



# Expanding Applications of Bioluminescence Technology: Predictive Bioassays for TNF $\alpha$ Biologicals Potency and Dose-Standardization Studies

## 生物発光テクノロジーの多様なアプリケーション：TNF $\alpha$ 生物製剤の力価・用量標準化試験のための予測的なバイオアッセイ

By Sarah Shultz, Andrew Niles, Jey Cheng and Simon T.M. Allard, Promega Corporation

### イントロダクション

腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) は免疫監視や免疫機能に関与する強力なサイトカインです。TNF $\alpha$ レベルの調節異常は、関節リウマチ、クローン病、数種の神経疾患など、さまざまな慢性疾患状態との関連性が指摘されているため、TNF $\alpha$ は魅力的な創薬ターゲットとなっています。ヒトの疾患治療薬として既に数々の組換え抗TNF $\alpha$ 抗体製剤が開発・ライセンス化されていますが、バイオ医薬品業界では力価や用量の標準化に用いることができる簡単で予測的なバイオアッセイが依然として求められています。自動化を可能にするホモジニアスなバイオアッセイは、この評価プロセスの簡素化の一助となることから望ましいと考えられます。本稿でご紹介するシンプルで自動化しやすい予測的なバイオアッセイを使用すれば、抗TNF $\alpha$ 製剤を効果的に評価することができ、他の生物製剤でも同様に効果的な品質管理を行うことができます。

### 生物発光アッセイで得られる予測性と生産性

本稿ではプロメガの簡単で予測的な2種類のバイオアッセイに焦点を当ててご紹介します。CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assayは、培養細胞内のATP (代謝活性を有する細胞の指標) を定量するホモジニアスな生物発光アッセイです。このアッセイはマルチウェルプレートフォーマットで使用できるようにデザインされているため、自動化された細胞生存率試験、細胞増殖試験、細胞毒性試験を行う上で最適です。ONE-Glo<sup>™</sup> Luciferase Assayは、ホタルルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた哺乳動物細胞のルシフェラーゼ発現量を測定するホモジニアスな生物発光アッセイです。このアッセイには新規のルシフェラーゼ基質が使用されているので、本アッセイの試薬は標準的なルシフェラーゼアッセイ試薬に比べて安定性が向上しており、サンプル成分に対する寛容性が高く、臭いが低減しています。これらの特長により、本アッセイはハイスループットアプリケーションに最適なものとなっています。

どちらのアッセイも迅速・簡単に実施でき、高い感度が得られます。プロトコルは、培地中の培養細胞に試薬を直接添加して (洗浄やプレコンディショニングの必要はありません)、混和したのち、“グロータイプ”の発光シグナルをルミノメーターで読み取るだけです。CellTiter-Glo<sup>®</sup>

Assayでは、発光シグナル量はサンプル中に存在するATP量に比例します。このATP量はサンプル中に存在する細胞数に直接比例します。ONE-Glo<sup>™</sup> Assayでは、発光量は、特定の遺伝子エレメントのアップレギュレーションとそれぞれに続くホタルルシフェラーゼ発現量に比例します。

### GloResponse<sup>™</sup> 細胞におけるTNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化および抗ヒトTNF $\alpha$ モノクローナル抗体によるTNF $\alpha$ 生物活性の中和

TNF $\alpha$ によって活性化される最も重要な下流シグナル伝達ターゲットの1つは、炎症反応、抗アポトーシス反応、免疫応答などの多様な生物学的プロセスに関与しているNF- $\kappa$ B 転写因子です。休止細胞では、 $\kappa$ B 阻害因子 (I $\kappa$ B) によってNF- $\kappa$ Bが細胞質内に隔離されることにより、NF- $\kappa$ Bの活性がコントロールされています。TNF $\alpha$ が細胞表面のTNF $\alpha$ 受容体に結合すると、一連のキナーゼカスケードが開始され、I $\kappa$ Bのリン酸化、ユビキチン化、プロテアソーム依存性の分解が引き起こされます。遊離したNF- $\kappa$ Bは核に移行して活性化し、標的遺伝子の転写発現を誘導します (図1)。

ルシフェラーゼレポーターアッセイは細胞内シグナル伝達経路の研究に広く用いられています。本試験では GloResponse<sup>™</sup> NF- $\kappa$ B-RE-*luc2P* HEK293 Cell Lineを使用しました。この細胞株は、Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) 細胞からクローニングにより樹立されたもので、ミニマルプロモーター (TATA配列) の制御下にルシフェラーゼ遺伝子 (*luc2P*) と複数のNuclear Factor- $\kappa$ B Response Elements (NF- $\kappa$ B-REs) が配置されています。このNF- $\kappa$ Bレポーター細胞株は、NF- $\kappa$ B活性の変化につながるあらゆる細胞反応を迅速かつ簡便に分析できるようデザインされています。

TNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化を評価するため、GloResponse<sup>™</sup> NF- $\kappa$ B-RE-*luc2P* HEK29細胞を10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有DMEMに懸濁し、epMotion<sup>®</sup> 5075 自動分注システム (Eppendorf) を使用してウェル側面が白色不透明で底部が白色の96ウェル Costar<sup>®</sup> #3917マイクロプレート (Corning) に10,000cells/wellの密度となるよう50 $\mu$ lずつ自動播種しました。このプレートに、培地に溶解した3段階のTNF $\alpha$ 希釈系列を、ウェルあたり50 $\mu$ lずつ自動分注しました。処理細胞を37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>で5時間インキュベーションしました。それぞれのプレートに対照を設け、1列は非処理細胞のウェルとし、別の1列は細胞を播種しないウェルとしました。

抗TNF $\alpha$ 抗体によるNF- $\kappa$ Bの中和を評価するため、Freedom EVO<sup>®</sup> Robotic Workstation (Tecan) を用いてGloResponse<sup>™</sup> NF- $\kappa$ B-RE-*luc2P* HEK293細胞を上記と同様に播種し、直ちに10ng/mlのTNF $\alpha$ とさまざまな濃度の抗ヒトTNF $\alpha$ モノクローナル抗体 (R&D Systems) で処理しました。3段階の希釈系列の抗TNF $\alpha$ モノクローナル抗体とTNF $\alpha$ を混和した培地を、プレートにウェルあたり50 $\mu$ lずつ自動分注しました。処理細胞を37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>で5時間インキュベーションしました。プレートには対照も設けました。

処理後、100 $\mu$ lのONE-Glo<sup>™</sup> 試薬を全てのプレートの各ウェルに自動分注し、旋回プラットフォーム上で10分間混和させました。NF- $\kappa$ B活性の変化に起因するルシフェラーゼ遺伝子発現によって生じた発光を、GloMax<sup>®</sup>-Multi Plate Readerで測定しました。

再現性および頑健性の統計的指標であるZ'因子をそれぞれのアッセイについて求めました。TNF $\alpha$  (10ng/ml) 添加培地またはTNF $\alpha$  (10ng/ml) +抗TNF $\alpha$ 抗体 (1 $\mu$ g/ml) 添加培地を、プレートの一部のウェルに50 $\mu$ lずつ分注して発現誘導しました。プレート内のその他のウェルは無処理としました。細胞は上記と同様の方法で調製・処理しました。

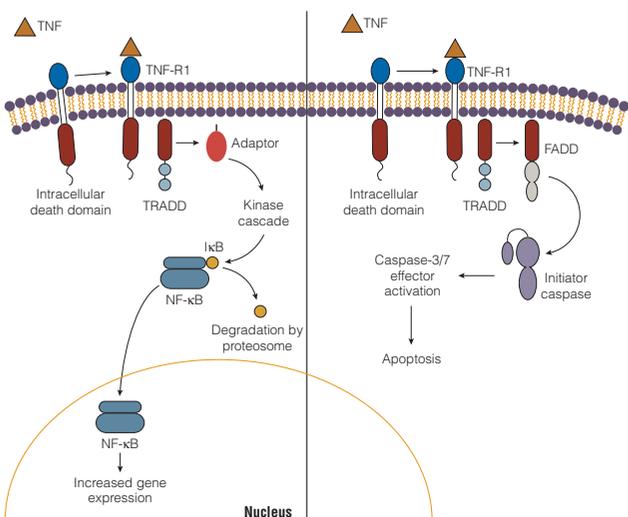


図1. TNF $\alpha$ が媒介する2つの細胞内経路の模式図 (生存性に基づくNF- $\kappa$ B活性化とアポトーシスを含む)

96 ウェルプレートに自動播種したGloResponse™ NF- $\kappa$ B-RE-*luc2P* HEK293細胞にTNF $\alpha$ 処理および抗TNF $\alpha$ 抗体処理を行い、ONE-Glo™ Assayで作製した用量反応曲線を図2に示します。懸濁細胞条件下にTNF $\alpha$ 処理のみを行った場合におけるTNF $\alpha$ 誘導のEC<sub>50</sub>値 (50%有効濃度) は1.1ng/mlでした。懸濁細胞条件下にTNF $\alpha$ を中和した場合におけるND<sub>50</sub>値 (50%中和量) は78ng/mlでした。どちらの自動化処理条件の場合にも、Z'因子の値は0.71を上回っており、これはアッセイの品質がすぐれていることを示しています。また、どちらの処理条件でも広いダイナミックレンジが得られました。

### L-929細胞毒性モデルを用いた抗TNF $\alpha$ 抗体の力価測定

TNF $\alpha$ は、転写活性化イベントを開始・促進するだけでなく、外因性のアポトーシス経路を通じてプログラム細胞死の促進も行います。TNF $\alpha$ タンパク質リガンドによりTNF受容体が活性化されると、プロカスペーゼ-8がプロセッシングを受けて活性型カスペーゼ-8が生じ、活性型カスペーゼ-8はプロカスペーゼ-3 (およびプロカスペーゼ-7) を活性化して触媒能を有する活性型カスペーゼ-3/7が産生されます。最終的に、細胞内のさまざまな構造エレメントに対するカスペーゼ-3/7のタンパク分解活性がアポトーシスによる細胞死を引き起こします (図1)。

TNF $\alpha$ の生物学的活性や、標準化された濃度のTNF $\alpha$ 存在下における抗TNF $\alpha$ 製剤の力価は、処理後の生細胞数を計数することにより測定できます。CellTiter-Glo® Assayは、頑健で信頼性の高い迅速な細胞生存率測定方法として知られており、このアプリケーションに最適です。

マウス細胞株L-929 (ATCC) はTNF $\alpha$ に対する感度が高いことが従来より知られているため、被験細胞として使用しました。L-929細胞を10% FBS含有DMEMに懸濁し、ウェル側面が白色不透明で底部が透明の96ウェル Costar® #3903マイクロプレート (Corning) に50 $\mu$ l/wellの密度で播種しました。細胞を37°C、5% CO<sub>2</sub>の無菌培養装置内で4時間接着させました。TNF $\alpha$ は、抗腫瘍性抗生物質アクチノマイシンD (Sigma) を添加した培養液に1ng/mlの濃度で希釈しました。抗TNFモノクローナル抗体を、上記のアクチノマイシンD含有培養液で5 $\mu$ g/mlに希釈し、2段階の希釈系列を作製しました。TNF $\alpha$ 希釈液と抗体希釈液を混合し、37°C、5% CO<sub>2</sub>で30分間プレインキュベーションしました。細胞を播種したアッセイプレートに各希釈液を50 $\mu$ lずつ分注し、オービタルシェーカーで軽く混和させたのち37°C、5% CO<sub>2</sub>で一晩インキュベーションしました。Z'因子の分析のため並行してもう1枚同じプレートを作製し、5 $\mu$ g/mlの抗TNF $\alpha$ 抗

体と1ng/mlのTNF $\alpha$ を添加し、また細胞毒性の対照としてはTNF $\alpha$ と培地を添加しました。

一晩処理したのち、Freedom EVO® Robotic Workstation (Tecan) を用いて各プレートにCellTiter-Glo® Reagentをウェルあたり100 $\mu$ l添加し、オービタルシェーカーで軽く混和させました。細胞生存率と相関する発光量をSafire2 Microplate Reader (Tecan) で測定しました。

96ウェルプレート上でL-929細胞にTNF $\alpha$ 処理および抗TNF $\alpha$ 抗体処理を行い、自動分注システムでCellTiter-Glo® Assayを実施することにより作製した用量反応曲線を図3に示します。接着細胞条件下にTNF $\alpha$ を中和した場合におけるND<sub>50</sub>値は45ng/mlでした。この自動化アッセイのZ'因子の値は0.76を上回っており、ここでもすぐれたアッセイの品質が示されました。

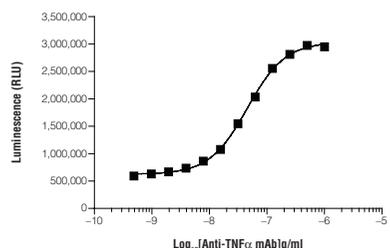


図3. 96 ウェルプレートフォーマットのL929細胞におけるTNF $\alpha$ 中和処理後の自動化CellTiter-Glo® Assayの用量反応曲線

本アッセイでのND<sub>50</sub>は45ng/mlであり、Z'因子は0.76を上回った。

### 結論

本稿で紹介した2つの生物発光アッセイがともに有するホモジニアスでシンプルな操作性は、自動化プラットフォームで使用した場合を含め、これらの方法が細胞生存率やリシフェラーゼ発現を評価するさまざまなアプリケーションにとって最適であることを示しています (いずれの場合もZ'因子が0.71を上回りました)。TNF $\alpha$ や抗TNF $\alpha$ 製剤の生物学的力価は、GloResponse™ NF- $\kappa$ B-RE-*luc2P* HEK293 Cell LineとONE-Glo™ Luciferase Assayを組み合わせることで、または細胞毒性試験用の細胞株モデルとCellTiter-Glo® Assayを組み合わせることで、高い再現性で容易に測定することができます。どちらのアッセイでもTNF $\alpha$ の生物学的活性に関して実用的な測定値が得られますので、使用環境が研究であるのかバイオ製剤製造であるのかにかかわらず、力価の特性解析に有用であることが実証されるはず です。

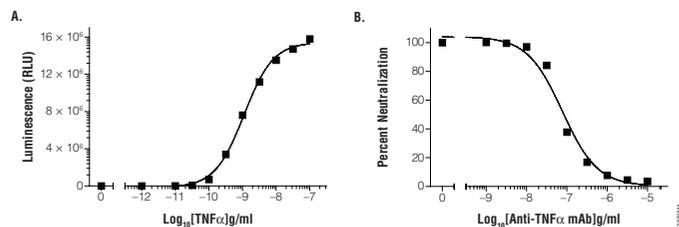


図2. 自動化 ONE-Glo™ Assay の用量反応曲線

用量反応曲線は、96ウェルプレートフォーマットでTNF $\alpha$ 処理 (パネルA) および抗TNF $\alpha$ 処理 (パネルB) したGloResponse™ NF- $\kappa$ B-RE-*luc2P* HEK293細胞について作製した。TNF $\alpha$ 処理アッセイのEC<sub>50</sub>値は1.1ng/mlであった。TNF $\alpha$ 中和アッセイのND<sub>50</sub>値は78ng/mlであった。どちらのアッセイともZ'因子の値は0.71を上回った。

### 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 ml	G7570	12,000
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110	17,000
Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Human, Recombinant (rhTNF $\alpha$ )	10 $\mu$ g	G5241	40,000
GloResponse™ NF- $\kappa$ B-RE- <i>luc2P</i> PHEK293 Cell Line	2 vials	E8520	650,000
GloMax®-Multi Detection System		E7031	3,000,000

日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

# プロメガ株式会社

本社 〒103-0011  
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15  
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011  
大阪府大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室  
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2008年10月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店