

# がん免疫キリングアッセイ

$^{51}\text{Cr}$  リリースアッセイ、LDH アッセイ、フローサイトメトリーに比べて多くの利点がある新たな実験手法のご提案

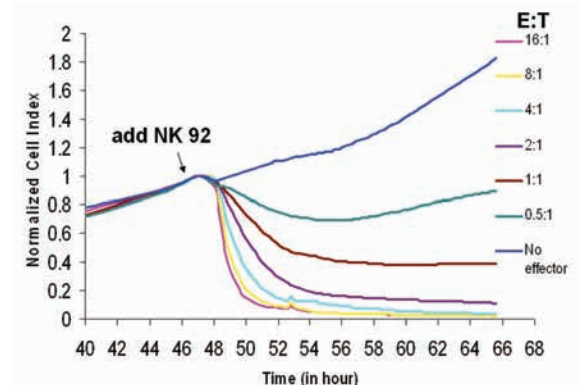


がん細胞に対する免疫細胞の細胞傷害活性を  
同一ウェルからラベルフリーでリアルタイムに連続測定します。

# がん細胞に対する免疫細胞の細胞傷害活性 いまの実験手法にご満足ですか？

免疫細胞のキリング活性の測定や抗体医薬品の抗がん活性のスクリーニングでは、クロムリリースアッセイ ( $^{51}\text{Cr}$  アッセイ)、LDH アッセイ、フローサイトメトリーなどが用いられてきました。xCELLigence RTCA システムによるがん免疫キリングアッセイは、近年多くの学術論文や製薬会社でのスクリーニングで活用されている新しい実験手法です。

xCELLigence RTCA システムを用いることで、従来法の課題を克服して、誰でも簡単に優れたデータを取得していただけます。



## ✓ ラベルフリー

RI や蛍光試薬を用いずに非染色で測定が可能です。Non-RI でしかも従来法よりはるかに少ない時間で測定が可能です。

## ✓ すべての時間を網羅した連続データ

同一ウェルの細胞のデータを短期から長期まで連続的に測定します。従来の 1 ウェル 1 タイムポイントでデータを取得する実験手法と異なり大切なキリング活性を見逃しません。また細胞傷害スピードを指標とした評価を可能にします。

## ✓ ハイスループット

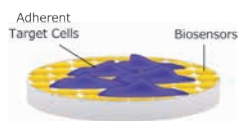
最大 96 ウェル x6 枚まで同時に実験を行っていただけます。多くの抗体医薬品候補や様々なコンストラクトの CAR-T 細胞を同時にスクリーニングできます。

## ✓ ビボ実験の予測性が高いデータを取得

極めて高感度で測定できるため低い ET 比で実験が可能です。動物体内に近い ET 比でビボ実験の予測性が高いデータを取得します。

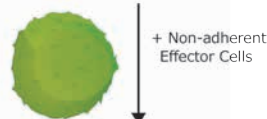
## ● 測定原理：ターゲット細胞の生死を電気抵抗値で追跡 ●

Step1



接着系のターゲット細胞（がん細胞）をバイオセンサープレート（E-Plate）の各ウェルに播種します。細胞が増殖すると Cell Index（電気抵抗値）が上昇します。

Step2



ターゲット細胞播種の 24 時間後、あるいは Cell Index を見ながら適切な時間に、エフェクター細胞（免疫細胞）をウェルに加えます。エフェクター細胞は浮遊細胞なので電気抵抗値に寄与しません。

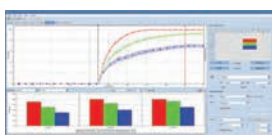
※ 細胞が沈んで電極に接することで多少は電気抵抗値が上がりますが、その上昇は極めてわずかです。また、ソフトウェアでエフェクター細胞のみのシグナルを差し引くことができます。

Step3



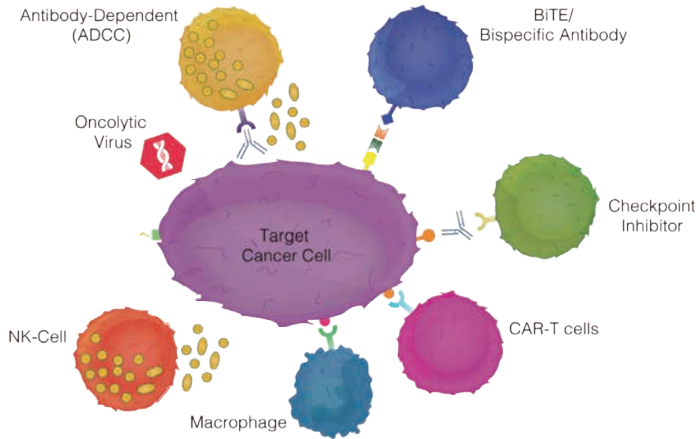
エフェクター細胞によりターゲット細胞が傷害を受けると、ターゲット細胞が電極面に接着しなくなり、Cell Index が下がります。xCELLigence RTCA システムでは細胞傷害を極めて高感度かつ客観的にモニタリングできます。

Step4



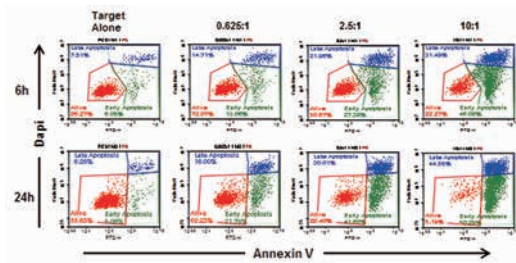
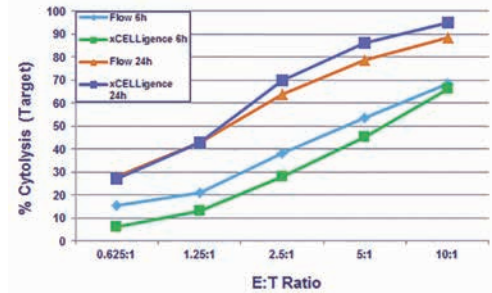
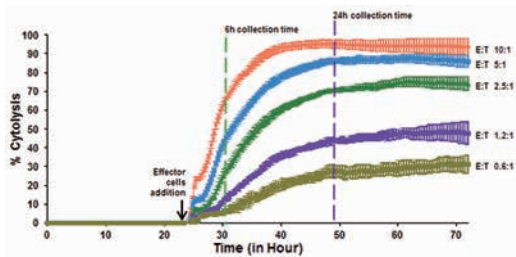
RTCA IMT Software（がん免疫キリング実験用オプションソフトウェア）で Cell Index を % Cytolysis に変換し、様々な解析を実行します。イメージングデータと異なり主観に頼らず、短時間で結果を得ることができます。

## ● 多くのがん免疫治療モダリティに使用可能 ●



CAR-T/TCR-T 細胞などの遺伝子改変 T 細胞から、免疫チェックポイント阻害薬、ADCC/BiTE 活性抗体まで多くの種類のがん免疫療法の in vitro 実験にお使いいただけます。腫瘍溶解性ウイルスによる溶解試験も可能です。さらに、複数のモダリティを組み合わせた複合免疫療法のご実験など、抗がん効果のタイムスケールが読めない場合でも、すべてのタイムポイントのデータを取得可能な xCELLigence RTCA システムは大切な反応を見逃しません。

## ● 確かなデータ ●



xCELLigence RTCA システムを用いて細胞傷害活性を測定した後に、エフェクター細胞添加 6 時間後および 24 時間後のウェルからターゲット細胞を回収してフローサイトメーターでアポトーシスアッセイを行いました。xCELLigence RTCA システムとフローサイトメーターで % Cytolysis が一致することが確かめられました。

## ● スループットに応じて装置をチョイス ●

システム	xCELLigence DP	xCELLigence SP	xCELLigence MP
------	----------------	----------------	----------------



スループット	3 x 16 wells (48 ウェル同時測定)	1 x 96 wells (96 ウェル同時測定)	6 x 96 wells (576 ウェル同時測定)
--------	------------------------------	------------------------------	-------------------------------

# がん免疫キリングアッセイの生産性を向上！

RTCA IMT ソフトウェア（がん免疫実験用 オプションソフトウェア）



RTCA IMT Software は、xCELLigence RTCA システムによるがん免疫キリングアッセイのために開発されたオプションソフトウェアです。プレートレイアウトの設定からデータ解析まで行うことができます。

電気抵抗値のプロットデータから % Cytolysis に簡単にデータ変換できるだけでなく、xCELLigence RTCA システムでは指標（KT50 値）を用いて細胞傷害活性を評価していただけます。



◀ 動画でわかりやすくご理解いただけます

<https://www.agilent.com/en/video/software-pro-for-immunotherapy-applications>

## % Cytolysis と KT50 値の算出

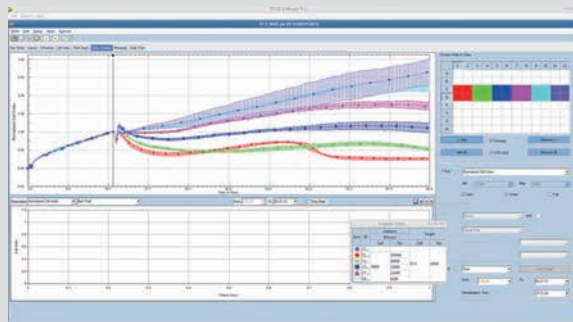
xCELLigence RTCA システムでは、一次データとして Cell Index（≒電気抵抗値）の時間変化データが得られます（増殖曲線に相当）。

RTCA IMT ソフトウェアを用いると、Cell Index カーブを、わずか数クリックのソフトウェア操作で、% Cytolysis カーブに自動変換できます。また、任意の時間における % Cytolysis の数値を棒グラフとして表示して実験群間で比較していただけます。

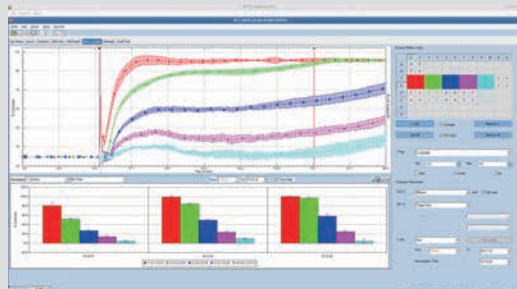
さらに、リアルタイム連続データの特徴を活かして、50% のターゲット細胞が傷害を受けるまでの時間（KT50）を算出することが可能です。開発中の細胞や抗体医薬品を「どれだけ速くがん細胞を殺すことができたか」という指標で評価しランキングしていただけます。KT50 だけでなく KT20 / KT40 / KT60 / KT80 も算出できます。

抗体製剤の実験において求められる EC50 の算出も可能です。

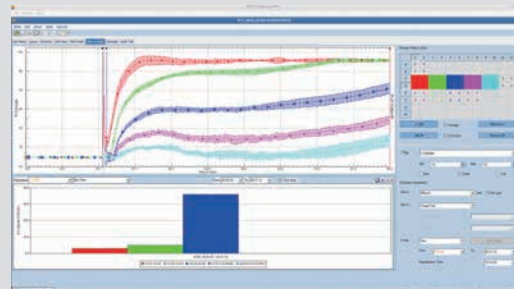
Cell Index カーブ



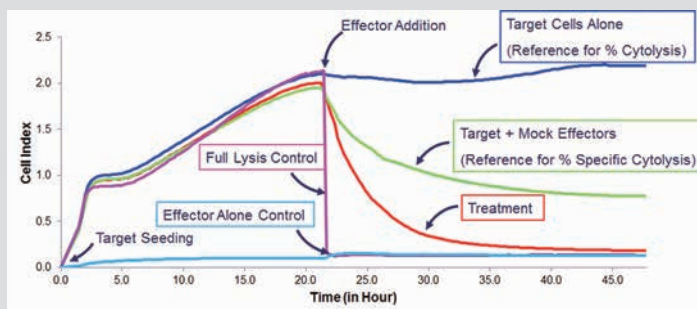
% Cytolysis



Time to kill 50% target cells (KT50)



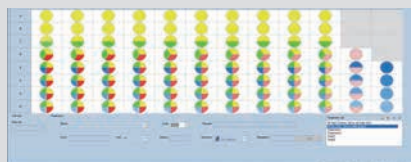
## % Cytolysis と KT50 値の算出



% Cytolysis の計算では、様々なコントロールウェルを用いて補正を行っていただけます。

- ターゲット細胞のみ (Target Cells Alone)
  - エフェクター細胞のみ (Effector Cells Alone)
  - ターゲット細胞 + Mock 細胞 (Target + Mock Effectors)
  - 100% キリングコントロール (Full Lysis Control)
- Mock コントロールを用いることで CAR-T / TCR-T 細胞実験における % Specific Cytolysis の算出が可能です。

## シンプルで簡単な実験設定



がん免疫キリングアッセイは、異なる ET 比での実験、異なる抗体濃度 (dose) での実験に加えて、ターゲット細胞コントロール、エフェクター細胞コントロールなどの各種コントロールウェルを設定するため、プレートのウェルレイアウトが複雑になりがちです。

RTCA IMT Software は標準付属のソフトウェアよりも、各ウェルの条件 (ターゲット細胞数・エフェクター細胞数・薬剤濃度・属性など) をシンプルな操作で設定していただけます。

また、カラーパイチャートを用いて、各ウェルの ET 比や薬剤濃度の設定に間違いがないかを視覚的に確認していただけます。

製品番号	品名	対応装置			適用
		DP	SP	MP	
310100270	RTCA IMT ソフトウェア シングルライセンス (DP 用)	○			1 ライセンス購入時
310100280	RTCA IMT ソフトウェア サイトライセンス (DP 用)	○			20 ライセンス同時購入時
310100290	RTCA IMT ソフトウェア シングルライセンス (SP 用)		○		1 ライセンス購入時
310100300	RTCA IMT ソフトウェア サイトライセンス (SP 用)		○		20 ライセンス同時購入時
310100230	RTCA IMT ソフトウェア シングルライセンス (MP 用)			○	1 ライセンス購入時
310100240	RTCA IMT ソフトウェア サイトライセンス (MP 用)			○	20 ライセンス同時購入時

# 浮遊細胞に対する免疫細胞キリングアッセイを行いたい！

## IMT アッセイキット (浮遊細胞用キリングアッセイキット)

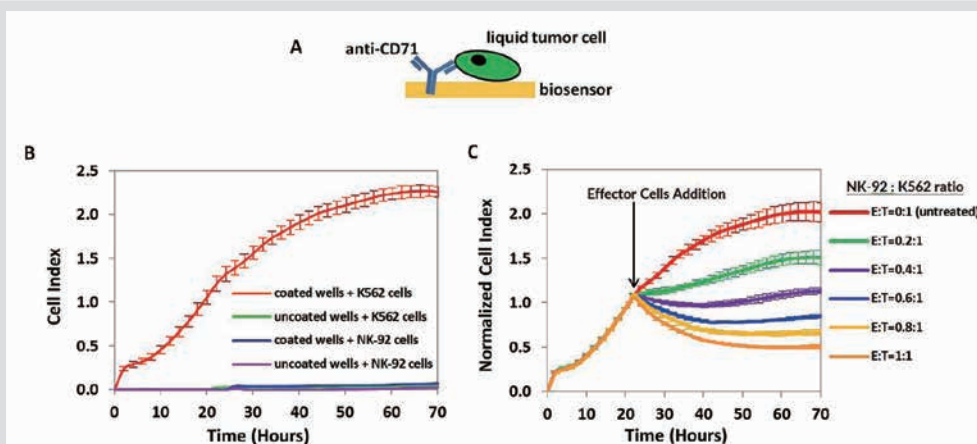


遺伝子改変 T 細胞療法 (CAR-T 療法 / TCR-T 療法) をはじめとする養子免疫療法は、現在までのところ、主に血液がんを対象に開発と実臨床応用が進められています。

IMT アッセイキットは、xCELLigence RTCA システムを用いて、浮遊細胞株に対する免疫治療細胞のキリング活性を測定するために開発されたキットです。

抗体を用いて浮遊系のターゲット細胞をウェル底面に捕捉する (Tethering) ことで、電気抵抗値によるキリングの評価を可能にします。

## 原理とデータ例



- A. IMT アッセイキットの原理を示す。バイオセンサープレート (E-Plate) にコートされた抗体 (上図の例では anti-CD71) により浮遊系のターゲット細胞をバイオセンサー表面に捕捉する。捕捉用抗体はウェル全面にコートされるためターゲット細胞が増殖しても捕捉され続ける。ターゲット細胞の増殖と細胞死をバイオセンサーを介して電気抵抗値としてモニタリングすることが可能になる。
- B. anti-CD71 抗体をコートした E-Plate とコートしていない E-Plate を用意し、それぞれに K562 細胞株 (15,000 cells /well) あるいは NK-92 細胞株 (15,000 cells/well) を播種して、電気抵抗値 (Cell Index) を 72 時間モニタリングした。ターゲット細胞である K562 細胞は、anti-CD71 抗体をコートしたウェルだけで電気抵抗値の上昇がみられた。エフェクター細胞である NK-92 細胞は非コートウェルだけでなく抗体コートしたウェルでも電気抵抗値がほとんど増加せず、anti-CD71 が NK-92 細胞を捕捉していないことがわかる。
- C. anti-CD71 抗体をコートした E-Plate に K562 細胞を播種し (15,000 cells/well)、24 時間後に様々な ET 比で NK-92 細胞を添加して電気抵抗値 (Cell Index) を 48 時間モニタリングした。NK-92 細胞 ET 比依存的なキリングが認められた。

## ラインナップ

IMT アッセイキットには、現在 5 種類の捕捉抗体がラインナップされています。それぞれ右表に示してあるターゲット細胞でワークすることをバリデーション済みです。エフェクター細胞としては、NK-92 細胞、CAR-T 細胞、CD-8+ T 細胞などをご使用いただけます。右表にないターゲット細胞については弊社までお問い合わせください。

キット (捕捉抗体)	バリデーション済みのターゲット細胞
anti-CD9	NALM6, RS4;11, RPMI 8226, MM1R
anti-CD19	Daudi, Raji, Ramos
anti-CD29	K562, HEL 92.1.7
anti-CD40	Daudi, Raji, Ramos, MEC2
Anti-CD71	K562, HEL 92.1.7

## ワークフロー

### 1日目

E-plate に希釈抗体溶液 (Tethering Reagent) を加えて、室温で 3 時間インキュベーション。  
E-Plate の各ウェルを捕捉抗体でコートする。

希釈抗体溶液を取り除き PBS で洗浄する。  
各ウェルに培地を加えて 37°C で 1 時間平衡化する。  
培地だけのバックグラウンド電気抵抗値を測定する (1 分)。

各ウェルにターゲット細胞を播種して室温で 30 分間放置し、抗体に細胞を捕捉させる (クリーンベンチ内)。

E-Plate をインキュベーター内の xCELLigence RTCA システムに装着し、ターゲット細胞の増殖をそのまま 24 時間モニタリングする。

### 2日目

各ウェルから培地を一部抜き取り、エフェクター細胞、抗体、IL-2 などを加える (クリーンベンチ内)。

E-Plate をインキュベーター内の装置に戻し、細胞傷害活性をリアルタイムモニタリング

## ご注文情報

製品番号	品名	梱包内容			対応枚数	
		Tethering Reagent	10x Tethering Buffer	Cytolysis Reagent	E-Plate 16	E-Plate 96
8100005	IMT アッセイ (抗-CD40) テザリングキット	250 $\mu$ L	10 mL	1.5 mL	36 枚分	6 枚分
8100008	IMT アッセイ (抗-CD29) テザリングキット	125 $\mu$ L	10 mL	1.5 mL	36 枚分	6 枚分
8100011	IMT アッセイ (抗-CD19) テザリングキット	250 $\mu$ L	10 mL	1.5 mL	36 枚分	6 枚分
8100014	IMT アッセイ (抗-CD9) テザリングキット	250 $\mu$ L	10 mL	1.5 mL	36 枚分	6 枚分
8100017	IMT アッセイ (抗-CD71) テザリングキット	250 $\mu$ L	10 mL	1.5 mL	36 枚分	6 枚分

## ● さらなる情報をお求めの方へ ●



### ハンドブック (Cancer Immunotherapy Handbook 英語)

免疫治療のモダリティごとにデータ例と論文例をご覧ください。  
下記で e-mail アドレスを入力していただくことでダウンロード可能です。

- ▶ <https://explore.agilent.com/CancerImmunotherapyHandbook>

### アプリケーションノート (英語)

xCELLigence シリーズのアプリケーションノートの中から、がん免疫キリングアッセイに関連するものをセレクトしました。



- ▶ [Ex Vivo Phenotyping and Potency Monitoring of CD19 CAR-T Cell Killing](#)
- ▶ [Real-Time Potency Assay for CAR-T Cell Killing](#)
- ▶ [Real Time Potency Assay for CAR-T Cell Killing of Adherent Cancer Cells](#)
- ▶ [Real-Time, Label-Free Measurement of Natural Killer Cell Activity and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity](#)
- ▶ [Label-Free Assay for NK-Cell Mediated Cytolysis](#)
- ▶ [Tumor Cell Killing by T Cells](#)
- ▶ [Real-Time Specificity and Potency Assessment of Human Papilloma Virus Specific Engineered T Cells](#)
- ▶ [Evaluating Functional Potency of Immunotherapies Targeting Tumors of B Cell Origin](#)

### プロトコル (英語)



- ▶ [A Human In Vitro T Cell Exhaustion Model for Assessing Immuno-Oncology Therapies](#)
- ▶ [In Vitro Functional Assay Using Real-Time Cell Analysis for Assessing Cancer Immunotherapeutic Agents;](#)
- ▶ [A Real-time Potency Assay for Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Solid and Hematological Cancer Cells.](#)

### ビデオ (英語)



- ▶ [xCELLigence Real-Time Cell Analysis \(RTCA\) instrument](#)  
(測定の原理がわかりやすく紹介されています)
- ▶ [Software Pro for Immunotherapy Applications \(がん免疫キリングソフトウェアの紹介\)](#)
- ▶ [Checkpoint Inhibitor Research Workflow Challenges](#)
- ▶ [Checkpoint Inhibitors for Cancer Treatment](#)
- ▶ [Maximize CAR-T Killing of Cancer Cells with the xCELLigence Real Time Cell Analysis \(RTCA\) eSight](#)



DE44839154

※本装置は試験研究用です。医療や診断目的にはご使用いただけません。  
※価格、外観、仕様などは、予告なしに変更することがあります。  
※それぞれの商標や登録商標、製品名は各社の所有する名称です。

代理店

国内販売元



本社 〒135-0014 東京都江東区石島 2-14  
Imas Riverside 4F  
Tel. (03)6458-6696 Fax. (03)-6458-6697  
西日本営業所 〒532-0003  
大阪市淀川区宮原5-1-3 NLC新大阪アースビル403  
Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851  
Web Site : [www.scrum-net.co.jp](http://www.scrum-net.co.jp) AG20220112C