

免疫系ヒト化マウスにおける 14 カラーマルチパラメーター解析

Aaron Middlebrook,¹ Eileen Snowden,² Warren Porter,² Friedrich Hahn,² Mitchell Ferguson,² Brian Soper,³ James Keck,³
Joan Malcolm,³ Shannon Dillmore,² Smita Ghanekar,¹ Rainer Blaesius².

¹ BD Biosciences, San Jose, CA; ² BD Technologies, Raleigh-Durham, NC; ³ The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME

要約

近年、免疫療法アプローチがメラノーマ治療において成功していることや、その他のさまざまながんに対しても同様の治療が有望であることは、がんにおける免疫系の重要性を明確に示しています。実際、効果的に治療のデザインと評価を行うには、免疫系と腫瘍内微小環境を構成する増殖性腫瘍細胞との相互作用の包

括的な理解が必要です。患者由来異種間移植（PDX）腫瘍からのがん組織を移植したヒト化マウス系は、研究者にとって高度に再現された研究ツールで、腫瘍細胞の免疫回避の抑制や、細胞傷害性応答の促進を目的とする治療戦略を容易にデザインすることができます。



BD LSRFortessa™ X20フローサイトメーター

NOD scid gamma (NSG™) マウスやヒトKITLG、CSF2、およびIL-3などのサイトカインを発現するトリプルトランスジェニックNSG™ マウス (NSG™-SGM3) などの重度複合免疫不全マウスは、ヒト腫瘍の生着および造血幹細胞 (CD34+) 移植後のヒト免疫系の構築において実績のあるホストです。標準的なNSG™ マウスよりも、骨髄系および制御性T細胞 (Treg) の分化を促すサイトカインの内因性発現が、実質的に改善されていることが示されています。

本資料では、3種類の14色フローサイトメトリーパネルを用いて免疫系全体の包括的かつ詳細な解析を実施しました。使用した3つの抗体パネルは免疫系における特定の細胞集団：1) T細胞、2) ナチュラルキラー (NK) 細胞 / 樹状細胞 (DC) / B細胞、および3) 骨髄系細胞の特性を、詳細に解析するためにデザインされています。NSG™ マウスおよびNSG™-SGM3 マウスから得られた血液、脾臓、および骨髄組織について、移植後10、16、21、および31週目に、上記3種類のフェノタイプパネルをそれぞれ用いて評価しました。本研究で得られたデータにおいて、トリプルトランスジェニックNSG™-SGM3 マウスではNSG™ マウスよりも、より完全なヒト化免疫系が確認され、T細胞サブセットの分布と骨髄系細胞の全体的な存在量が特異的に改善したことを示しています。

ヒト腫瘍を移植したNSG™ マウスは、がん免疫療法のための貴重な前臨床試験プラットフォームとなります。

方法

マウス

NSG™ マウスおよびNSG™-SGM3 マウスを、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) においてヒト臍帯血由来CD34+ hSCを移植してヒト化し、BD Technologies (Raleigh-Durham, NC) へ送付した。

組織の処理

マウスは安楽死させ、脾臓、骨髄、および末梢血を採取した。脾臓は2枚のガラス製スライドの間に置き、すりつぶした。その後スライドを50 mLのコニカルチューブ内で10～20 mL PBSでリンスし、回収した液を70 μmメッシュでろ過し、単一細胞浮遊液を回収した。骨髄は、ワイドボアピペットチップを用いて大腿骨から取り出してすりつぶした。その後70 μmメッシュでろ過し、単一細胞浮遊液を作製した。末梢血は、末梢血管からの採血で200～400 μLを回収した。末梢血サンプルおよび脾臓と骨髄から得られた単一細胞浮遊液は、赤血球を溶血するため室温にて4 mL ACKバッファー (Gibco A10492-01) で7分間処理した。その後サンプルを45 mL DPBS/2% FBSで1回洗浄した。上清を吸引し、ペレットはヒトFcRブロッキング試薬中でインキュベートし、PBS中に再懸濁した後、Falcon® 96ウェルプレートに移して抗体カクテルで染色した。

フローサイトメトリー

3種類のサンプル (血液、脾臓、および骨髄) それぞれから得られた細胞浮遊液は、結果のセクションに記載する14色パネルをそれぞれ用いて30分間染色した。抗体カクテルは50 μL BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences カタログ番号659611) で希釈した。染色後、細胞はPBSで2回洗浄し、遠心分離 (300 gで7分間) で回収した。サンプルは、Special Order BD LSRFortessa™ X-20フローサイトメーターで測定し、データ解析はBD FACSDiva™ ソフトウェアで行った。

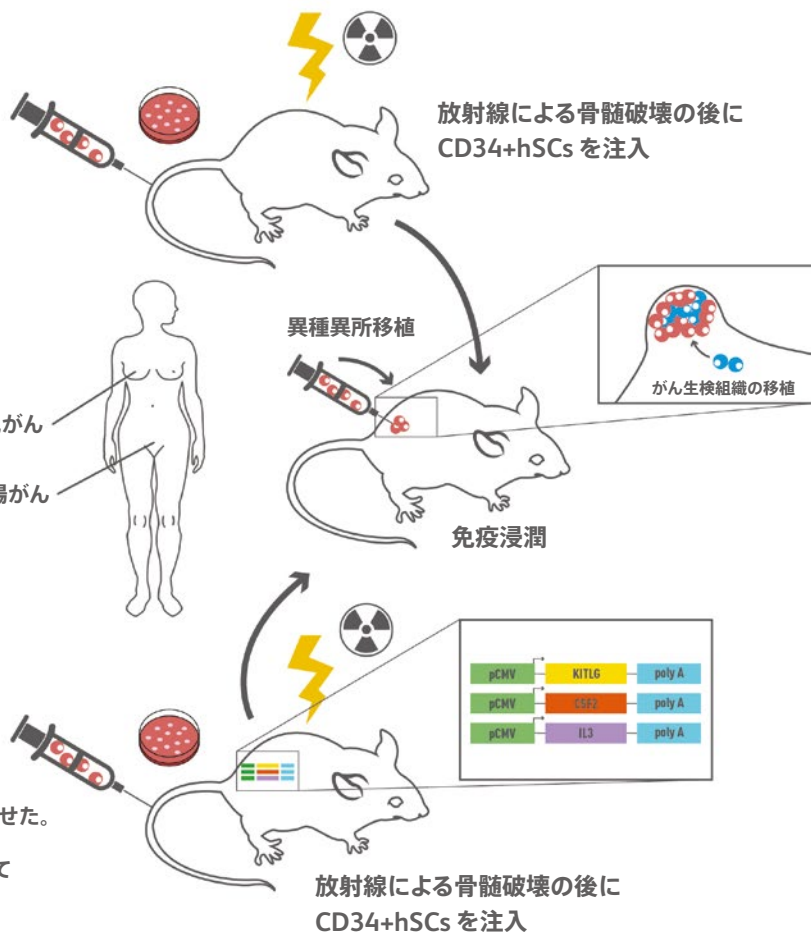
NSG™ マウス

IL-2 rg null 対立遺伝子を
B6129S4-IL2rgtm 1Wjl/J から
NOD.CB17-Prkdcscid/J に
8 世代以上かけて交差させた。

PDX マウスモデル

患者由来異種移植

乳がん
結腸直腸がん



NSG™ -SGM3 マウス

- 1) C57BL/6xC3H/HeN 卵母細胞に遺伝子導入を実施。
- 2) BALB/c-scid/scid に戻し交配した後、
NOD.CB17-Prkdcscid/J と少なくとも 11 世代は交配させた。
- 3) CB17-Prkdcscid-SGM3 マウスを NSG マウスと交配して
NSG-SGM3 マウスを作製した。

図 1 NSG™ マウスと NSG™ -SGM3 マウスとの比較

NSG™ マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, 005557) は、成熟し B 細胞、T 細胞、および NK 細胞を持たない。NSG™ -SGM3 (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg (CMV-IL3,CSF2,KITLG) 1Eav/MloySzJ, 013062) は、ヒト幹細胞因子 (KITLG)、GM-CSF (CSF2)、および IL-3 を発現する導入遺伝子を持つ NSG™ マウスである。レシピエントマウスを生後 3 ~ 4 週目に放射線照射処理し、ヒト臍帯血由来 CD34+ 造血幹細胞を移植した。ヒト腫瘍の同時移植前に、マウスはヒト多系統移植とヒト免疫系の確立について評価された。図の提供 : The Jackson Laboratory.

結果

T細胞パネル

組織サンプル（骨髄、脾臓、および末梢血）を14色パネルで染色しました（試薬リストは次のページの表を参照）。このパネルはT細胞サブセットを解析するためにデザインされました。下記のフローチャートは解析に用いられたゲーティングストラテジーを示しています（脾臓、23週齢 NSG™ マウス）。同定された集団の割合はボックスプロットで表示しました（次ページ、下

部）。各プロットを横切る緑色の帯は、健康成人ドナー（n = 6）において同じパネルを用いて測定された、末梢血中の各集団の範囲を示しています。計数された集団のすべてのプロットが示されているわけではありません。ほとんど変化が確認されなかったものや、参照値（緑色の帯）との一致が明らかなものは示しません。中間の16～17週および23週の結果は示していません。

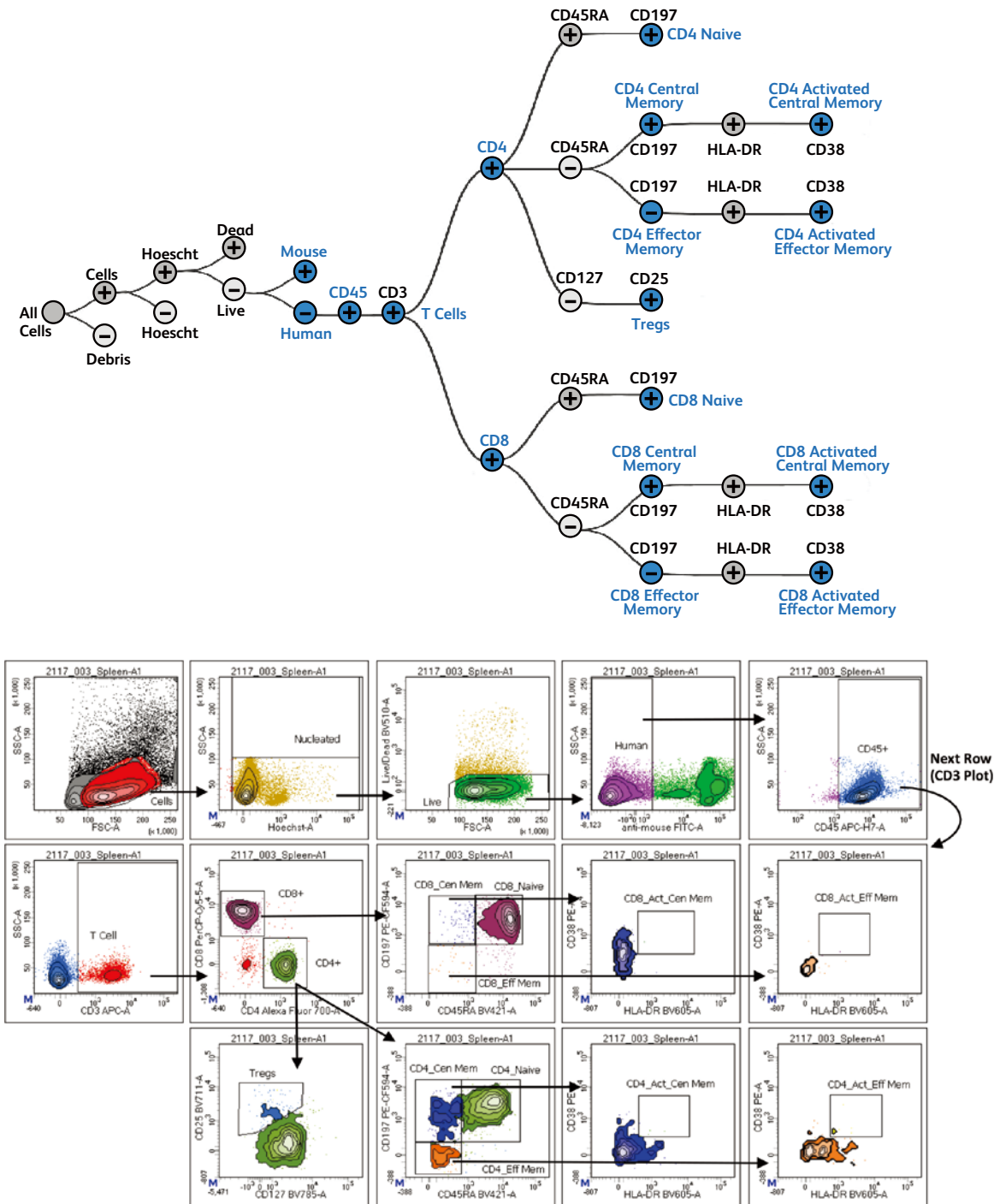
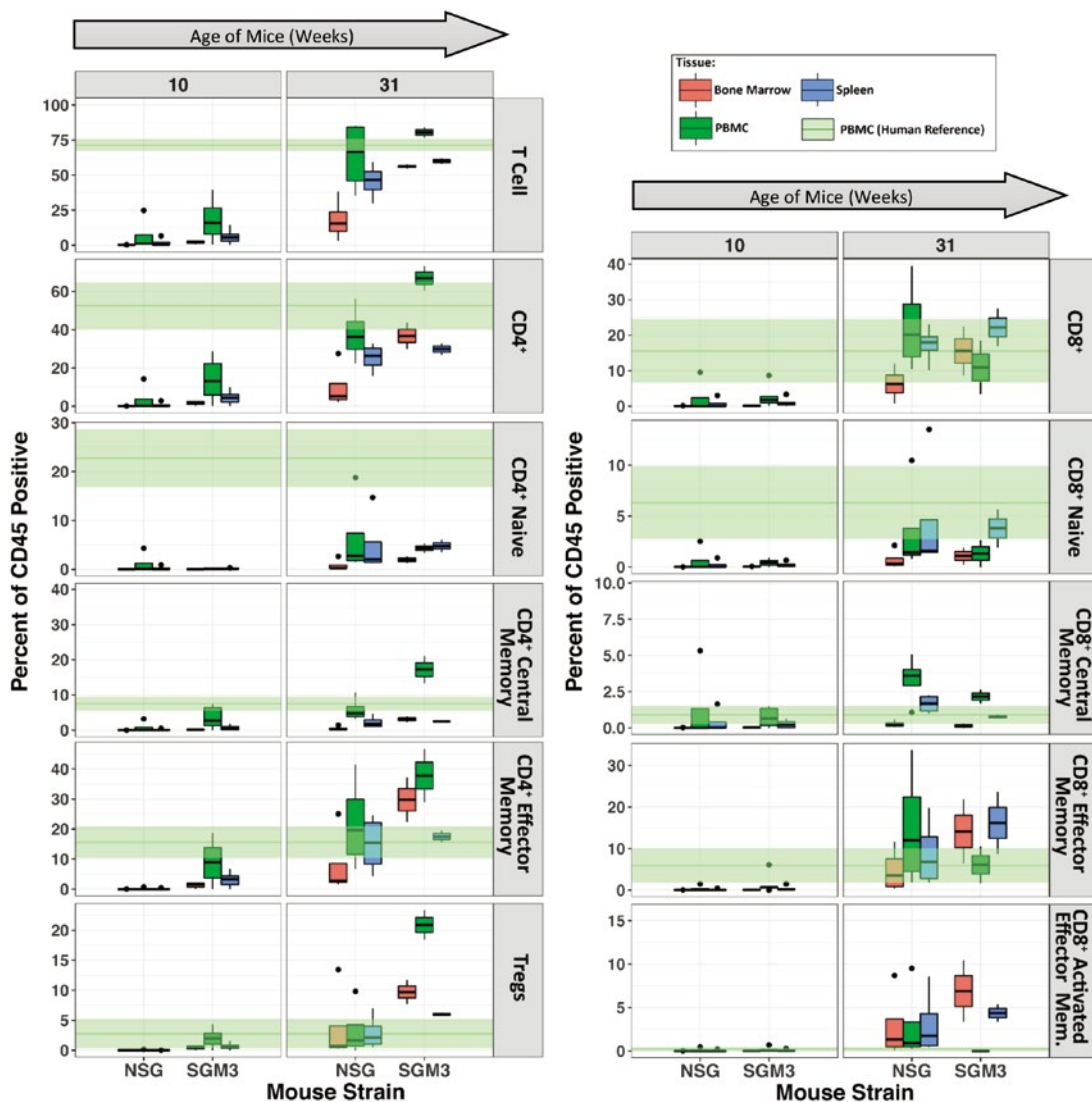


図2 T細胞集団の階層性およびゲーティングストラテジー

青字で示した細胞集団（上）はすべての組織、すべての週齢（10、16～17、23、および31週）について測定しました。細胞集団の階層性はBD Horizon GPS ツール（方法のセクションを参照）を用いて生成しました。各集団は、記載のゲーティングストラテジーに基づいて定義されました。記載のデータは23週齢 NSG™ マウスの脾臓から得られた代表的な一連の解析プロットです。このゲーティングストラテジーはパネルのすべてのマーカーを含んでいるわけではありません。いくつかのマーカーは腫瘍を移植したマウスとの比較実験に使用するような、活性化型特異的な表現型を同定するマーカーに分類されるためです。

T細胞パネルで使用した試薬

Laser	Fluor	T-Cell Panel	Cat. No.	*Mouse Dump	
				Antibody	Cat. No.
488	FITC	*Mouse Dump	(at right)	mCD45	553079
	PerCP-Cy™5.5	CD8	560662	mH2Kd	553592
561	PE	CD38	555460	mTer119	561032
	PE-CF594	CD197	562381	mCD31	558738
652	PE-Cy™7	CD28	560684	mCD41	561849
	APC	CD3	555342	mCD71	553266
405	APC-H7	CD45	560274		
	AF700	CD4	557922		
355	BV421	CD45RA	562885		
	BV510	FVS Live/Dead	564406		
355	BV605	HLA-DR	562844		
	BV711	CD25	563159		
355	BV786	CD127	563324		
	BUV395	Hoescht 33342	561908		



NK/DC/B 細胞パネル

組織サンプル（骨髄、脾臓、および末梢血）を 14 色パネルで染色しました（試薬リストは次のページの表を参照）。このパネルは DC 細胞、NK 細胞、および B 細胞サブセットを解析するためにデザインされました。下記のフローチャートは解析に用いられたゲーティングストラテジーを示しています（脾臓、23 週齢 NSG™ マウス）。同定された集団の割合はボックスプロットで表示しました（次ページ、下部）。各プロットを横切る緑色の帯は、

健康成人ドナー（n = 6）において、同じパネルを用いて測定された末梢血中の各集団の範囲を示しています。計数された集団のすべてのプロットが示されているわけではありません。ほとんど変化が確認されなかったものや、参照値（緑色の帯）との一致が明らかなものは示しませんでした。中間の 16 ~ 17 週および 23 週の結果は示していません。

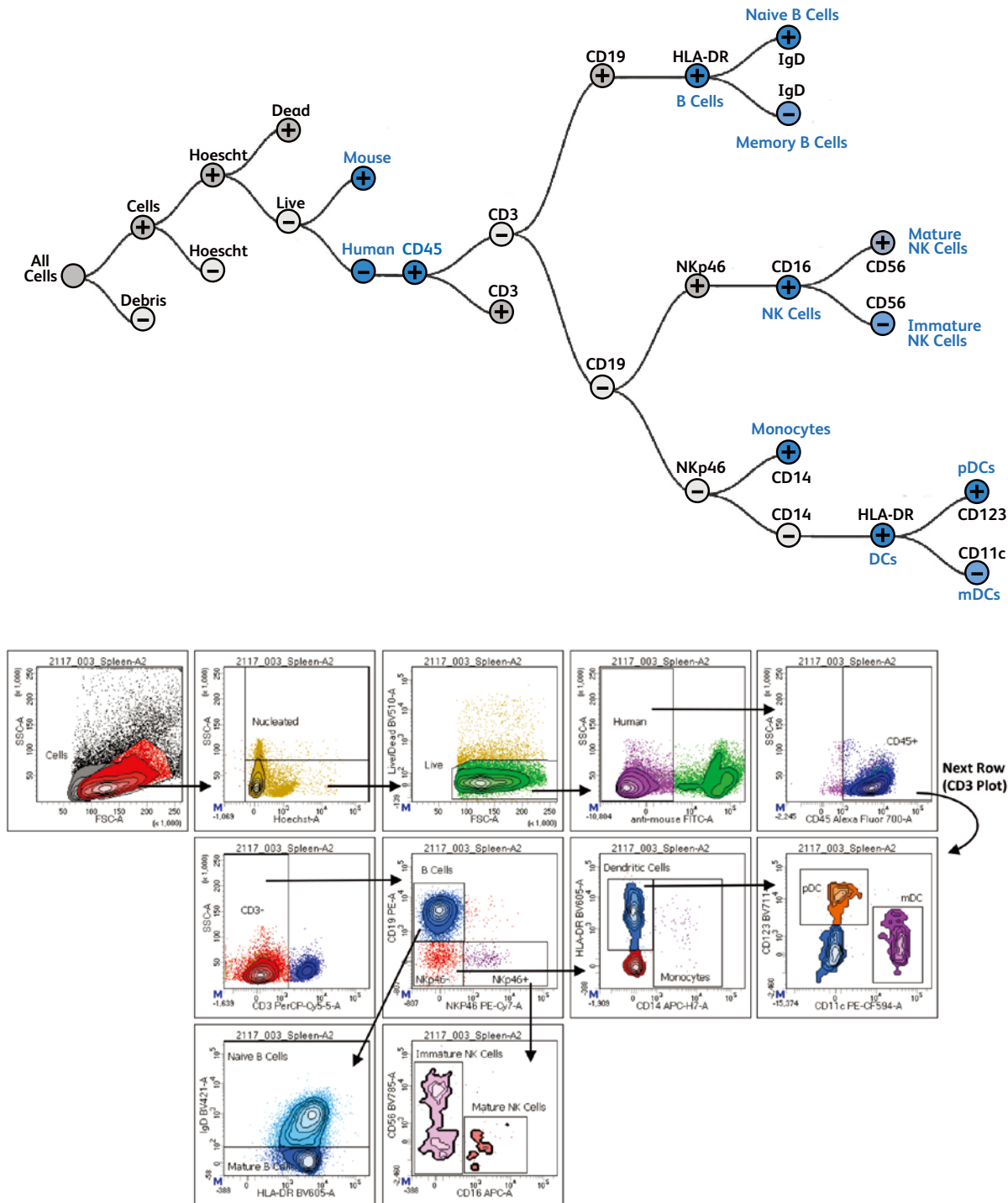
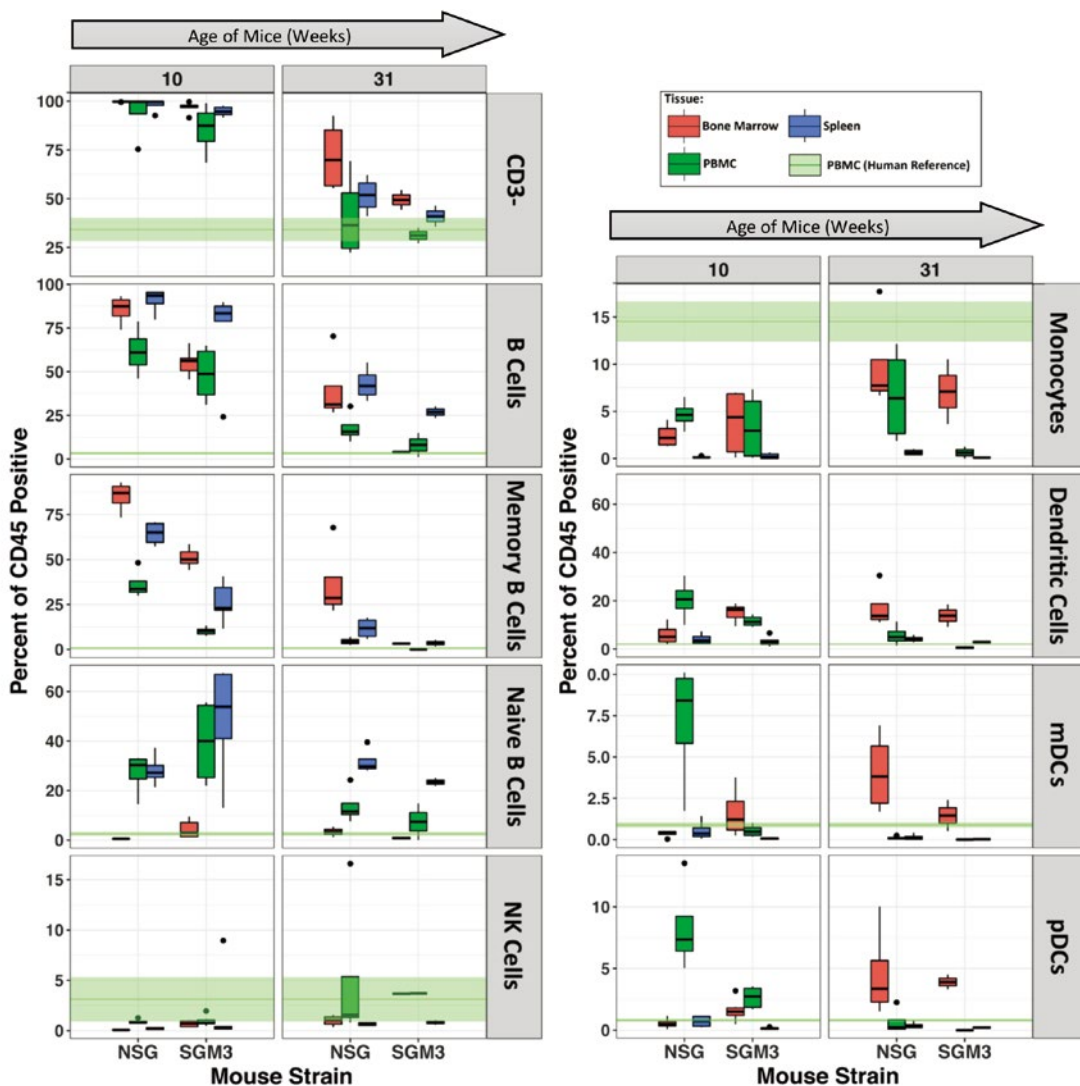


図 3 NK/DC/B 細胞集団の階層性およびゲーティングストラテジー

青字で示した細胞集団（上）はすべての組織、すべての週齢（10、16 ~ 17、23、および 31 週）について測定しました。細胞集団の階層性は BD Horizon GPS ツール（方法のセクションを参照）を用いて生成しました。各集団は、記載のゲーティングストラテジーに基づいて定義されました。記載のデータは 23 週齢 NSG™ マウスの脾臓から得られた代表的な一連の解析プロットです。このゲーティングストラテジーはパネルのすべてのマーカーを含んでいるわけではありません。いくつかのマーカーは腫瘍を移植したマウスとの比較実験に使用するような、活性化型特異的な表現型を同定するマーカーに分類されるためです。

NK/DC/B 細胞パネルで使用した試薬

Laser	Fluor	T-Cell Panel	Cat. No.	*Mouse Dump	
				Antibody	Cat. No.
488	FITC	*Mouse Dump	(at right)	mCD45	553079
	PerCP-Cy™5.5	CD3	560835	mH2Kd	553592
561	PE	CD19	555413	mTer119	561032
	PE-CF594	CD11c	562393	mCD31	558738
652	PE-Cy™7	NKp46	562101	mCD41	561849
	APC	CD16	561304	mCD71	553266
405	APC-H7	CD14	560180		
	AF700	CD45	560566		
355	BV421	IgD	562518		
	BV510	FVS Live/Dead	564406		
355	BV605	HLA-DR	562845		
	BV711	CD123	563161		
355	BV786	CD56	564058		
	BUV395	Hoescht 33342	561908		



骨髄パネル

組織サンプル（骨髄、脾臓、および末梢血）を14色パネルで染色しました（試薬リストは次のページの表を参照）。このパネルは骨髄サブセットを解析するためにデザインされました。下記のフローチャートは解析に用いられたゲーティングストラテジーを示しています（脾臓、23週齢 NSG™ マウス）。同定された集団の割合はボックスプロットで表示しました（次ページ、下部）。

各プロットを横切る緑色の帯は、健康成人ドナー（n = 6）において、同じパネルを用いて測定された末梢血中の各集団の範囲を示しています。計数された集団のすべてのプロットが示されているわけではありません。ほとんど変化が確認されなかったものや、参照値（緑色の帯）との一致が明らかなものは示しませんでした。中間の16～17週および23週の結果は示していません。

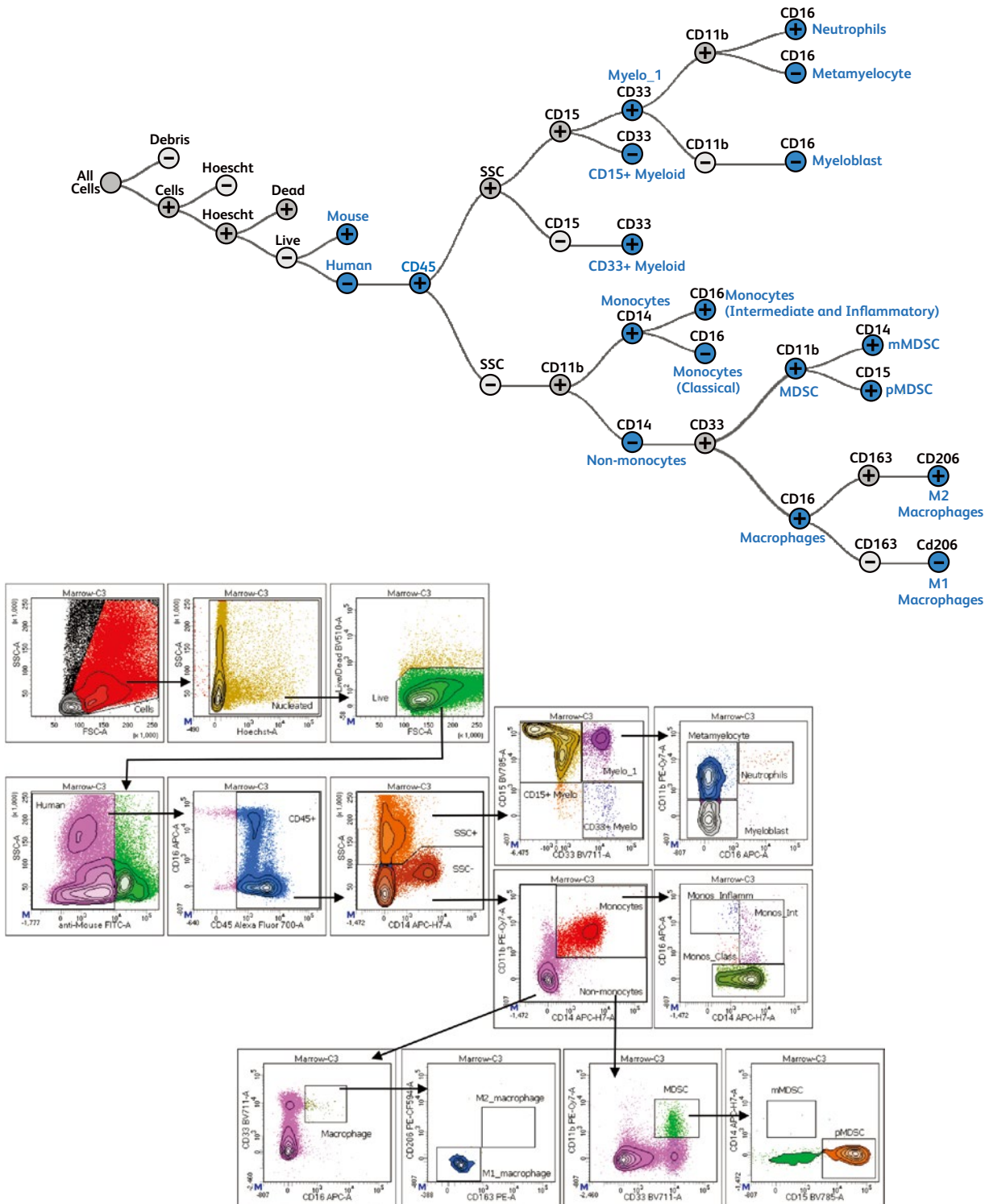
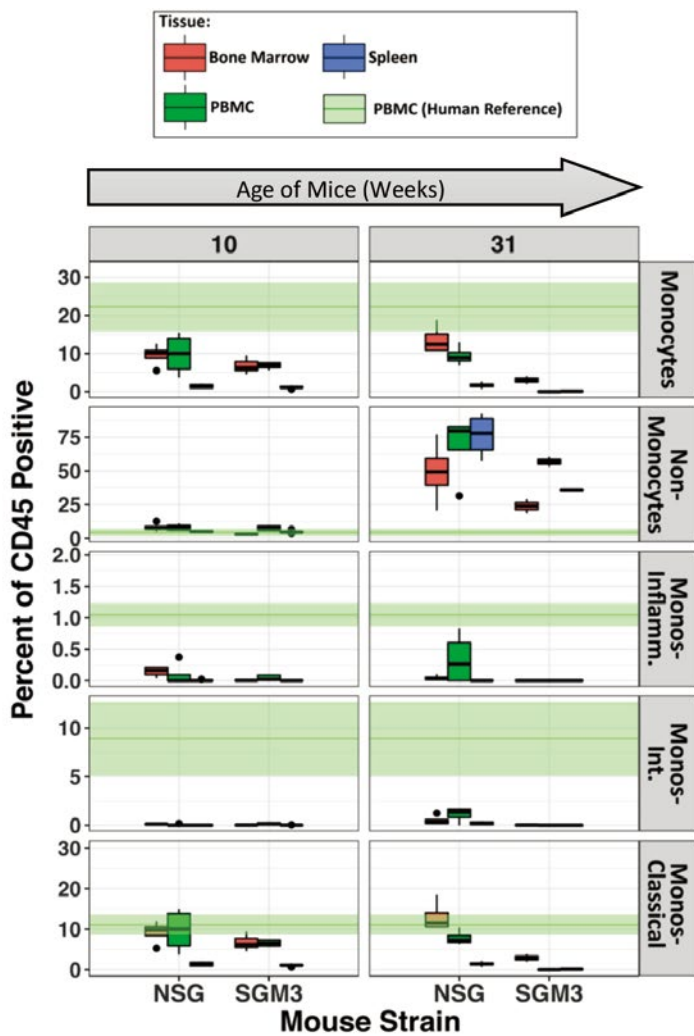
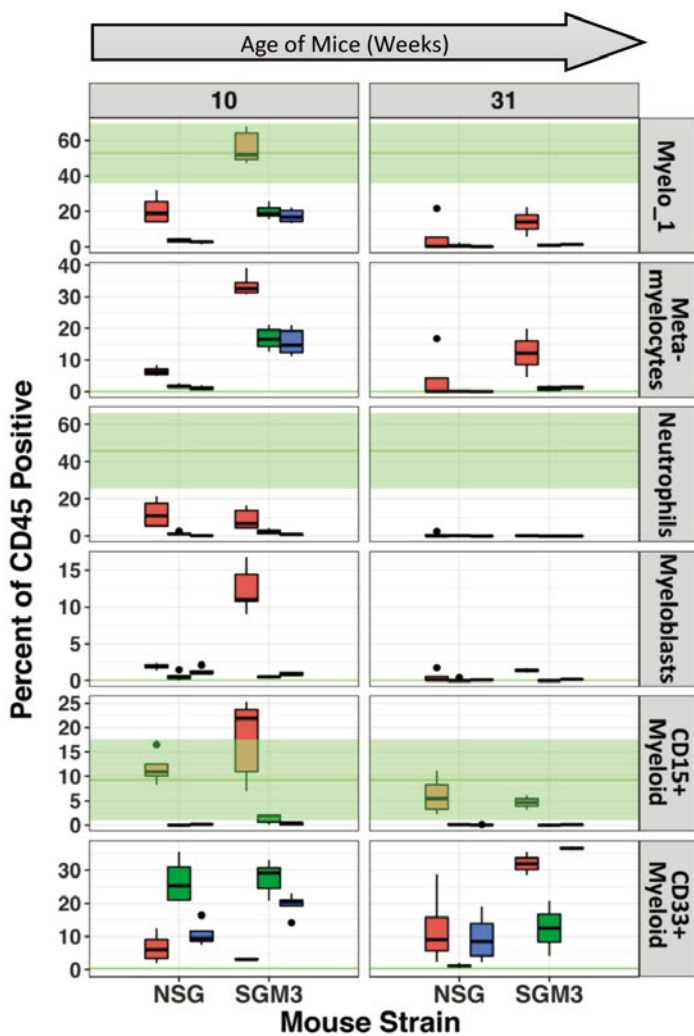


図4 ミエロイド系サブセットの階層性およびゲーティングストラテジー

青字で示した細胞集団（上）はすべての組織、すべての週齢（10、16～17、23、および31週）について測定しました。細胞集団の階層性はBD Horizon GPS ツール（方法のセクションを参照）を用いて生成しました。各集団は、記載のゲーティングストラテジーに基づいて定義されました。記載のデータは10週齢 NSG™ マウスの脾臓から得られた代表的な一連の解析プロットです。このゲーティングストラテジーはパネルのすべてのマーカーを含んでいるわけではありません。いくつかのマーカーは腫瘍を移植したマウスとの比較実験に使用するような、活性化型特異的な表現型を同定するマーカーに分類されるためです。

骨髓細胞パネルで使用した試薬

Laser	Fluor	T-Cell Panel	Cat. No.	*Mouse Dump	
				Antibody	Cat. No.
488	FITC	*Mouse Dump	(at right)	mCD45	553079
	PerCP-Cy™5.5	CD195	560635	mH2Kd	553592
561	PE	CD163	560933	mTer119	561032
	PE-CF594	CD206	564063	mCD31	558738
652	PE-Cy™7	CD11b	557743	mCD41	561849
	APC	CD16	561306	mCD71	553266
	APC-H7	CD14	560180		
	AF700	CD45	560566		
405	BV421	CD192	564067		
	BV510	FVS Live/Dead	564406		
	BV605	HLA-DR	562845		
	BV711	CD33	563171		
355	BUV395	Hoescht 33342	561908		



結論

NSG™ マウスモデルにおける 3 種類のヒト成長因子（SCF、GM-CSF、IL-3）の発現は、適切な異種移植モデルの開発における大きな進歩を示しています。BD の高度で柔軟性のあるフローサイトメトリーツールが、これらのマウスにおける免疫系の詳細かつ包括的な解析を後押しします。T 細胞、B 細胞、NK 細胞、および DC 細胞などほとんどの主要な免疫系細胞集団の割合を測定した結果、NSG™-SGM3 マウスは NSG™ マウスと比べて再構築の改善が確認されました。割合で見ると、骨髄系集団の顕著な欠乏（単球および好中球の出現頻度の低下がもっとも明白）は NSG™ と NSG™-SGM3 の両マウス系統で見られました。NSG™-SGM3 マウスでは、Treg の出現頻度が増加し（NSG™ マウスでは明白にはみられない）、メモリー T 細胞プールが増加す

ると同時にナイーブ T 細胞（CD4+ および CD8+）が減少することが確認されました。細胞の絶対数は測定しませんでした。NSG™-SGM3 由来サンプルでは全体として CD45+ 細胞の数が質的に増加していました。これらの知見から、測定した各対象細胞集団の細胞絶対数をさらに定量的に調べるメリットがあることは明らかです。NSG™-SGM3 マウスにおいて NSG™ マウスとの比較で確認された免疫再構築の全体的な改善は、この系統が PDX 腫瘍の宿主候補として有用であることを示しており、さらに腫瘍内微小環境内の免疫とがん細胞との間の複雑な相互作用を調べる研究者の研究能力を高め、がん治療に対する免疫療法アプローチのデザインとその確立の助けになるでしょう。

BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーター

製品構成一覧

			搭載レーザー数																		
			1	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	
			蛍光検出用 PMT 数																		
レーザー	蛍光色素	フィルター	4	6	8	7	8	11	14	10	11	10	13	14	17	13	16	15	18	15	18
488 nm	FITC	530 / 30	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	PE	575 / 26	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●						
	PE-Texas Red®	610 / 20			●	●	●	●	●	●	●		●	●	●						
	PE-Cy® 5	675 / 20																			
	PerCP-Cy® 5.5	695 / 40 or 710 / 50	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	PE-Cy® 7	760 / 60	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●					
640 nm	APC	660 / 20		●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Alexa Fluor® 700	730 / 45			●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	APC-H7	780 / 60		●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
405 nm	BD Horizon™ BV421	450 / 50						●	●					●	●	●	●	●	●	●	●
	BD Horizon™ BV510	525 / 50						●	●					●	●	●	●	●	●	●	●
	BD Horizon™ BV605	610 / 20						●	●					●	●	●	●	●	●	●	●
	BD Horizon™ BV650	670 / 30							●						●		●		●		●
	BD Horizon™ BV711	710 / 50							●						●		●		●		●
	BD Horizon™ BV786	780 / 60							●						●		●		●		●
561 nm	PE	586 / 15											●			●	●	●	●	●	●
	PE-Texas Red®	610 / 20											●			●	●	●	●	●	●
	PE-Cy® 5	670 / 30											●			●	●	●	●		
	PE-Cy® 5.5	710 / 50											●			●	●	●	●	●	●
	PE-Cy® 7	780 / 60											●			●	●	●	●	●	●
375 nm	Hoechst Blue	450 / 20				●				●			●					●	●		
	Hoechst Red	670LP				●				●			●					●	●		
355 nm	BD Horizon™ BUV395	378 / 28					●				●			●	●					●	●
	BD Horizon™ BUV496	515 / 30					●				●			●	●					●	●
	BD Horizon™ BUV737	740 / 35					●				●			●	●					●	●

注：Alexa Fluor® 488 は、FITC と同様 488 nm レーザーで励起し、530 / 30 nm フィルターで検出します。

Alexa Fluor® 647 は、APC と同様 640 nm レーザーで励起し、660 / 20 nm フィルターで検出します。APC-Cy® 7 は、APC-H7 と同様 640 nm レーザーで励起し、780 / 60 nm フィルターで検出します。

Pacific Blue™, BD Horizon™ V450 は、BD Horizon™ BV421 と同様 405 nm レーザーで励起し、450 / 50 nm フィルターで検出します。AmCyan, BD Horizon™ V500 は、BD Horizon™ BV510 と同様 405 nm レーザーで励起し、525 / 50 nm フィルターで検出します。

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)

bdbiosciences.com/jp/

各商標はそれぞれの所有者が所有します。

© 2018 BD. BD、BDロゴおよびその他の商標はBecton, Dickinson and Companyが所有します。

66-172-00

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

