抜粋

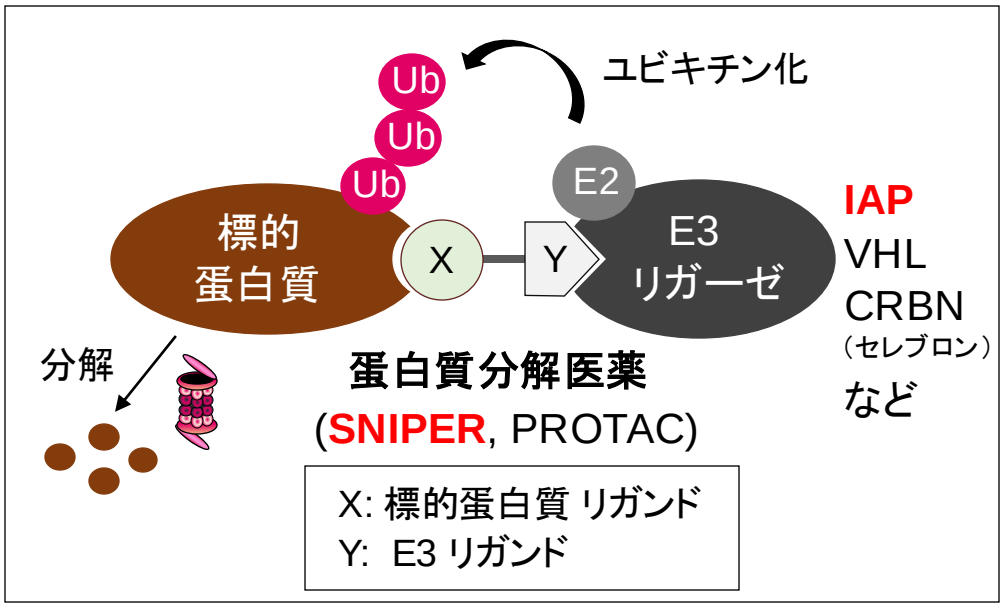
令和2年12月28日　AMED「創薬基盤推進研究事業」研究成果発表会

「革新的医薬品等開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得」

次世代型分子標的薬のオフターゲット作用の評価系開発

国立医薬品食品衛生研究所　遺伝子医薬部　第三室室長
大岡　伸通

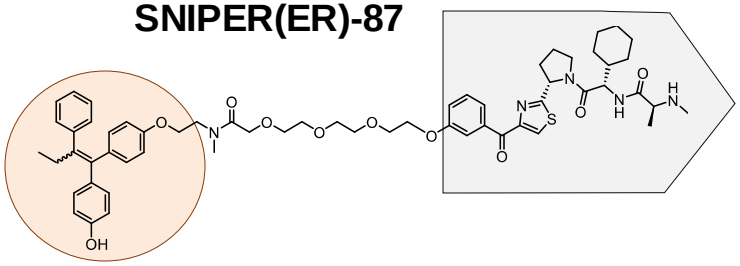
背景 1　蛋白質分解医薬の開発技術



IAP
VHL
CRBN
（セレブロン）
など

蛋白質分解医薬のモデル化合物の一例

SNIPER(ER)-87

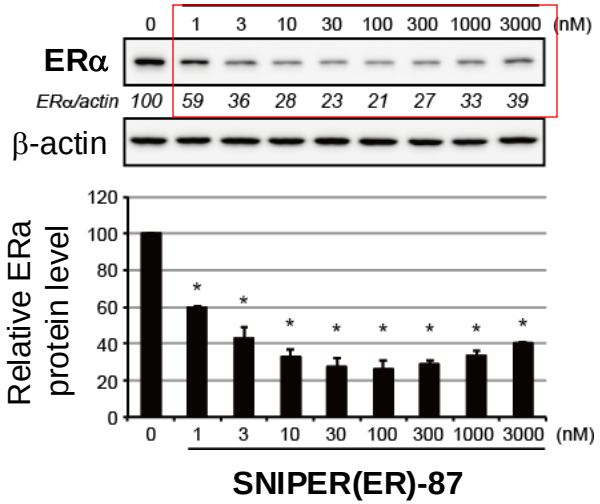


分子量1000程度の低分子化合物

培養細胞系

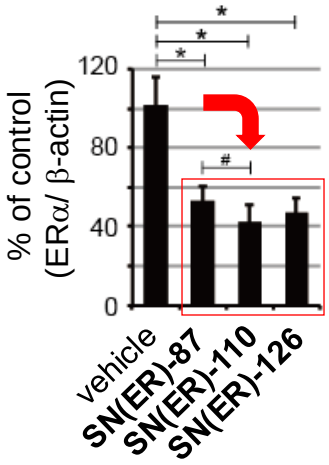
標的(ER)分解活性

SNIPER(ER)-87

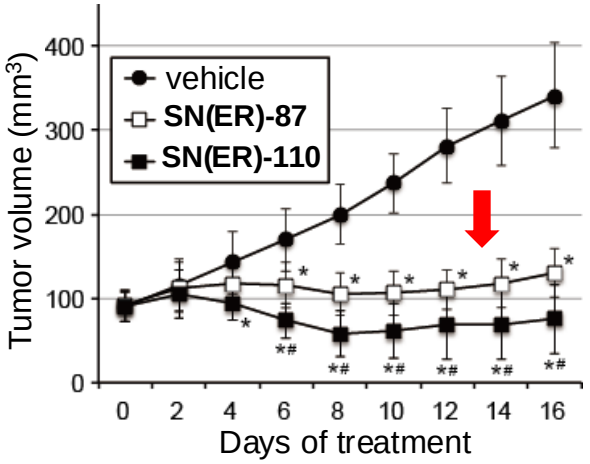


マウス in vivo

標的(ER)分解活性

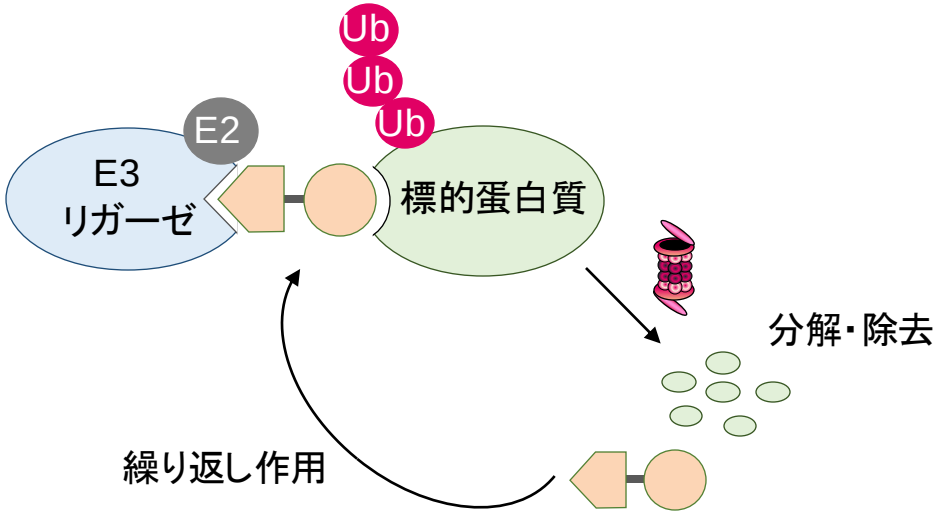


有効性(抗がん活性)



背景２　蛋白質分解医薬の作用機序と開発動向

蛋白質分解医薬は一般に，標的分子そのものを分解・除去し，かつ，標的に対して繰り返し作用することから，従来の低分子医薬と比べて，薬理作用が飛躍的に上昇することが知られている．

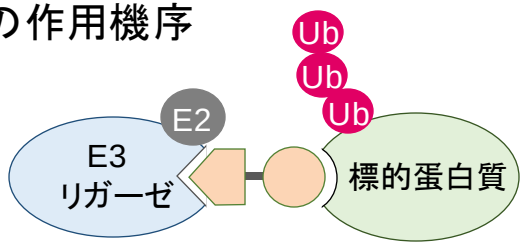


✓ 蛋白質分解医薬に利用するリガンドは、原理的には標的蛋白質のどこに結合しても良いことから、これまでの低分子薬で標的にできなかった「アンドラッガブル蛋白質」に対しても標的にできるのではないかと期待されている．

✓ 蛋白質分解医薬を開発するバイオベンチャーが国内外で相次いで設立され、大手製薬企業と提携するなどして、既にいくつかの医薬品候補が米国で臨床試験段階にある．

背景３ 蛋白質分解医薬の安全性評価について

蛋白質分解医薬の作用機序



従来の低分子医薬の作用機序

「標的−キメラ化合物−E3」で構成される3者複合体がユビキチン化修飾に適した立体配置になった時にのみ分解活性を示す.

1対1で作用する従来の低分子医薬とは異なる基質認識機構

相同蛋白質の構造がヒトと同一ではない試験動物においては、基質認識、ひいてはオフターゲット蛋白質が変化する可能性が示唆されている.

蛋白質分解医薬に対するオフターゲット評価法の構築 ①
（ショットガンプロテオミクス解析）

- 蛋白質分解医薬はオフターゲット分子を蛋白質レベルで減少させるため、その評価法としては、蛋白質の量の変動を包括的に解析可能なプロテオミクスの手法が適していると考えられる.

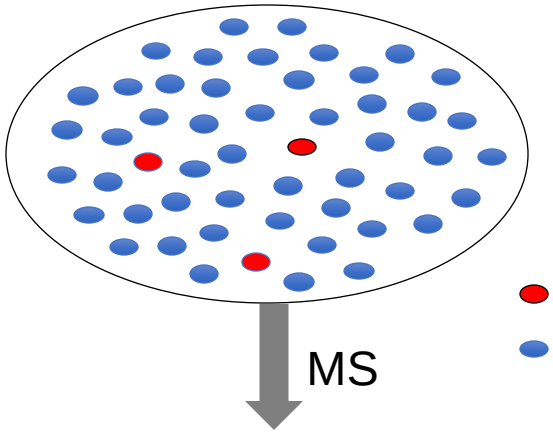
- オフターゲット作用の評価においては、オフターゲット分子の発現低下の程度を正確に把握する相対定量が重要であるため、定量性の高いプロテオミクスの活用が望まれる.

これまでの検証により判明した課題

✓ プロテオミクスの領域では、網羅的な相対定量解析が可能な「ショットガンプロテオミクス」がこれまで汎用されてきたが、定量性や再現性の精度に乏しいこと、また、発現量の低い蛋白質を検出できないことが判明した.
（発現量の多い4000程度のタンパク質の検出に限定され、さらに信頼性の高い定量は上位数百程度のタンパク質に限定される.）

蛋白質分解医薬に対するオフターゲット評価法の構築 ②

ショットガンプロテオミクス



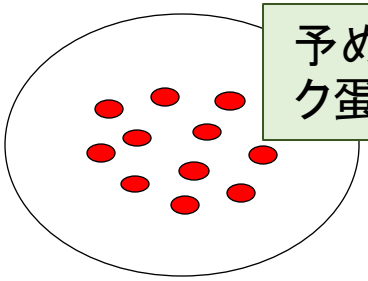
MS

発現量の多い4000程度の蛋白質を検出
上位数百程度のみ信頼性が高い
（リスク分子に対しては**低感度**）

リスク分子
その他

ターゲットプロテオミクス

予め評価すべきリスク蛋白質を絞り込む



MS

数十～数百程度の標的とした蛋白質を検出
ただ，内部標準ペプチドが必要
（リスク分子に対して**高感度**）

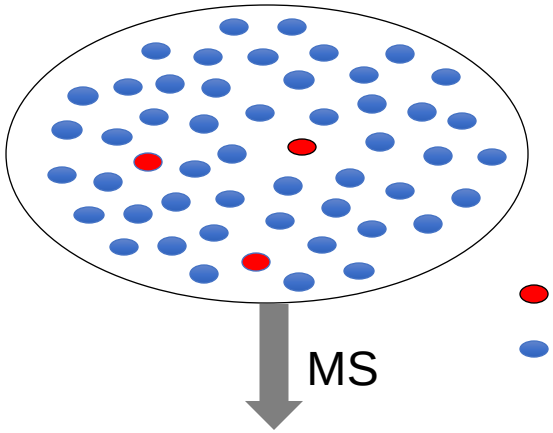
✓ 核酸医薬のオフターゲット効果のリスク評価を念頭に置いたリスク遺伝子の調査（下図）により、発現抑制により毒性発現が懸念されるヒト遺伝子リストに分類されているリスク分子は、約1600種類にのぼる.

発現抑制により毒性発現が懸念される
ヒト遺伝子リスト（右表参照）
【AMED革新基盤創成事業部】

ヒト遺伝子			遺伝子の情報													
			ヒト遺伝子疾患情報								ノックアウトマウスの病態情報					
Gene symbol	Gene ID	遺伝子の機能	ヒト遺伝子疾患情報の有無	ヒト遺伝子疾患の内容	遺伝子機能の変化の内容	左記判断の根拠	表現型発症までの期間	病態の分類	病態判断の根拠	左記情報源（データベース等）	KO動物における病態情報の有無	ヒトとマウスのタンパク質の相同性（%）	KOマウスの疾患の内容	表現型発症までの期間	病態の分類	病態判断の根拠
AAAS	8086	よくわかっていない；核膜の内部にある。位置的に分子の核内膜運動に関与すると考え	P	1.Triple A syndrome:	A	ほぼ全ての変異において核膜の適切な位置に到達できない。	B	D	アカラシア、副腎不全、無涙症	GHR	P	93	female infertility, abnormal behavior, hypoactivity	B	D	Aaas-/-マウスは、予想外にも異常行動及び神経系異常は軽度で
AASS	10157	アミノアジピンセミアルデヒドシンターゼ；哺乳類のリジン分解経路の最初の2段階における	P	1.Hyperlysinemia:	A	これらの変異は酵素の機能を低下又は排除すると考えられている	C	D	1.通常健康上の問題はない。	GHR	p	87	enlarged lymph nodes and urinary bladder, abnormal	B	D	impc
ABAT	18	γ-アミノ酪酸を異化する	P	1.GABA-transaminase deficiency:	A	正常なGABAトランスアミナーゼの欠乏	A	A/D	重症度はさまざまだが、ほとんどの患者は重篤な発達障害を抱	GHR	P	91	preweaning lethality	B	A	impc
ABCA1	19	膜間コレステロール/リン脂質輸送	P	1.Familial HDL	A	これらの変異は細胞からの	A	D	1.低HDL症 2.低HDL症、神経	GHR	N/P	95	postnatal lethality,	A/B	A/D	HDL-CはABCA1-/-マ

蛋白質分解医薬に対するオフターゲット評価法の構築 ②

ショットガンプロテオミクス

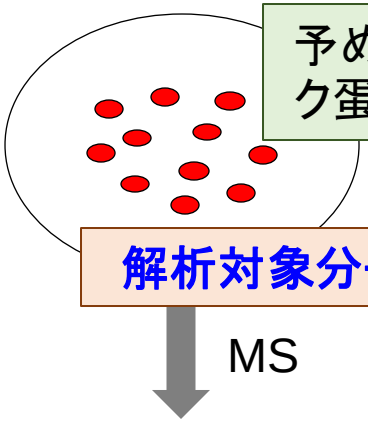


発現量の多い4000程度の蛋白質を検出
上位数百程度のみ信頼性が高い
（リスク分子に対しては**低感度**）

リスク分子
その他

ターゲットプロテオミクス

予め評価すべきリスク蛋白質を絞り込む



数十～数百程度の標的とした蛋白質を検出
ただ，内部標準ペプチドが必要
（リスク分子に対して**高感度**）

PMDA（毒性担当）との意見交換

「臨床試験では評価できない発がんのリスクを予測するため、がん抑制遺伝子（発現抑制されるとがん化に繋がる遺伝子）を解析対象とするのがよい。」との方針で一致.

➡ リスク分子をがん抑制遺伝子に限定して，オフターゲット評価系を構築.

✓ ターゲットプロテオミクスで解析可能な分析メソッドの確立を行う.

ターゲットプロテオミクス解析に最適な分析メソッドの確立
（がん抑制遺伝子を対象とした評価系の構築と標準化）

✓ リスク分子の調査結果に加えて、Shibata list（腫瘍関連遺伝子）とノックアウトがんモデルマウスの情報をもとに、独自のがん抑制遺伝子のリストの整理を終えた（51遺伝子）.

【がん抑制遺伝子リスト（51遺伝子）】

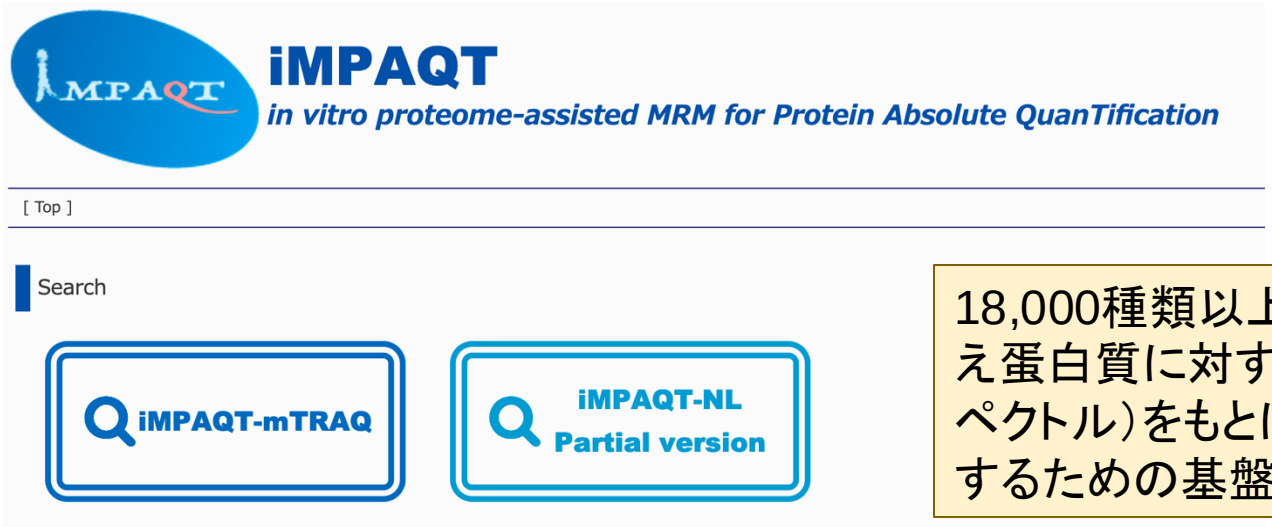
AIP	CDC73	FAT4	MAD2	PRKN	SDHD	STK11
AMER1	CDH1	FLCN	MLH1	PTCH1	SEPTIN9	TET2
APC	CDKN1C	GNMT	MSH2	PTEN	SMAD4	TMEM127
ARMC5	CDKN2A	KDM6A	MTH1	RB1	SMAD9L	TP53
ARID1A	CEBPA	KLLN	MUTYH	SDHAF2	SMARCA2	TSC1
BIN1	CHEK2	KMT2D	PALB2	SDHB	SMARCA4	TSC2
BRCA1	CYLD	LZTR1	PML	SDHC	SMARCB1	VHL
BRCA2	DKC1					

✓ ターゲットプロテオミクスには、解析に適した（特異的かつ高感度な）内部標準ペプチドを選定する検討が必要である.

✓ がん抑制遺伝子（51遺伝子）について内部標準ペプチドライブラリーを作成するため、まずは代表的な7遺伝子に対して標準ペプチドを選定・合成し、分析メソッドの確立（MRMトランジッションの組み合わせの作成及び検証）を行う.

ターゲットプロテオミクス（MRM）に適した内部標準ペプチドの選定

- ✓ MRMに適した内部標準ペプチドの候補は、同定実績のある蛋白質のペプチドから選ぶことも可能であるが、このような予測に基づき合成された候補ペプチドが必ずしも高感度なペプチドである保証がないことなどから、MRMメソッドの構築には組換え蛋白質の利用が提案されてきた.
- ✓ しかし、組換え蛋白質の利用によるメソッドの構築は非効率的であり、将来的には発がん性以外の毒性も予測することが可能な（包括的な）オフターゲット評価法へとリスク分子の対象を拡大することも視野に入れていることから、本研究では、効率的な内部標準ペプチドの選定手法の確立を目指し、iMPAQTデータベースを活用する.



18,000種類以上のゲノムワイドな組換え蛋白質に対する実データ（MS/MSスペクトル）をもとに構築したMRMを実施するための基盤情報のデータベース

- ✓ iMPAQTデータベースは、mTRAQで標識したペプチドを使って取得したデータで構築されているため、非標識ペプチドでもきちんと測定できるか検証する必要がある.

ターゲットプロテオミクス解析に最適な分析メソッドの確立
（がん抑制遺伝子を対象とした評価系の構築と標準化）
のまとめ

✓ まずは代表的な7遺伝子に対して標準ペプチドを選定・合成し、分析メソッドの確立を行う.

✓ ターゲットプロテオミクスに用いる LC/MSとしては、**Orbitrap eclipse** と **BioAccord**の2台を使用する.

Orbitrap eclipseによるオフターゲット評価法の分析メソッドの確立.

➢ 精度の高い分析データを取得 → 定量性、再現性の確認.

BioAccordによるオフターゲット評価法の標準化の検証.

➢ 汎用機器で分析データを取得 → 標準化が可能か検証.

本事業研究期間内の最終到達目標

✓ 代表的な7遺伝子を対象として評価系の標準化を行う。
✓ また、蛋白質分解医薬のモデル化合物を用いた評価を行い基盤データを取得する.