

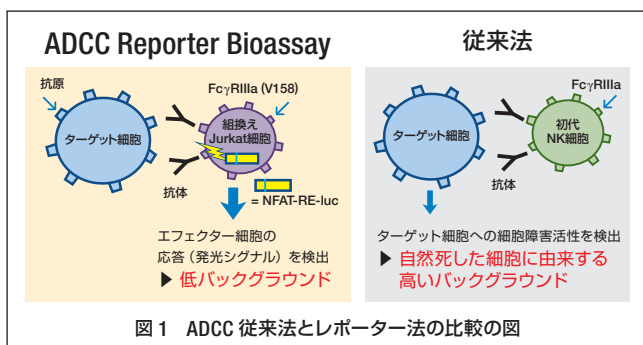
## これから創薬を始める方へ [Vol. 7] ～ バイオアッセイを支えるレポーターアッセイ ～

レポーターアッセイと言えばどんなアッセイをイメージしますか？ほとんどの方はプロモーター解析を挙げるといいます。それくらいレポーターアッセイはプロモーター解析手法として、またプロモーター解析から派生したシグナル応答配列の解析手法として広く使用されてきました。そのおかげで現在では哺乳動物、とくにヒト、マウスプロモーター解析が進み、主なシグナル経路の応答配列が解明されています。

プロモーター解析が済んでしまったら、レポーターアッセイはもう使えないのでしょうか？そんなことはありません。プロモーター活性以外にも、レポーター融合タンパク質を利用したタンパク質安定性アッセイやレポーター発現細胞を使った *in vivo* イメージングなど、タンパク質や細胞の存在を示すレポーターとしても広く使用されるようになりました。その中でもシグナル経路活性化センサーとしてレポーターアッセイを利用するバイオアッセイが次々と開発され、サイトカインなどの生理活性物質や抗体医薬品の効果、また炎症反応を起こす化合物やダイオキシンなどの生体に影響を与える物質の検出、評価に使用されています。ここではレポーターアッセイ利用の例として、① ADCC アッセイ、②炎症反応検出アッセイ（皮膚感作性試験）をご紹介します。

### ① ADCC アッセイ

抗体医薬品評価法の一つに Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) アッセイがあります。これまで抗体の ADCC 活性の有無や力価を調べるアッセイは非常に煩雑かつ結果が不安定であったため、ADCC 活性を抗体医薬品の作用として評価できないという問題がありました。この点を克服すべく開発された新たな ADCC Reporter Bioassay により、アッセイの簡便化と再現性向上が実現し、実際の抗体医薬品評価に使用できるようになりました。

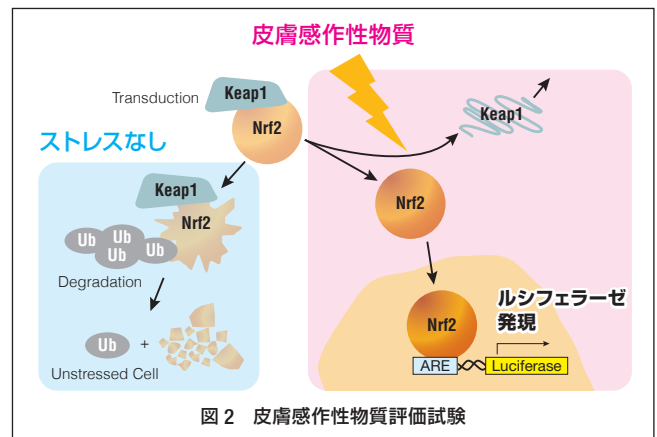


従来法では①初代 NK 細胞 (PBMC など) をエフェクター細胞として使用し、②エフェクター細胞が惹起したターゲット細胞死を検出しており、問題点はターゲット細胞死だけでなくエフェクター細胞死も検出してしまうためバックグラウンドが高いこと、および初代 NK 細胞の活性が不安定なことでした。これまでの研究結果から、ADCC において抗体によるエフェクター細胞活性化が NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) 配列を持つ遺伝子

の発現誘導を介して起こることが分かっていました。そこで ADCC Reporter Bioassay ではターゲット細胞死ではなくレポーターを利用してこの NFAT シグナル経路活性化を検出することにより、バックグラウンドを低レベルに抑えています。また不安定な NK 細胞ではなく安定なレポーター組換え細胞 (Jurkat) をエフェクターとして使用することでアッセイ系の安定化に成功したのです。現在では抗体医薬品の開発から品質管理まで広く使用されています。

### ② 炎症反応検出アッセイ（皮膚感作性試験）

新規化学物質が次々開発されていく現代において、化合物の安全性評価は欠かせません。これまで化合物安全性は主にモルモットやマウスを用いた動物実験によって評価されてきましたが、近年の動物実験縮小・廃止の流れを受け、*in vitro* 試験での代替法ニーズが高まっています。その中で皮膚感作性についてはレポーターアッセイを利用した *in vitro* 試験法が確立され、EU で最初に公定法として導入されました。このアッセイは多くの皮膚感作性物質が抗酸化剤応答配列 ARE (Antioxidant response element) によって制御される遺伝子の発現を誘導することを利用して、皮膚細胞 (ケラチノサイト) における ARE シグナル経路活性化をレポーターで検出することにより、動物実験を行うことなく皮膚感作性物質が評価できるようになったのです。



安全性試験の分野ではこの他にも *in vitro* 催奇形性試験が開発されています。これまで複雑かつ時間のかかる動物実験だったこの試験を、Hand1 遺伝子の発現誘導をレポーターで検出することにより簡便化、*in vitro* 化しています。特にこのアッセイ系では細胞数を同時に蛍光計数するデュアルアッセイにより、高い再現性や信頼性を実現しています。

ここで紹介したのはごく一部の例にすぎません。これまでの基礎研究で積み重ねられたデータと、高感度・簡便・高信頼性のレポーターアッセイを組合せることで、今後も多くのアッセイが開発されることを期待しています。

アイデア実現にお悩みの方、お気軽にご相談ください。

## プロメガ株式会社

本社 〒103-0011  
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル  
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

### テクニカルサービス

Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982  
E-Mail : prometec@jp.promega.com