

フローサイトメトリーにおける ナチュラルキラー細胞の抑制および 活性化レセプターの発現パターンの評価

BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーターと
BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 試薬を使用した 18 色マルチカラー解析

概要

- ナチュラルキラー（NK）細胞のフェノタイプ解析
- 18 カラーフローサイトメトリーパネルを用いて NK 細胞の活性化レセプターと抑制性レセプターの発現を同時に評価
- t-SNE、SPICE 解析を用いて NK 細胞の多様性に関するドナー特異的な差異を解析

ナチュラルキラー細胞は自然免疫系の重要な要素であり、Granzymes, Perforin, Granulysin を含む細胞傷害性顆粒を分泌することで、ウイルスに感染した細胞や悪性細胞を殺傷する防御の最前線を担っています。また活性化 NK 細胞は、樹状細胞、マクロファージ、好中球、抗原特異的 T 細胞および B 細胞などの自然免疫と獲得免疫の応答を担っている他の細胞の機能を調整するサイトカインを周囲に分泌します。

NK 細胞の機能は、細胞のストレスリガンドとヒト白血球抗原クラス I (HLA クラス I) を認識する活性化および抑制性レセプターによって厳格に制御されています。抑制性シグナルは、クラス I に依存する形で自己免疫寛容を維持するため特に重要です。一方、活性化シグナルは NK 細胞のエフェクター機能を促進します。一連の活性化および抑制性レセプターは、NK 細胞の表面に、多彩かつ重複する状態で確率的に発現します。各個人に 30,000 を超える NK 細胞の表現型があると推定され、個人間でも幅広い多様性を示します。抑制性レセプターの発現は主に遺伝子によって決定され、活性化レセプターの発現は環境因子などの確率的な影響によって大きく決定されます。

本データシートでは、ヒト NK 細胞の主要サブセットを明らかにし、さらに重要な活性化および抑制性レセプターの発現を評価する方法としてフローサイトメトリーによる解析について解説します。最初に重要な活性化レセプターまたは抑制性レセプターの発現を、それぞれ 12 カラーのパネルを用いて BD LSRFortessa[®] フローサイトメーターで検査しました。この検査では、6 種類の NK 細胞系列マーカーの基本パネルを 6 種類の活性化マーカーまたは抑制性マーカーのいずれかと組み合わせることで同時評価しました。次に、これらのマーカーを合わせて、1 つのチューブ内ですべてのマーカーを同時に評価し、さらにドナー 5 名間の NK 細胞の不均一性を検討するための 18 カラーパネルを構築しました。BD LSRFortessa[®] X-20 フローサイトメーターにおいて、Violet, Blue, yellow-Green, Red レーザーに加え、355-nm Ultraviolet (UV) レーザーと関連の BD Horizon Brilliant[™] Ultraviolet (BUV) 試薬を用いることで 18 カラーの測定を実現しました。これらを活用することで、蛍光色素の選択肢が増えて色素のオーバーラップが減ったためにパネル設計をシンプルにできます。

単一個人内で多数の NK 細胞の表現型を検討するために、モジュラーパネル設計手法 (modular panel-design strategy) を用いました。この手法により、6 カラー基本パネルを使用して主要な NK 細胞サブセットを評価し、別の 6 カラードロップインパネル 2 枚を用いて活性化レセプターまたは抑制性レセプターの発現を評価できました (表 1)。このモジュラーパネル設計手法により、研究者はドロップインパネル内のマーカーを好みのマーカーに自由に交換できるようになります。

表 1. 主要な NK 細胞サブセットを識別する 6 カラー基本パネルと、NK 細胞での活性化レセプターまたは抑制性レセプターの発現を評価する 6 カラードロップインパネルを備えたモジュラー 12 カラーパネル

6 カラー基本パネル			6 カラードロップイン: 活性化パネル			6 カラードロップイン: 抑制性パネル		
マーカー	蛍光色素		マーカー	蛍光色素		マーカー	蛍光色素	
主要な NK 細胞サブセット	CD94	BV480	活性化レセプター	CD314 (NKG2D)	BV421	抑制性レセプター	CD158f (KIR2DL5)	BV421
	CD16	BV786		CD159c (NKG2C)	BV605		CD158b (KIR2DL2/3)	BV605
	CD57	FITC		CD337 (NKp30)	BV650		TIGIT	BV650
	CD56	PE-Cy7 [™]		CD226 (DNAM-1)	BV711		CD159a (NKG2A)	BV711
	CD27	APC-R700		CD160	PE		CD158e1 (NKB1/KIR3DL1)	PE
	CD3	APC-H7		CD244 (2B4)	APC		CD158a (KIR2DL1)	APC

カラー基本パネルを用いることで、CD56 と CD16 の発現プロファイルの解析に基づき、NK 細胞サブセットの発生的および機能的な差異を識別できました。CD56^{bright} CD16⁻ 細胞は、末梢血中の未成熟 NK 細胞の小さなサブセットに相当します。強力なサイトカイン産生細胞ですが、活性化前の細胞障害性は低くなります。CD56^{dim} CD16⁻ 細胞には、細胞障害性の機能を発揮し、サイトカインの産生が抑制された最終分化型の NK 細胞が含まれます (図 1A)。

CD56^{bright} 細胞は、最終的に CD56^{dim} で分化を終了することが知られています。CD94 の発現解析は、CD94^{high} CD56^{bright}、CD94^{high} CD56^{dim}、CD94^{low} CD56^{dim} などの分化の中間細胞を識別するために役立ちました。後者が、最も細胞障害性の高いサブセットになります (図 1B)。NK 細胞の成熟は、CD56^{dim} CD16⁻ 細胞表面における CD27 の喪失と CD57 の獲得を、CD56^{bright} CD16⁻ 細胞のものと比較して解析することでモニターできます (図 1C)。

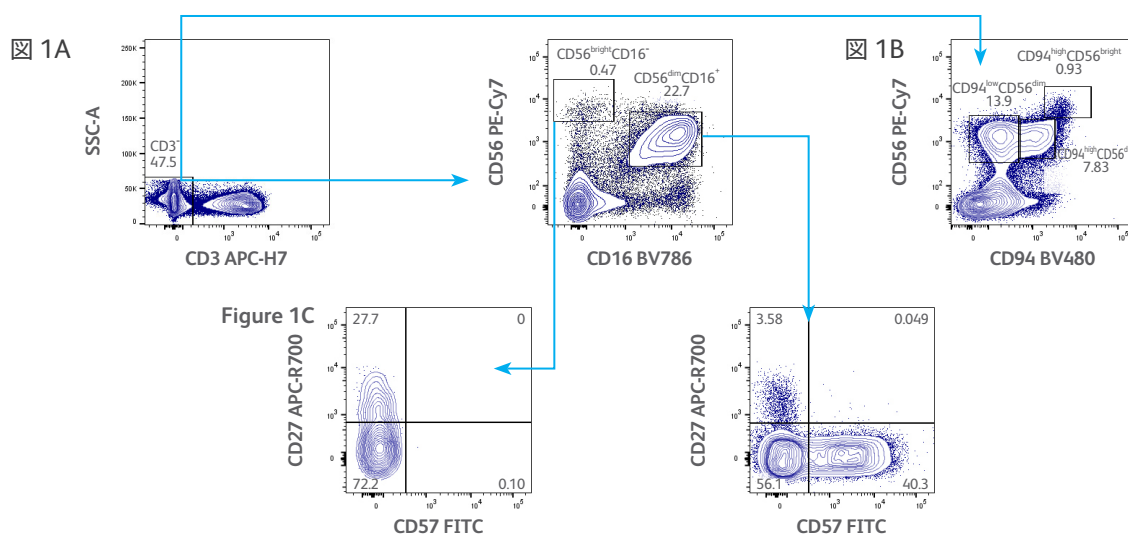


図 1. 主要な NK 細胞サブセットを解析するためのゲーティング法

健康なドナー (ドナー 1) の新鮮血球を、表 1 に示した蛍光色素標識抗体で染色しました。全血を、パネル抗体と BD Horizon[™] Brilliant Stain Buffer Plus を用いて 30 分間暗所で染色しました。BD FACS[™] Lysing Solution を用いて赤血球を 15 分間溶解しました。細胞を、BD Pharmingen[™] Stain Buffer (FBS) で 2 回洗浄しました。BD LSRFortessa[™] フローサイトメーターにより Violet/Blue/Yellow-Green/Red レーザーの構成でサンプル収集を完了しました。A. 主要な NK 細胞サブセットを、CD3⁺リンパ球内で CD56^{bright} CD16⁻ 細胞または CD56^{dim} CD16⁺ 細胞として区分しました。B. CD94 の発現によって、NK 細胞の分化中間体 (CD94^{high} CD56^{bright}、CD94^{high} CD56^{dim}、CD94^{low} CD56^{dim}) を識別しました。C. CD56^{dim} CD16⁺ 細胞における CD57 の発現獲得と CD27 の発現喪失を、CD56^{bright} CD16⁻ 細胞のものと比較して解析することで NK 細胞の成熟をさらに評価できます。細胞集団の統計量を、ゲートごとにそれぞれ等高線プロットで示します。

CD94 レセプターは、非古典的 MHC クラス I 分子を認識するヘテロダイマー複合体を形成する、多様な NK2 ファミリーレセプター (ドロップインパネルの CD159c (NK2C)、CD159a (NK2A) など) に関連することがあります。NK2 ファミリーのメンバーによって、この複合体は、NK 細胞の細胞傷害活性を活性化もしくは阻害することがあります。6 カラードロップイン活性化パネルでは、CD337、CD226、CD160、CD244 に加えて 2 種類の NK2 ファミリーメンバーである CD159c (NK2C) と CD314 (NK2D) も解析できます (図 2)。抑制性パネルには、NK2 ファミリーメンバーである CD159a (NK2A) に加え、TIGIT および キラー細胞免疫グロブリン様レセプター (KIR) ファミリーメンバーの CD158a、CD158b、CD158e1 および CD158f も含まれています (図 3)。CD56^{bright} CD16⁻ 細胞での活性化レセプターと抑制性レセプターの発現パターンは、CD56^{dim} CD16⁺ 細胞のものとは異なることが示されました。例えば、CD56^{dim} CD16⁺ 細胞集団では活性化レセプター CD160 の発現量が高く、抑制性レセプターである TIGIT および KIR ファミリーメンバーの発現量も高くなりました。

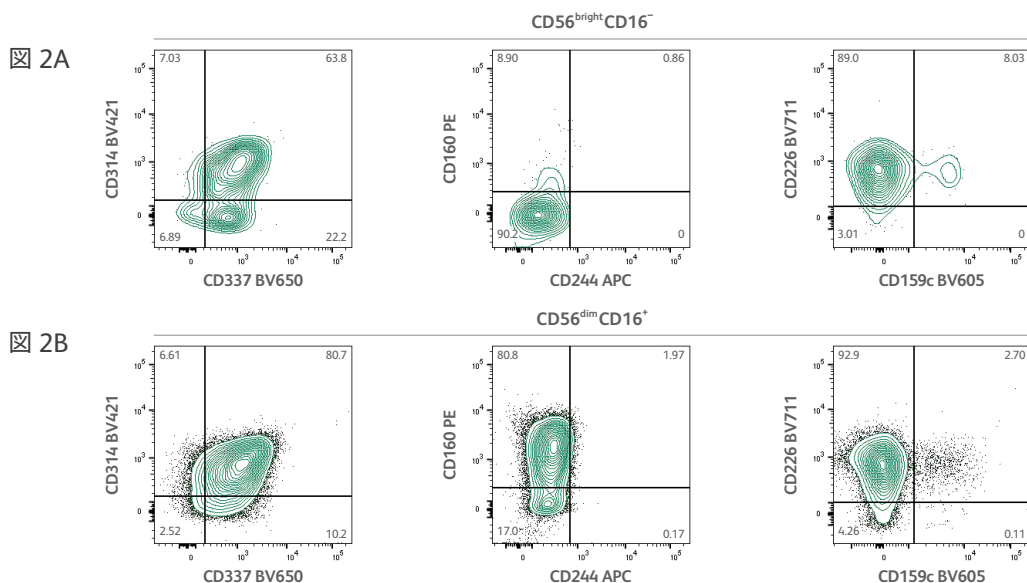


図 2. 主要な NK 細胞サブセットの活性化マーカー発現の評価

図 1 に示した主要な NK 細胞サブセット (CD56^{bright} CD16⁻、CD56^{dim} CD16⁺) を、NK2 レセプターファミリーのメンバー 2 種の CD159c (NK2C) と CD314 (NK2D) に加え、活性化マーカー (CD337、CD244、CD226、CD160) の発現を評価して等高線プロットで示しました。A. CD56^{bright} CD16⁻ 細胞の等高線プロット。B. CD56^{dim} CD16⁺ 細胞の等高線プロット。細胞集団の統計量を、四分画ゲートごとにそれぞれ等高線プロットで示します。

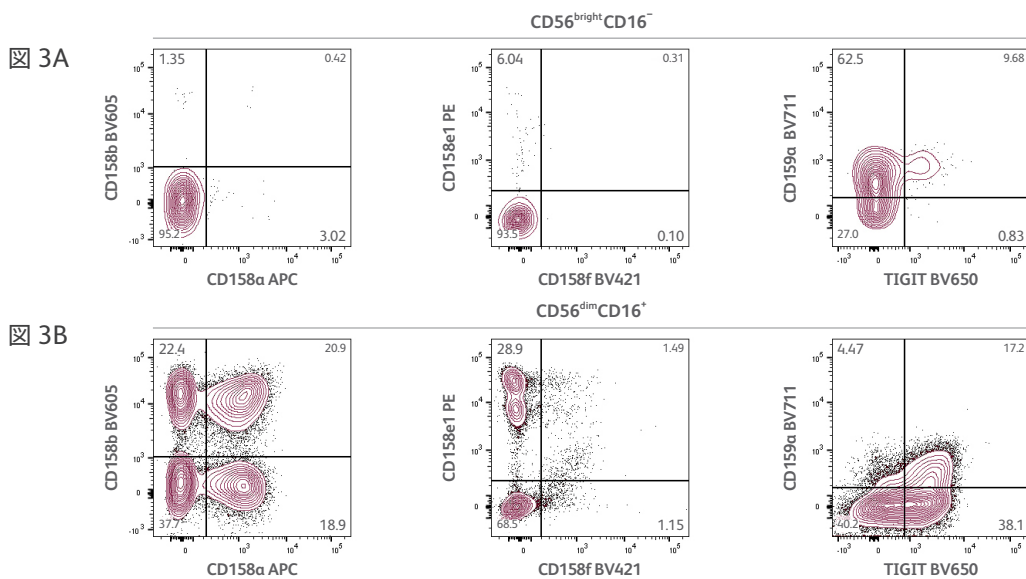


図 3. 主要な NK 細胞サブセットの抑制性マーカー発現の評価

図 1 に示した主要な NK 細胞サブセット (CD56^{bright} CD16⁻、CD56^{dim} CD16⁺) を、抑制性マーカーの CD158a、CD158b、CD158e1、CD158f、TIGIT および NK2 レセプターファミリーメンバー CD159a (NK2A) の発現を評価して等高線プロットで示しました。A. CD56^{bright} CD16⁻ 細胞の等高線プロット。B. CD56^{dim} CD16⁺ 細胞の等高線プロット。細胞集団の統計量を、四分画ゲートごとにそれぞれ等高線プロットで示します。

前述のとおり、NK 細胞は不均一性が高く、一部の個人で発現している活性化および抑制性レセプターのセットが別の個人では発現していません。NK 細胞の機能は、発現している活性化レセプターと抑制性レセプターの組み合わせによって制御されるため、NK 細胞の多様性と機能は密接に関連しています。活性化マーカーと抑制性マーカーの組み合わせ発現を同時評価するために、すべてのマーカーを 1 つの 18 カラーパネルに組み入れました

(表 2)。これによって、NK 細胞の多数の表現型をさまざまなドナー間で簡便に分析でき、NK 細胞の多様性に関するより包括的な理解が得られました。CD94、CD57、CD27 に加えて、すべての活性化および抑制性マーカーの細胞表面発現をドナー 5 名間で検討して、CD337、CD159a、CD158a、TIGIT などのマーカーの発現に差があることを明らかにしました (図 4)。

マーカー	蛍光色素	マーカー	蛍光色素	マーカー	蛍光色素
主要な NK 細胞 サブセット	CD3	BUV563	活性化 レセプター	CD226 (DNAM-1)	BV711
	CD56	BUV737		CD159c (NKG2C)	BV786
	CD94	BV480		CD337 (NKp30)	BB700
	CD57	FITC		CD160	PE
	CD27	APC-R700		CD244 (2B4)	PE-CF594
	CD16	APC-H7		CD314 (NKG2D)	PE-Cy7
抑制性 レセプター	CD158b (KIR2DL2/3)	BUV395	CD158f (KIR2DL5)	BV421	
	CD158e1 (NKB1/KIR3DL1)	BUV805	CD159a (NKG2A)	BV605	
	TIGIT	BV650	CD158a (KIR2DL1)	APC	

図 4

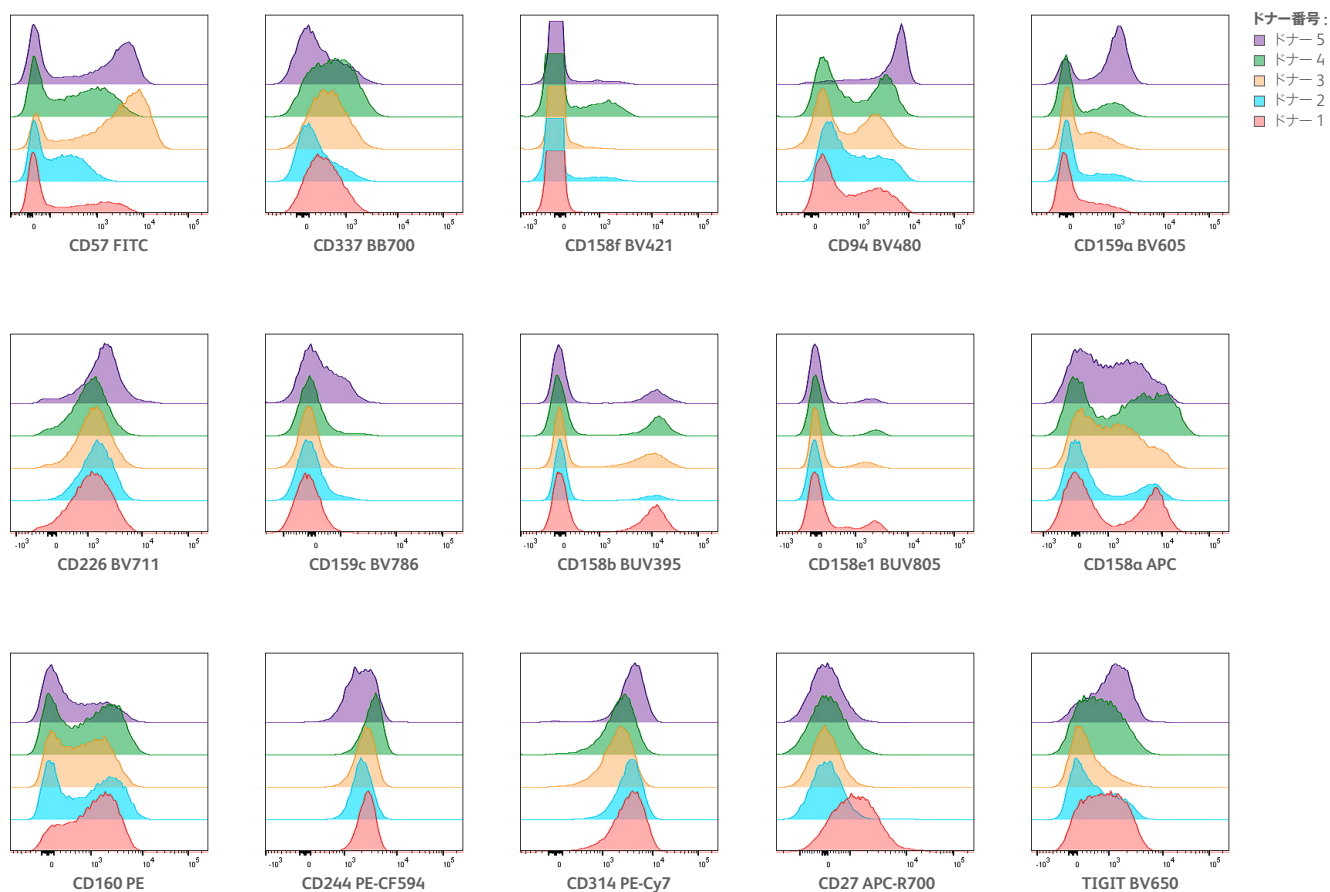


図 4.18 カラーフローサイトメトリーパネルを用いて NK 細胞表面の活性化マーカーと抑制性マーカーの発現を同時に評価

健康なドナーの新鮮血球を、表 2 に示した蛍光色素標識抗体を用いて図 1 に記載の方法で染色しました。BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーターの 5 レーザー (UV/Violet/Blue/Yellow-Green/Red) でデータを取得しました。ヒストグラムのレイアウトに示すように、活性化および抑制性マーカーに加えて CD94、CD57、CD27 の発現を、さまざまなドナーの CD56^{dim} CD16⁺ NK 細胞で評価しました。CD57、CD337、CD94、CD159a、CD158a、TIGIT などのマーカーの発現にドナー間での顕著な差異が観察されました。

NK 細胞レパートリーを包括的に評価するため、t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) 解析を FlowJo™ ソフトウェアで実施しました。t-SNE アルゴリズムを使用すると、異なるドナーの個別に解析したサンプルを同時に評価でき (図 5A)、1 つのマーカーに対するヒートマップを用いてドナー間の比較を一度に簡単に行うことができました (図 5B)。ドナー間のクラスタリングは、検査したマーカーの一部 (CD57、CD94、CD158a など) の発現における差異に基づき実施しました。Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations (SPICE) アルゴリズムを使用して、選択した活性化および抑制性マーカー

(CD94、CD159a [NKG2A]、CD160、CD337、CD158a、CD158b) を基に異なる NK 細胞サブセットを識別しました (図 6)。NK 細胞の主要な 30 種類のサブセットが、選択したマーカーの組み合わせ発現によって識別されました。扇形部分の相対的な大きさと円弧部分の配置で評価される SPICE 解析に示されるように、18 カラーパネルでの活性化および抑制性マーカーの組み合わせ解析から、健康なドナー間でのレセプター発現の内因的な差異が明らかになり、NK 細胞の多様性に関するより深い理解が得られます。

図 5

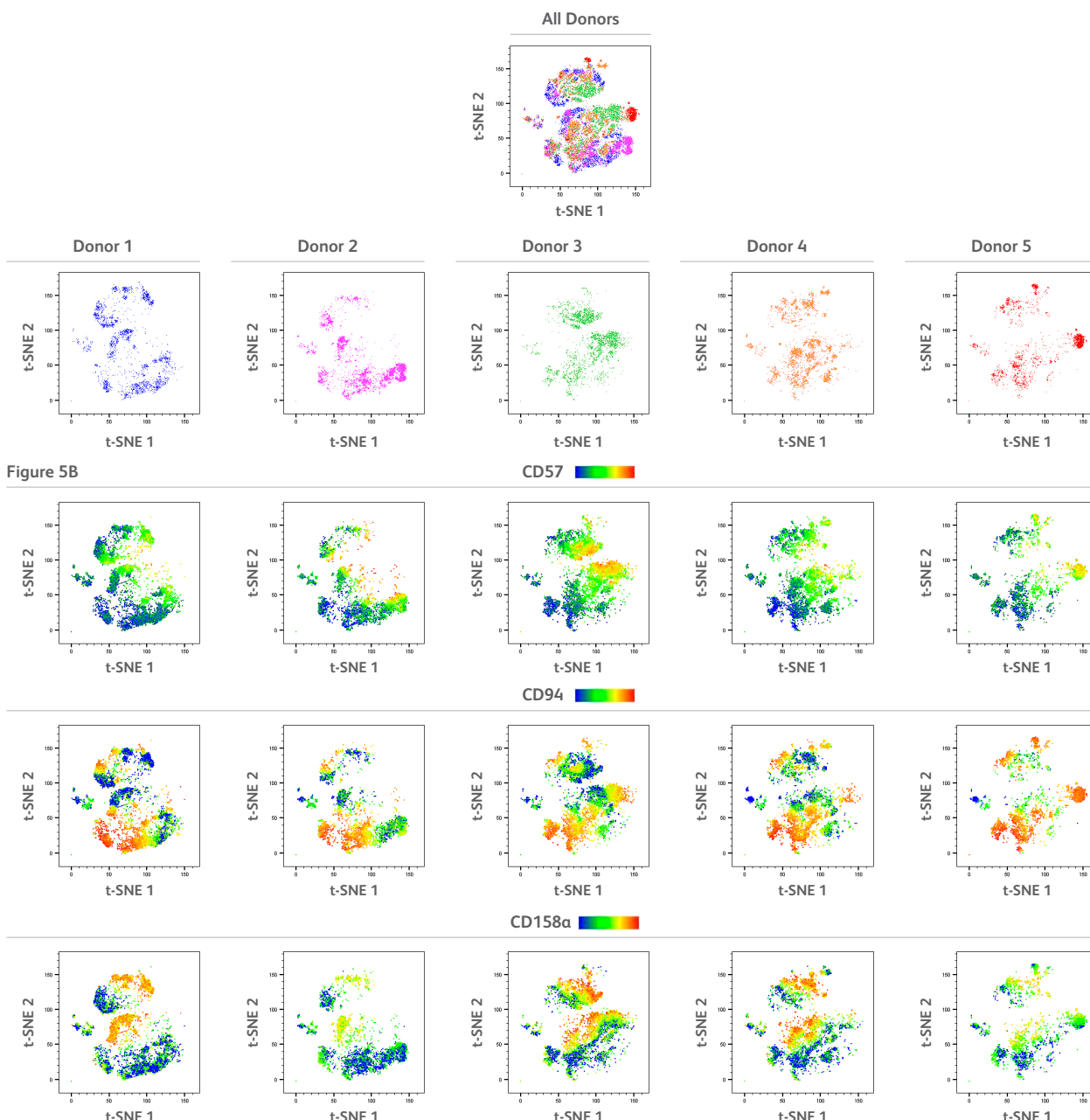


Figure 5B

図 5. NK 細胞の活性化および抑制性マーカーの高次元解析とさまざまなドナーの比較

図 4 に記載した方法で染色および収集したドナー 5 名の新鮮血球を使用して、FlowJo™ ソフトウェアにより高次元データ解析を行いました。解析のため NK 細胞を CD3⁺ CD56⁺ でゲーティングしました。A. 全ドナーと各ドナーの t-SNE 解析から、NK 細胞の活性化および抑制性レセプター発現におけるドナー間の多様性が投影されています。

B. ドナー特異的 t-SNE 投影のヒートマップに示されるように、さまざまなドナーで NK 細胞表面に異なるレセプターが発現しています。検査したマーカーの一部 (CD57、CD94、CD158a など) の発現における顕著な差異について、ドナー間でのクラスタリングを実施しました。

図 6

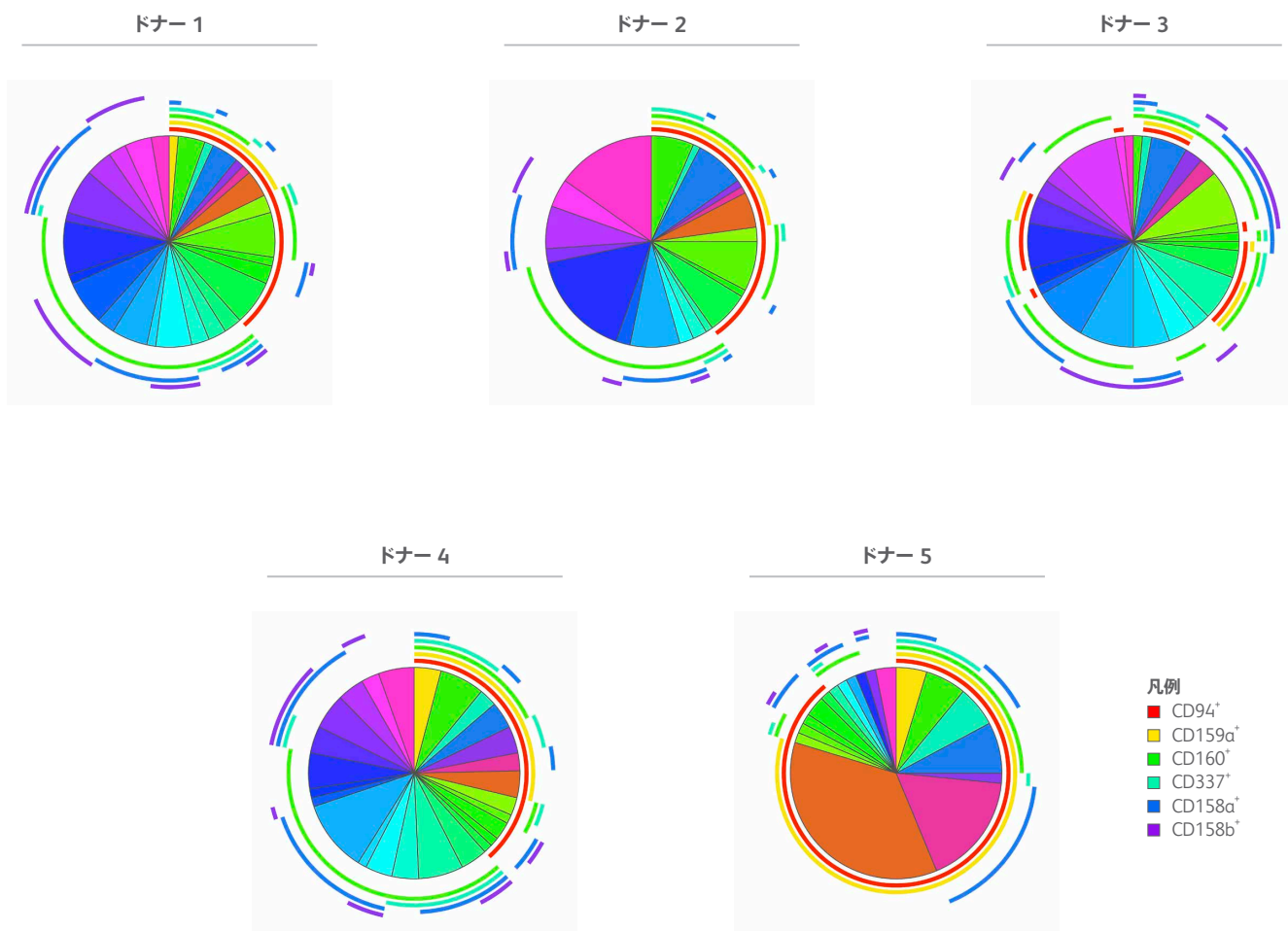


図 6. さまざまなドナー間での選択した活性化および抑制性レセプターの組み合わせ解析

さまざまなドナーの新鮮血球 (図 4 に記載した方法で染色および収集) を使用して、SPICE アルゴリズムにより高次元データ解析を行いました。NK 細胞の 30 種類の主要なサブセット (扇形部分) を、次の選択した 6 種類のマーカー (円弧部分) の組み合わせ発現に基づいて特定しました。CD94、CD159a (NKG2A)、CD160、CD337、CD158a および CD158b。円グラフの扇形部分はマーカーの組み合わせを発現している細胞サブセットの相対的な大きさを示し、円弧部分は円弧の凡例に示した特定のマーカーのさまざまなサブセットにおける発現を示しています。そのため、健康なドナー 5 名間での NK 細胞レパートリーの内因的な差異が明らかになります。

高性能な機器と適切な高次元データ解析ツールは、さまざまな健康なドナー間での内因的な NK 細胞の多様性を明らかにする効率的な方法となります。

355-nm UV レーザーを備えた BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーターでは、1 つのチューブ内で最大 18 種類のマーカーを同時に解析できます。これは、本データシートに示した NK 細胞のような不均一性が高く表現型が複雑な細胞型を適切に特性評価するために極めて重要です。BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet

色素は UV レーザーで励起でき、最大 6 種類の蛍光検出器を搭載することが可能です。そのため、パネルを設計する際により多くの蛍光色素を選択でき、5 種類のレーザーを使用することで蛍光の漏れ込みを減らし、目的とする細胞の分解能を向上できます。さらに、BD OptiBuild™ カスタム試薬を使用すると、蛍光色素標識抗体の選択肢が大幅に拡大するため、パネル設計がより簡単になります。

製品リスト

機械

製品名

BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーター

試薬

製品名

カタログ番号

BD FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate	349202
BD Pharmingen™ Stain Buffer (FBS)	554656
BD Pharmingen™ FITC Mouse Anti-Human CD57 Clone NK-1	555619
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human NKB1 (CD158e1) Clone DX9	555967
BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD56 Clone B159	557747
BD Pharmingen™ APC-H7 Mouse Anti-Human CD3 Clone SK7	560176
BD Pharmingen™ APC-H7 Mouse Anti-Human CD16 Clone 3G8	560195
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD160 Clone BY55	562118
BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD244 Clone 2-69	562350
BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD314 (NKG2D) Clone 1D11	562365
BD Horizon™ BV786 Mouse Anti-Human CD16 Clone 3G8	563690
BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD158a Clone HP-3E4	564319
BD Horizon™ BUV737 Mouse Anti-Human CD56 Clone NCAM16.2	564447
BD Horizon™ BV711 Mouse Anti-Human CD226 Clone DX11	564796
BD Horizon™ PE-CF594 Mouse Anti-Human CD244 Clone 2-69	564881
BD Horizon™ APC-R700 Mouse Anti-Human CD27 Clone M-T271	565116

試薬

製品名

カタログ番号

BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD158f Clone UP-R1	566330
BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer Plus	566385
BD Horizon™ BUV737 Mouse Anti-Human CD56 Clone NCAM16.2	612766
BD OptiBuild™ BUV563 Mouse Anti-Human CD3 Clone SK7	741448
BD OptiBuild™ BV650 Mouse Anti-Human CD337 (NKp30) Clone p30-15	743171
BD OptiBuild™ BV605 Mouse Anti-Human CD158b Clone CH-L	743453
BD OptiBuild™ BUV395 Mouse Anti-Human CD158b Clone CH-L	743456
BD OptiBuild™ BV421 Mouse Anti-Human CD314 (NKG2D) Clone 1D11	743558
BD OptiBuild™ BB700 Mouse Anti-Human CD337 (NKp30) Clone p30-15	745937
BD OptiBuild™ BV786 Mouse Anti-Human CD159c (NKG2C) Clone 134591	748170
BD OptiBuild™ BV480 Mouse Anti-Human CD94 Clone HP-3D9	746737
BD OptiBuild™ BV650 Mouse Anti-Human TIGIT Clone 741182	747840
BD OptiBuild™ BV711 Mouse Anti-Human NKG2A (CD159a) Clone 131411	747919
BD OptiBuild™ BV605 Mouse Anti-Human NKG2A (CD159a) Clone 131411	747921
BD OptiBuild™ BV605 Mouse Anti-Human CD159c (NKG2C) Clone 134591	748166
BD OptiBuild™ BUV805 Mouse Anti-Human CD158e1 (NKB1) Clone DX9	748921

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

