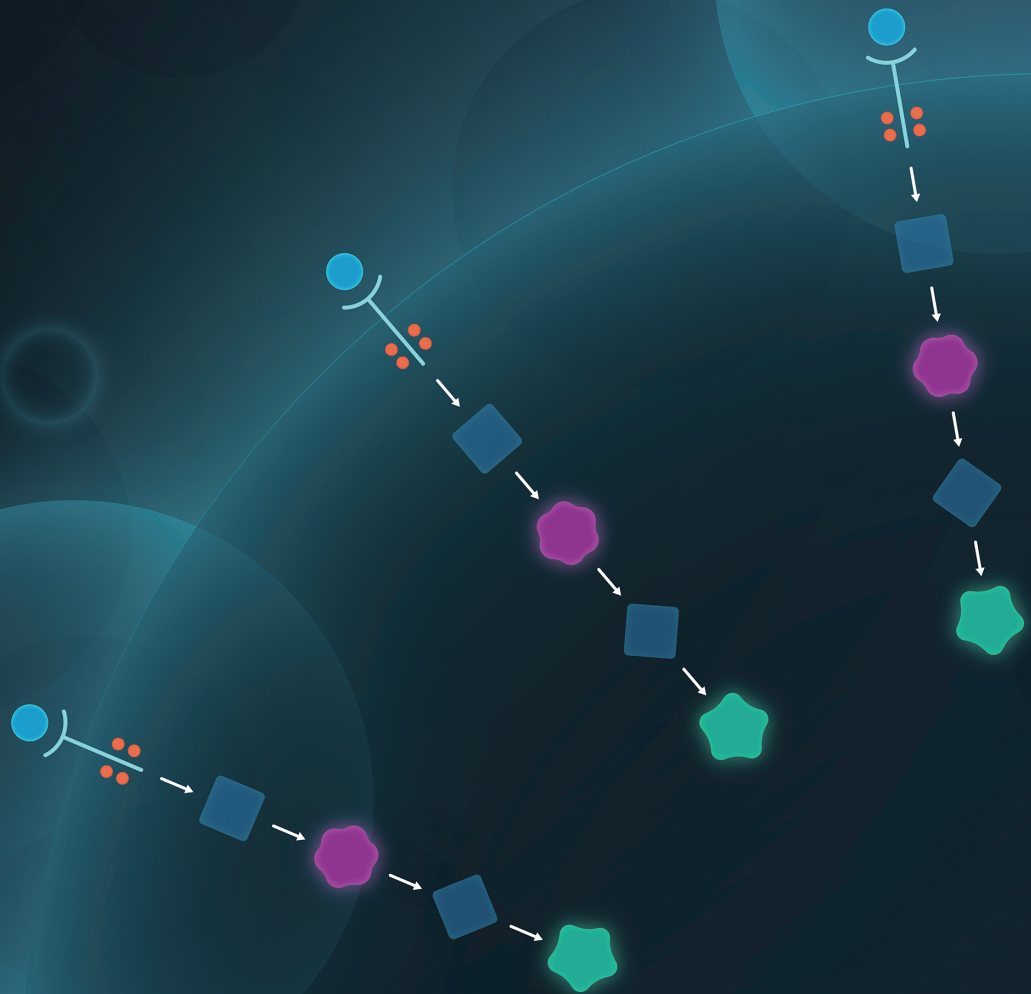


分子標的治療薬開発

確実に迅速な医薬品開発のためのアッセイ方法のご提案



標的探索から前臨床開発まで

分子標的治療薬の開発をより確実に進める お手伝いをいたします

近年の創薬モダリティの多様化により、低分子医薬品や抗体医薬品はもちろん、ペプチド医薬品、核酸医薬品、抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugates; ADC)、ペプチド薬物複合体 (Peptide-Drug Conjugates; PDC)、遺伝子治療薬 (遺伝子治療ベクター/腫瘍溶解性ウイルス)、細胞治療薬 (CAR-T 細胞/再生医療) など多くのタイプの薬剤の開発が進んでいます。

新薬の開発競争は依然として激しく、競争相手よりも確実かつ迅速に候補薬の開発を進めることがますます重要になっています。開発の遅れはコストに直結します。新たな創薬シーズを探索するアカデミア、新たなテクノロジーで開発を進めるバイオベンチャー、創薬に実績を持つ製薬会社、すべてのお客様にとって、疾患メカニズムの解明から前臨床試験まで、いかに効率的かつ着実に創薬を進めていくかは長年の課題と言えるでしょう。

タンパク質の発現解析は、疾患メカニズムの解明、創薬標的分子の同定と検証、そして薬剤の薬理活性の評価において機能解析と並んで大切な実験手法です。また、前臨床開発において、薬剤の疾患部位へのデリバリー/生体内分布/クリアランスの評価は重要な位置を占めます。

LI-COR 社は、それぞれの創薬ステップにおいて、より確実性の高い信頼できるデータを得るためのアッセイ・ソリューションを提供しています。

Make decisions with confidence, without delay and without hesitation

確実かつ迅速に次の創薬プロセスへ

信頼性の高いタンパク質発現解析による探索薬理研究

疾患メカニズムの解析、標的探索 (同定/検証)、in vitro 薬理活性評価、作用機序の検証などにおいてタンパク質の発現解析は必須の研究手法です。シグナル伝達タンパク質をはじめとする標的タンパク質の発現を正確に再現性高く解析することは、自信をもって次の創薬ステップに進むためのキーファクターです。

標的同定

標的検証

アッセイ開発

探索
スクリーニング

リード最適化

疾患メカニズムの解明

疾患発症メカニズムあるいは薬剤耐性メカニズムの解明は新たな薬剤の開発の第一歩です。オミクス研究による生体分子の網羅的解析やドライバー遺伝子変異の解析に加えて、疾患関連タンパク質や薬剤耐性関連タンパク質の発現を詳細かつ正確に知ることによって新たな創薬標的の発見につながります。

創薬ターゲットのセレクション

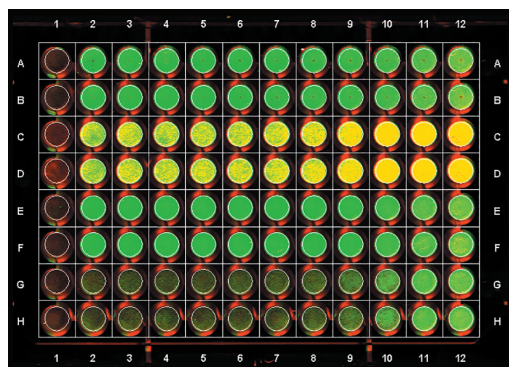
妥当性の高い標的タンパク質を信頼性の高いデータに基づいて確実に選択することは創薬研究において極めて大切です。信頼性の低い不確実なデータに基づく標的分子の選択は薬剤の開発に致命的な遅れをもたらします。LI-COR 社の蛍光定量ウェスタンブロットと In-Cell Western™ アッセイは、正確かつ高精度なタンパク質発現データに基づいた標的探索と標的検証を可能にします。

リード薬剤の薬効評価

蛍光ウェスタンブロットと In-Cell Western アッセイによるタンパク質発現解析は、薬剤による標的分子発現阻害活性の評価、あるいは PROTAC (タンパク質分解薬) や mRNA 医薬品など、タンパク質発現の修飾を薬効機序とする医薬品の薬理効果の検証に有用です。解析対象となるタンパク質を正確かつ再現性高く定量できるため、確実な薬剤評価データを得ることができます。

タンパク質発現解析

In-Cell Western™ アッセイと蛍光ウェスタンブロットングにより標的分子の発現を正確に定量

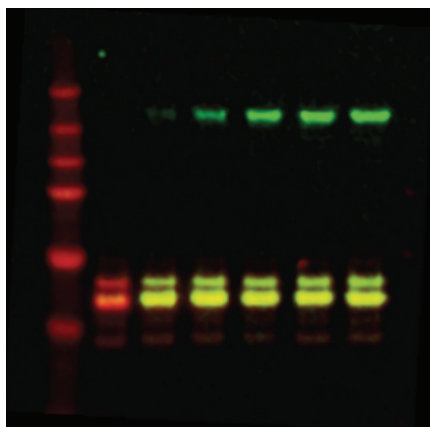


In-Cell Western アッセイは、セルベースでかつハイスループットにタンパク質の発現解析を行うことができる実験方法です。

タンパク質の抽出と可溶化を行わずに、細胞をインタクトな状態に保ったままで発現解析が可能です。また、タンパク質抽出のステップがないので、ウェスタンブロット法よりもデータのバラつきを少なくすることが可能です。タンパク質リン酸化レベルの変化など小さな違いを明らかにすることに適した手法です。

アッセイは 96 ウェルあるいは 384 ウェルで実施することが可能で、薬剤の薬理活性をハイスループットに試験していただけます。

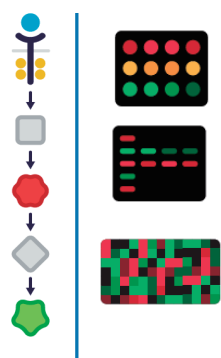
In-Cell Western アッセイのなかで、細胞表面タンパク質を対象とする実験は On-Cell Western アッセイと呼ばれます。細胞膜タンパク質を可溶化せずに立体構造を維持したままリガンドの結合特異性試験などを行っていただけます。



蛍光ウェスタンブロットは、タンパク質の発現変化を、化学発光法（ケミルミ法）では得られない高い定量性で解析できるウェスタンブロット手法です。ハウスキーピングタンパク質だけでなく、よりロバストなローディングコントロールとして近年推奨されている総タンパク質染色によるノーマライゼーションが可能です。さらに、同じブロットから、近接したバンドを同時に別々に検出できるためシグナリングタンパク質のリン酸化レベルの変化を正確に解析していただけます。

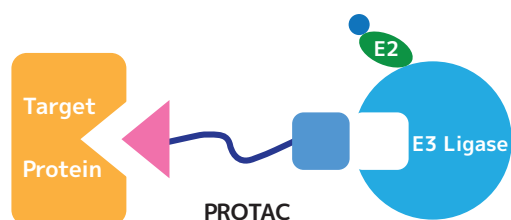
LI-COR 社の Odyssey® イメージャーは、論文実績に優れた蛍光ウェスタンブロットの世界標準機です。レーザーによる励起で高感度にブロットを検出できるだけでなく、6桁以上のダイナミックレンジで常に均一な再現性の高い画像取得が可能です。

セルシグナリング解析



がんを初めとする多くの疾患にとってシグナルパスウェイは特に重要な創薬標的ですが、シグナル伝達系をモジュレートする多くの薬剤が上市され、今でも新たなリガンドの開発が進められています。したがって、創薬ターゲットの探索（同定/検証）から薬剤の薬効評価（標的分子阻害活性評価）に至るまで、シグナル伝達分子の定量的評価は必須の解析手法です。LI-COR 社の In-Cell Western アッセイと蛍光ウェスタンブロットはこの目的に最適なアッセイ方法です。細胞の薬剤暴露あるいは遺伝子ノックアウト/ノックアウトに伴うシグナリングタンパク質のリン酸化レベルの変化を正確かつ再現性高く定量することが可能です。

タンパク質分解解析

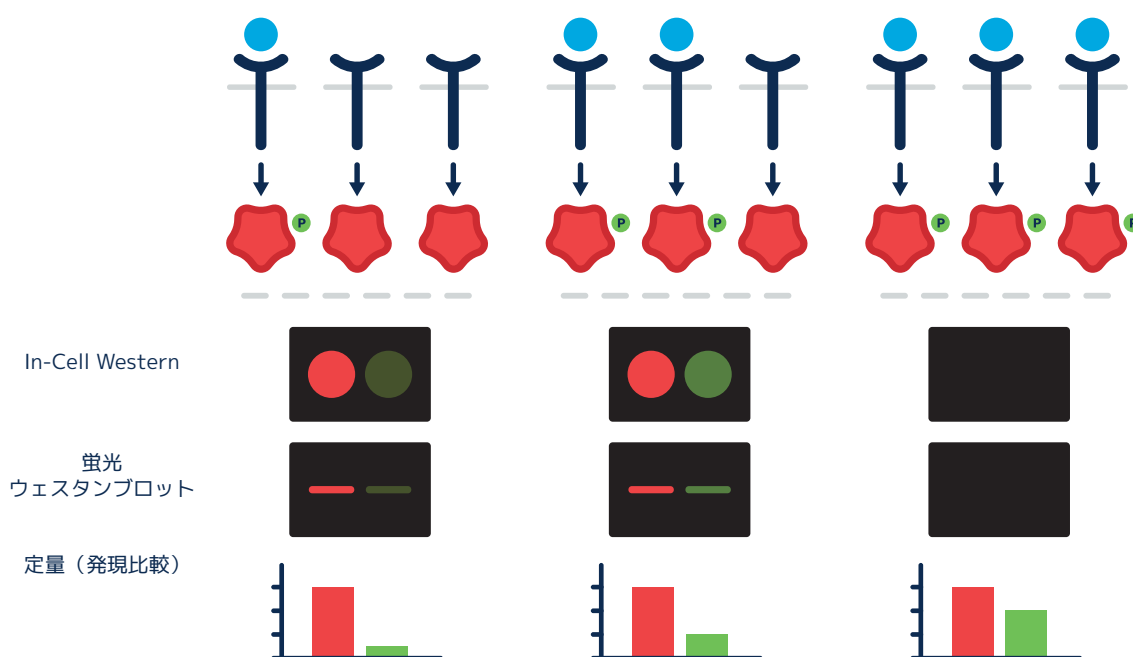


近年急速に発展している新たな創薬モダリティの中には、疾患の原因となるタンパク質の発現を変えることで薬効を発揮する医薬品が多くあります。核酸医薬品、AAV などの遺伝子治療ベクター、mRNA 医薬品などが含まれます。標的タンパク質分解誘導化合物（PROTAC）あるいはその他の標的タンパク質分解薬（Targeted Protein Degradation）もその 1 つです。In-Cell Western アッセイは、このような医薬品の薬理アッセイを効率的に行うことのできる強力なツールとなります。

アプリケーション例 ①

リン酸化カスケードによるシグナル伝達経路の解析

疾患メカニズムの解明、既存の治療薬に対する薬剤耐性のメカニズムの解明、あるいは薬剤の作用機序の解析において、細胞のシグナリングパスウェイのキャラクタリゼーションは大切です。Odyssey® イメージングシステムとIRDye® 標識二次抗体を用いたIn-Cell Western™ アッセイと蛍光ウェスタンブロットにより、タンパク質のリン酸化レベルの変化を正確かつ再現性高く測定していただくことができます。



上図は、リガンド（水色）によるタンパク質のリン酸化（黄緑色）を模式的に示すモデル図です。700 nm でターゲットタンパク質（赤色）、800 nm でリン酸化タンパク質（黄緑色）を検出することでターゲットタンパク質のリン酸化レベルを解析しています。上図の例では細胞表面受容体に結合するリガンド分子（水色）が増えるにつれて、解析対象としているシグナル伝達タンパク質のリン酸化が亢進しています。

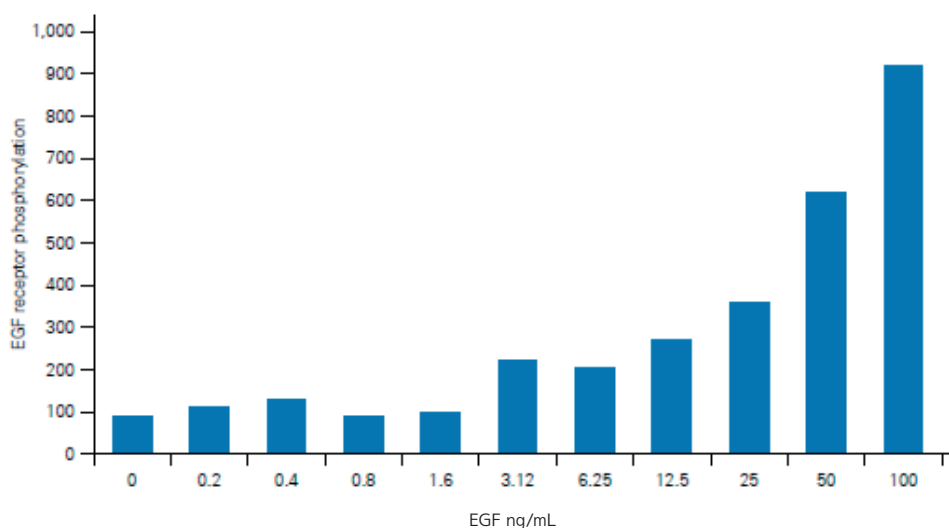
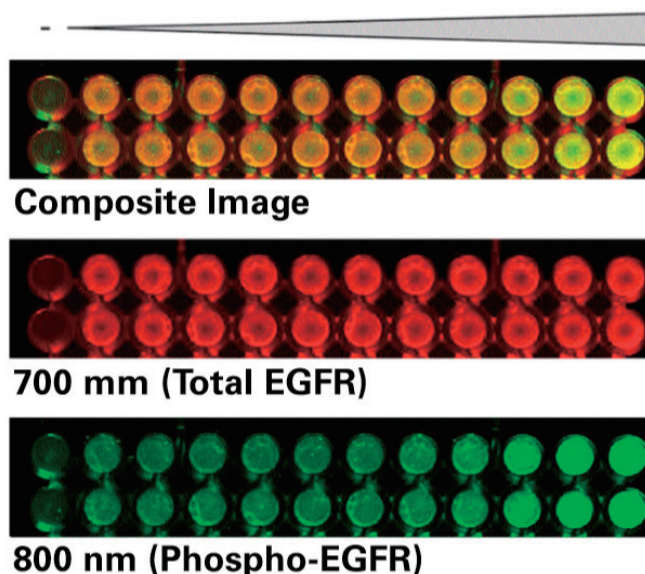
※上図はアッセイのコンセプトを示すための一例です。

EGF 刺激による EGFR リン酸化レベルの定量解析

A431 細胞に 2 倍希釈系列の上皮成長因子 (EGF) を作用させ、上皮成長因子受容体 (EGFR) のリガンド濃度依存的なリン酸化をセルベースで解析しました。

In-Cell Western™ アッセイはタンパク質のリン酸化をセルベースでハイスループットに定量することができます。この例では、リン酸化 EGFR を 800 nm で検出し、そのシグナルを 700 nm で検出したトータル EGFR でノーマライゼーションしました。リガンドである EGF 濃度依存的な EGFR リン酸化の測定に成功しています。In-Cell Western アッセイを用いると、細胞からのタンパク質抽出を行わずに、リン酸化レベルの小さな変化を再現性高く解析することができます。

EGF Concentration

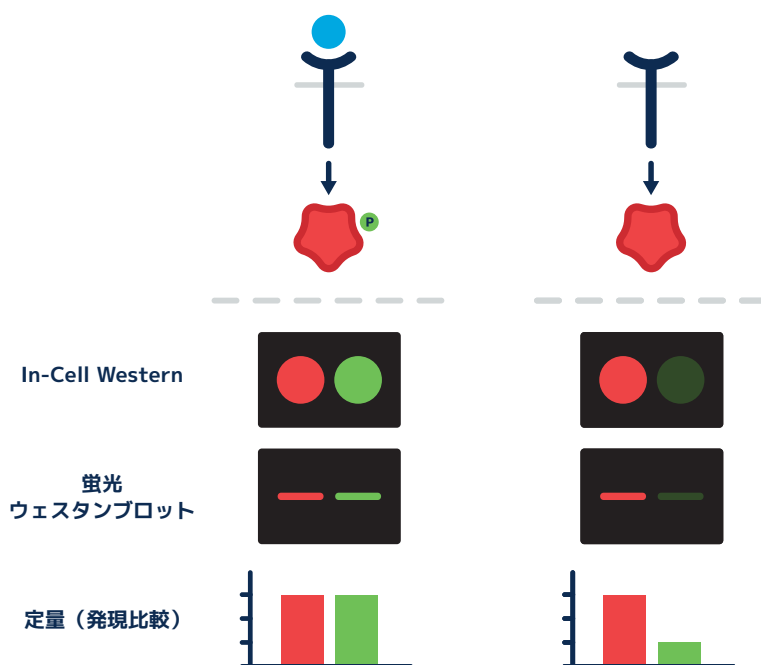


A431 細胞の EGF に対する用量依存的反応をリン酸化 EGFR 特異的抗体を用いて測定した。グラフは、トータル EGFR でノーマライゼーションした後の EGFR のリン酸化レベルを示す。

アプリケーション例 ②

ノックアウト/ノックアウト実験による 標的タンパク質の発現解析

遺伝子ノックアウト/ノックアウトは、創薬標的の探索や検証に欠かせない実験手法です。siRNA・shRNAによるRNA干渉(RNAi)、あるいはCRISPR/Cas9やTALENによるゲノム編集を用いて遺伝子発現を制御し、解析対象とするシグナリングタンパク質や標的分子の発現変化を測定します。In-Cell Western™ アッセイと蛍光ウェスタンブロットは、ノックアウト/ノックアウトで発現制御を受けたタンパク質の精緻な定量解析を可能にします。



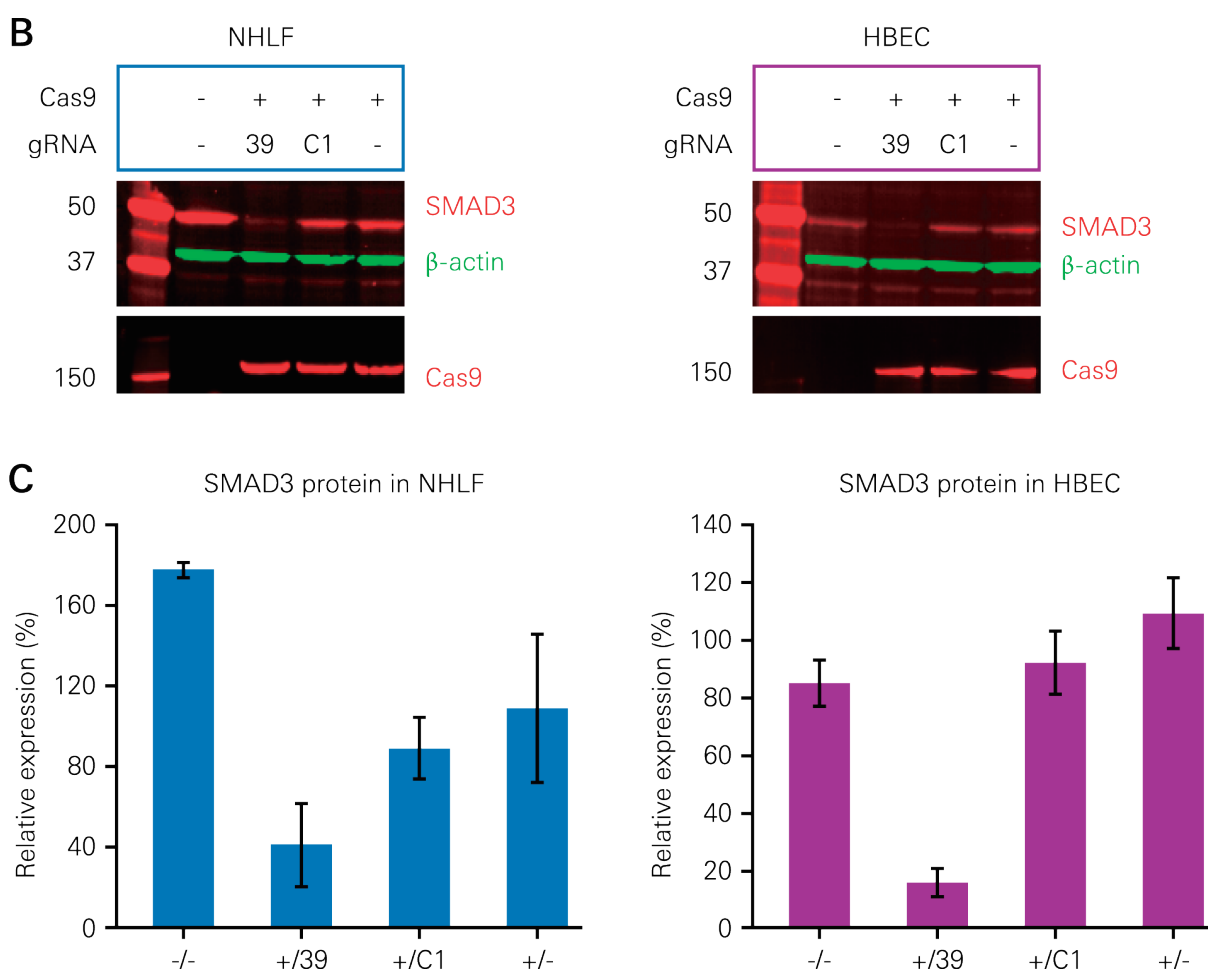
上図は遺伝子ノックアウト/ノックアウトによるタンパク質発現変動のモデル図です。正常細胞では、リガンド（水色）が細胞表面の受容体に結合し、その下流タンパク質がリン酸化されます（黄緑色）。遺伝子制御によりリガンドの発現がノックアウトされると、リン酸化レベルが低下します。すべての解析対象タンパク質を 700 nm（赤色）で、リン酸化したタンパク質を 800 nm（黄緑色）で検出しています。

※上図はアッセイのコンセプトを示すための一例です。

アデノウイルスベクター CRISPR/Cas9 による SMAD3 タンパク質のノックアウト

2種類のヒト初代培養細胞を用いて、アデノウイルスベクターを用いた CRISPR/Cas9 で SMAD3 タンパク質の発現をノックアウトし、Odyssey® イメージャーによる蛍光ウェスタンブロット法で発現低下を確かめました。

蛍光ウェスタンブロット法は、タンパク質の発現レベルの違いを化学発光法よりも安定して、再現性高く定量することが可能です。SMAD3 タンパク質は TGF-βシグナル伝達系のキー因子の1つです。SMAD3 の活性化(リン酸化)は細胞の増殖、アポトーシス、分化などに深く関与し、がんの進展や繊維症の発症などに影響します。この例では、CRISPR/Cas9 による SMAD3 タンパク質の発現ノックアウトを蛍光ウェスタンブロット法で確かめました。

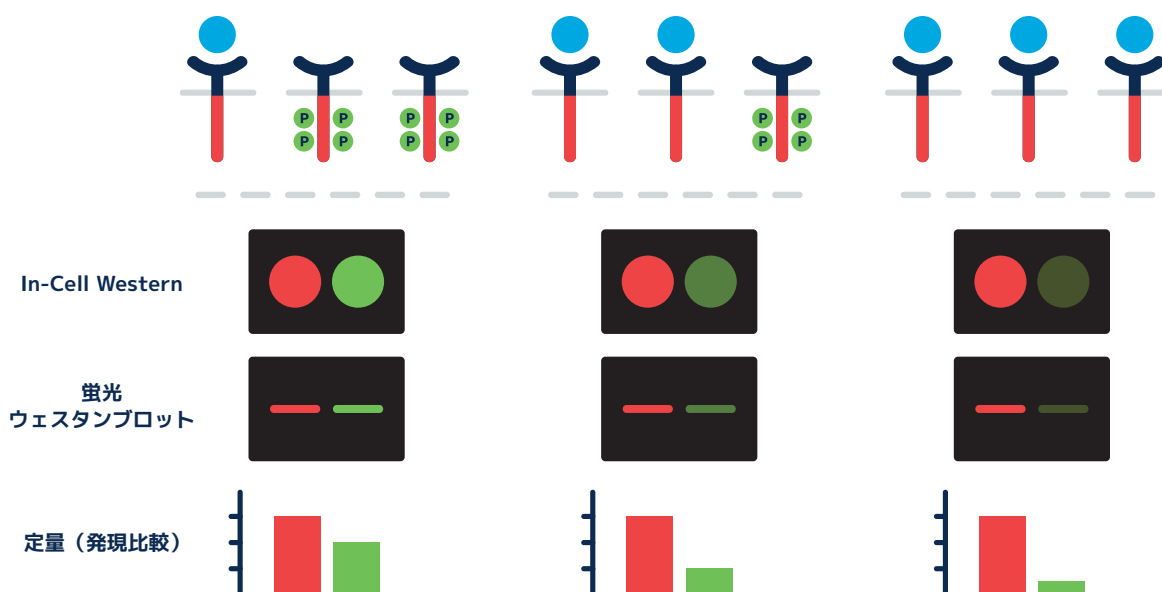


AdV-CRISPR/Cas9 による SMAD3 タンパク質の高効率なノックアウト。SMAD3 (赤: 700 nm) および Cas9ヌクレアーゼ (赤: 700 nm) のバンドシグナルをβ-アクトリン (緑: 800 nm) でノーマライゼーションした。Cas9 と gRNA (ガイド RNA) の両方が存在すると SMAD3 のタンパク質発現が著しくノックアウトされる。画像は Odyssey イメージングシステムで撮影し、Image Studio™ ソフトウェアで定量解析を行いました。

アプリケーション例 ③

IC₅₀ アッセイによる用量反応性試験

標的阻害活性の測定、とりわけ IC₅₀ の測定は薬剤の薬効評価に欠かせない大切なデータです。Odyssey® イメージングシステムを用いた In-Cell Western™ アッセイと蛍光ウェスタンブロットにより、細胞の薬剤に対する用量反応性を、シグナル伝達タンパク質等の標的タンパク質の発現阻害に基づいて正確かつ再現性高く評価していただくことができます。特に In-Cell Western アッセイは、セルベースでハイスループットな IC₅₀ の解析が可能のためこの目的に最適な実験手法です。



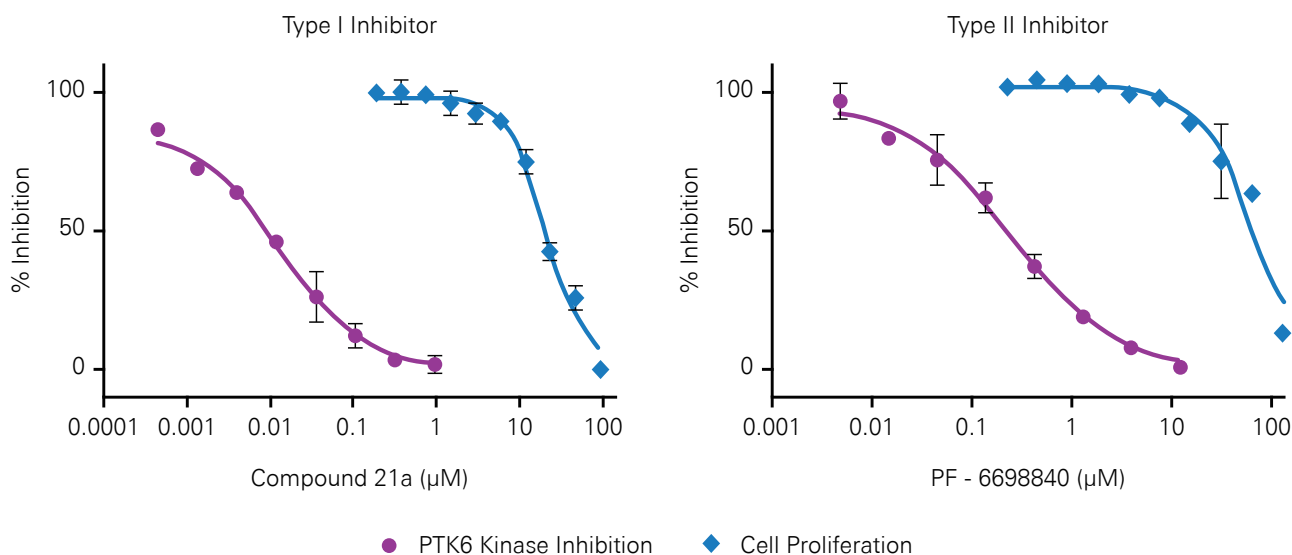
上図は IC₅₀ アッセイのモデル図です。阻害剤(水色)濃度の増加にしたがいターゲットタンパク質のリン酸化(黄緑色)が減少する様子を表しています。700 nm でトータルのターゲットタンパク質 (赤色)、800 nm でリン酸化タンパク質 (黄緑色) を検出することでターゲットタンパク質のリン酸化レベルを解析しています。

※上図はアッセイのコンセプトを示すための一例です。

In-Cell Western™ アッセイを用いて PTK6 活性化阻害の IC₅₀ を測定

2種類の PTK6 阻害剤の薬理活性を In-Cell Western アッセイと細胞増殖アッセイで評価しました。

PTK6 (チロシンプロテインキナーゼ 6、BRK) は乳がん等の悪性腫瘍で発現が亢進する非受容体型チロシンキナーゼです。この例では、2種類の PTK6 リン酸化阻害剤を乳がん細胞株に作用させました。用量依存的な PTK6 リン酸化阻害を In-Cell Western 法で、細胞増殖阻害を Cell-Titer Glo アッセイ法で測定し、それぞれの IC₅₀ を算出しました。



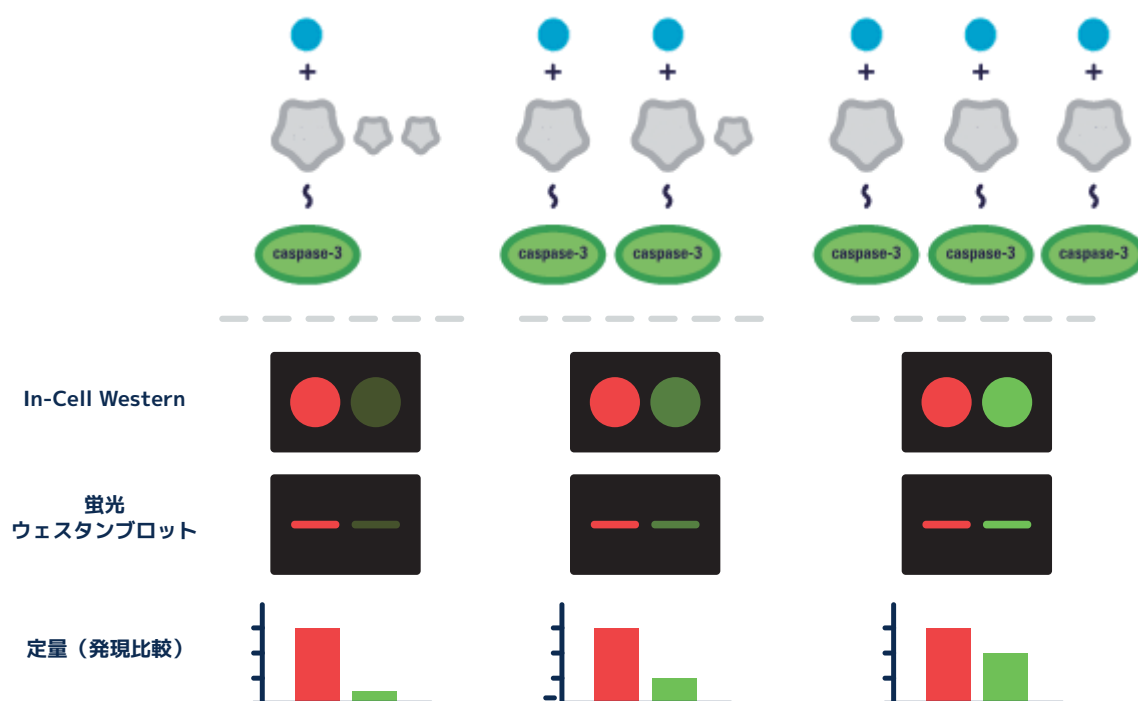
PTK6 を過剰発現させた乳がん細胞株 (MDA-MB231) の 2 種類の PTK6 阻害剤 (Type I および Type II) に対する用量反応曲線。紫色は Odyssey® イメージングシステムによる In-Cell Western アッセイの用量反応曲線を示す。リン酸化 PTK6 のシグナルを CellTag™ 700 染色による総細胞数シグナルでノーマライゼーションした。青色は Cell-Titer Glo アッセイの用量反応曲線を示す。リン酸化阻害の IC₅₀ と細胞増殖阻害の IC₅₀ が大きく異なることから、PTK6 は腫瘍形成に限定的な役割しか果たさないことが推察される。

アプリケーション例 ④

プログラム細胞死の誘導

アポトーシスからの回避はがん細胞がもつ重要な特性の1つです。がん細胞はアポトーシスによる細胞死を巧みに回避することで生存を維持しています。したがって、アポトーシス誘導剤あるいはオートファジー誘導剤は悪性腫瘍に対する有望な分子標的治療薬と考えられています。

Odyssey[®] イメージングシステムとIRDye[®] 標識二次抗体を用いた In-Cell Western[™] アッセイと蛍光ウェスタンブロットは、シグナル伝達タンパク質だけでなく、アポトーシス/オートファジー関連タンパク質、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質など様々なタンパク質の発現量の変化を従来の方法よりも信頼性高く解析できます。



上図はリガンド（水色）によって誘導されるアポトーシスのモデル図です。細胞内のシグナル伝達を経てタンパク質分解酵素カスパーゼ（黄緑色）が活性化されます（オートファジーの場合はカテプシンなどのタンパク質分解酵素）。カスパーゼ3を 800nm（黄緑色）で、総タンパク質（総細胞数）あるいはハウスキーピングタンパク質などのローディングコントロールを 700nm（赤色）で検出しています。

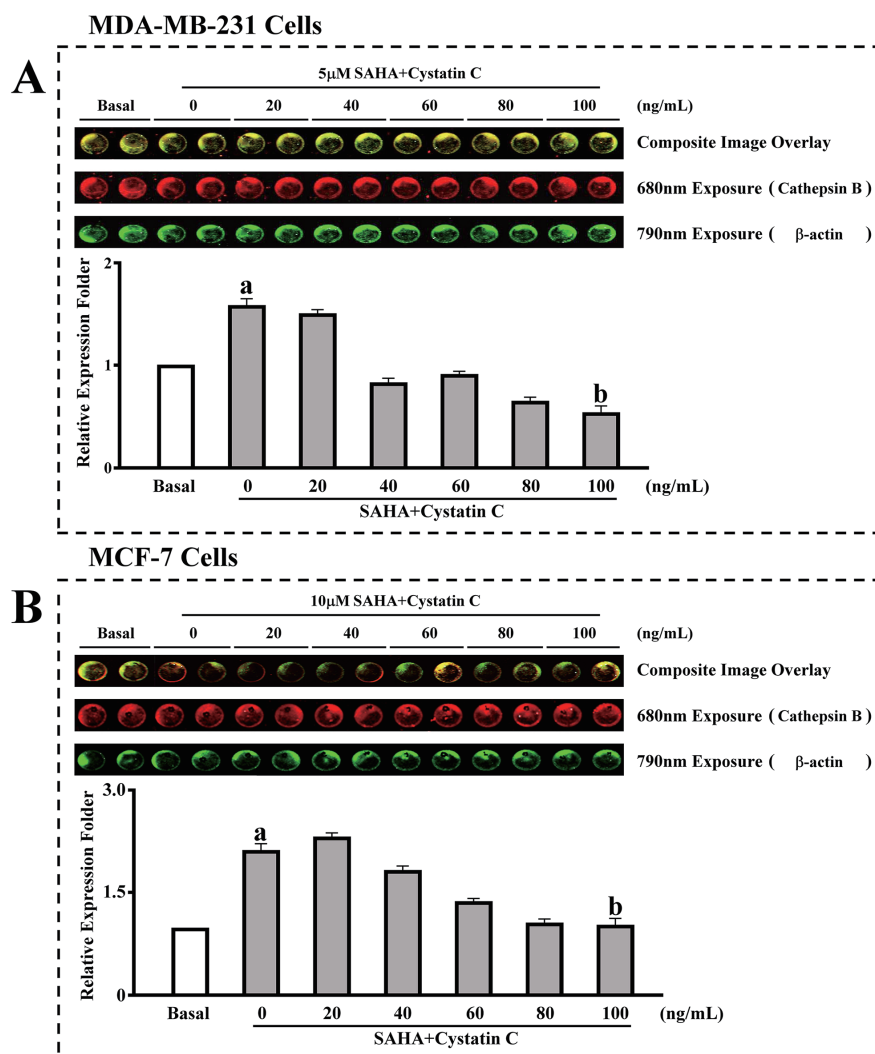
※上図はアッセイのコンセプトを示すための一例です。

In-Cell Western™ アッセイによる Cathepsin B タンパク質の発現解析

低分子薬剤への暴露に伴うタンパク質分解酵素 Cathepsin B の発現量の変化を Odyssey® イメージャーによる In-Cell Western アッセイ法で測定しました。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤) は、ヒストン脱アセチル化酵素によるヒストンタンパク質リジン残基の脱アセチル化を阻害し、遺伝子の転写を阻害あるいは活性化させます。細胞死を導くことで抗悪性腫瘍薬として働きます。Cathepsin ファミリーはリソソームに局在するタンパク質分解酵素で、オートファジーによる細胞内タンパク質の分解に中心的な役割を果たします。

この例では、2種類の乳がん細胞株 (MDA-MB-231 と MCF-7) を用いて、HDAC 阻害活性を持つ低分子化合物 SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid) による Cathepsin B の発現上昇を In-Cell Western アッセイで測定しました。さらに、内因性の血清タンパク質 Cystatin C がその作用を打ち消すことを明らかにしました。

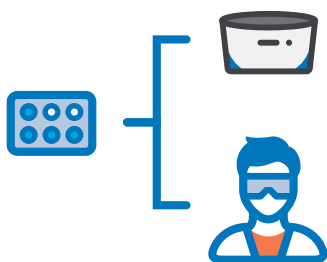


Cathepsin B タンパク質の発現を In-Cell-Western 法で解析。Cathepsin B を 700 nm (赤) で、ローディングコントロールとして β -actin を 800 nm (緑) で検出し、Cystatin C の濃度の違いによる Cathepsin B の発現レベルの違いを定量した。

- A) MDA-MB-231 細胞
- B) MCF-7 細胞

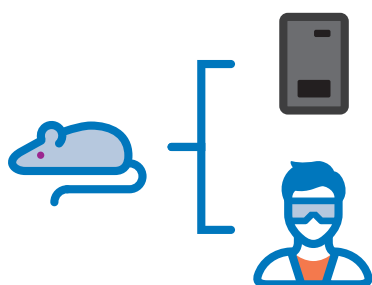
In vivo 薬物送達研究と薬効研究

In vitro アッセイで薬理活性、安全性、代謝性、物性が確認された薬剤は実験動物による試験（前臨床試験）に移ります。LI-COR 社は、薬剤候補の標的分子への結合特異性試験から、個体レベルあるいは組織レベルでのドラッグデリバリー / 生体分布の検証まで、途切れなくアッセイを進めるためのソリューションを提供しています。高分子 / 中分子等のリガンドの蛍光ラベル（蛍光プローブ化）に始まり、個体レベルでの生体分布試験、臓器レベル / 組織レベルでの標的部位への集積の検証まで、近赤外蛍光プローブの利点を活かして、確実なデータの取得をヘルプします。また、抗腫瘍効果等の薬理活性の測定も高い定量性と再現性で実施していただけます。



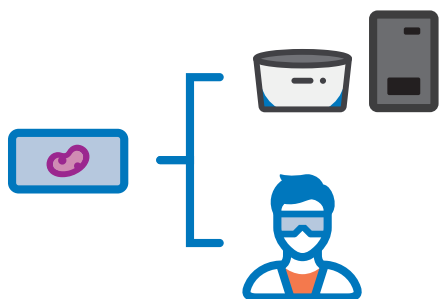
近赤外蛍光ラベルした薬剤の結合特異性評価

近赤外蛍光ラベルした薬剤候補分子（タンパク質 / ペプチド / ADC など）は、ラベル後のターゲット分子への結合特異性をテストする必要があります。Odyssey® F/M イメージングシステムを用いた In-Cell Western™ / On-Cell Western アッセイ（セルベース ELISA）はこの目的に最適な実験手法です。



In vivo イメージングによる生体分布の解析

ターゲット分子への結合特異性を検証した近赤外蛍光標識薬剤を実験動物に投与し、標的部位への集積、生体クリアランスなどの特性を解析します。Pearl® Trilogy イメージングシステムは、マウスを用いた近赤外蛍光イメージングを高感度に行うことができます。また、抗がん剤の場合には、薬剤のターゲティングと同時に抗腫瘍活性の評価も可能です。



Ex vivo 臓器 / 組織切片イメージングによる検証

In vivo イメージングで個体レベルでの生体分布を解析した動物から臓器を取り出し、臓器レベルで標的部位への集積と生体クリアランスを検証します。

さらに、そのまま組織切片を作製することで、組織レベルでの薬剤取り込みの検証を行うことも可能です。

臓器の Ex vivo イメージングは、Pearl Trilogy イメージングシステムあるいは Odyssey F/M イメージングシステムで行っていただけます。組織切片のマクロイメージングは Odyssey F/M イメージングシステムで可能です。

ドラッグデリバリー解析

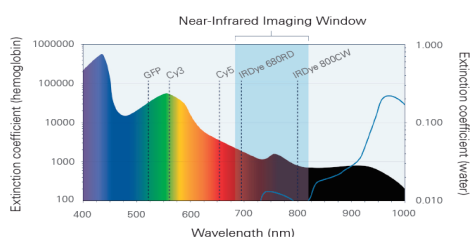
近赤外蛍光ラベルにより 簡便かつ高感度なインビボイメージング実験を実現

PET/SPECT は生体深部まで高感度にイメージングが可能な優れた in vivo イメージング手法です。しかし、PET/SPECT 核種は半減期が短いため取り扱いが難しく、薬剤への標識も簡単ではありません。

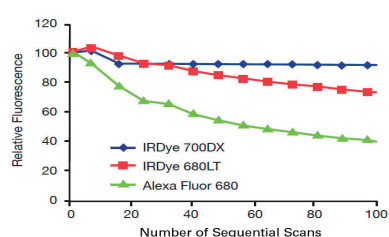
蛍光 in vivo イメージングは、蛍光色素の薬剤への標識が容易で、通常の実験環境下で手軽に利用できる利点があります。このとき、動物は可視波長で強い自家蛍光を持ち光透過性も低いため、十分な感度でイメージングすることが困難です。一方で、近赤外波長は生体による光吸収と自家蛍光が少なく、十分な感度でのイメージングを可能にします。

LI-COR 社の IRDye® シリーズは、様々な研究目的で豊富な使用実績を持つ近赤外蛍光試薬です。前臨床試験はもちろん近年では臨床試験における使用実績が増えています。

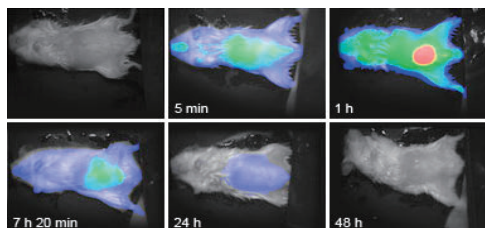
生体透過性が高く自家蛍光の少ない 近赤外蛍光波長（700/800 nm）



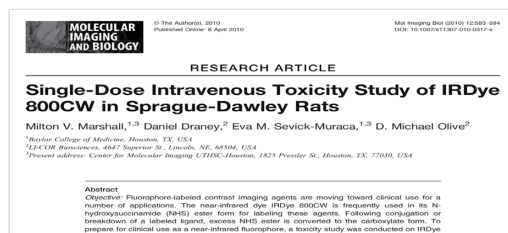
優れた光安定性で褪色が少なく 長時間の実験に最適



水溶性が高く生体クリアランスに優れる



論文化された生体毒性データ（低い生体毒性）

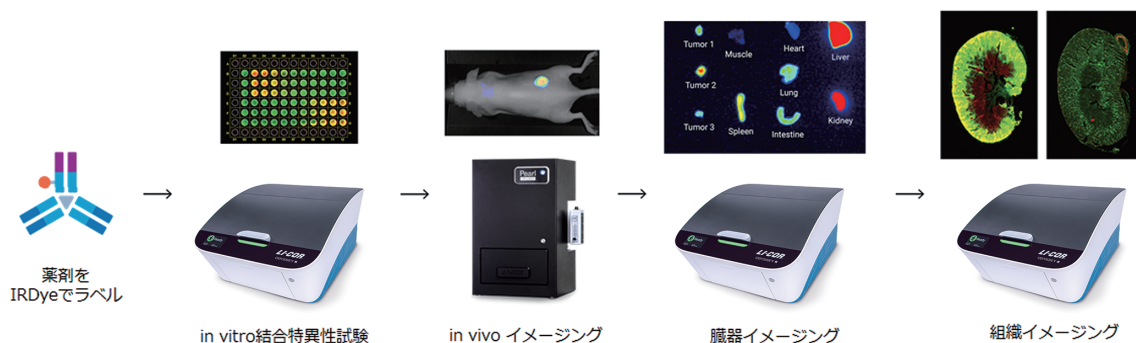


IRDye は、レーザー励起光源を備えた in vivo イメージャー Pearl® Trilogy システムと組み合わせて使用することで、候補薬剤の体内動態をより高感度に追跡することができます。

個体レベルから組織レベルまでワンフロー解析を実現

蛍光色素で標識した薬剤を生体内分布試験に使用する際には、薬剤の標的分子への結合特異性が標識後も保たれていることを in vitro でテストすることが望めます。また、薬剤が目的の臓器あるいは組織に本当に集積しているか、あるいはどの臓器からクリアランスされているかを正確に知るためには、個体レベルでのイメージングに加えて臓器あるいは組織レベルでの検証が必要とされます。

LI-COR 社は、近赤外蛍光標識薬剤の標的結合特異性試験、個体レベルのイメージング、そして臓器や組織切片のイメージングまでワンフローで行うためのトータルソリューションを提供しています。



アプリケーション例 ⑥

リガンドの標的結合特異性の解析

薬剤の標的分子への結合特異性は薬効薬理試験以降のすべての創薬ステップで大切な評価項目です。疾患モデル動物を用いた薬剤のバイオディストリビューション研究においても、動物実験を行う前にプローブでラベルした薬剤の標的分子への結合特異性を確保することが望まれます。この結合特異性の検証 (Specificity Test) は、siRNA (または shRNA) や CRISPR/Cas9 等で標的分子の発現をノックアウト/ノックアウトした細胞、あるいは競争阻害試験により行います。



上図は競争阻害アッセイのモデル図です。蛍光色素 (黄緑色) で標識したリガンド (水色+黄緑色) と非標識のリガンド (水色のみ) が細胞表面レセプターに結合しています。非標識リガンドの濃度が上がるにつれて、標識リガンドに由来するシグナル (黄緑色: 800 nm) が減少します。この結合特異的シグナルは、ローディングコントロール (赤色: 700 nm) で補正されます。ローディングコントロールには、総細胞数 (総タンパク質染色)、あるいはハウスキーピングタンパク質などが使用されます。

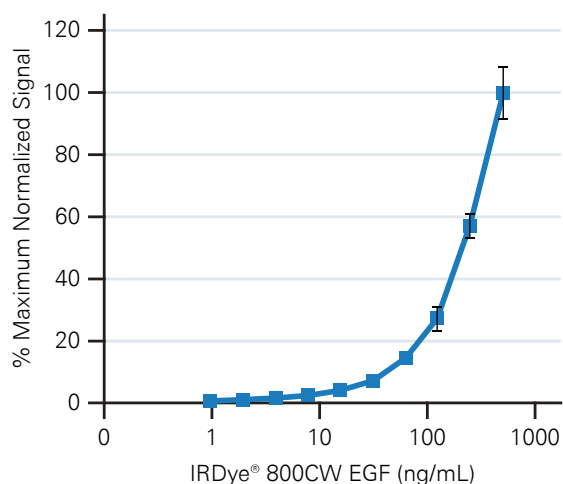
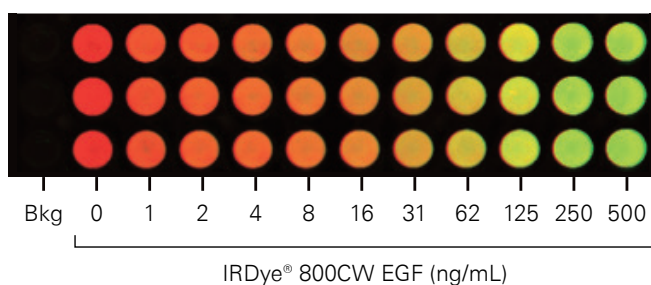
※上図はアッセイのコンセプトを示すための一例です。

On-Cell Western 法による競争阻害アッセイで 近赤外蛍光標識リガンドの標的結合特異性を解析

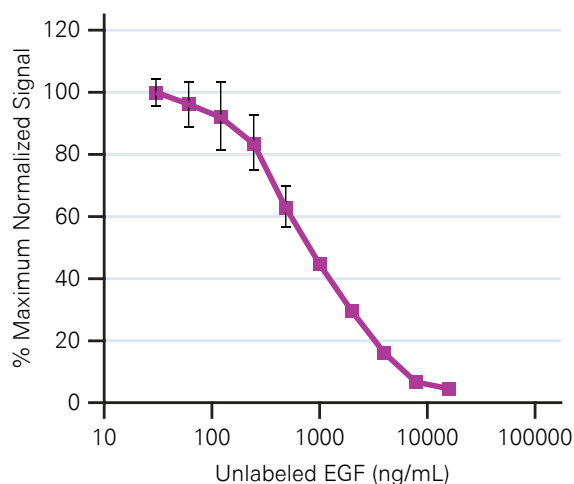
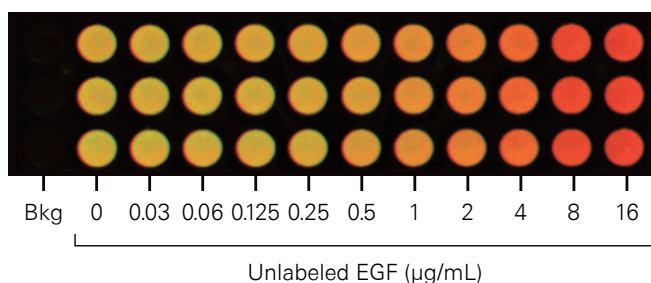
近赤外蛍光試薬 IRDye® 800CW で標識した EGF（上皮成長因子）の EGFR（上皮成長因子受容体）
に対する結合特異性を On-Cell Western アッセイ法でテストしました。

IRDye 800CW 標識 EGF の EGFR に対する結合を非標識の EGF で競争的に阻害し、On-Cell Western アッセイ法で測定しました。

A



B



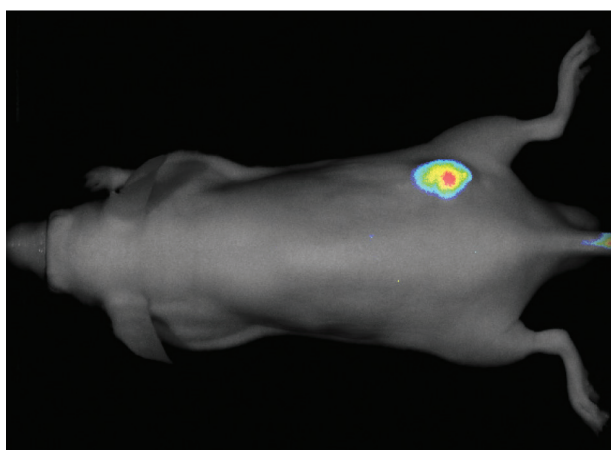
- A) IRDye 800CW 標識 EGF の濃度依存的にシグナルの上昇がみられる。ローディングコントロールとして CellTag™ 700 による総細胞数を使用し 700 nm で検出した。IRDye 800CW-EGF は 800 nm で検出し、そのシグナルを 700 nm でノーマライズした。
- B) 一定濃度の IRDye 800CW EGF に濃度上昇系列の非標識 EGF を加え競争的な結合阻害を測定した。非標識 EGF 濃度依存的にノーマライズシグナルが減少することから、IRDye 800CW-EGF が EGFR に特異的に結合することがわかる。

アプリケーション例 ⑦

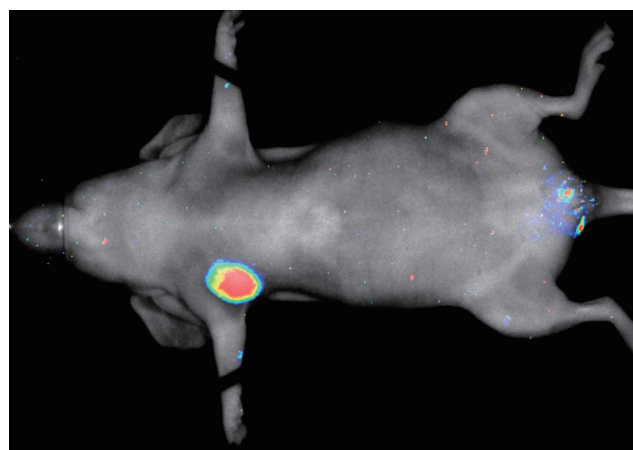
抗体等のリガンドの 生体分布と組織内分布の解析

LI-COR 社の IRDye[®] 蛍光色素とイメージングシステムは、抗体などの高分子医薬品、あるいはペプチドや siRNA などの中分子医薬品の生体内分布をクリアに可視化します。Odyssey[®] イメージングシステムと Pearl[®]Trilogy イメージングシステムの組み合わせにより、薬剤の個体レベルでのデリバリーとクリアランスに加えて、組織レベルでの取り込みと局在までワンフローで解析が可能です。

In Vivo Imaging

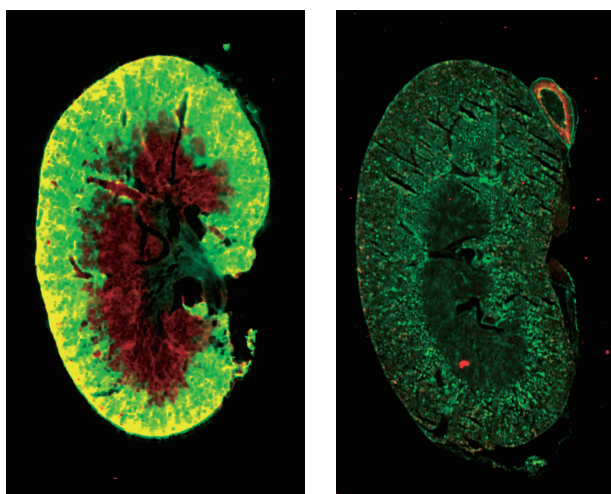


前立腺がん細胞株を皮下移植し、薬剤のターゲットデリバリーを Pearl Trilogy イメージングシステムで可視化した。

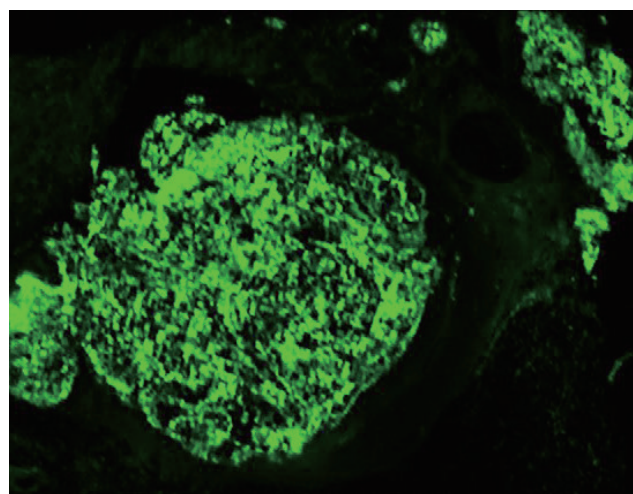


乳がん細胞株を同所移植し、IRDye で標識した薬剤のターゲットデリバリーを Pearl Trilogy イメージングシステムで可視化した。

Ex Vivo Imaging



Odyssey イメージングシステムによる腎臓の組織マクロイメージング。2種類の薬剤の組織への取り込みを可視化した。



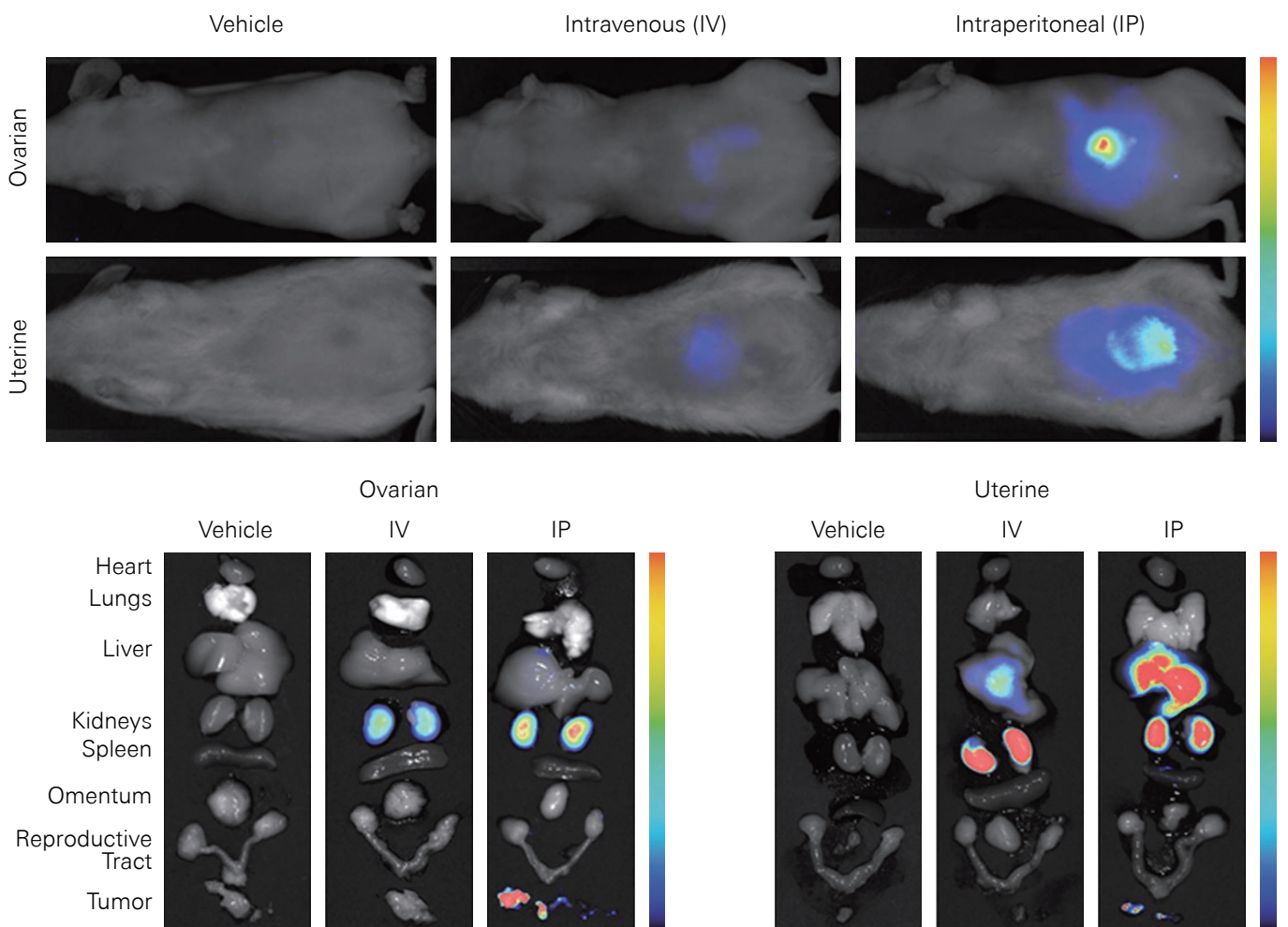
Odyssey イメージングシステムで取得した腫瘍組織の画像

ナノパーティクルに内包させた siRNA のターゲットデリバリーと生体内分布を近赤外蛍光イメージングで評価

AXL タンパク質を標的とする siRNA をペプチド・ナノ粒子内包させ、ターゲットデリバリーと生体内分布を近赤外蛍光イメージングで評価した。

AXL タンパク質は卵巣がんおよび子宮がんの重要な治療標的ですが、AXL タンパク質の発現をノックダウンする siRNA を開発し、その生体内分布を Pearl® Trilogy イメージングシステムを用いた近赤外蛍光 in vivo イメージングと ex vivo イメージングで評価しました。

siRNA とペプチド・ナノ粒子 (p5RHH) の複合体を近赤外蛍光試薬で標識し、腫瘍細胞を移植したモデルマウスに投与して、in vivo イメージングを行いました。エンドポイントでマウスを解剖し ex vivo による臓器イメージングと組織切片イメージングで生体内分布をさらに詳細に解析しました (組織切片イメージングのデータはここに掲載していません)。



上段) 卵巣がん細胞株 (OVCAR8) を移植したマウスと子宮がん細胞株 (ARK1) を移植したマウスの in vivo イメージング画像 (どちらの細胞株も腹腔に投与)。それぞれ、近赤外蛍光標識した p5RHH-siRNA を静脈投与 (IV) したマウスと腹腔投与 (IP) したマウスを PBS 投与したコントロールマウス (Vehicle) と比較。腹腔投与したマウスで腫瘍移植部位に強いシグナルが認められる。

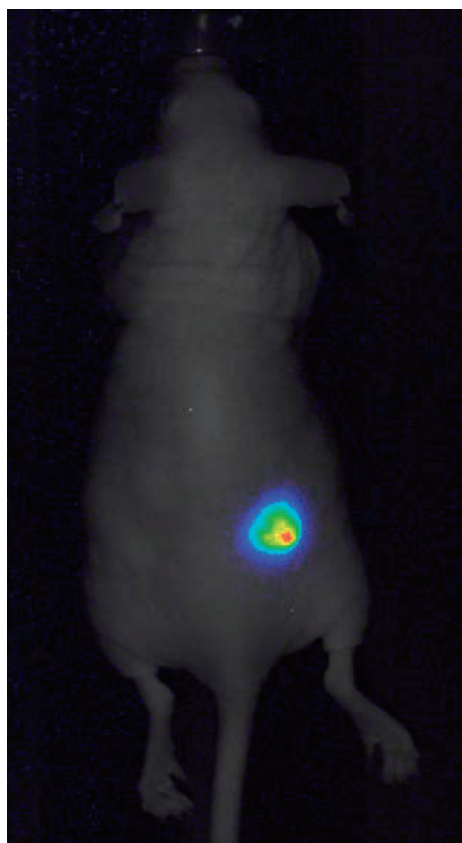
下段) Ex vivo による臓器イメージング画像。腎臓あるいは肝臓に強いシグナルが認められ、p5RHH-siRNA が腎臓や肝臓を通してクリアランスされることがわかる。

アプリケーション例 ⑧

薬剤の抗腫瘍活性の in vivo イメージング解析

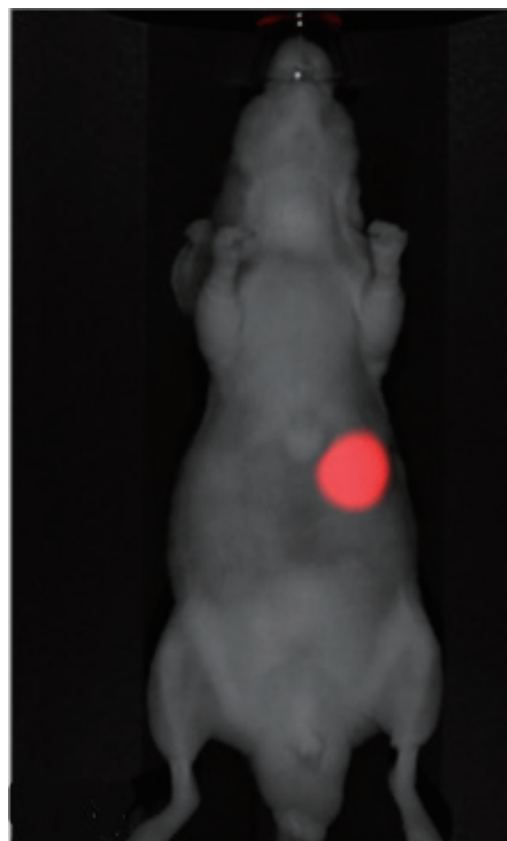
固形がんに対する薬剤の抗腫瘍効果の評価は、皮下移植モデルあるいは同所移植モデルマウスで行います。皮下移植モデルでは腫瘍サイズをノギスで計測することが可能です。しかし同所移植モデルではイメージングによる計測が必要です。同一の個体から腫瘍サイズを経時的に比較するためには、タイムポイント間で同じ露光設定で撮影を行う必要があります。Pearl®Trilogy イメージングシステムは6桁以上のダイナミックレンジを持ち、この目的を容易に達成することができます。Pearl Trilogy イメージングシステムはルシフェラーゼ発現細胞を用いた生物発光撮影、近赤外蛍光タンパク質発現細胞を用いた近赤外蛍光撮影のどちらも可能です。

生物発光



ルシフェラーゼ発現乳がん細胞を皮下移植したヌードマウスの生物発光 (BLi) 画像。ルシフェリン (基質) の静脈注射後に撮影。

近赤外蛍光



iRFP (近赤外蛍光タンパク質) を発現するメラノーマ細胞株を静脈注射して肝転移を起こさせたヌードマウスの近赤外蛍光画像。

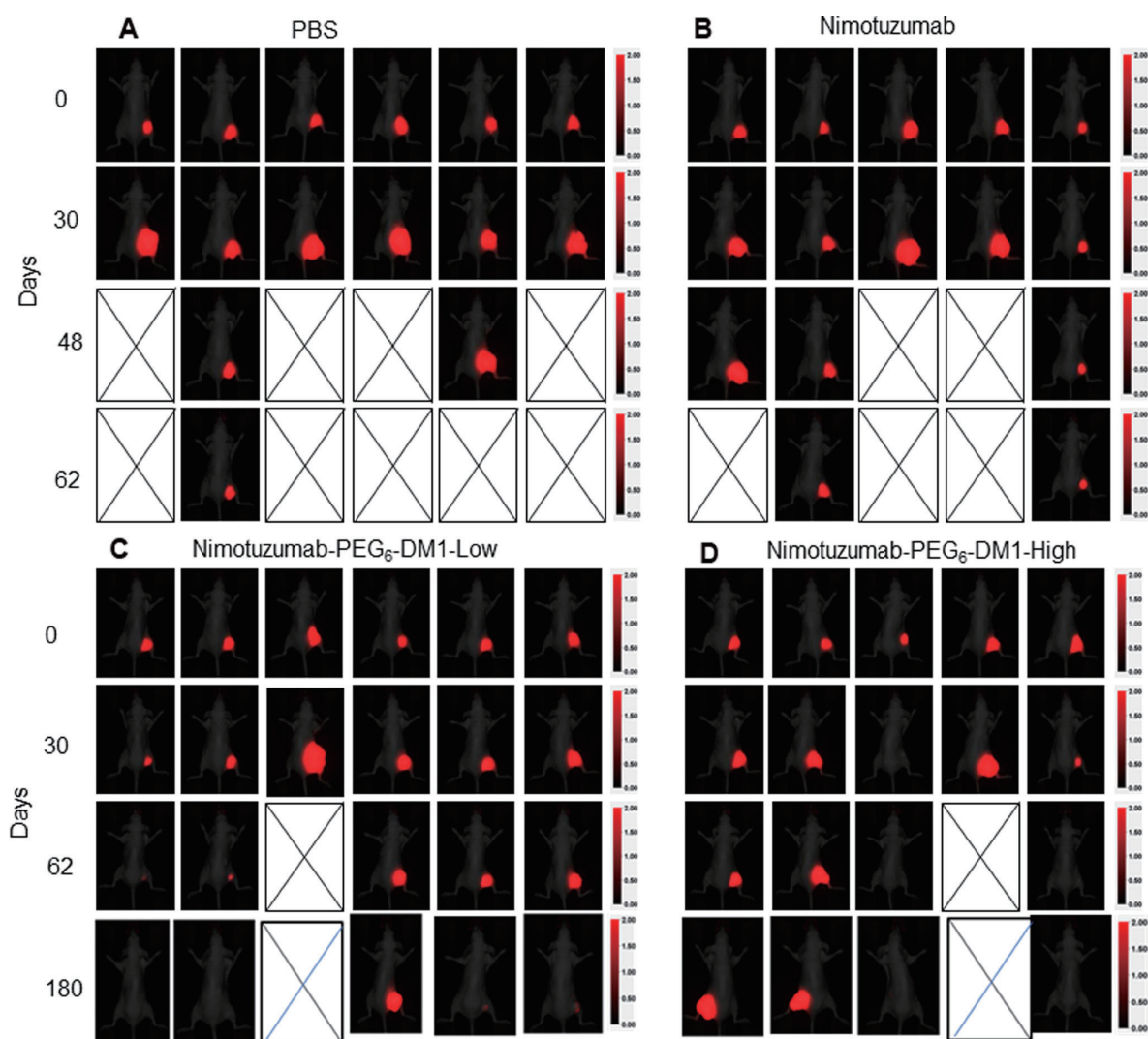
抗体薬物複合体（ADC）の抗腫瘍活性を 近赤外蛍光タンパク質 iRFP 発現細胞を用いた in vivo イメージングで解析

近赤外蛍光タンパク質 iRFP を発現する腫瘍細胞をマウスに移植し、EGFR をターゲットとする抗体薬物複合体（ADC）の抗腫瘍活性を近赤外蛍光 in vivo イメージングでモニタリングしました。

抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugates; ADC）は、低分子の化学療法剤と抗体医薬品のそれぞれ強みを活かすことができる新しいタイプの分子標的治療薬で、近年急速に開発が進んでいます。

この例では、EGFR を標的とする抗体医薬品 Nimotuzumab にペイロード（低分子薬剤）として PEGylated-maytansine をリンカー結合させた ADC の抗腫瘍活性を近赤外蛍光 in vivo イメージングで評価しました。

近赤外蛍光タンパク質 iRFP を発現する EGFR 陽性がん細胞を皮下移植した Xenograft モデルに、ADC あるいは Nimotuzumab 単剤を投与して腫瘍サイズの変化とマウスの生存率を調べました。



iRFP を遺伝子導入した DLD-1 細胞（DLD-1-iRFP-702）の皮下移植モデルマウスを用いた抗腫瘍活性のインビロイメージング

A) PBS（コントロール）

B) Nimotuzumab 単剤

C) ADC : Nimotuzumab-PEG₆-DM1（DAR: Low）

D) ADC : Nimotuzumab-PEG₆-DM1（DAR: High）

測定機器・ソフトウェア・試薬



イメージングシステム

	 Odyssey® M	 Odyssey F	 Pearl® Trilogy
装置概要	<ul style="list-style-type: none"> • 蛍光に加えて可視蛍光による撮影も可能なスキャナータイプの in vitro 生体分子イメージャー。化学発光撮影や明視野イメージングにも対応し、1 台で非常に多くのアッセイが可能です。 	<ul style="list-style-type: none"> • 蛍光専用のスキャナータイプの in vitro 生体分子イメージャー。2 レーザーモデルと 4 レーザーモデルがあります。2 レーザーモデルは 2 波長、4 レーザーモデルは 3 波長による蛍光ウェスタンロットと In-Cell Western アッセイが可能です。 	<ul style="list-style-type: none"> • 近赤外蛍光検出と生物発光検出の両方が可能な実験小動物用イメージングシステム。近赤外蛍光プローブや近赤外蛍光タンパク質発現細胞による in vivo イメージングとルシフェラーゼ発現細胞によるイメージングが可能です。
対应用途	<ul style="list-style-type: none"> • 蛍光ウェスタンロット • In-Cell Western™ アッセイ • On-Cell Western™ アッセイ • ELISA • 細胞増殖アッセイ • ex vivo イメージング • 組織切片イメージング (5 μm) など 	<ul style="list-style-type: none"> • 蛍光ウェスタンロット • In-Cell Western アッセイ • On-Cell Western アッセイ • ex vivo イメージング • 組織切片イメージング (21 μm) など 	<ul style="list-style-type: none"> • 近赤外蛍光 in vivo イメージング • 生物発光 in-vivo イメージング • 臓器イメージング
特徴と利点	<ul style="list-style-type: none"> • >6 桁のダイナミックレンジによる再現性の高い画像取得 • レーザー励起による低バックグラウンド & 高感度な画像スキャン • 撮影エリア全域で均一な画像取得 • 最大 3 波長によるマルチカラー蛍光ウェスタンロット実験と In-Cell Western アッセイに対応 • 最大 5 μm の解像度で組織切片スライドのスクリーニングが可能 	<ul style="list-style-type: none"> • >6 桁のダイナミックレンジによる再現性の高い画像取得 • レーザー励起による低バックグラウンド & 高感度な画像スキャン • 撮影エリア全域で均一な画像取得 • 最大 3 波長によるマルチカラー蛍光ウェスタンロット実験と In-Cell Western アッセイに対応 (4 レーザーモデル) 	<ul style="list-style-type: none"> • レーザー励起による高感度蛍光イメージング • >6 桁のダイナミックレンジで、撮影タイムポイント間で露光設定を変えずに撮影が可能 • 撮影エリア全域で均一な画像取得 • シンプルな操作性



ソフトウェア




	 Empiria Studio®
装置概要	<p>信頼性の高い数値化解析を行うための機能が搭載された次世代の画像解析ソフトウェア。主観性の少ない再現性の高い定量解析を実現。各種のバリデーション解析機能やアッセイ最適化解析機能により、得られるデータに確実性を担保できます。また、統計解析とグラフ化まで一つのソフトウェアで短時間で行うことができます。</p>
対应用途	<ul style="list-style-type: none"> • 定量ウェスタンロット • In-Cell Western アッセイ • On-Cell Western アッセイ • ELISA • 細胞増殖アッセイ • 組織切片スライド など



Consistency and Speed Without Compromise

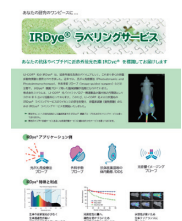
LI-COR社は、セルシグナリング研究と標的タンパク質の発現解析から前臨床バリデーション試験まで、再現性の高い高品質なデータを得るための実験機器、ソフトウェア、試薬、実験プロトコルおよび解析サービスを提供しています。アカデミアにおける新たな創薬標的の発見から前臨床開発まで、次の創薬ステップへの意思決定を確実なデータをもとに自信をもって行っていただくためのお手伝いをいたします。

☀️ アッセイ試薬

	 蛍光ウェスタンプロット	 In-Cell Western™ アッセイ	 近赤外蛍光 in vivo イメージング
対応試薬	<ul style="list-style-type: none"> • IRDye® 近赤外蛍光標識二次抗体 • Revert™ 520/700 総タンパク質ノーマライゼーション試薬 • Intercept® ブロッキングバッファー • Chameleon® 分子量マーカーなど 	<ul style="list-style-type: none"> • IRDye 近赤外蛍光標識二次抗体 • VRDye® 可視蛍光標識二次抗体 • CellTag™ 520/700 総細胞数ノーマライゼーション試薬 • Intercept ブロッキングバッファー • CellTag 520/700 ICW キット 	<ul style="list-style-type: none"> • IRDye 近赤外蛍光試薬 • IRDye ラベリングキット • CellVue® 細胞ラベル試薬 • BrightSite™ 近赤外蛍光ターゲットイメージング試薬

🧑‍🔬 サービス

NMI TT Pharmservices 社との提携による DigiWest® ハイコンテントプロファイリングサービスに加えて、国内で IRDye のラベリングサービスをご提供しています。



📄 サポート

長年の経験に裏打ちされた実験プロトコルと経験豊富なスタッフによるテクニカルサポートをご提供しています。



Make decisions with confidence without delay and without hesitation.

ご興味をお持ちの方はこちらまでご連絡ください

li-cor@scrum-net.co.jp

さらなる情報をお求めの方へ

本カタログの内容についてさらなる情報をお求めの方に、いくつかのコンテンツをご紹介します。

Odyssey® シリーズ
製品カタログ



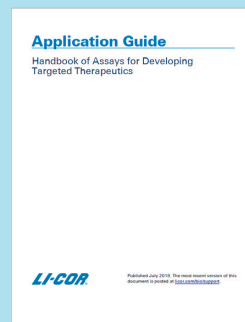
Odyssey シリーズ
蛍光ウェスタンブロット
カタログ



Odyssey シリーズ
アプリケーションガイド



Handbook: Assays for
Developing Targeted
Therapeutics (英語)



<https://www.licor.com/bio>

※ 本製品は試験研究用です。医療や診断目的にはご使用いただけません。
※ 価格、外観、仕様などは、予告なしに変更することがあります。
※ それぞれの商標や登録商標、製品名は各社の所有する名称です。

代理店

輸入元



本社 〒135-0014 東京都江東区石島 2-14
Imas Riverside 4F
Tel. (03)6458-6696 Fax. (03)-6458-6697
西日本営業所 〒532-0003
大阪市淀川区宮原5-1-3 NLC新大阪アースビル403
Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851
HP : www.scrum-net.co.jp

LC20241010