

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：強化学習駆動型のショウジョウバエ表現型スクリーニングによる抗腫瘍天然物の開発
Developing anti-cancer natural products through AI-driven *Drosophila* phenotypic screening

研究開発実施期間：令和3年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：園下 将大
Masahiro Sonoshita

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人北海道大学 遺伝子病制御研究所 教授
Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Professor

II 研究開発の概要

がんは、世界で年間約一千万人が死亡する深刻な福祉課題である。中でも膵がんは、患者の5年生存率が全がん種中で最低の約1割に留まる代表的な難治がん、その治療法の開発は極めて重要なアンメットニーズとなっている。しかし、新薬開発やそのための膵がんの発生素過程の解明は、主に治療標的や個体レベルの効率的な評価系の不足等により極めて難航している。すなわち、病態解明や治療法開発に資するモデル生物の一層の拡充や治療薬の新規モダリティの開発が喫緊の課題となっていた。

本研究ではこの問題を解決すべく、代表者が最近作出した、膵がん患者の中でも最も予後の悪い群の遺伝子型を模倣したモデルショウジョウバエを使用し、北海道大学の独自の天然物ライブラリの個体スクリーニングを実施して、膵がんの新規治療薬シーズの迅速な同定を目指す。この達成に向け、腫瘍の大きさを幼虫体内で計測する光学撮像装置とその解析のための強化学習アルゴリズムを新規に開発し、解析に導入する。これらを通じ、作用機序の裏付けを伴う新規シーズの創出を目指す。

＜新規シーズ探索＞

研究開始時に代表者らは、膵がんの遺伝子異常パターンを模倣した初のモデルハエとして、4遺伝子（がん遺伝子 *KRAS* の活性化、がん抑制遺伝子群 *TP53*・*CDKN2A*・*SMAD4* の不活性化）の変異を模倣した *4-hit* ハエを作出することに成功していた。このハエは、細胞の増殖能や遊走能の亢進、個体致死等の表現型を示す。代表者らは、このハエを使用して遺伝学的スクリーニングや化合物スクリーニングを実施することで膵がんの新規治療標的や新規シーズの同定が可能であることを報告している（Sekiya et al. *Cancer Res* 2023、Fukuda et al. *Cancer Sci* 2024）。そこで代表者らはこのハエを使用し、北海道大学創薬科学研究教育センター

が保有する独自の天然物のスクリーニングを実施した。

まず代表者らは、非遺伝子組換えハエに各天然物を投与し、それぞれの最大耐量を決定した。次にこの量を最大量とする投与実験を *4-hit* ハエに対して実施した。ここでは、単剤あるいは既に代表者らがシーズとして同定している MEK 阻害薬 *trametinib* (Tr) との組み合わせとして実施した。その結果、Tr の効果を A が増強することが分かった。この結果は、Tr と A の組み合わせが膵がんの新規シーズとなることを示唆している。これまでに、A は細胞内の特定のシグナル伝達経路を活性化することが報告されている。一方、MEK がこの経路と相互作用することが知られている。これらを踏まえ代表者らは、Tr や A を投与した際に *4-hit* ハエの体内におけるこれらのシグナル伝達の状態をウェスタン法で解析した。その結果代表者らは、2つの経路の相互作用が実際に発生していることを確認した。

次に代表者らは、この組み合わせシーズが哺乳類の膵がんモデルでも有効か検証すべく、膵がんモデルマウスの作出に取り組んだ。具体的には、培養ヒト膵がん細胞 AsPC-1 を膵臓に移植した同所移植ゼノグラフトモデルマウスを作出し、これが腫瘍体積の経時増大を示すことを確認した。並行して代表者らは、マウスにおける A の最大耐量を決定した。これらを完了したのち代表者らはこのモデルマウスに対し、Tr や A の単独あるいは組み合わせ投与を実施した。その結果代表者らは、Tr と A の組み合わせがゼノグラフトの成長を顕著に抑制することを見出した。

この結果はこの組み合わせが新規シーズとなり得ることを示唆しているが、同時に代表者らはこの組み合わせ群がマウスの死亡等の副作用を招来することも見出し、この組み合わせ投与の最適化は容易ではないと考えた。そこで、より副作用の小さいシーズの開発戦略として代表者らは、A が制御するシグナルの下流で作動するタンパク B を操作する着想を得て、これを実現する化合物 C に着目した。まず代表者らは、Tr と C の組み合わせを *4-hit* ハエに投与した際、このハエの生存率が大きく改善することを見出した。さらに代表者らは、この組み合わせが上記モデルマウスにおける腫瘍成長を著明に抑制することも見出した。重要なことに、この処置による体重減少や個体死等の副作用は観察されず、副作用の制御が十分可能であることを確認した。これまで B やこれが制御するシグナル伝達経路が膵がんの発生や悪性化、あるいはこれらの抑制に果たす役割は十分に研究されておらず、この経路を標的とするシーズも報告がない。これらの結果を踏まえ、代表者らは Tr と C の組み合わせが新規の作用機序を有する有望な膵がんシーズであると結論づけた。

<アルゴリズム開発>

薬効評価を正確に行うには、ある疾患を持つ個体が多量の薬剤摂取による毒性、または疾患そのものが原因で死んだのかを正しく判別しなければならず、そのため、正常な個体に対する最大耐量 (Maximal tolerated dose, MTD) と呼ばれる薬剤投与量の閾値を評価する必要がある。従前、MTD を推定するには4点から5点の任意の間隔での投与量に対し、ショウジョウバエなどのモデル動物の一定数の個体に投与しそれら集団の生存率を実験的に評価することが必要であるとされてきた。しかしこの手法では、そのデータ点数、個体数が充分なのか否かに関わらず、全てのデータ点で同じ個体数を扱っているため、精度が保証されていないという課題があった。我々は生存曲線の典型例を、非遺伝子組換えショウジョウバエに対し異なる3種の薬剤を給餌して生存曲線の候補関数 (2つのシグモイド関数の和) を同定し、最少の実験回数で効率かつ正確に MTD を推定できる手法を単調増加制約のある多腕バンディット手法を用いて開発して、その有用性を数値的に検証することに成功した。本研究では薬物 D を例に MTD 推定シミュレーションを実施し、その結果今回提案した手法が、従来の手法より真の関数形にフィッティングしながら MTD を正しく推定していることを見出した。さらに、MTD 付近の投与量での選択数が多く MTD から遠い投与量での選択数が少ないことか

ら、新手法において MTD を効率かつ正確に推定できていると判断できた。

一方、薬効評価を行う際に天然物の分子構造情報を反映することで、分子構造情報（含まれる置換基、原子種、化学結合といった分子のトポロジ的性質）と薬効などの物性値に関係があれば、その関係性を使うことで、効率的に計算機上で有効な天然物をスクリーニングできることになる。これはハエで *in vivo* スクリーニングする以前により超膨大数である候補分子群を *in silico* スクリーニングすることに相当する。本研究では、膨大な薬物候補群に対して薬効が同定されていないため開発するアルゴリズムの妥当性を検証することに力点を置き、各分子に対して計測されている物性値を例に、計測するについて増大するサンプル数に従って重要な特徴量を再推定（動的特徴量選択）しながらその物性値に対する信頼区間を推定し、物性値が一番高い分子を迅速に同定するアルゴリズムを開発した。そして、今回開発した動的特徴量選択を導入した線形多腕バンディット手法は既存手法である乱択法やベイズ最適化に比して高いパフォーマンスを示していることを確認した。

次に、次項に示す光学撮像装置により得られた 3D 蛍光画像から、形質転換を生じた幼虫ハエか正常ハエ幼虫かを識別するための深層学習アルゴリズムの開発を行った。得られた 3D 蛍光画像を入力とする深層学習器による識別精度は 0.7 程度（1 が 100% の識別能に相当）を示したが、より高い識別精度を得るべく、前処理方法の見直しを実施した。次元操作や形質転換細胞を標識している GFP 蛍光の強度分布に着目した検討を実施することで、3D 蛍光画像データから翅原基部位周辺を抽出する前処理手法を完成させた。引き続き、深層学習の援用により、識別精度の更なる向上を目指している。

< 光学撮像装置の設計・構築 >

自動幼虫透明化装置、流体システム、ライトシート顕微鏡、制御ソフトウェアを組み合わせることで、ハエ一個体まるごとの 3D イメージングを 1 個体／分で実現できるハイスループット 1 細胞解像個体トモグラフィを設計して作出した。空間分解能は、1 細胞程度の分解能を実現した。また、4 本の励起レーザーを備えており、4 蛍光色の撮像を実現した。

この装置を用いて *4-hit* ハエ幼虫における GFP シグナルを指標とした形質転換細胞の自動撮影を行ったところ、翅原基等の体内臓器を撮像することができ、*4-hit* ハエと対照ハエとの間で翅原基内の形質転換細胞の分布に違いがあることを確認した。さらに、種々の組織特異的ドライバーで誘導した GFP シグナルを観察し、神経節やマクロファージ等の分布を検出することに成功した。

Cancer is a serious welfare issue, causing approximately ten million deaths worldwide each year. Among various cancers, pancreatic cancer is particularly intractable, with the five-year survival rate being the lowest of all cancers at about 10%. Developing treatments for pancreatic cancer is therefore a critically important unmet need. However, the development of new drugs and the elucidation of the process of pancreatic cancer development have been extremely challenging, mainly due to the lack of efficient evaluation systems at the therapeutic target or individual level. There is an urgent need to expand the use of model organisms that contribute to understanding the disease and developing treatments, as well as to develop new modalities for treatment drugs.

In this study, to solve these problems, we utilized a model fruit fly mimicking the genotype of the group with the worst prognosis among pancreatic cancer patients. Whole-body screening was conducted using Hokkaido University's unique natural product library to rapidly identify new therapeutic seeds for pancreatic cancer. To achieve this, a new optical imaging device to measure tumor size within larvae and a reinforced learning algorithm for its analysis were developed and introduced for analysis. Through these innovations, the aim is to create new seeds with a mechanism of action.

At the start of their research, we utilized the first model fly mimicking the genetic mutation pattern of pancreatic cancer, involving four genetic changes (activation of the oncogene *KRAS* and inactivation of the tumor suppressor genes *TP53*, *CDKN2A*, and *SMAD4*), known as the 4-hit fly in chemical screening of unique natural substances in Hokkaido University. We found that Substance A enhances the effect of the MEK inhibitor trametinib (Tr), which suggests that the combination of Tr and A could be a new therapeutic seed for pancreatic cancer.

Next, we endeavored to verify if this combination seed would also be effective in a mammalian model of pancreatic cancer. Specifically, we created an orthotopic xenograft mouse model by transplanting human pancreatic cancer cells, AsPC-1, into the pancreas, and found that the combination of Tr and A significantly inhibited the growth of the xenograft.

Investigating more efficacious therapeutic options, we focused on compound C, which, when combined with Tr and administered to the 4-hit flies, significantly improved their survival. Moreover, this combination notably inhibited tumor growth in the aforementioned mouse model without causing side effects like weight loss or mortality, confirming the potential for adequate side effect management. Based on these results, we concluded that the combination of Tr and C represents a promising pancreatic cancer seed with a novel mechanism of action.

Also, we aimed to develop a deep learning algorithm to differentiate between transformed larval flies and normal larval flies based on 3D fluorescence images obtained from the optical imaging device mentioned in the following section. The identification accuracy of the deep learner, which uses the 3D fluorescence images as input, was about 0.7 (where 1 corresponds to 100% identification capability), but we conducted a review of preprocessing methods to achieve higher accuracy. By focusing on dimension manipulation and the intensity distribution of GFP fluorescence that labels transformed cells, we refined the preprocessing methods for the 3D fluorescence image data. We continue to aim for further improvements in identification accuracy through the use of deep learning.

Furthermore, by combining an automatic larval clearing device, a fluidic system, a light sheet microscope, and control software, we designed and constructed a high-throughput single-cell resolution individual tomography system capable of 3D imaging of entire fly individuals at a rate of one individual per minute. The system achieves a spatial resolution sufficient to resolve single cells and is equipped with four excitation lasers, enabling imaging in four fluorescence colors.

Using this equipment, we conducted automated imaging of transformed cells in 4-hit fly larvae, indicated by GFP signals. We successfully captured images of internal organs such as wing discs and observed differences in the distribution of transformed cells within the wing discs between 4-hit flies and control flies. Additionally, we observed

GFP signals induced by various tissue-specific drivers and successfully detected the distribution of structures such as ganglia and macrophages.