

プロジェクト名：フローサイトメーターと蛍光共鳴エネルギー移動・蛍光寿命計測型バイオプローブによる創薬の細胞基盤アッセイ系の開発

代表者：鈴木美穂（理工学研究科・助教）

1 緒言

創薬において初期薬剤ライブラリーからバイオチップ・アレイを用いて疾病標的との相互作用などで絞られた中期リード化合物は細胞での薬効、副作用の検討、動物での薬効、副作用、薬物動態の検討、さらに絞られた後期薬剤候補はヒトでの臨床試験へと進まなければならない。ここで迅速にスクリーニングが行われることが求められる。しかしながら、バイオチップと動物を結ぶ細胞基盤のアッセイ系は技術開発が遅れており、整合性に困難を抱えている。昨年度、蛍光共鳴エネルギー移動を作用原理とする蛍光共鳴エネルギー移動・蛍光寿命計測型バイオプローブ（生体内動態モニター分子）を用い細胞基盤アッセイ系の検討を行った。作製したバイオプローブの特長は 1：生体試料の形態を問わず（精製酵素、血液、生細胞、動物等）2：複数の生体内動態を同時にモニター出来る事、であるため、迅速なスクリーニング、バイオチップや動物を結ぶ整合性を適える。そこへハイスループット細胞解析可能装置であるフローサイトメーターを導入した。共同研究先の三井造船（株）が開発したフローサイトメーターは蛍光強度及び寿命計測機能を搭載している。生体内の微量な変化を定量的に捉えるためにバイオプローブには精度、感度が求められるが、蛍光寿命計測は微量変化の定量計測に優れている。昨年度は既知の抗癌剤による細胞応答に最適な bioprobe の検討、それらにより抗癌剤の時間応答を検討した。本年度プロジェクトでは、抗癌剤の種類、濃度、処理時間と細胞応答を詳細に検討する。

2 材料と方法

HeLa 細胞、Jurkat 細胞

FRET bioprobes：標的酵素 caspase-9 用 6 種

Cas9(I)、Cas-9 (I)-A532、Cas9 (I)-D680、Cas9(II)、Cas9(II)-A532、Cas9 (II)-A750

FRET bioprobes：標的酵素 caspase-3 用 3 種

Cas3、Cas3-A532、Cas3-A750

三井造船開発 蛍光寿命計測機能搭載フローサイトメーター：Flicyme

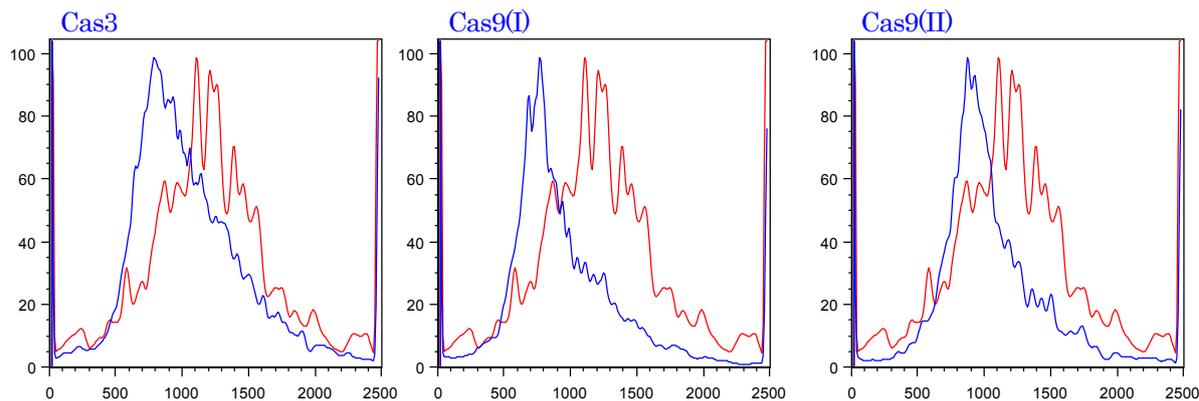
抗癌剤：cycloheximide、TNF- α

- 1) タンパク質導入試薬により細胞に bioprobe を導入（4時間）。未導入の細胞も用意。
- 2) 過剰な BioPORTER と bioprobe 或いは蛍光タンパク質を洗浄。
- 3) 既知抗癌剤の種々の濃度（抗癌剤フリーも含む）にて細胞死誘導処理（5.0時間）。
- 4) すべての細胞を回収。
- 5) Flicymeにて蛍光計測。
- 6) 抗癌剤濃度依存細胞死誘導の蛍光寿命変化を解析（HeLa 細胞）。Bioprob 導入、未導入の細胞群の蛍光寿命の比較検討（Jurkat、HeLa 細胞）。

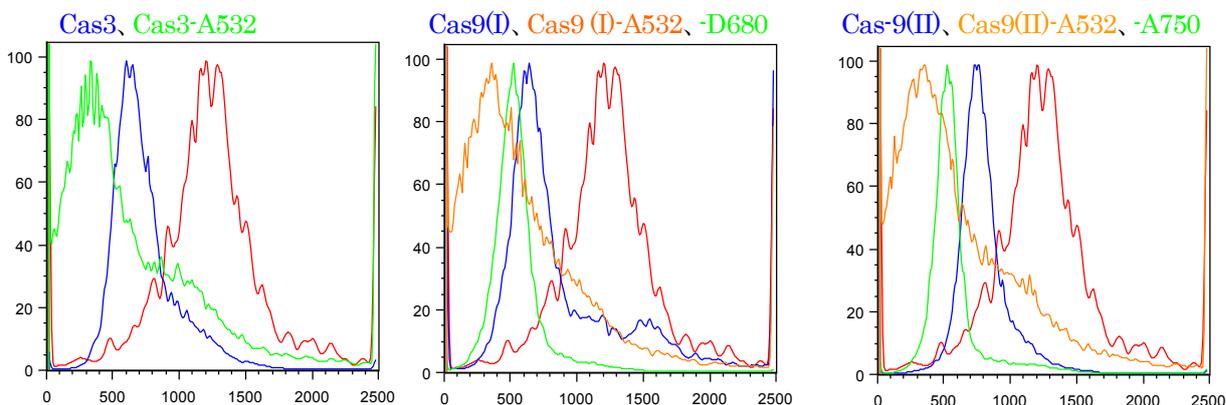
3 結果と考察

3-(1) 細胞毎 bioprobe、蛍光タンパク質導入、未導入細胞群の蛍光寿命の比較

Jurkat 細胞

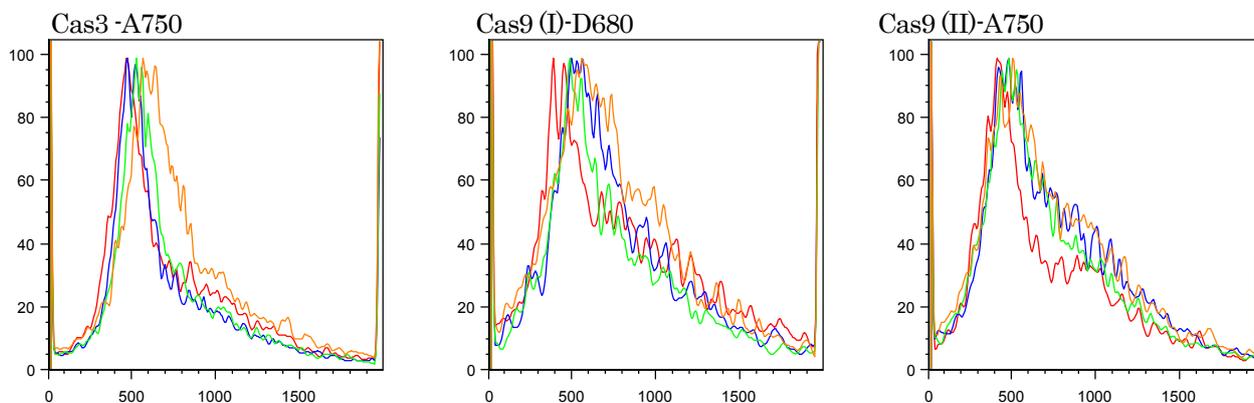


HeLa 細胞



赤：未導入細胞群

3-(2) HeLa 細胞への抗癌剤濃度依存性細胞死誘導の比較



抗癌剤 2 種の組み合わせ濃度 0 ⇒ low ⇒ medium ⇒ high

Jurkat 及び HeLa 細胞への Cas3、Cas9(I)、Cas9(II)の導入では細胞により蛍光寿命分布の若干の違いが見られるが、bioprobe 自身のロットによる可能性もあり、今後精査しなければならない。ただし、創薬のための細胞基盤アッセイ系としては各々のロット由来の bioprobe 導入、薬剤処理による比較を行うためロット差は相殺される。また、抗癌剤濃度依存性細胞死誘導の比較では Cas9 を標的とする bioprobe は濃度が低い段階でも応答し、濃度が上昇しても応答が飽和している様である。一方 Cas3 を標的とする bioprobe は高い濃度の薬剤に対し応答が見られた。これはこれまでの知見である細胞死誘導の早い段階では caspase-9 活性が惹起され、その後細胞死確定の段階に至ると caspase-3 が活性化されることと合致している。これよりこのアッセイ系は細胞基盤抗癌剤スクリーニングのモデル系の可能性が示された。

4 結語

蛍光共鳴エネルギー移動・蛍光寿命計測型バイオプローブによりフローサイトメーターを用いた抗癌剤の濃度依存細胞応答の検出が行えた。これまで時間応答を済ませており、これらをまとめたものは国際会議にて、創薬のための細胞基盤アッセイ系として評価も受けた。細胞種、抗癌剤種の幅を広げ、より一般化したものとして、製薬業界にアピールする予定である。