

驚きの再現性：発光レポーターを利用した ADCC アッセイ

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。バイオ医薬品の一般化を後押しすると期待されているバイオシミラーの開発も活発化しています。「同程度の薬効を示す=バイオシミラー」だけでなく「よりよい効果を持つ=バイオベター」という考え方も出てきており、開発研究から製造、品質管理まで、新たな技術が求められていることは間違いありません。

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ます。

第一回目は抗体医薬の主要な作用機序の一つ、Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) アッセイを取り上げます。従来の ADCC アッセイは ①初代 NK 細胞 (PBMC など) をエフェクター細胞として使用し、②エフェクター細胞が惹起したターゲット細胞死を検出していました。

しかし、バックグラウンドが高いため十分な検出感度が得られず、初代 NK 細胞の活性が不安定であるため再現性が低い、という問題がありました。その上作業が煩雑で時間がかかるため開発研究においても使いづらいアッセイでしたが、さらに厳密さが要求される品質管理試験のクライテリアを満たすことは極めて難しいものでした。

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 **ADCC Reporter Bioassay** を開発しました。ADCC では、抗体によるエフェクター細胞活性化の際に NFAT シグナル経路が活性化されることがターゲット細胞死につながるトリガーであることが報告されています。この NFAT シグナル経路活性化をレポーターで検出することにより、従来のようにターゲット細胞死を検出する方法に比べてバックグラウンドが大幅に低くなり、検出感度が格段に向上しました (図 1)。またエフェクター細胞として組換え Jurkat 細胞を使うことにより、NK 細胞の不安定さに起因する問題を克服し、品質管理試験に使用できる高い再現性と信頼性を実現しました (図 2)。

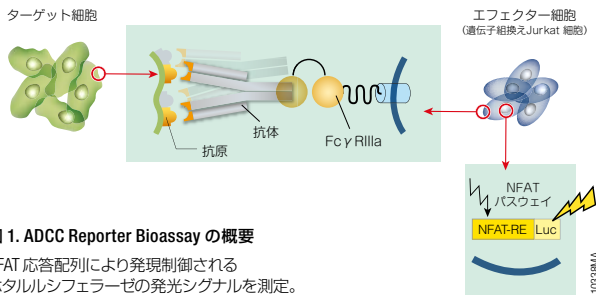


図 1. ADCC Reporter Bioassay の概要

NFAT 応答配列により発現制御されるホタルルシフェラーゼの発光シグナルを測定。

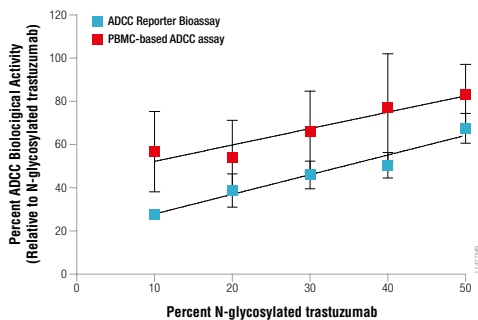


図 2. 抗体グリコシル化にともなう ADCC 活性の従来法との比較

従来法 (■) に比べ、レポーター法 (■) のエラーバーは非常に小さい

アッセイプロトコールにも工夫を凝らしています。細胞培養が不要な Thaw-and-Use フォーマットを採用し、細胞を試薬のように使うことができます。このため従来 1 週間以上かかっていたアッセイを、たった 1 日で終えることができます (図 3)。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ADCC レポーターアッセイ			
コンプリートキット			
ADCC Reporter Bioassay, Complete (WIL2-S)	1 キット	G7014	138,000
ADCC Reporter Bioassay, Complete (Raji)	1 キット	G7015	138,000
コアキット			
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit	1 キット	G7010	115,000
	5 キット	G7018	515,000

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。

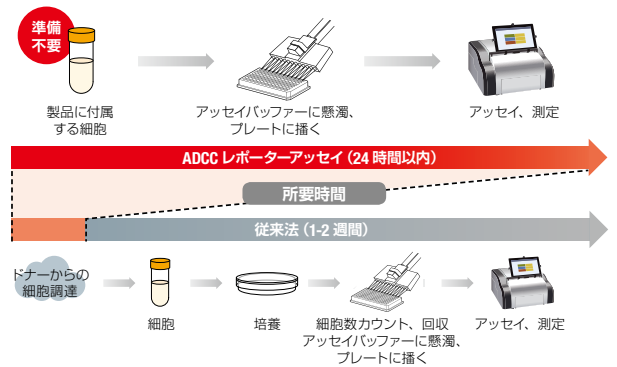


図 3. 飛躍的に短縮されたプロトコル

ADCC Reporter Bioassay のメリットはこれだけではありません。ADCC において、抗体はエフェクター細胞表面の Fc γ RIIIa 受容体と結合しますが、この受容体には抗体と親和性の高い **V variant** と親和性の低い **F variant** があり、F variant は ADCC が起きにくい事が報告されています。従来法では親和性の高い V variant でなければ十分な差が見られなかったため、V variant をホモで持つドナーからの細胞を使用していましたが、実際は約 85% の人が F variant をヘテロまたはホモで持つと報告されており、V variant の調達が困難でした。そのため、多くの患者様での効き目を評価できない点が問題となっていました。ADCC Reporter Bioassay では Jurkat 細胞に外来性 Fc γ RIIIa 受容体を導入しているため、V variant または F variant を単独で発現するエフェクター細胞を容易に作る事ができます。また感度が高いため、抗体への応答性が低い F variant でも十分なシグナルが得られ、効果判定ができるようになったのです (図 4)。

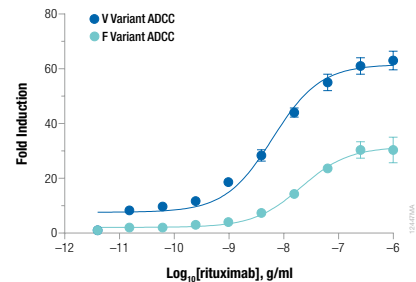


図 4. V variant と F variant の応答性比較

今回紹介した ADCC アッセイの他にも、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。次回は免疫チェックポイントでホットな抗 **PD-1 / PD-L1 抗体** のアッセイをご紹介します。お楽しみに！

ADCC レポーターバイオアッセイについては次ページをご覧ください。

※コンプリートキットはエフェクター細胞(組換え Jurkat 細胞[Fc γ RIIIa-V158 バリエーション、luc2])、ターゲット細胞 (WIL2-S または Raji)、コントロール抗体 (Anti-CD20)、アッセイ試薬などが付属します。
 ※コアキットにはコンプリートキットに含まれるターゲット細胞およびコントロール抗体が除かれています。
 ※この他のエフェクター細胞として、Fc γ RIIIa-F158 バリエーション、マウス Fc γ RIV、マウス Fc γ RIII などをご用意しております。詳細については弊社までお問合せください。

今すぐ始めたいけど装置が無い? そんな時は...
www.promega.co.jp/rentamax/

ADCP モレポーターバイオアッセイ

最近 ADCC と並んで、ADCP という言葉を見たまたは聞いたことがあるのではないのでしょうか？ ADCP とはどのような現象でしょうか？ また ADCC と何が違うのでしょうか？

ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) の主役は NK 細胞です。活性化した NK 細胞は液性成分を分泌してターゲット細胞を殺します。一方、ADCP (Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis) の主役はマクロファージです。活性化したマクロファージはターゲット細胞を貪食することで排除します (図 5)。ADCP ではエフェクター細胞の種類のほか、関係する Fc γ 受容体の種類も違います。ADCC ではタイプ III 受容体 (Fc γ RIIIa) を介してエフェクター細胞が活性化しますが、ADCP ではタイプ II 受容体 (Fc γ RIIa) を介するため、ADCC アッセイ用の細胞では ADCP アッセイができません。ADCP アッセイのニーズが高まったことを受け、この度プロメガでは ADCP Reporter Bioassay を発売しました。タイプ II 受容体にも高親和性の H variant と低親和性の R variant があることが分かっており、プロメガでは両方のアッセイキットをご用意しています。R variant キットはまだカスタム品ですが、将来的にカタログ品化する予定です。

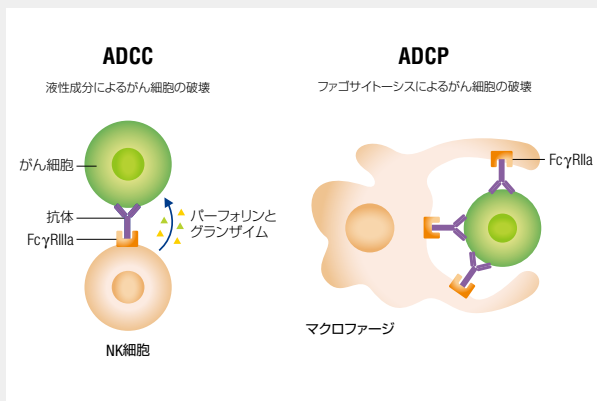


図 5. ADCC と ADCP の作用機序比較

ADCC および ADCP バイオアッセイ

バイオアッセイ	システムに含まれる細胞	カタログ番号
ADCC Reporter Bioassays		
Complete Kit (WIL2-S) ¹		G7014
Complete Kit (Raji)	Effector Cells: Fc γ RIIIa-V158 Jurkat cells	G7015
Core Kit2.	Target Cells: WIL2S or Raji cells	G7010
ADCC Reporter Bioassays, F Variant5		
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RIIIa-F158 Jurkat cells	G9790
mFcγRIV ADCC Reporter Bioassays		
Complete Kit	Effector Cells: Mouse Fc γ RIV Jurkat cells	カスタム品
mFcγRIII ADCC Reporter Bioassays		
Core Kit	Effector Cells: Mouse Fc γ RIII Jurkat cells	カスタム品
FcγRIIIa-H ADCP Reporter Bioassays 新発売!		
Complete Kit		G9901
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RIIIa-H131 Jurkat cells	G9991
FcγRIIIa-R ADCP Reporter Bioassays		
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RIIIa-R131 Jurkat cells	カスタム品
FcγRI ADCP Reporter Bioassays		
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RI Jurkat cells	カスタム品

※カスタム品については弊社テクニカルサービス部までお問合せください。