

ヒト末梢全血中の 細胞傷害性免疫細胞の特性評価

16色パネルと

BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーターを使用した
表現型マーカーおよび機能的マーカーの評価

特徴

- BD FACSymphony™ テクノロジーを搭載したコンパクトサイズの BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーターで、優れたフローサイトメトリー性能を実現
- 4波長の高出力レーザーを使用した最大 19 パラメーター (16 種類の蛍光および 3 種類の散乱光) による解析で、血中の細胞傷害性細胞のさまざまな細胞サブセットを検出
- 最適なパネル設計と高い検出感度を組み合わせることで、微弱なシグナルを明瞭に識別

細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) とナチュラルキラー (NK) 細胞は、がん細胞を死滅させる効率的なメカニズムを備えており、がん免疫療法で注目される治療ターゲットとなっています。エフェクター CTL と成熟 NK 細胞は共に、標的細胞への細胞傷害活性を持つ細胞溶解性タンパク質の複雑な発現パターンを示します。溶血と細胞の固定を同時に行えるように最適化したバッファーを使用することで、末梢血球中に存在する細胞溶解性タンパク質の細胞内レベルを直接的に測定できます。これらの細胞を BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーターで解析しました。BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーターでは、細胞傷害性細胞中において低発現の細胞溶解性タンパク質や他のマーカーを最適に分離可能な高輝度の蛍光標識抗体を使用できます。

計 16 種類の細胞内または細胞表面マーカーをまとめて解析することで、血中に存在する細胞傷害性細胞のさまざまな細胞サブセットの検出に役立ちます。



プロトコール

ヒト末梢血を、ヘパリンナトリウムを含む滅菌済み真空採血管に採取しました。細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体を事前に設定した最適濃度で（表 1）、BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer Plus に添加して混合し、5 mL の Corning™ ポリスチレン製丸底試験管に分注しました。次に、ヘパリン添加血 200 μ L と BD Horizon™ Fixable Viability Stain 575V (0.6 μ g/ μ L) 2 μ L を続けて試験管に加え、ボルテックスミキサーで短時間攪拌しました。室温遮光下で 20 分間インキュベーションした後、BD Phosflow™ Lyse/Fix Buffer (1X) 4 mL を試験管に加えて赤血球を溶解し、白血球を固定しました。15 分間インキュベーションした後、細胞を遠沈し、BD Pharmingen™ Stain Buffer (FBS) で 2 回洗浄しました。次に、固定した細胞を BD Phosflow™ Perm/Wash I Buffer 100 μ L に入れて 4°C で 20 分間透過処理し、細胞内マーカーの抗体を加えて、遮光下でさらに 60 分間インキュベーションしました。2 回洗浄した後、細胞を BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーターで測定しました。

Table 1. 測定機の構成と細胞傷害性免疫細胞パネルの試薬

Laser	Filter	Fluorochrome	Specificity	Clone	Catalog Number	Purpose	[§] Antibody Volume (mL) / 100 mL Blood or Perm Buffer
Violet 405 nm	450/50	BV421	Perforin	dG9	563393	Cytolytic abilities	5
	525/50	BV480	CD159a (NKG2A)	131411	747923	Inhibitory receptor	5
	610/20	BV605	CD19	H1B19	740394	Exclusion/B cells	1.25
			CD14	M5E2	564054	Exclusion/monocytes	5
			CD123	7G3	564197	Exclusion/plasmacytoid dendritic cells and eosinophils	5
			CD141	1A4	740421	Exclusion/myeloid cells and platelets	5
			FVS575V	-	-	565694	Viability
	670/30	BV650	CD3	UCHT-1	563851	T cells	5
	710/50	BV711	CD314 (NKG2D)	1D11	563688	Activating receptor	5
780/60	BV786	HLA-DR	G46-6	564041	Activation marker	2.5	
Blue 488 nm	530/30	FITC	CD57	NK-1	555619	Maturation and differentiation marker	10
	710/50	PerCP-Cy5.5	CD8	RPA-T8	560662	Cytotoxic T cells	5
Yellow-Green 561 nm	586/15	PE	CD158 (KIRs)	HP-MA4	567158	Maturation and differentiation marker	5
	610/20	PE-CF594	CD56	R19-760	564963	NK cells/activation marker	5
	670/30	PE-Cy5	CD95 (Fas)	DX2	559773	Differentiation marker	20
	710/50	PE-Cy5.5	CD127 (IL7R- α)	eBioRDR5	35-1278-42 [#]	Differentiation marker/innate lymphoid cells	1.25
	780/60	PE-Cy7	CD38	HIT2	560677	Differentiation marker	2.5
Red 637 nm	670/30	AF647	Granzyme K	G3H69	566655	Cytolytic abilities	5
	710/50	R718	Granzyme B	GB-11	566964	Cytolytic abilities	1.25
	780/60	APC-H7	CD16 (Fc γ RIII)	3G8	560195	NK cells/cytolytic abilities	5

BV : BD Horizon Brilliant Violet™、FVS : BD Horizon™ Fixable Viability Stain、AF : Alexa Fluor™、#Thermo Fisher Scientific、

§ 抗体濃度の分析証明書を参照、Perm : 透過処理。

細胞解析の結果

BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーターには 4 本のレーザー (Violet、Blue、Yellow-Green および Red) が搭載されているため、13 種類の高輝度の蛍光標識抗体で染色した細胞を検出できます。高感度の装置と高輝度の蛍光色素を組み合わせることで、細胞傷害性細胞集団中では発現レベルに幅があったり、低レベルの発現を示す CD3、CD56、Perforin、CD314 (NKG2D)、CD159 (NKG2A) などのマーカーを高効率で分離できました (Figure 1 および 2)。

FlowJo™ v10.7.2 ソフトウェアを用いた細胞解析では、記録した 150,000 個以上のリンパ球の中からダブルレット、死細胞、解析対象外の細胞集団を取り除くことで、稀な細胞集団を検出しました。合計 8 名の健康ドナーの事前評価を実施し、解析対象とした 5 種類の主要な細胞サブセットを高頻度で発現するドナー 1 名の末梢血に由来する結果をパネルシートに示しました。5 種類の細胞サブセットは、CD56^{bright}CD3⁻ サイトカイン産生 NK 細胞 (ピンク)、CD56^{dim}CD3⁻ 細胞傷害性 NK 細胞 (青)、CD56^{dim}CD3⁺ を含む NKT 細胞 (茶)、CD56^{dim}CD3^{bright} を含む $\gamma\delta$ T 細胞 (緑)、および通常の CD8 細胞傷害性 T 細胞 (紫) です (Figure 1)。

Figure 1. 健康者末梢血中の細胞傷害性免疫細胞集団の明瞭な分離

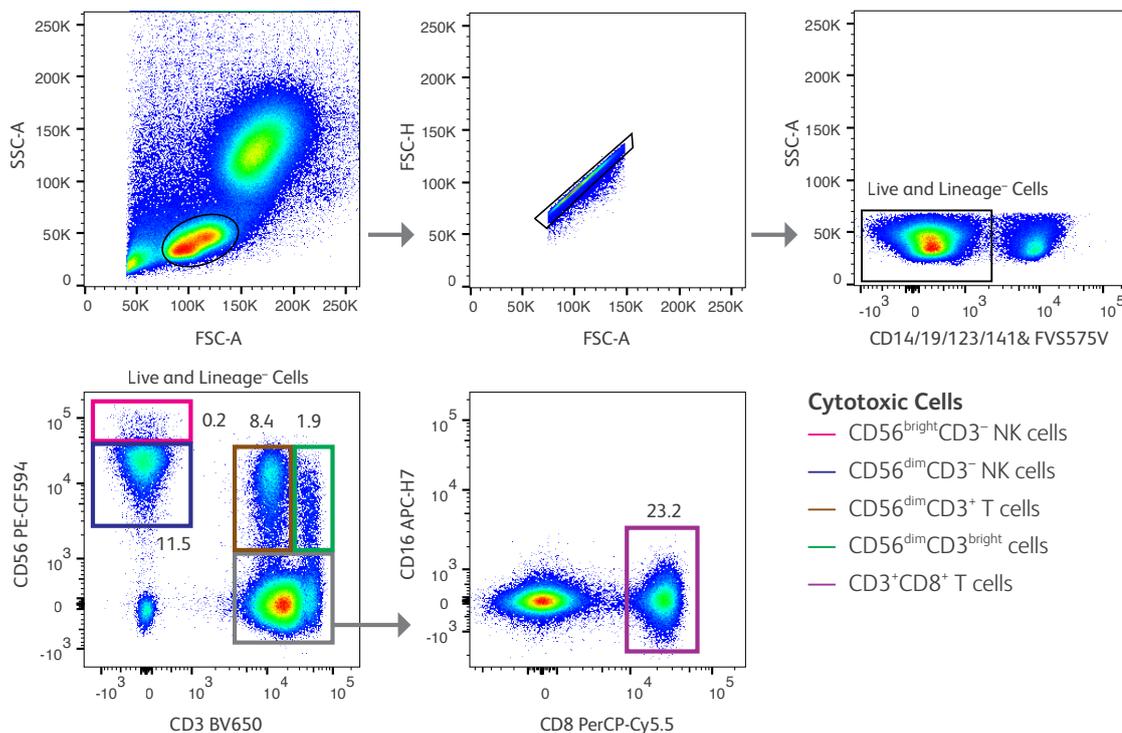


Figure 1. 健康者末梢血中の細胞傷害性免疫細胞集団の明瞭な分離

前方散乱および側方散乱による細胞特性に基づくリンパ球を中心とした最初のゲーティングで、細胞片および大多数の単球 / 顆粒球を除外しました。次のゲーティングでダブルレット細胞を除去しました。その後、FV5575V 標識した死細胞と解析対象外の細胞リネージ (CD19⁺/CD14⁺/CD123⁺/CD141⁺) も除去して T 細胞と NK 細胞を含むようにサンプルを濃縮しました。分化マーカー陰性の生細胞内で CD56 と CD3 を解析したところ、さまざまな細胞集団が見出されました。それらを、サイトカイン産生 NK 細胞 (ピンク)、細胞傷害性 NK 細胞 (青)、NKT 細胞を含む CD56⁺ T 細胞 (茶)、 $\gamma\delta$ T 細胞を含む CD56⁺ T 細胞 (緑)、および細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞 (紫) に色分けして示します。

NK 細胞と細胞傷害性 T 細胞サブセットは、脱顆粒より感染細胞または変異細胞を死滅させる共通のメカニズムを利用します。細胞溶解性顆粒の主成分は、Perforin と数種類のセリンエステラーゼ (Granzyme) です。ここで、Granzyme K (GrzmK)、Granzyme B (GrzmB) と一連の分化マーカーの細胞内レベルを同時に評価して、これらの細胞の機能状態を包括的に解析しました (Figure 2 および 3)。

Figure 2A. Cytolytic proteins

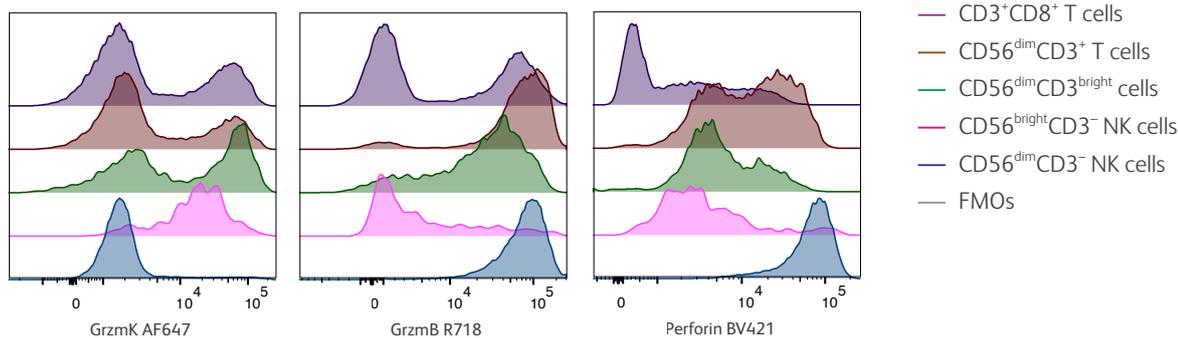


Figure 2B. Cell differentiation markers

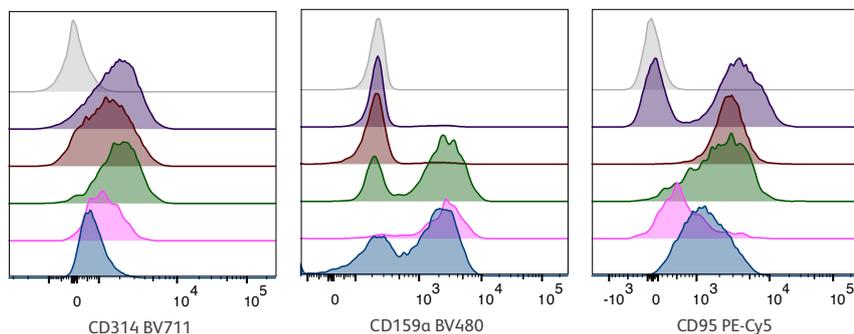


Figure 2. 末梢血中の細胞傷害性細胞の比較解析

色分けした各ヒストグラムは、Figure 1 に示したようにゲーティングした細胞集団を示します。A. 主要な Granzyme (GrzmK および GrzmB) と Perforin の発現を示します。B. 2 種類の主要な活性化受容体 (CD314、NKG2D) と抑制性受容体 (CD159a、NKG2A)、および細胞死受容体 CD95 (Fas) の発現を示します。FMO (Fluorescence Minus One) のヒストグラムを、分化マーカー陰性の全生細胞でゲーティングした後に作成しました。

Figure 3A.

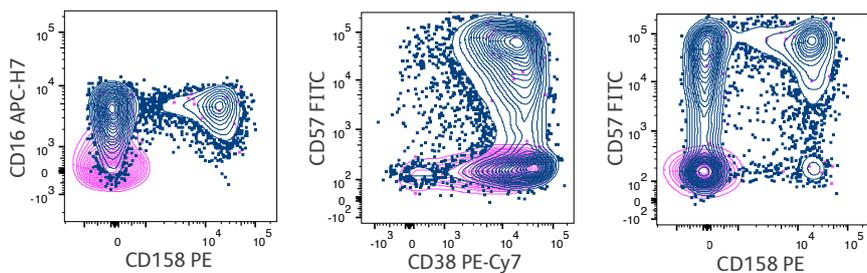


Figure 3B. CD56^{dim}CD3⁺ T cells

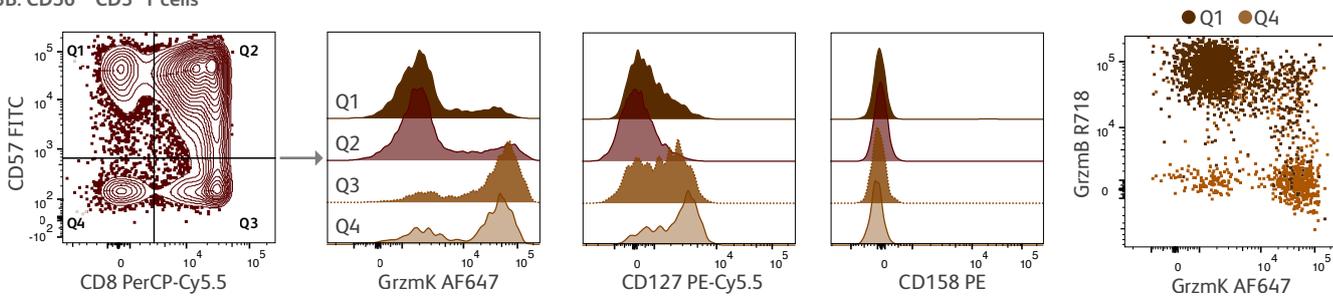


Figure 3C. CD56^{dim}CD3^{bright} T cells

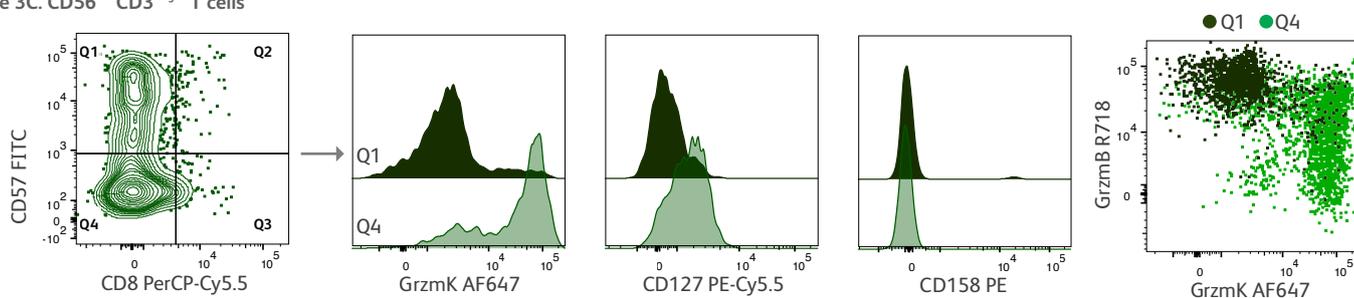


Figure 3D. CD3⁺CD8⁺ T cells

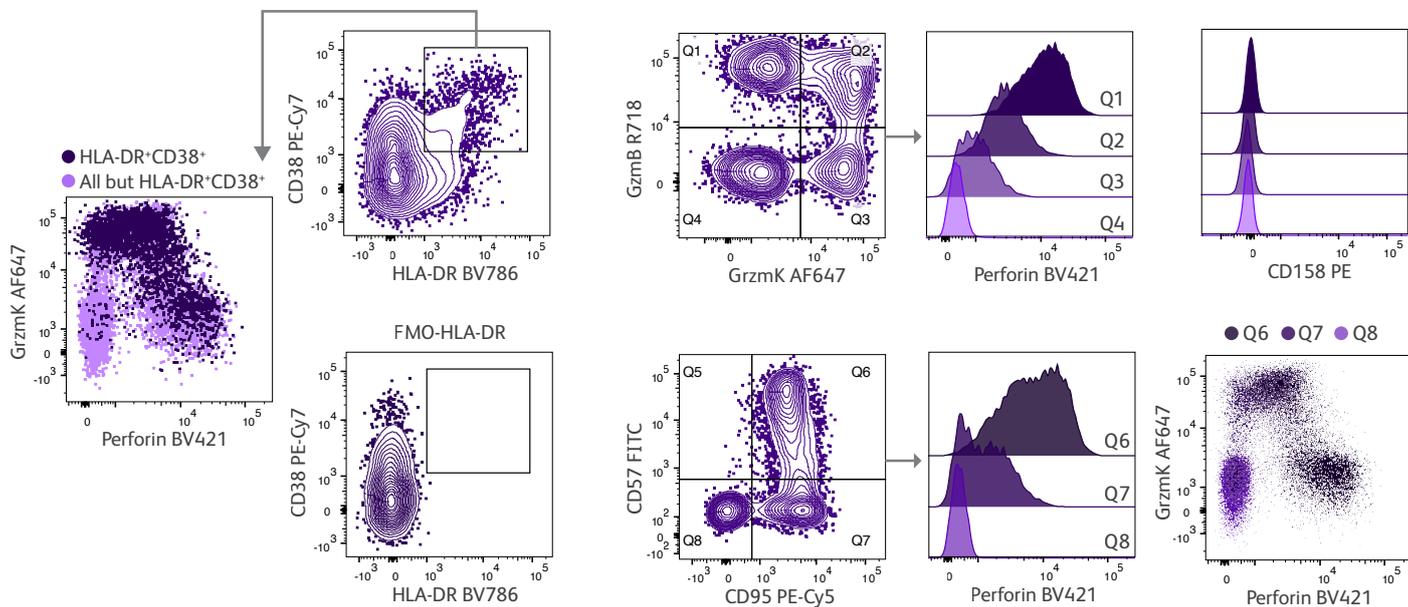


Figure 3. 16色パネルを使用した末梢血中の細胞傷害性細胞のフェノタイプング

プロット図は、細胞溶解性タンパク質とさまざまな細胞分化マーカーの組み合わせでの解析例を示します。Figure 1 でゲーティングした細胞集団の詳細な特性評価が可能です。A. NK 細胞サブセットのオーバーレイ。B. GrzmB または GrzmK を発現する細胞サブセットをハイライトした CD56^{dim}CD3⁺ T 細胞サブセットの解析。C. CD56^{dim}CD3^{bright} T 細胞サブセットの解析においても、さまざまなサブセットに GrzmB および GrzmK の発現が示されています。D. CD38 および HLA-DR の発現を基にした活性化 CD8 T 細胞の識別。HLA-DR FMO 染色はゲーティングの境界を判定し、二重陽性細胞を適切に検出するために有用です。プロット図は、GrzmB と GrzmK の発現、または CD95 と CD57 の発現の比較に基づくさまざまな CD8 T 細胞サブセットも示します。

結論

今回のパネルは、エフェクター細胞の溶解性タンパク質の発現に基づいて、末梢血中の多種多様な細胞傷害性細胞を比較する解析手法について説明しました。他の分化マーカーと同様にこれらのタンパク質も、さまざまな細胞集団にわたり低レベルから高レベルに及ぶ幅広い発現を示しました。そのため、末梢血中の細胞傷害性細胞集団を詳細に評価する目的で発現レベルが極めて低いタンパク質についても調べるには、高性能な試薬と機器を組み合わせる使用することが非常に重要です。

BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター

製品の特長：

- BD FACSymphony™ テクノロジーを搭載し、高感度で低ノイズの測定を実現
- 高出力 100mW レーザーを 4 本搭載し、最大 **19** パラメーターの測定に対応
- 微粒子検出機能を搭載し、エクソソームや細胞外小胞などの微粒子解析に対応
- **BD FACSDiva™** ソフトウェア搭載
- 省スペース設置可能なコンパクトサイズ



BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター

BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター希望小売価格

カタログ番号	製品名	希望小売価格
4 レーザータイプ		
664892	BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター 4 レーザー 14 カラータイプ (488nm/637nm/405nm/561nm)	¥25,000,000
664893	BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター 4 レーザー 16 カラータイプ (488nm/637nm/405nm/561nm)	¥26,000,000
664894	BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター 4 レーザー 14 カラータイプ (488nm/637nm/405nm/561nm) SPD 付き	¥28,000,000
664895	BD FACSymphony™ A1 フローサイトメーター 4 レーザー 16 カラータイプ (488nm/637nm/405nm/561nm) SPD 付き	¥29,000,000

* BD® Small Particle Detector オプション (SPD) は、細胞外小胞やエクソソームなどの微粒子測定用のオプションです。

* カタログ番号 664892 および 664893 は、近日発売予定の BD® Small Particle Detector オプション (SPD) で追加アップグレードを行うことができます。

* 14 カラータイプから 16 カラータイプへのアップグレード製品はございません。

〈オプション〉

カタログ番号	製品名	希望小売価格
658946	ハイスループットサンプラーオプション (HTS)	¥ 6,500,000
649908	BD FACFlow™ Supply System オプション	¥ 1,000,000
近日発売予定	BD® Small Particle Detector オプション (SPD) *	価格未定

* 製品名は発売時に変更される場合があります。

* 情報として該当製品に统一的に設定している当社の希望小売価格です。

* 販売代理店からの販売価格はそれぞれの代理店様が自主的に決定されております。

* お見積りは販売代理店へお問い合わせ下さい。

* 上記価格は、本書発行日時点での価格となります。

* 上記価格には、消費税は含まれておりません。

クラス 1 レーザー製品。
研究用です。治療・診断には利用できません。

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

本社: 〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ
カスタマーサービス ☎ 0120-8555-90 FAX: 024-593-3281
(ご注文・納期・資料請求)

bd.com/jp/

機器・試薬の使用方法および学術に関するサポート

☎ 0120-4890-77 E-Mail: tech.cell@bd.com

機器のトラブルに関するサポート

☎ 0120-7099-12

