

XF Hu T Cell 活性化アッセイキット を用いた ヒトT 細胞活性化の リアルタイムな検出とモジュレーション

Authors

Yoonseok Kam, Lisa P. Winer,
George W. Rogers, and
James Hynes
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Agilent Seahorse XFテクノロジーは、細胞のエネルギー代謝に関するリアルタイムな洞察を提供し、T細胞の活性化と機能の研究にとって重要です。この有用性は、XF Hu T Cell活性化アッセイ – ヒトT細胞における初期の活性化に関連する代謝の応答を計測するための迅速かつ標準化された方法を提供する – によって現在拡張され、活性化の初期のダイナミクスと、そのより幅広い代謝の基礎に対する重要な洞察を提供します。XF Hu T Cell活性化アッセイのワークフローは、可溶性CD3/CD28アクチベーター、プレコートされた Poly-D-Lysine (PDL) XF細胞培養プレート、そして直観的な、クラウドベースのデータ解析ツールである Agilent Seahorse Analyticsを取り入れています。XF Hu T Cell活性化アッセイは、T細胞活性化と関連する代謝のリプログラミングを研究するために、便利な一貫したソリューションを提供し、2つの主要な実験のデザイン：T細胞活性化を試験するための標準アッセイと、naïveまたは予め活性化されたT細胞におけるT細胞活性化に対する試験化合物の急性の調節的な効果を調査するためのモジュレーションアッセイをサポートします。このアプリケーションノートは、これらの別々のアッセイデザインの概要と、T細胞の免疫学と代謝の文脈においてこれらの方法をどのように適用するかを説明するアプリケーション例を提供します。このような事例は、免疫細胞療法と創薬にとって重要です。

Introduction

Agilent Seahorse XFテクノロジーは、XFアナライザー、センサーカートリッジ、アッセイキット、直観的なソフトウェアをシームレスに組み合わせた、ラベルフリーの統合されたプラットフォームで、リアルタイムなカイネティクスを含む機能的な細胞代謝のデータを供給します。Agilentは、このプラットフォーム上に組み込んだ多様なXFアッセイキットを供給し、細胞機能の幅広い評価から代謝の特性の詳細まで、完全な範囲の情報を提供しています。特に、生きた細胞の解糖活性は、細胞外酸化速度 (ECAR) の計測と、その後の乳酸産生速度と相関するプロトン流出速度 (PER) の算出を介して、XFアッセイで容易に評価することができます^{1,2}。

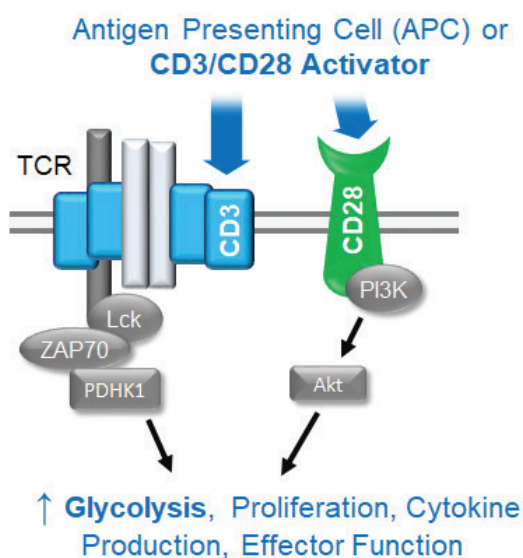


Figure 1 : APCまたはCD3/CD28アクチベーターは、T細胞の解糖増加を誘発する。APCまたはCD3/CD28アクチベーターによる活性化に応じて、T細胞受容体 (TCR) とCD28リガンドからのシグナルは、さまざまなキナーゼを含むシグナリング・カスケードによって伝達され、結果として、解糖の即時の増加と、以降の増殖、サイトカイン産生、関連するエフェクター機能、長期間にわたる代謝的な変更をもたらす。

リアルタイムの解糖の変化を計測するこの能力は、特にT細胞の活性化の文脈において強力です。T細胞の活性化において、解糖活性の初期の急速な増加は典型的な活性化イベントとして認識されて、その後のT細胞の増殖と分化にとって重要です。解糖のこの即時の増加は、*in vitro*でのT細胞活性化のために一般に用いられるCD3およびCD28リガンドを共同刺激する可溶性T細胞アクチベーターの *in situ* 注入を通して、リアルタイムに捕えることができます (Figure 1)³⁻⁶。この利用しやすい、効率的なアッセイは、生きた細胞でのT細胞活性化のリアルタイム・モニタリングとモジュレーションを可能にします。そして、遺伝子発現、細胞増殖またはサイトカイン産生を計測する直交法によっては一般的に得ることのできない異なるT細胞サブタイプ全体の活性化応答または、特定の薬剤もしくは遺伝子的介入に対する機能的な応答に対して、初期のウィンドウを提供します。

XF Hu T Cell 活性化アッセイキットは、簡単で信頼性が高いワークフローを介してヒトT細胞活性化を計測するようにデザインされています。リアルタイムなXF T Cell活性化アッセイのために、抗CD3および/または抗CD28抗体³⁻⁵または適切な抗体に結合したビーズを含む、APCを模倣したアクチベーターのいくつかの選択肢があります⁶。XF Hu T Cell 活性化キットは、ヒトCD3/CD28 T細胞リガンド・アクチベーターの四量体複合体である、可溶性の ImmunoCult Human CD3/CD28 T Cell Activator (STEMCELL Technologies) を利用しています。この方法は、準備時間の削減と注入能力の改善に関して、ビーズベースのアプローチに対して明白な強みを提供し、このことによってXFプラットフォーム上でのT Cell活性化計測の便利さ、信頼性と一貫性を増加させます。XF Hu T Cell 活性化キットはまた、付加的なアッセイ能力と便利さを助長する2つの更なるアッセイ構成要素を取り入れています：すぐに使えるPDLコーティング済のXF細胞培養用プレートは、アッセイ準備時間を減少させて、ウェルとプレート全体での一貫したPDLコーティングが確実にあります。用途の広い、クラウド・ベースのXFデータ解析ツールであるSeahorse Analyticsは、T細胞活性化アッセイ・データの解析と解釈を補助するために、便利でフレキシブルなデータ変換を提供します。このアプリケーションノートは、naïveおよび予め活性化されたヒトT細胞を用いた例を通して、XF PDL細胞培養プレートとSeahorse Analyticsと組み合わせたXF Hu T Cell 活性化アッセイキットのアッセイ・デザイン、能力、そしてアプリケーションの概要を提供します。

Experimental

材料

材料	販売者
初代CD4+ および CD8+ T 細胞, PBMC	STEMCELL Technologies または Hemacare
ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium	STEMCELL Technologies
Interleukin 2 (IL-2)	
Agilent Seahorse XF Hu T Cell 活性化キット (ImmunoCult Human CD3/CD28 T Cell Activator と 2-DG を含む)	Agilent Technologies
XFe96 PDL 細胞培養プレート	
XFe96 センサーカートリッジ	
XF キャリブレーション溶液	
XF RPMI 培地, pH 7.4	
XF グルコース	
XF ビルビン酸	
XF グルタミン	
Seahorse XFe96 アナライザー	
Human IL-2 DuoSet ELISA (DY202)	
Dasatinib	Millipore Sigma
Lck inhibitor	
96ウェル細胞培養プレート (ELISA用)	Corning
マイクロプレートリーダー	Tecan Group Ltd

細胞

Naïve T細胞活性化実験のために、ヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) (STEMCELL Technologies) から単離された凍結されたnaïve CD4+またはCD8+ T細胞を溶解し、メーカーの説明書に従って、ImmunoCult-XF T Cell Expansion Mediumで培養した。再活性化アッセイのために、naïve T細胞の部分は、ImmunoCult-XF T Cell Expansion Mediumにて、DynabeadsまたはImmunoCult Human CD3/CD28 T Cell Activatorを用いて6ウェルプレート上で活性化した。活性化後4日目に、Expansion Mediumに300U/mLのIL-2を添加し、活性化した細胞を20日後まで引き続き培養した。

ELISA

IL-2産生を測定するために、naïve T細胞の並列したセットをELISAでの調査のために従来の96ウェルマイクロプレート上に調製した。簡潔に書くと、naïve T細胞は、サプリメントを含まないImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium中に、 1×10^5 cells/wellの密度で懸濁した。CD3/CD28アクチベーター滴定 (Figure 5) のために、アクチベーター容量は、200 μ あたり2.5、5、10、20 μ Lに調製した。これらは相当するXF T Cell 活性化アッセイで用いられるウェルあたりのアクチベーター濃度と一致する。薬剤によるモジュレーション (Figure 8D) のために、細胞はdasatinibで30分間前処理し、その後10 μ LのCD3/CD28アクチベーターを添加した。活性化の後、細胞を72時間培養し、次に培地を回収した。各ウェルの培地サンプルは、マイクロプレートの遠心 (200 \times g、1分間) の後に回収した。IL-2レベルは、Human IL-2 DuoSet ELISA (DY202, R&D Systems) を用いて、メーカーの説明書に従い、450、540、570 nm において測定した吸光度を検出した (Spark, Tecan)。

細胞イメージング

明視野像は、細胞播種の後、直ちにXFイメージング・ノーマライゼーションシステムを用いて取得した⁷。

XF T Cell活性化アッセイ

すべてのXF T Cell 活性化アッセイは、センサーカートリッジ準備、PDLコーティング済マイクロプレート準備、細胞播種、化合物希釈に関して XF T Cell 活性

化アッセイユーザーガイド⁸に記載されている通りに実施しました。全体のアッセイ手順は、Figure 2にまとめられています。

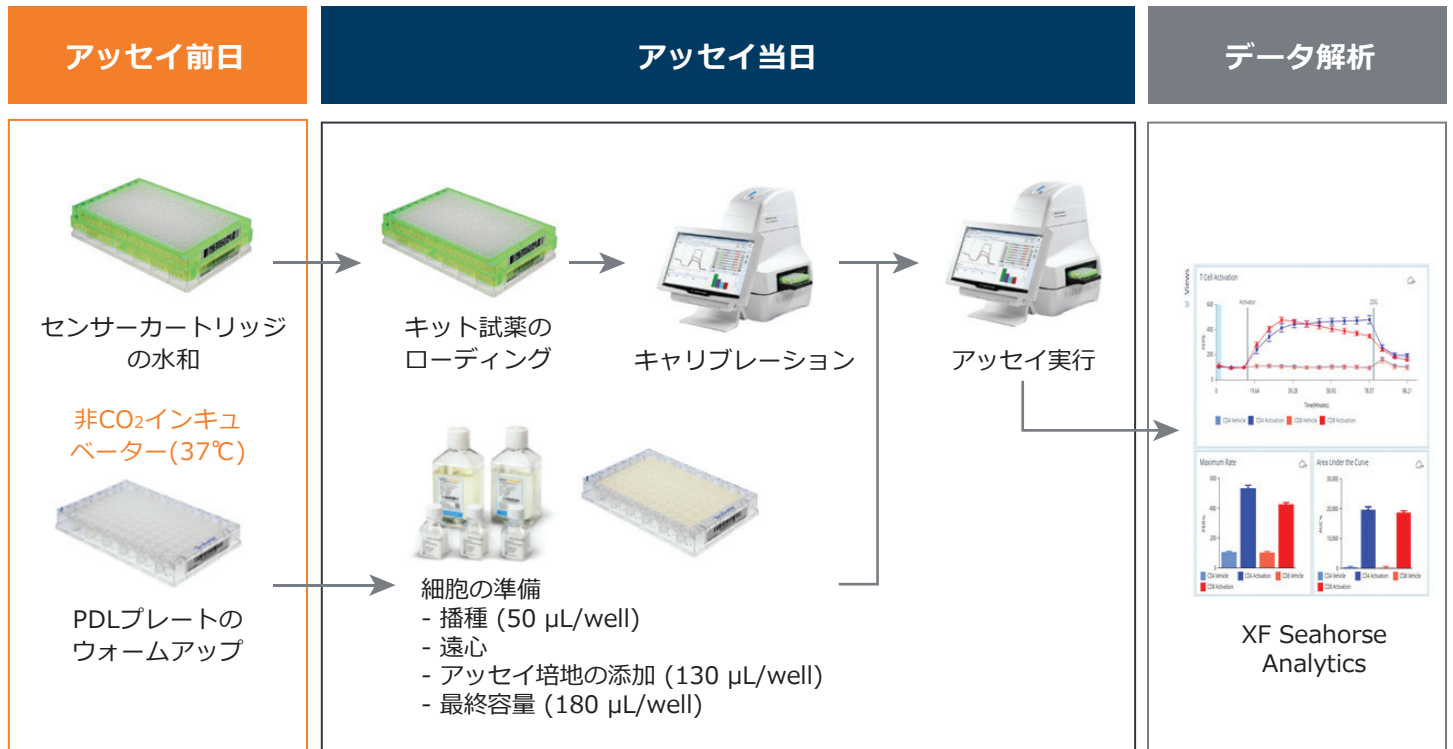


Figure 2 : T Cell 活性化アッセイワークフローの概要

XF T Cell 活性化アッセイの戦略とデザイン

Figure 3の略図は、XF Hu T Cell 活性化アッセイのデザインと、関連するデータ出力を要約しています。基底のECARを最初に確立し、次にCD3/CD28 アクチベーターを注入します。T細胞活性化によって誘発されるECARの増加を経時的にモニターし(一般的に測定サイクル10回で60分超え)、その後2-DGを注入して活性化に関連する解糖の増加を止めます。結果のECARデータは、WaveまたはSeahorse Analyticsによってプロトン流出速度 (PER (pmol/min))に自動的に変換されます (Figure 3)。

XF T Cell 活性化アッセイは、2つの実験デザインをサポートします: T細胞活性化を試験するための標準アッセイ (Figure 3A) と、T細胞活性化に対する試験化合物の急性の調節的な影響を調査するためのモジュレーションアッセイ (Figure 3B) です。標準アッセイは、2回の注入を含みます: CD3/CD28アクチベーターの注入後に2-DGの注入が続き、異なるドナーまたは介入(例えば、遺伝子および/または薬剤の介入)の適用を受けたT細胞の間で、T細胞活性化の潜在能力を比較するために用いることができます。モジュレー

ションアッセイは、CD3/CD28アクチベーター注入の前に試験化合物の追加的な注入を組み込み、これによってT細胞活性化の潜在能力に対する試験化合物の急性の調節的な影響を調べます。

XF Seahorse Analyticsを用いた XF T Cell 活性化アッセイのデータ解析

XF Seahorse Analyticsは、XF T Cell 活性化アッセイのための容易で効率的なデータ解析ツールを提供する、ウェブ・ベースのソフトウェア・プラットフォームです。Seahorse Analyticsの中のT Cell Activation Assay Viewは、まとめの表と3つのグラフ図: カイネティック・グラフ (PER vs 時間)、最大PER (pmol/minまたは%)の棒グラフ、そして活性化期に算出された曲線下面積 (area under the curve; AUC、pmolまたは%)の棒グラフ、を提供します。カイネティック・グラフはT細胞活性化ダイナミクスのリアルタイム評価のために用いられ、T細胞の応答の包括的な概要を提供します。最大速度 (最小二乗法best-fitを用いて算出された)は、異なるグループ/サンプルの間で活性化の大きさを

比較することに役立ちます (Figure 4A)。AUCは、T細胞活性化の潜在能力に関して、累積的な情報を提供しません (Figure 4B)。追加的な解析またはグラフ化のニーズのために、出力データはSeahorse Analyticsに含まれるデータ・エクスポート機能を用いてMicrosoft ExcelまたはGraphPad Prismファイル形式で出力することができます。

通常は、絶対的な速度データ (PER pmol/min) の解析からデータ評価を始めて、重要な情報の潜在的な損失を最小化することを勧めています。しかしながら、Seahorse Analyticsにおいて、カイネティック・トレースと最大速度データは、Baseline featureを用いて変換することができます⁹。この変換は、一般的にアクチベーター注入の直前に計測された速度に基づいて、絶対的なXF速度データを相対的な (%) スケールに変換します。これによって実験系列全体で相対的な比較を可能にし、細胞播種のわずかな違いによるウェル間の偏差を最小化します。

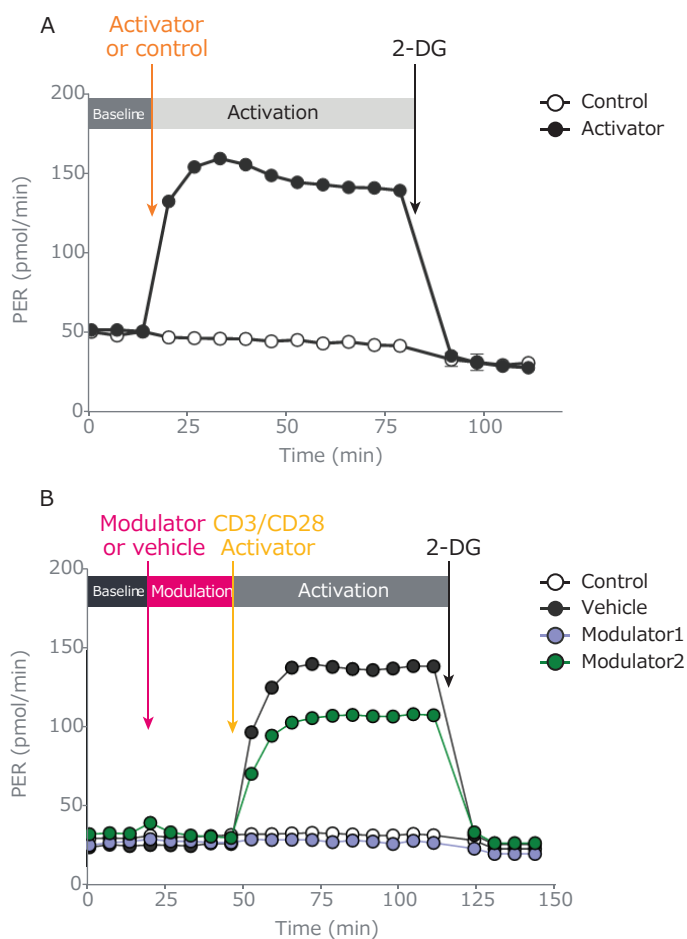


Figure 3. Agilent Seahorse XF Hu T Cell 活性化アッセイで CD3/CD28アクチベーターの注入に応じたT細胞の解糖の応答を標準アッセイデザイン (A) とモジュレーションアッセイデザイン (B) で計測した。解糖速度は、絶対的PER値 (pmol/min) またはベースラインに対する相対的な増加、PER (%) によって解析することができる。

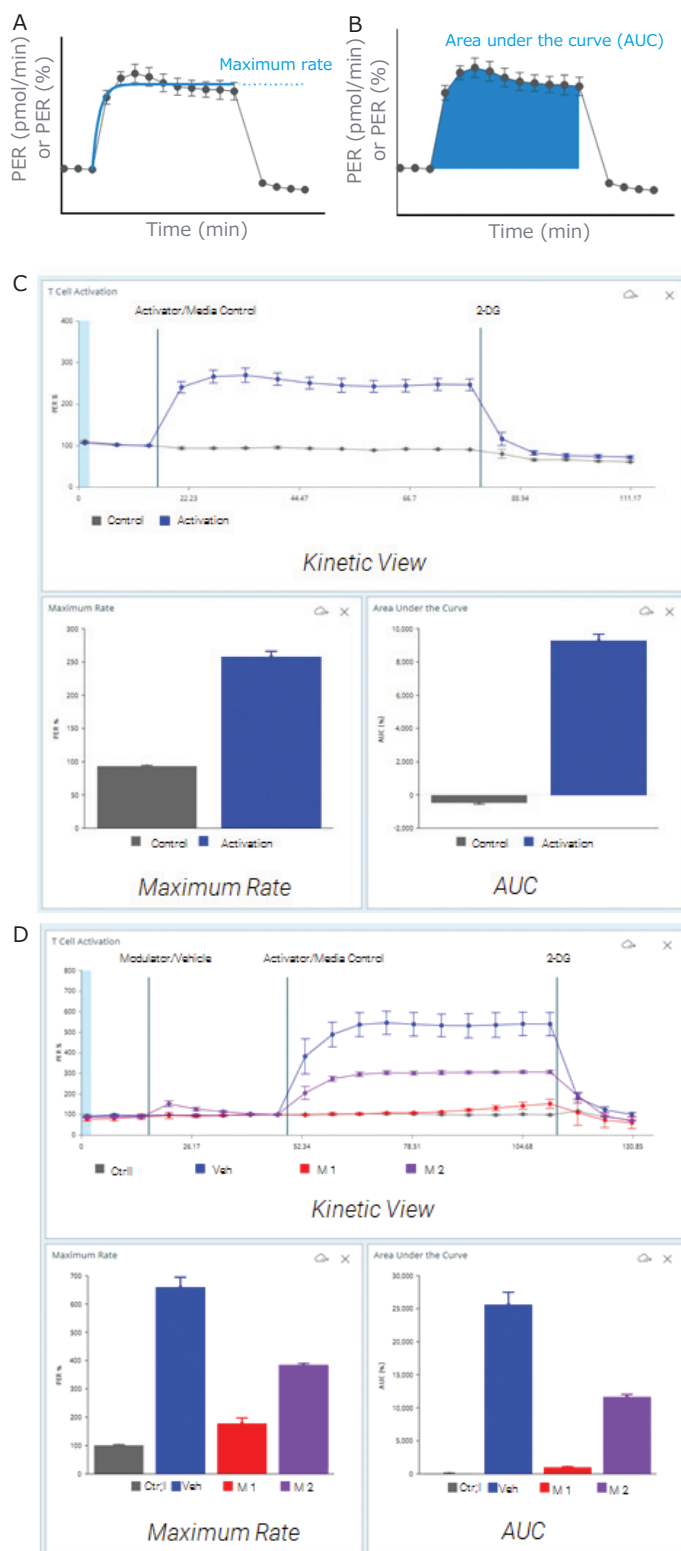


Figure 4. XF Seahorse Analyticsを用いたAgilent Seahorse XF Hu T Cell 活性化アッセイのデータ解析。(A)と(B)は、それぞれ、最大速度とAUCを算出する方法の略図である。(C)と(D)はそれぞれ、標準アッセイのデータとモジュレーションアッセイのデータに関するカイネティックグラフと、最大速度とAUCの棒グラフの例。

しかし、その有用性にも関わらず、有用な情報が変換に応じて失われる可能性があり、研究室間のデータ比較を可能にするための考慮が必要になるため、これを絶対的な速度の解釈の代用と考えてはいけません。従って、絶対値のレポートが推奨されます。

Results and Discussion

アクチベーターの評価と最適化

原理の最初の証明として、そして、最適アッセイ条件を確立するために、ImmunoCult CD3/CD28 アクチベーター試薬の容量を 2.5 ~ 20 μ L/well の範囲 (20 μ L/well のトータル注入容量) で naïve CD4+ T 細胞を用いて評価しました。Figure 5A のカイネティック・データは、アクチベーター用量が増加するにつれて解糖の反応が増加することを示しています。このデータは、10 μ L/well のアクチベーターが最大の持続性の活性化を達成するために十分であることも示唆しています。

T 細胞の活性化は直交 ELISA で、同じアクチベーター濃度を使用した細胞の平行したセットで IL-2 産生を測定することによって確認しました (Figure 5D)。これらの ELISA データは、5 ~ 20 μ L/well のアクチベーター量で刺激される細胞の間で 72 時間に蓄積される IL-2 の差をほとんど示しません。対照的に、活性化後すぐに取得された XF データは、カイネティック PER トレース (Figure 5A) と最大速度、AUC 値 (それぞれ Figure 5B および 5C) で観察されるように、アクチベーター用量に相関した活性化パターンを示しました。従って、XF リアルタイムアッセイは、ELISA のような他のエンドポイント法ではできない、免疫のモジュレーションと有効性を計測して詳細に描写するユニークな方法の提供が可能です。

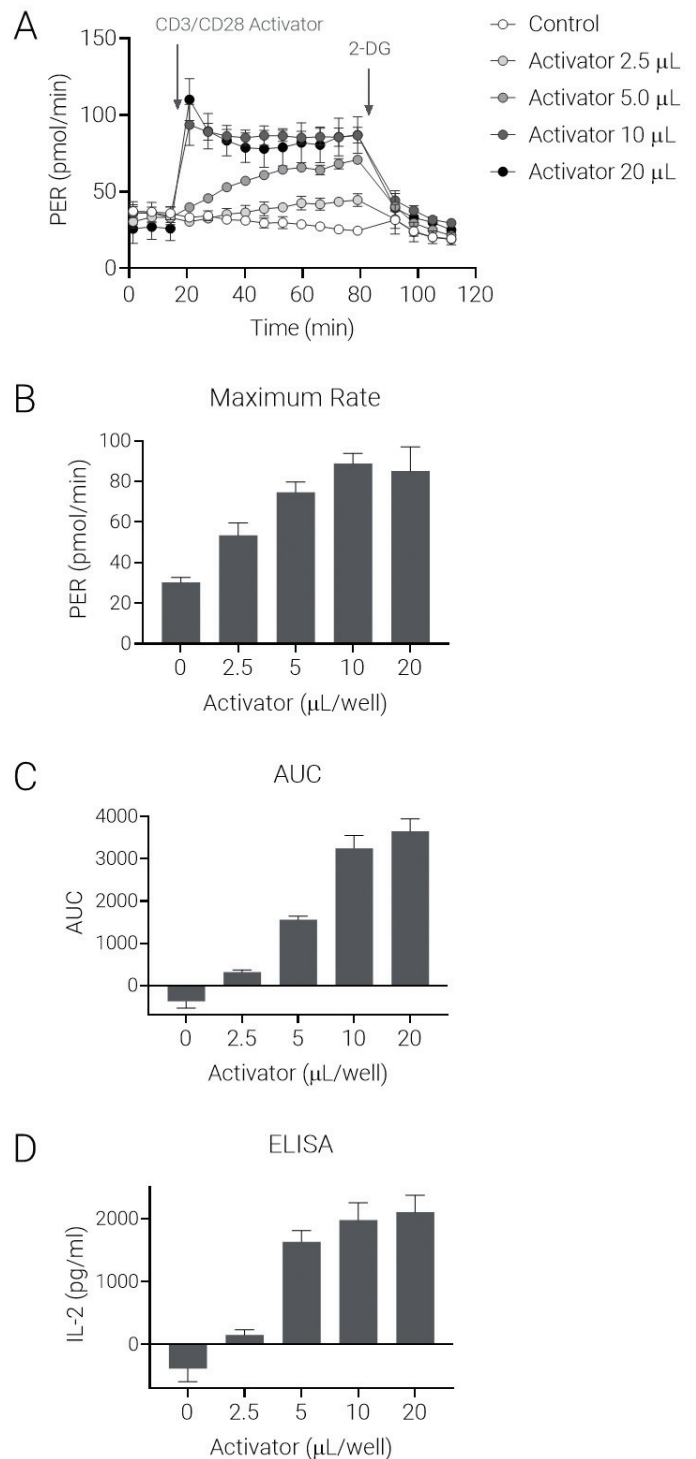


Figure 5. CD3/CD28 アクチベーターの量の変化させることによる naïve CD4+ T 細胞の活性化。アクチベーターのトータル注入容量はすべてのグループで 20 μ L/well に固定した。注入ポートにロードする前に 20 μ L 未満の容量のグループでは XF アッセイ培地でアクチベーターを希釈することによって、これを達成した。(A) 異なる投与量のアクチベーターの注入に応じた PER のリアルタイム変化を示すカイネティック・グラフ。(B) と (C) 異なるアクチベーター投与量における最大 PER と AUC 値。(D) 細胞活性化後 72 時間に集められた培地を用いた ELISA によって測定された、異なるアクチベーター投与量における IL-2 の産生。

T細胞の活性化潜在能力を評価するためのアプリケーション

T細胞の活性化ならびにその後の増殖と分化の機能は、代謝的に制御され、薬理的にモジュレートされる可能性があります。XF Hu T Cell 活性化アッセイは、異なる被験者由来のT細胞、または介入を受けたT細胞（例えば、遺伝子操作および/または慢性的な化合物暴露）の間で活性化の潜在能力や他の活性化の特徴を比較するために用いることができます。Figure 6はCD4+ とCD8+ T細胞の活性化を比較した簡潔な例を示しています。各細胞タイプは異なる、無関係な被験者由来であり、T細胞の活性化カインेटクスならびに最大速度とAUC値は絶対的なPER (pmol/min) と相対的 (%) 値を用いて比較しました。CD4+ とCD8+ 細胞のいずれも、CD3/CD28 アクチベーターの注入に応じたPERの増加、その後の2-DGの注入によるPERの減少を示しました。

絶対的なPERの解析は、CD4+ 細胞がCD8+ 細胞よりも高い基底速度と、活性化に誘発された高い最大値を示したことを示唆します (Figure 6A と B); しかしながら、XF イメージング・ノーマライゼーションシステム (Figure 6C) を使用して得られた位相コントラスト画像は、絶対的なPERのこれらの違いが主にウェルあたりの細胞数の違いによることを説明しています。これは、絶対的なPER値が相対的 (%) スケールに変換されるとき、最大速度の相対的な違いが存在しないという観察によって更にサポートされます。このことは、CD4+ とCD8+ 細胞には類似の活性化潜在能力があることを示唆し、ベースラインのノーマライゼーションの有用性を強調しています。加えて、両方の絶対的な値の % データは、CD4+ 細胞が計測の期間に解糖活性の上昇を維持した一方でCD8+ 細胞のPERの上昇は活性化後20~30分にわずかに減弱されたように、異なった動力学的挙動を示唆しています。

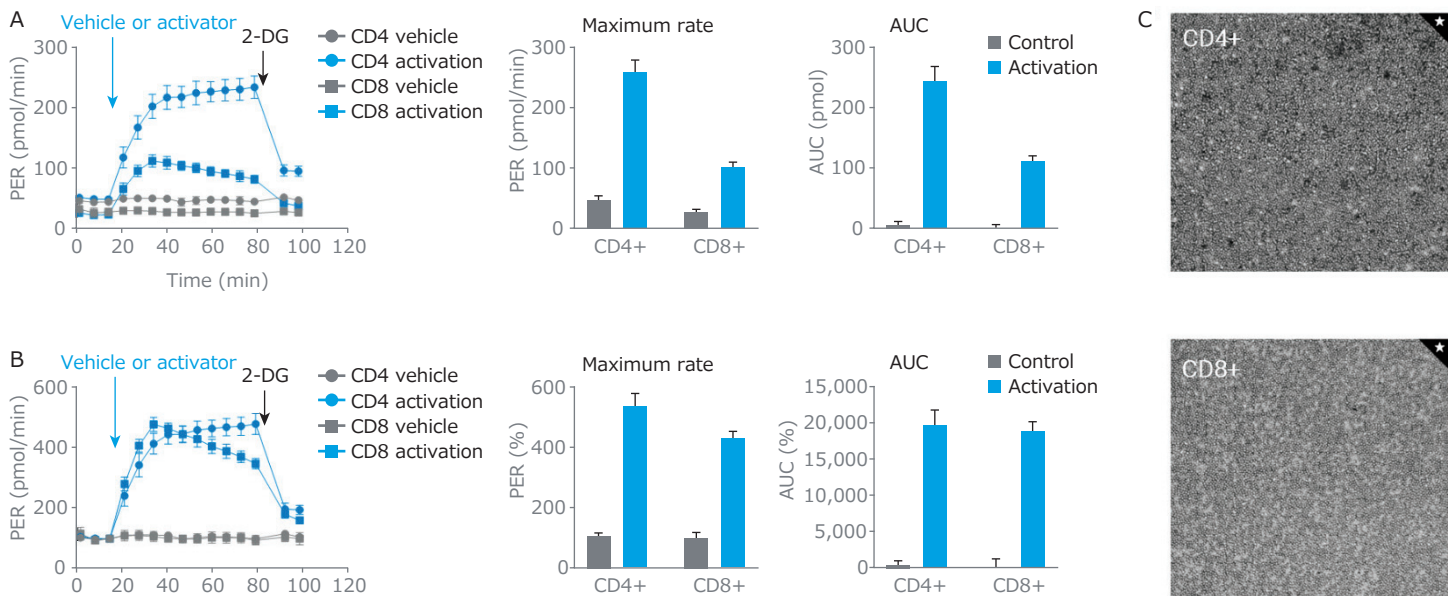


Figure 6. ベースラインのノーマライゼーション有または無しのXF T細胞活性化アッセイ・データ。Naïve CD4+ とCD8+ T細胞は、標準アッセイプロトコルによって活性化され、データは (A) 絶対的なPER (pmol/min)、(B) 相対的なPER (最後の基底の速度計測と比較した % 変化) としてプロットした。細胞播種条件は、XF イメージング・ノーマライゼーションシステム (C) の明視野イメージング機能を用いて比較した。

T細胞活性化モジュレーターに対する影響を計測するためのアプリケーション

XF Hu T Cell 活性化アッセイは、標準またはモジュレーションアッセイデザインのうちどちらによっても、T細胞活性化に関する薬物の急性の影響を調べるために用いることができます。Lck は、T細胞受容体複合体に含まれる広く知られたチロシンキナーゼです。これは、受容体から下流のカスケードへと初期の活性化シグナルを伝達します (Figure 1)。近年、元々は抗癌剤として開発された Bcr-Abl キナーゼ阻害剤である dasatinib が Lck の抑制を介した CAR-T 細胞活性化モジュレーターとしての可能性があることが報告されています¹⁰。活性化の薬理的なモジュレーションの評価における XF Hu T Cell 活性化アッセイの有用性を実証するため

に、T細胞活性化に対する dasatinib と Lck 阻害剤の影響を計測しました。効果的な薬剤濃度を決定するために、あらかじめ活性化させておいた CD4+ T細胞を T細胞活性化アッセイの前に 30 分間、増加させた化合物量で前処理しました。Figure 7 は、T細胞活性化が dasatinib と Lck 阻害剤によって用量依存的な様式で抑制されたことを示しています。カイネティック・データは、Seahorse Analytics を用いて最大速度と AUC 値に容易に変換することができ、追加的な解析のために Microsoft Excel または GraphPad Prism にエクスポートすることができます。Figure 7 は用量依存的カーブの例で、Seahorse Analytics からエクスポートされた最大速度と AUC 値を用いて GraphPad Prism ソフトウェアによって算出した IC₅₀ 値を含んでいます。

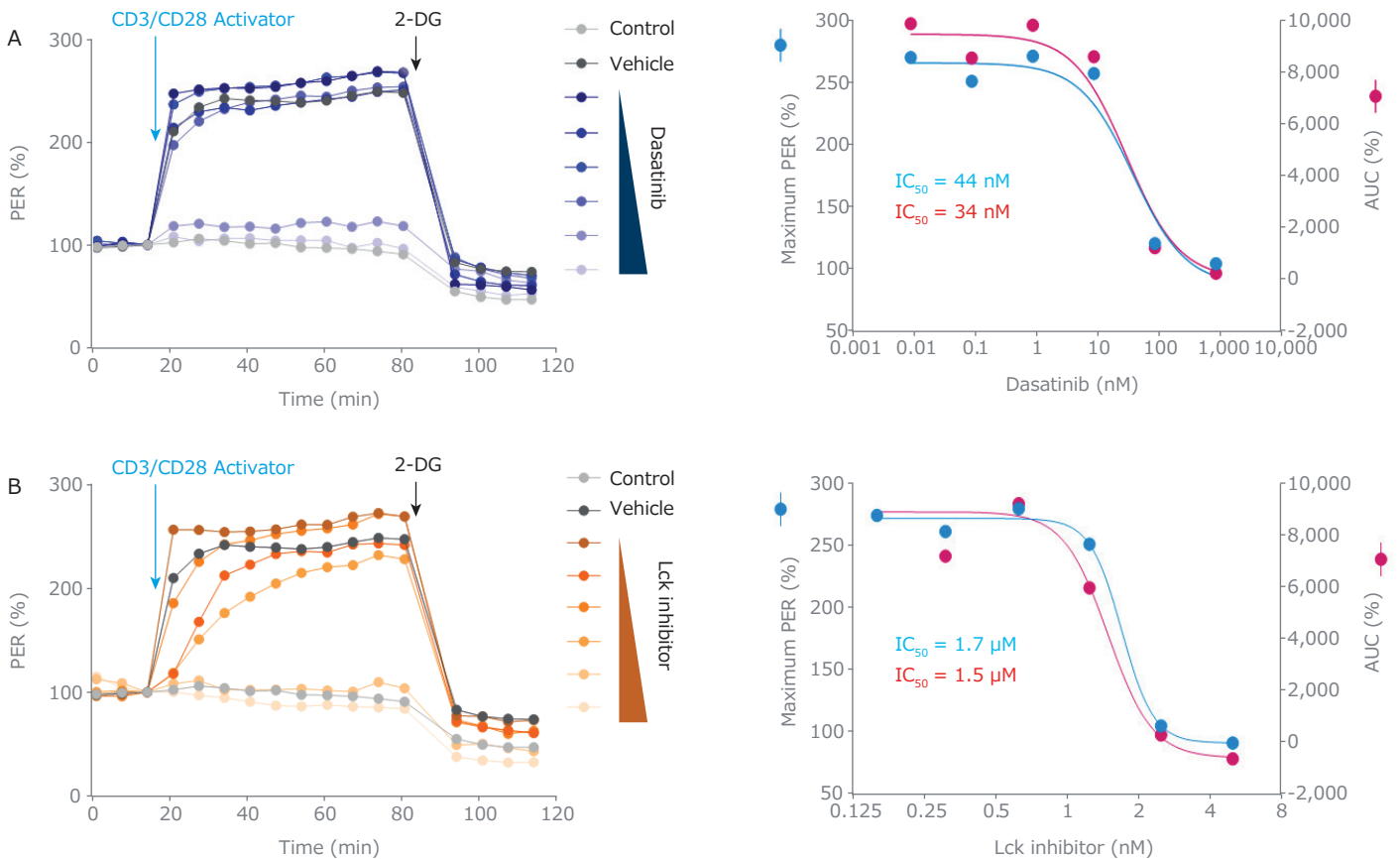


Figure 7. T細胞活性化のサブレッサーの特性評価。予め活性化させた CD4+ T細胞は、活性化アッセイの前に 30 分間、様々な濃度の dasatinib (A) または Lck 阻害剤 (B) で前処理した。% 最大 PER と % AUC 値 (左のパネル) は、Agilent Seahorse Analytics で算出し、薬剤濃度に対してプロットした。投与量曲線ならびに IC₅₀ 値 (右パネル) は、GraphPad Prism ソフトウェアを用いて算出した。

薬理的なモジュレーションは、アクチベーター注入の前に試験化合物の *in situ* 注入を行って急性的に評価することもできます。Figure 8 は、naïve T 細胞活性化に対する dasatinib の急性作用を示しています。2つの異なる濃度の dasatinib を注入し (50 および 100nM の最終ウェル濃度)、PER への影響を 5 回の測定サイクルの間 (~ 30 分) 観察しました。これに続いて、活性化を開始するために CD3/CD28 アクチベーターを注入しました。T 細胞活性化に関連する PER の増加は 50nM dasatinib によって部分的に抑制されましたが、100nM dasatinib ではほぼ完全に抑制されました。これらの観察は、Figure 7 の中で観察された IC₅₀ 値と一貫しています。Figure 8B および 8C の中の変換されたデータは、試験された 4 つの条件における % PER と % AUC の最大の活性化潜在能力を示します。また、T 細胞活性化に対する dasatinib の効果を IL-2 産生を測定することによって試験しました。この結果は XF Hu T Cell 活性化アッセイデータによく一致しており、dasatinib の存在下で IL-2 抑制レベルの著しい減少を示しました (Figure 8D)。

Conclusion

本研究は、XF Hu T Cell 活性化アッセイのアッセイデザインとコンセプトの証明について記述しています。このアッセイは、リアルタイムでの PER の増加をモニターすることによって T 細胞の活性化を視覚化するための迅速な方法を提供し、T 細胞活性化の初期の検出と活性化カインेटイクスの比較を可能にします。さらに、薬理的または遺伝子の介入によるモジュレーションの解析も容易にします。XF Hu T Cell 活性化アッセイキットは、アッセイ能力を最大化するために可溶性 CD3/CD28 アクチベーターを用い、そして、プレコートされた XF PDL プレートと共に用いる場合に標準化された便利なワークフローを提供します。加えて、Seahorse Analytics は効率的で利用しやすい解析ツールであり、データ解釈のために重要な解析パラメータを自動的に提供します。T 細胞活性化のリアルタイム解析のためのこのターンキー・ソリューションは、慢性および/または急性の免疫モジュレーターの研究を容易にし、従って、癌、免疫機能不全、様々な代謝疾患を含む種々の疾患に対する細胞および分子的な免疫療法の発見において大変有用です。

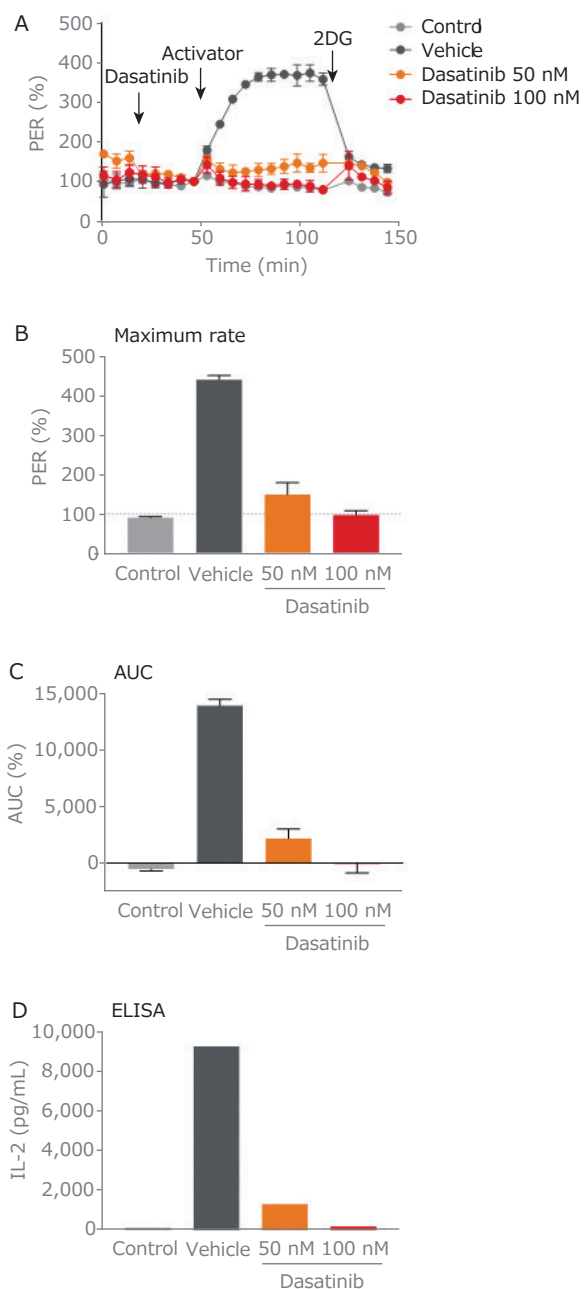


Figure 8. モジュレーションアッセイのプロトコルを用いた CD4+ T 細胞活性化に対する dasatinib の急性作用の評価。Dasatinib はアクチベーター注入の前に 2 つの異なる濃度 (50nM と 100nM) で注入した。(A) % PER のリアルタイム変化のカインेटィック・グラフ、(B) % PER の最大速度、(C) % PER の AUC 値、(D) 細胞活性化後 72 時間に集めた培養培地を用いて ELISA によって測定した IL-2 産生。

References

1. Romero, N. *et al.* Quantifying Cellular Glycolytic Rate Using CO₂-Corrected Extracellular Acidification. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-7894EN.
2. Agilent Seahorse XF/XFp Glycolytic Rate Assay Kit User Guides. *Agilent Technologies*, publication number 103344-400 and 103346-400.
3. Gubser, P. M. *et al.* Rapid Effector Function of Memory CD8+ T Cells Requires an Immediate-Early Glycolytic Switch. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1064–1072.
4. Menk, A. V. *et al.* Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 1509–1521.
5. Jones, N. *et al.* Akt and STAT5 Mediate Naïve Human CD4+ T-Cell Early Metabolic Response to TCR Stimulation. *Nature Comm.* **2019**, *10*, 152–160.
6. Buck, M. D. *et al.* Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate Through Metabolic Programming. *Cell* **2016**, *166*, 63–76.
7. Kam, Y. *et al.* Data Quality Management Using Brightfield Images with the Seahorse XF Imaging and Normalization System. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-9385EN.
8. Agilent Seahorse XF Hu T Cell Activation Assay Kit User Guide. *Agilent Technologies*, publication number 5994-1811EN.
9. Kam, Y. *et al.* Methods and Strategies for Normalizing XF Metabolic Data to Cellular Parameters. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-8980EN.
10. Mestermann, K. *et al.* The Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib Acts as a Pharmacologic on/off Switch for CAR T Cells. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaau5907.

※本文書に記載の製品は、すべて研究・実験用です。
人・動物の診断あるいは治療等の臨床用途に使用することはできません。

●お問合せ先 (Seahorse XFシリーズ 販売店) :



プライムテック株式会社

東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone: [東京] 03-3816-0851 [大阪] 06-6310-8077
<http://www.primetech.co.jp/> sales@primetech.co.jp

●製造元 :



DE.2682175926
rev03 (202107E)