

オートファジー活性測定のための品質性能評価試験-ガイドライン-

1 オートファジー活性測定の定義

オートファジー活性測定とは、細胞におけるオートファジーフラックスの量、つまり単位時間あたりに観察されるリソソーム内の細胞質由来物質の分解量を生化学的に測定することである¹⁾。オートファジーフラックスを測定するには、細胞成分のオートファジー依存性の分解量を直接定量化するか、分解の累積量を表すことができるレポーターを使用する必要がある。

2 考慮すべき基本的事項

既報の研究はいくつかあるが、動物およびヒトでオートファジー活性を測定する手段については探索段階であり、標準的な方法は未だ確立されていない。このため、ヒトへの適用を前提とするのであれば、本来ヒトでのオートファジー活性測定方法に関する標準化を目指すべきであるが、まずは現在の科学水準において基準を定めることとする。よって、測定方法が確立されている培養細胞を用いた試験での評価方法を中心に規定を定める。今後の科学の進展に伴い、本規則はエビデンスに則った改訂を行う。

なお、オートファジー関連の構造体やタンパク質、mRNA 量の変化は参考情報ではあるが、それらはオートファジーフラックスを測定したことにはならない。例えば、オートファゴソームの数は必ずしもフラックスを示すものではなく、オートファジーの誘導によって、あるいはリソソームによるオートファゴソームの消費の減少によって増加する可能性がある。これはリソソームの機能障害によっても起こりうるものであり、オートファジーフラックスの測定のようにオートファジー活性を直接的に示すことはできない。

3 オートファジー活性測定のための品質性能評価試験

3.1 培養細胞を用いた試験の概要

細胞におけるオートファジー活性測定のための培養細胞を用いた標準的な生物学的アッセイ方法としては、下記(3.2)が挙げられる^{1,2)}。以下の評価法の中のどれかを用いて、被験物質を添加した際のオートファジー活性評価を行う。

3.2 測定方法の種類

< 遺伝子導入を行う手法 >

- ・ HaloTag-LC3B プロセッシングアッセイ法
- ・ RFP-GFP-LC3 (tfLC3) レポーター法
- ・ GFP-LC3-RFP(-LC3 Δ G) レポーター法

※上記二種類のレポーター法の活性評価手法としては、ウェスタンブロット法もしくはフローサイトメトリー法、マイクロプレートリーダー法を推奨する。また、顕

微鏡法を用いる場合は手動ではなく自動カウントを前提とする。

- ・ GFP-LC3 フローサイトメトリー法

※タンパク質の変化が転写誘導によるものでないことを確認する必要がある。

- ・ Keima-LC3 法

※顕微鏡法は、手動ではなく自動カウントを前提とする。活性評価手法として、フローサイトメトリー法を推奨する。

<遺伝子導入を行わない手法>

- ・ 基質ターンオーバー法

※タンパク質量の変化が転写誘導によるものでないことを確認する必要がある。

※3.2 測定方法の種類 全体への注釈

※顕微鏡画像を手動で評価する場合は（ドットの数のカウントなど）、サンプルをブラインド化し、主観によるバイアスを排除して行う必要がある。

※遺伝子導入を行う場合は、安定発現株の同一クローン細胞の使用を推奨する。

※上記手法に準ずる他の手法は、それら手法についての論文の妥当性を科学的根拠をもとに説明し、日本オートファジーコンソーシアムが認めるアカデミアのオートファジー専門家が指名したレビューアの検証により判断する。

3.3 標準的な測定実施法

測定を実施する際には、以下の点を考慮して行う。

3.3.1 測定体制

測定を適正に実施するために、その測定に責任を負う「測定責任者」を定めるとともに確実に実施できる体制を構築する。

3.3.2 測定結果の信頼性

転記・表示ミスを防ぐ、適切な研究データの品質管理体制を構築する。
各測定方法に推奨される測定回数を実施する。

3.3.3 数値の表記

数値の表記は、JIS の表記等に従うことが望ましい。また表記単位は SI 物理単位等を採用する。

3.3.4 器具の校正

マイクロピペットや計量器具や検出装置など器具の感度については、機器の性能保守が確実に行われていなければならない。データの収集、処理、測定又は解析に使用する機器については、テスト、校正、標準化のうち、

必要なものを使用目的に応じた適切な方法と頻度で実施する必要がある。一例として、天秤やマイクロピペットなど、その測定と評価に影響する重要な機器については定期点検並びに使用時点検を行い、その点検記録を保存する。点検頻度や精度については、非 GLP 試験の信頼性確保における基本要素を抑えることが望ましい。

3.3.5 標準物質

試薬の品質管理、純度、濃度や被験物質（関与成分）の定量方法、サンプルなどを保管する冷蔵庫、冷凍庫の温度管理記録も被験物質、サンプルの品質を保証するうえで必要な根拠資料であるため適正な保管が求められる。温度管理記録には、経時的に庫内温度をモニターする温度モニター記録と最高/最低温度計による測定記録があるが、温度モニター記録が望ましい。一例として冷蔵庫の設定温度範囲を逸脱した場合、最高/最低温度計ではその逸脱時間がどの程度であったか確認できないため冷蔵庫に保存している被験物質等の品質を保証できないリスクがある。これらの記録追跡とその保管を担保する体制が求められる。

3.3.6 品質性能評価試験成立条件

試験実施の際には、細胞生存率を測定し、被験物質の細胞毒性を確認する。また、ラパマイシン、トリン 1 等をオートファジー誘導に関する陽性対照、またワルトマニン、バフィロマイシン A₁ 等を阻害に関する陽性対照物質として用いる。被験物質の溶媒を陰性対照として用い、オートファジー活性に対して溶媒の影響がないことを確認する。

3.3.7 技能確認試験の導入

手技、器具や装置の操作技術の妥当性の確認
測定者による測定結果を標準（認証値、信頼限界）と照らす

3.3.8 資料保存

品質性能評価試験関係資料は、後日試験の再現性を確認するための試験の再構築に必要なため、保存しておかなければならない。試験関係資料には、試験計画書、試験報告書、試験操作記録、測定・解析結果などの生データ・標本のほか、機器管理に関する記録も含まれる。資料保存に関して注意すべきことは以下の 3 点である。

- 資料の紛失・散逸の防止
- 資料の混同、改ざんの防止

○資料の損傷・劣化の防止

資料の保存管理において、資料保存管理責任者を置くことや、キャビネットの施錠管理も含めた管理体制構築精度については、非 GLP 試験の信頼性確保における基本要素を押さえることが望ましい。即ち正確性、網羅性、保存性をその科学的基準に則り実施することとする。

3.3.9 文書化と教育

3.3.9-1 測定実施機関においては、ガイドラインに基づき測定手順を明文化しておかねばならない。

3.3.9-2 測定実施機関において責任者および測定者は、測定手順を踏まえた所定の教育訓練を受け、また測定者においては技能確認試験の合格を得る必要がある。

3.4 オートファジー活性の有無に対する解析と評価

評価する被験物質を試験する際には適切な試験計画書(仮説、対照群の設定や用量の設定根拠を含む試験デザイン、仮説に応じた統計解析手法を含んだもの)を作成し、それに準拠して実施する。試験の目的及び立証したい試験の仮説を明確にして、その目的に応じた手法を十分に考慮する。

4 例外規定

in vitro 試験においてオートファジー活性亢進作用が認められない場合でも、*in vivo* 試験もしくはヒト臨床試験において被験物質投与によるオートファジー活性亢進が認められるという査読論文での報告がある場合は、それらの論文内容の妥当性を科学的な根拠として説明し、認証事務局が当該参照論文の記載に係る専門性等を考慮し別途指定したレビュアーの検証により活性評価の妥当性を判断することで認証する。

5 参考文献

- 1) Mizushima N, Murphy LO. Autophagy Assays for Biological Discovery and Therapeutic Development. Trends Biochem Sci. 2020 Dec;45(12):1080-1093. doi: 10.1016/j.tibs.2020.07.006.
- 2) Yim WW, Yamamoto H, Mizushima N. A pulse-chasable reporter processing assay for mammalian autophagic flux with HaloTag. Elife. 2022 Aug 8;11:e78923. doi: 10.7554/eLife.78923.