

# Using Protease Biomarkers To Measure Viability And Cytotoxicity

## 細胞生存性と細胞毒性の測定を目的としたプロテアーゼバイオマーカーの利用

By Andrew Niles<sup>1</sup>, Michael Scurria<sup>2</sup>, Laurent Bernad<sup>2</sup>, Brian McNamara<sup>1</sup>, Kay Rashka<sup>1</sup>, Deborah Lange<sup>1</sup>, Pam Guthmiller<sup>1</sup> And Terry Riss<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Promega Corporation, <sup>2</sup>Promega Biosciences, Inc.

### イントロダクション

培養細胞の生存性や毒性を測定するバイオマーカーはこれまでもいくつか報告されており、利用されているものもありますが、いずれも技術的な問題点を抱えているのが現状です。このほど弊社は、細胞生存性と細胞毒性に関連する2つの新しいバイオマーカーの特性を明らかにしました。このような特性により、従来のアッセイが抱える化学的制約の多くを回避でき、マルチプレックスアッセイが格段に行いやすくなります(1)。これら2つのマーカーは細胞死または細胞生存性に関連するタンパク質分解活性を持っており、マルチプレックスアッセイ(単一の発光基質を用いた連続測定、発光基質と蛍光基質の併用、2種類の蛍光基質の併用)に利用することができます(2-4)。これらのマーカーを用いるアッセイでは、使用するフォーマットにかかわらず広いダイナミックレンジとすぐれた直線性が得られ、高密度なフォーマットでも従来にない感度を実現できます(図1)。

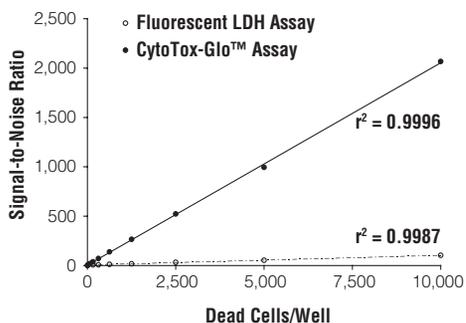
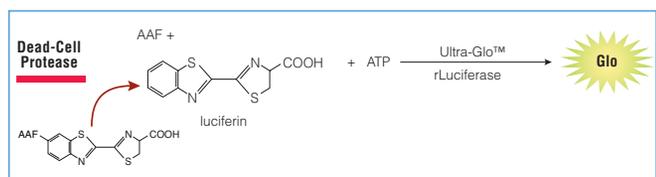
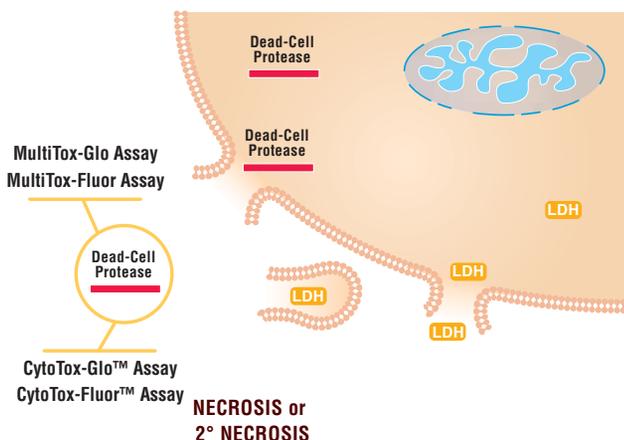


図1. CytoTox-Glo™ Assayは感度が高いため、わずかな細胞生存性の変化でも検出できる。

この図はCytoTox-Glo™ Assayが蛍光LDHアッセイに比べてシグナル/ノイズ比にすぐれていることを示している。

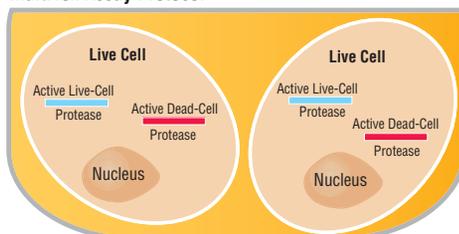


CytoTox-Glo™ Assay Chemistry.

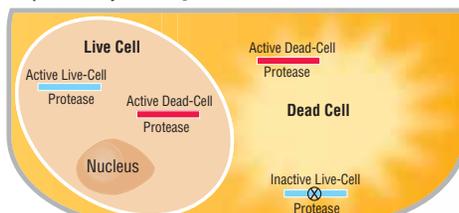
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assayはもっとも感度が高い細胞毒性測定法です。

このアッセイでは、細胞膜の完全性が損なわれることによって漏出した細胞内プロテアーゼ(死細胞由来のプロテアーゼ)の活性を細胞外で測定します。

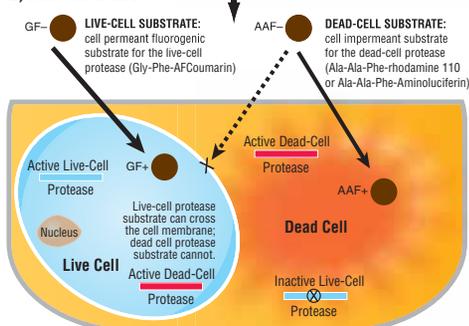
### MultiTox Assay Protocol



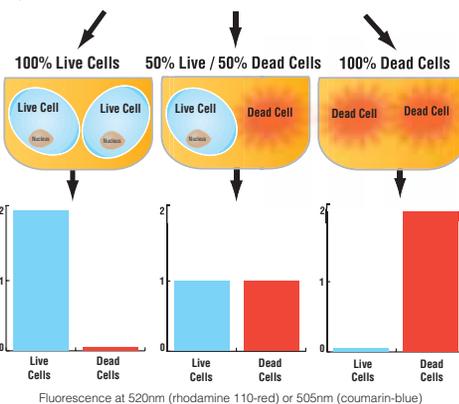
1) Treat cells with the potential cytotoxic agent.



2) Add substrates.



3) Measure fluorescence/luminescence.



MultiTox Assayは、2つの異なるプロテアーゼバイオマーカーを用いた検出法により生細胞数と死細胞数の双方を1つのウェル内で定量することができます。2つの細胞生存性パラメーターを同一ウェル内で測定することにより、ばらつきの原因が抑えられ、一貫性の高いデータを得ることができます。

## 細胞生存性と細胞毒性の測定を目的としたプロテアーゼバイオマーカーの利用

**検証課題①：細胞毒性以外の刺激に影響を受けることなく生細胞と死細胞を相対的に識別できる細胞生存性と細胞毒性の酵素バイオマーカーの発見。**

**実験：**恒常的に機能を有するプロテアーゼに絞ってペプチドベースのプロテアーゼ活性スクリーニングを行った。既知の誘導性プロテアーゼ（カスパーゼ、グランザイム、カルパイン、トリプターゼなど）の基質はカウンタースクリーニングまで使用しなかった。限界希釈法により各被験蛍光基質を生細胞と死細胞の希釈系列に添加し、生細胞と死細胞を選別できるかどうか検討した。

**結果：**細胞ベースのスクリーニングにより2つのタンパク質分解プロファイルが浮かび上がった（表1）。

- Gly-Phe-AFCを使用した場合には生細胞に限定される活性が測定された。この活性は特定のアミノペプチダーゼによるものと思われ、同数の死細胞存在下では酵素の不安定性のため活性が著しく低下した。
- Ala-Ala-Phe-AMCを使用した場合には死細胞に限定される活性が測定された。この活性も生体に広く分布するアミノペプチダーゼに起因する可能性が高く、他の蛍光（rhodamine 110）や発光性の検出基を導入した基質でも検出された。

**結論：**上記の活性はどちらも細胞膜の完全性に依存しており、プロテアソーム阻害やカスパーゼ誘導といったその他の外部刺激には依存しない（これらの処理によって二次的ネクロシスが引き起こされるまで）。

表1. 一次スクリーニングにおいて種々の基質により得られたシグナル

基質	生存性	毒性
Z-XXX-AMC	None*	None
Z-XXXX-AMC	None	None
Z-XXXXX-AMC	None	None
GF-AMC	+++	None
GF-AFC	+++++	None
bis-GF-R110	None	None
AAF-AMC	None	++
bis-AAF-R110	None	+++++
AAF-aminoluciferin	None	+++++
X-AMC	+	None
XX-AMC	+	None

\*None：コントロールに比べ統計的に有意な活性が無い。

＋：反応の相対強度。

X：基質のアミノ酸残基数。

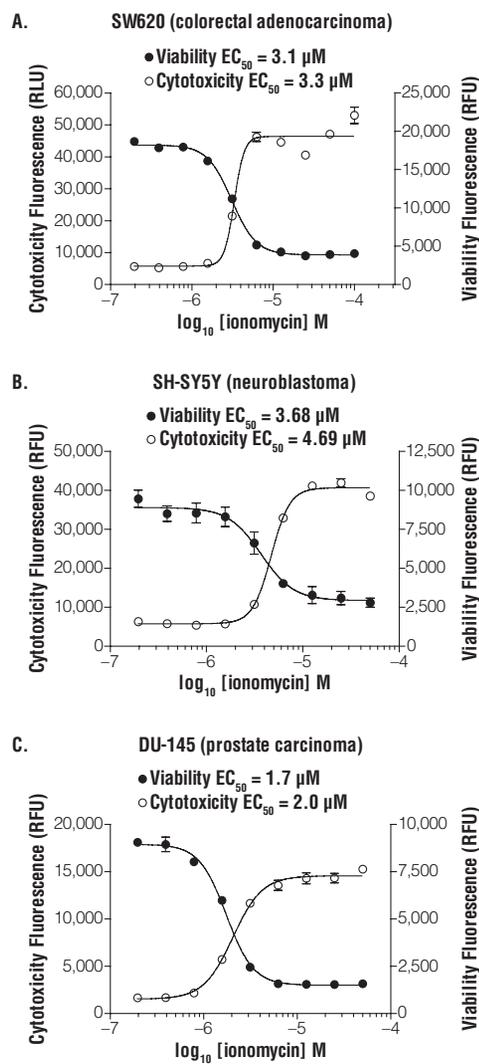


図2. 細胞生存性と細胞毒性の力価プロファイルが様々な細胞種で容易に得られる。

**検証課題②：細胞毒性と細胞生存性を測定することのできる高度に保存された普遍的マーカーの発見。**

**実験：**National Cancer Institute-60(NCI-60) パネルに含まれる多様な細胞株を用いて、それらの細胞に弊社の新しいタンパク質分解性バイオマーカーが存在するか否かを検討した（図2にヒトの結腸、神経、前立腺の結果を示す）。このパネルには、血液、脳、結腸、乳房、皮膚、卵巣、前立腺、肺、腎臓の組織に由来する細胞株が含まれる。

**結果：**下記の知見が得られた。

- 試験したすべての細胞株において、“生細胞”プロテアーゼと“死細胞”プロテアーゼの両方が細胞生存性や細胞毒性の定量を行うのに十分な濃度で含まれていた（限界希釈法による生細胞と死細胞の検出感度は200細胞未満）。
- 細胞株間で2種類のプロテアーゼマーカーの活性比にわずかなばらつきが認められ、細胞体積に応じて概ね正の相関を示した。

**結論：**これらの細胞生存性・細胞毒性アッセイで用いるタンパク質分解性バイオマーカーは、ヒト細胞株や非ヒト哺乳動物細胞株（データ未掲載）で検出された。

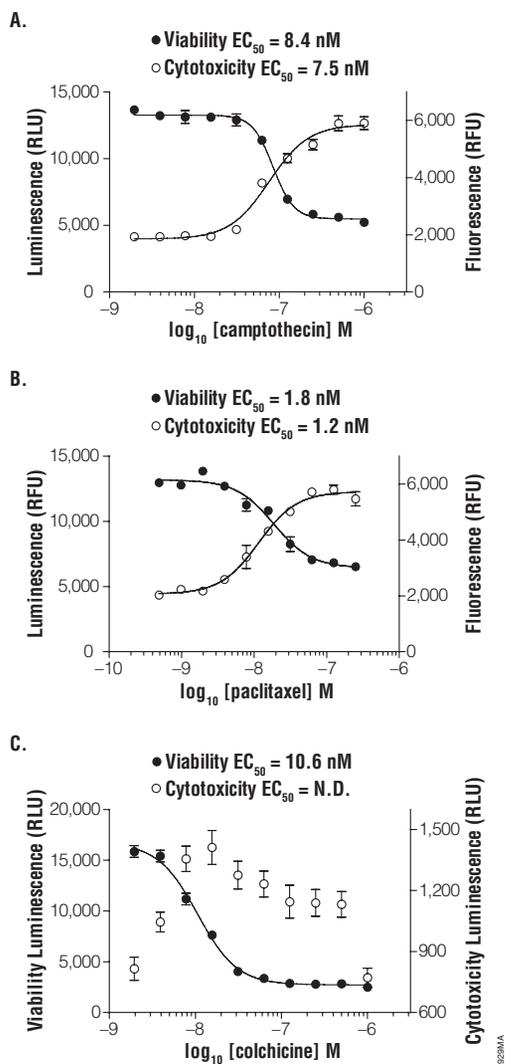


図3. これらのプロテアーゼベースのアッセイにより、様々な被験化合物に関して適切な $IC_{50}$ 値が得られる。

**検証課題③：細胞生存性を正確に評価する上で、妥当な時間枠において培養中でも十分な安定性を有するマーカーの発見。**

**実験：**数種類の標準的な細胞毒性誘導化合物を幅広い希釈系列で24時間～48時間暴露した場合の作用について検討した。

**結果：**下記の知見が得られた。

- “生細胞”マーカーには半減期の制約はなく、正確な細胞生存性/力価の決定に関して通常2本の漸近線が得られる。
- より長いインキュベーションにともなう“死細胞”プロテアーゼマーカーの検出能は、細胞死のカインेटクスに強く依存する。

**結論：**バイオマーカーの分解に起因する細胞毒性の過小評価を考慮に入れなければならないが、長時間のインキュベーションを伴う場合の本バイオマーカーの有用性は、細胞死のカインेटクスやメカニズムに影響される。このような問題は、最初の化合物濃度を低下させたり培養時間を短縮したりすることによって解決できる場合が多い(図3)。

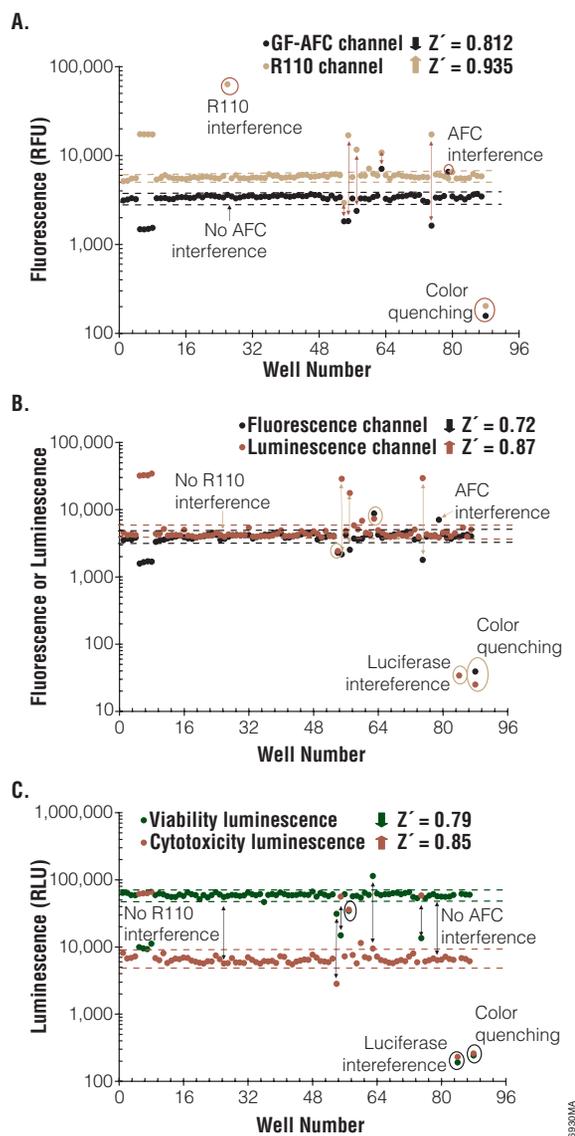


図4. これらのプロテアーゼベースのアッセイは様々なフォーマットに柔軟に適用できるので、化合物による干渉の大部分を回避することができる。

**検証課題④：化合物の干渉を抑え、様々なフォーマットで優れた性能を発揮するアッセイの開発。**

**実験：**弊社のプロテアーゼバイオマーカーの性能を、蛍光マルチアッセイ (MultiTox-Fluor Assay)、発光/蛍光マルチアッセイ (MultiTox-Glo Assay)、発光アッセイ (CytoTox-Glo™ Assay) を用いた3種類の細胞毒性測定フォーマットで検討した。これらのアッセイを、着色消光や波長特異的な蛍光・発光干渉を起こすことが知られている化合物で構成した模擬ライブラリーを用いて比較した。さらに、1ウェルあたりの播種細胞数や細胞生存率を変化させた。

**結果：**3つのフォーマットはいずれも細胞毒性に関しては同等の性能を示したが、化合物の干渉に関しては差が見られた(図4)。

- 3つのフォーマットはいずれも細胞毒性存在下においてコントロールに対して同等の細胞生存性と細胞毒性の変化を示した。
- 3つの化学反応はコントロールウェルに対するシグナルの強弱によってフラグが付けられた(アッセイ阻害に対する警告)。

表2. 細胞生存性/細胞毒性マルチプレックスアッセイのスクリーニングにおける特長

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay
1液添加	2液添加	2液添加
非溶解性	非溶解性	溶解性 (第2ステップ)
96, 384, 1536-プレート形式	96, 384, 1536-プレート形式	96, 384, 1536-プレート形式
既知蛍光阻害の回避	未知ライブラリーでの優れたヘッジ機能	蛍光阻害の回避
他の蛍光アッセイとのマルチプレックス可	発光法による増感	発光法による増感
問題のあるデータポイントに対する警告	問題のあるデータポイントに対する警告	問題のあるデータポイントに対する警告

- 蛍光干渉がAFCチャンネルまたはR110チャンネルの片方で生じたが、両方で生じることはなかったため、データポイントの“フラグ付け”として役立つ。発光はどちらにも影響を受けなかった。
- ルシフェラーゼ阻害剤で蛍光干渉が生じたが、その他の蛍光化合物では生じなかった。蛍光はルシフェラーゼ阻害剤による影響を受けなかった。
- 試験した退色剤は蛍光フォーマットと発光フォーマットの双方において負の影響を及ぼしたが、二重測定によって、影響を受けたデータポイントの“フラグ付け”が可能となる。

**結論:** 3つのアッセイはいずれも潜在的なアッセイ干渉に対して“フラグを付ける”能力に関し一長一短がある (表2)。

## 要約

弊社ではプロテアーゼをバイオマーカーとする高感度で頑健な定量法を複数ご用意していますので、ご利用の化学物質ライブラリー、処理方法、望ましいエンドポイントに適したアッセイをお選びいただけます。高度に保存された恒常的に存在するマーカーを採用していますので、細胞生存性と細胞毒性の変化を識別する用途に活用できます。最後に、検出プラットフォームの柔軟性が高いため、研究者はマルチアッセイの特性とスループットを両立させることができ、データの質も向上させることができます。

## 参考文献

1. Niles, A. *et al.* (2007) *Anal. Biochem.* **366**, 197–206.
2. Niles, A. *et al.* (2006) *Cell Notes* **15**, 11–5.
3. Niles, A. *et al.* (2006) *Cell Notes* **16**, 12–5.
4. Niles, A. *et al.* (2007) *Cell Notes* **18**, 15–20.

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9270	27,000
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9200	27,000
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9290	15,000
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9260	15,000
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080	15,000

- 上記以外のサイズおよびバルク注文についてはお問い合わせ下さい。