

フローサイトメトリーにおける ヒト B 細胞の多次元解析

BD FACSCelesta™ フローサイトメーターと FlowJo™ 解析用ソフトウェアを
組み合わせた、B 細胞のより詳細な解析方法の紹介です。

概要

- 12 カラーパネルを用いた 7 種を超える B 細胞サブセットの解析
- 各種組織における各 B 細胞集団の多次元解析
- FlowJo™ 解析用ソフトウェア v10 の t-SNE 解析機能によるロバストなデータ解析

B 細胞の発生は、胎児期には肝臓、生後には骨髄で始まり、その後は末梢リンパ系器官で抗原に遭遇し継続する段階的なプロセスです。B 細胞の分化の各段階は、B 細胞の分化の期間全体を通して調節されている、さまざまな細胞表面マーカーの発現および発現レベルを解析することによって同定できます。

マルチカラーフローサイトメトリーは、細胞が発生するとき、分化するとき、および免疫不全、自己免疫異常、悪性腫瘍などの病的な状態にあるときの B 細胞マーカーの判定を容易にすることで、B 細胞の生物学的特性における重要な発見をもたらす強力なツールです。



BD FACSCelesta™ フローサイトメーター



はじめに

本アプリケーションノートでは、ヒトの末梢血および骨髄に存在する主要な B 細胞サブセットを解析するためのフローサイトメーターを用いた 12 カラーパネルを紹介します。12 カラーパネルは、形質細胞 (plasma cell) に発現する CD138 などの各サブセット特異的なマーカーや恒常的に発現しているマーカー (CD38 や CD24) で構成されています。(図 1A)。このパネルは、未成熟 / 移行サブセット (T1、T2、T3)、ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞サブセット、形質芽球 (plasmablasts)、形質細胞を分類するためにデザインしたものです。ATP-binding cassette B1

(ABCB1) transporter を特異的に発現しているナイーブ B 細胞サブセットは、ミトコンドリア染色を行う MitoTracker™ Green FM (ThermoFisher) を用いて解析を行いました。また、CD3 および 7-AAD をパネルに加えることにより、CD19 陽性の生きている B 細胞をより厳密にゲーティング出来ます。BD FACSCelesta™ フローサイトメーターにおいて最大で 6 種類の BD Horizon Brilliant™ Violet 色素、2 種類の BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 色素、その他の 4 種類の色素を用いて、主要な B 細胞集団を最適に分離することができました (図 1B および 1C)。

図 1A

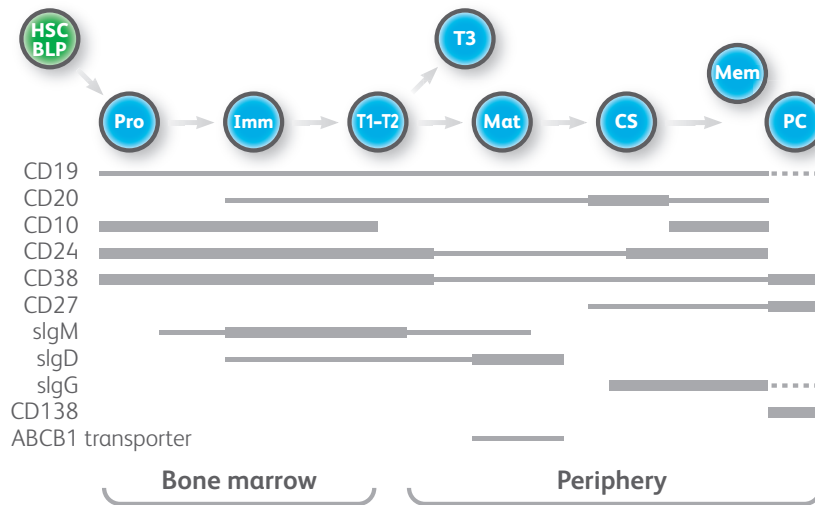


図 1B

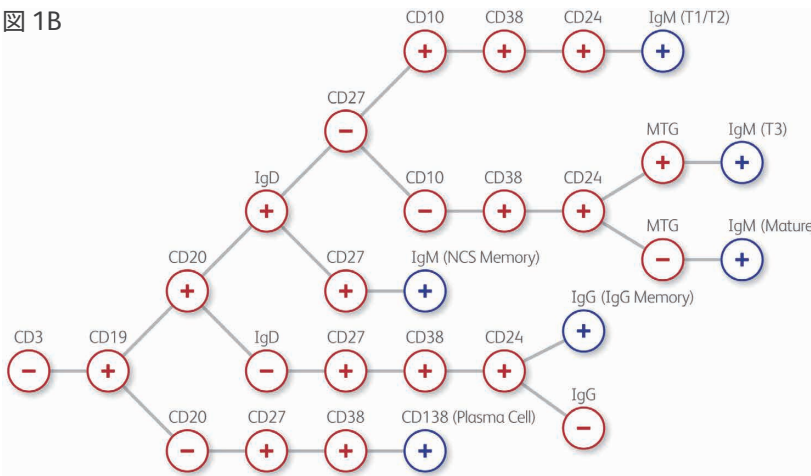


図 1C

Laser (nm)	Fluorochrome	B-Cell Panel
355 Ultraviolet	BUV737	CD138
	BUV395	IgM
	BV786	CD20
405 Violet	BV711	CD10
	BV650	IgG
	BV605	CD27
	BV480	IgD
488 Blue	BV421	CD38
	PE-Cy™7	CD19
	PerCP-Cy™5.5	CD3 & 7-AAD
	PE	CD24
	MTG*	MTG

※MitoTracker™ Green FM

図 1. ヒトの B 細胞サブセット解析用 12 カラーパネルデザイン

A. 12 カラーパネルで検出される細胞表面マーカーの発現プロファイルを表す各種 B 細胞サブセット。発生から分化・成熟過程における表面抗原発現を示しており、線の太さは発現強度を表し、点線の期間は発現が消失することを表します。B 細胞の成熟および分化の経路には、造血幹細胞および B 系統前駆細胞 (HSC/BLP)、B 細胞前駆細胞 (Pro)、未成熟 (Imm)、移行 (T1、T2、T3)、成熟 (Mat)、クラススイッチ (CS)、メモリー (Mem) の各 B 細胞、および形質細胞 (PC) が存在します。

B. BD Horizon™ Guided Panel Solution (GPS) で作成した B 細胞集団の階層構造を表す概略図。非クラススイッチ (NCS) メモリーを含む主要な B 細胞集団は青色で示しています。

C. Blue、Violet、Ultraviolet レーザー搭載の BD FACSCelesta™ フローサイトメーターによる B 細胞解析用パネル。

実験データは、等高線プロットでの B 細胞集団の解析に加え、FlowJo™ 解析用ソフトウェアに含まれる Plug In 機能 (高次元データ解析) を用いて解析しました。

図 2 では、末梢血単核球 (PBMC) および骨髄単核球 (BMMC) の B 細胞集団の比較に用いたゲーティング手法を示します。まず、生存 B 細胞を、7-AAD⁻ CD3⁻ CD19⁺ 細胞として同定しました。次に、CD19⁺ 集団内で CD38 と CD10 の発現を解析す

ることにより、3 種類の主な B 細胞サブセット、CD38^{high}CD10⁻、CD38^{high}CD10^{high}、および CD38^{low}CD10⁻ の存在が明らかになりました。CD38^{high}CD10^{high} 細胞は、未成熟 B 細胞および B 細胞前駆細胞に相当し、その割合は PBMC に比べて BMMC で高くなっていました。PBMC で認められた CD38^{high}CD10^{high} 細胞の割合はごくわずかで、骨髄を出たばかりの移行細胞に相当すると考えられます。

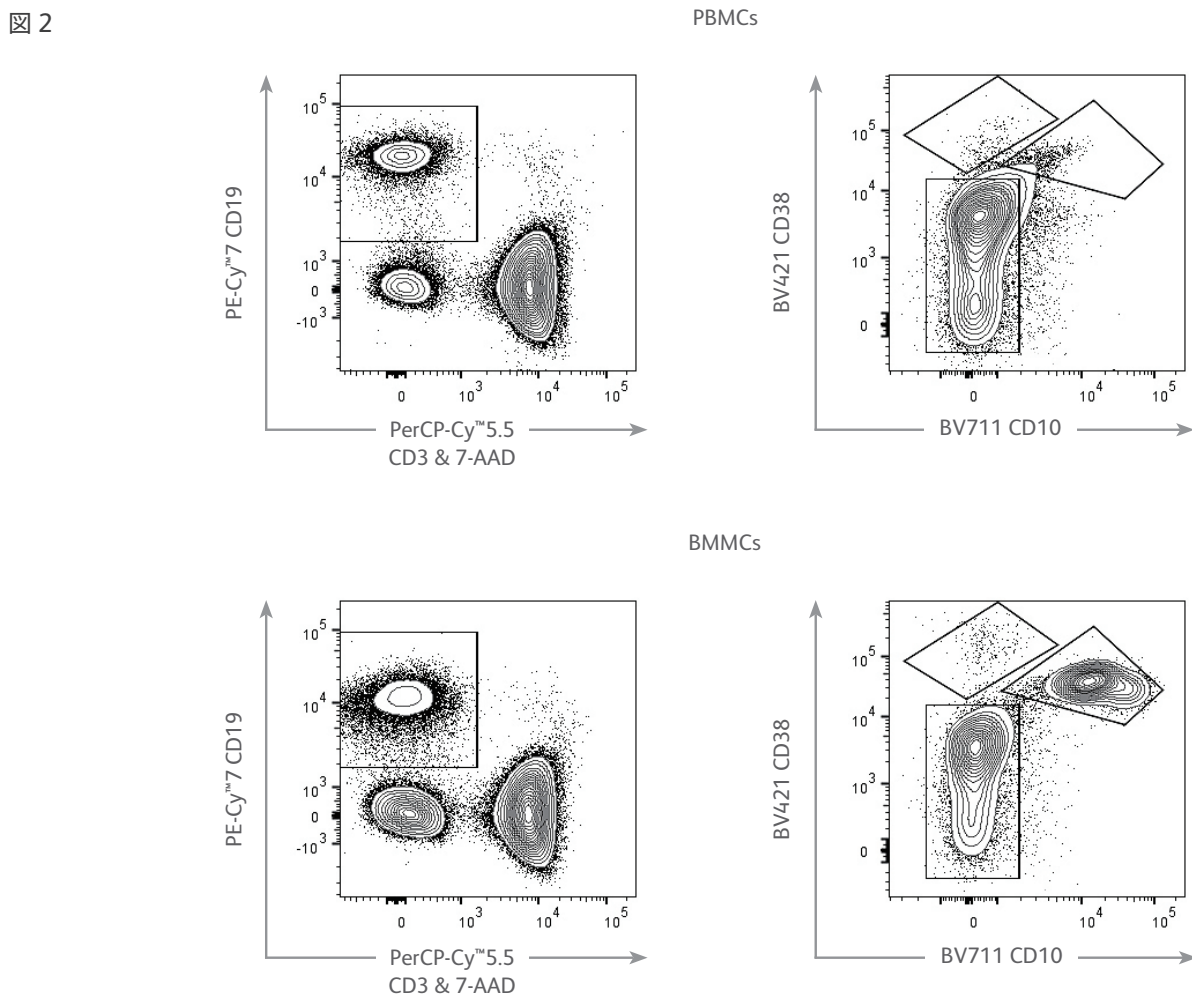


図 2. 12 カラーパネルによるヒトの末梢血および骨髄の B 細胞サブセット解析

PBMC または凍結 BMMC は、MitoTracker Green による前標識を 30 分行ってから、培地で 30 分間培養しました。洗浄後に、BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer Plus を用いて抗ヒト抗体の CD3、CD19、CD10、CD20、CD24、CD27、CD38、CD138、IgM、IgD、IgG を用いて細胞染色を行いました。BD FACSCelesta™ フローサイトメーターによる測定前に、細胞を洗浄し、細胞の生存能を判定するために BD Pharmingen™ 7-AAD 含有溶液に再懸濁しました。上の図は、末梢血および骨髄の単核球の比較解析です。ゲーティング後の生存 CD19⁺ B 細胞での CD38 および CD10 の発現に基づき、3 種類の主な B 細胞サブセット、CD38^{high}CD10⁻、CD38^{high}CD10^{high}、CD38^{low}CD10⁻ が同定されました。パネルを構成するこれ以外の表現型マーカーは、両組織の B 細胞サブセットすべての包括的な解析に使用しました。この結果は図 3 および 4 に示します。

これらのパネルによって同定された各 B 細胞サブセットを包括的に解析するため、FlowJo™ 解析用ソフトウェアの t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) を実施しました。これにより、B 細胞集団を自動的に同定し、異なるドナーの骨髄細胞と PBMC の比較を簡単に行うことができました。細胞解析では、2 人のドナーから得られた CD19⁺ B 細胞のデータを Down

Sample 機能で同イベント数に揃えました。さらに、Down Sample 後のデータを concatenate 機能で一つのファイルに結合し、t-SNE で解析しました。Down Sample は、t-SNE でこのバージョンのデータ削減アルゴリズムを使う場合の解析時間を短縮するために必要です。

t-SNE では、PBMC において、成熟、クラススイッチメモリー、非クラススイッチメモリー、移行、形質芽球の 5 種類の主な B 細胞集団が同定されました。また、小集団のサブセットである IgG⁺ クラススイッチメモリー細胞と希少な CD138⁺ 形質細胞集団も検出されました。移行細胞サブセットの T1-T2 および T3 は、MTG、CD24、CD38、CD10 の発現の差異によって識別できま

した (図 3A)。同じように、BMMC にも、成熟 B 細胞、CD27⁺ メモリー B 細胞サブセット、形質芽球のクラスターが認められました。一方、PBMC と異なり、骨髄では CD10 を発現している大集団の B 細胞クラスターが検出され、さらに CD10^{bright} および CD10^{dim} B 細胞に分けることができました (図 3B)。

図 3A

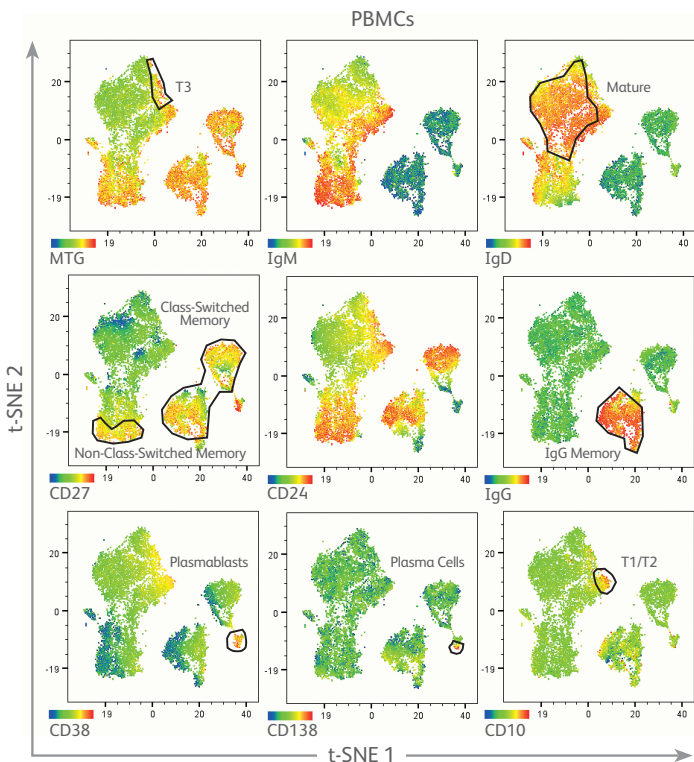


図 3B

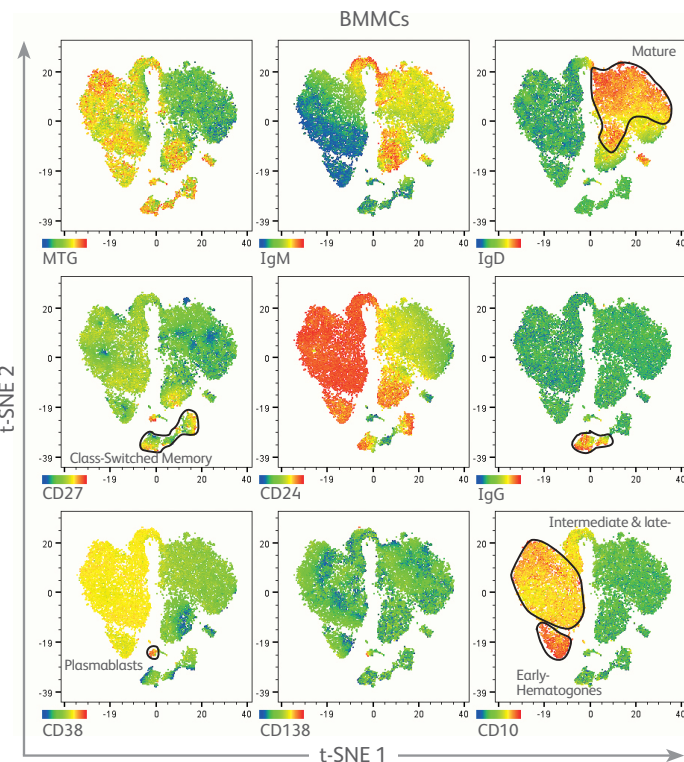


図 3C

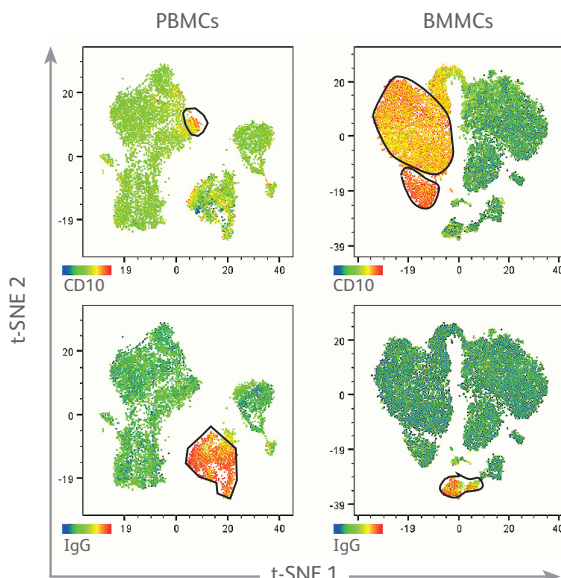


図 3. ヒト B 細胞サブセットの高次元フローサイトメトリー解析

図 2 で染色した PBMC または凍結 BMMC を、判明した表現型マーカーに関して 2 次元 t-SNE プロットで可視化しました。青と赤の色調の強さは、低レベルから高レベルまでの発現の勾配を表しています。

- A. 2 人のドナーの PBMC サンプルを個別に分析し、各ドナーから得られた合計 10,000 の CD19⁺ イベントを 1 つのファイルに結合して、FlowJo で t-SNE 解析を実施しました。
- B. PBMC と並行して、凍結 BMMC も同じ抗体カクテルで染色し、解析しました。図 3A のとおり、PBMC では、成熟、クラススイッチメモリー、非クラススイッチメモリー、移行の各 B 細胞と形質芽球が同定されました。また、IgG⁺ B 細胞と CD138⁺ 形質細胞が明確に識別され、移行 B 細胞サブセットはさらに T1-T2 細胞および T3 細胞に分けられました。B および C. BMMC には、末梢血と同じ B 細胞サブセットが認められたのに加え、大集団の CD19⁺ IgM⁻ CD24⁺ CD38⁺ CD10⁺ 細胞コンパートメントが認められました。

t-SNE 解析を使ったことで、B 細胞の成熟時における CD10 発現のダウンレギュレーションも容易に検出できました。このため、CD10 は、骨髄での初期段階から末梢組織での成熟段階まで至る B 細胞の成熟の進捗度を判定するうえで今回のパネルの重要なマーカーであり、(IgG などの) 他のマーカーは、さまざまな組織を通過する B 細胞サブセットの循環を示しています (図 3C)。B 細胞が CD10^{bright} から CD10⁻ 成熟 B 細胞へ成熟すると、CD20 の発現もアップレギュレーションします。CD10 と CD20 の発現を

等高線プロットで解析したところ、前駆細胞や血球小芽細胞からさらに成熟した B 細胞へ至る B 細胞の成熟の各段階、つまり、血球小芽細胞の初期段階 (CD10^{bright}CD20⁻) から、中期段階 (CD10⁺CD20^{-low})、後期段階 (CD10⁺CD20⁺) を経て、成熟 B 細胞 (CD10⁻CD20⁺) に至る経路が明らかになりました。一方、t-SNE によるクラスター解析では、2 変量解析よりもさらにロバストに細胞集団を分離することができ、希少な細胞集団の可視化における t-SNE の重要性がさらに示されました (図 4)。

図 4

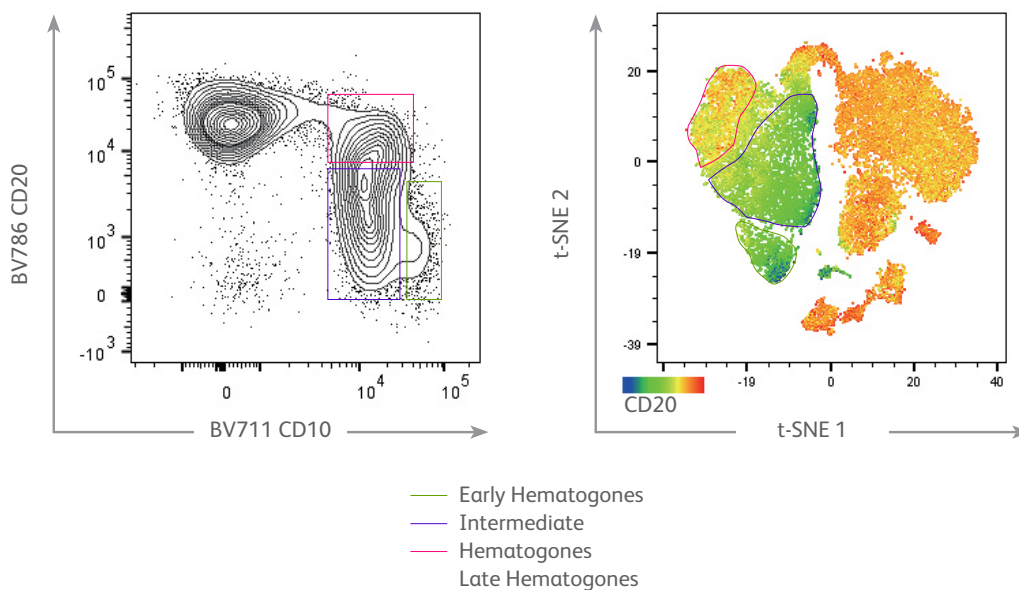


図 4. 骨髄の B 細胞前駆細胞の詳細な解析

図 2 で染色した凍結 BMMC を等高線 (左図) および t-SNE (右図) プロットでさらに解析しました。CD19⁺ 細胞における CD10 および CD20 の相関発現を調べた結果、血球小芽細胞の初期段階 (CD10^{bright}CD20⁻) から中期段階 (CD10⁺CD20^{-low}) を経て、後期段階 (CD10⁺CD20⁺) に至る正常な B 細胞の成熟パターンが明らかになりました。血球小芽細胞は、CD20 の発現を示した t-SNE プロットでさらに 3 種類の集団にはっきりと分けられましたが、この解析は等高線プロットでは困難です。

これらの結果より、12 カラーパネルを使って、末梢血および骨髄における B 細胞の分化段階を詳細に解析するための系統および分化マーカーのリストを作成しました。パネルの中心的存在である CD19、CD27、IgM、IgD、CD24、CD38、CD20、CD3、7-AAD は主要な B 細胞集団の検出に使用し、その他の MTG、CD10、IgG、CD138 の各マーカーは特有の B 細胞サブセットをさらに識別するために使用しました。FlowJo™ 解析用ソフトウェア t-SNE アルゴリズムの使用により、異なるドナーから得られ個別

に分析したサンプルを同時に解析することができ、各組織における細胞の分布の比較が容易になりました。重要な点は、t-SNE によって偏りのない方法で細胞クラスターが自動作成され、形質細胞などの希少な集団も可視化できたことです。このように、高性能の装置と適切なツールと高次元データ解析の経験を組み合わせることにより、細胞を解析するロバストで効率的なシングルソリューションが実現します。

BD FACSCelesta™ フローサイトメーター 製品構成一覧

			660343	660344	660345	660346
搭載レーザー数			2	3	3	3
蛍光検出用PMT数			10	12	12	12
レーザー	蛍光色素	フィルター				
488 nm	BD Horizon™ BB515, FITC	530 / 30	●	●	●	●
	PE	575 / 25	●	●		●
	BD Horizon™ PE-CF594	610 / 20	●	●		●
	PerCP-Cy® 5.5	695 / 40	●	●	●	●
640 nm	APC	670 / 30		●		
	BD Horizon™ APC-R700	730 / 45		●		
	APC-Cy® 7	780 / 60		●		
405 nm	BD Horizon™ BV421	450 / 40	●	●	●	●
	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			●	
	BD Horizon™ PE-CF594	610 / 20			●	
	PE-Cy® 5	670 / 30			●	
	PE-Cy® 7	780 / 60			●	
355 nm	BD Horizon™ BUV395	379 / 28				●
	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、670 / 30 nm フィルターで検出します。

Alexa Fluor® 700 は、BD Horizon™ APC-R700と同様 640 nm レーザーで励起し、730 / 45 nm フィルターで検出します。

APC-H7 は、APC-Cy7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。

V450、Pacific Blue™ は、BD Horizon™ BV421と同様 405 nm レーザーで励起し、450 / 40 nm フィルターで検出します。

V500、AmCyan 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。

システムとソフトウェア

製品名	カタログ番号
BD FACSCelesta™ フローサイトメーター	お問い合わせください
FlowJo™ 解析用ソフトウェア v10.4.1 以上	—

試薬

製品名	クローン	カタログ番号
BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer Plus	—	566385
BD Pharmingen™ PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD3	UCHT1	560835
BD OptiBuild™ BV711 Mouse Anti-Human CD10	HI10α	740770
BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD19	HIB19	560728
BD OptiBuild™ BV786 Mouse Anti-Human CD20	L27	740838
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD24	ML5	555428
BD Horizon™ BV605 Mouse Anti-Human CD27	L128	562655
BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD38	HIT2	562444
BD Horizon™ BUV737 Mouse Anti-Human CD138	MI15	564393
BD Horizon™ BV480 Mouse Anti-Human IgD	IA6-2	566138
BD OptiBuild™ BV650 Mouse Anti-Human IgG	G18-145	740596
BD Horizon™ BUV395 Mouse Anti-Human IgM	G20-127	563903
7-AAD	—	559925



BD FACSCelesta™ フローサイトメーター

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/

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

