
バイオエレクトロニクスによる
細胞内シグナルセンサー開発と新規がん治療法の創出
Development of Intracellular Sensors via Bioelectronic Technologies and
Drug Discovery for Cancers

M21助自123

代表研究者 吉見昭秀 国立がん研究センター研究所 がんRNA研究分野 分野長
Akihide Yoshimi *Chief, Division of Cancer RNA Research,
National Cancer Center Research Institute*

共同研究者 大石篤郎 杏林大学 医学部 肉眼解剖学教室 講師
Atsuro Oishi *Lecturer, medical school gross anatomy, Kyorin University*

G protein-coupled receptors (GPCRs) form one of the biggest membrane protein families, which transduce the external cellular signal to intracellular signaling. There still remain ~100 GPCRs whose ligands have not been identified, thus called “orphan GPCRs”. Given that GPCRs are an important class of molecular targets and approximately 34% of FDA-approved drugs target 108 GPCRs, we performed a CRISPR-Cas9 mediated dropout screen to identify GPCRs that are essential for cancer cell survival. Surprisingly, this identified as many as 26 non-olfactory GPCRs including 15 orphan receptors and 26 olfactory GPCRs, suggesting that there still remains many GPCR that have not been recognized as cancer targets.

In addition, deorphanization of orphan receptors will provide us with a valuable opportunity to pharmacologically regulate cancer-associated signaling via GPCRs. To address this goal, we developed novel biosensors and optimized them for high-throughput screens (HTSs). We will use these biosensors for as well as >5,000 plasma samples from patients with a variety of cancers to perform comprehensive HTSs to identify ligands of orphan receptors.

At the same time, we have partly validated the results from our CRISPR screen using individual CRISPR-gRNAs targeting 26+26 GPCRs and evaluate the molecular and biological effects of each GPCR knockout by measuring cellular proliferation and analyzing gene expression profile and intracellular signaling. For promising GPCR, we will develop monoclonal antibodies and similarly test the molecular and biological effects in vitro. With a combination of promising GPCRs and antibodies, we will move on to preclinical trials in vivo using cell-line/patient-derived xenograft models and test the efficacy of antibodies as therapeutic strategies against cancers.

To summarize, our interdisciplinary study of bioelectronics and cancer biology will lead to the establishment of novel cancer therapies and biomarkers for cancers.

研究目的

本研究は最新の発光バイオエレクトロニクス技術を用いたオリジナルプラットフォームを構築・活用することにより、生体内新規物質の発見と新しいがん治療の創生に挑むものである。G蛋白質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノム最大の膜蛋白ファミリーで、FDA承認薬の約30%はGPCRを標的としている。現在およそ100のGPCRが未だリガンドが見つからないOrphan受容体である。Orphan受容体のDeorphanization(リガンド同定)の試みはこれまでにも正常組織においてなされてきたが、がんという特異な環境下で実施した研究は世界でも例がない。そこで、我々は、がんという特殊な環境で、そのOrphan受容体あるいはリガンドが機能的に働いているという仮説を立てた。

本研究では、まずCRISPR dropout screeningによりがん細胞が生存する上で依存しているGPCRを選定し、創薬やDeorphanizationの標的候補を同定する。候補となるGPCRにOrphan受容体が含まれている場合には、多種類のがん患者血漿を用いることにより、リガンドの同定を試みる。そのために、①新規に発光バイオセンサープラットフォームを開発してリガンドスクリーニングのために最適化し、ハイスループットスクリーニングを実施する基盤を形成する。

概要

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノム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

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た。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[受容体ーリガンド]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性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。

—以下割愛—