

総括

免疫治療細胞の 細胞障害活性の定量

現在、実用化されているがん免疫療法の大半は、モノクローナル抗体またはがんワクチンを使用していますが、それらと異なる種類のがん免疫療法である、養子細胞療法が急速に進歩しています。養子細胞療法では、患者自身から免疫細胞を回収し、この細胞をそのまま、あるいは遺伝子改変して *in vitro* で拡大培養し、患者に再び輸注します。

養子細胞療法開発の課題の 1 つに、免疫治療細胞のがん細胞に対するキリング活性の評価があります。理想的な *in vitro* アッセイは、シンプルで堅牢性が高いことに加えて、*in vivo* での活性に近いデータを得られるものです。すなわち、動物モデルにおける長期の挙動を予測できることが求められます。究極にはヒトでの有効性を予測できるアッセイであることが期待されます。ACEA Biosciences（現在はアジレント・テクノロジー）は、免疫治療細胞の細胞傷害能を容易に測定することができるプラットフォームとして、xCELLigence® リアルタイム細胞解析 (RTCA) システムを開発しました。

RTCA システムについては以下に記載しています。本文では、この RTCA システムが実際の研究プロジェクトの進歩にどのように役立っているか記載しています。この記事では、RTCA システムをどのように使用しているかについて、複数の研究者から GEN にお話しいただきました。

GEN: 患者間または患者のサブpopulation間で現在のがん免疫療法の効力に大きな差があるのはなぜでしょうか。

Anderson 博士: 遺伝子と腫瘍微小環境という 2 つの要因が研究の主な焦点になっています。はまだ詳細に理解されていませんが、多くの種類の免疫療法で問題になるでしょう。がんはこれまでに治療戦略の回避に順応しており、我々は現在、このことが免疫療法でも同じように当てはまることを目の当たりにしています。我々は、腫

Additional Info

このウェビナーを
オンデマンドで見る：
「次世代 CAR-T
細胞」▶



Agilent

瘍が免疫療法をどのように回避するかの予測に取り組んでおり、これが予測できれば、腫瘍による免疫療法の回避を阻止するための戦略を開発することができます。

Bamdad 博士: 私は、問題の根底にあるのは、細胞を患者に戻す前に、*in vitro* でどのように細胞を扱っているかということだと考えています。*in vitro* での培養期間が長くなればなるほど患者にとって悪影響を及ぼすと考えられます。というのも、これらの細胞は成熟しているため、T細胞のさまざまなサブpopulationのプロファイルが変化しているためです。これにより、免疫治療細胞の効果持続性（患者の中でどれだけの期間、細胞が効果的であり続けるか）に悪影響を及ぼし、いわゆるサイトカインストームや神経毒性にも影響を及ぼします。この問題に関して、我々の理解は、近年飛躍的に深まっています。

MacLeod 博士: CAR-T 細胞、あるいはその他の輸注 T 細胞をによる治療において、薬効が異なる大きな理由の 1 つは、患者自身の細胞を使用することです。Precision Biosciences では、自家移植アプローチを用いる代わりに、健常者のドナー細胞を遺伝子改変し、非血縁者の患者に移植します。この同種移植アプローチによって、より活性が明確でより均一な細胞を作り出すことができます。そのことは、ACEA Biosciences が開発した xCELLigence による細胞傷害性アッセイなど、機能評価アッセイのデータをみるとよくわかります。

Golubovskaya 博士: 患者はそれぞれ免疫プロファイルが異なり、それぞれの腫瘍はそれぞれ異なるバイオマーカーをもちます。治療奏功性を完全に予測することはできていませんが、免疫プロファイルなどのバイオマーカーを解析することで、治療効果を予測できるようになるよう挑戦しています。



Kristin Anderson 博士

フレッドハッチンソンがん研究センター、
ワシントン大学、博士研究員

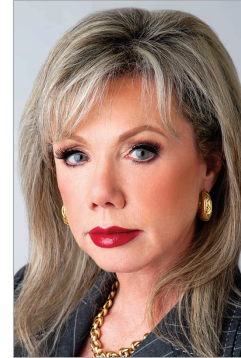
「免疫逃避の詳細はまだ理解されていませんが、多くの種類の免疫療法で問題になるでしょう。」

GEN: がんに対する免疫療法の効力と効果を評価し、モニタリングする際の主な課題は何ですか。

Anderson 博士: 課題は腫瘍の種類（癌腫）によって異なります。ヒトサンプルを用いるほとんどの実験は、ディッシュで行わなければなりません。しかし、それは複雑な腫瘍微小環境を再現していません。また、我々のラボでは、クロムリリースアッセイやフローサイトメトリーなどキリングアッセイの「常道」とされるいくつかの分析法で、卵巣癌細胞に対する実験で問題を経験しました。我々が用いるがん細胞は、クロム標識をうまく取り込まなかったり、保持しなかったりすることがよくあるため、アッセイのバックグラウンドが高くなってしまいます。

フローサイトメトリーベースのアッセイは細胞のラベリングが必要で、細胞の種類が多すぎると、そのラベリング効率をコントロールする必要が出てきます。また、サンプルが過密になりすぎると、非特異的な腫瘍細胞死をひろってしまう危険があります。こういった場合、バックグラウンドの細胞死により真の T 細胞の細胞傷害能を評価することが難しくなります。

Overstreet 博士: 最大の課題の 1 つは、ヒトにおける効果を予測できる実験モデルを構築することです。その多くはマウスのレベルではよくわかっていて、一部についてはヒトでの予想性が良好なものもありますが、そうでないものも多くあります。我々は、xCELLigence システムで *in vitro* の評価系を構築し、ヒト T 細胞とヒト腫瘍細胞の間の反応をみています。実際に患者の腫瘍中で起こると目される反応をより反映しているのではないかと考えています。



Cynthia C. Bamdad 博士

Minerva Biotechnologies

創設者兼 CEO

「キリングアッセイでは、細胞傷害を測定するタイミング、精度、柔軟性が最も大切です」

Bamdad 博士: 細胞傷害を測定するタイミング、精度、柔軟性が最も大切です。フローサイトメーターでもCAR-T 細胞のキリング能を調べることができますが、この方法は細胞を剥がしてから測定する必要があり、とても間接的です。また、タイムコースの中の一瞬のスナップショットしか見ることはできません。つまり、CAR-T 細胞や癌細胞が経時的にどのように変化しているかを見ることはできません。

癌細胞と CAR-T 細胞を共培養して経時的に測定し、ナイーブまたはセントラルメモリー T 細胞とエフェクターメモリー T 細胞の正しい分布を同定することができる技術が必要です。これらの細胞がどれくらいの時間をかけて成熟するかを特定できれば、CAR-Tによる傷害いつ起こるのかを知ることができます。またその反対に、CAR-Tが疲弊し、がん細胞集団が再び増殖し始める時期を確認できます。起こっていることをリアルタイムで確認できることは、CAR のデザインや、求めるサブタイプ分布の細胞を得るための培養方法の検討に重要です。

MacLeod 博士: 主な課題の1つは、*in vitro*の結果をいかにして動物モデルまたはヒトの実際の治療にトランスレーションしていくかです。通常、従来の細胞傷害アッセイは、短期間のキリングしかみることができません。3、4時間しかみられないこともあります。またキリングをみるのに必要とされる ET 比も大きいことが多いです。この方法では活性は示されますが、全体の作用機序を反映しません。

エフェクター細胞は生きている製剤です。つまり、細胞を殺すだけでなく、自らも増殖します。これは、細胞製剤の作用機序の中で重要な部分です。低い ET 比で細胞傷害性を長期間経時的に追っていくと、エフェクター細胞が増殖し、serial killing と呼ばれる連続的なキリングが起きることが確認できます。このような長期間の測定は T 細胞の活性を正しく評価するための非常に説得力のある方法です。



Dan MacLeod 博士

Precision BioSciences, Cell Therapy Discovery,
アソシエートディレクター

「エフェクター細胞は生きている製剤です。つまり、細胞を殺すだけでなく、自らも増殖します。これは、細胞製剤の作用機序の中で重要な部分です。」

GEN: エフェクター細胞からの分泌される分子を定量することでも細胞の活性を知ることができると思いますが、ターゲット細胞に対する傷害活性を直接測定することがどうして重要なのでしょうか。

Anderson 博士: 両方とも重要ですが、殺される側の腫瘍は種類によってそれぞれわずかに違いがあります。したがって、癌種ごとにターゲット細胞を殺しているかを測定することは特に重要です。一部の腫瘍細胞はある殺傷機序に反応しますが、別の機序には反応しません。また、腫瘍細胞は T 細胞介在性の細胞殺傷を回避するために素早く順応することができるため、T 細胞が実際に標的を殺傷できることを確認する必要があります。一部の腫瘍細胞はある殺傷機序に反応しますが、別の機序には反応しません。また、腫瘍細胞は T 細胞による細胞殺傷を回避するために素早く順応することができることが知られています。したがって、T 細胞が実際に標的の細胞を殺傷できることを確認する必要があります。

xCELLigence アッセイは厳密には細胞死を直接読み取っているのではなく、ターゲット細胞のプレートの底に接着する能力を電気抵抗値として測定していることは知っておくべきでしょう。プレート内ですでに死んだ細胞はシグナルを妨害することはないため、ここでは細胞傷害を間接的に読み取っています。xCELLigence は、生理学的な低い ET 比を用いて、しかも再現性の高い結果を得られることが、他のアッセイ法にはない良いところだと思います。

Overstreet 博士: 目的は T 細胞がどのように腫瘍細胞と相互作用し、どのように腫瘍細胞を殺しているかを知ることですから、それを測定すれば良いのです。T 細胞にはキリング活性を測定する方法はいくつかありますが、ひとつの因子だけで測定すると、重要な相互作用に関わる大切な因子を見逃すかもしれません。しかし、腫瘍細胞がリアルタイムでどのよう



Michael Overstreet 博士

MedImmune (AstraZeneca の一部門)
サイエンティスト

「従来の T 細胞毒性を評価する方法と比べて、xCELLigence アッセイの利点の 1 つは、特異性が高いことです。」

に死んでいくかを検証した場合、エフェクター機能すべての最終結果である動的な相互作用を確認でき、あなたの治療方法がその相互作用をどのように変化させることができるかを知ることができます。

GEN: CAR-T 細胞やその他の T 細胞療法のデザインと最適化において、免疫細胞によるがん細胞キリングのカイネティクスを測定する方法に求められる最も重要な要素は何ですか。

Anderson 博士: 感度、精度および再現性のどれもが重要です。xCELLigence のようなハイスループット測定法の利点の 1 つは、実験デザインに多くのコントロールを入れることができることです。これらのコントロールは、実際に本当に T 細胞による細胞傷害をみているということを保証するのに必要です。xCELLigence は、ソフトウェアがコントロールウェルの非特異的バックグラウンドを差し引いて自動的に補正してくれます。

Overstreet 博士: 従来の T 細胞毒性を評価する方法と比べて、xCELLigence アッセイの利点の 1 つは、特異性が高いことです。細胞傷害性を短期の 1 つのタイムポイントで捉えるのではなく 3 ~ 4 日間の長期のキリングをリアルタイムでモニタリングできることで、ET 比を 0.5 ~ 2:1 までに下げることができ、T 細胞と腫瘍細胞の一对一の相互作用に近づけることができます。それによって、腫瘍細胞と T 細胞の間の本来の相互コミュニケーションをウェルの中で再現することができ、実際に腫瘍組織で起きていることを反映した実験ができると考えられます。また、このような低い ET 比で実験を行うことで、キリングの特異性も改善され、劇的にダイナミックレンジが拡大します。

Bamdad 博士: キリングアッセイには、多数の異なる条件を同時に試験できることが求められます。シングルタイムポイントのアッセイ法であるフローサイトメーターを使用すると、異なる条件下でさまざまな癌種の細胞

「非侵襲的な測定なので、xCELLigence で測定した細胞をそのまま他のアッセイに供することもできます。例えば、フローサイトメリー解析やサイトカイン解析などで、腫瘍に対する T 細胞そのものの応答を調べることができます。」

Michael Overstreet 博士

に対して 60 の異なる CAR-T細胞を検証するには、6～9 か月かかることとなります。xCELLigence の 96 プレートで 6 枚測定できるモデルを使用すると、576 の条件を一度に解析することができます。我々は、この仕事を 1 か月未満で完了することができました。また、実際に CAR-T ががん細胞を殺す過程をリアルタイムにみながら、その途中で試薬を添加することもできます。

Golubovskaya 博士: ラベルフリー、リアルタイム、容量依存的、そして時間依存的であることは免疫細胞介在性キリングアッセイに求められる最も重要な特性です。xCELLigence は、T 細胞の細胞傷害性と標的がん細胞の死をリアルタイムで測定するため、非常に優れています。

GEN: xCELLigence ならではの利点と、ラベルフリーアッセイ法のベネフィットは何ですか。また、探索段階と開発段階それぞれにおける xCELLigence の役割をご説明いただけますか。

Overstreet 博士: この装置はカインティックレスポンスをリアルタイムに測定することができ、1 回の実験で非常に豊富なデータを得ることができます。我々の組織の中で、この装置を使うことに興味があった研究者から要望がありました。xCELLigence プラットフォームのラベルフリーという特徴はワークフローを効率化させられます。また、非侵襲的な測定なので、xCELLigence で測定した細胞をそのまま他のアッセイに供することもできます。例えば、フローサイトメトリー解析やサイトカイン解析などで、腫瘍に対する T 細胞そのものの応答を調べることができます。

この装置とその他のいくつかの実験ツール、そして我々が開発したヒト免疫モデルを組み合わせることで、ヒト細胞ベースの分子機能解析システムができあがりました。このアプローチは多くの方にとっても期待していただいています。前臨床のモデル実験を改善され、臨床に持ち込む際の強い根拠を得られることを期待しています。



Vita Golubovskaya 博士

ProMab Biotechnologies、研究開発ディレクタ

「xCELLigence は、T 細胞の細胞傷害性と標的がん細胞の死をリアルタイムで測定できる点が非常に優れています。」

Bamdad 博士: 我々は、フレッドハッチンソンがん研究センターと共同で研究を行っており、今年後半からヒト臨床試験を開始する予定です。臨床試験が近づくにつれて、実験室および動物による実験結果と実際の患者の治療とのギャップを埋める必要がでてきます。我々は、動物への CAR-T 細胞と腫瘍細胞の移植実験と xCELLigence による実験を並行して行っています。今のところ、xCELLigence の結果は動物で得られた結果を完全に反映しています。これにより、臨床試験に移行する際も移行した後も自信をもって仕事を進めることができます。

Golubovskaya 博士: ラベルフリーアッセイを使用する利点とベネフィットは、実験のステップが少ないこと、データのバラつきが小さいこと、そして蛍光や RI プローブを使うよりも直接的なアッセイであることです。我々は 96 ウェルプレートで 6 枚測定できる xCELLigence システムを使って、がん細胞に対する CAR-T 細胞の細胞傷害性をリアルタイムで測定しています。1 日目に異なる種類のがん細胞をプレートに播種し、翌日、さまざまな ET 比でエフェクター CAR-T 細胞を加えることで、異なるタイムポイントと異なる薬剤用量での細胞傷害データを一度に得ることができています。ソフトウェアであらゆるタイムポイントを網羅したカイネティックデータを確認することができます。視覚的にもわかりやすく便利なアッセイです。

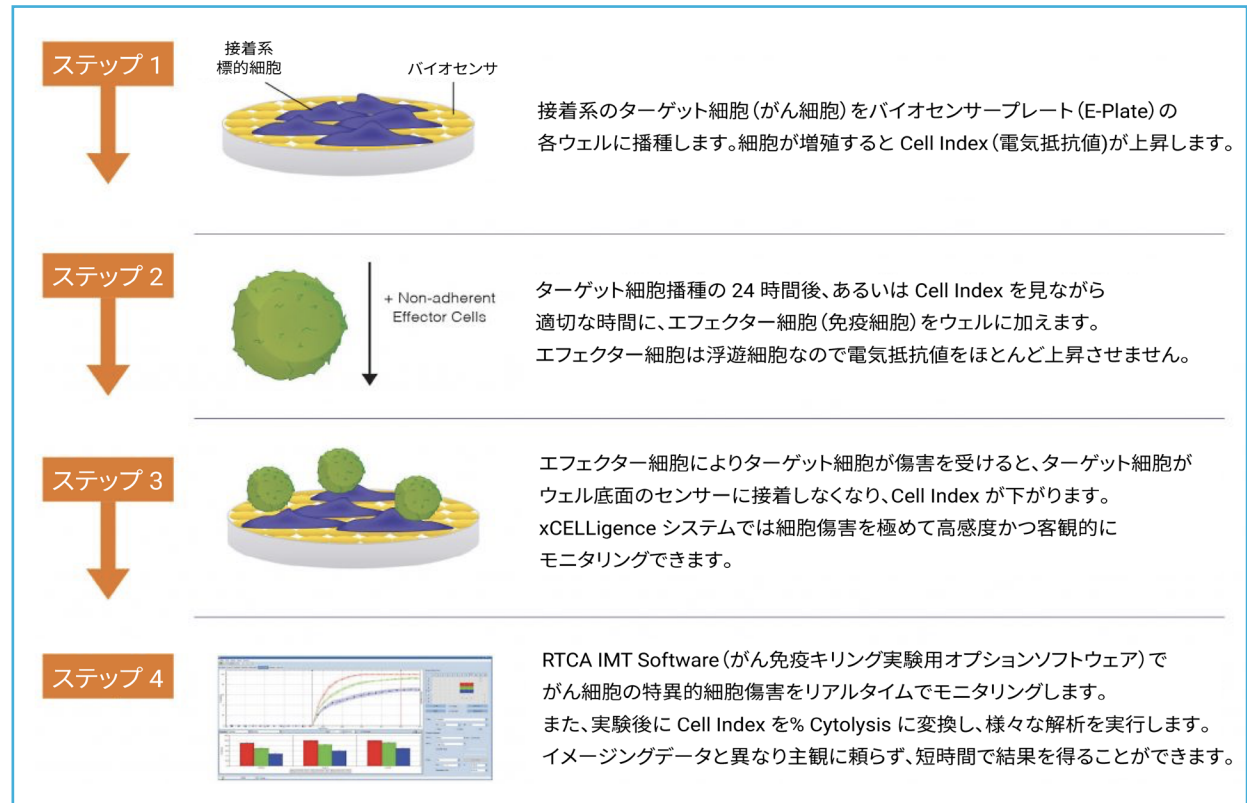
MacLeod 博士: xCELLigence の最大の利点は、シンプルなところです。簡単にアッセイを開始することができ、データの一貫性にも優れ、初めて使う人にも簡単に教えることができます。我々は主に初期段階の実験で使用していて、たくさんの CAR-T コンストラクトの違いを検証しています。アッセイ感度がよいので、非常に少ない数の細胞で実験ができます。低い ET 比で細胞傷害能をテストできるので、より多くの実験ができ、より多くのコンストラクトのスクリーニングができます。 ■

革新的プラットフォームによる発見と開発の加速

キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞、チェックポイント阻害剤および腫瘍溶解性ウイルスなどの効果的な免疫療法の設計と開発に重要なのは、標的腫瘍細胞に対する薬効を *in vitro* でモニタリングする能力です。理想的な *in vitro* アッセイは、堅牢性とシンプルさに加え、その治療法が動物モデルでどのように振る舞い、最終的に患者でどのように振る舞うかの予測性が高いものであるべきです。

in vivo での活性により近い結果を *in vitro* で再現するために、ACEA Biosciences (現在はアジレント・テクノロジーの一部門) は xCELLigence® リアルタイム細胞解析システムを開発しました。このシステムにより、長時間にわたるがん細胞キリングを生理学的条件に近い低い ET 比で定量的にモニタリングすることができるようになりました。xCELLigence システムでは、独自開発されたバイオセンサープレートを用いて、接着性細胞の反応をラベルフリーで非侵襲的に測定します。

ワークフローは非常にシンプルです。ターゲット細胞をプレートに播種して培養し、そのあとでエフェクター細胞を加えます。あとは全く手を加えることなく、xCELLigence システムが腫瘍細胞の生存活性を自動でモニタリングします。血液がんを研究対象とする場合、血液がん細胞は本来は接着性を持ちませんが、ACEA Biosciences 社が開発したテザリングキットを用いてウェル底面に細胞を捉えて、xCELLigence システムで細胞傷害性をモニタリングすることができます。



とてもシンプルなワークフローにより、異なる用量のチェックポイント阻害剤またはさまざまな CAR コンストラクトなどのキリング能のデータを簡単に得ることができます。xCELLigence アッセイは感度が高く、生理学的な低い ET 比で実験ができます。また同じウェルを継続的に測定することによって、すべてのタイムポイントを網羅したコンプリートなデータを得ること

ができ、これまでのエンドポイントアッセイでは見落としてしまう細胞傷害活性や微妙な動きを捉えることができます ■