

免疫チェックポイントをレポーターで定量 PD-1/PD-L1

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の研究開発が加速しています。このセクションでは、抗体医薬の研究・評価試験のうち従来法の問題を新たな技術で克服したアッセイや、従来法では対応できなかった新しいニーズに応えるアッセイをシリーズでご紹介していきます。

バイオ医薬プロジェクト第二回目は今一番ホットなターゲットの一つ、抗 PD-1/PD-L1 抗体の新しい評価法とその他の免疫チェックポイントアッセイを取り上げます。

PD-1/PD-L1 経路はもともと正常組織を免疫反応から保護するためのチェックポイントの一つであり、過剰な T 細胞活性化をコントロールする経路です。T 細胞に発現している PD-1 と、抗原提示細胞の PD-L1 が結合すると T 細胞は抑制され、活発な免疫反応が妨げられます。がん細胞はこの経路を利用し、自ら PD-L1 を発現することにより T 細胞の攻撃から逃れています。従って中和抗体などにより PD-1/PD-L1 経路をブロックすれば、がん細胞近辺の T 細胞が活性化されてがんを攻撃・除去することができるのです。

このメカニズムに基づき、抗 PD-1/PD-L1 ブロック抗体はこれまで①抗体結合アッセイ、②プライマリー T 細胞活性化アッセイ（細胞増殖、サイトカイン放出、細胞表面マーカー検出）、などの方法で評価されてきました。しかし①の抗体結合アッセイは機能アッセイではないという問題があり、また②の T 細胞活性化アッセイはプライマリー T 細胞を使うためアッセイが煩雑で結果のバラつきが大きく、スクリーニングや安定した抗体評価に使えないという問題がありました。

この問題を克服するため、プロメガではレポーターアッセイを応用した PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay を開発しました。PD-1/PD-L1 経路による T 細胞活性化抑制機構は、主に NFAT シグナル経路の抑制を介したメカニズムであることが分かっていたため、NFAT シグナル経路をレポーター検出するアッセイを構築しました。T 細胞の代わりに NFAT レポーターと PD-1 タンパク質を発現する Jurkat 細胞を使用し、抗原提示細胞（artificial antigen presenting cells, aAPC）として PD-L1 を発現させた CHO-K1 細胞を使用することで、プライマリー細胞を調製する煩雑さや結果の不安定さを克服しています（図 1）。

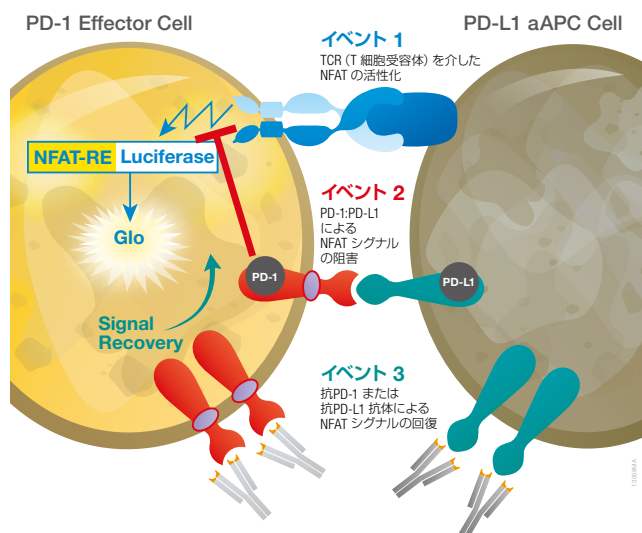


図 1. 免疫チェックポイント遮断アッセイの概要

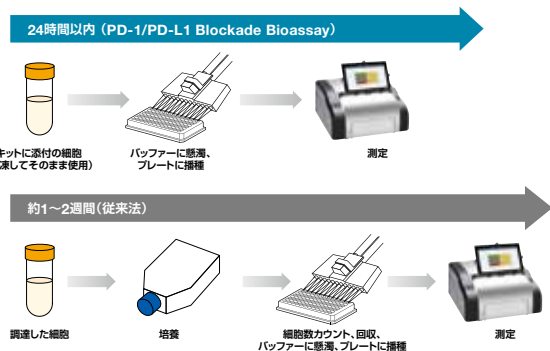


図 2. 従来 1-2 週間かかっていたプロトコルが大幅に簡便化され、早ければ 1 日で結果が出る

また ADCC Reporter Bioassay 開発などで培ったノウハウをもとに細胞培養が不要な Thaw-and-Use フォーマットを採用し、より簡便かつ安定なアッセイプロトコルにしました。これにより従来はプライマリー T 細胞の調製から 1 週間以上かかっていたアッセイを、たった 1 日半で終わることができます（図 2）。また HTS にも適したフォーマットであるため、抗体のほかにも PD-1/PD-L1 をブロックするペプチドや化合物のスクリーニングも容易に実施できます（図 3）。

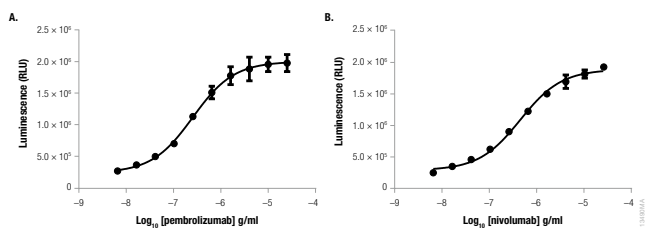


図 3. 抗 PD-1 抗体医薬品での力価測定

PD-L1 aAPC/CHO-K1 細胞を播種し、16-20 時間インキュベーションした。PD-1 エフェクター細胞とペンブロリズマブ（パネル A）またはニボルマブ（パネル B）の濃度を変えて添加し、37℃で 6 時間インキュベーションした後、Bio-Glo™ Reagent を加え、GloMax® Discover System を用いて測光した。データは GraphPad Prism® Software を用いて 4PL curve にフィッティングさせた。EC₅₀ 値はそれぞれ 0.25 µg/ml（ペンブロリズマブ；パネル A）および 0.44 µg/ml（ニボルマブ；パネル B）。データは thaw-and-use の細胞を用いて取得した。

プロメガではこの他にも T 細胞活性化をベースとした免疫チェックポイントアッセイを多数開発しています。もう一つの PD-1 リガンドである PD-L2 のアッセイをはじめ、CTLA-4、TIGIT/CD155 などの Co-inhibitory アッセイ、GITR、CD40、4-1BB、OX40 などの Co-stimulatory アッセイが開発済みであり、今後も新たなターゲットや既存ターゲットのコンビネーションアッセイを開発していく予定です。

ここでご紹介した免疫チェックポイントアッセイ以外にも、プロメガでは抗体医薬品開発をサポートする画期的な製品を次々に開発しています。次回の記事をお楽しみに！

抗体をズバッと断片化！ IdeS、IdeZ

抗体の構造解析を行っている方、抗体を効率よく切断できる IdeS や IdeZ プロテアーゼはご存知ですか？

抗体はサイズが大きいいためそのままの解析が難しい反面、トリプシンなどの消化に耐性があり、分析者を困らせてきました。お困りの方、ぜひ一度 IdeS や IdeZ をお試しください。IdeS はトリプシンやペプシンと異なり、抗体の特定部位を高効率で切断する酵素です（図 4）。IdeZ は IdeS では切断できなかったマウス IgG2a や IgG3 も切断できる改良型で、さらに汎用性を高めた製品です。

品質管理試験では ADCC、ADCP アッセイで測定できる抗体力価と並んで、抗体の物性解析も重要です。IdeS、IdeZ で物性解析もワンランクアップさせましょう。

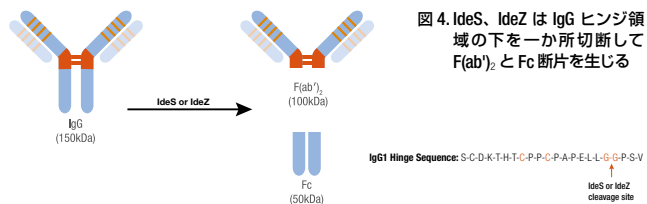


図 4. IdeS、IdeZ は IgG ヒンジ領域の下を一か所切断して F(ab')₂ と Fc 断片を生じる

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
免疫チェックポイントアッセイ			
PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay	1 kit	J1250	151,000
	5 kit	J1255	680,000
	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
IdeZ Protease, Frozen	2000 u	V8342	86,000
IdeS Protease, Frozen	2000 u	V7512	81,000

⑤ キャンペーン対象製品：詳細については 8 ページをご覧ください。