

マスサイトメトリーによるヒト免疫細胞の網羅的解析の実例

メディフォード株式会社

○田中護, 真弓彩夏, 内田夏美, 山木浩嗣, 原田英樹, 森民樹, 木下誠司
(メディフォード株式会社 事業統括部門 治験事業部 医薬品分析部)

目的

フローサイトメトリーの測定対象である免疫細胞は様々な役割を担う細胞集団で構成され、それらが形成するネットワークを通じて腫瘍細胞やウイルス感染細胞を排除する。一方で、自己免疫疾患やアレルギーなどの場合には、免疫系の過剰な働きが生体に不利益をもたらす。したがって、医薬品の開発においては、免疫系の機能を利用・制御したり、薬剤による免疫系への影響を確認したりすることが重要である。

これらの免疫細胞には細胞の種類や状態を特徴づけるためのマーカーが多く発現していることから、より詳細に免疫系を把握するためにはマルチパラメーター測定が必要である。そこで当社では、マルチパラメーター測定に対応するためにマスサイトメーターを導入した。本発表では30（一部32）のマーカーを用いたマスサイトメトリーによるヒト免疫細胞の網羅的解析の実例を示す。

材料と方法

PBMC： 社内ボランティア血液からBD バキュティナ®CPT™単核球分離用採血管（Becton Dickinson and Company）で分離、及びCTL社から購入した計9ドナーのPBMC

試薬： Maxpar® Direct Immune Profiling Assay™ (MDIPAキット、Standard BioTools社)を使用した。30種類の抗体を含み、それぞれに重金属が標識されている。

試料調製： MDIPAキットのチューブにPBMC (3x10⁶ cells/50 µL) を添加・反応後洗浄して測定試料とした（キット取説に従った）。一部測定ではMDIPAキットにPD-1及びFasに対する抗体を追加した。

測定方法： 測定試料をCyTOF® XT™ (Standard BioTools社) で測定した。取り込みイベント数は100,000以上とした。

解析方法： 解析ソフトFlowJo™ (Ver.10.7.2、Becton Dickinson and Company) を使用した。



結果

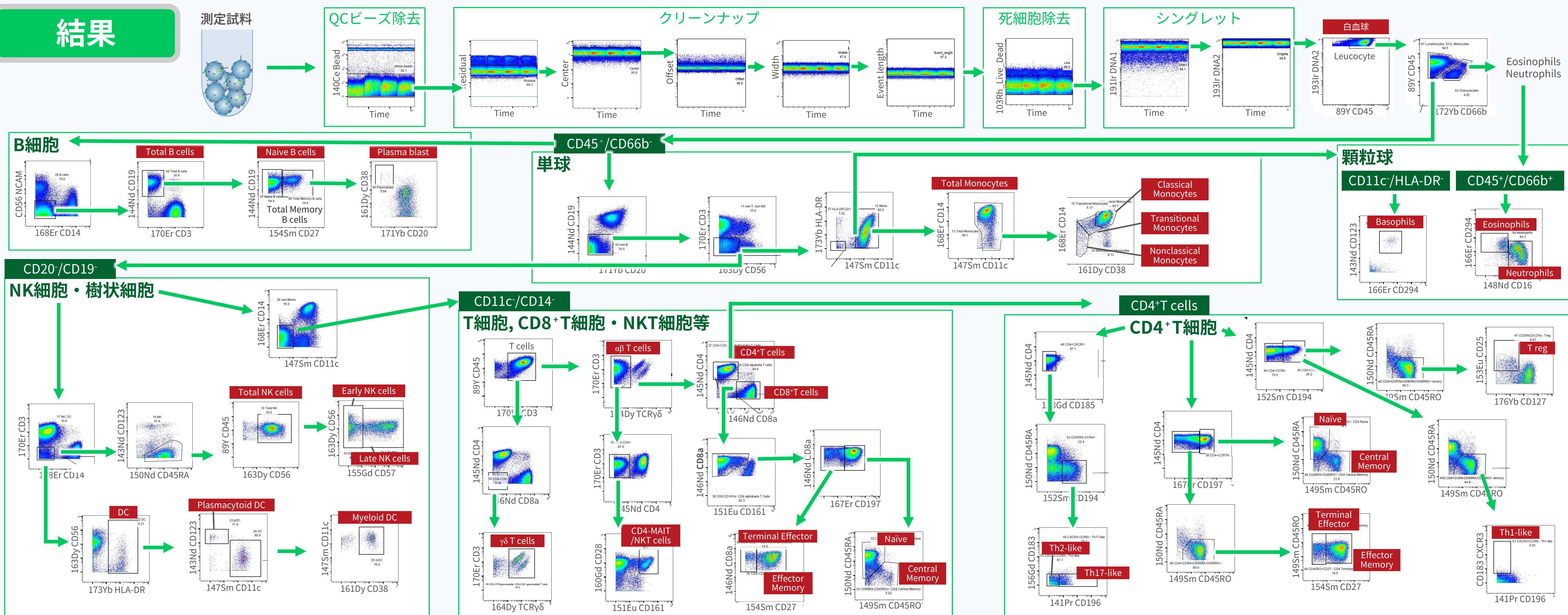


Fig. 1 白血球の網羅的測定（サイトグラムの代表例）
凍結保存したPBMCを解凍後、30種の抗体（MDIPAキット）で測定試料を調製し、CyTOF XTで測定した。キット添付資料に従ってサイトグラムを表示し、PBMCに含まれる白血球集団の割合を解析した。

Table 1 白血球の網羅的測定（PBMC 9例）

T細胞/CD4 ⁺ T細胞			CD8 ⁺ T細胞/他のT細胞			B細胞/NK細胞			樹状細胞/顆粒球			リンパ球・単球		
ポピュレーション	%	±SD	ポピュレーション	%	±SD	ポピュレーション	%	±SD	ポピュレーション	%	±SD	ポピュレーション	%	±SD
CD3 ⁺ T cells	55.8	5.5	CD8 ⁺ T cells	19.3	4.3	B cells	10.1	5.8	Dendritic cells	2.0	1.3	Lymphocytes	78.0	5.0
CD4 ⁺ T cells	31.1	3.8	Naïve	10.8	5.5	Naïve	7.7	5.7	Myeloid	0.9	0.3	Monocytes	17.7	6.2
Naïve	13.7	4.7	Central Memory	0.4	0.2	Memory	2.4	0.5	Plasmacytoid	0.4	0.4	Classical	14.5	5.5
Central Memory	2.6	1.0	Effector Memory	4.9	1.3	Plasma blasts	0.1	0.1	Granulocytes	1.0	1.1	Nonclassical	1.1	0.8
Effector Memory	9.2	1.5	Terminal Effector	1.3	1.5	NK cells	8.8	1.7	Neutrophils	0.8	0.8	Transitional	1.1	0.8
Terminal Effector	2.0	1.2	γ δ T cells	2.1	2.4	Early	4.2	0.7	Basophils	0.1	0.0			
Regulatory T cells	0.8	0.3	MAIT/NKT cells	2.4	1.8	Late	4.6	1.7	Eosinophils	0.1	0.3			
Th1-like	1.9	1.8												
Th2-like	2.9	0.7												
Th17-like	1.8	0.3												

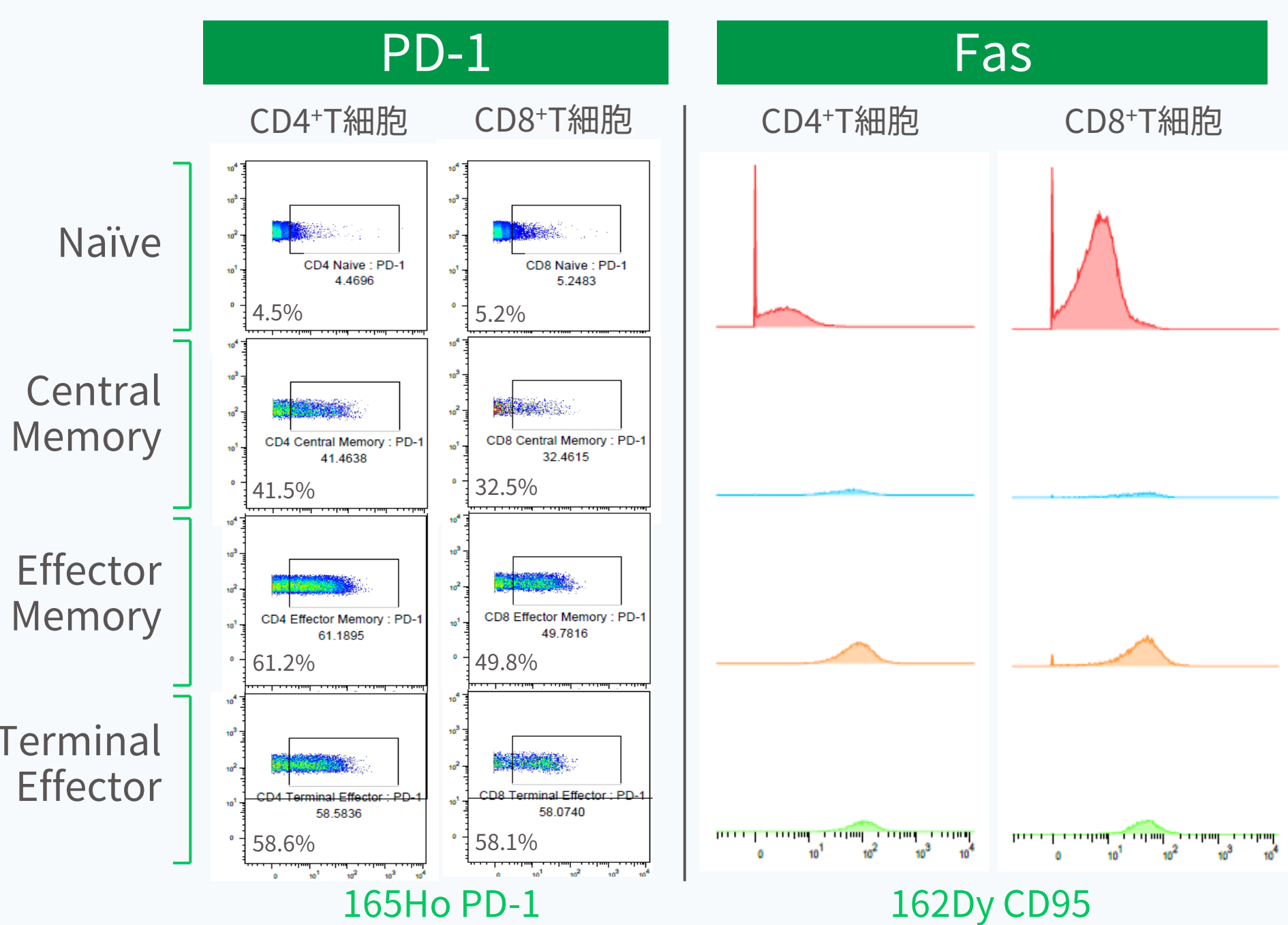
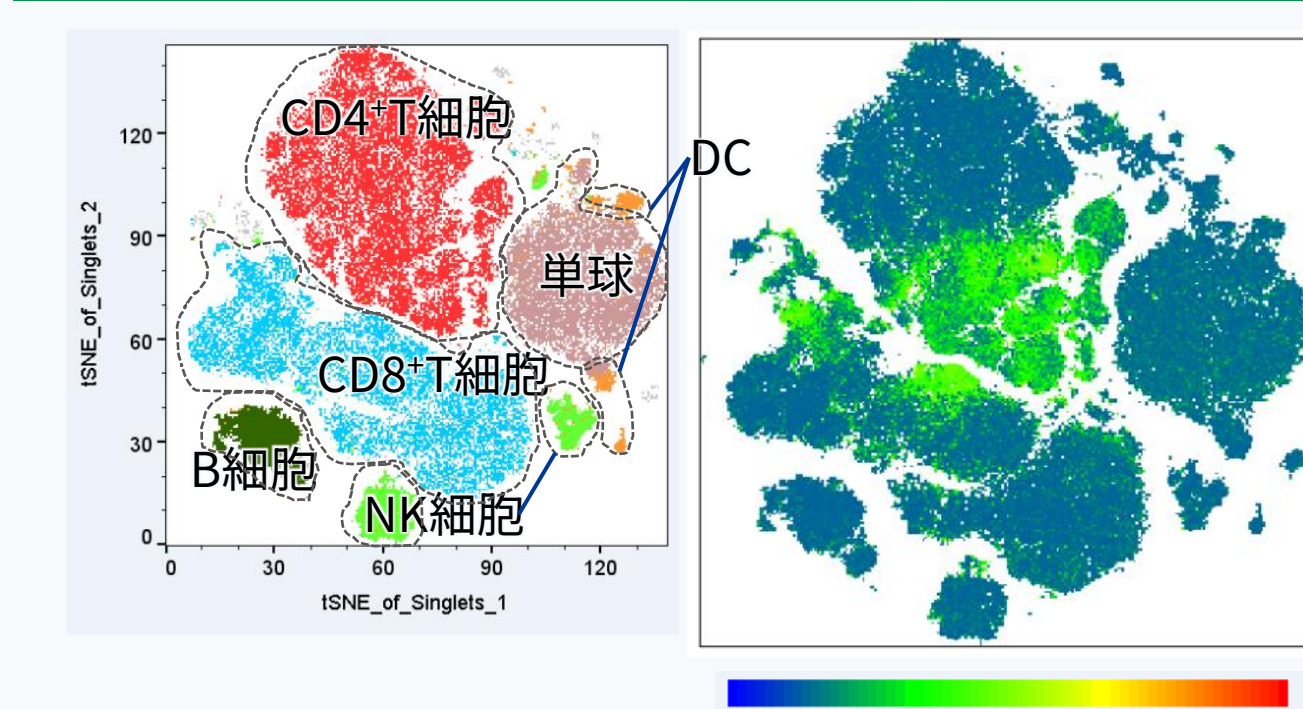
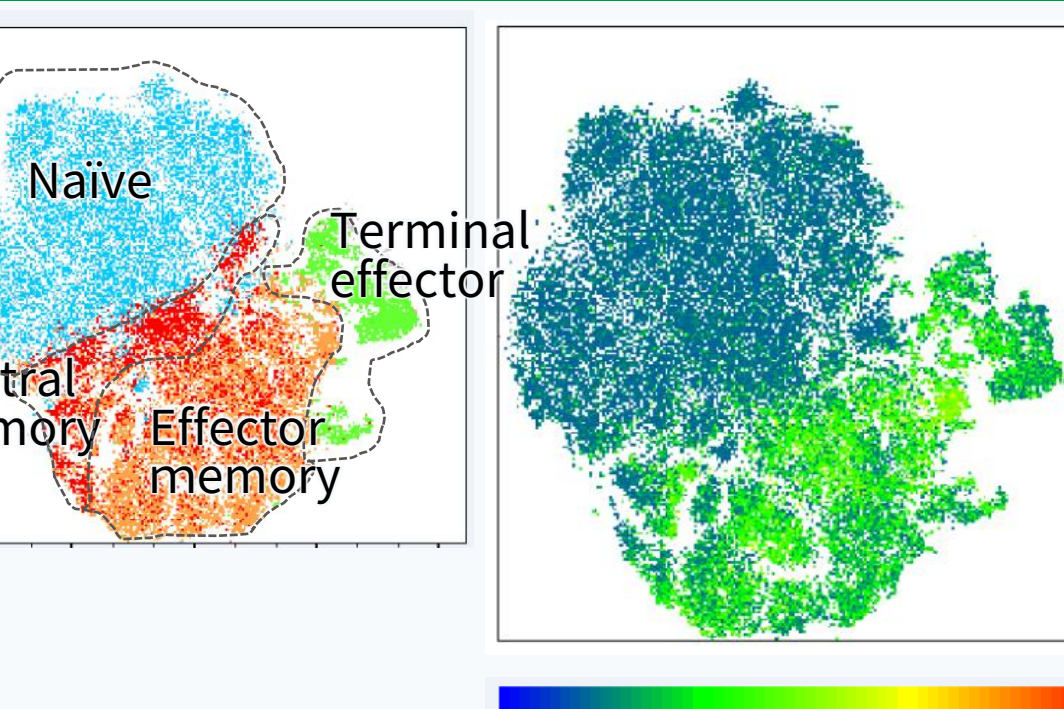


Fig. 2 T細胞におけるチェックポイント分子（PD-1）及び活性化マーカー（Fas）の発現解析 T細胞の分化段階が進むにつれてこれらのマーカーの発現も高くなることが確認できた。MDIPAキットに抗体医薬の標的分子等の任意のマーカーを追加することもできる。

(A) 全ポピュレーション中のPD-1の分布



(B) CD4⁺T細胞中のPD-1の分布



(C) CD8⁺T細胞中のPD-1の分布

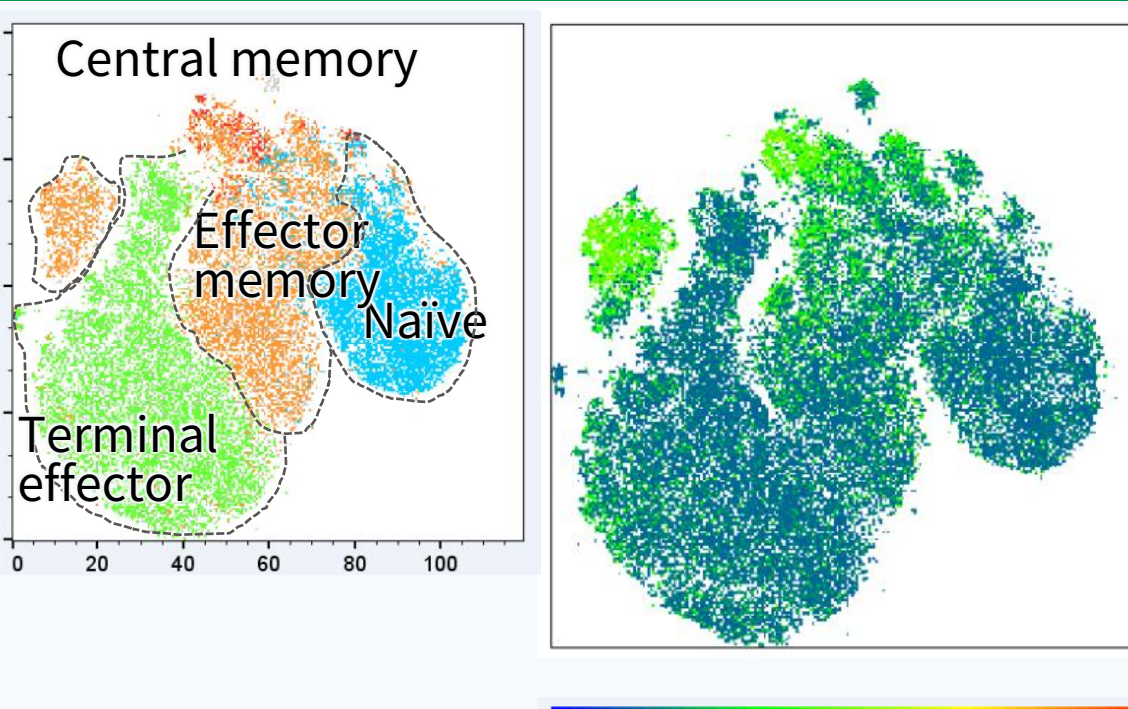
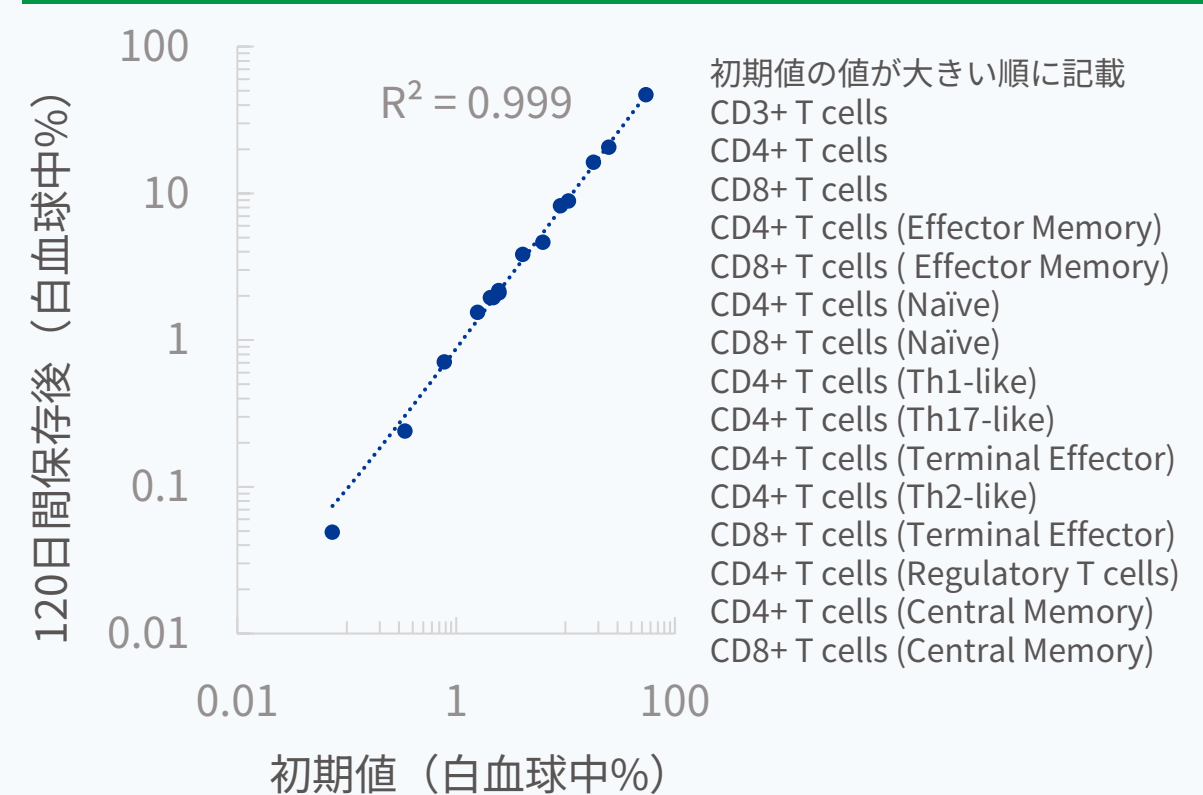
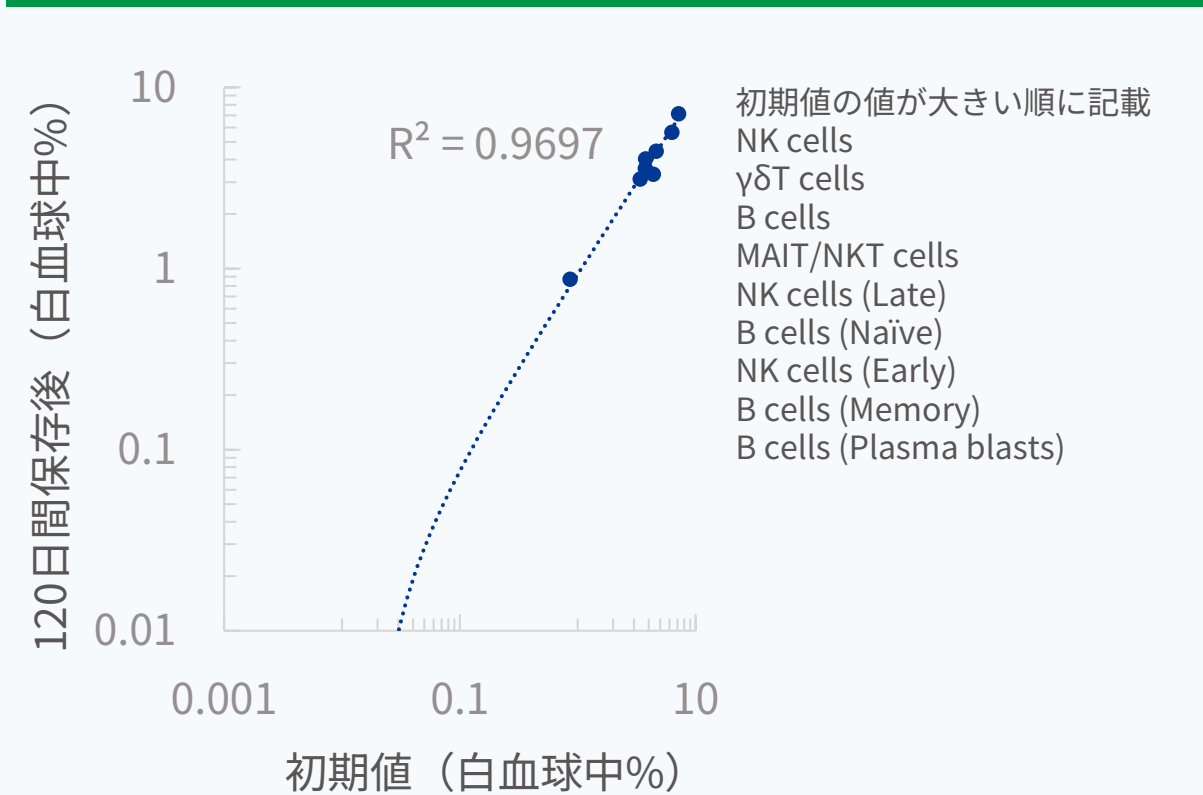


Fig. 3 次元削減的手法による白血球集団中のPD-1発現の俯瞰的解析 Fig.1およびFig.2で得られたサイトグラムを基に解析ソフトFlowJoを用いて次元削減（t-SNE）を行った（1検体のデータ）。全ポピュレーションを「ランド（島）」として表示し（図A・左）、PD-1の発現強度を示した（図A・右）。主にCD4⁺T細胞及びCD8⁺細胞にPD-1の発現が確認できた。さらにCD4⁺T細胞及びCD8⁺細胞を分化段階に分けて表示すると、CD4⁺T細胞では主にEffector memoryおよびTerminal effectorに、CD8⁺T細胞では主にCentral memory及びEffector memoryの一部にPD-1が発現していることが確認できた（図B及びC）。

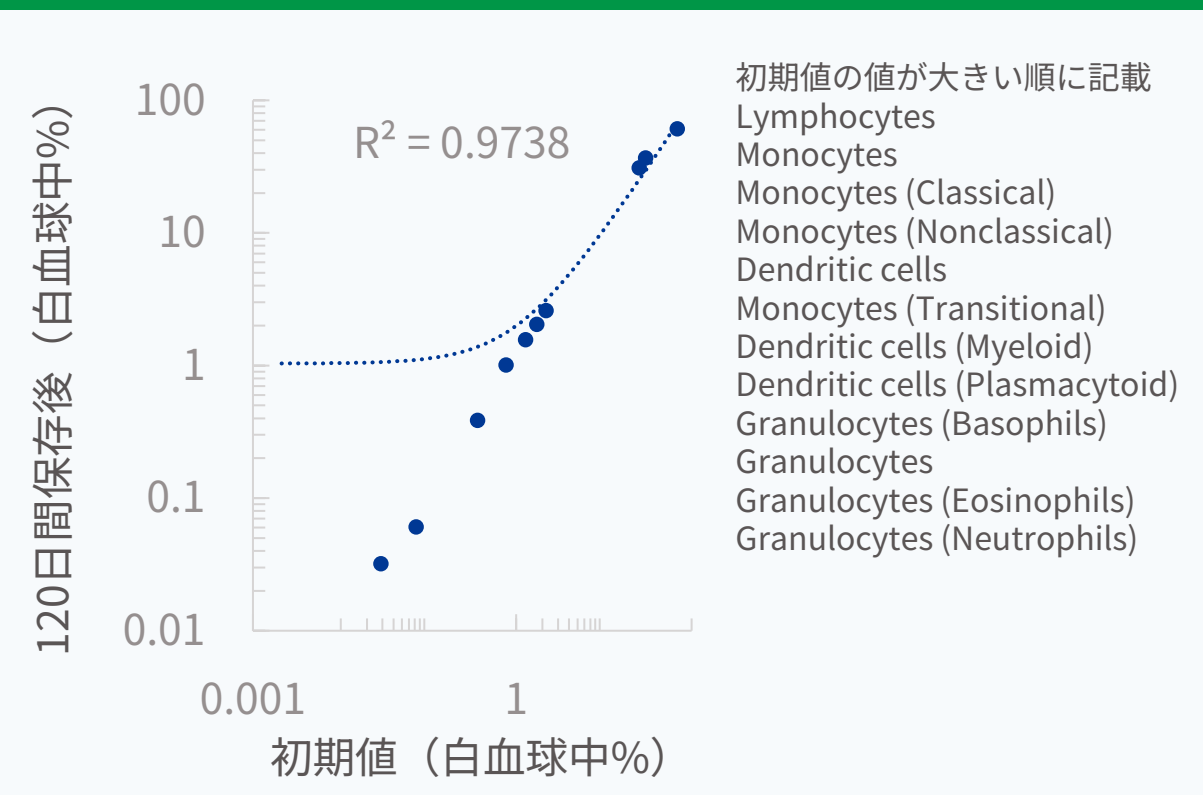
T細胞



その他のT細胞・B細胞・NK細胞



リンパ球・DC・単球・顆粒球



結語

今回我々は、マスサイトメトリーによってヒトPBMCに含まれる細胞集団の網羅的な解析例を示した。さらに抗体を追加することで、抗体医薬の標的分子など任意のマーカーの発現分布を俯瞰的に解析することが可能であることも示した。

このようにマスサイトメトリーは、腫瘍免疫や感染症予防ワクチンの開発、免疫系に作用する薬剤の評価など、幅広い応用が可能であるため、免疫系の詳細な理解と評価が進み、今後の研究や医薬品開発において重要な役割を果たすことが期待される。