

がん免疫療法のための マルチファンクショナルアッセイ

リアルタイム細胞解析で明らかにする
二重特異性 T 細胞誘導抗体の細胞傷害活性

Lauren Jachimowicz 博士、Aimee Chiavario、Peifang Ye、Ming Lei、Nan Li 博士、Xiaobo Wang 博士、Wei Tang、Garret Guenther 博士、Kenneth Chan 博士、Jeff Shurong Xue 博士

がん免疫療法は、がん細胞を攻撃する免疫システムを生かしてがんを治療する方法で、第四の標準治療としてますます評価されています。獲得免疫と自然免疫は、どちらも、腫瘍に対する宿主防御において極めて重要な役割を担っています。

CD8+ 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は獲得免疫反応の主要なプレイヤーで、複数のサイトカインの産生に加え、グランザイム、パーフォリン、グラニュライシンなどの細胞溶解タンパクを放出することで腫瘍細胞を直接排除します。したがって、腫瘍免疫学では、T 細胞のタンパク質発現あるいは分泌と、細胞傷害能を結び付けて考えることが非常に大切です。

この研究を実験室から臨床に移行することは非常に重要ですが、*in vivo* の活腫瘍免疫学の知見を実験室から臨床に移行し治療薬として活かすことは非常に重要ですが、そのためには *in vivo* での活性を *in vitro* で模倣できる信頼できる実験ツールが求められます。性を綿密に模倣する *in vitro* アッセイを設計するには信頼できるツールが必要です。本研究では、インピーダンスベースの細胞解析法とビーズベースのマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイを組み合わせ、T 細胞による B 細胞傷害試験における、ターゲット細胞とエフェクター細胞の動態を評価しました (図 1)。具体的には、ACEA Biosciences の xCELLigence® リアルタイム細胞解析テクノロ



Additional Info

xCELLigence RTCA
がん免疫療法ハンド
ブックをダウンロード: 



Agilent

ジーを用いてターゲット細胞の生存率の変化を継続的に読み取り、フローサイトメトリー法でサイトカインおよび細胞溶解性タンパク質の分泌を測定することで T 細胞の活性と機能の検証を行いました。

Bispecific T-cell Engager (BiTE) は、CTL が腫瘍を特異的に認識して排除する能力を増強することによって、獲得免疫反応の力を利用して治療を行う新しい有望な治療法です。CD19-BiTE は、CTL の CD3 と B 細胞腫に発現する CD19 をブリッジして結合するように設計されており、T 細胞を B 細胞の近傍へ誘導するとともに、T 細胞自体の活性化を行います。さまざまな B 細胞性腫瘍に対する CTL のエフェクター機能を増強します。

ここでは、CD19-BiTE による、T リンパ球の B 細胞性リンパ腫由来の細胞株 (Daudi 細胞) への細胞傷害能の増強効果について、2 種類のアッセイを用いて評価しました。ターゲット細胞死はリアルタイム細胞解析のインピーダンスアッセイを使ってモニタリングし、サイトカインと細胞溶解性タンパク質の分泌をビーズベースのマルチプレックス・フローサイトメトリーアッセイで定量化して、T 細胞応答を全般にわたって評価しました。

BiTE による T 細胞介在性細胞傷害能の増強

xCELLigence プラットフォームを用いて、B 細胞リンパ腫細胞株 (Daudi 細胞) に対するヒト T 細胞の細胞傷害活性を評価しました。B 細胞腫は、血液がんであるため T 細胞が腫瘍細胞に容易にアクセスできます。また、固形がんと違って微小環境の複雑性や組織多様性の影

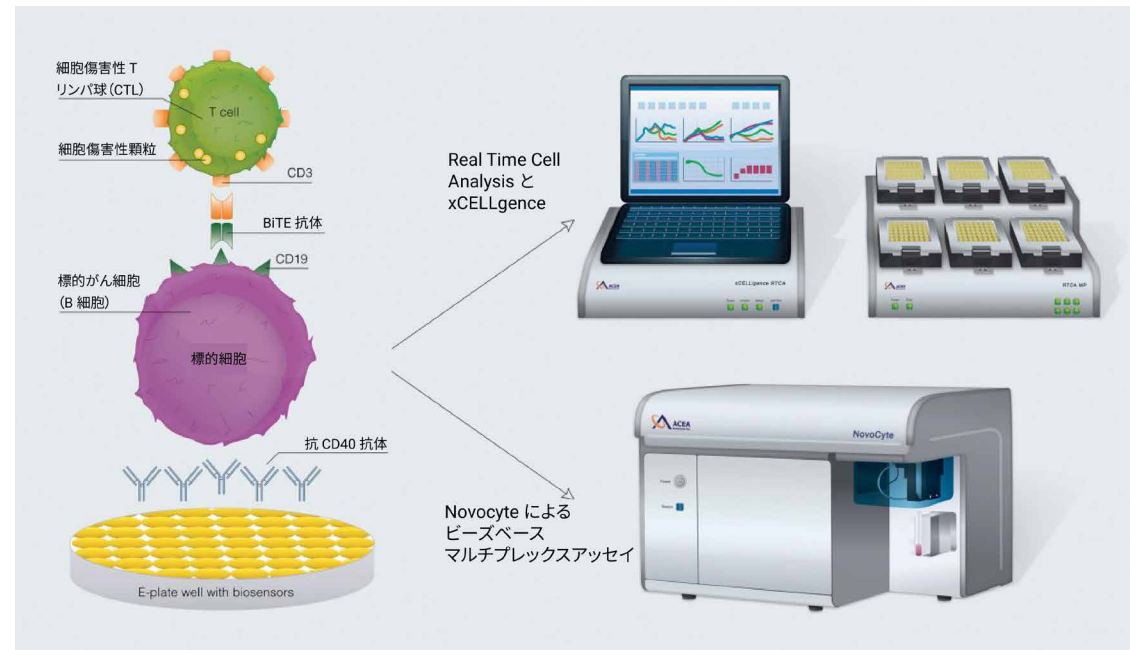


図 1. ターゲット細胞 (Daudi) に対する細胞傷害は xCELLigence RTCA インピーダンスアッセイを使ってモニタリングし、サイトカインと細胞溶解性タンパク質の分泌は Novocyte フローサイトメーターによるビーズベースのマルチプレックスアッセイで定量化し、T 細胞応答を評価した。

響を受けません。そのため有望な免疫療法ターゲットと考えられます。血液がんに対する細胞傷害活性を測定するために、ACEA Biosciences は、xCELLigence Immunotherapy Kit を開発しました。

本研究では、最初に、がん B 細胞である Daudi 細胞を抗 CD40 テザリング抗体でプレコートした xCELLigence E-Plate[®] に播種してウェル底面に捕捉させました。次に、初代末梢血単核球 (PBMC) から濃縮した T 細胞を ET 比 10:1 で加えました。また、BiTE の細胞傷害活性増強能を調べるために、CD19-BiTE または抗 CD19 コントロール抗体を加えました。

xCELLigence テクノロジーは、ウェル底面に微小金電極が張られた独自のバイオセンサープレート E-Plate を使用して、細胞由来の電気抵抗値を測定することで細胞の挙動をモニタリングします。単層 Daudi 細胞に由来する電気抵抗シグナルは 15 分間ごとに記録され、Cell Index としてレポートされます。図 2 の青線はターゲット細胞 (Daudi 細胞) のみを播種したウェルの細胞増殖曲線です。黒線はエフェクター細胞 (T細胞) のみを播種したウェルのデータです (20 時間のタイムポイントでウェルに細胞を添加)。T 細胞のみのウェルでも電気抵抗シグナルが認められますが、持続的な上昇は見られません。このエフェクター細胞コントロールウェルの値はバックグラウンドとしてソフトウェアで自動的に減算することができます。緑色の線は、ターゲット細胞播種の 20 時間後に、T 細胞と抗 CD19 抗体 (陰性コント

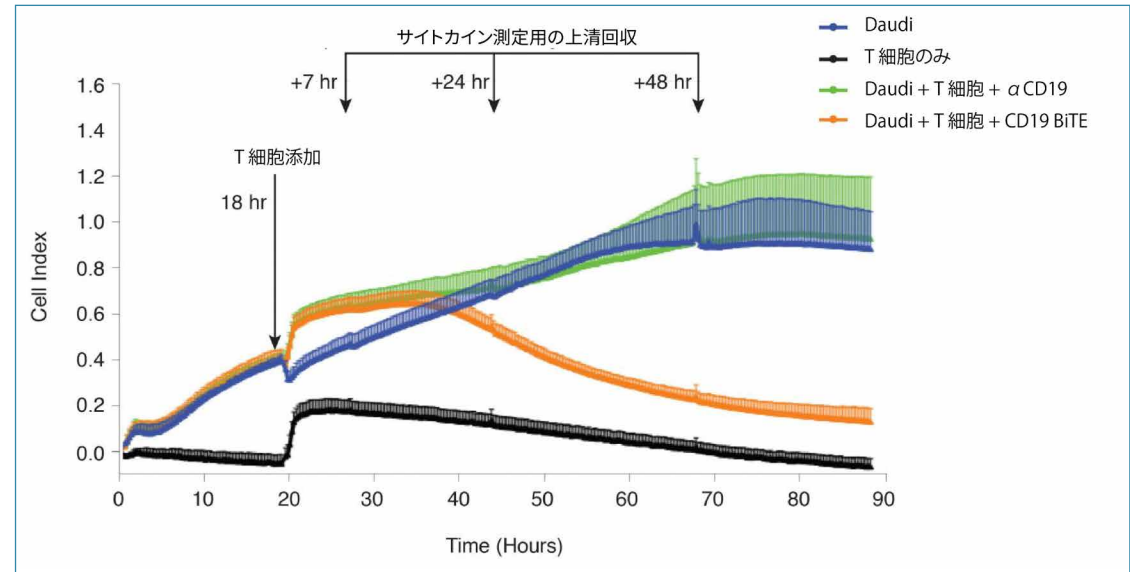


図 2. CD19-BiTE による細胞障害活性の増強効果を xCELLigence RTCA システムで測定した。抗 CD40 抗体でコートした 96 ウェル E-Plate[®] に Daudi 標的細胞を 50,000 個/ウェルで播種した。Daudi 細胞の播種 18 時間後、培養前の PBMC から濃縮したヒトエフェクター T 細胞を T 細胞 : Daudi 細胞比 10:1 で加えた。同時に CD19-BiTE (0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または抗 CD19 抗体 (0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。T 細胞添加 7、24、48 時間後に、フローサイトメトリーによるタンパク質測定のために培養上清を回収した。xCELLigence システムは、ウェル底面のバイオセンサーと細胞の相互作用により生じる細胞由来の電気抵抗値を測定する。ここでは縦軸の Cell Index がそれを示す。Cell Index は生細胞数と相関し、その増加はターゲット細胞が増殖していることを示す。一方で Cell Index の減少は細胞死を示す。電気抵抗シグナルは、15 分ごとに測定した。

ロール抗体) を添加したウェルの細胞増殖曲線です。T細胞や抗体によって Daudi 細胞の増殖が影響を受けていないことがわかります。オレンジ線は、T細胞に加えて CD19-BiTE 抗体を添加したウェルのデータです。添加後 Cell Index の急激な低下が認められ、Daudi 細胞が傷害を受けていることが示されています。すなわち、B がん細胞に対する T 細胞の傷害活性が CD19-BiTE により増強されたことを示します。

サイトカインと細胞溶解性タンパク分泌の増加

T 細胞活性化と機能に関して CD19-BiTE の効果をさらに検証するために、サイトカインおよび細胞溶解性タンパクの分泌を測定しました。細胞は図 2 に説明したように培養し、T 細胞添加 から 7、24、48 時間後に上清を回収し、NovoCyte フローサイトメーターでビーズベースのマルチプレックスアッセイを用いて T 細胞機能に影響を及ぼす既知の 13 種類のヒトタンパクを測定しました (図 3)。RTCA の結果と一致して、CTL 関連タンパクの分泌増加が認められました。このデータから、CD19-BiTE の存在によって、標的細胞の破壊に介在し、それを持続させるサイトカインとエフェクター分子の産生が大幅に増加していることがわかります。エフェクター T 細胞の添加から 7 時間後に、IFN γ 、TNF α 、IL-2 など CTL の応答に特に関連しているサイトカインがそれぞれ、300 倍、9 倍、10 倍に増加しました。

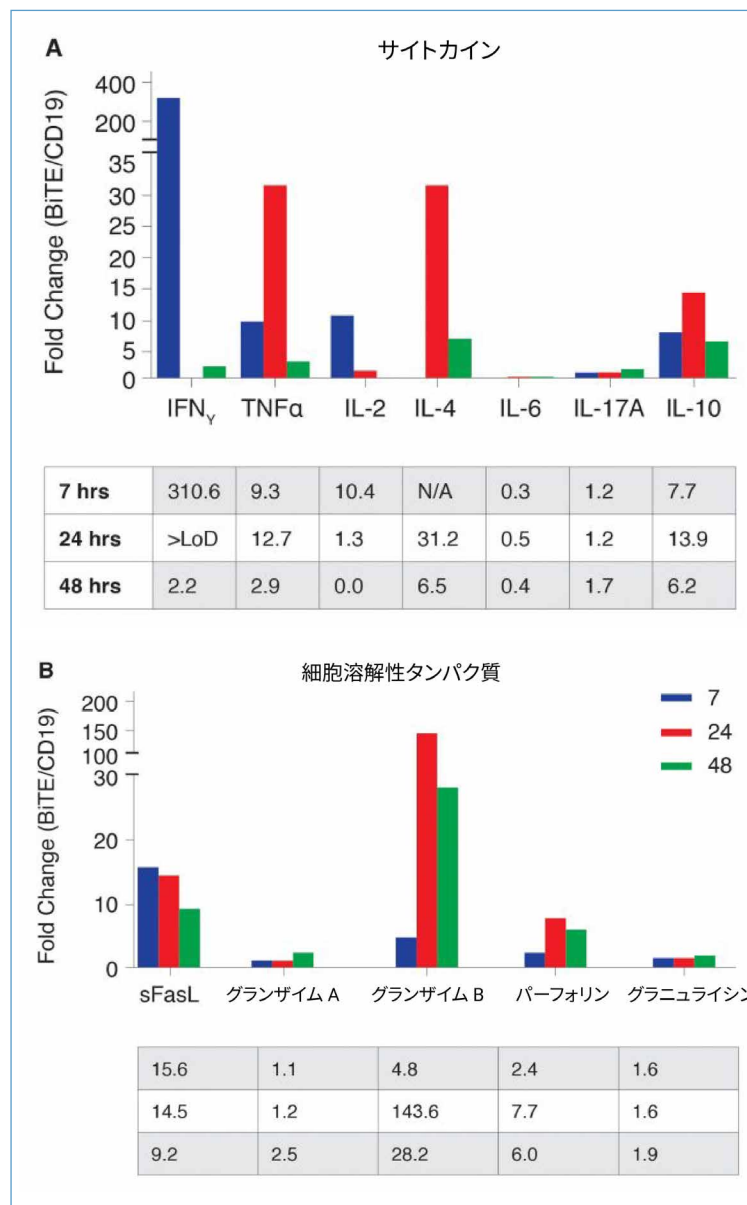


図 3. ビーズベースのマルチプレックス免疫測定法における CD19-BiTE による T 細胞の細胞傷害活性の増強。抗 CD40 抗体でコートした 96 Well E-Plate に Daudi 標的細胞を 50,000 個/ウェルで播種しました。Daudi 細胞の播種 18 時間後、PMBC から濃縮したヒトエフェクター T 細胞を T 細胞 : Daudi 細胞比 10:1 で加えた。同時に、CD19-BiTE (0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または抗 CD19 抗体 (0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。T 細胞添加 7、24、48 時間後に、ビーズベースのマルチプレックス免疫測定用に培養上清を回収した。サイトカイン (A) および細胞溶解性タンパク (B) について、Daudi + T + CD19-BiTE 対 Daudi + T + αCD19 間のタンパク質発現の相対的倍率変化を測定した。

エフェクター T 細胞添加から 24 時間後までに sFasL、グランザイム B、パーフォリンなどの細胞溶解性タンパクの分泌も大幅に増加し、観察された CTL の殺傷応答と一致しました。このデータは、CD19-BiTE が安定した CTL 応答に必須のサイトカインや細胞溶解性タンパクの産生を増大させることで、T 細胞が媒介する B 細胞殺傷を増強することを示しています。

まとめ

本章では、定量的な細胞キリングアッセイとバイオマーカー定量を組み合わせることで、B 細胞腫瘍への T 細胞介在性キリングに CD19-BiTE が及ぼす影響について、単一のワークフローで詳細な知見を得られることを示しました。リアルタイム細胞解析を用いた細胞数、細胞サイズおよび接着能の継続的なモニタリングにより、キリング過程の定量と経時的動きの評価が可能です。また、この細胞傷害性データとサイトカインおよびエフェクタータンパク質産生の定量的解析を結び付けることによって、T 細胞の活性化と機能を同時に知ることができます。この細胞解析とタンパク解析を統合したワークフローは、がん免疫療法の研究の進歩をもたらします。

Lauren Jachimowicz 博士はアプリケーション開発サイエンティスト、Aimee Chiavario 氏はがん免疫療法のシニアマーケティングマネージャ、Peifang Ye氏はグループリーダー、Garret Guenther 博士および Kenneth Chan 博士はプロダクトマネージャ、Jeff Shurong Xue 博士は ACEA Biosciences (現在はアジレントの一部) のマーケティングディレクターです。

免疫細胞療法のアプリケーションのための 専用のソリューション



力価試験

免疫細胞適応性

細胞工学

免疫表現型検査

腫瘍増殖と
細胞傷害性

細胞運命の決定

免疫細胞療法のための
次世代の解析ツールを紹介

- xCELLigence RTCA
- Seahorse XF アナライザ
- Novocyte Quanteon フローサイトメータ
- SureGuide CRISPR sgRNA

[詳しくはこちら](#)