フローサイトメトリーによる簡単な17マーカー、18カラーのヒト血液フェノタイピング

James McCracken, Ph.D., Jonel Lawson
Beckman Coulter Life Sciences

はじめに

フローサイトメトリーの能力は、レーザーやより多くの検出器、より優れたシグナル処理が追加されるなど、進化をつづけており、ハイパラメータ アプリケーションは、特別な研究だけのものから一般的なものへと変わりつつあります。ただし、高品質のデータを得るために、パネルを構成する抗体と蛍光色素の組み合わせを何度も繰り返し、信頼性の高い結果を得るために徹底的なテストが必要となることから、こうしたハイパラメータ アプリケーションを確立するプロセスは、ユーザーにとって決して簡単なことではありません。しかし、フローサイトメトリーのシグナル検出の革新によって、パネルデザインとデータ生成のプロセスは容易になりました。

目的

- DURAClone をバックボーンとして用いたハイパラメータパネルを作成する方法を学ぶ
- ゲーティングの信頼性を高めるために Fluorescence Minus One (FMO) コントロールをどこで適用するかを学ぶ

シグナル検出に Avalanche Photodiode detectors (APD) を用いたことで、CytoFLEXはパネルデザインを容易にする2つの重要な利点を備えています。まず、APDはPhotomultiplier tubes (PMT) に比べて、より広いスペクトル範囲にわたってより高い感度を示します。次に、この高い光感度によって測定誤差が小さくなり、その結果、漏れ込みが最小限に抑えられます[1]。ハイパラメータ実験では、spillover spreading (漏れ込みの補正によるネガティブピークの広がり) を最小限に抑えることで、暗い集団と陰性の集団をより確実に識別できるため、暗いマーカーに対するチャンネル選択はそれほど重要ではなくなります。さらには、DURACloneなどのドライ抗体試薬パネルを使用することによっても、デザインを容易にすることができます。DURAClone IMパネルを「バックボーン」として用いることで、多くのパラメータを事前に最適化し安定した状態に保ったまま、追加の染色を随時行うことが可能です。

CytoFLEXとDURACloneの革新的テクノロジーを組み合わせることにより、ハイパラメータ実験系を作成する際のデザインやセットアップに要する労力を減らすことができます。このノートでは、CytoFLEX LXとDURAClone IM T Cell Subsetパネルを用いて、簡単にパネルをデザインし、信頼性の高いデータを作成する方法を示します。また、CytoFLEX LXには多数の検出チャンネルがあるため、ひとつのDURAClone IMバックボーンを複数の実験デザインやニーズに合わせて変更することで、実験中に生じた新たな疑問に素早く答えることができます。ここでは、これらの技術を用いて18カラーパネルを迅速にデザインし、テストを行う方法を説明します。

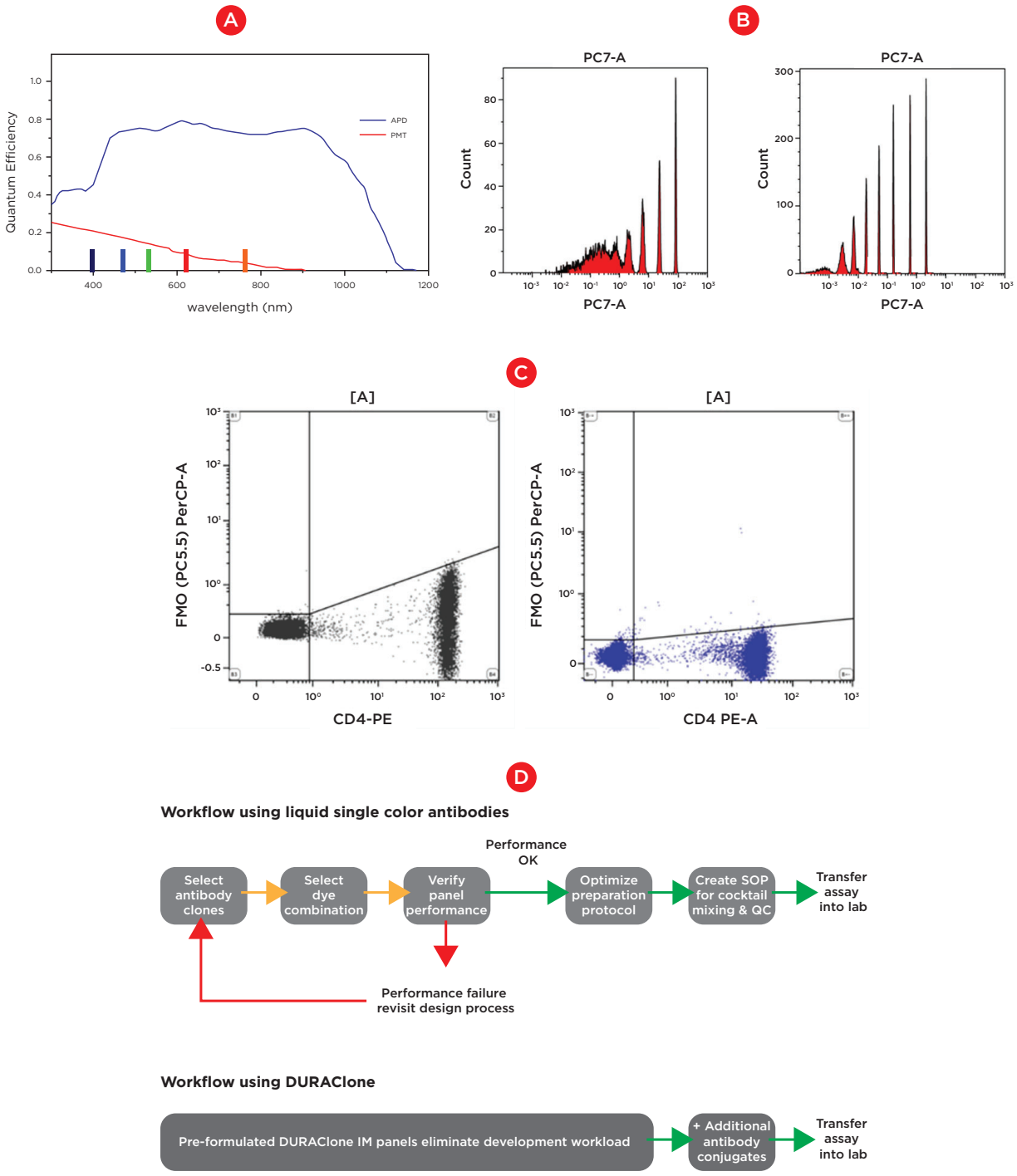

図1. PMTベースのシステムとAPDベースのシステムの比較

パネル A: スペクトル範囲におけるAPDとPMTの量子効率（Quantum Efficiency：QE）、すなわち光子から電子への変換効率を示したグラフ。このように光子から電子への変換効率が高くなることで、測定誤差が小さくなり、感度と分解能が向上します。「A Comparison of Avalanche Photodiode and Photomultiplier Tube Detectors for Flow Cytometry」Paul Wallace *et al.*, 2008, Proceedings of SPI, Vol 6859[2]

パネル B: PMT（左図）とAPD（右図）のSpherotech 8ピークビーズの比較から、特に650 nmを超える蛍光波長でQEが高くなるため、非常に暗いビーズでも分解能が高いことを示しています。

パネル C: APDベースのシステム（右図）では、PMTベースのシステム（左図）に比べてQEが高いために、隣接する検出器へのデータの広がりも小さくなります。

パネル D: DURACloneを使用した場合と使用しない場合の抗体パネルデザインワークフローの比較。DURACloneパネルは、事前に最適化され安定した試薬のため、より少ない労力で大きなパネルを構築することができます。DURACloneはそれだけ使用するか、テストしてより多くの色を追加して使用することができます。

材料および方法

製品	製造業者	製品番号
CytoFLEX Daily QC Fluorospheres	Beckman Coulter Life Sciences	B53230
CytoFLEX Sheath Fluid	Beckman Coulter Life Sciences	B51503
CytoFLEX Daily IR QC Fluorospheres	Beckman Coulter Life Sciences	C06147
VersaComp Antibody Capture Beads	Beckman Coulter Life Sciences	B22804
VersaLyse Lysing Solution	Beckman Coulter Life Sciences	A09777
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	CORNING cellgro	21-031-CV
Brilliant Stain Buffer	BD Biosciences	566349
DURAClone IM T Cell Subsets	Beckman Coulter Life Sciences	B53328
CD20 BUV395	BD Biosciences	563781
HLA-DR BUV661	BD Biosciences	565074
CD19 BUV737	BD Biosciences	564304
CCR4 BV605	BioLegend	359417
CD95 BV650	BioLegend	305641
CD25 BV785	BioLegend	302637
CD33 PC5	Beckman Coulter Life Sciences	IM2647U
iFluor860(IR fixable viability dye)	AAT Bioquest	1408
Whole EDTA blood (24-HR post venipuncture)	N/A	N/A
740/35 Band Pass Filter	Beckman Coulter Life Sciences	B78217
CytoFLEX LX UV	Beckman Coulter Life Sciences	C11186

ヒント

- 複数のBrilliant Violet色素またはBrilliant Ultraviolet色素を使用する場合は、アーティファクトをもたらす可能性がある色素の相互作用を防ぐため、色素を添加する前にBrilliant Stain BufferをDURACloneチューブに添加してください。
- 試薬が十分に混合されるよう、検体および追加の蛍光標識抗体を添加後、ただちにDURACloneチューブを攪拌（ボルテックス）してください。

プロトコル

1. DURACloneコンペンセーションコントロール（DURACloneキットに含む）を染色します。
    a. 各コンペンセーションコントロールチューブをラックにセットします。
    b. 陽性および陰性VersaCompビーズ各1滴を各チューブに添加します。
    c. 室温で20分間、遮光して放置します。
    d. PBS+1% BSAバッファー1mLを各チューブに添加し、300×gで6分間遠心分離します。
    e. 上清を除きます。
    f. 攪拌（ボルテックス）を行います。
    g. PBS+1% BSAバッファー400µLに再懸濁します。
2. drop-in試薬のコンペンセーションコントロールを作成します。
    a. 陽性および陰性VersaCompビーズ各1滴を各チューブに添加します。
    b. 室温で20分間、遮光して放置します。
    c. PBS+1% BSAバッファー1mLを各チューブに添加し、300×gで6分間遠心分離します。
    d. 上清を除きます。
    e. 攪拌（ボルテックス）を行います。
    f. PBS+1% BSAバッファー400µLに再懸濁します。
3. 染色血液を調製します。
    a. Brilliant Staining Buffer 50µLを各DURACloneチューブに添加します。
    b. drop-in抗体およびiFluor 860のそれぞれの試験量を各DURACloneチューブに添加します。
    c. 別の12×75 mmチューブを未染色全血とします。
    d. 各混合抗体試薬チューブおよび未染色の全血チューブに新鮮な全血100µLを添加します。

e. 6 ～ 8 秒間攪拌（ボルテックス）を行います。

f. チューブを遮光して15分間放置します。

g. 2 mL のVersaLyseを添加します。

h. 1 ～ 3 秒攪拌（ボルテックス）します。

i. 各チューブを室温で、遮光して放置します。

j. 各チューブを200×gで5分間遠心分離します。

k. 上清を除きます。

l. 細胞ペレットを軽くたたいて残留している上清に懸濁します。

m. 各混合抗体試薬チューブにIR Fixable dyeを5 µL 添加します。

n. 室温で20分間、遮光して放置します。

o. PBS+1% BSA バッファー 3 mL に細胞ペレットを再懸濁し、洗浄します。

p. 上清を除きます。

q. 細胞ペレットを静かにタップし、細胞ペレットをPBS+1% BSA 500µLに再懸濁します。

測定

4. スタートアップ

a. CytoFLEXシステムスタートアッププログラムを実行します。

b. 検出器の構成を確認します。

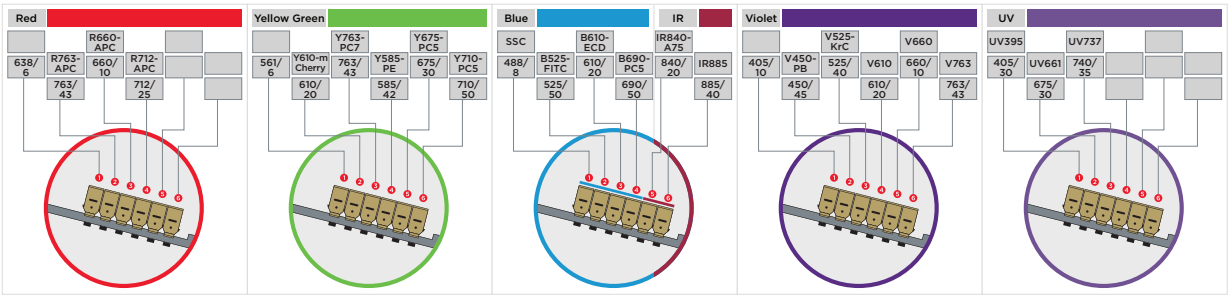

図2. UVレーザーを備えたCytoFLEX LXの検出器構成

c. ユーザーマニュアル「CytoFLEXシリーズ取扱説明書」（文書番号：B54849AJ）に従って、精度管理手順を実施します。

5. コンペンセーション実験を作成します。

a. ロット変更時にコンペンセーションコントロールを更新できるようにするため、使用するDURAClone コントロールとdrop-in 試薬のロット番号を入力します。

b. サンプルタイプの列でビーズを選択し、シングルカラーコントロールを反映させます。

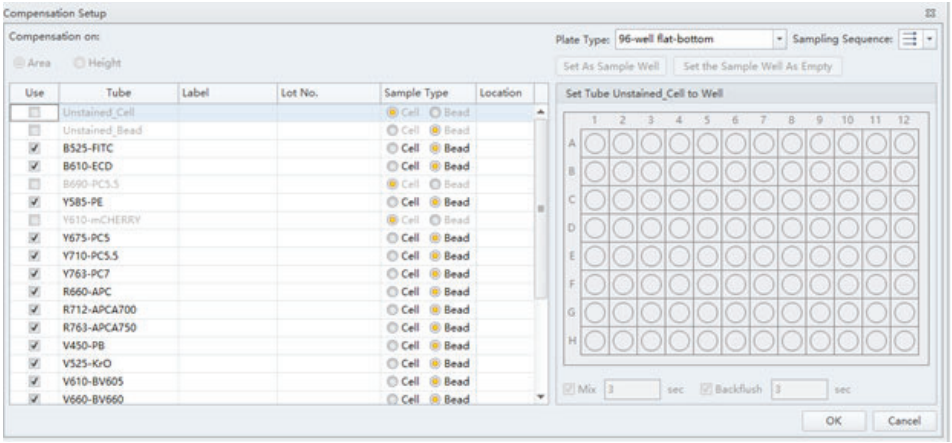

図3. チャンネルとサンプルタイプを選択できるコンペンセーションセットアップウィンドウ

c. VersaCompビーズは各チューブ内に陰性ピークが含まれているため、ユニバーサルネガティブ使用のチェックは外します。

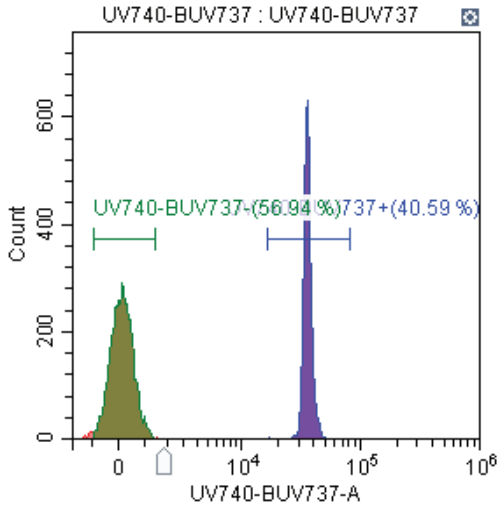

図4. シングルカラー測定とゲーティングの例

d. 各コンペンセーションサンプルを記録します。

i. シングレットビーズが含まれるようにスキャッターゲートを移動させます。

ii. 対数線形スライダーを用いて陰性集団の域を狭め、陰性集団が含まれるようにゲートを移動させます。

iii. 陽性集団が含まれるようにゲートを移動させます。

e. コンペンセーションマトリックスを計算し、ライブラリに保存します。

6. CytExpertでExperimentを作成します。

a. 作成したコンペンセーションライブラリをインポートし、現在のゲインに基づいてマトリックスを変換します。

b. プロットを作成します。

c. 記録します。

結果

この実験では、計3名の健常ドナーから得た静脈穿刺24時間後の検体を試験しました。まず、バックボーンとして10カラーのDURAClone IM T Cell Subsetを用い、パネルを完成させるために7つのマーカーと生細胞識別色素を追加しました。マーカーと蛍光色素の組み合わせは、マルチカラーデザインの標準原則に従い、目的のマーカーに対する蛍光標識抗体の入手可能性も考慮して選択しました。

詳細なT細胞解析を開始する前に、予備的なゲーティングを行います。IR励起の固定可能な生細胞識別色素を用いて死細胞を除外し、生細胞をゲーティングします。次に、SSC対CD45プロットとして生細胞をプロットし、これを白血球（WBC）の特定のために用います。デブリを除外するため、WBCの周囲にゲートを作成します。リンパ球ゲートは、SSCが低くCD45が高い蛍光プロファイルを持つ集団の周囲に作成します。リンパ球は、ダブレット（凝集細胞）をゲートアウトし、解析から単球（CD33陽性）を除外することで、さらに絞り込めます。最後に、実験中のシステムの流路系および安定性の内部検証として、Timeプロットを追加しています（図6a）。

ここでは、T細胞サブセットで計25個の集団が評価されています（図6b、6c）。この解析を始めるにあたり、まずリンパ球リージョン内にCD3陽性細胞のリージョンを描画します。これにより、NK細胞（CD8）や単球（CD4）などのマーカーを発現する可能性があるほかの細胞種類から、CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞を区別することができます。

375 nm			405 nm					488 nm			561 nm					638 nm			808 nm	
405/305	675/30	740/35	450/45	525/40	610/20	660/10	763/43	525/40	610/20	690/50	585/42	610/20	675/30	710/50	763/43	660/10	712/25	763/43	840/20	885/40
BUV395	BUV661	BUV737	PAC BLUE	KROME ORANGE	BV605	BV650	BV786	FITC	ECD	B690	PE	Y610	PC5	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750	IR840	IR885/40
CD20	HLA-DR	CD19	CD57	CD45	CCR4	CD95	CD25	CD45RA	CD28		CCR7		CD33	CD279 (PD-1)	CD27	CD4	CD8	CD3		Viability

図5. 17マーカー、18カラーのパネルデザイン。この試験で用いたマーカーと蛍光色素の組み合わせを示しており、10カラーのDURAClone IM T Cell Subsetのバックボーンは赤枠で、使用しなかったチャンネルはグレーの網掛けで示しています。

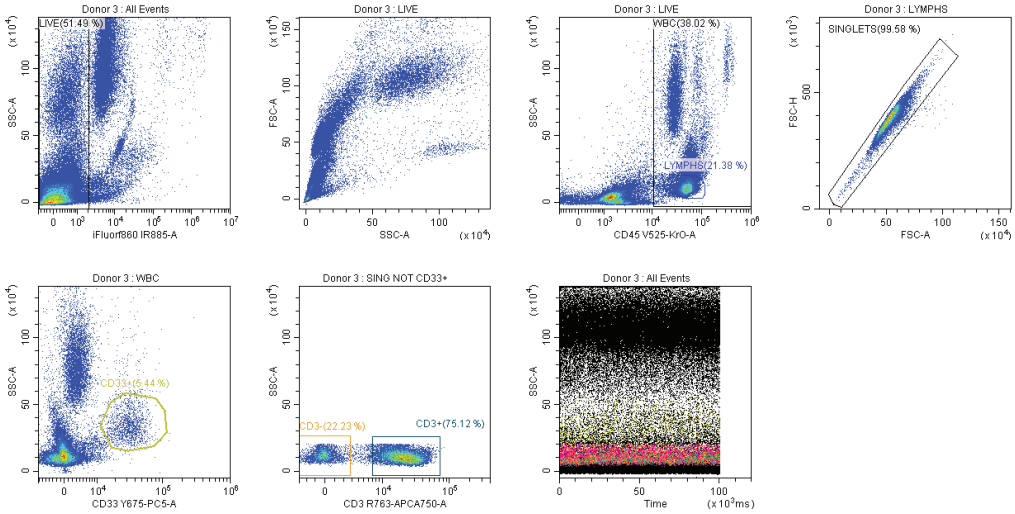

図 6a. 高純度のゲーティング

CD4 陽性 T 細胞

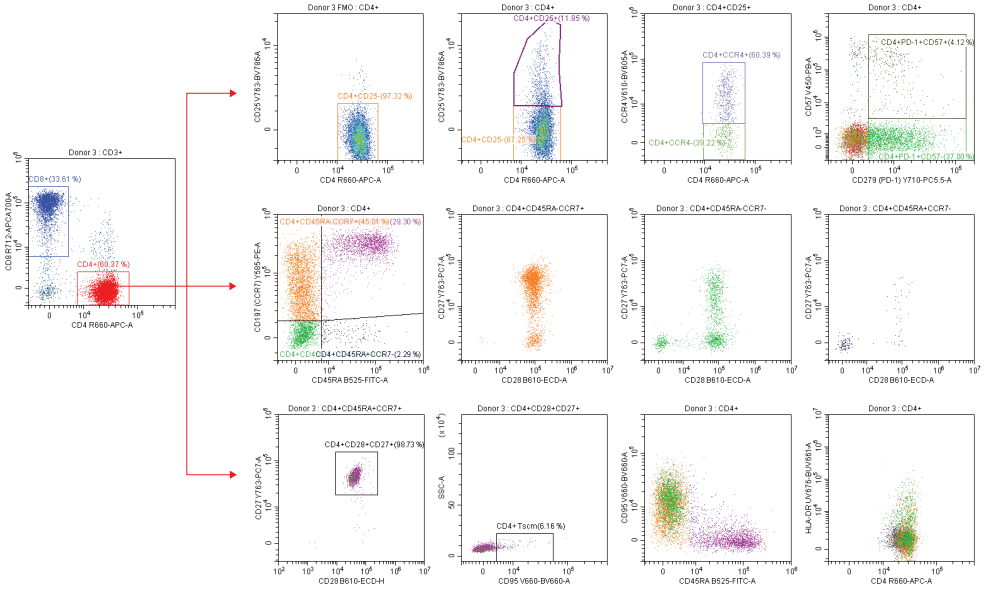

図 6b. CD4 T 細胞サブセット解析

CD8 陽性 T 細胞

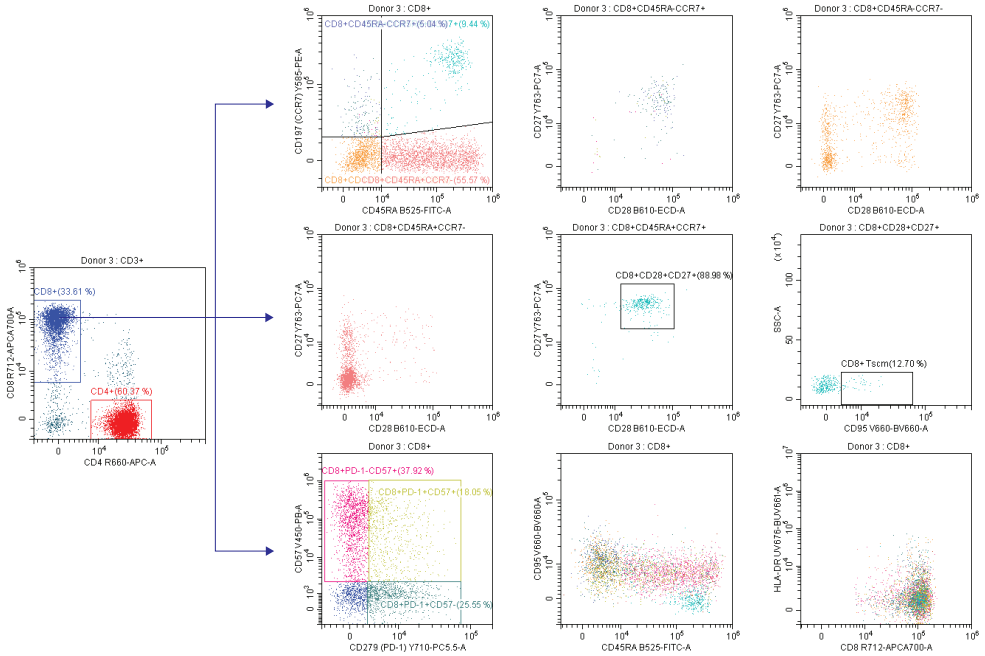

図 6c. CD8 T 細胞サブセット解析

CD4陽性T細胞サブセットを詳しく見てみると、CD4陽性CD25陽性T細胞の集団は制御性T細胞を構成しています。このマーカーは非常に暗いことが多くデータの広がりの可能性が高いマルチカラーパネルで確実にゲーティングを行うことは難しいことから、信頼性を高めるためにFluorescence minus One (FMO) のコントロールを組み込んでいます。CD4陽性細胞のゲーティングでは、Tregの関数としてCCR4の発現を評価することも可能です。CCR4マーカーは皮膚細胞のホーミングにおいて重要な役割を担っており、CCR4陽性細胞のサブセットはエフェクター制御性T細胞の抑制をコントロールしているといわれています[3]。

CD45RAとCCR7を組み合わせることで、ナイーブ (CD45RA陽性CCR7陽性)、セントラル (CD45RA陰性CCR7陽性)、メモリー、エフェクター (CD45RA陽性CCR7陰性)、エフェクターメモリー (CD45RA陰性CCR7陰性) 細胞など、活性化中に起こるT細胞サブセットの様々な段階や経路を調べることができます。各表現型は、CD27とCD28の共刺激分子の様々な発現を調べることで、さらに評価することが可能です。

Program Death Cell-1 (PD-1) は、CD28スーパーファミリーに属し、制御性T細胞を活性化しますが、エフェクターT細胞の機能は妨げます。また、CD95は細胞を介したアポトーシスに関与します。CD95は主にメモリーT細胞に発現していますが、ナイーブ表現型の少数のT細胞にもCD95が発現しており、これらはいわゆるメモリータイプの幹細胞様T細胞であると考えられます (図6b) [4]。

B細胞

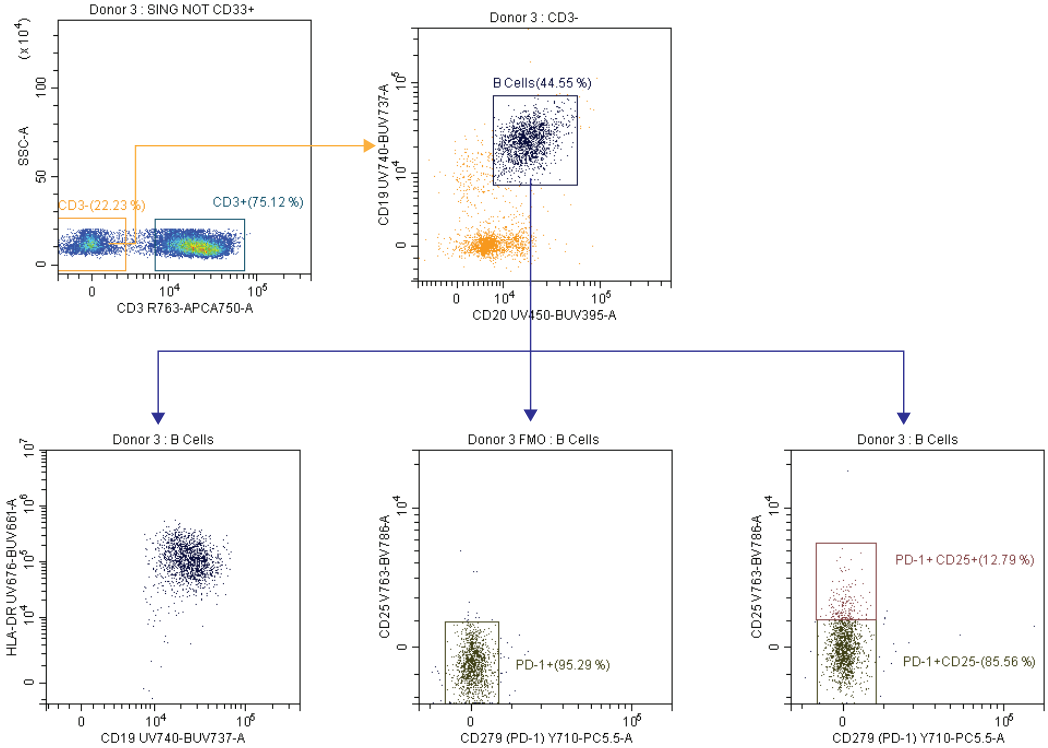

図6d. B細胞サブセット解析

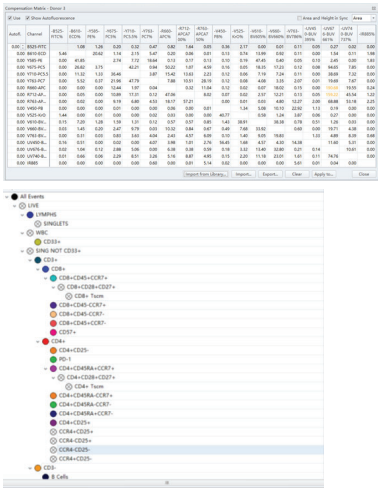

図7. コンペンセーションマトリックスおよび階層的ゲーティング

CD8 T細胞サブセットに関しても、CD4と同様の手法でCD45RA、CCR7、CD28およびCD27マーカーサブセットを調べています。CD8陽性CD57陽性サブセットは、細胞傷害性が高く、増殖能が低い最終分化T細胞を表しています。このT細胞サブセットにおいても、CD45RAの機能としてCD95の発現が再度評価されています（図6c）。

このパネルでは、T細胞ほど十分に抗体染色されていませんが、CD3陰性集団にB細胞（CD19陽性、CD20陽性、HLA-DR陽性）がゲーティングされていることが観察できます。この集団またはほかの細胞種類において詳細な情報を得たい場合は、バックボーンパネルのオープンチャンネルを用いて容易に変更することが可能です（図6d）。

結論

このアプリケーションノートでは、DURAClonеのドライ抗体試薬アッセイをイムノフェノタイピングパネルのバックボーンとして用いることで、より詳細な解析を簡単に実施できることを示しました。まずバックボーンを用い、次にサイトメーターのオープンチャンネルを利用することにより、結果を迅速に得ることができ、また、パネルの複数のパラメータが事前に最適化されていることが分かっているという安心感を得ることができます。また、この方法は、研究における特定の質問に答えるためにdrop-in試薬を設定できるため、ラボの柔軟性も高くなります。

さらに、DURAClone IMチューブを使用することで、試薬の分注に要する時間が削減でき、複数の試薬を複数のサンプルチューブに分注する際に起きる過誤の可能性も低くなります。

さらには、CytoFLEXのAPD検出器の感度により、柔軟なハイパラメータ パネルデザインが可能となります。発現の弱いマーカーであっても、例えば、CD25 BV786をV763チャンネルにセットするように、そのマーカーを高感度のチャンネルに特別にセットする必要はもはやありません。FMOは行われていますが、CD4陽性CD25陰性細胞とCD4陽性CD25陽性細胞との区別ははっきりと確認できたことから、このシステムが暗い集団と陰性の集団を識別できることは明らかです。

参考文献

1. Nguyen R, Perfetto S, Mahnke YD, et al. Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design. Cytometry A 2013 Mar; 83 (3): 306-315. Available from URL: 2013 Feb 6; doi: 10.1002/cyto.a.22251.
2. Lawrence W, Varadi G, Entine G, et al. A Comparison of Avalanche Photodiode and Photomultiplier Tube Detectors for Flow Cytometry. Proceedings of SPIE 2008 Feb; Vol 6859. Available from URL: 2008 Feb; doi: 10.1117/12.758958.
3. Baatar D, Olkhanud P, Sumitomo K, et al. Human Peripheral Blood T Regulatory Cells (Tregs), Functionally Primed CCR4+ Tregs and Unprimed CCR4− Tregs, Regulate Effector T Cells Using FasL. J Immunol 2007 Apr 15; 178(8): 4891–4900.
4. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. Nat Med 2011 Sep 18; 17(10): 1290–1297. Available from URL: doi:10.1038/nm.2446.
5. Van de Veen W, Stanic B, Yaman G, et al. IgG4 production is confined to human IL-10–producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. J ALLERGY CLIN IMMUNOL 2013 APR; 131 (4).
6. Mauri C, Menon, M. The expanding family of regulatory B cells. International Immunology 2015 JUN; 27 (10): 479-486.

弊社Webサイトにイムノフェノタイピングの情報を掲載中！ ぜひご覧ください。

https://www.beckman.jp/resources/techniques-and-methods/immunophenotyping

ベックマン・コールター株式会社

本　　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460

e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp

F19a0207a　　2019.12-500 (L)