

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07358

研究課題名（和文）慢性掻痒の創薬、がんの抗体医薬開発に向けた中枢痒み受容体の構造基盤解明

研究課題名（英文）Structure-based analysis of the central itch receptors aiming at development of new medicine for chronic itch and cancer

研究代表者

井上 明俊（INOUE, Akitoshi）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50709152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：G蛋白質共役受容体(GPCR)ファミリーであるGRPRとNMBRは、脊髄において痒み特異的な神経伝達を担う「中枢痒み受容体」として働く。このためGRPRやNMBRはアトピー性皮膚炎などの慢性掻痒の治療薬開発における重要なターゲットであり、創薬に向けた構造情報の解明が求められている。本研究では独自の手法で熱安定性の高い様々な不活性固定型変異体を作製し、単分散性のよいGRPRやNMBRの精製を行った。これらの精製標品に様々な阻害薬を結合させクライオ電子顕微鏡単粒子解析（Cryo-EM SPA）を行い、リガンド結合情報を含む高分解能三次元構造情報を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では痒み伝達における中枢受容体であるGRPRとNMBRの様々な阻害剤結合情報を含む三次元立体構造情報を明らかにした。これらの情報を元にリガンドの選択性、非選択性に関わるアミノ酸配列を明らかにすることができる。これによりGRPRやNMBRをターゲットにしたリガンド開発を構造情報を元に効率よく行うことが可能となる。

研究成果の概要（英文）：GRPR and NMBR, members of the G protein-coupled receptor (GPCR) family, serve as central itch receptors, transmitting itch-selective signals in the spinal cord. Therefore, GRPR and NMBR are important targets in the development of drugs for chronic pruritus such as atopic dermatitis, and structural information for drug discovery is needed. In this study, we employed a novel approach to generate various thermostabilized mutants that enable monodisperse purification of GRPR and NMBR. By conducting Cryo-Electron Microscopy Single-Particle Analysis (Cryo-EM SPA), we elucidated high-resolution three-dimensional structural information, including details of inhibitor binding.

研究分野：構造生物学

キーワード：痒み Cryo EM SPA 構造解析 GRPR NMBR GPCR

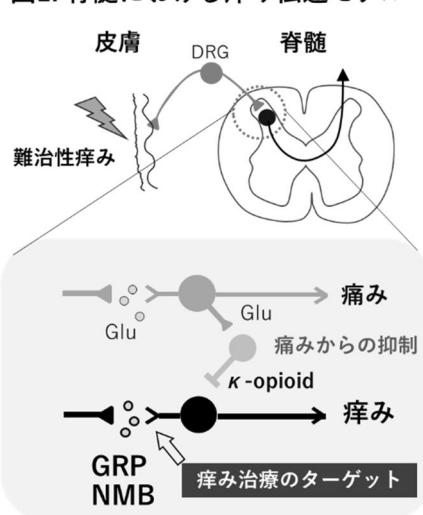
## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎、老人性乾皮症、慢性腎不全、胆汁うっ滞性肝疾患などの疾患には全身性の慢性的な痒みが付随する(慢性掻痒)。痒みを抑えるための掻く行動はさらに皮膚を傷つけ、痒みを増強させる。睡眠障害や集中力の低下など、痒みにより日常生活に支障をきたす患者は非常に多い。現在、慢性掻痒は慢性疼痛と同様に治療を必要とする深刻な症状として認められている。慢性掻痒はC線維の表皮内への異常な伸展や、炎症に伴う免疫細胞などからの様々な起痒物質の放出など、多様な関与因子により引き起こされている。このため、抗ヒスタミン薬などに抵抗性を示し、末梢をターゲットとした対処治療を非常に困難なものとしている。

近年、脊髄においてボンベシン様ペプチドの哺乳類アナログである Gastrin-releasing peptide (GRP) や Neuromedin B (NMB) を介した痒み特異的な中枢伝達経路が発見され、痒み治療の新たなターゲットとして注目されている。マウスにおいて GRP や NMB の髄腔内投与は激しい搔破行動を引き起こす。逆にこれらの受容体 (GRPR、NMBR) のノックアウトは様々な痒み刺激への応答を抑制する(痛み刺激への応答は変化しない)。このことから、GRP や NMB は脊髄における痒み伝達経路の主要なシグナル分子であると考えられる。このため、G 蛋白質共役受容体 (GPCR) の一種である GRPR、NMBR の構造が明らかになれば、これらの中枢痒み受容体をターゲットとした治療薬の開発に重要な情報を提供することができる。さらに、GRPR は肺がん、大腸がん、前立腺がんなどの様々ながん細胞において過剰発現し、がん細胞の増殖や分化に関わる発がん因子である。GRPR の構造情報の解明は痒みのみならず、がんの治療薬開発においても重要な役割を果たす。

図1. 脊髄における痒み伝達モデル



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、中枢痒み受容体である GRPR と NMBR の構造情報解明に向けて以下のことを明らかにすることである。

(1) GRPR、NMBR のクライオ電子顕微鏡単粒子解析 (Cryo-EM SPA) を行い、受容体へのリガンド結合様式などの高分解能三次元構造情報を得る。

(2) GRPR、NMBR の立体構造認識抗体を作製し、構造解析に用いるとともに、シグナル活性を阻害する抗体をスクリーニングし、抗掻痒薬およびがん治療薬開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1, GRPR、NMBR の精製、構造解析

GRPR や NMBR は他の GPCR と比較しても特に熱安定性が低く野生型での精製は非常に困難である。そこでまず(1)GFP タグをつけた受容体に様々な点変異やbRIL などの融合タンパク質を導入し、GFP を指標とした「蛍光ゲル濾過法」熱安定性変異体をスクリーニングする。(2)浮遊 HEK 細胞にバキュロウイルスを用いた遺伝子導入法を組み合わせた大量発現系で熱安定性変異体を発現させて精製を行う。(3)GRPR-bRIL や NMBR-bRIL の細胞内領域に bRIL Fab と Fab ナノボディ (Nb) を結合させた GRPR-細胞内抗体複合体を作製し、Cryo-EM SPA により阻害薬結合型の構造情報を明らかにする。

#### 2, GRPR や NMBR の細胞外認識抗体の取得

(4)精製した受容体を免疫不全マウスに免疫する。脾臓 B 細胞を回収し、ハイブリドーマを作製する。ハイブリドーマの中から受容体の立体構造を認識する抗体を「リボソーム ELISA 法」によりスクリーニングする。ビオチン化脂質を使いプロテオリボソームを調整することで、受容体をストレプトアビジンプレートに簡単に固定することができる。立体構造を認識しない抗体は直鎖状に変性させた受容体と結合するかウェスタンブロットングで確認して排除する。(5)G タンパク質結合状態を模倣した結合様式の抗体を選別するために、抗体存在下でのリガンド結合アッセイを行う。抗体の GRPR に対する阻害活性を調べるために、マウスに髄腔内投与し、GRP による搔破行動が抑制されるか解析する。阻害活性を持つ抗体はがんの抗体医薬の候補として特許申請する。

### 4. 研究成果

(1) GRPR や NMBR の熱安定性変異体の作成

不活性型固定変異に、N末とC末の様々な長さの欠失変異を組み合わせ、野生型の数十倍の発現、熱安定性を持つ変異体を作製した(図2)。さらに、GRPRの不活性状態安定化変異体の第3細胞内ループに融合タンパク質(bRIL)を導入して、熱安定性を高めたGRPR-bRILを作製した。

(2) GRPR、NMBRの精製

GRPR、NMBRの熱安定性変異体をバキュロウイルスに組み込み、浮遊系HEK細胞を用いて大量発現させ、単分散性のよいGRPRやNMBRの変異体を精製した(図3)。

(3) GRPR、NMBRのCryo-EM SPA

細胞内領域にbRIL FabとFab ナノボディ(Nb)を結合させたGRPR-細胞内抗体複合体を作製し、Cryo-EM SPAを行った(図3)。bRILの挿入位置はAlphaFold2を用いた立体構造予測とFSECにより候補をあげ、Cryo-EM SPAで数種類の構造を解き、高解像度になるものを選択した。これまで、非選択的な低分子阻害薬PD176252の結合した不活性型GRPR、NMBRの構造をそれぞれ2.93Å、3.31Åの分解能で決定した(図3)。また、GRPRに選択的なペプチド阻害薬RC-3095の結合した不活性型GRPRの構造を2.98Åの分解能で決定した(図3)。

(4) GRPRの立体構造認識抗体の作製

GRPRの細胞外領域に結合する立体構造認識抗体を5種類作製した(図4)。

今後はGRPRとNMBRに対するリガンドの選択性、非選択性に関わるアミノ酸配列を明らかにし、SDBBに必要な構造情報を提供する。さらに得られた抗体の結合位置をCryo-EM SPAで明らかにするとともに、抗体の中に阻害活性があるものがないかなど検証を行っていく。

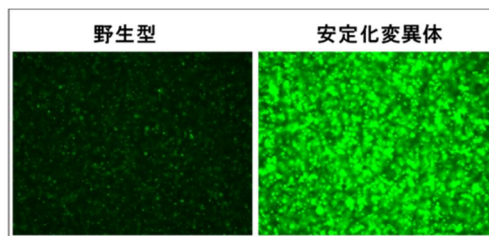


図2 GRPRの野生型と安定化変異体の発現の比較

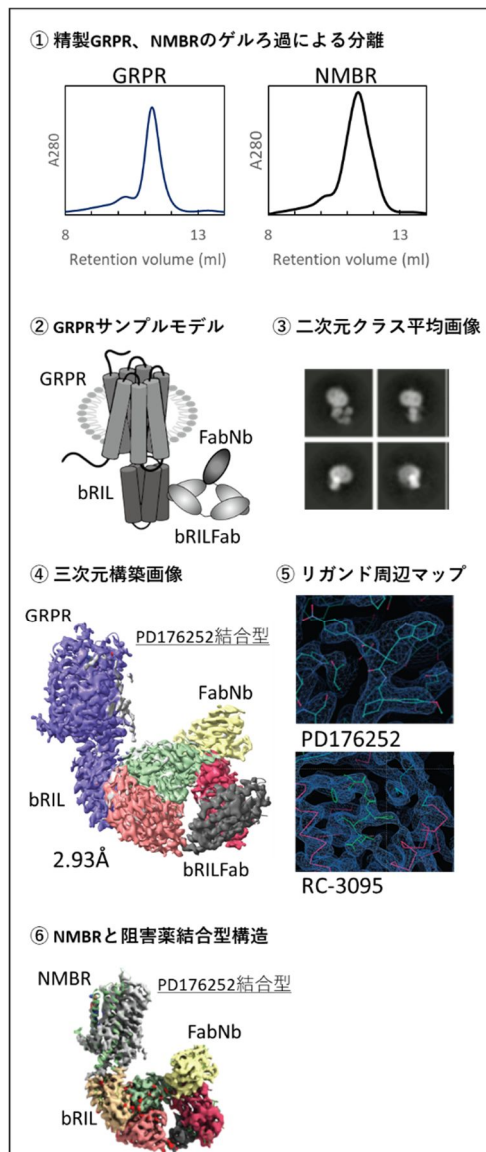


図3. GRPRとNMBRのCryo-EM SPAによる構造解析

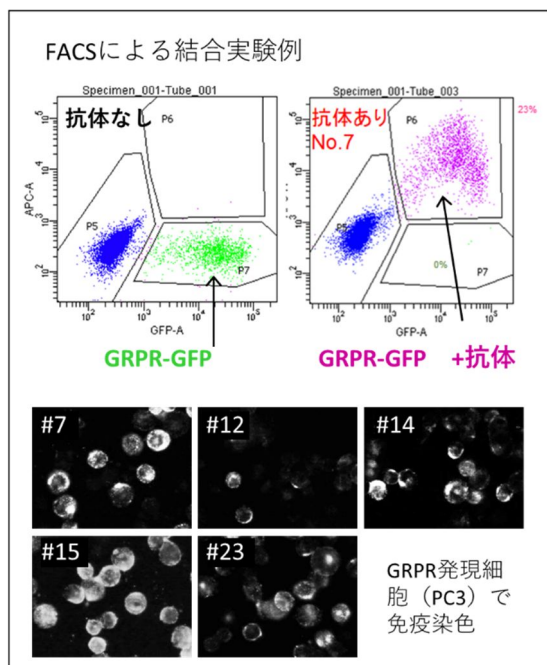


図4. GRPRの立体構造認識抗体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寿野 良二  (SUNO Ryouji)  (60447521)	関西医科大学・医学部・准教授    (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関