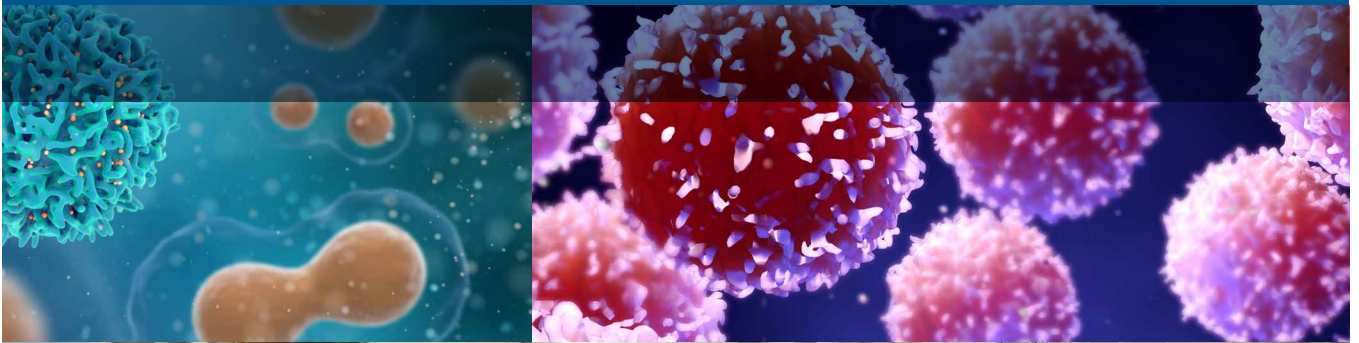


# 生細胞代謝解析による 免疫学研究

Agilent Seahorse XF テクノロジー



# 細胞の運命と機能を制御する代謝パスウェイの調節による免疫系の統制

免疫細胞は、環境からのさまざまな刺激やシグナルを感知し、それらのシグナルを統合して細胞内プロセスや機能を調整することにより、統一的な免疫反応を示すことができます。免疫細胞マーカー発現アッセイ、サイトカイン放出アッセイ、パスウェイプロファイリングなどの分析手法は、特に細胞が特定の系列や活性化状態に関与した後に、免疫細胞の従来の分類を提供します。一方、パスウェイに介入し、それを調節することによって免疫細胞の機能を操作するためには、免疫細胞プロセスの上流駆動因子について理解することを含め、免疫細胞の運命と機能をより包括的に把握する必要があります。このような重要決定因子として免疫細胞の作用を方向付けるのが、代謝プログラムです。

Agilent Seahorse XF 技術は、免疫細胞で起こっている細胞内プロセスをより直接的に示す速度論的、機能的な代謝測定データをリアルタイムに提供します。このような上流決定因子として免疫細胞の作用を方向付けるのが、代謝プログラムです。活性化、増殖、メモリの発達など、免疫細胞プロセスはすべて代謝の再プログラミングによって実行され、これを調整して免疫機能を向上させることができます。Seahorse XF の代謝解析では、リアルタイムの動態に加え、免疫細胞の生物学的機序を調節する豊富なパスウェイターゲットに関する情報を引き出すことができます。

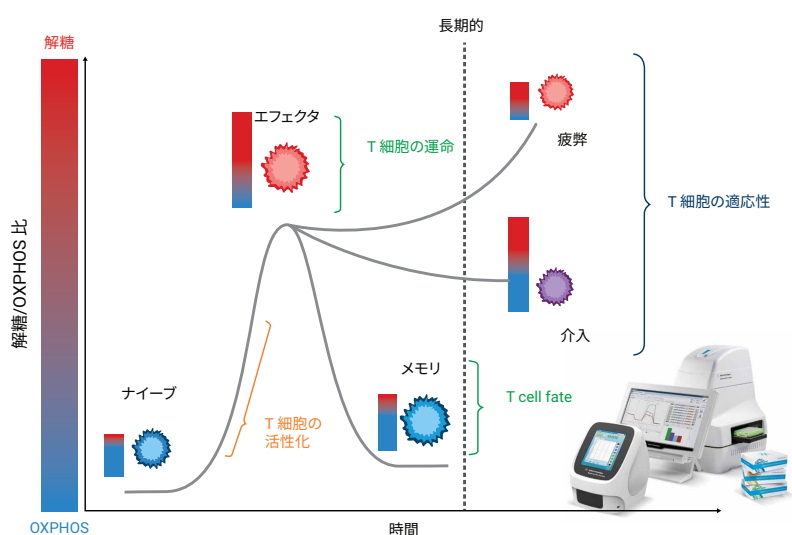


図 1. 免疫細胞代謝表現型の測定。解糖/OXPHOS 比と細胞の運命、適応性、機能の間の関係を示しています。

# 免疫学研究用 Agilent Seahorse XF 細胞解析ソリューション

## 生細胞からのリアルタイムでの機能データの生成

Agilent Seahorse XF テクノロジーは、細胞生体エネルギーをリアルタイムで測定します。ミトコンドリア活性、解糖、ATP 産生速度などの生体エネルギーパラメータから、免疫細胞の即時から初期の機能に関する情報が得られ、免疫細胞の機能をより完全に理解して調整することで、性能の向上や予測が可能になります。



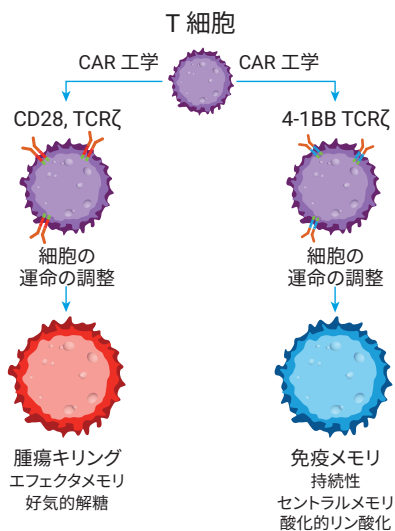
Agilent Seahorse XF の細胞解析技術は、以下の免疫学研究アプリケーションに活用されています。

- 免疫細胞のライフサイクル、活性化、および分化系列決定
- メモリ表現型、適応性、疲弊、機能持続能力
- 代謝燃料に関する要件
- 代謝シグナル伝達、パスウェイ、チェックポイント、阻害
- 感染症における宿主-病原体代謝

Agilent Seahorse XF Pro の詳細については、[こちらをクリック](#)

# 代謝解析による、がん免疫療法の新たな治療の機会を拡大する 多様なパスウェイターゲットの解明

## 細胞治療法の開発の前進に向けて、パスウェイを摂動し、免疫細胞の応答を制御するための戦略の発見



免疫細胞ベースの治療法の目標は、免疫細胞を増殖または改変して関連するシグナル伝達パスウェイを変化させ、細胞機能を変化させることにより、本来の免疫細胞の性能を向上させることです。XF 解析では、生細胞の重要な側面をリアルタイムに測定し、モジュレーション戦略の機能的な帰結を明らかにすることができます。また、シグナル伝達、チェックポイント阻害、またはパスウェイ摂動を介した免疫細胞応答のモジュレーションが、代謝プログラミングの変更を通してどのような「作用をもたらす」のかを突き止めることができます。

図 2. T 細胞工学と生体エネルギー学は、エフェクタまたはメモリ集団に有利な「T 細胞の運命」に影響を与えます。

## 代謝解析により、CAR-T 共受容体とエフェクタメモリ細胞応答を結ぶ重要な代謝リンクを解明することで、 養子免疫療法の開発を前進

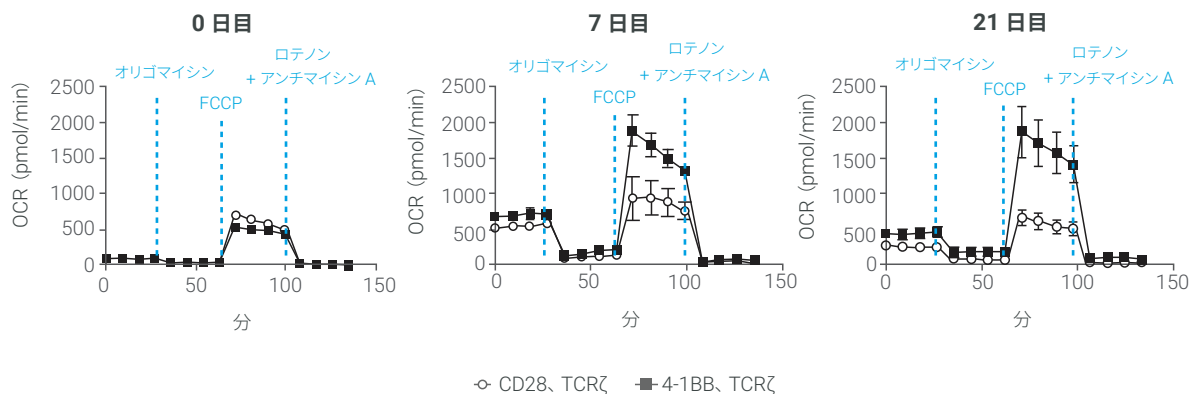


図 3. 出典：Kawalekar, O, et al. 『Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR-T Cells (共受容体の異なるシグナル伝達による特異的代謝パスウェイの制御と CAR-T 細胞のメモリの発達への影響)』 Immunity 2016, 44(2), 380-90.

予備呼吸能 (SRC) は、ミトコンドリア機能の信頼性の高い指標であり、必要に応じて、ミトコンドリアのエネルギー産生を増加させる細胞の能力を表しています。増殖 CAR-T 細胞では、SRC の増加は、T 細胞メモリ表現型または T 幹細胞メモリ表現型と強い相関関係があります。

Kawalekar らは、Seahorse XF アッセイを用いて、CAR シグナル伝達ドメインの選択が、抗原刺激後の CD8+ CAR-T 細胞の生体エネルギー表現型を決定することを示しました。21 日間にわたり、4-1BB シグナル伝達共刺激ドメインを含む CAR-T 細胞は、CD28 シグナル伝達共刺激ドメインを含む CAR-T 細胞と比較して、より大きな SRC を示すようになり、結果的に in vitroでの持続性が向上し、セントラルメモリの分化が増加しました。

## 腫瘍細胞の代謝変化のモニタリングによる、腫瘍の微小環境の特性解析の改善とチェックポイント治療法の活用

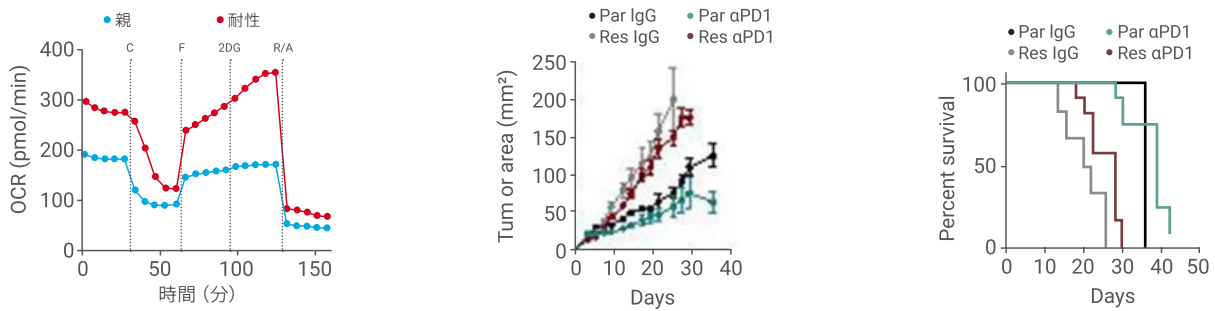
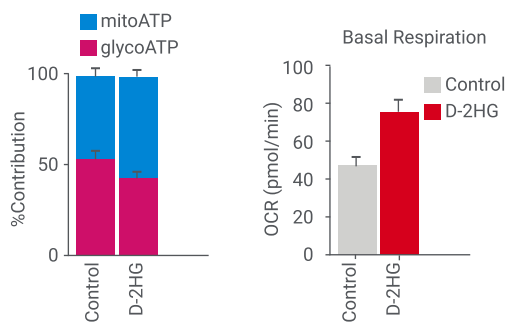


図 4. 出典：Zandberg, D. et al. 『Tumor hypoxia is associated with resistance to PD-1 blockade in squamous cell carcinoma of the head and neck (頭頸部の扁平上皮癌における、腫瘍低酸素の PD-1 阻害薬に対する耐性との関連)』 J ImmunoTher Cancer 2021, 9(5), e002088.

Zandberg, D. らによる研究では、Seahorse XF アッセイを用いて、腫瘍が抗 PD-1 阻害薬に耐性を示すようになると、酸化代謝がアップレギュレートされることを示しました。また、腫瘍の微小環境の代謝状態により、抗 PD-1 治療薬に対する腫瘍の反応を予測できることを実証しました。

## 細胞の表現型と機能に関する独自の知見を得るための T 細胞の生体エネルギー状態の評価



Notarangelo らは、Seahorse XF テクノロジーを用いて、腫瘍由来の d-2-ヒドロキシグルタル酸 (D-2HG) が CD8+ T 細胞の代謝状態を変化させ、ATP 生成のための酸化的リン酸化への依存が高まり、その結果、増殖、サイトカイン産生、細胞傷害性に障害を与えることを示しました。

図 5. 出典：Notarangelo, G. et al. 『Oncometabolite d-2HG alters T cell metabolism to impair CD8+ T cell function (オンコメタボライト d-2HG による T 細胞代謝の変化が CD8+ T 細胞機能に与える障害)』 Science 2022, 377(6614), 1519–1529.

## 代謝適応性が免疫細胞機能に与える影響の評価

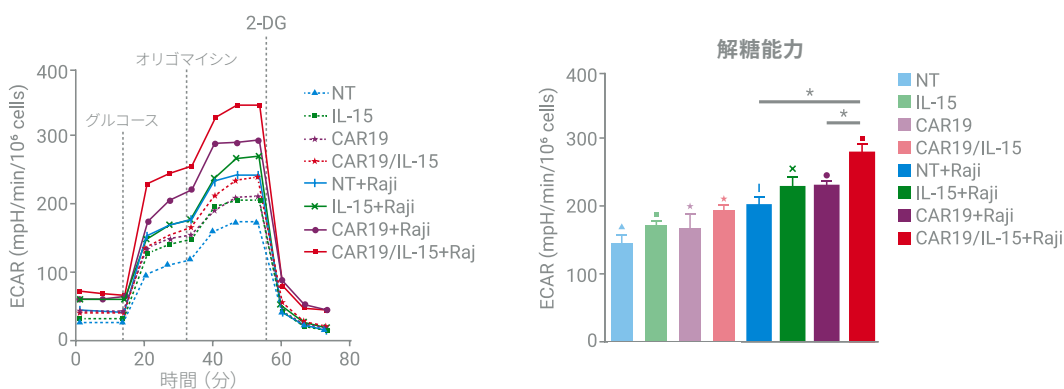


図 6. 出典：Li, L. et al. 『Loss of metabolic fitness drives tumor resistance after CAR-NK cell therapy and can be overcome by cytokine engineering (代謝適応性の喪失による CAR-NK 細胞療法後の腫瘍耐性の発生とサイトカイン工学による克服)』 Science Advances 2023, 9, eadd6997.

Li らは、Seahorse XF テクノロジーを用いて、インターロイキン 15 (IL-15) を発現するように CAR19 NK 細胞を操作すると、コントロールと比較して解糖活性が改善され、代謝適応性が向上することを示しました。この研究により、CAR NK 細胞の抗腫瘍効果は、代謝適応性を向上させることで改善できることが示されました。

# リアルタイムの定量測定により免疫細胞機能を包括的に把握

## Seahorse XF の機能測定により、免疫細胞の応答、運命、および機能に影響する重要な因子を究明

代謝測定では、免疫応答に関連する統合的・多面的な要求を満たすために、免疫細胞がさまざまな条件下でどのように応答するのかを敏感に示す指標が与えられます。Seahorse XF テクノロジーは、炎症、自己免疫、および免疫抑制に関する疑問や、基質依存性および腫瘍の微小環境の免疫抑制効果を調査するために活用されています。

## マクロファージにおける表現型と炎症機能の指標としての代謝

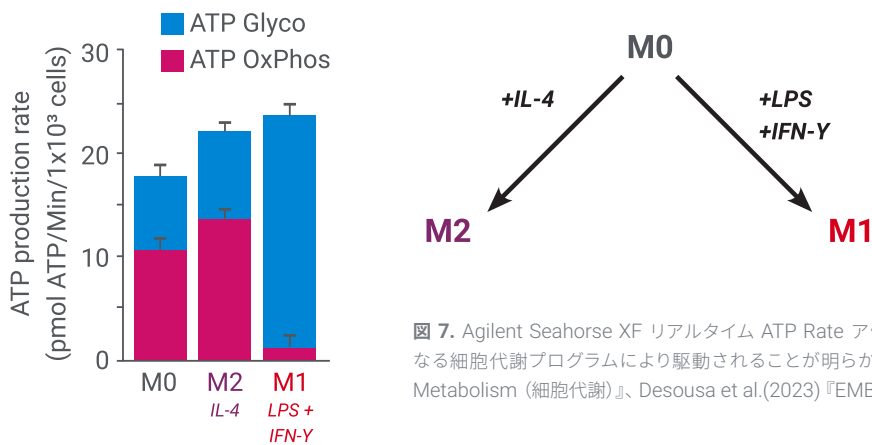


図 7. Agilent Seahorse XF リアルタイム ATP Rate アッセイにより、マクロファージの極性化が、2 つの異なる細胞代謝プログラムにより駆動されることが明らかになりました。出典：Divakaruni et al.(2018) 『Cell Metabolism (細胞代謝)』、Desousa et al.(2023) 『EMBO Reports (EMBO レポート)』。

マクロファージの炎症誘発性 (M1) および抗炎症性 (M2) の極性化はともに、ATP 産生速度を向上させますが、エネルギー代謝反応は大幅に異なります。抗炎症性 M2 表現型は、酸化的リン酸化によって強く特徴づけられていますが、炎症誘発性 M1 表現型のマクロファージは、解糖を増加させ、活性酸素種としてコハク酸やイタコン酸のような炎症誘発性代謝物の生成に対して、好氣的代謝を再指示します。

## Seahorse XF テクノロジーによる、腫瘍の微小環境に関連する抗腫瘍免疫応答の必須パスウェイ、シグナル伝達、および栄養素要求に関する知見の獲得

代謝測定では、免疫応答に関連する統合的・多面的な要求を満たすために、免疫細胞がさまざまな条件下でどのように応答するのかを敏感に示す指標が与えられます。Seahorse XF テクノロジーは、炎症、自己免疫、および免疫抑制に関する疑問や、基質依存性および腫瘍の微小環境の免疫抑制効果を調査するために活用されています。

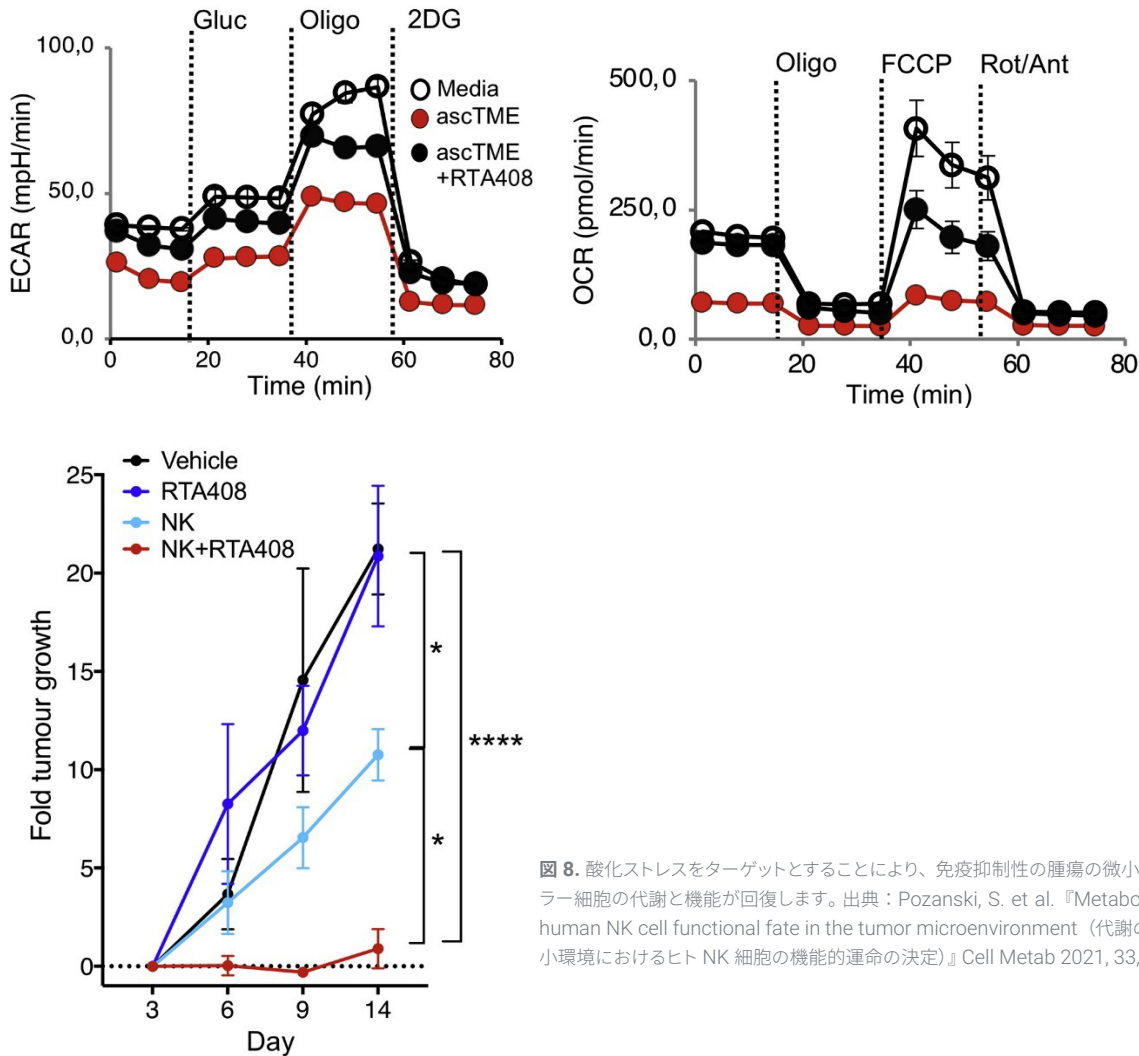


図 8. 酸化ストレスをターゲットとすることにより、免疫抑制性の腫瘍の微小環境におけるナチュラルキラー細胞の代謝と機能が回復します。出典：Pozanski, S. et al. 『Metabolic flexibility determines human NK cell functional fate in the tumor microenvironment (代謝の柔軟性による、腫瘍の微小環境におけるヒト NK 細胞の機能的運命の決定)』 Cell Metab 2021, 33, 1205-1220。

Pozanski らは、Seahorse XF アッセイを用いて、腫瘍の微小環境 (TME) における NK 細胞の機能不全のメカニズムに関する知見を獲得しました。この研究では、NK細胞を再プログラミングして代謝基質の柔軟性を高めることにより、敵対的な TME においても代謝適応性が持続し、抗腫瘍活性が高まることを示しました。

# 免疫細胞機能の変化に必要な生体エネルギーの変化

## 代謝表現型解析による免疫細胞機能の探究

エフェクタ機能の活性化、増殖、および関与や恒常性の維持はどれも、免疫細胞のライフサイクルのさわめて重要な側面です。これらの役割を果たす免疫細胞の能力は、免疫細胞の系統とアイデンティティによって決定付けられます。Seahorse XF テクノロジーでは、リアルタイムの機能測定を通して、免疫細胞機能を包括的に把握できる他、免疫細胞の応答を調節するパスウェイとターゲットに関する情報が得られます。

## 免疫細胞活性化のリアルタイム解析による、代謝要求、シグナル伝達、パスウェイ、およびチェックポイントの探究

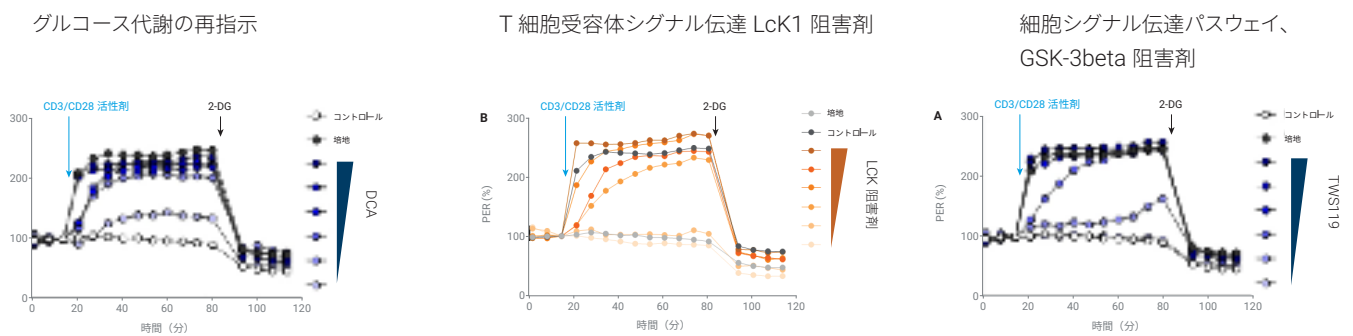


図 9. Agilent Seahorse XF Hu T 細胞活性化アッセイでは、T 細胞の活性化に不可欠な代謝およびシグナル伝達の要件が明らかになるため、T 細胞モジュレータの効果を調べることができます。出典：Kam et al. 『Determining the Metabolic Consequences of Pharmacological Modulation of T Cell Activation (T 細胞活性化の薬理的調節の代謝結果の決定)』 Agilent Technologies Poster, ASGCT, 2020.

## 免疫細胞型とその機能および分化系列決定の指標としての代謝の測定

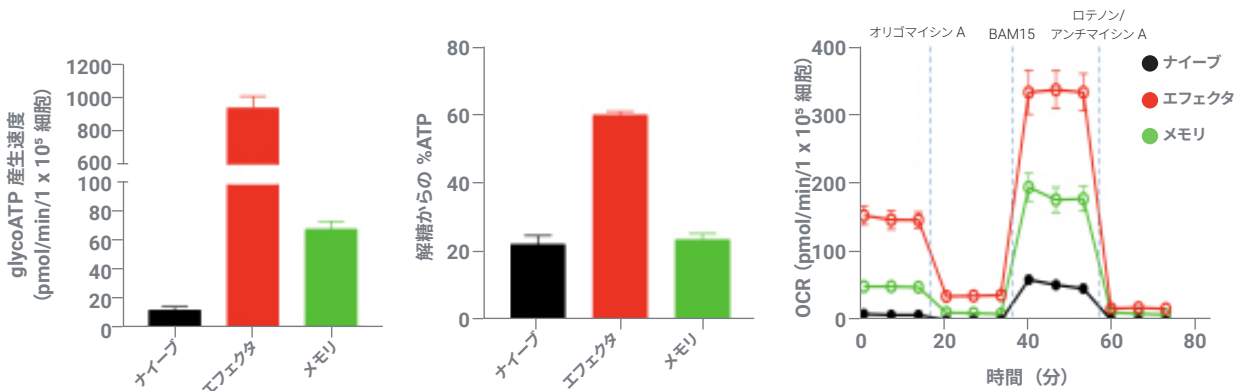


図 10. T 細胞は、活性化すると代謝が大きく変化して解糖に切り替わり、エフェクタ機能と急速な細胞増殖をサポートします。ヒト panT 細胞を抗 CD3/CD28 で 3 日間活性化して、細胞培地中で増殖させました。ナイーブ T 細胞（活性化前）と、活性化されて 6 日間（エフェクタ）および 15 日間（メモリ）増殖させた T 細胞の XF T 細胞代謝適応性アッセイを、Agilent Seahorse XF Pro アナライザを用いて実施しました。アジレント・テクノロジーの未発表データ

XF T 細胞代謝プロファイリングキットは、解糖およびミトコンドリア生体エネルギー活性、代謝状態、ミトコンドリア生体エネルギー能力を含む、完全な生体エネルギープロファイルを明らかにします。これにより、異なる細胞分化状態での細胞の表現型と機能に関する独自の知見が得られます。ナイーブ T 細胞には、解糖への依存が低い静止状態の表現型があり、抗原に遭遇して活性化されると、解糖活性が向上します。感染が終息すると、これらの細胞の少数がメモリ集団を生成して、解糖活性は再度低下します。

## 宿主-病原体の代謝反応に関する有用な知見の獲得

一般的に、病原体は感染に最適な条件を確立するために、宿主の細胞代謝パスウェイをターゲットとします。宿主の反応には、中心炭素代謝パスウェイの乗っ取りやミトコンドリア機能の変化など、細胞代謝における大規模な変化が含まれている場合があります。また、シグナル伝達のネットワークとチェックポイントのカスケードも、感染に対抗するための本来の免疫応答を引き起こします。Seahorse XF テクノロジーでは、宿主の反応をシステムレベルで包括的に観察するための重要な機能的測定が可能であり、これにより潜在的な治療ターゲットに関する知見が得られます。

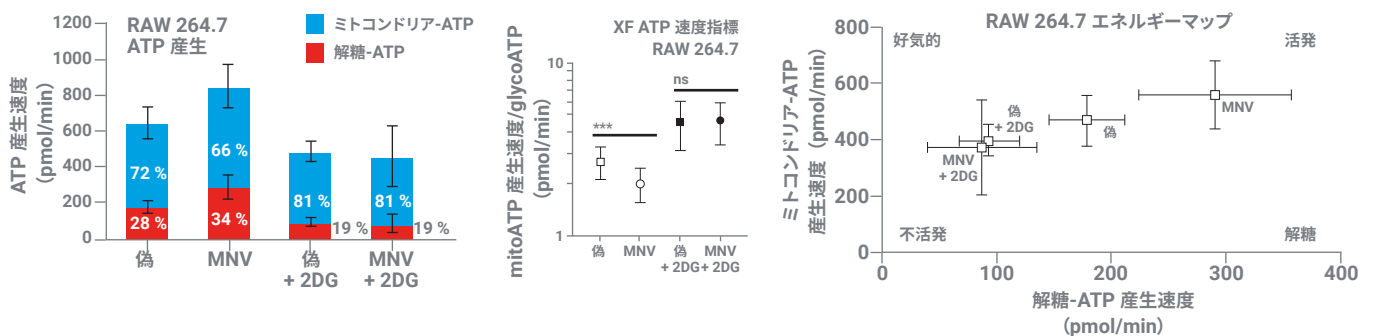


図 11. ノロウイルスに感染したマウスマクロファージでは、ATP 産生における解糖への依存が高まります。クリエイティブ・コモンズ・ライセンス 4.0 により転載しました。出典：Passalacqua, K. et al. 『Glycolysis Is an Intrinsic Factor for Optimal Replication of a Norovirus (ノロウイルスの最適な複製のための内性因子である解糖)』 mBio 2019, 10(2), 02175-18。 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

SeahorseXF リアルタイム ATP Rate アッセイにより、マウスマクロファージ細胞のノロウイルス感染では、解糖と OXPHOS の両方が増加するが、より解糖を引き起こす表現型への全体的な再プログラミングにより、全体的な ATP 産生速度が向上することが明らかになりました。これは、初期のウイルス感染を持続させるための宿主-解糖活性が重要な役割を果たしていることを示唆しています。

免疫代謝の調査における Agilent Seahorse XF の利点の詳細については、[こちら](#)の専用ウェブページをご覧ください。

# 免疫代謝測定向けに最適化されたアッセイ

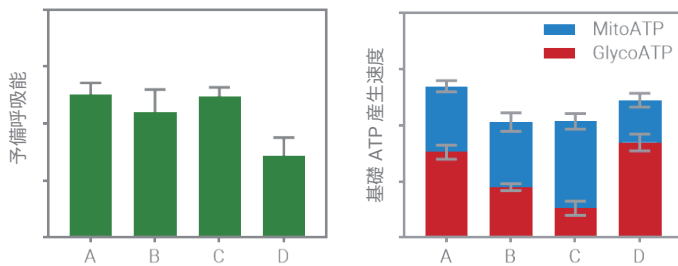
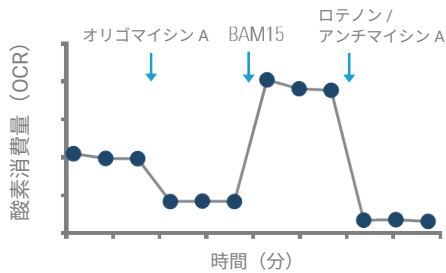
## XFT 細胞代謝プロファイリングアッセイ：細胞治療薬開発向けにカスタマイズされたアッセイ

これらのアッセイは、さまざまな T 細胞および NK 細胞集団向けに最適化された試薬を用いることで、細胞持続性や代謝適応性といった、抗腫瘍特性において重要な属性に関連する 堅牢な生体エネルギーパラメータを提供します。

- 構成物の設計、工学的戦略、原材料の選択、または in vitro の細胞増殖中の代謝コンディショニングの評価に最適
- 腫瘍の微小環境における T 細胞および NK 細胞の代謝適応性の維持能力の評価に使用可能
- T 細胞および NK 細胞のミトコンドリア機能をより一貫して正確に測定するために改良された脱共役剤 BAM15 を含有
- 解糖およびミトコンドリア効果活性と生体エネルギー能力の同時定量を含む、T 細胞および NK 細胞代謝の包括的な見解を提供
- T 細胞および NK 細胞の代謝プロファイリング試験済み



### 細胞生体エネルギー学を包括的に把握



部品番号 103772-100 (XF Pro/XFe96) および 103771-100 (XF HS Mini と XFp)

## Agilent Seahorse XF リアルタイム免疫細胞活性化アッセイ：活性化を示す迅速かつ堅牢な指標を提供

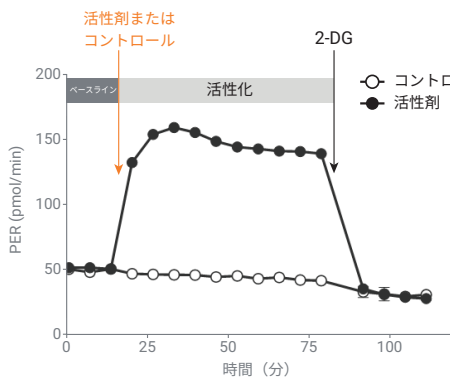
免疫細胞活性化は、細胞増殖に必要な成長促進パスウェイへの迅速な切り替えによって駆動されます。Agilent Seahorse XF リアルタイム免疫細胞活性化アッセイでは、刺激後数分で活性化反応を検出できるため、免疫細胞の活性化、モジュレーション、関連する代謝再プログラミングに関する知見が得られます。

免疫細胞専用のアッセイ:

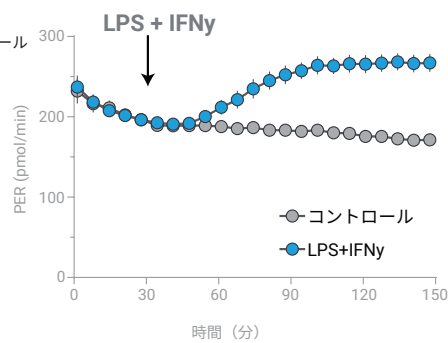
- Agilent Seahorse XF Hu T 細胞活性化アッセイ
- Agilent Seahorse XF リアルタイムマクロファージ活性化アッセイ
- Agilent Seahorse XF リアルタイム好中球活性化アッセイ

### T 細胞活性化アッセイ

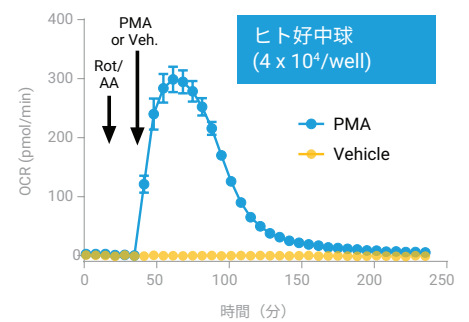
(キット部品番号 103759-100)



### マクロファージ活性化アッセイ



### 好中球活性化アッセイ



Agilent Seahorse XF アッセイキットの詳細については[こちら](#)

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

RA45427.4037615741

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Printed in Japan, October 2, 2024  
5994-7553JAJP

