を含むDNA断片を得た。さらに、Ras85Dのアミノ酸配列の12番目のグリシンをコードするコドンをアスパラギン酸をコードするコドンに置換するための部位特異的変異導入用プライマーDNAを設計、合成し、前記DNA断片を鋳型としたPCRを行って、Ras85D変異体（Ras^{G12D}）をコードするDNA断片を作製した。このDNA断片をショウジョウバエのノックダウン用ベクターであるpWALIUMベクター（Harvard Medical School）に挿入し、pWALIUM.UAS-Ras^{G12D}ベクターを作製した。これをショウジョウバエy^1w^{67c23};P{CaryP}attP2にマイクロインジェクションし、相同組換えにより3番染色体L領域にRas^{G12D}をコードするDNAが挿入されたUAS-Ras^{G12D}ハエを作出した。

[0063] また、Ras^{G12D}をコードするDNA断片と共にp53遺伝子ノックダウン配列（センス鎖TGCTGAAGCAATAACCACCGA（配列番号２）、ヘアピンループTAGTTATATTCAAGCATA（配列番号６）及びアンチセンス鎖TCGGTGGTTATTGCTTCAGCA（配列番号３）を連結した配列）を含むDNA断片をpWALIUMベクターに挿入して、pWALIUM.UAS-Ras^{G12D},UAS-$p53^{shRNA}$ベクターを作製した。これを同様にショウジョウバエy^1w^{67c23};P{CaryP}attP2にマイクロインジェクションすることで、3番染色体L領域にRas^{G12D}をコードするDNA及びp53遺伝子に対するshRNAが挿入されたUAS-Ras^{G12D},UAS-$p53^{shRNA}$ハエを作出した。

[0064] さらに、ショウジョウバエw⁻のゲノムDNAを鋳型として、Cyclin E（CycE）遺伝子を増幅するように設計されたプライマーDNAを用いてPCRを行い、CycE遺伝子の塩基配列を含むDNA断片を得た。このDNA断片を、Med遺伝子ノックダウン配列（センス鎖TTCAGTGCGATGAACATTGCT（配列番号４）、ヘアピンループTAGTTATATTCAAGCATA（配列番号６）及びアンチセンス鎖AGCAATGTTCATCGCACTGAA（配列番号５）を連結した配列）を含むDNA断片と共にpWALIUMベクターに挿入して、pWALIUM.UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ベクターを作製した。これをショウ

ジョウバエPBac{yellow[+]-attP-9A}VK00027にマイクロインジェクションし、相同組換えにより3番染色体R領域にCycE遺伝子をコードするDNA及びMed遺伝子に対するshRNAが挿入されたUAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ハエを作出した。

[0065] 次いで、UAS-Ras^{G12D},UAS-p53^{shRNA}ハエとUAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ハエを25℃で3日間交配し、UAS-Ras^{G12D},UAS-p53^{shRNA},UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ハエを作出した。

[0066] UAS-Ras^{G12D}ハエ及びUAS-Ras^{G12D},UAS-p53^{shRNA},UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ハエのそれぞれをptc-gal4,UAS-GFPハエ（ptc>GFPハエ、Bloomington Drosophila Stock Center）と25℃で3日間交配し、ptc>GFP; UAS-Ras^{G12D}ハエ（1-hitハエ(ptc>GFP)と表す）及びptc>GFP; UAS-Ras^{G12D},UAS-p53^{shRNA},UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ハエ（4-hitハエ(ptc>GFP)と表す）を作出した。これらのハエにおいては、ptcプロモーターの制御下で翅原基の限局した上皮細胞に導入遺伝子の発現が誘導される。

[0067] 1-hitハエ(ptc>GFP)、4-hitハエ(ptc>GFP)及びコントロールであるptc>GFPハエの３齢幼虫の翅原基を蛍光顕微鏡で観察したイメージを図１に示す。コントロールでは、約10細胞分の幅の単層上皮細胞においてGFPの発現が認められた（左から２番目及び中央のイメージ）。1-hitハエ(ptc>GFP)ではより広い幅でGFP発現細胞が観察された（右から２番目のイメージ。この傾向は4-hitハエ(ptc>GFP)ではさらに顕著になり（右から１番目のイメージ）、また元の領域から離脱した遊走能が亢進した腫瘍細胞（図中、矢頭で示す）の出現が確認された。

[0068] また、1-hitハエ(ptc>GFP)及び4-hitハエ(ptc>GFP)を作出するための交配を行った際、交配後の親ハエに餌上で2日間産卵させ、１バイアルあたり20～50個の卵を得た。これを16℃で25日間飼育した後、羽化した個体の数を蛹の総数で割り、生存率を算出した。コントロールのptc>GFPハエの生存率が100%であったのに対し、1-hitハエ(ptc>GFP)の生存率は55%であり、さらに4-hitハエ(ptc>GFP)の生存率は0%、すなわち致死であった。

[0069] これらの結果から、Ras^{G12D}の発現により翅原基上皮細胞の増殖が亢進すること、Ras^{G12D}の発現に加えてp53のノックダウン、CycEの発現亢進及びMed遺伝子

のノックダウンを誘導すると翅原基上皮細胞の増殖がさらに亢進し、また遊走能も亢進することが確認され、4-hitハエはヒト膵がんショウジョウバエモデルとなり得ることが示された。

[0070] 実施例２　4-hitハエの生存率に影響を及ぼすキナーゼ遺伝子の探索

Sonoshitaら（Curr. Top. Dev. Biol., 2017, 121, 287-309）の方法に従って、図２に示されるように交配を行って、4-hitハエの生存率に影響を与えるキナーゼ遺伝子の探索を行った。具体的には、実施例１で作出したUAS-$Ras^{G12D,UAS}$-$p53^{shRNA}$,UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}ハエを$SM5_{tubgal80}$-TM6Bバランサーハエ（Dr. Ross Cagan, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, NY, USA）と交配し、UAS-Ras^{G12D},UAS-$p53^{shRNA}$,UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}/$SM5_{tubgal80}$-TM6Bハエを作出した。次いでこれをSer>GFPハエ（Bloomington Drosophila Stock Center）と交配し、Ser>GFP;UAS-Ras^{G12D},UAS-$p53^{shRNA}$,UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}/$SM5_{tubgal80}$-TM6Bハエを作出した。

[0071] また、Bloomington Drosophila Stock Center（米国）から、ハエ全キノーム中のキナーゼのヘテロ接合性変異系統の中で入手可能なもの220系統を入手し、これらのそれぞれを、27℃で3日間、Ser>GFP;UAS-Ras^{G12D},UAS-$p53^{shRNA}$,UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}/$SM5_{tubgal80}$-TM6Bハエと交配し、キナーゼヘテロ接合性変異4-hitハエの卵を得た。対照として、w^{-}ハエをSer>GFP;UAS-Ras^{G12D},UAS-$p53^{shRNA}$,UAS-CycE,UAS-Med^{shRNA}/$SM5_{tubgal80}$-TM6Bハエと交配し、キナーゼ野生型4-hitハエの卵を得た。これらのハエを27℃で13日間飼育した後、羽化した個体の数を蛹の総数で割り、生存率を算出した。

[0072] ハエキナーゼ遺伝子の網羅的検索の結果、RAS経路因子MEK、SRCファミリーキナーゼFRK、細胞分裂制御因子群WEE及びAURORA、並びに細胞骨格制御因子ROCKそれぞれのヘテロ接合性変異が、4-hitハエの致死性を抑制することが見出された（図３）。これらのヘテロ接合性変異ハエの生存率を図３に示す。このことは、MEK阻害剤、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤、及びROCK阻害剤の使用は4-hitハエの生存率の上昇に有効であり得ることを示唆する。

[0073] 実施例３　4-hitハエの生存率に対するキナーゼ阻害剤の薬効評価

トラメチニブ（MEK阻害薬）、アダボセルチブ（MK-1775ともいう、WEE1阻害剤）、AD80（FRK阻害剤）、Y-27632（ROCK阻害剤）、アリセルチブ（AURKA阻害剤、以上はMedChem Expressより購入）、BI-831266（AURKB阻害剤、Boehringer Ingelheimより譲渡）はDMSO（SIGMA）に溶解し、-20℃で保存した。

[0074] agar（Wako）、brewers' yeast（MPBio）、yeast extract（Sigma Aldrich）、bacto casitone（BD)、sucrose（Wako）、glucose（Wako）、$MgCl_2$（Wako)、$CaCl_2$（Wako)、Propionic acid（Wako)、Mold inhibitor（10% Methyl-4-hydroxy Benzoate in 95% Ethanol; Wako)を超純水に溶解して標準餌を作製した。これを50℃に保温しながら、DMSOに溶解したキナーゼ阻害剤（トラメチニブ単独、又はトラメチニブと他のキナーゼ阻害剤の組み合わせ）を添加混合し、冷却して薬餌を調製した。各化合物の餌中最終濃度は、トラメチニブ1μM、アダボセルチブ100μM、AD80 50μM、Y-27632 10μM、BI-831266 100μMとした。

[0075] 実施例１で作出した$UAS\text{-}Ras^{G12D}$,$UAS\text{-}p53^{shRNA}$,UAS-CycE,$UAS\text{-}Med^{shRNA}$ハエをSer-gal4ハエ（Bloomington Drosophila Stock Center）と交配したのち、親ハエに標準餌又は薬餌上で2日間産卵させ、１バイアルあたり20～50個のSer-gal4;$UAS\text{-}Ras^{G12D}$,$UAS\text{-}p53^{shRNA}$,UAS-CycE,$UAS\text{-}Med^{shRNA}$ 4-hitハエ(non-GFP)の卵を得た。これを25℃で13日間飼育した後、羽化した個体の数を蛹の総数で割り、各餌上で飼育した4-hitハエ(non-GFP)の生存率を算出した。

[0076] トラメチニブは単独で4-hitハエ(non-GFP)の生存率を20%向上させた。また、他のキナーゼ阻害剤は単独では4-hitハエ(non-GFP)の生存率を変化させなかったが、トラメチニブと組み合わせるとトラメチニブ単独よりも生存率を向上させたことから、トラメチニブと他のキナーゼ阻害剤との相乗効果の存在が示唆された（図４）。

[0077] 実施例４　ヒト膵がん細胞を用いたキナーゼ阻害剤の薬効評価

ヒト膵がん細胞株（MIAPaCa-2）は、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センターより購入し、Dulbecco's Modified Eagle's Medium（nakalai tesque）に10%ウシ胎児血清（gibco）と1% penicillin-streptomycin

（nakalai tesque）を加えた培地を用い、5%CO_2存在下、37℃で培養した。

[0078] トラメチニブ（DMSOのみ、1μM、300μM）、アダボセルチブ（300μM、1 mM）、AD80（30μM、3 mM）、アリセルチブ（30μM、1 mM）、BI-831266（3μM、3 mM）を各々調製し、培地で100倍に希釈して薬剤液とした。

[0079] MIAPaCa-2細胞を96ウェルプレートに1,000細胞/ウェル播種した（100μL培地中）。1日培養した後、トラメチニブ単独又はトラメチニブと他のキナーゼ阻害剤との組み合わせの薬剤液を10μLずつ96ウェルプレートの細胞に添加した（DMSOの最終濃度0.2%）。各組み合わせは5ウェルずつ試験した。薬剤液添加後、5%CO_2存在下、37℃で72時間培養した後、MTSアッセイ（CellTiter96（登録商標）、Promega）を使用して細胞生存率を測定した。生存率は、対照（溶媒のみ）に対する割合で表記した。

[0080] トラメチニブは単独で細胞生存率を用量依存的に減少させた。トラメチニブをアダボセルチブ、AD80、アリセルチブ、BI-831266のそれぞれと組み合わせると、いずれの組み合わせにおいてもトラメチニブ単独よりも細胞生存率は大きく減少したことから、トラメチニブと他のキナーゼ阻害剤との相乗効果の存在が示唆された（図５）。

[0081] 実施例５　4-hitハエの致死性の温度依存性の評価

実施例３で作出した4-hitハエ(non-GFP)を、22、24、25、27、29℃の各温度で飼育したところ、温度上昇とともに生存率は低下し、25℃以上で致死となった（図６）。

[0082] 実施例６　担がんマウスを用いたキナーゼ阻害剤の薬効評価

BALB/c-nu/nu免疫不全ヌードマウス（６週齢、specific pathogen-free飼育）に麻酔を施し、その皮下に5×10^6個のMIA PaCa-2細胞を移植した。腫瘍体積（長径×短径×短径／２）を計測しながら飼育を続け、これが100 mm^3に達した時点で４群（n=8）に分けた。各群に溶媒（5% DMSO）、トラメチニブ（1 mg/kg body weight/day）、BI-831266（10 mg/kg body weight/day）、又はトラメチニブ（1 mg/kg body weight/day）及びBI-831266（10 mg/kg body weight/day）を１週間に５日間経口投与し、腫瘍体積を経時的に測定した。

[0083] トラメチニブとBI-831266の組み合わせ投与群（T+B群）では、トラメチニブ単独投与群（T群）及びBI-831266単独投与群（B群）と比べ、腫瘍体積平均値の増加が著しく抑制された（図７Ａ）。個々のマウスで見た場合、組み合わせ投与群では部分寛解（30%以上の腫瘍体積縮小）又は完全寛解（腫瘍消失）に至った症例が多く認められたのに対し、溶媒投与群及びトラメチニブ単独投与群では部分寛解又は完全寛解は認められず、BI-831266投与群で１例の完全寛解が見出されたのみであった（図７Ｂ）。これらの結果から、トラメチニブとBI-831266との組み合わせは、マウスに移植されたヒト膵がん細胞に対して相乗的な細胞増殖抑制効果を示すこと、及びその効果には個体差が少ないことが確認された。

配列表フリーテキスト

[0084] 配列番号１　Ras85Dのアミノ酸配列

配列番号２　p53遺伝子を標的とするshRNAのセンス鎖をコードするDNAの塩基配列

配列番号３　p53遺伝子を標的とするshRNAのアンチセンス鎖をコードするDNAの塩基配列

配列番号４　Med遺伝子を標的とするshRNAのセンス鎖をコードするDNAの塩基配列

配列番号５　Med遺伝子を標的とするshRNAのアンチセンス鎖をコードするDNAの塩基配列

配列番号６　shRNAヘアピンループをコードするDNAの塩基配列

請求の範囲

[請求項1] 下記a）～d）：

a）配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸、バリン、又はシステインに置き換えられた変異型Ras85Dの発現、

b）p53遺伝子の欠失又は発現抑制、

c）Cyclin E遺伝子の過剰発現、及び

d）Med遺伝子の欠失又は発現抑制

の特徴を有するショウジョウバエに被験物質を摂取させるステップ、

被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率を測定するステップ、並びに

被験物質を摂取したショウジョウバエの生存率が、被験物質を摂取しないショウジョウバエの生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップを含む、抗がん剤をスクリーニングする方法。

[請求項2] 変異型Ras85Dが、配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられたタンパク質であり、

p53遺伝子の発現抑制が、p53遺伝子の発現を抑制する核酸の導入により行われ、

Cyclin Eの過剰発現が、Cyclin Eをコードする核酸の導入により行われ、及び

Med遺伝子の発現抑制が、Med遺伝子の発現を抑制する核酸の導入により行われる、請求項１に記載の方法。

[請求項3] ショウジョウバエが、配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする核酸、p53遺伝子に対するノックダウン核酸、Cyclin E遺伝子をコードする核酸、及びMed遺伝子に対するノックダウン核酸が導入されたショウジョウバエである、請求項１に記載の方法。

[請求項4] 下記a'）～d'）：

a'）UAS配列の下流に配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする塩基配列を有する核酸、

b'）UAS配列の下流にp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸、

c'）UAS配列の下流にCyclin E遺伝子をコードする塩基配列を有する核酸、及び

d'）UAS配列の下流にMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸

が導入されたショウジョウバエとgal4遺伝子が導入されたショウジョウバエとの交配により産まれた卵を、被験物質を含有する餌料上で飼育するステップ、

被験物質を含有する餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率を測定するステップ、並びに

被験物質を含有する餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率が、被験物質を含有しない餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率よりも高い場合、当該被験物質を抗がん剤の候補物質として選抜するステップ

を含む、抗がん剤をスクリーニングする方法。

[請求項5] ショウジョウバエの飼育温度を調節することによって、被験物質を摂取しないショウジョウバエ又は被験物質を含有しない餌料上で飼育したショウジョウバエの生存率を制御する、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 下記a）～d）：

a）配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸、バリン、又はシステインに置き換えられた変異型Ras85Dの発現、

b）p53遺伝子の欠失又は発現抑制、

c）Cyclin E遺伝子の過剰発現、及び

d）Med遺伝子の欠失又は発現抑制

の特徴を有するショウジョウバエ。

[請求項7] 下記a'）～d'）：

a'）UAS配列の下流に配列番号１のアミノ酸配列の12番目のグリシンがアスパラギン酸に置き換えられた変異型Ras85Dをコードする塩基配列を有する核酸、

b'）UAS配列の下流にp53遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸、

c'）UAS配列の下流にCyclin E遺伝子をコードする塩基配列を有する核酸、及び

d'）UAS配列の下流にMed遺伝子に対するshRNAをコードする塩基配列を有する核酸

が導入されている、請求項６に記載のショウジョウバエ。

[請求項8] 膵がんの治療のための、MEK阻害剤、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも２種のキナーゼ阻害剤の組み合わせ医薬。

[請求項9] 膵がんの治療のための、MEK阻害剤と、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種のキナーゼ阻害剤との組み合わせ医薬。

[請求項10] MEK阻害剤がトラメチニブである、請求項８又は９に記載の組み合わせ医薬。

[請求項11] FRK阻害剤がAD80であり、WEE阻害剤がアダボセルチブであり、AURK阻害剤がアリセルチブ又はBI-831266である、請求項８～１０のいずれか一項の組み合わせ医薬。

[請求項12] 膵がんの治療においてMEK阻害剤と組み合わせるための、FRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択されるキナーゼ阻害剤。

[請求項13] MEK阻害剤がトラメチニブである、請求項１２に記載のキナーゼ阻

害剤。

[請求項14] FRK阻害剤がAD80であり、WEE阻害剤がアダボセルチブであり、AURK阻害剤がアリセルチブ又はBI-831266である、請求項１２又は１３に記載のキナーゼ阻害剤。

[請求項15] 膵がんの治療においてFRK阻害剤、WEE阻害剤、AURK阻害剤及びROCK阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種のキナーゼ阻害剤と組み合わせるための、MEK阻害剤。

[請求項16] トラメチニブである、請求項１５に記載のMEK阻害剤。

[請求項17] FRK阻害剤がAD80であり、WEE阻害剤がアダボセルチブであり、AURK阻害剤がアリセルチブ又はBI-831266である、請求項１５又は１６に記載のMEK阻害剤。