

膵癌患者検体を用いた Deorphanization と新規がん治療法の開発

国立がん研究センター研究所 がんRNA研究ユニット

吉 見 昭 秀

(要旨)

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) はヒトゲノム中最大の膜タンパクファミリーで、FDA 承認薬の約 30% は GPCR を標的としている。ホルモンなど生理活性物質を感知する約 400 の非嗅覚受容体のうち、現在およそ 100 の受容体が未だリガンドが見つからない Orphan 受容体である。これまで Orphan 受容体のリガンド同定の試みは主に正常組織においてなされてきたため、当該分野ではがんという特異な環境下に着目した研究は世界でも例がほとんどない。一方、リガンド同定の成功例は近年頭打ちとなってきている。Orphan 受容体のリガンド同定が進まないのは、(i) リガンド不在の条件下で研究がなされてきたため、また (ii) 下流活性化シグナルが多岐にわたるため単一アッセイでは見逃されているため、であるという仮説を我々は立てた。

一方、嗅覚受容体は動物において外界の情報を検出する非常に重要な機能を担い、実際に嗅覚受容体が匂い物質と結合することが示されたが、視覚や言語コミュニケーションが発達したヒトにおいては生きるのに必須ではない退化した機能として扱われてきた。そのため医学研究の対象・創薬対象として認識されてこなかったが、匂いを感知する器官以外でも嗅覚受容体が高発現する事象が観察されることから、嗅覚受容体には匂いを感知する以外の機能が存在する可能性が示唆される。受容体を研究対象とすることにより、創薬につなげやすいという利点があり、本研究はがんを対象とするこれまでにな

い視点からの新しい創薬・治療法開発につながる可能性がある。

近年のゲノム医療は、患者に同定された特定の遺伝子異常に基づき標的治療薬を使用するスタイルが主流である。その一方で、特異的標的治療が確立されている遺伝子異常はごく一部であり、またその臨床的効果は一部の例外を除いて限定的である。この問題にはがんの不均一性が寄与しているものと考えられ、がん細胞を多面的に攻撃するためには遺伝子異常とは異なる視点からの創薬が必要とされている。本研究開発では、様々ながん種を対象にスクリーニングを行うことにより、がん横断的に、あるいは特定のがん種毎に治療標的化が可能な [受容体—リガンド] の組み合わせを同定し、創薬につなげる。

上記の目的を達成するために、我々はまず計 668 種類の GPCR を標的として、膵癌を含む 5 種類のがん細胞株で CRISPR Dropout スクリーニングを実施した。その結果、これらのがん細胞では非嗅覚受容体、嗅覚受容体双方で 26 種類の GPCR への依存性が高いことが示唆された。また同定された依存性が高いと考えられる非嗅覚受容体の中には、いまだにリガンドが同定されていない Orphan 受容体が 15 種類含まれていた。上記の結果から、がんにおいては治療標的として認識されていない GPCR が多数存在し、ゲノム医療とは異なる角度から新しい創薬に結び付く可能性が示唆された。特に、嗅覚受容体という本来がんと無関係に思える受容体群に含まれる複数の受容体のがん細胞の生存・増

殖に必須であるという知見は意外性があり、今後の創薬研究に期待がかかる。

さらに、本研究では、非嗅覚受容体に属するGPCRのうち、CRISPRスクリーニングで同定されたOrphan受容体15種類のリガンドを同定するために、バイオエレクトロニクス技術を用いて独自に高感度バイオセンサーを各種開発し、がん患者血漿検体を実際に用いてハイスループットスクリーニング（HTS）を実施するためのセンサーの最適化を行った。今後はHTSを実施し、同定しているOrphan受容体のリガンドの同定を試みる。同時にCRISPRスクリーニングで得られた候補受容体52種類を機能的にvalidationし、有望な候補についてその分子生物学的・生物学的な機能を解析し、治療標的としての意義を確認する。Validationされた受容体を不活化ないし活性化するような抗体を創薬し、がん治療への有効性を検証する。将来的なアウトカムとして、前臨床試験を経て研究開発後の知財獲得および企業導出、そしてFirst-in-Humanの臨床試験へと開発を進めることを目指す。本研究開発により同定される受容体・リガンドはバイオマーカーとしても有用な可能性があり、臨床的有用性を評価する。liquid biopsyが可能になれば、患者に優しい診断・経過フォローの手段となることが期待される。

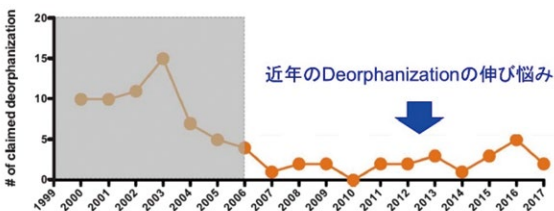


図1 Deorphanization件数の年次推移

(本文)

(1) 非嗅覚 G タンパク質 共役型 受容体の Deorphanization

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）はヒトゲノム中最大の膜タンパクファミリーで、FDA承認薬の約30%はGPCRを標的としている。ホルモンなど生理活性物質を感知する約400の非嗅覚受容体のうち、現在およそ100の受容体が未だリガンドが見つからないOrphan受容体である。これまでOrphan受容体のリガンド同定（Deorphanization）の試みは主に正常組織においてなされてきたため、当該分野ではがんという特異な環境下に着目した研究は世界でも例がほとんどない。一方、Deorphanizationの成功例は近年頭打ちとなってきている（図1）。Orphan受容体のDeorphanizationが進まないのは、(i) リガンド不在の条件下で研究がなされてきたため、また(ii) 下流活性化シグナルが多岐にわたるため単一アッセイでは見逃されているため（図2）、であるという仮説を我々は立てた。本研究提案は上記の二つの仮説を解決すべく、それぞれ次のように計画を立てた：(i) がんという環境下、特にがん患者検体を用いて検証する、(ii) GPCR下流の多岐にわたるシグナルを網羅的・かつ鋭敏に検出するため、バイオエレクトロニクスを駆使した新規バイオセンサーを開発し、スクリーニングを実施する。

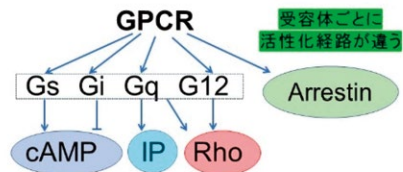


図2 多岐にわたるGPCR下流シグナル

感知の漏れをなくすため、我々は図3のように独自に開発したものを含め複数のバイオセンサーを用いて high-throughput screening 系を構築した。

・ **G15 バイオセンサー** : G15 はほぼ全ての GPCR で活性化される特殊な G 蛋白質である。この「無差別」な G15 の特性を生かし、G15 に発光蛋白質の一部を付加し受容体とのリガンド依存的結合を検出することで、どの G 蛋白質経路を活性化する受容体のシグナルも漏れなく検出するオリジナルバイオセンサーを開発した (図 4A)。

・ **Arrestin 系バイオセンサー** : 一般に GPCR は Gs/Gi/Gq/G12 の 4 つの G 蛋白質経路と β -arrestin 経路の 2 つのシグナルを惹起し、その後細胞膜表面から細胞内へ移行する。活性化する G 蛋白質が受容体ごとに異なるのに対し、ほぼ全ての受容体は β -arrestin と直接結合しエンドソームへ移行する。そこで、Luciferase Complementation Assay を組み合わせてバイオセンサーを開発した (図 4B)。

・ **Rho BRET バイオセンサー** : 我々が開発した Rho BRET バイオセンサーは、生細胞でプレートリーダーを用いた high-throughput screening

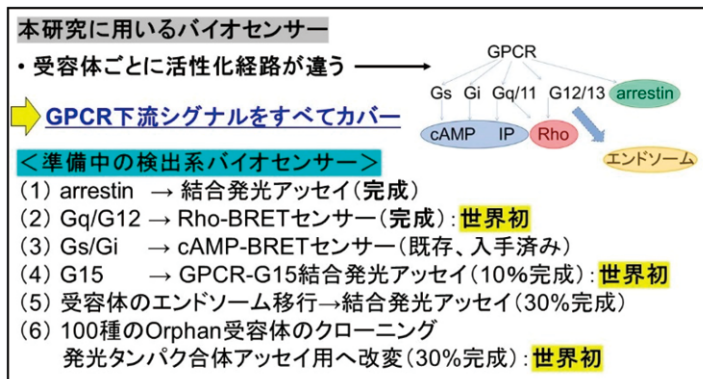


図 3 本研究で開発する各種バイオセンサー

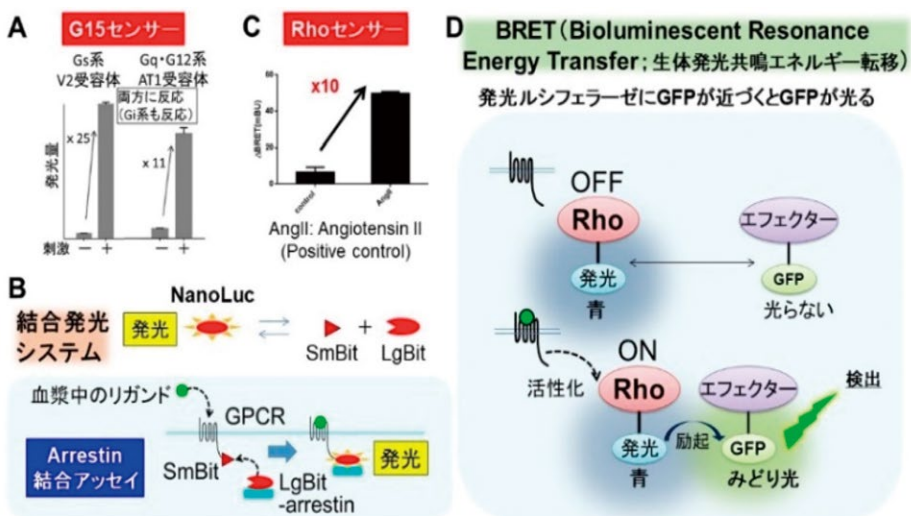


図 4 本研究で開発したの各種バイオセンサー

を可能とする BRET システムを活用したバイオセンサーであり、同時に少ない受容体発現量でも高感度に検出可能で光毒性もない優れたシステムである。Rho 経路はハイスループットが可能なセンサーがこれまでになかったことから、本研究のために同システムを独自に開発し、鋭敏な感度を示した (図 4C-D)。

一方、Orphan 受容体を含めた GPCR ががんにおける創薬標的となるかどうかを検討するために、我々は CRISPR-Cas9 システムを用いて非嗅覚受容体の約 9 割に当たる 349 種類の遺伝子を標的としたノックアウトスクリーニングを肺癌・肝癌・大腸がん・膀胱がん・白血病の細胞株において実施した。その結果がん細胞の依存度が高い 26 種類の GPCR を見出し (図 5)、その中には、肉腫において治療標的となることが最近報告された GPR20 を含む (Iida et al. Cancer Discov. 2021)、Orphan 受容体が 15 種類含まれていた。このことから、本 CRISPR スクリーニングの結果が有望であると考えられ、また同時にこれまでに創薬研究の対象となっていない Orphan 受容体で、がん細胞の生存に寄与するものが数多く存在することが示唆された。

(2) 嗅覚受容体の発がんにおける役割

嗅覚受容体は動物において外界の情報を検出する非常に重要な機能を担い、実際に嗅覚受容体が匂い物質と結合することが示されたが、視

覚や言語コミュニケーションが発達したヒトにおいては生きるのに必須ではない退化した機能として扱われてきた。そのため医学研究の対象・創薬対象として認識されてこなかったが、匂いを感知する器官以外でも嗅覚受容体が高発現する事象が観察されることから、嗅覚受容体には匂いを感知する以外の機能が存在する可能性が示唆される。

我々は、上記の非嗅覚受容体の CRISPR スクリーニングに平行して、319 種類の嗅覚受容体についても同様の CRISPR スクリーニングを実施したところ、驚くことに非嗅覚受容体と同様にがん細胞の依存度が高い 26 種類の嗅覚受容体が検出された (図 6)。

嗅覚受容体は非嗅覚受容体と異なり、Golf (Golf) という特殊な G 蛋白質とのみ共役し、細胞内シグナルを惹起する。匂いを感知する嗅細胞においては 1 細胞に 1 種類の嗅覚受容体しか発現しないという特殊性があり、治療標的とした際の嗅覚への副作用は限定的と考えられるが、がん細胞での嗅覚受容体の発現状態や機能はあまりわかっていない。そこで、今後は正確な細胞内シグナルの評価のため、既に開発済みの G15 センサーを応用し、Golf 特異的発光バイオセンサーを開発する。

さらに、本研究では Orphan 受容体に対するリガンドスクリーニングに並行し、CRISPR-Cas9 を用いて CRISPR スクリーニングで得ら

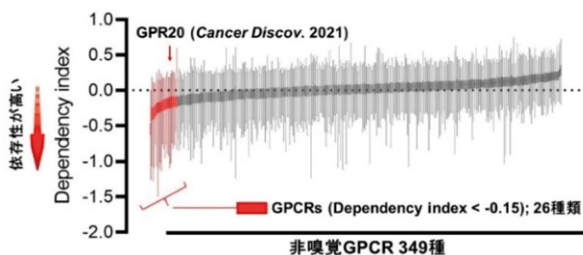


図 5 非嗅覚受容体 CRISPR Dropout Screen

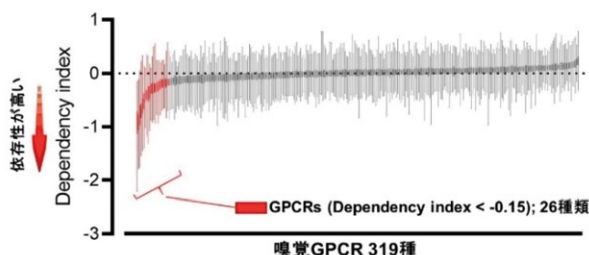


図 6 嗅覚受容体 CRISPR Dropout Screen

れた個々の候補 Orphan 受容体・嗅覚受容体をノックアウトし、機能的 Validation を行った。対象とする GPCR をノックアウトする guide RNA を導入した細胞を GFP で、コントロールの Luciferase guide RNA を導入した細胞を mCherry で標識して導入直後に 1:1 の比率で混合し、経時的に flow cytometry で GFP:mCherry の比率を観察する系を立ち上げた。現在、本項目は進行中であり一部の候補 GPCR についての validation が終了した段階であるが、すでに肺がん細胞株 A549 が“GPCR-1”（遺伝子名とは異なる）への依存度が高いことが確認された（図 7）。

また、がん種によっては GPCR のノックアウトが細胞増殖ではなく細胞分化に影響することも考えられることから、分化に関わる表面マーカーを上記の flow cytometry に組み合わせることにより解析を行う（例えば急性骨髄性白血病由来細胞における CD11b など）。また、個々にノックアウトしたがん細胞株の RNA シークエンス（RNA-seq）を実施し、それぞれの受容体のがんにおける分子生物学的な役割を解析する。特に依存性の高い Orphan 受容体・嗅覚受容体の候補を 2 つ～3 つに絞り、対象となるがん種を選定し、今後の抗体医薬創生へとつなげる。

(3) 受容体を創薬研究のターゲットとするメリット

受容体を研究対象とすることにより、創薬につながるやすいという利点があり（Roecker et al. J Med Chem 2015）、本研究はがんを対象とするこれまでにない視点からの新しい創薬・治療法開発につながる可能性がある。なお、Deorphanization は必ずしも必須の研究開発項目ではなく、Orphan 受容体を創薬対象とする戦略も併用する。リツキシマブやハーセプチンなどの過去の創薬成功例と同様に、本研究開発で体調とする Orphan 受容体・嗅覚受容体も細胞表面に発現する治療標的・バイオマーカーの二役を担う新たな個別化治療のキープレーヤーとなることが期待される。

そこで、本研究の今後の課題としては、上記の機能的 validation を完了させ、その結果から選定した GPCR に対するモノクローナル抗体の作成を行う。抗体の作成に際しては 7 回膜貫通型 GPCR の N-terminus を含む 4 つの細胞外ドメインを抗原部位として設定する。1 種類の GPCR に対し 5-10 程度のクローンを作成する。

作成したモノクローナル抗体の特徴を明らかにするために、下記の評価を行う。

i) 受容体への特異的抗体結合の評価：対応するがん種の細胞株に蛍光蛋白質を N-terminus に付加した GPCR を発現させ、蛍

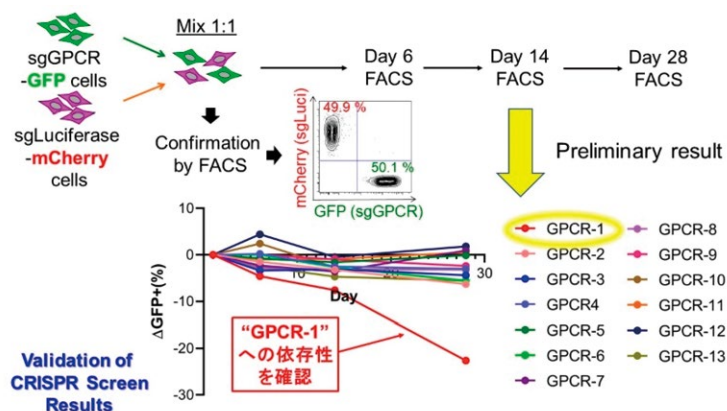


図 7 CRISPRスクリーニングの機能的Validationの結果

光ラベルした抗体と受容体の結合を時間分解蛍光 TR-FRET を用いた非放射線ラベリングで評価する。他にウェスタンブロットや免疫沈降など古典的手法による評価も行う。

ii) 細胞内シグナル応答へ与える影響の評価：該当するモノクローナル抗体がGPCR 発現を発現するがん細胞株の細胞内シグナルへ与える影響を各種 GPCR 下流経路において評価し、薬理的特性を明らかにする。これらのシグナル解析は、すでに我々が保有するバイオセンサーを使用することにより、新たにセンサーを開発することなく解析することが可能である。

続いて、がん治療への有効性を確認するために下記の検討を行う。

i) 得られた薬剤のがん細胞への影響の評価 (in vitro)：対象とする GPCR を発現するがん細胞株に抗体を投与し、抗腫瘍効果を検討する。がん細胞の増殖・細胞周期・アポトーシスへの影響を評価するとともに、がん細胞内の遺伝子発現プロファイル、シグナル変化を RNA-seq で解析する。

ii) 得られた薬剤のがん細胞への影響の評価 (in vivo)：in vitro における効果が有望な薬剤に関しては、対応するがん種で Cell line-

derived xenograft (CDX) モデルを準備し、薬剤のがん治療への有効性を検証する (図8)。また、研究の進捗が順調で CDX モデルにおける治療効果が有望な場合には、患者由来異種移植 (PDX) モデルにおける有効性の検証に進む。その際には国立がん研究センターの J-PDX ライブラリーを活用する。同ライブラリーにはすでに樹立された各種がん (肉腫を含む) の PDX モデルが 1,500 以上保存され、その一部は遺伝子異常のプロファイリングもなされている。そこで、国立がんセンター中央病院の各診療科とも連携し、対応するがん種を中心に PDX モデルを用いて前臨床試験を実施し、さらなるがん治療への有効性を検証する。治療後のモデルにおいてはがん細胞を FACS sorting し、アポトーシス評価や RNA-seq による遺伝子発現プロファイル・シグナル変化を確認する。

本研究で選定した GPCR でがん治療法を開発上で有望なものについては、東京大学創薬機構のケミカルライブラリーを利用した薬剤スクリーニングを考慮する。また、本研究開発では抗体創薬を第一に念頭に置くが、同定したリガンドを元にしたアンタゴニストのコンピュー

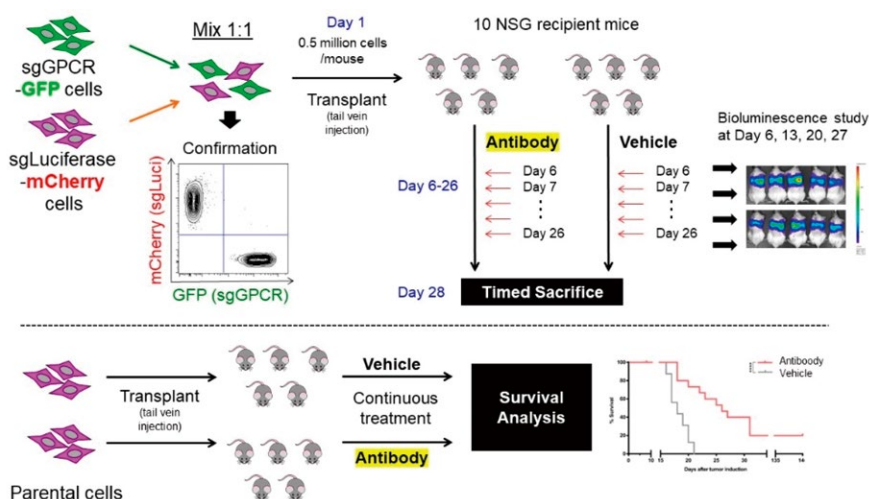


図8 CDXモデルにおける抗体医薬の有効性評価

ターモデリングも検討する。

近年リャマやアルパカなどのラクダ科の動物が持つ軽鎖がなく重鎖だけからなる小型の 1 本鎖抗体 (ナノボディ) を利用し、GPCR を活性化型・非活性化型に安定化させる手法が結晶構造解析で多くの成功をもたらした (2012 年ノーベル化学賞)。ナノボディは小型のため、受容体のリガンド結合部位を認識できることが知られており、更に 1 本鎖抗体のため抗体をコードするアミノ酸配列を得ることができればプラスミドを発現した大腸菌による作成が可能であることから、ファージディスプレイ法などを利用した微小改変による抗体の最適化を行いやすいという長所がある。アルパカの免疫 (国内受託企業あり) および GPCR の細胞外ドメイン特異的抗体の作成がネックであるが、マウス抗体で期待した効果が得られない場合にはナノボディ開発を検討する。

(4) ゲノム医療とがんの多面的治療法の必要性

近年のゲノム医療は、患者に同定された特定の遺伝子異常に基づき標的治療薬を使用するスタイルが主流である。その一方で、特異的標的治療が確立されている遺伝子異常はごく一部であり、例えば OncoKB によれば FDA に承認された薬剤の使用対象となる Level 1 の Actionable gene は 43 種類に限られ、またその臨床的効果は一部の例外を除いて限定的である。この問題にはがんの不均一性が寄与しているものと考えられ、がん細胞を多面的に攻撃するためには遺伝子異常とは異なる視点からの創薬が必要とされている。本研究開発では、様々ながん種を対象にスクリーニングを行うことにより、がん横断的に、あるいは特定のがん種毎に治療標的化が可能な [受容体ーリガンド] の組み合わせを同定し、創薬につなげる。

(5) 結論

本研究により、がん患者由来血漿検体を用い

た Deorphanization のためのスクリーニング体制が整った。具体的には、各種の高感度バイオセンサーの開発が完了し、また実際に患者血漿を用いた条件検討を行うことにより、バイオセンサーおよび実験条件の最適化が完了した。構築されたプラットフォームを用いて、今後本格的な HTS を実施する。

また、CRISPR dropout screening から有望な結果が得られており、つい最近 1 種類のヒット GPCR について機能的な validation も完了した。今後は機能的 validation をさらに進め、ヒット GPCR を特定するとともに、ヒット GPCR のがんにおける役割の解明、および創薬に向けた研究を加速させる。

(6) 謝辞

最後になりましたが、今回日本脳臓病研究財団からのご支援により、当初想定していた以上に本研究を飛躍的に推進させることができました。この場をお借りして深謝いたします。