

# BD FACSLyric™ フローサイトメーターを用いた 10色マルチカラー解析、 末梢血免疫細胞における 免疫チェックポイント受容体の発現

Aaron J. Middlebrook, Casey Fox, Peter Lllontop, Mamatha Bharadwaj, Dina Huckaby, and Smita Ghanekar BD Biosciences, San Jose, CA

## 要約

マルチカラーフローサイトメトリーの使用は、血液がんや固形がんの患者診断や治療経過観察の方法を変える可能性を秘めています。個々の細胞において同時測定できるパラメーター数の増加に伴い、臨床でのフローサイトメトリーアプリケーションの可能性や影響力は飛躍的に増大しています。このアプリケーションノートでは、10カラー BD FACSLyric™ フローサイトメーターのマルチパラメーター性能に焦点を当てます。BD FACSLyric™ システムと BD FACSuite™ ソフトウェアを使用し、健康なドナー由来の末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell：PBMC）における免疫チェックポイント受容体パネルの発現変化を解析しま

した。免疫チェックポイントマーカーの発現評価は、候補となる治療法の選択における情報または、免疫調節薬投与中の患者における治療効果のモニタリングに役立つ可能性があります。このアプリケーションノートでは、PBMCの ex vivo での刺激により、CD3<sup>+</sup> T 細胞と CD3<sup>-</sup> リンパ球の双方において免疫チェックポイント受容体の発現レベルが顕著に上昇したことを紹介します。発現レベルの変化は、刺激時間また刺激濃度に依存していました。BD FACSLyric™ フローサイトメーターはユーザーに有用な10カラー解析のデザインまた情報性の高い内容を含むデータの取得を可能にします。



BD FACSLyric™ フローサイトメーター  
製造販売届出番号 07B1X00003000161

# はじめに

臨床におけるフローサイトメトリーは、1980年代に初めてヒト免疫不全ウイルス感染患者を管理するために使用されました。<sup>1-4</sup> 以来、マルチカラー免疫プロファイリング研究の可能性と医療に与える影響は飛躍的に増大しています。

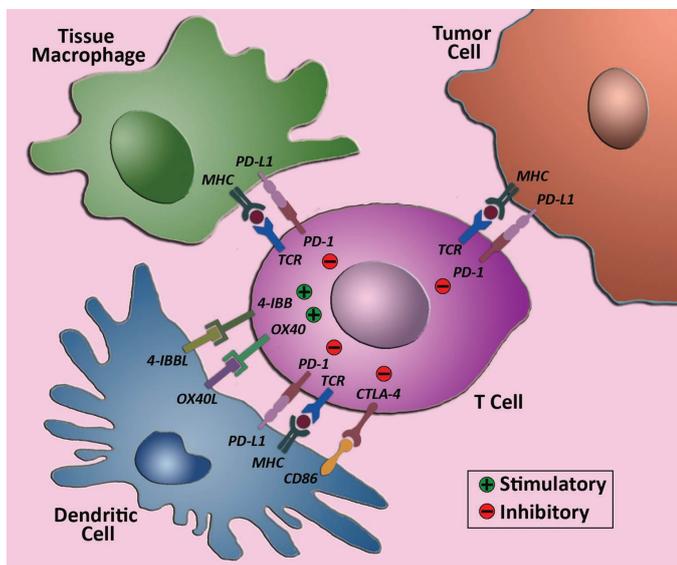
機器や蛍光色素の性能における重要な進歩、臨床アプリケーションの拡大、および最先端のコンピューターテクノロジーを駆使したデータ分析により、ユーザーは情報性の高い内容を含む患者データをルーチンで迅速に取得できるようになりました。<sup>5-7</sup> がん患者の診断や管理の手法として、マルチカラーフローサイトメトリーの使用は特に成功を収めています。例えば EuroFlow Consortium は、臨床的に妥当性が確認された標準化された 8 カラーの抗体パネルとして開発され、白血病やリンパ腫の患者の分類における診断補助として使用されています。<sup>8</sup>

また、マルチカラー試薬パネルは、急性骨髄性白血病や慢性リンパ性白血病の患者における微小残存病変の追跡にも役立つ可能性があります。<sup>9-11</sup>

がんの特徴として、免疫応答の回避があげられます。<sup>12</sup>

腫瘍細胞は複数のメカニズムを駆使し、腫瘍微小環境における発現抗原に対する T 細胞の応答を抑制することがあります。<sup>13, 14</sup> 例えば、腫瘍抗原による慢性的また持続的な刺激により、腫瘍組織に浸潤した活性化 CD8<sup>+</sup> T 細胞の表面には免疫抑制能を持つ PD-1 (programmed cell death 1, CD279) の発現が増加します。PD-1 のリガンドである PD-L1 (CD274) の腫瘍細胞での発現は、エフェクター T 細胞の活性を抑制し、それによって抗腫瘍免疫応答を減弱させます。<sup>15</sup>

PD-1 : PD-L1 相互作用の阻害療法は、メラノーマ患者において持続的な臨床反応と腫瘍退縮を誘発します。<sup>16-18</sup> PD-1 : PD-L1 相互作用以外にも多くの抑制または促進経路があり、免疫応答の状況における特定の T 細胞の活性化または逆の不活性化を総体的に決定しています。こうした経路のいくつかを図 1 に示します。



10 個またはそれ以上のパラメーターを個々の細胞において検出できる高性能なフローサイトメーターの登場は、がん免疫療法の推進に初期から貢献しました。例えば、メラノーマ患者検体のマルチカラー免疫プロファイリングでは、PD-1<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は抗 PD-1 療法の効果と相関し無増悪生存期間の継続が認められ、腫瘍への浸潤の頻度増加を示しました。<sup>14</sup> さらに別の研究では、抗 PD-1 療法を行ったメラノーマ患者では標的療法の患者に比べ、腫瘍生検標本中に CD8<sup>+</sup> T 細胞の頻度が増加していることが示されました。<sup>20</sup> こうした成功にもかかわらず、抗 PD-1 療法は少数の患者にしか反応しないようです。つまり、これらの研究が示唆することは、最適な免疫療法を選択する際また、免疫チェックポイント阻害剤に対する患者の臨床反応を予測する際に信頼性の高いバイオマーカーが必要でありながら、まだそのニーズは満たされていないということです。<sup>21</sup>

このアプリケーションノートでは、10 カラー BD 抗体パネルを用いた活性化末梢血 T 細胞における免疫チェックポイント受容体の特徴評価および定量法について説明します (図 1 参照)。健康なドナー由来の PBMC を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + ionomycin、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体 (CD3 + CD28)、または phytohemagglutinin (PHA) で刺激しました。データの取り込みと解析は、BD FACSuite™ ソフトウェアで行いました。免疫チェックポイント受容体の発現は培養時間や刺激の条件によって制御されることを示します。PHA や CD3 + CD28 刺激に比べ、PMA + ionomycin 刺激は免疫チェックポイント受容体の発現に最も顕著な変化を引き起こすことが観察されました。腫瘍浸潤における免疫チェックポイント受容体発現の 10 カラープロファイリングにより、治療法の選択に関する情報や、免疫調節薬による患者の治療効果のモニタリングに役立つ可能性を示します。

図 1 特定の T 細胞の相対的免疫応答性は、組織マクロファージ、抗原提示細胞 (樹状細胞など)、腫瘍細胞との細胞間相互作用を通じて生じる抑制性および刺激性シグナルの組み合わせによって決まります。

(図の出展 : Shin et al<sup>19</sup>)

# 方法

## 健常人ドナーの PBMC 刺激および細胞培養条件

96 ウェルプレート（リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、非刺激コントロール）、または抗 CD3  $\epsilon$  抗体（クローン UCHT1、BD Biosciences カタログ番号: 555329）の濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （低）、2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （中）、8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （高）にて各ウェルを 250  $\mu\text{L}$  使用し、コーティングした。コーティングしたプレートを 37°C、5% CO<sub>2</sub> で 2 時間インキュベートし、4°C で一晩冷却した。翌日、すべてのウェルを PBS で 2 回リンスした。健常人ドナー由来の新鮮な PBMC は、BD バキュティナ® CPT™ 単核球分離用採血管を用いて分離した。3 人のドナーから採取した PBMC は 10% FCS を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) にプールされ、非刺激コントロールまたは CD3 でコーティングされたウェルに、各ウェルにつき 3  $\times$  10<sup>5</sup> cells/250  $\mu\text{L}$  で播種した。PBMC の播種後、抗 CD3 抗体を含むウェルには 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗 CD28 抗体を添加した。対照群の PBMC のウェルでは、PBS に PHA の濃度を 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （低）、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （中）、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （高）加えたもの、または PBS + 500 ng/mL ionomycin に PMA の濃度を 5 ng/mL（低）、50 ng/mL（中）、500 ng/mL（高）加えたものでインキュベートした。インキュベートは 37°C、5% CO<sub>2</sub> で 12 時間または 24 時間培養。実験条件、ウェルはトリプレットで調製し、3 ウェルから得られた細胞をプールし、染色を行った。

## BD FACSLytic™ を用いたデータの取得と解析

インキュベーション後、プレートのトリプレットウェルの細胞を 12  $\times$  75 mm、5 mL チューブにプールし、各培養条件の細胞を 1 本の染色用チューブに集めた。これを遠心（300 g で 7 分）して細胞をペレットにし、PBS で 2 回洗浄した。次に、洗浄した細胞を表 1 の 10 カラー抗体パネルで染色した。染色は室温、低光量の条件下で 30 分間、BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer（BD Biosciences カタログ番号: 659611）でインキュベートした。染色後、PBMC を PBS で 2 回洗浄し、300 g で 7 分間遠心した。細胞ペレットを染色バッファーに懸濁し、10 カラー BD FACSLytic™ フローサイトメーター（4-3-3 コンフィグレーション）を使用して測定した。機器設定では lyse/wash を調整して使用した。データの取得と解析は BD FACSuite™ ソフトウェアで行った。

# 結果

活性化 T 細胞において発現する免疫チェックポイント受容体に対し、10 種の特異的な蛍光色素標識抗体（すべて BD Biosciences 製品）を使用しパネルをデザインした。表 1 に示すように、パネルには次のものが含まれています：白血球受容体 CD45、T 細胞コレセプター CD3、主要組織適合遺伝子複合体クラス II 受容体 HLA-DR、共刺激受容体 CD28、および免疫チェックポイント受容体 CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen : CD152)、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、PD-1 (CD279)、B7-2 (CD86)、PD-L1 (CD274)。

	標的抗原	別名	クローン	蛍光色素	BD カタログ番号
1	CD45	PTPRC	2D1	APC-H7	560178
2	CD3	n/a	SK7	PerCP-Cy™5.5	340949
3	HLA-DR	n/a	G46-6	BD Horizon™ BV510	563083
4	CD28	n/a	CD28.2	PE-Cy™7	560684
5	CD134	OX40	ACT35	PE	555838
6	CD137	4-1BB	4B4-1	APC	550890
7	CD274	PD-L1	M1H1	FITC	558065
8	CD86	B7-2	2331	Alexa Fluor® 700	561124
9	CD152	CTLA-4	BNI3	BD Horizon™ BV421	562743
10	CD279	PD-1	EH12.1	BD Horizon™ BV605	563245

表 1 活性化 T 細胞における免疫チェックポイント受容体の特徴評価および定量法の 10 カラー抗体パネル。

エフェクター T 細胞の機能は、複数ある受容体のライゲーシオンにより誘起されるシグナル経路によって制御されています。これらのシグナルは促進または抑制のどちらかの作用を有します。例えば、CD134/OX40 や CD137/4-1BB のライゲーシオンは T 細胞の増殖、生存、機能活性を促進します（**図 2 参照**）。逆に、CTLA-4/CD152 や PD-1/CD279 のライゲーシオンはアポトーシス、アネルギー、機能疲弊を促し、活性化 T 細胞のエフェクター機能を低下させます。つまり、こうした複雑性から、活性化した T 細胞で発現する多様な免疫チェックポイント受容体パネル（アゴニスト、アンタゴニストの両方）を選択することで、免疫チェックポイント阻害剤に対する患者応答を予測するバイオマーカーを特定できる可能性があります。

**図 3** には 10 カラーの免疫チェックポイント受容体パネルのゲーティングストラテジーを示します。簡潔に、CD45<sup>+</sup> リンパ球を CD3<sup>+</sup> の T 細胞（オレンジ色のゲート）と CD3<sup>-</sup> の細胞（青色のゲート）に分けます。次に CD134、CD137、PD-L1/CD274、HLA-DR、CD86、CD152、PD-1/CD279 の発現を両細胞集団において定量します。

**図 3** に示すように、PMA + ionomycin で刺激したリンパ球では非刺激コントロールに比べ、CD134、CD137、PD-L1/CD274、HLA-DR、CD86、CD152、PD-1/CD279 の発現が増加することが分かり、このデータは公表されている結果とも一致しています。<sup>32</sup> 例えば、CD3<sup>+</sup> リンパ球（オレンジ色のゲート）では、中濃度の PMA（50 ng/mL）+ ionomycin 刺激により CD134 の発現が増加（41.8% 陽性）しますが、これは低濃度刺激の PMA（5 ng/mL）+ ionomycin または非刺激コントロールの条件と比較しより高い数値（それぞれ 20.3% および 0.6% 陽性）となっています。これに比べ、活性化により誘起される CD134 の発現増加は CD3<sup>-</sup>（青色のゲート）では抑えられています（中濃度 PMA 刺激では 9.9% 陽性、低濃度 PMA 刺激では 1.9%、非刺激コントロールでは 0.7%）。同様に、PD-L1/CD274 の発現は CD3<sup>+</sup> T 細胞では顕著に増加していますが（中濃度 PMA 刺激では 43.7% 陽性、低濃度 PMA 刺激では 20.2% 陽性、非刺激コントロールでは 2.6% 陽性）、CD3<sup>-</sup> リンパ球ではそれほど増加していません（中濃度 PMA 刺激では 24.5%、低濃度 PMA 刺激では 16.6%、非刺激コントロールでは 16.5%）。最後に、活性化により誘起された CD137 の発現は CD3<sup>+</sup> T 細胞と CD3<sup>-</sup> リンパ球とでは似たパターンを示した（高濃度 PMA 刺激でそれぞれ 73.9%、77.8%）。CD28 の発現には変化がありませんでした（データは記載せず）。

#### OX40/CD134

T 細胞共刺激受容体 CD134 のライゲーシオンは、T 細胞の増殖、生存、機能活性を促進することで、活性化後の T 細胞応答を向上させることが示されています。<sup>22</sup> アゴニストの抗 CD134 抗体は患者の抗腫瘍免疫応答を促進する可能性があります。<sup>23</sup> CD134 は活性化 T 細胞や活性化好中球で発現します。<sup>24</sup>

#### 4-1BB/CD137

共刺激受容体 CD137 のライゲーシオンは T 細胞の増殖、サイトカイン産生、サイトカイン活性、生存を増進します。<sup>25</sup> CD137 は活性化 T 細胞、樹状細胞、NK 細胞、顆粒球に発現します。4-1BB アゴニストは患者の抗腫瘍免疫応答を促進する可能性があります。<sup>26</sup>

#### PD-L1/CD274

PD-L1/CD274 は活性化 T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞に発現します。CD274 のライゲーシオンは活性化 T 細胞の増殖を抑制し、エフェクターサイトカインの産生を減少します。<sup>27</sup>

#### HLA-DR

HLA-DR は MHC クラス II の細胞表面受容体で、単球、B 細胞、樹状細胞、活性 T 細胞に発現します。HLA-DR の主な機能はペプチド抗原を T 細胞に提示します。<sup>28</sup>

#### B7-2/CD86

共刺激受容体 CD86 は抗原提示細胞や活性化 T 細胞に発現します。<sup>29</sup> CD86 は CD28 と CTLA-4 のリガンドで、この 2 つの受容体はそれぞれ、休止 T 細胞と活性化 T 細胞で発現します。<sup>31</sup>

#### CTLA-4/CD152

CD152 は活性化 T 細胞で発現し、T 細胞活性の負の調節因子として機能します。<sup>31</sup> また CTLA-4 は NK 細胞や顆粒球においても発現します。<sup>30</sup> CTLA-4 のライゲーシオンを阻害するモノクローナル抗体は、メラノーマや肺がんの治療に使用されています。<sup>31</sup>

#### PD-1/CD279

CD279 はアポトーシス、アネルギー、機能疲弊を促進することで T 細胞の活性化を抑制します。<sup>27</sup> PD-1 は活性化 T 細胞、B 細胞、単球の細胞表面に発現します。

図 2 活性化 T 細胞で発現する免疫チェックポイント受容体

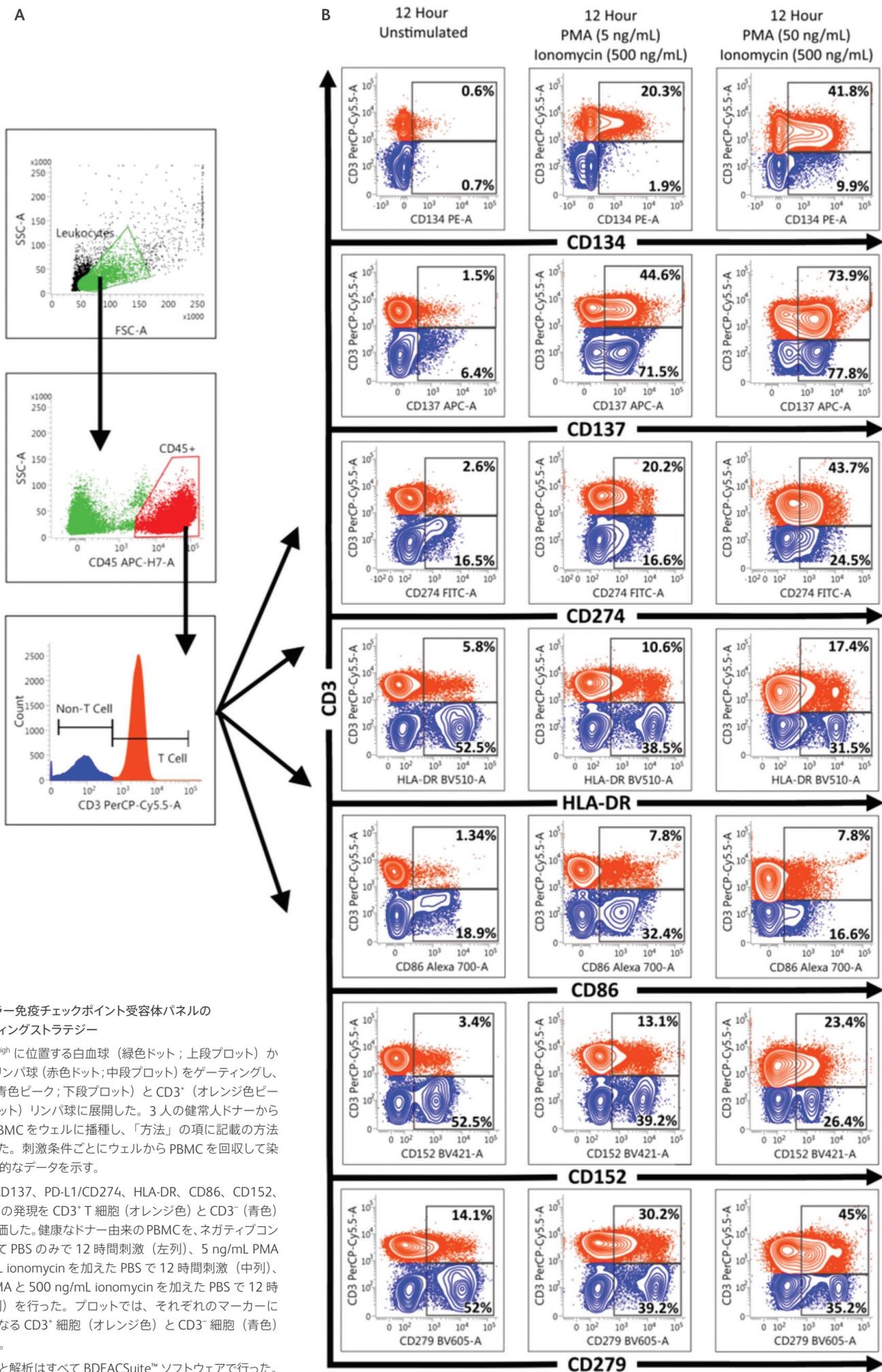


図3 10カラー免疫チェックポイント受容体パネルのゲーティングストラテジー

A. SSC<sup>low</sup>FSC<sup>high</sup>に位置する白血球（緑色ドット；上段プロット）からCD45<sup>+</sup>のリンパ球（赤色ドット；中段プロット）をゲーティングし、次にCD3<sup>-</sup>（青色ピーク；下段プロット）とCD3<sup>+</sup>（オレンジ色ピーク；下段プロット）リンパ球に展開した。3人の健康人ドナーからブールしたPBMCをウェルに播種し、「方法」の項に記載の方法で刺激しました。刺激条件ごとにウェルからPBMCを回収して染色した。代表的なデータを示す。

B. CD134、CD137、PD-L1/CD274、HLA-DR、CD86、CD152、PD-1/CD279の発現をCD3<sup>+</sup>T細胞（オレンジ色）とCD3<sup>-</sup>（青色）リンパ球で評価した。健康なドナー由来のPBMCを、ネガティブコントロールとしてPBSのみで12時間刺激（左列）、5 ng/mL PMAと500 ng/mL ionomycinを加えたPBSで12時間刺激（中列）、50 ng/mL PMAと500 ng/mL ionomycinを加えたPBSで12時間刺激（右列）を行った。プロットでは、それぞれのマーカーに対して陽性となるCD3<sup>+</sup>細胞（オレンジ色）とCD3<sup>-</sup>細胞（青色）の割合を示す。

データの取得と解析はすべてBDFACSuite™ソフトウェアで行った。

PMA (中濃度 50 ng/mL) + ionomycin 刺激により CD3<sup>+</sup> T 細胞では、CD134、CD137、PD-L1/CD274、HLA-DR、CD152、PD-1/CD279 の顕著な発現増加を引き起こすことが認められたが、CD86 では認められなかった。次に、BD FACSLyric™ を使用した 10 色マルチカラー解析を発展し、刺激条件をさらに追加した。図 4 に示すように、健康ドナー由来の PBMC を PBS のみ (未処理のコントロール (UNT))、および次の 3 種類の刺激条件で培養した：抗 CD3 + 抗 CD28 抗体 (CD3 + CD28、青線)、PHA (赤線)、PMA + ionomycin (緑線)。3 種の活性化刺激はそれぞれ、刺激濃度を変えて実施し (低、中、高)、PBMC を 12 時間または 24 時間刺激した。

結果、CD3<sup>+</sup> T 細胞における CD134、PD-L1/CD274、CD152、PD-1/CD279 の発現増加は 12 時間の PMA + ionomycin による活性と PHA による活性では同様の結果を得た。逆に、PMA + ionomycin では PHA の刺激に比べ、12 時間の低濃度と中濃度の刺激で CD137 の発現が顕著に増加した。

最後に、CD3<sup>+</sup> T 細胞は中濃度 (50 ng/mL) の PMA + ionomycin で 24 時間刺激した際に、HLA-DR、CD86、CD152、PD-1/CD279 の陽性率が最も高くなることが観察された。測定したほとんどの受容体において、CD3 + CD28 刺激による発現増加率は、PMA + ionomycin や PHA による刺激に比べて低かった。

CD134

CD137

PD-L1/CD274

HLA-DR

CD86

CD152

PD-1/CD279

## CD3<sup>+</sup> T Cells

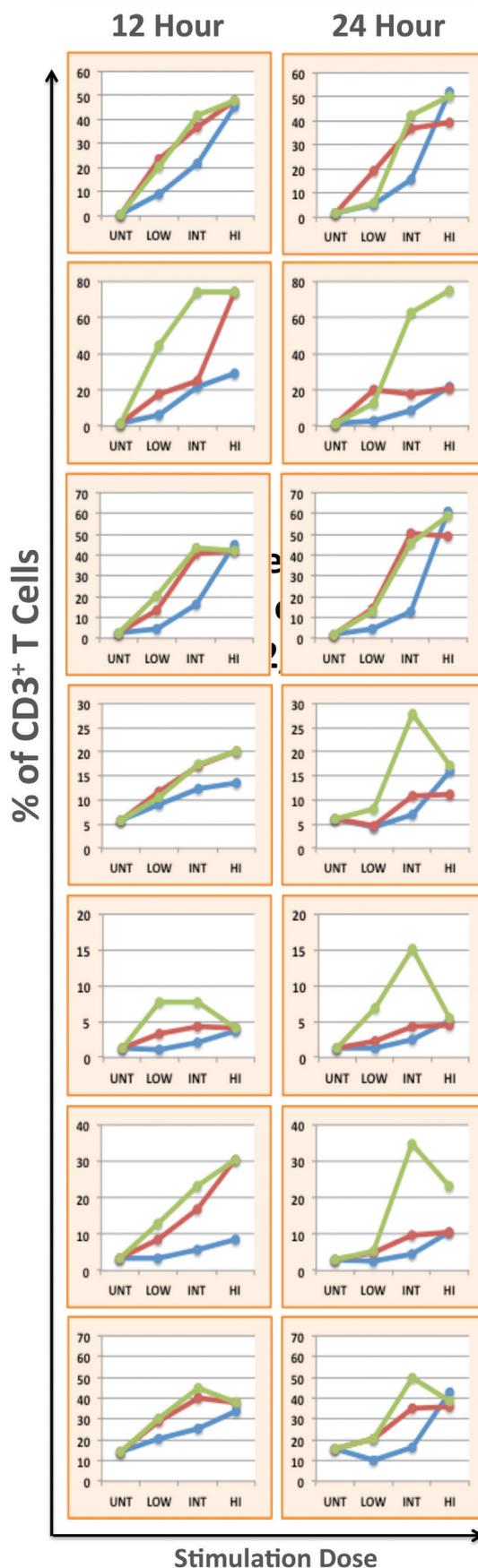
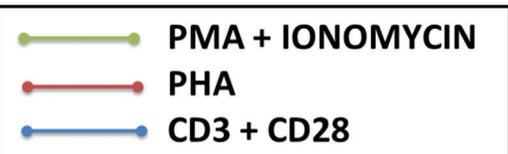


図 4 長時間刺激によるチェックポイントマーカー発現

健康なドナー由来の PBMC を抗 CD3 抗体でコーティングした 96 ウェルプレートで刺激培養した。抗体濃度は三段階、0.5 μg/mL (低)、2.0 μg/mL (中)、8.0 μg/mL (高)。抗 CD28 抗体は濃度 2 μg/mL で添加した。また、PBMC の PHA による刺激培養を行った。PHA 濃度も三段階、1 μg/mL (低)、3 μg/mL (中)、5 μg/mL (高)。さらに、PMA による PBMC 刺激培養も行った。三段階の PMA 濃度 5 ng/mL (低)、50 ng/mL (中)、500 ng/mL (高)、500 ng/mL ionomycin 含む。刺激を与えない PBMC (UNT) をコントロールとして使用した。CD3<sup>+</sup> T 細胞の結果を示す。



# 結論

免疫チェックポイント療法は、腫瘍微小環境にある細胞を標的とする T 細胞の活性抑制能を有する受容体経路を阻害します。免疫組織染色とは異なり、マルチカラーによる免疫プロファイリングでは表現型と機能の両方を調べることができるため、T 細胞活性状態のより詳細な特性評価が可能です。抗 PD-1 や抗 CTLA-4 の単独療法は治療患者のごく一部にしか効果がないと思われることから、患者選択に関する情報や治療効果のモニタリングに役立つ、信頼性の高い予測バイオマーカーを特定する必要があります。BD FACSLyric™ と BD FACSuite™ ソフトウェアを組み合わせることで、有用な 10 色マルチカラー解析を行い情報性の高い内容を含む有意義なデータを取得できることが、本研究のデータで示されています。また、本研究で示した結果から、免疫チェックポイント阻害薬の開発におけるさまざまな治療法の有効性を測定するための有用な手段が得られる可能性があります。

## References

1. Fahey JL, Prince H, Weaver M, et al. Quantitative changes in T helper or T suppressor/cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immune deficiency syndrome from other immune subset disorders. *Am J Med.* 1984 ; 76:95-100.
2. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett.* 1990 ; 10:55-61.
3. Landay A, Ohlsson-Willhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS.* 1990 ; 4:479-497.
4. Sabin CA, Mocroft A, Phillips AN. The use of CD4 counts as prognostic markers in HIV infection. *AIDS.* 1995 ; 9:1205-1206.
5. Perfetto SP, Chattopadhyay KP, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004 ; 4:648.
6. Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 ; 130:680-690.
7. Saeys Y, Gassen SV, Lambrecht BN. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol.* 2016 ; 16:449-462.
8. van Dongen JJ, Orfao A. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia.* 2012 ; 26:1899-1907.
9. Sartor MM, Gottlieb DJ. A single tube 10-color flow cytometry assay optimizes detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 ; 84:96-103.
10. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time" ? *Blood.* 2014 ; 124:3345-3355.
11. Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplant.* 2014 ; 49:1129-1138.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 ; 144:646-674.
13. Park J, Kwon M, Shin EC. Immune checkpoint inhibitors for cancer treatment. *Arch Pharm Res.* 2016 ; 39:1577-1587.
14. Daud AI, Loo K, Pauli ML, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J Clin Invest.* 2016 ; 126:3447-3452.
15. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 2015 ; 36:265-276.
16. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011 ; 364:2517-2526.
17. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013 ; 369:134-144.
18. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013 ; 369:122-133.
19. Shin DS and Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: What' s here, what' s next?. *Current Opinion in Immunology.* 2015 ; 33:23-35.
20. Cooper ZA, Reuben A, Spencer CN, et al. Distinct clinical patterns and immune infiltrates are observed at time of progression on targeted therapy versus immune checkpoint blockade for melanoma. *Oncoimmunology.* 2016 ; 5:e1136044.
21. Yuan J et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2016 ; 19:3.
22. Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Crit Rev Immunol.* 2009 ; 29:187-201. Review. PMID: 19538134
23. Lynch SN, McNamara MJ, Redmond WL. OX40 agonists and combination immunotherapy: putting the pedal to the metal. *Front Oncol.* 2015 ; 5:34.
24. Baumann R, Yousefi S, Simon D, Russmann S, Mueller C, Simon HU. Functional expression of CD134 by neutrophils. *Eur J Immunol.* 2004 ; 34:2268-75. PMID: 15259024.
25. Sica G, Chen L. Biochemical and immunological characteristics of 4-1BB (CD137) receptor and ligand and potential applications in cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* . 2000 ; 47:275-279. PMID 10604232.
26. Bartkowiak T, Curran MA. 41-BB agonists: multi-potent potentiators of anti-tumor immunity. *Front Oncol.* 2015 ; 5:117.
27. Shi L, Chen S, Yang L, Li Y. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2013 ; 6:74. PMID: 24283718.
28. Stern LJ, Calvo-Calle JM. HLA-DR: molecular insights and vaccine design. *Curr Pharm Des.* 2009 ; 15:3249-3261. PMID: 19860674.
29. Paine A, Kirchner H, Immenschuh S, Oelke M, Blasczyk R, Eiz-Vesper BJ. IL-2 upregulates CD86 expression on human CD4 (+) and CD8 (+) T cells. *Immunol.* 2012 ; 188:1620-1629. PMID: 22246628.
30. Pistillo MP, Tazzari PL, Palmisano GL, et al. CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. *Blood.* 2003 ; 101:202-209. PMID: 12393538.
31. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities differences and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016 ; 39:98-106.
32. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2021 ; 12:252-264.

製造販売元

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

〒960-2152 福島県福島市土船字五反田1番地

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/](http://bdbiosciences.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](mailto:tech_cell@bd.com)

機器のトラブルに関するサポート

☎ 0120-7099-12



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。

66-174-00