日本医療研究開発機構　　創薬基盤推進研究事業
事後評価報告書

Ⅰ 基本情報

研究開発課題名： 動物試験で検出困難な毒性を予測するオフターゲット評価法の確立
—リスク分子にフォーカスしたターゲットプロテオミクス解析—
Establishment of an Off-target Evaluation System for Crucial risk Associated molecules using targeted ProtEomics (Off-ESCAPE)

研究開発実施期間：令和 4 年 4 月 15 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：井上 貴雄
Takao Inoue

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長
Head, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Scienes

II 研究開発の概要

1. 研究目的

siRNA 医薬やタンパク質分解医薬に代表されるノックダウン型のモダリティは、標的分子の認識において種特異性が高いことから、動物を用いた非臨床試験のみでは毒性発現を予測することが困難である。このことから臨床試験において初めて毒性が生じる可能性があり、開発中止のリスクや被験者の安全性確保の観点から懸念が持たれている。これを回避するためには、ヒト由来の細胞/組織を用いてオフターゲット作用を評価する系が必要と考えられる。RNA を標的とする核酸医薬については、マイクロアレイ等を用いた網羅的な遺伝子発現変動解析によりオフターゲット評価が可能であるが、mRNA の変動を評価するマイクロアレイでは、翻訳抑制の機序を有する siRNA やタンパク質を直接分解するタンパク質分解医薬などのオフターゲット作用は評価できない。また、タンパク質の発現変動を評価する従来のプロテオミクスの手法では高発現のタンパク質しか検出できないという課題がある。すなわち、タンパク質レベルでオフターゲット作用を評価する手法は現状では存在せず、難治性疾患への適用が期待される新規モダリティの安全性確保が困難な状況にある。

タンパク質レベルでオフターゲット作用を評価する手法としては、タンパク質の量の変動を解析するプロテオミクスの適用が考えられるが、これまで汎用されてきたショットガンプロテオミクスの手法では、相対的に発現量の多い数千のタンパク質しか検出できないことが知られている。これに対し、近年では、各タンパク質に固有の安定同位体標識ペプチドを合成し、これを内部標準として用いることで、数十から数百のタンパク質に限定して高感度かつ高精度な定量分析を行うターゲットプロテオミクスの技術開発が進んでいる。すなわち、特定のタンパク質群に限定すれば、低発現であっても正確に発現変動を捉えることが可能である。

以上の背景を踏まえ、本研究では「リスク分子にフォーカスしたプロテオミクス応用型オフターゲット評価法（Off-target Evaluation System for Crucial risk Associated molecules using targeted ProtEomics：Off-ESCAPE 法）」を新たに確立することを目的とし、以下の研究を実施し完了した。

1. 内部標準ペプチドの選定スキームを構築すると共に、定量精度および解析可能なタンパク質数の明確化などプロテオミクス技術をオフターゲット評価法として応用するために必要な基盤データを取得する。

2. 「1」を踏まえ、200 の毒性リスク分子の発現変化を定量解析するプロテオミクス応用型オフターゲット評価系（Off-ESCAPE 法）を確立する。

以下に、研究成果を概括する。

2. 研究成果

（1）内部標準ペプチドの選定スキームの構築と Off-ESCAPE 法の確立

ターゲットプロテオミクスによるタンパク質の定量おいては、各タンパク質に固有の安定同位体標識内部標準ペプチドを選定・合成し、ヒト培養細胞由来のタンパク質が夾雑する条件において、内部標準ペプチドとしての適切性をひとつひとつ検証する必要がある。本研究では、臨床試験では評価できない毒性に関連する分子（研究開発項目 3 参照）を対象に、合計 268 分子に対する内部標準ペプチド（合計 748 本）を設計・合成し、それぞれの質量分析メソッドを構築した。また、それぞれの内部標準ペプチドについて、ヒト由来細胞（HEK293 細胞）のライセートを用いて適切性の検証を行った。これにより内部標準ペプチドの適切性が確認された 206 分子に対して、タンパク質レベルで発現変動を評価する定量系を確立した。

（2）Off-ESCAPE 法の定量精度等の検証

適切な内部標準ペプチドが決定できた 174 ペプチドをモデルとして、構築した解析系（Off-ESCAPE 法）の定量精度の検証を行い、変動係数（CV 値）が 15%未満のペプチドの割合が 96.6%、平均 CV が 5.1%であることを示した。また、適切性を確認した内部標準ペプチドについて、繰り返し検証を行い、再現性よく内在性タンパク質を定量できることを確認した。ターゲットプロテオミクスを用いたオフターゲット評価系は新規の評価系であるため、定量精度等の妥当性を示した指針は存在しないが、位置付けが近いと考えられるバイオアナリシス（生体試料中に存在する特定の分子の定量）のガイドラインにおいては、「定量精度の変動係数：15%以下」の基準が示されている。これをひとつの指標と考えると、Off-ESCAPE 法は上記のデータから精度の高い評価系であると考察される。

本研究ではさらに、代表的なタンパク質分解医薬であるサリドマイドの誘導体を用いた解析から、薬効に関わるオンターゲット分子（BRD4）の発現抑制とともに、催奇形性の原因となるオフターゲット分子（SALL4）の発現抑制を同時に検出できることを示した。この結果は、動物試験（げっ歯類）では評価できなかったサリドマイドの催奇形性を、Off-ESCAPE 法を用いることで予測できることを実証するものである。

（3）Focused リスク分子の選定

リスク分子の選定に当たっては、「被験者・患者の安全性確保の観点から特に重要性が高いと考えられるリスク分子（Focused リスク分子）」を産学官で協議し、臨床試験では評価できない毒性（長期投与

で初めて発現する毒性）に関連する分子、被験者の安全性確保の観点から、臨床試験開始前に確認しておくべき毒性に関連する分子を対象とすることを決定した。また、Off-ESCAPE 法で対象とする Focused リスク分子の選定に関しては、製薬協と共同で関連する文献及びデータベースを調査し、臨床試験では評価できない毒性関連分子については 286 分子、臨床試験開始前に確認しておくべき毒性関連分子については 55 分子を Focused リスク分子として選定することを決定した。

3. 今後の課題と方向性

上述のとおり、本研究では達成目標を上回る 206 のリスク分子について、タンパク質レベルで発現変動を高精度に評価する定量法（Off-ESCAPE 法）を確立することに成功した。さらに、サリドマイド誘導体を用いた解析から、薬効に関わるオンターゲット分子の発現抑制とともに、催奇形性の原因となるオフターゲット分子の発現抑制を同時に検出できることを示した。この結果は、動物試験（げっ歯類）では評価できなかったサリドマイドの催奇形性を Off-ESCAPE 法を用いることで予測できることを示すものである。

以上のとおり、Off-ESCAPE 法が毒性発現種差の大きい新規モダリティの毒性発現を予測する評価技術として有用であることを実証したが、今後 Off-ESCAPE 法を社会実装するためには、解析対象とするリスク分子を拡大し、研究開発項目 3 で選定した「341 の Focused リスク分子（286 の臨床試験では評価できない毒性関連分子+55 の臨床試験開始前に確認しておくべき毒性関連分子）」のすべてについて、Off-ESCAPE 法を用いた評価を可能にする必要がある。そのため、本研究で「定量系を構築できなかった Focused リスク分子」について、本研究から顕在化した「定量系を確立できない複数の理由」の精査に基づき、これらの課題を克服するための研究を体系的に実施する。これにより、Focused リスク分子のすべてを包括した Off-ESCAPE 法を確立し、その社会実装を実現する。

Knockdown-type therapeutic modalities, such as small interfering RNA (siRNA) drugs and protein degraders, have gained attention for their potential to target previously undruggable molecules. However, due to their high species-specificity in recognizing target molecules, predicting human-specific toxicities using conventional animal-based non-clinical studies remains a major challenge. This raises the possibility that unexpected toxicities may first become apparent during clinical trials, posing serious risks both to the safety of trial participants and to the continuation of drug development. To address these concerns, it is essential to establish evaluation systems that can assess off-target effects using human-derived cells or tissues.

For nucleic acid-based therapeutics that act at the RNA level, off-target evaluation can be conducted using comprehensive gene expression profiling techniques such as microarrays. However, these approaches are limited to assessing mRNA changes and are therefore inadequate for evaluating modalities that suppress protein expression via translational repression (e.g., siRNA) or directly degrade proteins (e.g., protein degraders). Moreover, conventional proteomics techniques, particularly shotgun proteomics, are limited in sensitivity and typically detect only high-abundance proteins. As a result, a method for reliably assessing off-target effects at the protein level has yet to be established, complicating the safety evaluation of next-generation modalities aimed at treating intractable diseases.

To overcome this limitation, this study sought to develop a novel off-target evaluation method based on targeted proteomics, termed the “Off-target Evaluation System for Crucial risk Associated molecules using targeted ProtEeomics” (Off-ESCAPE). This approach leverages stable isotope-labeled internal standard peptides to enable high-sensitivity and high-precision quantification of specific protein expression changes. A total of 748 internal standard peptides were designed and synthesized for 268 toxicity-related proteins, focusing on those associated with toxicities that are difficult to detect in clinical trials. Each peptide’s suitability as an internal standard was assessed in human-derived HEK293 cell lysates, resulting in the successful validation of 206 proteins for quantitative analysis at the protein level.

The performance of the Off-ESCAPE system was further evaluated using 174 peptides that passed rigorous quality checks. Quantitative precision analysis demonstrated that 96.6% of the peptides had coefficients of variation (CV) below 15%, with an average CV of 5.1%. While no formal regulatory guidelines exist for this specific application, these values meet the standards generally applied in bioanalytical quantification, indicating the system’s high reliability. Additionally, by analyzing a thalidomide derivative—a representative protein degrader—the system successfully detected the suppression of both the on-target protein BRD4 and the off-target teratogenic risk protein SALL4. This finding highlights the ability of Off-ESCAPE to predict human-specific toxicities, such as thalidomide-induced teratogenicity, which are undetectable in conventional rodent studies.

The selection of target proteins for Off-ESCAPE was based on discussions among stakeholders from academia, regulatory bodies, and industry. A set of "Focused risk molecules" was identified, encompassing two categories: (1) 286 proteins linked to toxicities that are difficult to evaluate during clinical trials, and (2) 55 proteins considered critical for preclinical safety assessment. Literature and database reviews conducted in collaboration with the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) supported the selection process.

Through this research, a quantitative proteomic system capable of precisely evaluating expression changes in 206 risk-associated proteins was successfully established. Moving forward, to enable broader implementation, further development will focus on extending the Off-ESCAPE system to cover all 341 Focused risk molecules. This includes resolving technical challenges that prevented quantification of certain

targets during the current study. Ultimately, establishing a comprehensive Off-ESCAPE platform encompassing all critical risk proteins will facilitate its practical application in evaluating the safety of novel therapeutic modalities.