

## 白血病患者血清中のリガンド探索を通じた新規治療開発

大石篤郎

杏林大学医学部 肉眼解剖学教室

### 【研究の背景】

FDA 承認薬の約 30%は G 蛋白質共役型受容体(GPCR)を標的とするが、ヒトで約 400 ある非嗅覚 GPCR 中約 100 がリガンド(受容体に結合する物質)が未知のオーファン受容体で、新規リガンド発見は直接的創薬につながりうる。

### 【目 的】

我々は白血病患者で発現が著名に亢進している 19 のオーファン GPCR を見出したため、①独自のスクリーニングプラットフォームを構築②白血病などのがん患者血漿を有する国立がん研究センターバイオバンクを利用しオーファン受容体のリガンド同定、③白血病の新バイオマーカー・新規がん治療薬の創出を目指す。

### 【方 法】

① スクリーニングプラットフォームの構築: 一般に GPCR は Gs/Gi/Gq/G12 の 4 つの G 蛋白経路とアレチン経路を活性化し、その後細胞膜からエンドソームへ移行する。活性化する G 蛋白が受容体ごとに違うこと、G12 のアッセイが難しいことが、今日のオーファン受容体リガンド探索での難点である。我々は複数のバイオセンサーで漏れのないハイスループットスクリーニング系を構築する。

② スクリーニングの実施とリガンドの同定: 申請者が外来研究員として所属する国立がん研究センターにはがん患者血漿を集積したバイオバンクがあり、適切な倫理審査を経ることで利用可能である。本研究は①で構築した 4 つのスクリーニングプラットフォームを用いて、白血病患者で発現が著名に更新しているオーファン GPCR に対しバイオバンク血漿を用いた徹底的ハイスループットスクリーニングを実施する。いずれの系も 96 サンプルを 1 分程度で検出可能で、多検体での計画実効性が非常に高い。スクリーニングでヒットが出た場合には、過去のオーファン受容体成功例に倣い複数の血清中の蛋白質を分画した上で Mass spectrometry によりリガンドを同定する

③ リガンド結合によるがん細胞応答の解明: 同定したリガンドが受容体に結合することによる白血病細胞内の下流シグナルを解析し、白血病における同受容体の役割を明らかにする。同定した[リガンド-受容体]ペアががん細胞応答に影響を与える場合、免疫不全マウスを用いた異種移植モデルを用いて白血病治療の標的となるか検討する。

④ 抗体創薬およびバイオマーカー創出の検討: 受容体が白血病治療の標的となりうる場合、受容体を活性化・非活性化させるモノクローナル抗体の開発を行い、リガンドそのものおよび抗体の in vivo における抗腫瘍効果を動物モデルで検証する。更に同定した[リガンド-受容体]ペアが臨床的にバイオマーカーとして活用可能かを臨床検体や臨床情報を用いて検証する。

本助成期間内に、オーファン GPCR の中で白血病腫瘍で高発現する受容体の抽出とクローニング、次いでそれらの活性化を検出するプラットフォームの基盤形成を行った。

【結 果】

我々は独自のスクリーニングプラットフォームの構築を行った。白血病患者で発現が著名に亢進している 19 のオーファン GPCR をクローニングし、発光ナノビットテクノロジーを利用するため、SmallBit タグを各 GPR の C 末に付加した。バイオセンサーとしてはβアレスチンなど GPCR との会合が期待できる蛋白に LargeBit フラグメントを付加したバイオセンサーを作成し(図 1)、ポジティブコントロール受容体で良好な反応を得た(図 2)。

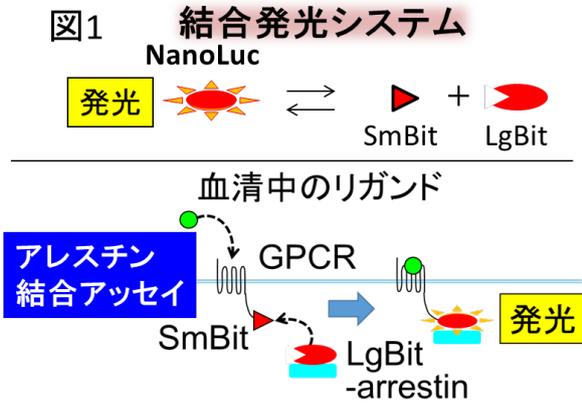
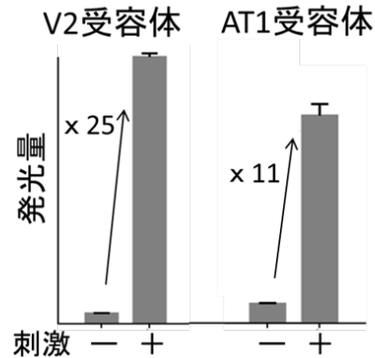
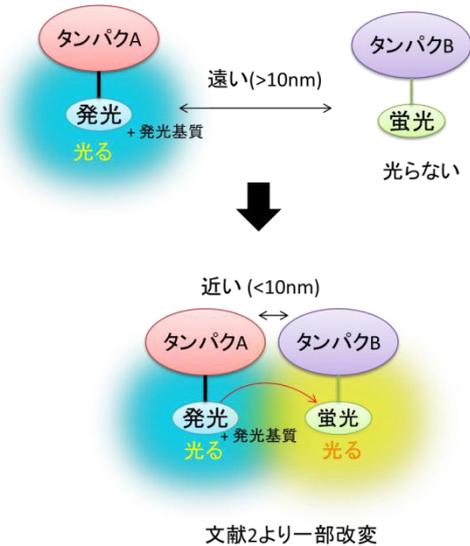


図2 新規バイオセンサー反応の一例

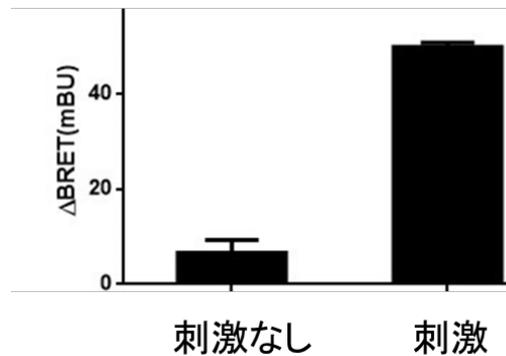


また、発光蛋白と蛍光蛋白を組み合わせた BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 技術を用いたバイオセンサーも作成した(図 3)。これら受容体とバイオセンサーを用いて、リガンドスクリーニングを行っている。

図3 BRETの概要



BRETセンサーの反応例



【考 察】

臨床で現在のところオーファン GPCR を標的とした薬剤は臨床で使用されておらず、その原因として①リガンドが未知のためオーファン GPCR の生理的機能がよくわかっておらず、受容体の活性化・不活化という strategy での治療目標が定めにくい②オーファン GPCR またはリガンドの異常による疾患がわかっていない、という 2 点があげられる。

白血物の腫瘍細胞において発現が更新しているオーファン GPCR は、今後のナチュラルリガンド(生体内に本来備わっているリガンド)やサロゲートリガンド(受容体に結合する化学合成した非天然分子など)の発見を通じた臨床応用への道筋を期待させるものである。

以上、本計画は当初の想定通り順調に進捗し、研究全体としては想定以上の進捗を得ることができた。今後は本助成の

成果であるプラットフォームを利用した Orphan GPCR のリガンドスクリーニングを利用し、リガンドの同定や同リガンド-受容体の生理的・病理的役割を明らかにし、将来的な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。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

研究対象である GPCR は、近年リガンド発見から創薬に至った成功例である成人 T 細胞白血病に対するモガムリズマブ (CCR4 受容体)、抗 HIV 薬 Maraviroc (CCR5 受容体)、不眠症に対するスボレキサント (オレキシン受容体) などが示すように、短期間に全く新しい治療薬を様々な病態に対し生み出しうるという利点があり、本計画も白血病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将来性がある。また、同じ白血病の型であってもその遺伝学的異常は患者により様々である。患者検体の遺伝子変異や染色体異常などのプロファイルと本プラットフォームを組み合わせることで研究を推進することにより、どのような遺伝子異常を有するときに同定した [オーファン受容体-リガンド] が病理学的に重要な役割を果たすかを検討することが可能であり、本研究はテイラーメイド医療への橋渡しとなることも期待される。さらに、同定した [受容体-リガンド] の発現が腫瘍マーカーとなる可能性があり、臨床情報と臨床検体を用いたバイオマーカー研究につながり、特に血清中のリガンドが liquid biopsy に利用可能であれば、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。

#### 【謝 辞】

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター中央病院後藤悌先生と国立がん研究センター研究所の吉見昭秀先生です。また、本研究の遂行は先進医薬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。

#### 【参考・引用文献】

1. Oishi A, and Jockers R. Recent advances in orphan GPCRs research and therapeutic potential. GPCRs as Therapeutic Targets 2022, 1, 20-59, DOI; <https://doi.org/10.1002/9781119564782.ch2>
2. Oishi A, and Jockers R. Measuring Protein-protein interactions of Melatonin Receptors by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Methods in Molecular Biology 2022, 2550:207-18, PMID: 36180695 DOI: 10.1007/978-1-0716-2593-4\_26)