

プライマリー細胞不要！ T 細胞活性化バイオアッセイ

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。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。

第四回目は「T Cell Activation Assays (T 細胞活性化アッセイ)」のお話です。

①そもそも T Cell Activation とは？

PD-1/PD-L1 チェックポイント阻害に代表されるがん免疫療法では、T 細胞活性化を抑制する機構の解除を目的としています。またがん免疫チェックポイント阻害に続くターゲットとして、積極的に T 細胞活性化を起こすパスウェイの活性化に期待が寄せられています。

ところで、そもそも T 細胞活性化 (T Cell Activation) とはどのような現象をさすのでしょうか？ 詳しい説明は免疫学の教科書に譲りますが、非常にシンプルに定義すると「抗原の T 細胞受容体 (TCR) 刺激により IL-2 が産生されること」と言えます。この TCR から IL-2 産生 (= IL-2 プロモーター活性化) につながるシグナル経路は複数ありますが、重要なものの一つが NFAT 経路です。カルシウムシグナルの転写因子として有名な NFAT は Nuclear factor of activated T-cells の略であり、もともと T 細胞活性化に深い関わりのある分子なのです。IL-2 プロモーターには NFAT シグナルを受け取る NFAT-RE とそれ以外のシグナル経路の刺激を受け取る領域があり、NFAT 経路は主に TCR/CD3 複合体を介して活性化され、TCR の co-receptor である CD28 を介したシグナルはそれ以外の領域を活性化することが分かっています。このメカニズムを再現した製品 T Cell Activation Bioassays では、主に TCR/CD3 経路の解析に使える NFAT レポーターを組み込んだタイプ (図 1A) と、CD28 など他のシグナル経路の解析にも使える IL-2 プロモーターのレポーターを組み込んだタイプ (図 1B) の 2 つを用意しました。

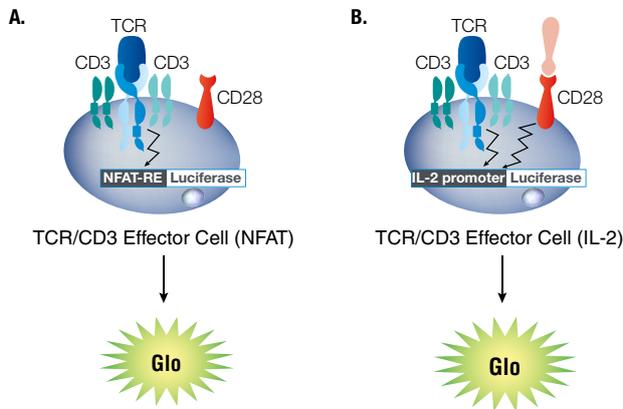


図 1. T Cell Activation Bioassay のアッセイ原理

この 2 つの使い分けは、解析対象シグナルが NFAT シグナル以外の経路に關与するかどうかをもとに考えます。例えば TCR/CD3 経路をブロックする PD-1/PD-L1 の解析には NFAT レポータータイプが使えますが、CD28 経路をブロックする CTLA-4 の解析には IL-2 プロモーター全長を持つ IL-2 レポータータイプが必要です。PD-1/PD-L1 のようにどちらも使える場合はシグナルが強い NFAT レポータータイプが使いやすいでしょう (図 2)。

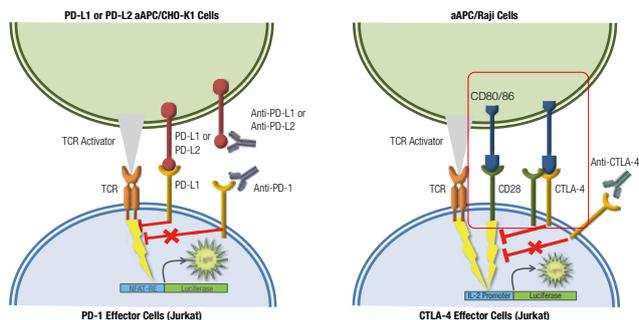


図 2. 2 つのタイプの使い分け

② T Cell Activation Bioassay アプリケーション

Anti-CD3 といった普通のモノクローナル抗体による T 細胞活性化の解析はもちろん、Abatacept (CTLA-4 R と IgG-Fc のキメラタンパク質) のような遺伝子組換え融合タンパク質や、Blinatumomab (CD3 と CD19 に結合する二重特異性抗体) などの評価に使用したアプリケーションもあります (技術ポスター: www.promega.co.jp/asy_search.html より “二重特異性抗体” で検索)。

しかしこのような使い方では、Jurkat がもともと持っている分子を介したアッセイしかできません。Jurkat が持っていない因子や変異遺伝子の解析などにも幅広く使いたい。そんな声に対応するため、**実はこのアッセイ、細胞増殖権利付きモデル (Cell Propagation Model, CPM) をご購入いただければ自由に細胞を改変できる**のです。つまり自分のターゲットとなる受容体を発現させたり、疾患原因となる遺伝子を欠損させたり、プローブとなるような分子を組み込んだりすることで、自由にアッセイをデザインできるようになりました。これは今までのプロメガのバイオアッセイとは大きく違う特長です。細胞を改変したアッセイの一例として、キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor, CAR) 発現 T 細胞 (CAR-T) アッセイをご紹介します。

CAR は腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体可変領域の軽鎖 (VL) と重鎖 (VH) を直列に結合させた単鎖抗体 (scFv) を N 末端側に、CD3 と鎖を C 末端側に持つキメラタンパク質の総称です (図 3)。CAR を発現させた T 細胞は scFv 領域で腫瘍抗原を認識した後、その認識シグナルを引き続き CD3 と鎖を通じて T 細胞内に伝達します。さらに T 細胞活性化を増強するため、scFv と CD3 と鎖の間に共刺激分子 (CD28、4-1BB のドメイン) を組み込んでいます。図 3 は CAR の構造と CAR 発現 NFAT エフェクター細胞でのアッセイデータです。

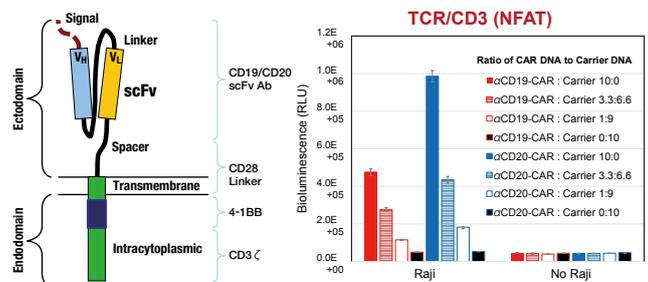


図 3. 抗 CD19 または抗 CD20 キメラ抗原受容体 (CAR) 構造と T Cell Activation Bioassay データ
左: CAR の構造。
右: TCR/CD3 Effector Cells (NFAT) に抗 CD19-CAR または抗 CD20-CAR ベクターを一過性に導入し、Raji 細胞と反応させた。導入した発現ベクター量依存的にシグナルが得られている。

今回ご紹介した T Cell Activation Bioassay は ADCC Reporter Bioassay をはじめ、多くのプロメガバイオアッセイのベースとなったアッセイです。このアッセイ、他のバイオアッセイとは違って細胞増殖権利付きモデル (Cell Propagation Model, CPM) をご購入いただければ、好きなタンパク質を組み込んだり、逆にノックアウトしたりと自由に改変できる点も見逃せません。次々出てくる免疫療法ターゲットをいち早く解析するためにも、アッセイ構築ベースとしてラボに常備いただきたい製品です。

関連製品

製品名	カタログ番号	価格 (¥)
(NFAT)	J1621	85,000
T Cell Activation Bioassay (NFAT) 5X	J1625	385,000
(NFAT), Propagation Model	J1601	お問合せ下さい
(IL-2)	J1651	85,000
T Cell Activation Bioassay (IL-2) 5X	J1655	385,000
(IL-2), Propagation Model	J1631	お問合せ下さい