

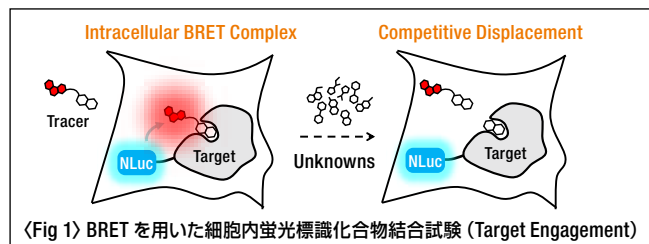
## 生細胞を用いた薬剤結合試験のすすめ [Vol. 10]

### ～ Target Engagement と Residence time ～

薬剤の標的分子への結合の選択性と親和性を理解することは、薬剤を評価するうえで重要なポイントとなります。これらを実験するにあたり、従来は単離精製した標的分子を用いたセルフリー系が用いられてきました。しかし、セルフリー系は、生体内での環境と大きく異なり、必ずしも薬剤の実際の効果環境を反映しているとは言えません。

そこで、BRET を用いた評価系、Target Engagement が開発されました。ここでは、Nature Communications 6 (2015), Article number: 10091 に掲載されたものをご紹介します。なお、BRET については、「テックのひとことコラム」2015年11月号にも掲載しましたのでご参照ください。

標的タンパクと BRET のドナーである NanoLuc® ルシフェラーゼとの融合タンパクを発現した細胞に、BRET アクセプターとなる蛍光で標識した膜透過性トレーサーを添加します。トレーサーが標的分子に結合すると BRET が起こり、アクセプターが光を発します (Fig 1 左)。またこの結合試験に、非標識の薬剤を添加することにより、結合阻害を見ることができます (Fig 1 右)。

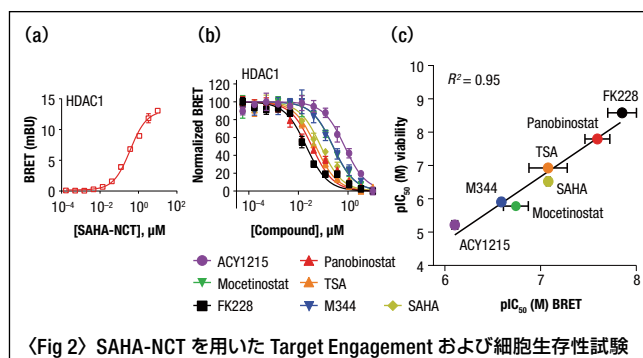


〈Fig 1〉 BRET を用いた細胞内蛍光標識化合物結合試験 (Target Engagement)

ここでは、HDAC 阻害剤 SAHA に蛍光標識した細胞膜透過性トレーサー SAHA-NCT を作成し、HDAC1-NanoLuc® 融合タンパクを発現した細胞に添加して、細胞内の HDAC1 : SAHA-NCT 結合活性を (Fig 2a)、またさまざまな HDAC 阻害剤の SAHA-NCT 結合に対する阻害活性を観察しました (Fig 2b)。文献では、SAHA-NCT が他の HDAC サブタイプにも結合することも示しています。この競合試験により各薬剤の細胞内結合阻害活性を測定することができました。

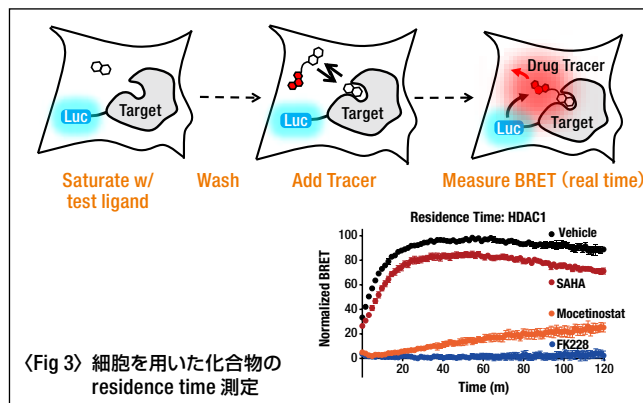
この細胞内での HDAC1 への親和性と、薬効のひとつとして細胞増殖抑制効果 (細胞内 ATP 測定) を比較しました (Fig 2c)。HDAC1 への結合阻害活性 (X 軸) と細胞増殖抑制効果 (Y 軸) の相関が取れることが示されました。実際には他の HDAC との相関も見えていますが、HDAC1, HDAC2 との明確な相関が観察され、HDAC1, HDAC2 が多くのがん細胞での細胞増殖にかかわっているという報告と一致した結果を得ることができました。

一方、薬剤の有効性に、標的タンパクとの結合の非平衡状態での結合-解離が影響すること、特に residence time (滞留時間) が重要な指標となることが明らかになってきました。加えて、細胞内で修飾をうけるプロドラッグは、その修飾を受けた状態で評価する必要があります。



〈Fig 2〉 SAHA-NCT を用いた Target Engagement および細胞生存性試験

〈Fig 3〉では、HDAC1-NanoLuc® 融合タンパクを発現させた細胞にあらかじめ、SAHA, Mocetinostat, FK228 処理を行い、洗浄後、SAHA-NCT を添加し、BRET を測定しました。HDAC1 との解離が早ければ、早く BRET シグナルが得られ、増加します。SAHA は SAHA-NCT 添加 20 分後にほぼプラトーに達しました。これは、SAHA の膜透過時間と一致、SAHA の早い解離が観察されました。一方、Mocetinostat は解離が遅いものとして報告されていますが、ここでもゆっくりとした解離が観察されました。また、プロドラッグである FK228 は、Mocetinostat よりもさらにゆっくりとした解離が観察されました。FK228 はがん細胞に対して、ゆっくりとした長い生理活性を持つことが知られており、この NanoBRET™ の結果は、その活性を支持しています。文献ではプロドラッグ TDP-A についても同様の結果が得られています。



〈Fig 3〉 細胞を用いた化合物の residence time 測定

このように BRET を用いた、Target Engagement および residence time の評価は、細胞における薬効を評価する上でひとつのツールになると考えられます。

Promega では、この HDAC 用トレーサー SAHA-NCT のほかに、Bromodomain 結合活性をみる iBET-762-NCT およびさまざまな Kinase を評価するトレーサーを開発しています。ご興味のある方は、お問い合わせください。

## 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