

分泌された T細胞活性化マーカーを 90分で定量

Simple Plex™全自動ELISAを使用



イントロダクション

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞は優れた治療効果がありますが、製造ワークフローは複雑で、厳しい規制要件を満たさなければなりません。CAR T細胞は、患者に投与する前に、In vitroで徹底的に特性評価されなければなりません。Bio-Techneは、細胞治療の開発と製造をサポートするために、Simple Plex T細胞活性化マーカーアッセイを提供しています(表1)。Ella platformのSimple Plexアッセイは、分泌されたT細胞活性化マーカーを迅速かつ正確に評価し、細胞治療の開発と製造効率を高めます。

| T細胞活性化マーカー | |
|------------|-------|
| Granzyme B | IFN-γ |
| IL-2 | TNF-α |
| Perforin | |

表1. Simple PlexのT細胞活性化マーカーアッセイ

このアプリケーションノートでは、Bio-Techneの新しい非ウイルス遺伝子デリバリーテクノロジーであるTcBuster™でCD19 CAR T細胞を作製し、EllaのT細胞活性化マーカーアッセイプラットフォームとしての使用を検証します。詳細については、以下をお読みください。

CD19 CAR T細胞はCD19+がん細胞のみ溶解

最初の実験は、CD19 CART細胞の細胞傷害活性をテストするために設計されました。次世代の非ウイルス遺伝子デリバリーシステムであるTcBuster™を用いて、抗CD19 CARを発現するように、T細胞を設計しました。CD19 CAR T細胞を、CD19を共発現する(Nalm-6)または発現しない(K562)ルシフェラーゼ発現癌細胞と共培養しました。24時間後、細胞上清にルシフェリンを混ぜ、ルシフェラーゼを評価しました。細胞溶解は、Nalm-6と共培養すると促進されましたが、K562と共培養しても促進されませんでした。溶解は、K562培養と混ぜた抗CD19 CARを導入していないコントロールT細胞と同等でした。このデータは、抗CD19 CAR発現T細胞がCD19+Nalm-6細胞を溶解したが、CD19- K562細胞は溶解しなかったことを示しています(図1)。



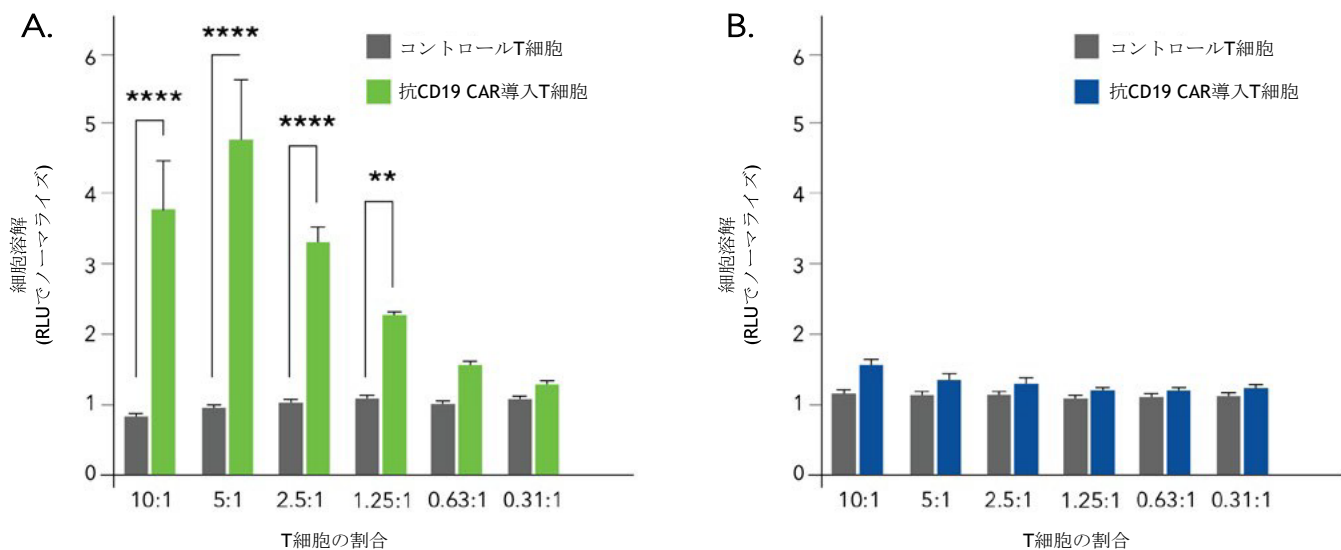


図 1.細胞溶解活性はNALM-6共培養で観察されたが、K562共培養では観察されなかった。CD19 T細胞とNalm-6 (A) またはK562 (B) 癌細胞株をさまざまな比率 (10 : 1、5 : 1、2.5 : 1、1.25 : 1、0.63 : 1、または0.31 : 1) で24時間共培養しました。データは、がん細胞のみ培養したウェルの相対光(relative light unit: RLU)でノーマライズしました。棒グラフ=平均±SD (n = 3)、**** P <0.0001、**P<0.01。

Simple PlexアッセイでT細胞活性化マーカーの分泌を迅速に定量

次に、T細胞活性化マーカーの分泌を評価しました。抗CD19 CAR発現T細胞とNalm-6またはK562癌細胞を5 : 1の比率で24時間共培養しました。共培養後、上清を回収し、500 x gで5分間遠心して細胞残骸を除去しました。上清と次のSimple Plex T細胞マーカーアッセイを用いて90分でアッセイしました : Granzyme B、TNF-α、IFN-γ、およびIL-2。図2はコントロールと比較して、CD19 CAR T/Nalm-6共培養でのみ、T細胞マーカーの分泌が明らかに上昇したことを示しています。

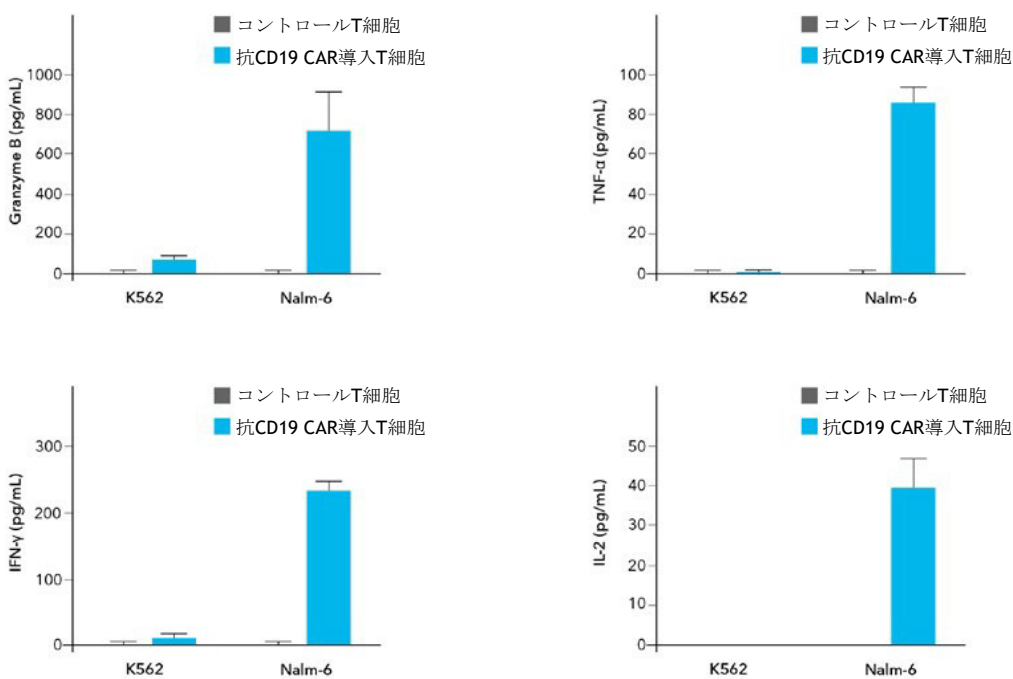


図 2. CD19 CAR T細胞をCD19+ Nalm-6がん細胞と共培養すると、T細胞活性化マーカーが劇的に上昇します。T細胞活性化マーカー-Granzyme B、TNF-α、IFN-γ、およびIL-2について、32x4 Multianalyte カートリッジを用いてEllaで並行してアッセイを行った。棒グラフ = 平均 ± SD (n=3)。

Simple Plexのイムノアッセイは90分でPerforinの分泌量を定量

Perforinの分泌を評価するために、さまざまな比率でNalm-6やK562と共培養し、上清を集め、Simple PlexのPerforinアッセイを行いました。図3で見られるように、CD19+/Nalm-6共培養では、コントロール共培養上清よりもすべての培養上清にPerforinが多く分泌されていました。CD19 CAR T細胞/K562共培養では、コントロール共培養上清よりも最もT細胞の割合の高い(10:1)培養上清のみにPerforinが多く分泌されていました。

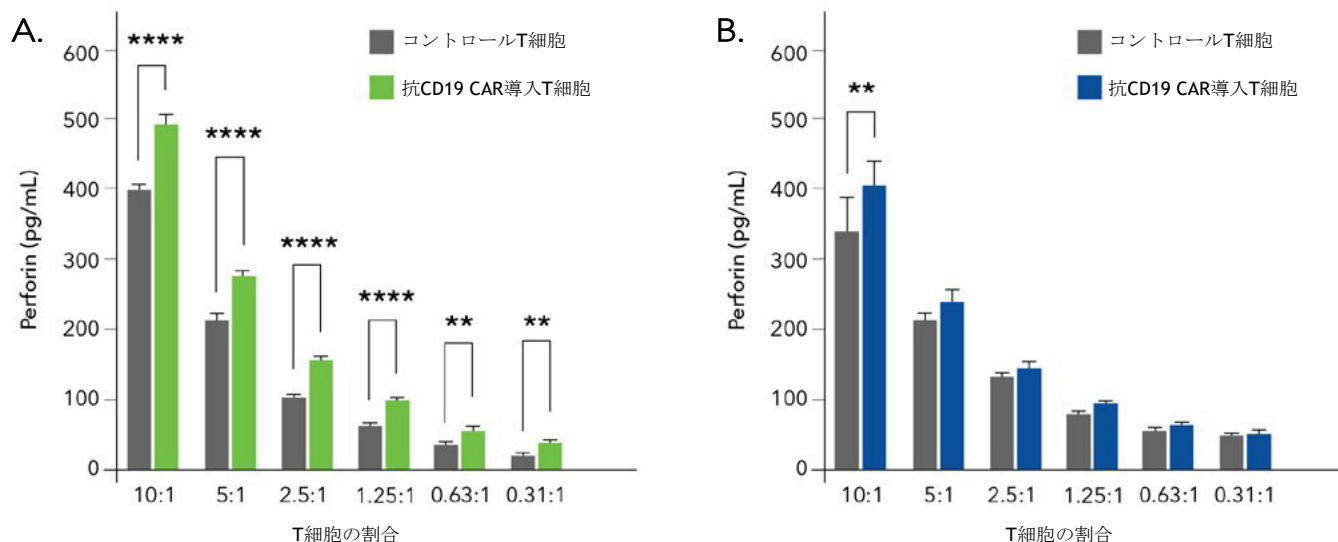


図3. すべてのNalm-6共培養上清で、有意にPerforin分泌が増加した。棒グラフ = 平均 ± SD (n=3), ****P<0.0001, **P< 0.01.

まとめ

この一連の実験の理論的根拠は、細胞治療の開発と製造におけるSimple Plexイムノアッセイの価値を実証することでした。この研究結果を図4に示しています。CD19 CART細胞はCD19+Nalm-6細胞を溶解します。PerforinとT細胞活性化マーカーの分泌は、これらの癌細胞とCD19 CART細胞を共培養すると劇的に促進されます。逆に、CD19-K562細胞とCD19 CAR T細胞を共培養しても、溶解活性に影響を与えません。CD19 CAR T細胞を共培養しても、T細胞活性化マーカーとPerforinは強力に分泌されませんでした。

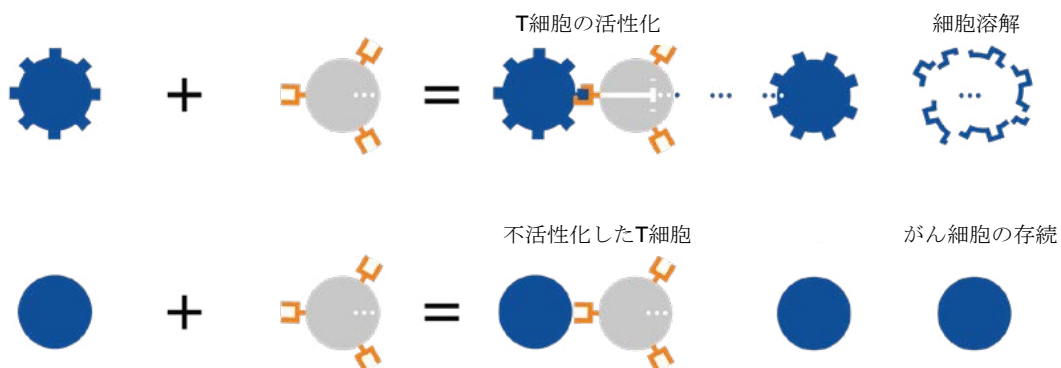


図 4. サイトカインとPerforinの分泌および細胞溶解はCD19+ Nalm-6/ CAR T共培養では観察されたが(A)、CD19- K562/ CAR T共培養で観察されなかった(B).

使いやすいSimple Plexアッセイにより90分で正確なデータを取得

Simple Plex多分析物アッセイは比類のない柔軟性と使いやすさに加えて、わずか90分で高品質な定量データを提供することを実証しました。サンプルをロードしてスタートを押すだけです。さらに試薬を追加する必要ありません。Simple Plexイムノアッセイの利点として、当社工場で作成された標準曲線データが組み込まれていること、最大4ログのダイナミックレンジ、および細胞療法製造プロセスに対応する21 CFR Part 11準拠などがあげられます。Simple PlexアッセイはR&D Systemsの抗体と垂直統合されており、信頼できる再現性の高いデータを提供します。

Simple Plex T細胞活性化マーカーアッセイ

正確で再現性の高いデータを90分で取得しましょう。

Ellaの詳細および価格の問い合わせ

Granzyme B
IFN- γ
IL-2
IL-8/CXCL8
Perforin
TNF- α

Quantikine™ T Cell Activation ELISAキット

これらのReady-to-use ELISAキットは、市場で最も引用されています。

Granzyme B
IFN- γ
IL-2
IL-8/CXCL8
TNF- α

細胞および遺伝子治療の開発および製造リソース

TcBuster™非ウイルス遺伝子工学サービス

Cloudz™ Cell Activationキット

治療薬製造向けGMPグレードタンパク質

GMPグレード関連製品製造能力に関する詳細は

こちらからご覧ください

biotechne®

R&D Systems™ Novus Biologicals™ Tocris Bioscience™ ProteinSimple™ ACD™

Trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

STRY0237069_IBU_AN_CellKillingAppNote_LA