

研究報告書
令和2年度：A課題

2022年3月31日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 国立開発法人国立がん研究センター研究所

住 所 東京都中央区築地5-1-1

研究者氏名 吉見 昭秀

(研究課題)

がん患者検体を活用したOrphan受容体リガンド同定のためのスクリーニング基盤形成

令和3年3月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究目的】

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をターゲットとしているが、現在約100のGPCRが未だにリガンドが見つかっていないOrphan受容体である。本研究では、多種類のがん患者の血漿を用いることにより、Orphan受容体のリガンドの同定を試みる。がん患者由来の検体を用いたOrphan受容体のリガンド同定(deorphanization)の報告はなく、未だにリガンドが同定されていないOrphan受容体の中には、がんにおいて特異的に[リガンドー受容体]システムが亢進しているものがあるのではないか（それ故にこれまでdeorphanizationがなされなかった）と仮説を立て、今回の患者血漿を用いたハイスループットスクリーニングの実施を着想した。

本研究では、多種類のがん患者の血漿を用いることによって、現在約100種類存在するOrphan受容体（リガンドが同定されていない受容体）の新規リガンドの同定を試みる。そのためには、我々のグループが新規開発するバイオセンサ一群を用いたスクリーニングを実施し、ヒットするがん種と受容体の組み合わせを決定し、分画した血漿蛋白質のMass spectrometryによりリガンドを同定した上で、化学合成したリガンドを用いて、Orphan受容体のリガンドであることを確認する。さらに、同定したリガンドが受容体に結合することによるがん細胞内の下流シグナルを解析し、がんにおける同受容体の役割を明らかにし、将来的に抗体創薬を目指すとともに、抗体創薬の可能性や、同定した[受容体ーリガンド]の腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。なお、本研究提案では研究期間内に主にスクリーニングの基盤となるプラットフォームの構築とスクリーニングの実施を目指す。

具体的に本研究では、Orphan受容体のリガンド同定に際して、シグナル感知の漏れをなくすため、以下のように独自に開発するものを含め、複数のバイオセンサーを用いてハイスループットスクリーニング系を構築した。本研究では血漿を用いるため、血漿中の非特異的因子が目的の受容体以外を活性化する擬陽性を生じやすく、既存の転写因子などを利用したスクリーニングアッセイシステムが使いにくい。そこで下記の感度または特異度が高い複数のバイオセンサーを用いてOrphan受容体スクリーニングプラットフォームを作成し、GPCR下流のGs/Gi/Gq/G12の4つのGタンパク質経路とarrestin経路の2つのシグナルの両者を漏らさずに検出するよう計画した。

- Arrestin系バイオセンサー：[β-arrestinー受容体]の会合を細胞質（高感度・中特異度）、あるいはエンドソーム（中感度・高特異度）で検出する系。
- Rhoバイオセンサー：本研究のために我々が独自に開発したGq・G12の下流に位置するRhoバイオセンサー。Rho経路はセンサーの欠如からこれまでにスクリーニングアッセイとして使用されたことがなく、新規性・独自性が高い

【進捗状況概略】

貴財団の助成を受け、本研究は下記の進捗を得た。

- ①バイオセンサー・スクリーニングプラットフォーム構築とスクリーニングの開始。
- ②国立がん研究センター・杏林大学の倫理審査承認を受けた。
- ③「がん細胞株における依存性解析」で本計画の創薬への道筋を期待させる解析結果を得た。

【具体的な進捗内容】

①-1 新規バイオセンサー開発とスクリーニングプラットフォームの構築

初年度に全てのバイオセンサー開発とスクリーニングプラットフォーム構築が80%完了した(図1)。更に、独自に開発した世界初ハイスループット対応高感度発光G15センサーは予想を上回ることができ(図2)、特許申請を準備中でスクリーニングに使用することとした。更にスクリーニングのために(A)G15センサー(B1)アレスチンセンサーの安定発現細胞株の樹立に成功し、一過性発現よりも安定した反応を得ている。

- 図1.スクリーニングプラットフォームの進捗率
1. G15 センサー(100%) 安定発現細胞株樹立済(完成)
 2. Arrestin センサー(100%)
 3. 受容体のエンドソーム移行(30%)
 4. ハイスループットRho-BRETセンサー(100%)
 5. 100種のオーファンGPCRのクローニング 発光結合システムへ改変(95%完成)

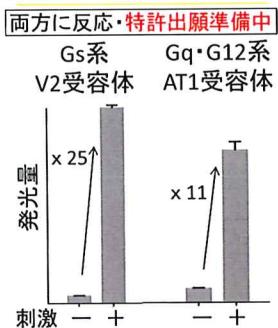


図2.新規開発
G15バイオセンサー

①-2 Rho センサーによるがんの評価

本計画のリガンドスクリーニングに使用予定である Rho-BRET バイオセンサーで、複数のがん細胞における RhoA/Rac1/Cdc42 の活性状況を定量化した。がん細胞ごとの RhoA/Rac1/Cdc42 活性化バランスが異なることを新たに見出し、がんに focus した論文を発表予定である。

② 倫理委員会によるヒト検体を用いる当該研究への倫理審査の承認

本研究課題は国立がん研究センターバイオバンクのがん患者血漿使用のため国立がん研究センター倫理委員会(研究課題番号 2021-017、研究課題名：がんにおけるオーファン受容体の観察研究)および杏林大学倫理委員会(研究課題番号 R03-081、課題名同上)にて倫理委員会の承認を得た。研究協力者である臨床チームとの会議も実施し、計画通り 2021 年度中にバイオバンクサンプルを使用したスクリーニングを開始した。今後も引き続きスクリーニングを継続する。

③ CRISPR-Cas9 Dropout Screening によるがん依存性 Orphan GPCR の発見

初年度申請時リガンド発見後の④(16~24か月目)で計画しているオーファン GPCR の腫瘍化への貢献の評価の一部をリガンドスクリーニングに先立って実施した。複数のがん細胞株において 100 種類の Orphan GPCR をノックアウトする guide RNA library を作製し、CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトし、dropout するものを検出した。この解析により腫瘍細胞の依存度が高い 11 種類の Orphan GPCR を見出した(図3)。この中には、最近肉腫において治療標的となることが報告された GPR20 も含まれており(Iida et al. *Cancer Discov.* 2021)、本 CRISPR スクリーニングの結果が有望であると考えられた。

本結果を踏まえ、これら 11 種類の Orphan GPCR のリガンドスクリーニングでの優先度を上げて、リガンドスクリーニングを実施するとともに、詳細な解析を行う方針とした。

【総括】

以上、本計画は当初の想定通り順調に進捗し、またさらに CRISPR-Cas9 Dropout Screening

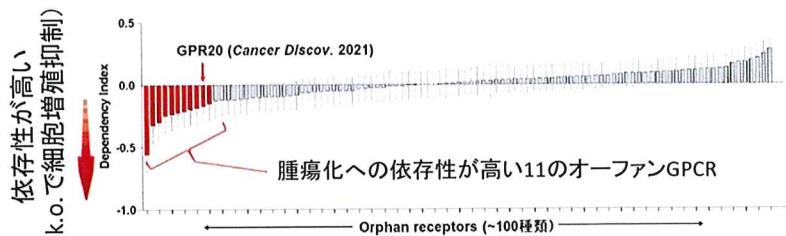


図3.複数のがん細胞株における CRISPR-knockout スクリーニング

を追加できることから、研究全体としては想定以上の進捗を得ることができた。今後は進捗③から得た優先順位を生かしつつ、引き続き Orphan GPCR のリガンドスクリーニングを本格的に実施し、リガンドの同定やがんにおける同リガンド-受容体の役割を明らかにし、将来的な抗体創薬や腫瘍マーカー開発の根拠となるような強いエビデンスの獲得を目指して研究を進めたい。

【謝辞】

本研究の共同研究者は、杏林大学医学部肉眼解剖学教室講師の大石篤郎先生です。また、本研究の遂行は公益財団法人がん研究振興財団からの助成金により初めて可能になりました。ここに深く感謝いたします。