

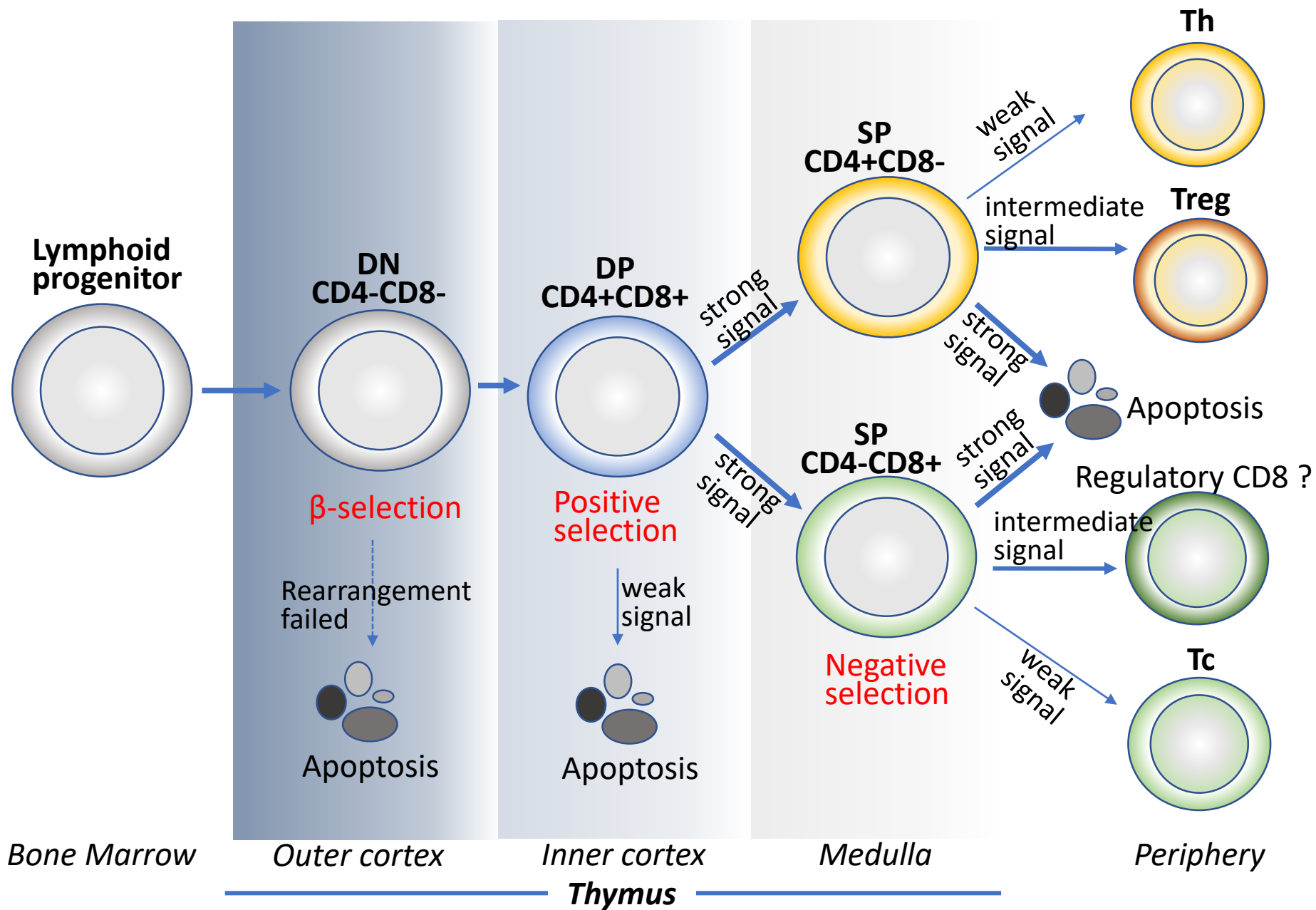
多蛍光フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの解析

1. ヒトT細胞の分化
2. ヒト末梢血T細胞サブセットの分類
3. ヒト末梢血T細胞サブセット(メモリー/エフェクター)の解析
4. フローサイトメトリーで用いられる蛍光の特性
5. 本日の実習染色手順

研究創出支援センター/高度研究機器部門

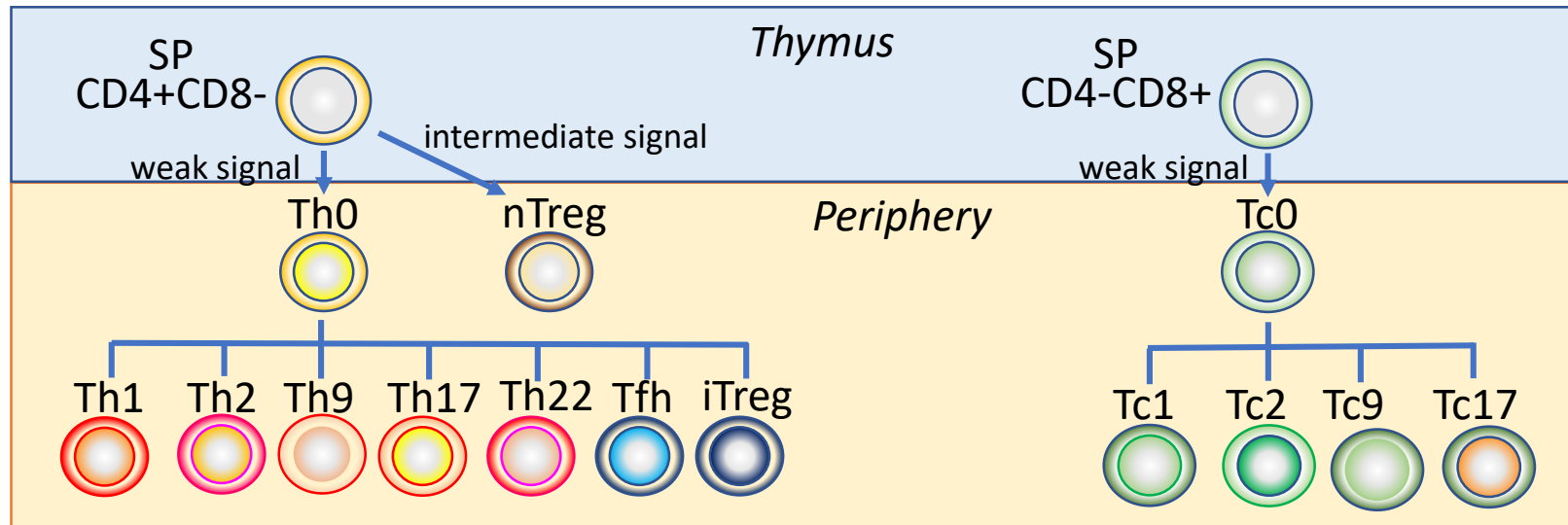
鈴木 進

T細胞の胸腺内分化



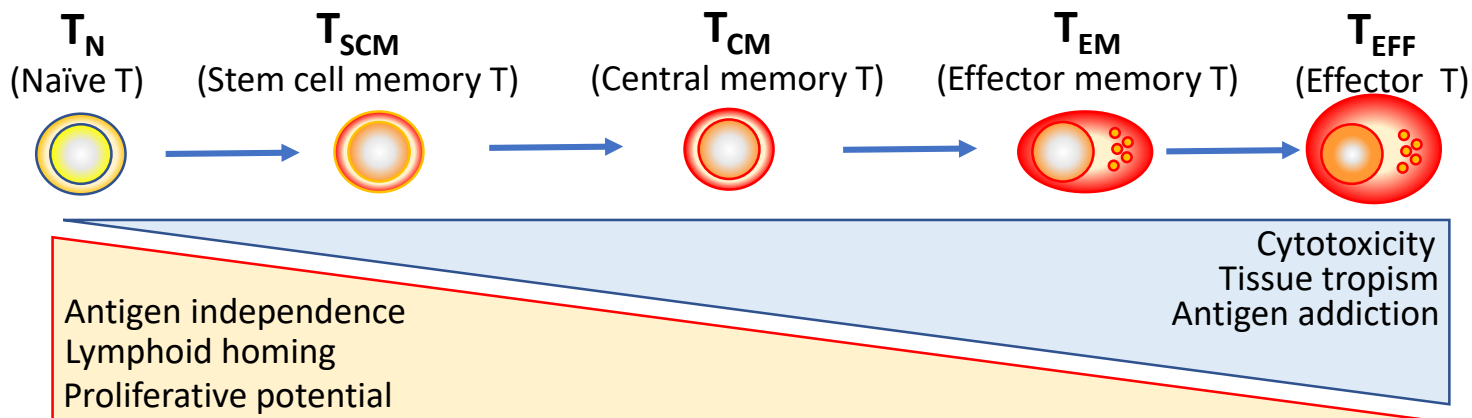
ヒト末梢血T細胞サブセットについて

分化、機能に基づく分類



Arch. Immunol. Ther. Exp. (2014) 62:449-458
 J Allergy Clinical Immunol. (2011) 127:701-21

成熟段階に基づく分類



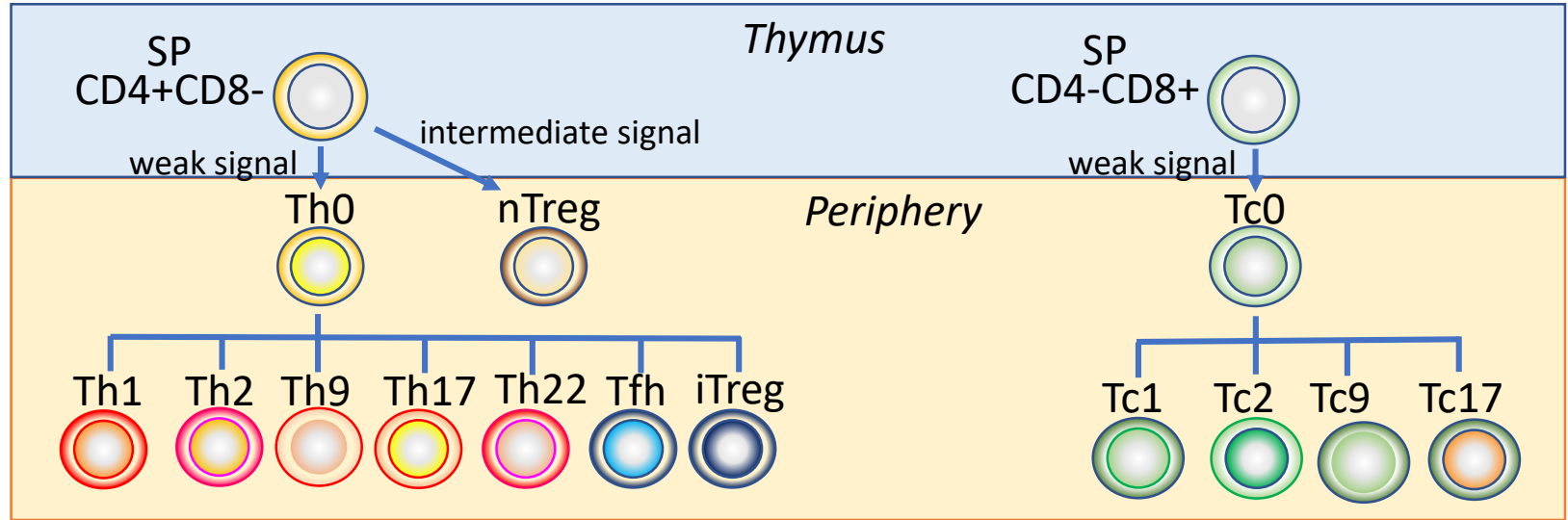
J Clin Invest. 2007;117(5):1204-1212
 Front. Immunol., 08 September 2015 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00456>
 Cell Reports 2016 17, 2811-2818

分化、機能に基づくT細胞サブセットとその特徴

T-cell subsets		Transcription factors	Differentiation cytokines	Effector cytokines	Surface antigens	Functions
CD4 ⁺ T	Th1	T-bet	IL-12,18,21	IL-2, IFN γ , TNF α	CXCR3	Intracellular cellular pathogens, apoptosis of tissue cells
	Th2	GATA3	IL-4	IL-4,5,6,10,13	CCR4, CRTH2	Helminths, allergic inflammation, IgE, chronic eosinophilic inflammation
	Th9	PU.1	IL-4	IL-9		Mucus production, tissue inflammation
	Th17	ROR γ T	TGF β +IL-6	IL-17,21,22	CD161, CCR4, CCR6	Extracellular pathogens, chronic neutrophilic inflammation
	Th22	FOXO4, AHR	IL-6	IL-22	CCR4, CCR6, CCR10	Tissue inflammation
	Tfh	BCL6	IL-21	IL-21	ICOS	Antibody synthesis
	Treg	FOXP3	TGF β	TGF β ,IL-10,35	CD25, CTLA-4, CCR4 ^{hi}	Immune regulation, prevention of autoimmunity
CD8 ⁺ T	Tc1	T-bet	IL-12	IL-2, IFN γ , TNF α	CXCR3	Immunity against intracellular pathogens and tumors
	Tc2	GATA3	IL-4	IL-4,5,13	CCR4, CRTH2	Propagation of Th2-mediated allergy, contribution to arthritis
	Tc9	?	TGF β , IL-4	IL-9,10	CCR6	Inhibition of CD4 ⁺ T-cell-mediated colitis, propagation of Th2-mediated allergy, anti-tumor response
	Tc17	ROR γ T	TGF β +IL-6	IL-17,21,22	CD161, CCR6	Propagation of autoimmunity, immunity to viral infections, contribution to anti-tumor response

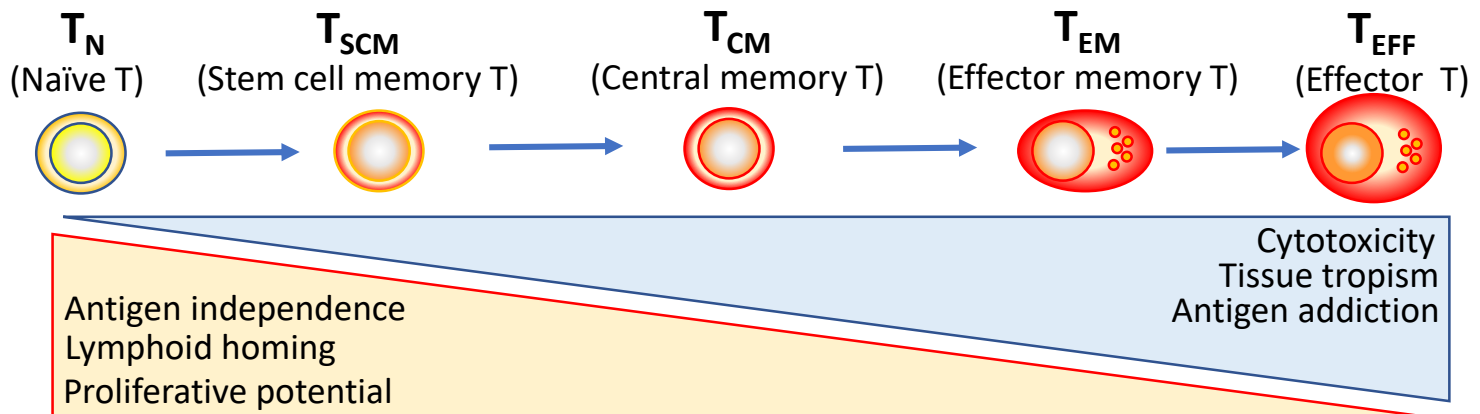
ヒト末梢血T細胞サブセットについて

分化、機能に基づく分類



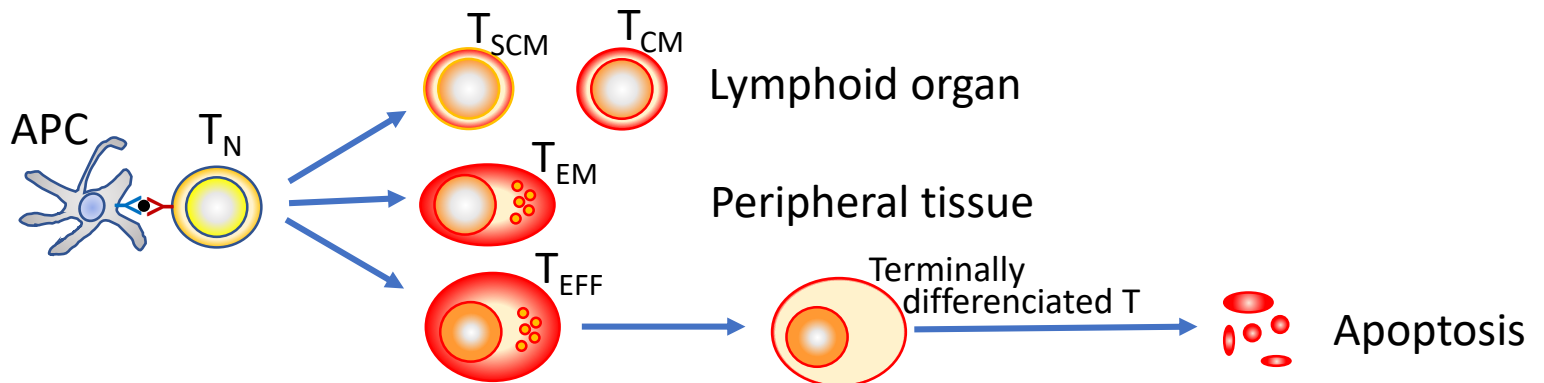
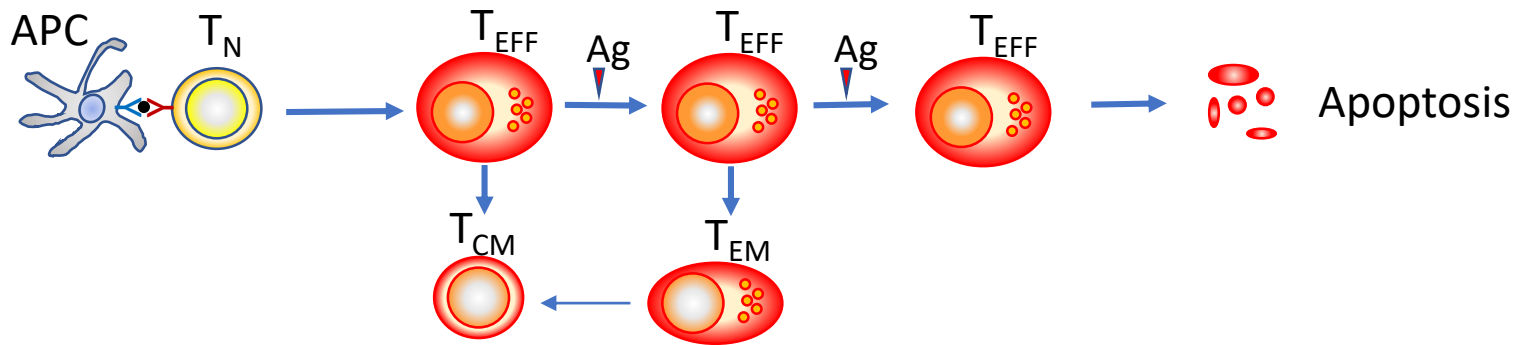
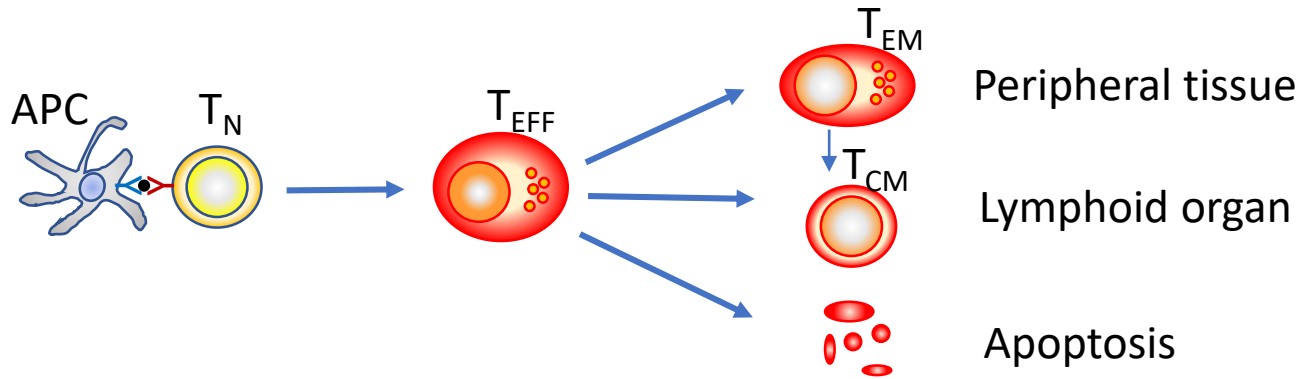
Arch. Immunol. Ther. Exp. (2014) 62:449-458
 J Allergy Clinical Immunol. (2011) 127:701-21

成熟段階に基づく分類

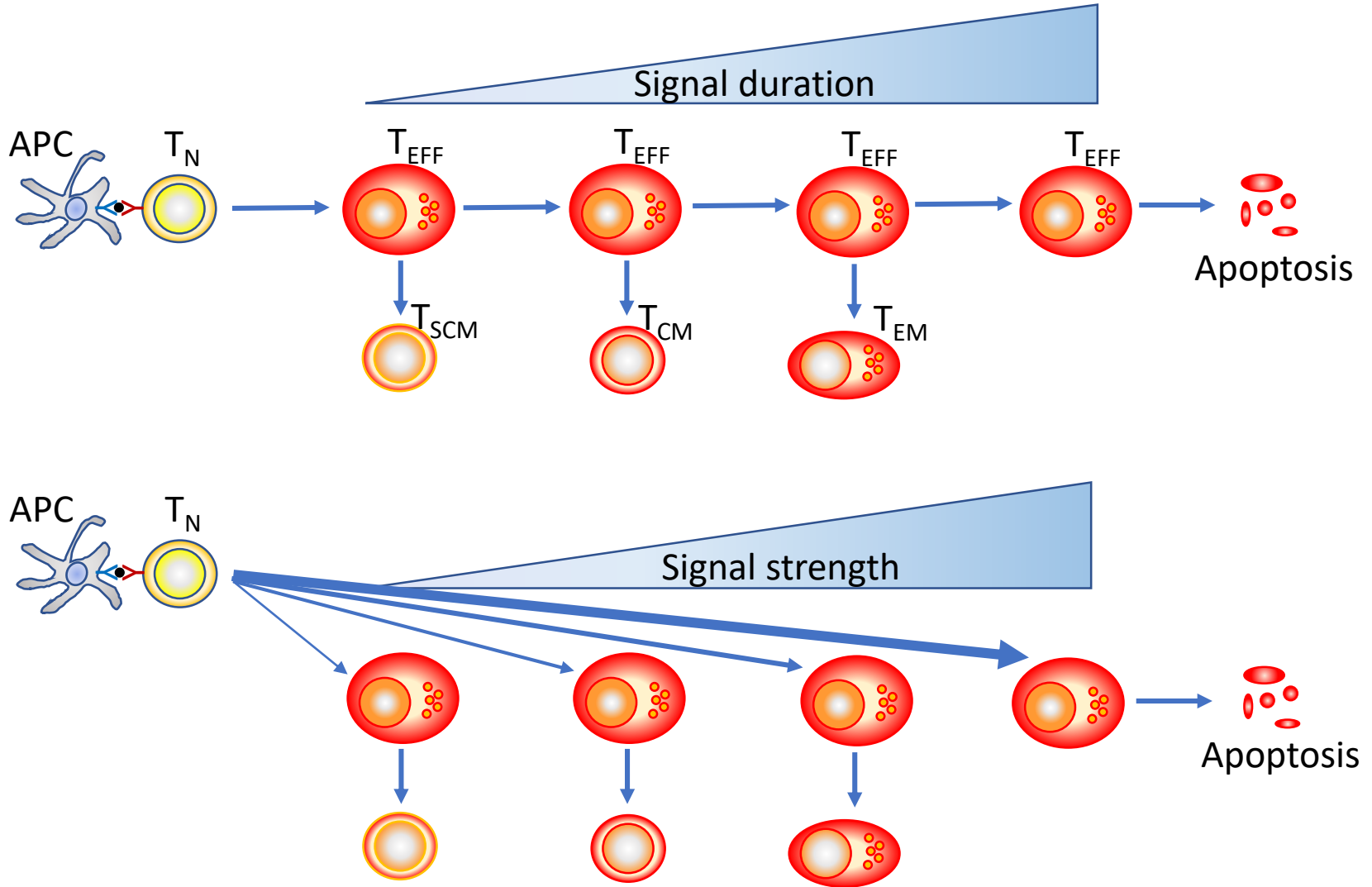


J Clin Invest. 2007;117(5):1204-1212
 Front. Immunol., 08 September 2015 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00456>
 Cell Reports 2016 17, 2811-2818

末梢におけるT細胞の成熟過程



末梢における、T細胞の成熟過程 (続き)

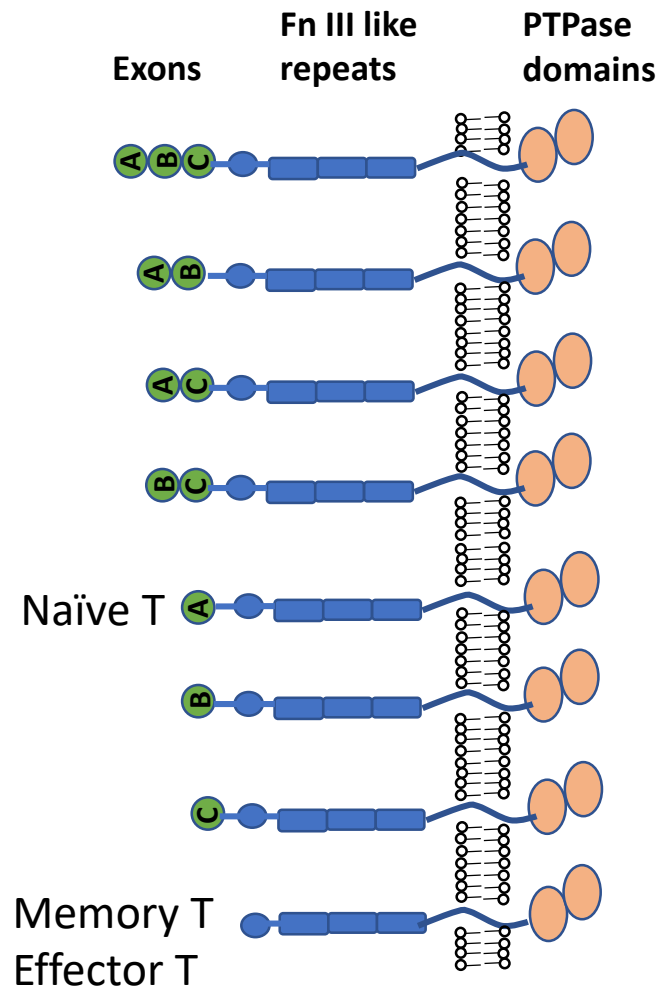
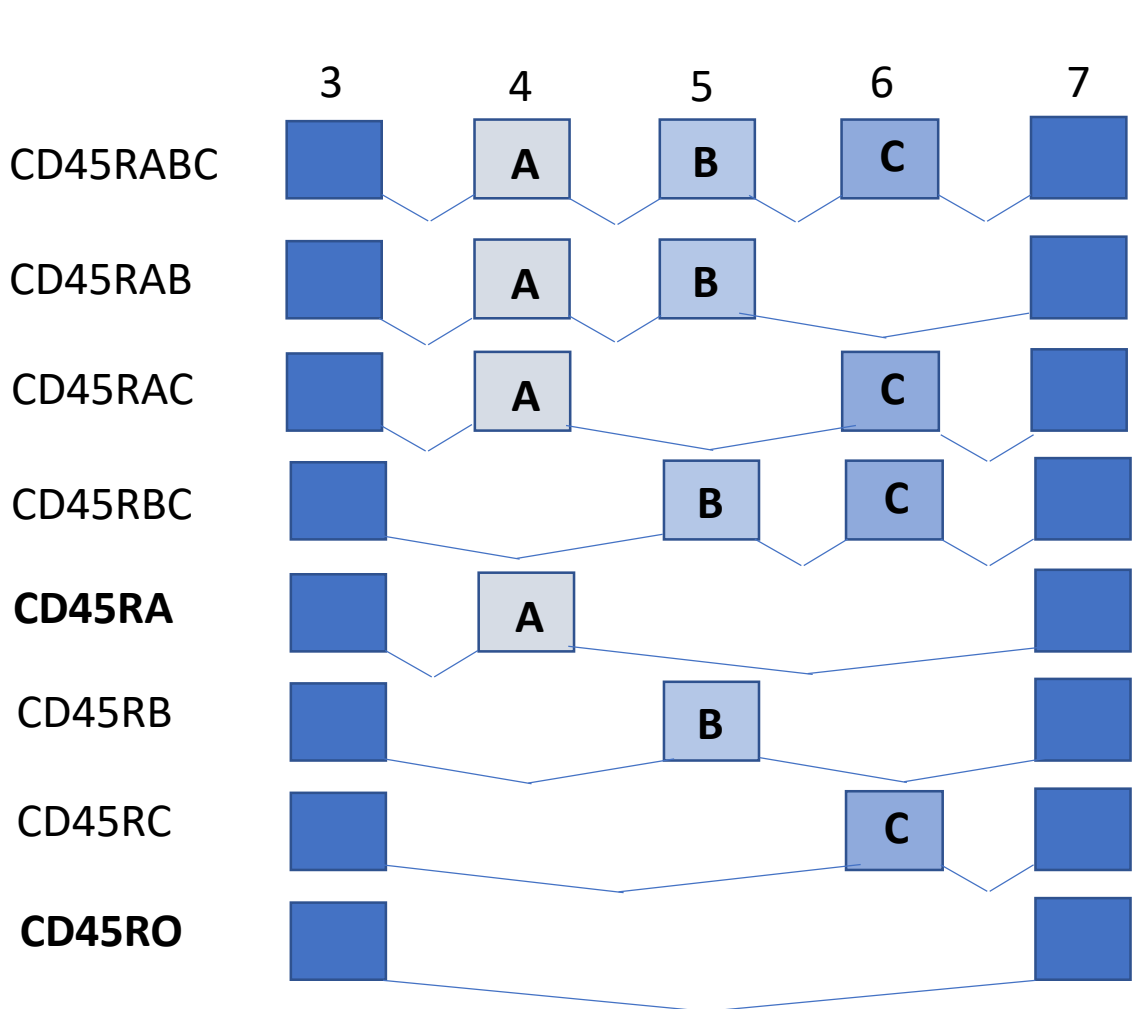


成熟段階に基づくT細胞サブセットとその特徴

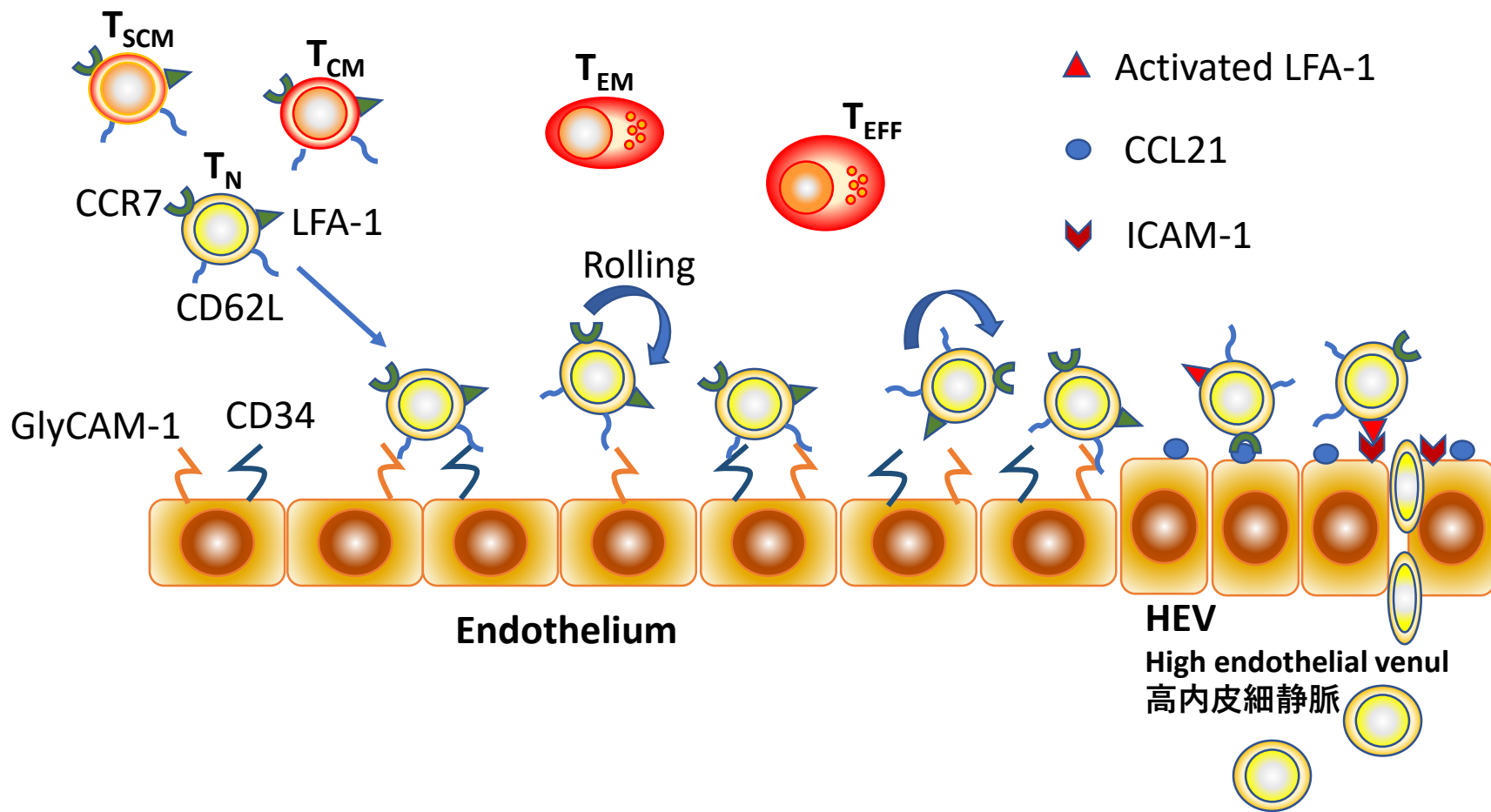
Surface antigens	CD4				CD8			
	T _N	T _{SCM}	T _{CM}	T _{EM/EFF}	T _N	T _{SCM}	T _{CM}	T _{EM/EFF}
CD45RA	+	+	-	-	+	+	-	+/-
CD27	+++	+++	++	+/-	+++	+++	++	+/-
CD28	++	+++	+++	+/-	++	+++	+++	+/-
CCR7	+++	+++	++	-	+++	+++	++	-
CD62L	+++	++	++	-	+++	+++	++	-
CD45RO	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-
CCR5	-	+	+	+++	-	+	++	+++
FAS	-	++	+++	++	-	++	+++	++
IL18R	-	+	++	+++	-	++	++	+++
HLA-DR	-	+	+	++	-	+	+	++

CD45 isoforms

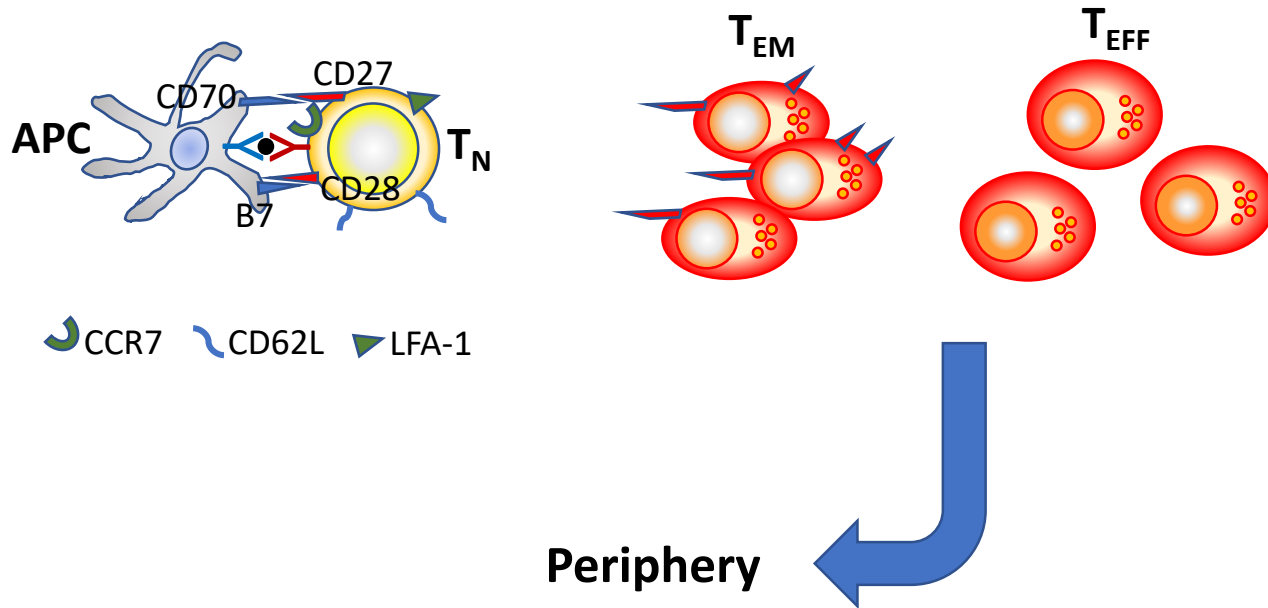
CD45 exons	3	4	5	6	7
bp	27	198	141	144	68



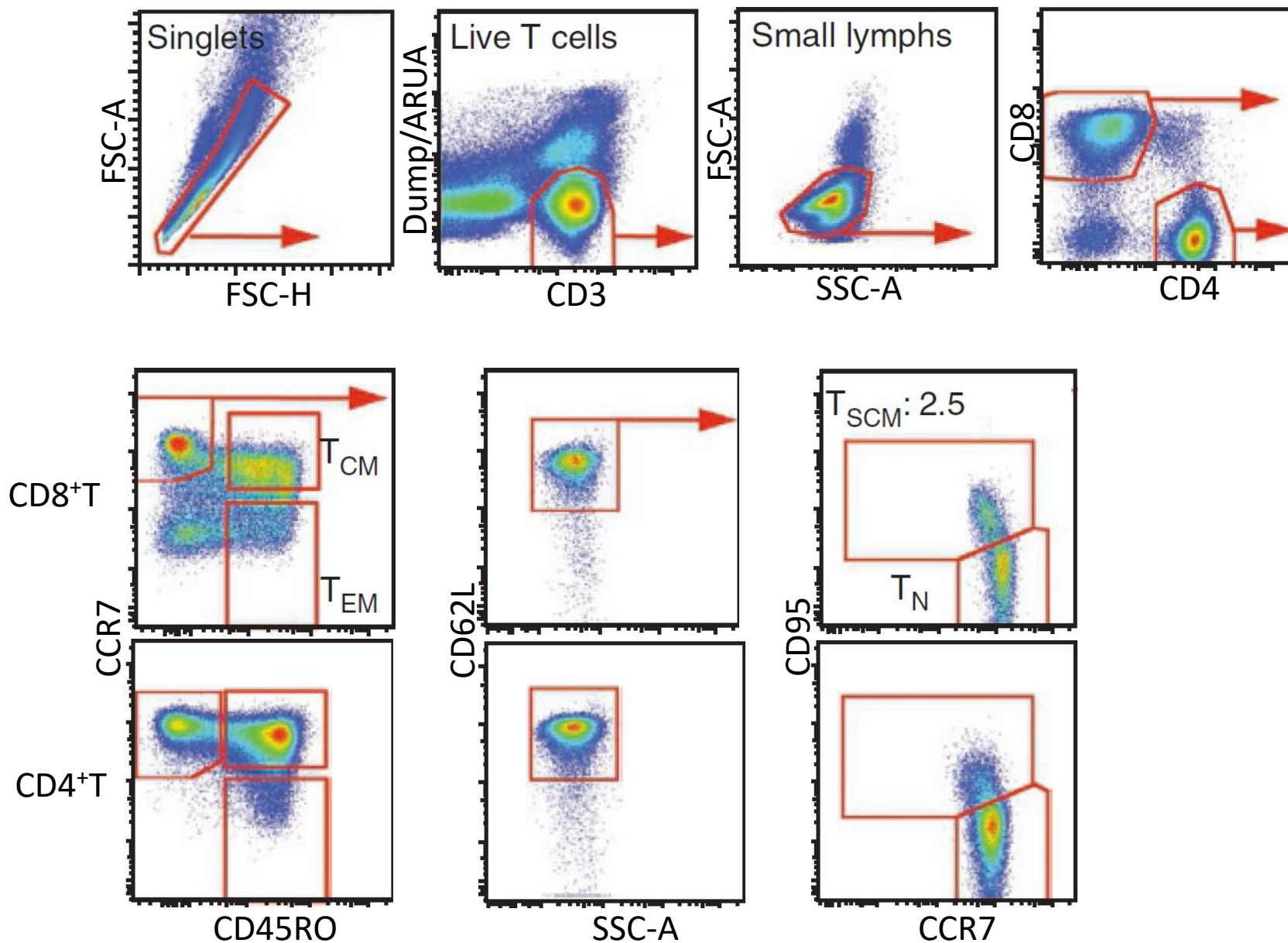
T細胞のリンパ節へのホーミング機序



副刺激分子 CD27, CD28 を介した抗原認識と homing receptor CCR7, CD62Lの消失



メモリーT細胞の解析方法 (TSCM の測定)



メモリーT細胞の解析例

使用抗体

Specificity	Clone	Fluorochrome	Manufacture	Cat number	uL
CD3	UCHT1	PerCP-Cy5.5	BD	560835	2
CD4	SK3	BUV496	BD	564651	2
CD8	SK1	APC-H7	BD	560179	2
CCR7	G043H7	BV421	Biolegend	353208	2
CD28	CD28.2	APC	BD	559770	2
CD45RO	UCHL1	BV395	BD	564291	2
CD95	DX2	FITC	BD	556640	2
CD62L	Dreg-56	PE	BD	555544	2

サンプル

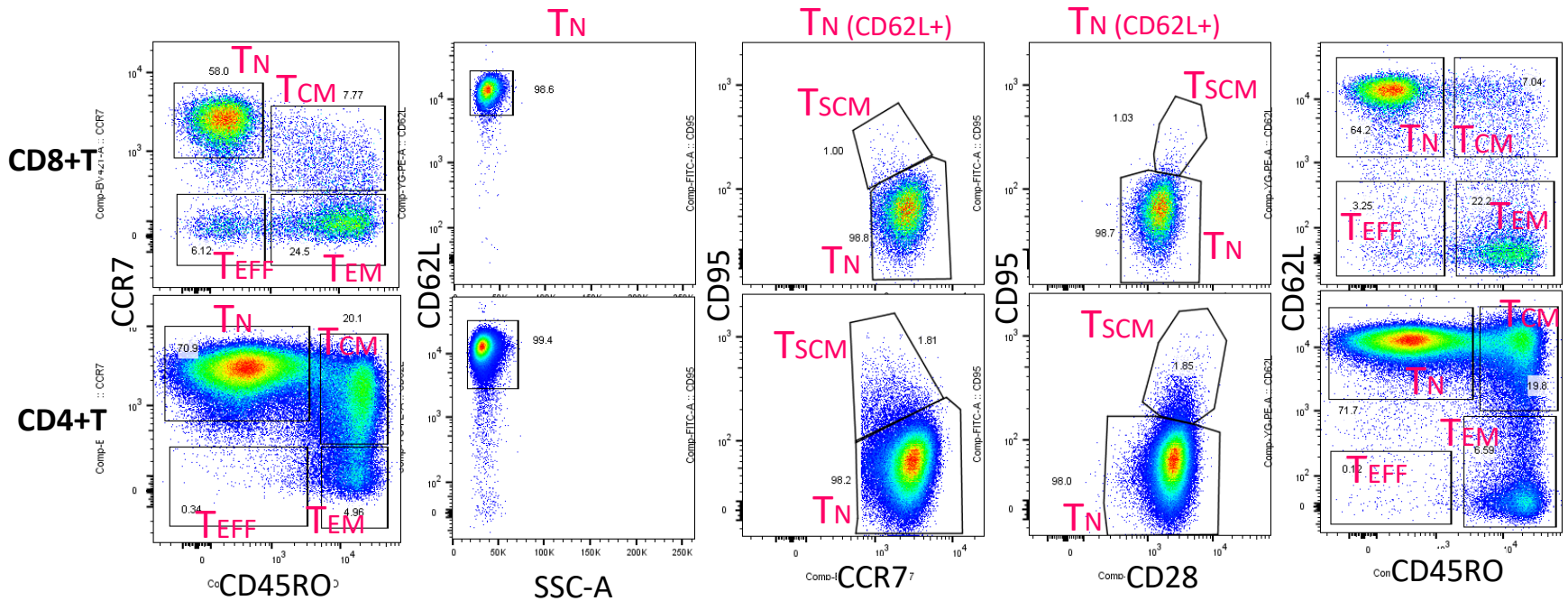
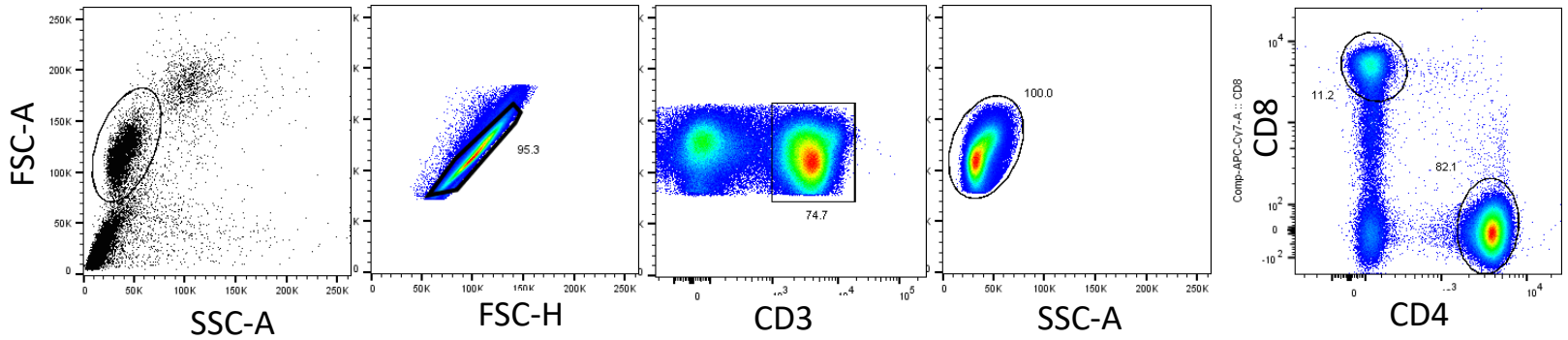
健常人由来 末梢血単核球 (PBMC)

注) CD62L は時間経過とともに細胞表面から脱落するので採血直後に分離し、使用する。

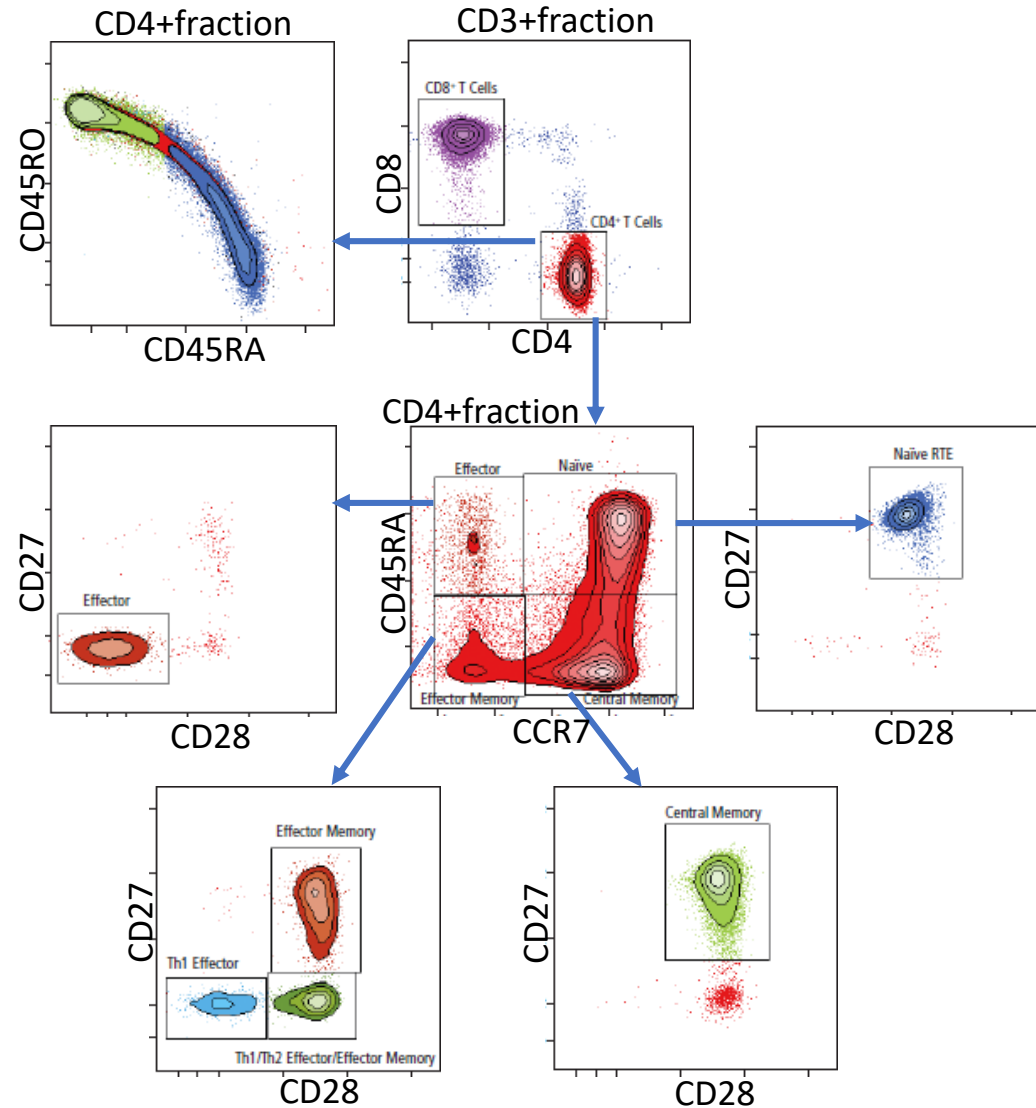
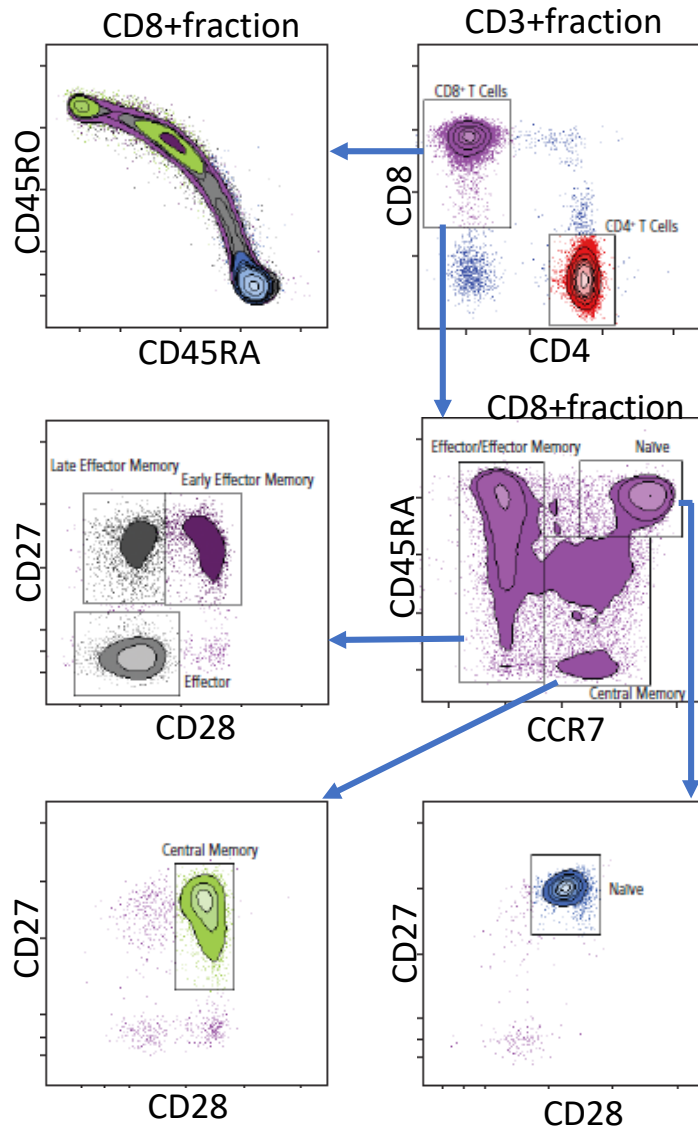
抗体とサンプルの反応

PBMC を 5×10^5 /30uL in PBS (0.2% HAS, 2mM EDTA) に調整し、各抗体(CD3, CD8, CD28, CD62L) を2uL ずつ加え、4°Cで20分反応後、500mL Brilliant stain bufferで洗浄。遠心(300Xg 2分) 後、上清を吸引。各抗体 (CD4, CD45RO, CCR7)を2uL ずつ加え、4°Cで20分反応後、500mL PBS (0.2% HAS, 2mM EDTA)洗浄。遠心(300Xg 2分) 後、上清を吸引。500uL PBS (0.2% HAS, 2mM EDTA) で懸濁後、Fortssa で測定。

メモリーT細胞の解析例 (続き)



メモリーT細胞の解析方法 (CD27,28 を用いたT_{EM/EFF}の細分化)



BD Fortessa による多重蛍光測定

免疫研究に重要なT細胞サブセットの解析には、多くの抗原を同時に検出する必要があるため、今後マルチカラー(18色)対応の本機器の活用が期待される。



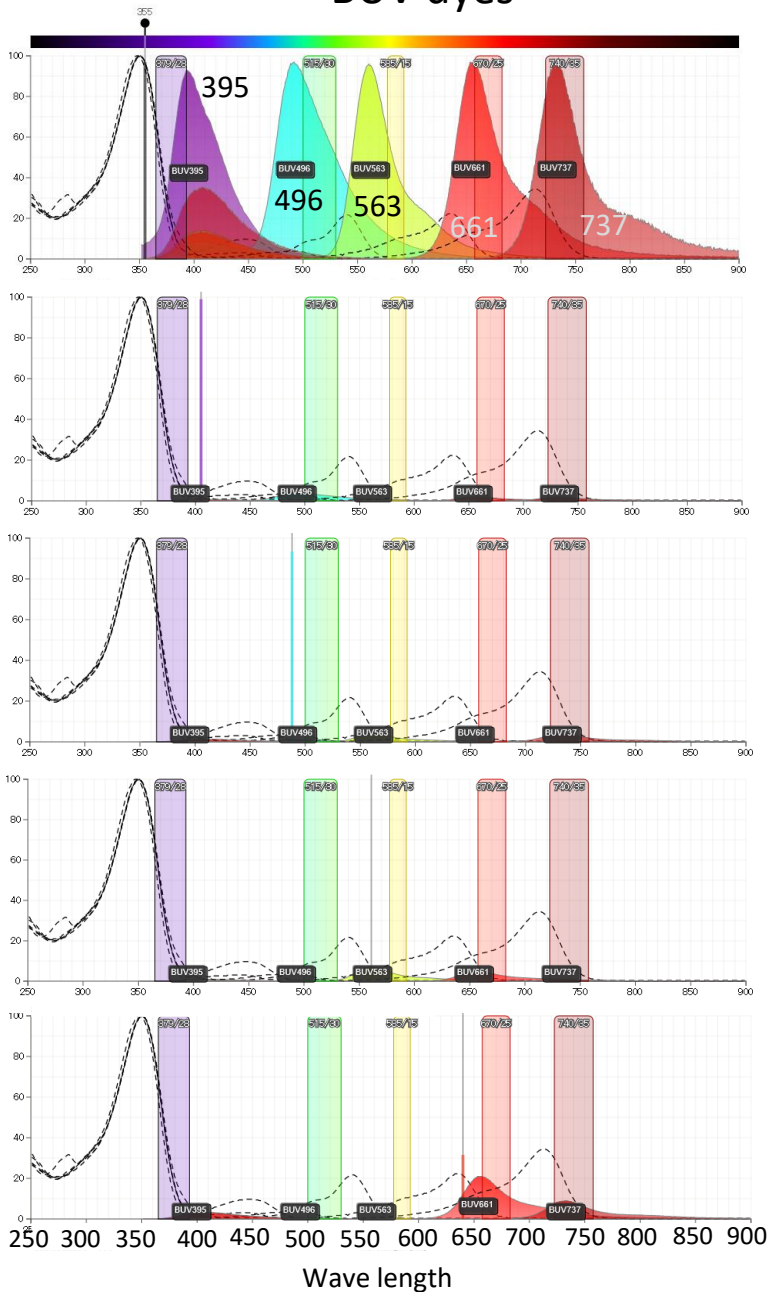
BD Fortessa で使用できる蛍光色素一覧

Excitation Laser	Fluorochromes	Emission	Filter
UV 355nm	BUV395	395nm	379/28
	BUV496	496nm	515/30
	BUV563	560nm	585/15
	BUV615	616nm	610/20
	BUV661	661nm	670/30
	BUV737	737nm	740/35
	BUV805	805nm	820/60
Violet 405nm	BV421, V450	421, 448nm	450/40
	BV480	478nm	470/15
	BV510, V500	510, 500nm	525/40
	BV605	602nm	610/20
	BV650	650nm	670/30
	BV711	711nm	710/50
	BV750	745nm	750/30
BV786	786nm	780/60	
Blue 488nm	FITC, Alexa488, BB515	519, 519, 515nm	530/30
	PerCP, PerCP-Cy5.5	678, 678,	670/30,710/50
	BB700	693nm	695/540
Yellow-Green 561nm	PE	578nm	586/15
	PE-CF594	612nm	610/20
	PE-Cy5	667nm	670/14
	PE-Cy7	785nm	780/60
Red 640nm	APC, Alexa647	660, 668nm	670/30
	APC-R700, Alexa700	704, 719nm	730/45
	APC-Cy7, APC-H7	785, 785nm	780/60

各蛍光色素の特性

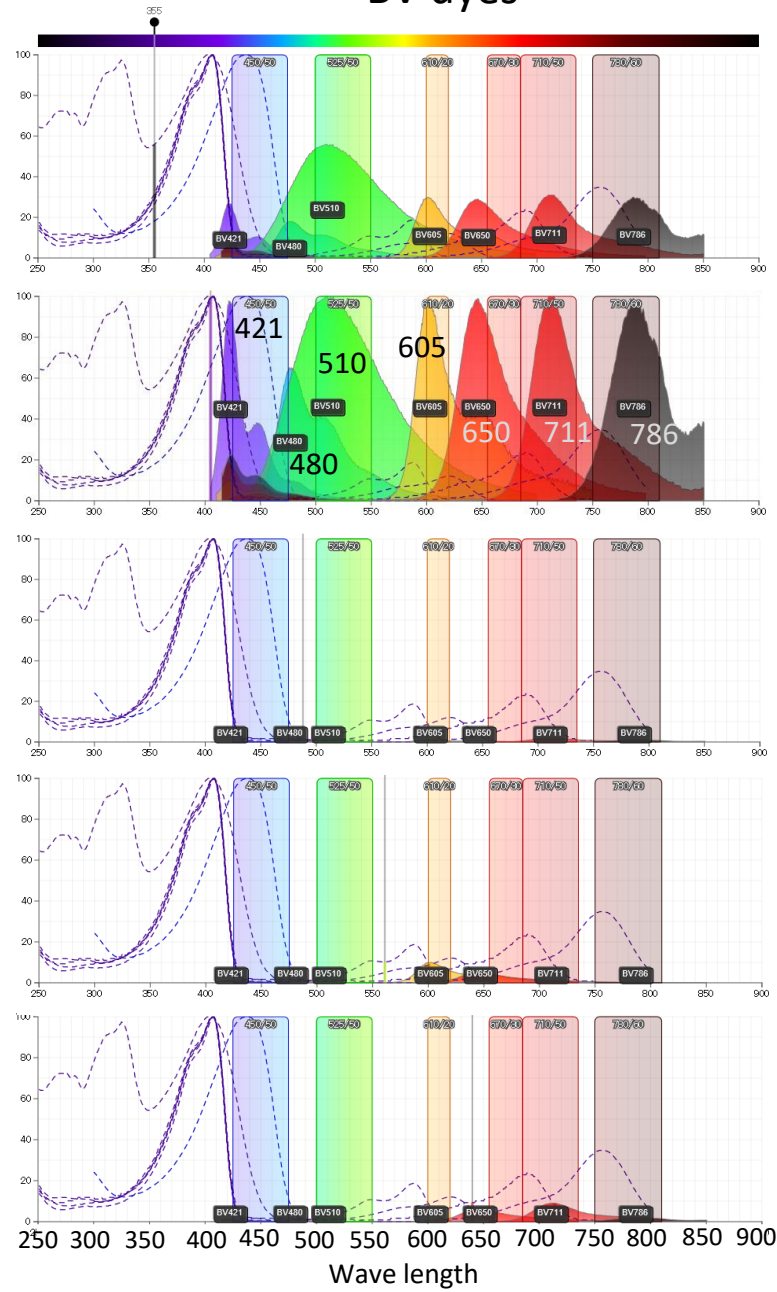
BD

BUV dyes



BD

BV dyes





Blue laser excitation dyes

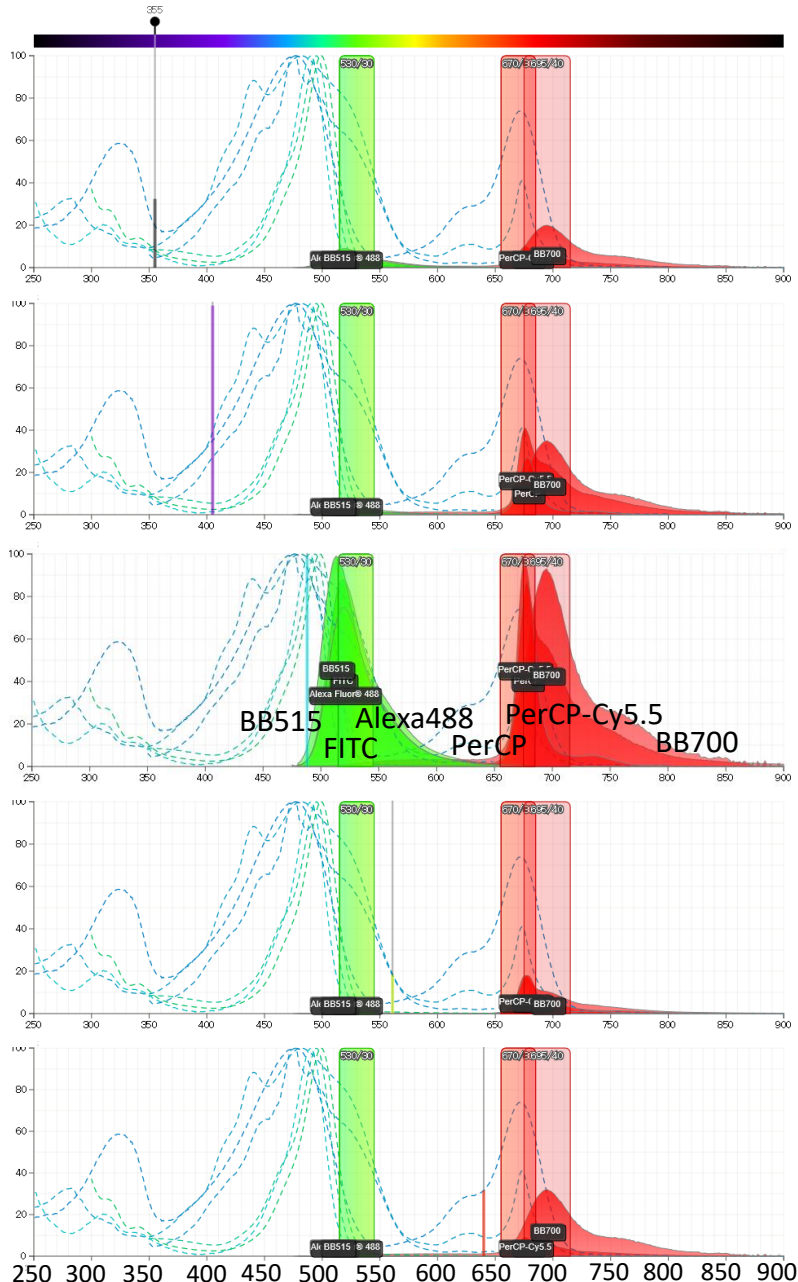
UV laser
355nm

Violet laser
405nm

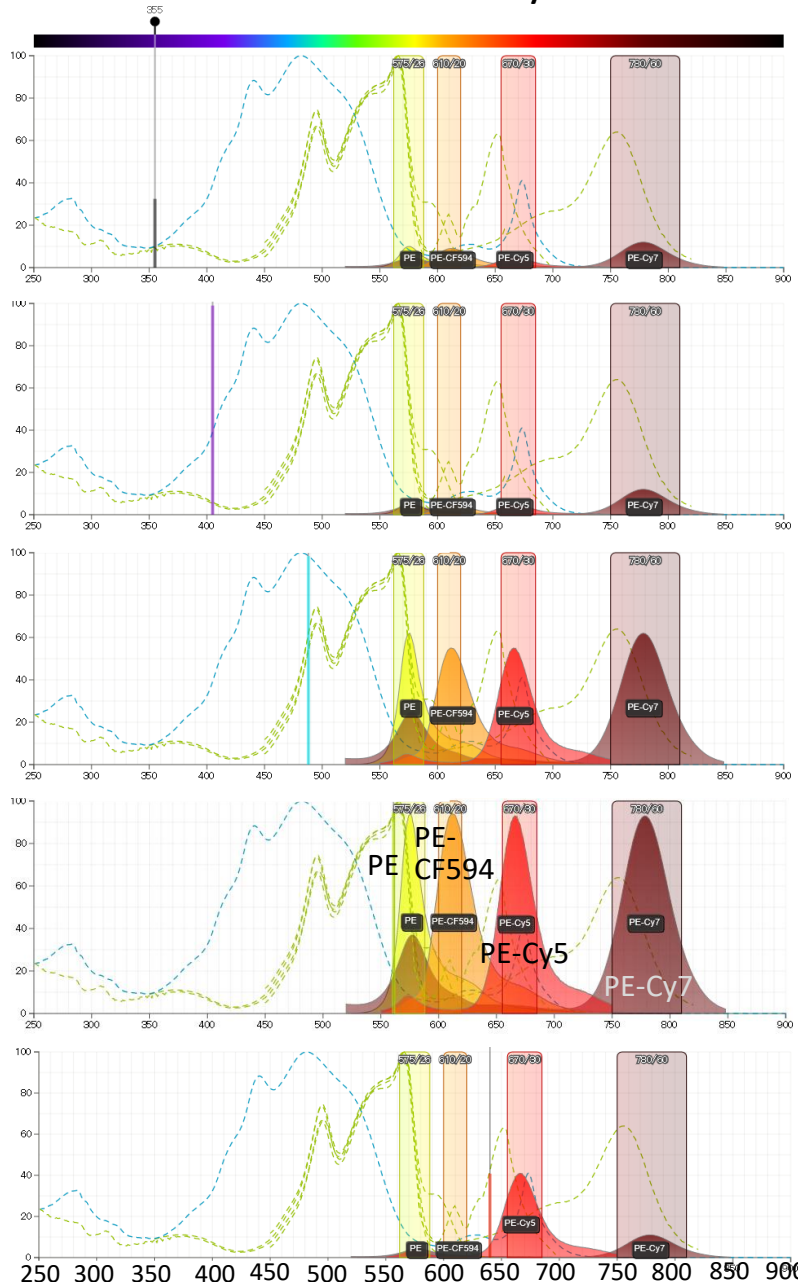
Blue laser
488nm

Yellow-green
laser
561nm

Red laser
640nm



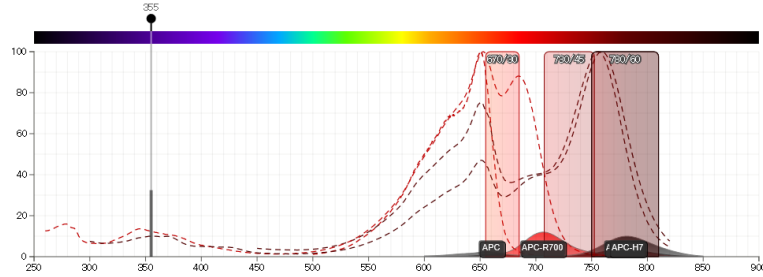
PE-tandem dyes



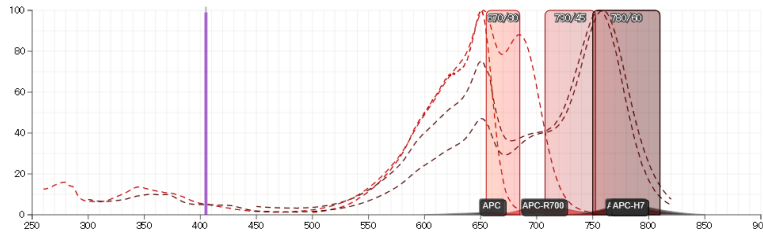


APC-tandem dyes

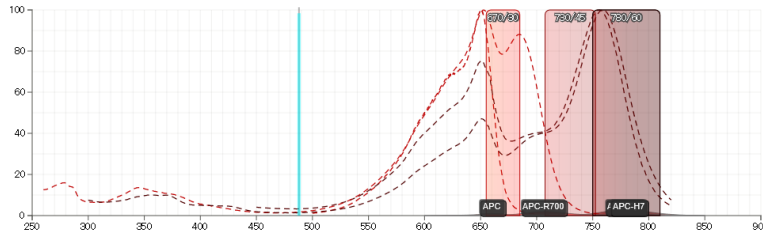
UV laser
355nm



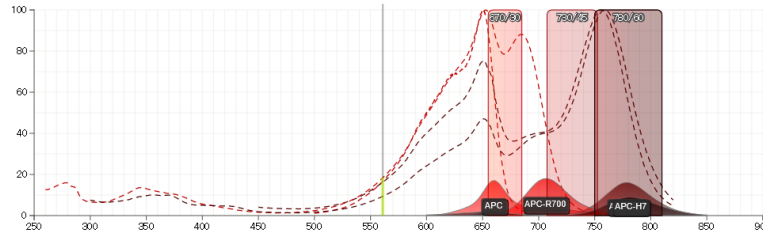
Violet laser
405nm



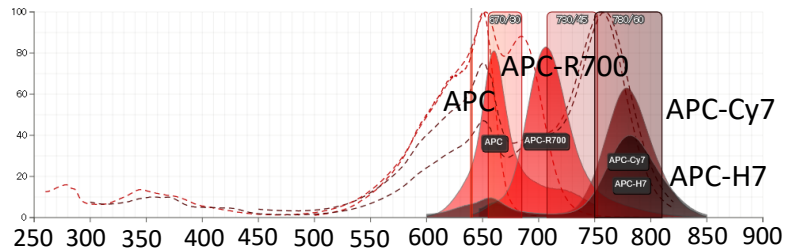
Blue laser
488nm



Yellow-green laser
561nm



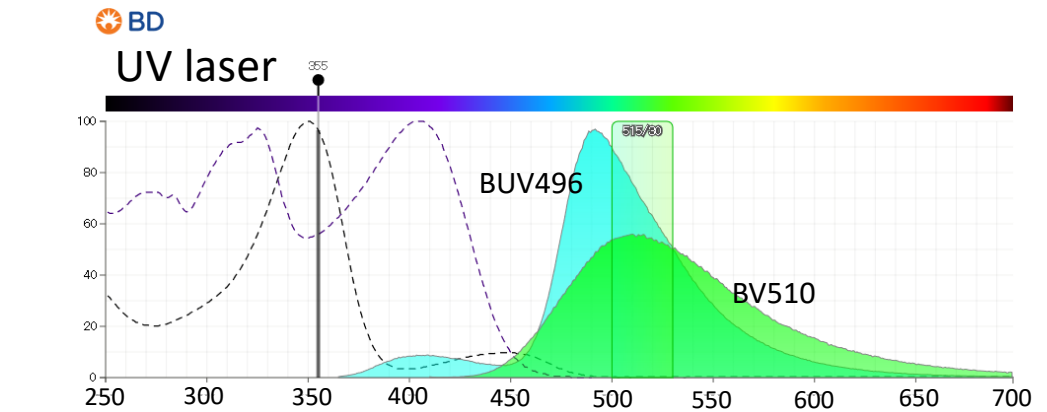
Red laser
640nm



励起波長が異なっても、蛍光の漏れ込みが顕著な蛍光色素の組み合わせ

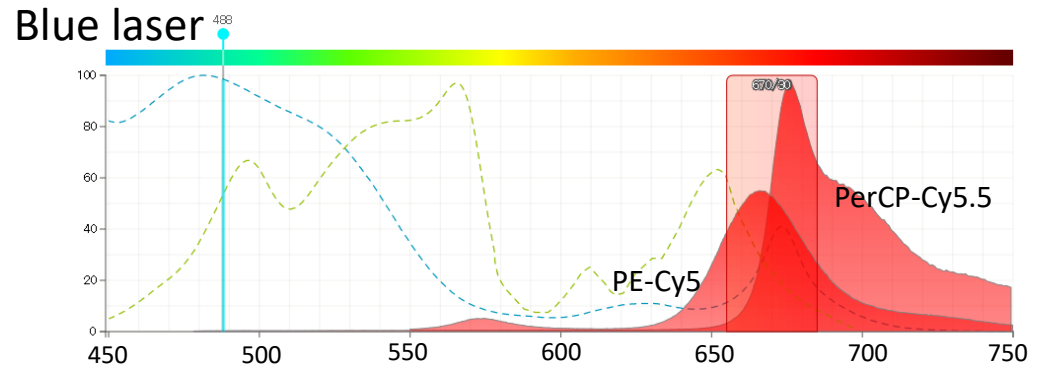
BUV496
(UV laser)

BV510
(BV laser)



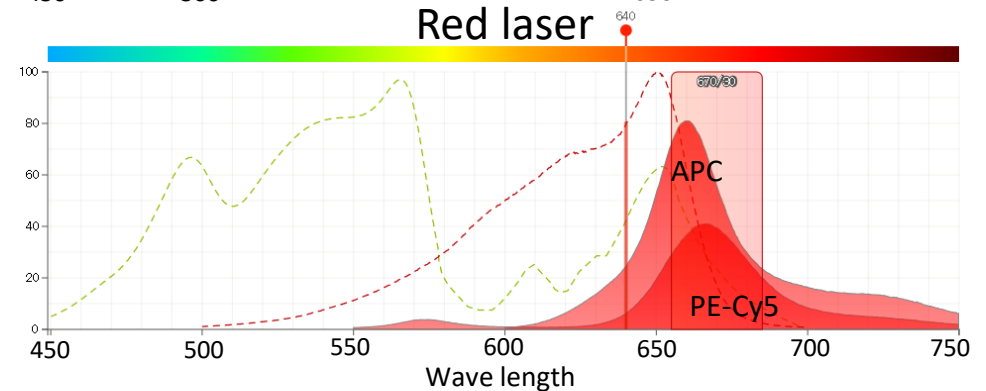
PerCP
PerCP-Cy5.5
(Blue laser)

PE-Cy5
(Green laser)



APC
(Red laser)

PE-Cy5
(Green laser)



健常人末梢血単核球を用いた T_{SCM} の測定手順

- 1) 健常人末梢血単核球(PBMC) を10e6/ml in PBS (0.2% HSA, 2mM EDTA) に調製する。
- 2) フローサイトメトリー用チューブを9本用意し、チューブにラベルをする (Tube1- Tube9)。
- 3) Tube1-8 に1) で調製したPBMC を200 ul ずつ分注する。Tube9 には、500 ul 分注する。
- 4) Tube1-8 にPBS (0.2% HSA, 2mM EDTA) を300 ul ずつ加える。
- 5) Tube1-9 を遠心 (1200rpm, 2 min, 4°C)
- 6) 上清を捨てる。
- 7) それぞれのチューブに抗体を2 ul ずつ加える。

Tube 1 : CD3-PerCP

Tube 2 : CD4-BUV496

Tube 3 : CD8-APC-H7

Tube 4 : CCR7-BV421

Tube 5 : CD28-APC

Tube 6 : CD45RO-BUV395

Tube 7 : CD62L-PE

Tube 8 : CD95-FITC

Tube 9 : CD3-PerCP

CD8-APC-H7

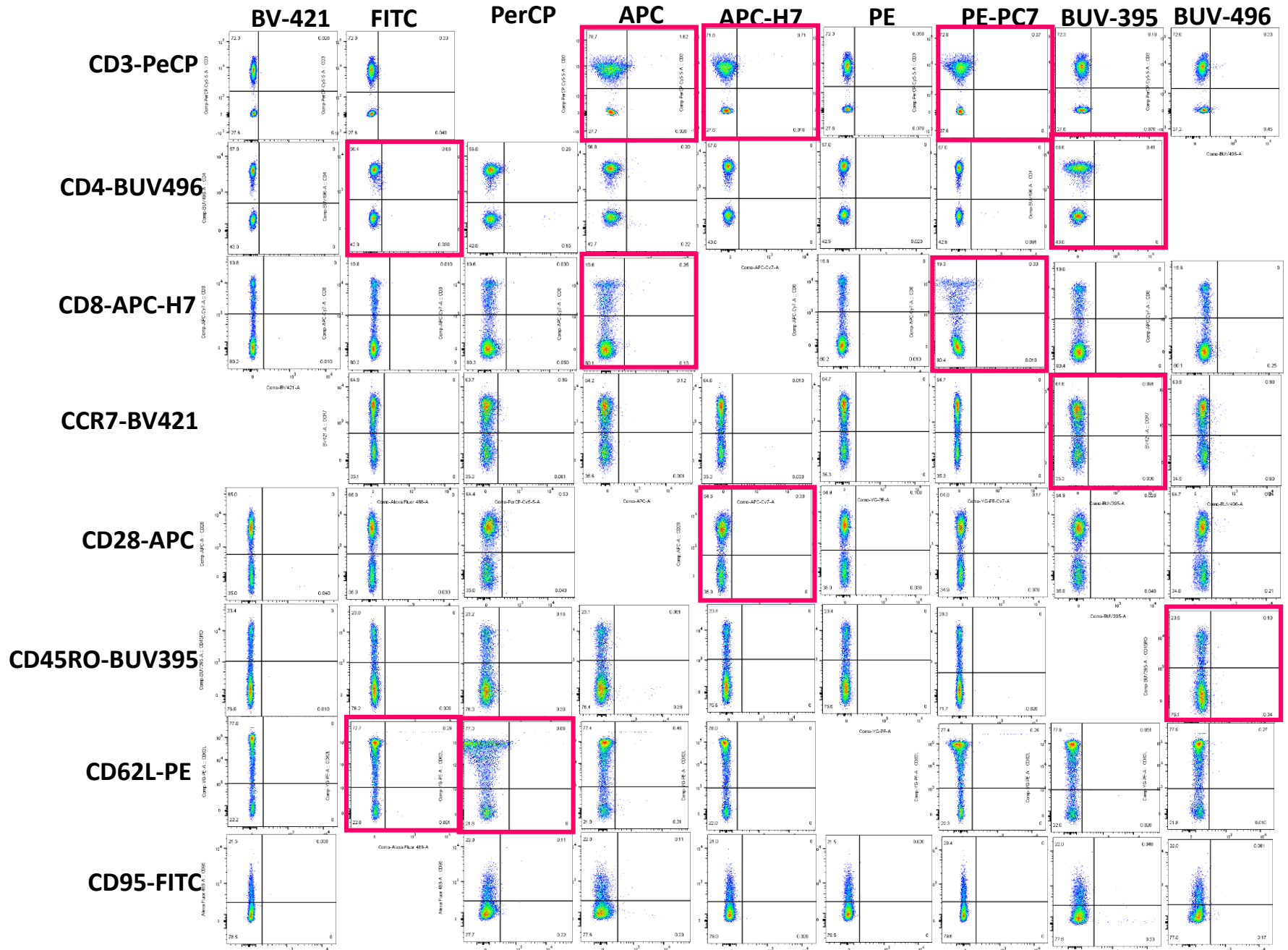
CD28-APC

CD95-FITC

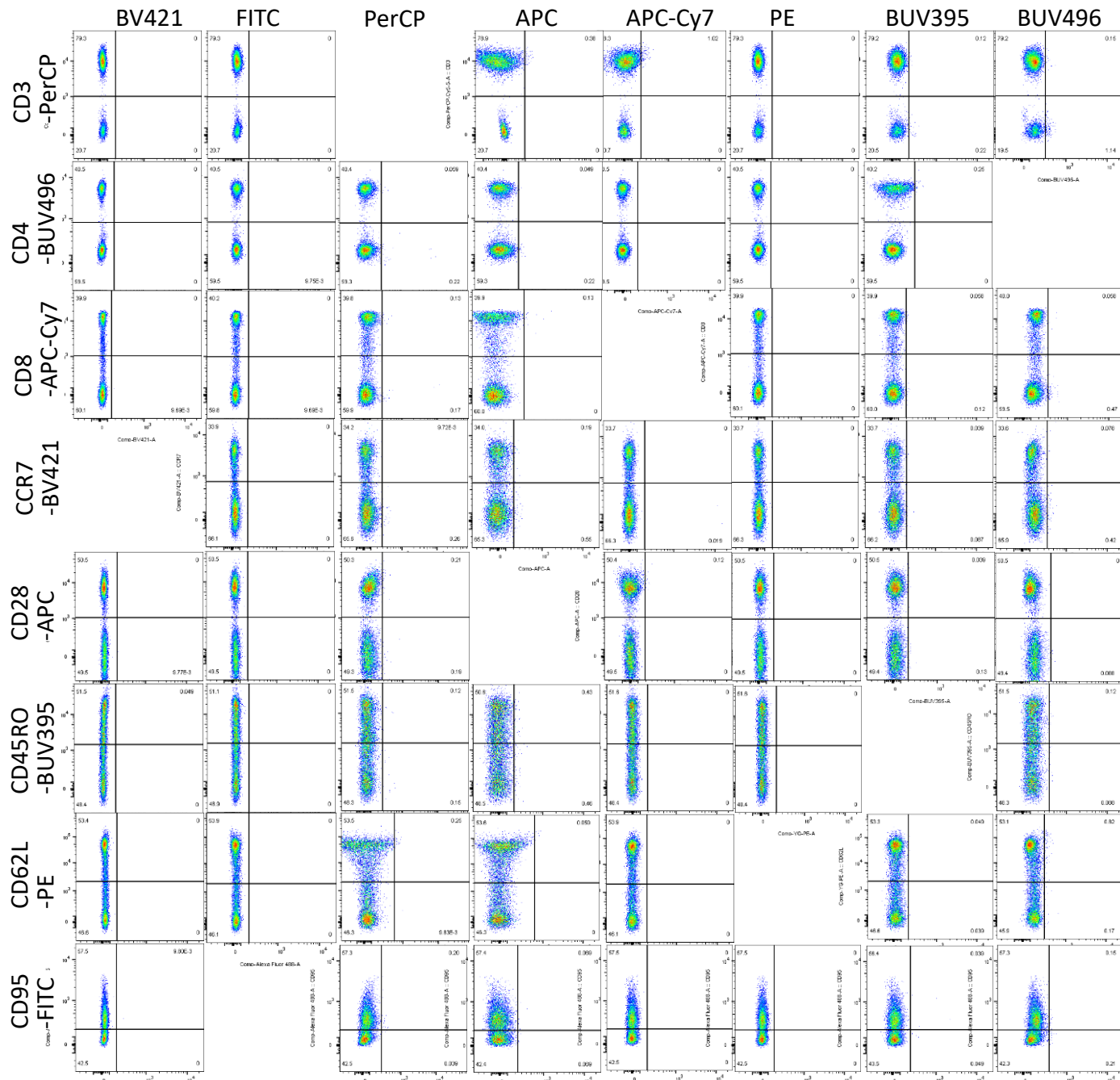
健康人末梢血単核球を用いた T_{SCM} の測定手順 (続き)

- 8) 攪拌後、冷蔵庫内で15 min 反応させる。
- 9) Tube 1-8 : PBS (0.2% HSA, 2mM EDTA) を500 ul 加える。
- 10) Tube 9 : Brilliant staining buffer を500 ul 加える。
- 11) Tube 1-9 : 遠心 (1200rpm, 2 min, 4°C)
- 12) 上清を捨てる。
- 13) Tube 1-8 : PBS (0.2% HSA, 2mM EDTA) を300 ul 加える (染色終了)。
- 14) Tube 9 : 下記の抗体を2 ul ずつ加える。
 - Tube 9 : CD4-BUV496
 - CD45RO-BUV395
 - CCR7-BV421
 - CD62-PE
- 15) 攪拌後、冷蔵庫内で15 min 反応させる。
- 16) PBS (0.2% HSA, 2mM EDTA) を500 ul 加える。
- 17) 遠心 (1200rpm, 2 min, 4°C)
- 18) PBS (0.2% HSA, 2mM EDTA) を500 ul 加える。
- 19) Tube 1-8 を使って蛍光補正をかける
- 20) Tube 1-8 を使って調整した蛍光補正值の下に、Tube 9 を測定する。

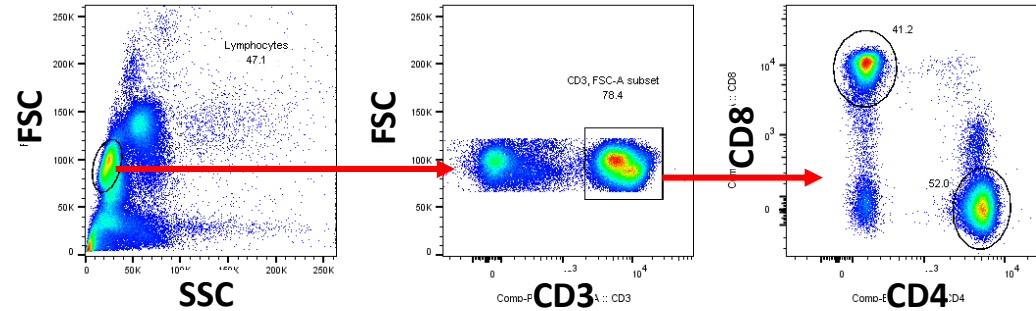
Tube1-8 を用いた蛍光補正 (補正後)



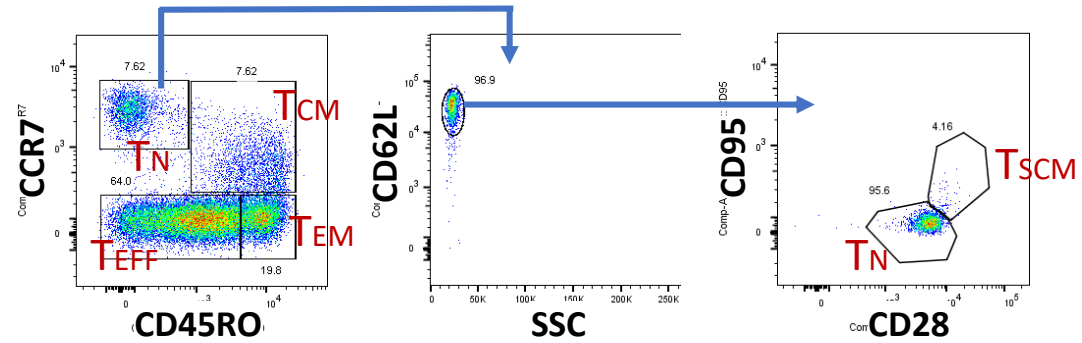
実技講習会時の蛍光補正後サイトグラム



実技用サンプルの測定結果



CD8⁺fr.



CD4⁺fr.

