

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた PROTAC 製剤 off-target 評価系の開発
(英語) Development of PROTAC off-target evaluation system using liquid chromatograph mass spectrometer

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 渡部 昌
(英語) Masashi Watanabe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人北海道大学大学院・医学研究院・講師
(英語) Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Lecturer

II 研究開発の概要

研究開発の背景と目標

近年、治療が困難な疾患に対する新たなモダリティとして PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimeras、タンパク質分解誘導キメラタンパク質) あるいは SNIPER (Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protei(n)dependent Protein Eraser) (以下 PROTAC/SNIPER と総称する) が注目されている。低分子医薬あるいは抗体医薬でアプローチ可能なタンパク質は現状約 20%にとどまる一方で、PROTAC/SNIPER では残り約 80%のタンパク質を標的とし分解に導くことが可能になると考えられている。PROTAC/SNIPER は標的タンパク質と結合するリガンド、ユビキチンリガーゼと結合するためのリガンド、そして両末端リガンドを繋ぐクロスリンカーからなる。これにより、PROTAC/SNIPER が標的タンパク質とユビキチンリガーゼに同時に結合することで、標的のポリユビキチン化とプロテアソーム系によるタンパク質分解へと導く。新しい薬剤モダリティとしてその有望性から大きな注目を集めている PROTAC/SNIPER であるが、その新規性ゆえに安全性評価は重要な課題であり、特に標的外のタンパク質(オフターゲット基質)を分解することで毒性を発揮する可能性について精査する必要がある。一方で、その精査を行う手法は未だ確立されておらず、国内外を問わず実施された例もなかった。本研究は、新規ユビキチン化基質同定手法を応用して PROTAC/SNIPER 製剤オフターゲット評価系を確立することを目標とした。

研究開発の成果

(1) オフターゲット評価用プローブを安定に発現する細胞株の樹立

オフターゲット評価用プローブの作製：PROTAC/SNIPER に頻繁に用いられるユビキチンリガーゼ遺伝子 5 種類を入手し、基質を捕獲するためのユビキチンリガーゼプローブをレトロウイルス発現ベクター上に組み込んだ。各遺伝子につき 2 種のプローブを作製し、計 10 種のプローブプラスミドを得た。

PROTAC/SNIPER 依存性結合分子評価用プローブの作製：各ユビキチンリガーゼ遺伝子について、結合分子を捕獲するためのユビキチンリガーゼプローブをレトロウイルス発現ベクター上に組み込んだ。

プローブ安定発現細胞株の樹立：本方法ではプローブを細胞内で安定に発現させる必要がある。作製したプローブベクターを用いてレトロウイルスを作製し、プローブを安定に発現する細胞株を作製した。

(2) 樹立細胞株を用いた PROTAC/SNIPER 標的タンパク質の同定

サンプル回収条件の検討および質量分析実行までのプロトコル作成：前項目で作製した細胞を用いて、既知の基質に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析を元に、PROTAC/SNIPER 処理濃度、処理時間、プロテアソーム阻害剤使用の有無などの条件検討を行い、オフターゲット評価のための質量分析実行までのプロトコルを作成した。プロテアソームによって分解を受ける基質と、分解を受けない基質について、それぞれ別の条件で評価することが重要であることを見出した。また、PROTAC/SNIPER 依存性結合分子評価用プローブ導入細胞溶解液を用いて、予めユビキチンリガーゼに結合しているタンパク質、PROTAC/SNIPER 処理によって結合量が増加するタンパク質を同定するための条件検討を行った。この結果、可溶化条件や薬剤処理条件などを最適化することができた。

質量分析用サンプルの調製：前項目で確定した各条件で樹立した細胞株に薬剤処理を行い、2 段階の精製によってユビキチン化ペプチドを精製した。精製したペプチドは脱塩および濃縮処理を行い、質量分析に適した形へ調製した。さらに PROTAC/SNIPER 依存性結合分子評価用プローブ導入細胞溶解液を用いて、予めユビキチンリガーゼに結合しているタンパク質、PROTAC/SNIPER 処理によって結合量が増加するタンパク質を精製した。精製したタンパク質はタンパク質分解酵素によってペプチドへと消化後、脱塩および濃縮処理を行い、質量分析に適した形へ調製した。

質量分析器による基質の同定：前項目で精製したオフターゲット評価サンプルおよび PROTAC/SNIPER 依存性結合分子評価サンプルを、液体クロマトグラフィーと連結したタンデム質量分析計にて網羅的な測定を行った。得られたオフターゲット基質同定用の測定データは配列データベース検索ソフトウェアによってユビキチン化ペプチドと帰属するタンパク質を同定した。偽陽性を排除するために別種のユビキチンリガーゼプローブで行った解析データと比較し、頻繁に誤同定されるユビキチン化ペプチドを排除し、さらに PROTAC/SNIPER 処理時と非処理時、または PROTAC/SNIPER かつプロテアソーム阻害剤併用処理時とプロテアソーム阻害剤単独処理時を比較することで PROTAC/SNIPER オフターゲット基質候補をリスト化した。PROTAC/SNIPER 依存性結合分子評価用の測定データについても、配列データベース検索ソフトウェアによってペプチドと帰属するタンパク質を同定した。偽陽性を排除するために別種のユビキチンリガーゼプローブで行った解析データと比較し、頻繁に誤同定されるペプチドを排除し、さらに PROTAC/SNIPER 処理時と非処理時を比較することで PROTAC/SNIPER 依存的に結合する分子をリスト化した。

(3) 同定 PROTAC/SNIPER 標的タンパク質の妥当性評価

ウエスタンブロット法による評価：PROTAC 処理群、非処理群、プロテアソーム阻害剤単独処理群、PROTAC/プロテアソーム阻害剤併用処理群のウエスタンブロット解析を行い、PROTAC による分解量の評価を行った。さらに、PROTAC/SNIPER 依存性結合分子評価用プローブ導入細胞溶解液を用いて、PROTAC 処理群/非処理群に分けて抗体で免疫沈降を行い、予めユビキチンリガーゼに結合しているタンパク質、PROTAC 処理によって結合量が増加するタンパク質について、ウエスタンブロット解析を行い検証した。

ユビキチン化アッセイによる妥当性の評価：野生型細胞株を用いて各条件で回収後、ユビキチン化タンパク質の免疫沈降を行った。基質候補抗体を用いて標的タンパク質候補分子のユビキチン化が PROTAC 処理によって増加するかどうかを検証した。

一連の解析の結果、オフターゲット基質を評価するための薬剤処理、可溶化処理、サンプル調製、測定方法など各種条件を最適化し、解析系を確立した。実際に、いくつかの PROTAC/SNIPER についてオフターゲット基質を同定している。また、プロテアソームによって分解を受ける基質と、分解を受けない基質について、それぞれ別の条件で解析する必要性を見出しその手順を作成した。さらに、PROTAC/SNIPER 依存性結合分子の評価を加えることで、オフターゲット基質群の層別化プロトコルを作成した。

研究開発の意義

本研究により、PROTAC/SNIPER 製剤が結合またはユビキチン化する標的外のタンパク質を網羅的かつ迅速に予測する評価系を確立した。本研究開発では、PROTAC/SNIPER 製剤で頻用されるユビキチンリガーゼに対応した基質同定プローブの作製と、このプローブを安定に発現する細胞株の樹立を行った。これは安全性薬理試験において利用可能なリソースとなり、企図しない毒性を未然に排除するための情報を取得する有力なツールとなる。例えば、細胞の生存に必須なタンパク質やドライバーがん抑制遺伝子産物がオフターゲット基質に含まれているかどうかを検討することが可能となる。さらに毒性試験や臨床試験で有害事象が認められた場合、作用メカニズムを検討する際に重要な基礎データとなる。また、開発途上の PROTAC 製剤もこの細胞株に投与することで速やかにオフターゲット基質の評価を行うことができるため、基礎研究のスクリーニング段階においても活用が期待できる。構造情報と合わせることで、オフターゲット基質を避け、標的としていた基質のみに作用可能な PROTAC/SNIPER 製剤へと修正するための基盤となる。

Recently, PROTAC (PROteolysis Targeting Chimeras, proteolysis-inducing chimeric proteins) or SNIPER (Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protei(n)dependent Protein Eraser) (hereinafter collectively referred to as PROTAC/SNIPER) has attracted attention as a new modality for difficult-to-treat diseases. PROTAC/SNIPER is a ligand that binds to target proteins, ligand for binding to the ubiquitin ligase, and a cross-linker connecting the two terminal ligands. This allows PROTAC/SNIPER to simultaneously bind to the target protein and the ubiquitin ligase, leading to polyubiquitination of the target and proteolysis by the proteasome system. PROTAC/SNIPER has attracted much attention for its promise as a new drug modality, but because of its novelty, safety evaluation is an important issue, especially the possibility of toxicity due to degradation of off-target proteins (off-target substrates). This study aimed to establish an evaluation system for PROTAC/SNIPER off-target proteins by applying a novel method for identifying ubiquitinated substrates.

(1) Establishment of cell lines stably expressing probes for off-target evaluation

Five types of ubiquitin ligase genes frequently used in PROTAC/SNIPER were obtained, and ubiquitin ligase probes for capturing substrates were incorporated on retrovirus expression vectors. Two types of probes were produced for each gene, yielding a total of 10 probe plasmids. This method requires stable expression of the probes in cells. Retroviruses were generated using the probe vector, and cell lines stably expressing the probe were established.

(2) Identification of PROTAC/SNIPER target proteins using established cell lines

Using the cells prepared in the previous section, we examined conditions such as PROTAC/SNIPER treatment concentration, treatment time, and use of proteasome inhibitors based on Western blot analysis using antibodies against known substrates. A protocol was developed to perform mass spectrometry for off-target evaluation. Cell lines established under the conditions determined in the previous section were treated with drugs, and the ubiquitinated proteins were purified. The purified off-target evaluation samples were comprehensively measured by mass spectrometer.

(3) Validation of identified PROTAC/SNIPER target proteins

Western blot analysis of PROTAC-treated, non-treated, proteasome inhibitor alone, and PROTAC/proteasome inhibitor combination treated groups was performed to evaluate the amount of degradation by PROTAC. Immunoprecipitation of ubiquitinated proteins was performed under each condition using wild-type cell lines. Using candidate substrate antibodies, we tested whether ubiquitination of candidate target protein molecules was increased by PROTAC treatment.

As a result of a series of analyses, actual off-target substrates were identified for several PROTAC/SNIPERs. In addition to establishing an off-target evaluation system, we developed a protocol for stratification of off-target substrate groups.

Through this research, we have established an evaluation system that comprehensively and rapidly predicts off-target proteins which PROTAC/SNIPER ubiquitinate. In this study, we generated substrate identification probes corresponding to ubiquitin ligases frequently used in PROTAC/SNIPER and established cell lines that stably express these probes. This should enable the elimination of unintended toxicity in safety pharmacology studies. In addition, PROTAC products under development can be administered to this cell line for rapid evaluation of off-target substrates, and thus can be expected to be utilized in the screening phase of basic research.