

# FACSymphony™ フローサイトメーター 28 カラーパネルを用いた マウスリンパ組織および血液中の 様々な白血球集団のマッピング

## 要約

- さまざまな組織間で細胞組成を評価するための包括的な 28 カラーイムノフェノタイピングパネルを用いた
- FlowJo™ 解析用ソフトウェア v10 の細胞クラスタリングアルゴリズムによるシンプルかつロバストなデータ解析を行った
- 15 種類を超えるマウス白血球サブセットを高精度で識別した

シングルセルレベルのマルチパラメーター解析では、多様な感染症、血液疾患、免疫不全症候群、他の疾患におけるヘテロな細胞表現型の計数と特性評価が可能になります。

近年、マルチパラメーター細胞解析の著しい発展が腫瘍免疫学の分野で認められ、癌免疫療法における免疫応答の複雑で体系的な特性を理解する手段として用いられています。最近の測定試薬の開発と計測機器の進歩によって、マルチカラー解析によるシングルセルについてのデータ収集を多次的に行えるようになり、新しい治療法の発見と検証が加速しています。

本実験に用いる BD FACSymphony™ フローサイトメーターでは、1つのチューブ内で最大 28 カラー /30 パラメーターの同時解析が可能です。このアナライザーは、高輝度 BD Horizon Brilliant™ Blue、BD Horizon Brilliant Violet™、および BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 色素シリーズを検出できるため、柔軟なパネル設計が可能です。低発現抗原をより高感度で検出することができます。

本データシートでは、自然免疫と獲得免疫の両方で役割を果たすマウス白血球のさまざまなサブポピュレーションを識別し、その特徴を評価できるように設計された 28 カラーパネルについて説明します。このパネルは、さまざまなリンパ組織と血液中での細胞解析に利用できるように開発されました。



BD FACSymphony™ フローサイトメーター

本パネルに用いられているマーカーでは、B 細胞 (CD45R+ CD19+)、T 細胞 (CD3ε+ CD4+ または CD8α+)、ナチュラルキラー細胞 (NK、NK1.1+)、樹状細胞 (DC、CD11c+)、さらに単球、マクロファージ、好中球などの主要な細胞集団を識別できます。更に、その他のマーカーを用いて、これらの細胞集団をナイーブ T 細胞やメモリー T 細胞などのサブセットに区分できます。また、CD25と CD192については、それぞれ T 細胞と単球の細胞活性化の際に発現が上昇することが知られています。CD25 と CD127 も、制御性 T 細胞や B 細胞前駆細胞のサブセットの特性を評価するために用いられました。これらのマーカーを含む計27種類の抗体に加えて、BD Pharmingen™ 7-AAD を用いて、死細胞を区別し、解析の初期段階で除外しました (図 1A と 1B)。

図 1A

B Cells CD19 <sup>+</sup>			
Immature/ Transitional	Marginal Zone	Follicular	B-1a
B220 <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup>	B220 <sup>low</sup>
IgM <sup>high</sup>	IgM <sup>+</sup>	IgD <sup>high</sup>	CD43 <sup>+</sup>
CD93 <sup>+</sup>	CD21 <sup>high</sup>	CD23 <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup>

T Cells CD3ε <sup>+</sup>			
CD4 Naïve	CD8 Naïve	Central Memory	Effector Memory
CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD62L <sup>+</sup>	CD62L <sup>low</sup>
CD62L <sup>high</sup>	CD62L <sup>high</sup>	CD44 <sup>high</sup>	CD44 <sup>high</sup>

Dendritic Cells CD11c <sup>+</sup>		
Myeloid	Lymphoid	Plasmacytoid
IA/IE <sup>high</sup>	IA/IE <sup>high</sup>	IA/IE <sup>low</sup>
CD11b <sup>+</sup>	CD8α <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup>

Monocytes and Macrophages CD11b <sup>+</sup>	
Macrophages	Monocyte Subsets
Ly6C <sup>low</sup>	Ly6C <sup>high</sup>
F4/80 <sup>high</sup>	Ly6C <sup>low</sup>

NK Cells NK1.1 <sup>+</sup>	Neutrophils CD11b <sup>+</sup>
CD27 <sup>high/low</sup>	Ly6C <sup>low</sup>
CD11b <sup>high/low</sup>	Ly6G <sup>+</sup>
NKG2A <sup>+/+</sup>	

図 1B

Laser	Fluorochrome	Marker
Ultraviolet 355 nm 40 mW	BUV805	CD45R/B220
	BUV737	Ly6C
	BUV661	CD21
	BUV615	CD314/NKG2D
	BUV563	F4/80
	BUV496	IgD
Violet 405 nm 100 mW	BUV395	CD8α
	BV786	IgM
	BV750	CD25
	BV711	CD27
	BV650	CD23
	BV605	CD192
Blue 488 nm 100 mW	BV570	CD4
	BV480	IA/IE
	BV421	CD44
	BB790	NK1.1
	BB755	Ly6G
	7-AAD	live/dead
Yellow-Green 561 nm 150 mW	BB660	CD127
	BB630	CD11c
	BB515	CD62L
	SSC	
Red 628 nm 200 mW	PE-Cy™7	CD43
	PE-Cy™5	NKG2A/C/E
	PE-CF594	CD93
Red 628 nm 200 mW	PE	CD5
	APC-H7	CD19
	APC-R700	CD11b
Red 628 nm 200 mW	APC	CD3ε

図 1. さまざまなマウス組織の免疫細胞構成を解析するための 28 カラーパネル

A. リネージおよび分化マーカーの発現に基づく主要な白血球ポピュレーションの詳細。B. BD FACSymphony™ フローサイトメーター機器のレーザー構成と 28 カラーパネルで使用された蛍光標識抗体。

図 2 に記載のように処理した組織サンプルのデータを BD FACSDiva™ ソフトウェアで測定して、FlowJo™ 解析用ソフトウェアで解析しました。ダブレット除去と生細胞のゲーティングを行った後、骨髄、血液、脾臓およびリンパ節に由来する細胞をそれぞれ 10,000 イベントまで減らして 1 つのファイルに結合し、t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) 解析を実施しました (図 2A)。t-SNE で作成されたクラスターを任意に選択して、番号で示すようにアノテーションしました。その後、FlowSOM アルゴリズムを同一のデータセットに適用して、t-SNE マップに示す色分けしたクラスターを作成しました (図 2B)。

FlowSOM と t-SNE では、基本的に類似するクラスターが形成され、B 細胞、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、NK 細胞、骨髄系細胞など、5 種類の主な細胞クラスターが明らかになりました。各々の組織における細胞集団の分布を比較するために、個々のサンプルを統合データセットから作成した t-SNE マップで解析し、この方法から細胞の区画化が明らかになりました (図 2C と 2D)。例えば、骨髄系細胞の大部分が骨髄中に存在するのに対し、リンパ球集団では大部分が二次リンパ組織に局在していました。反対に、NK 細胞は、クラスター 1 内の小さな細胞分画と同様に、大部分が血液に存在することが認められました。

パネルのさまざまなマーカーの発現も、FlowSOM スパニングツリーで可視化できました。CD11b、NK1.1、CD19、および CD3ε の発現を解析したところ、スパニングツリー内での骨髄系細胞、NK 細胞、B 細胞、T 細胞の各局在が明らかになりました (図 2E)。t-SNE マップで観察された表現型と同様に、スパニングツリー内の各細胞リネージは、異なる局在性となりました。これにより主要な白血球集団の解析における BD FACSsymphony™ フローサイトメーターを用いた 28 カラーパネルの有効性が裏付けられました。

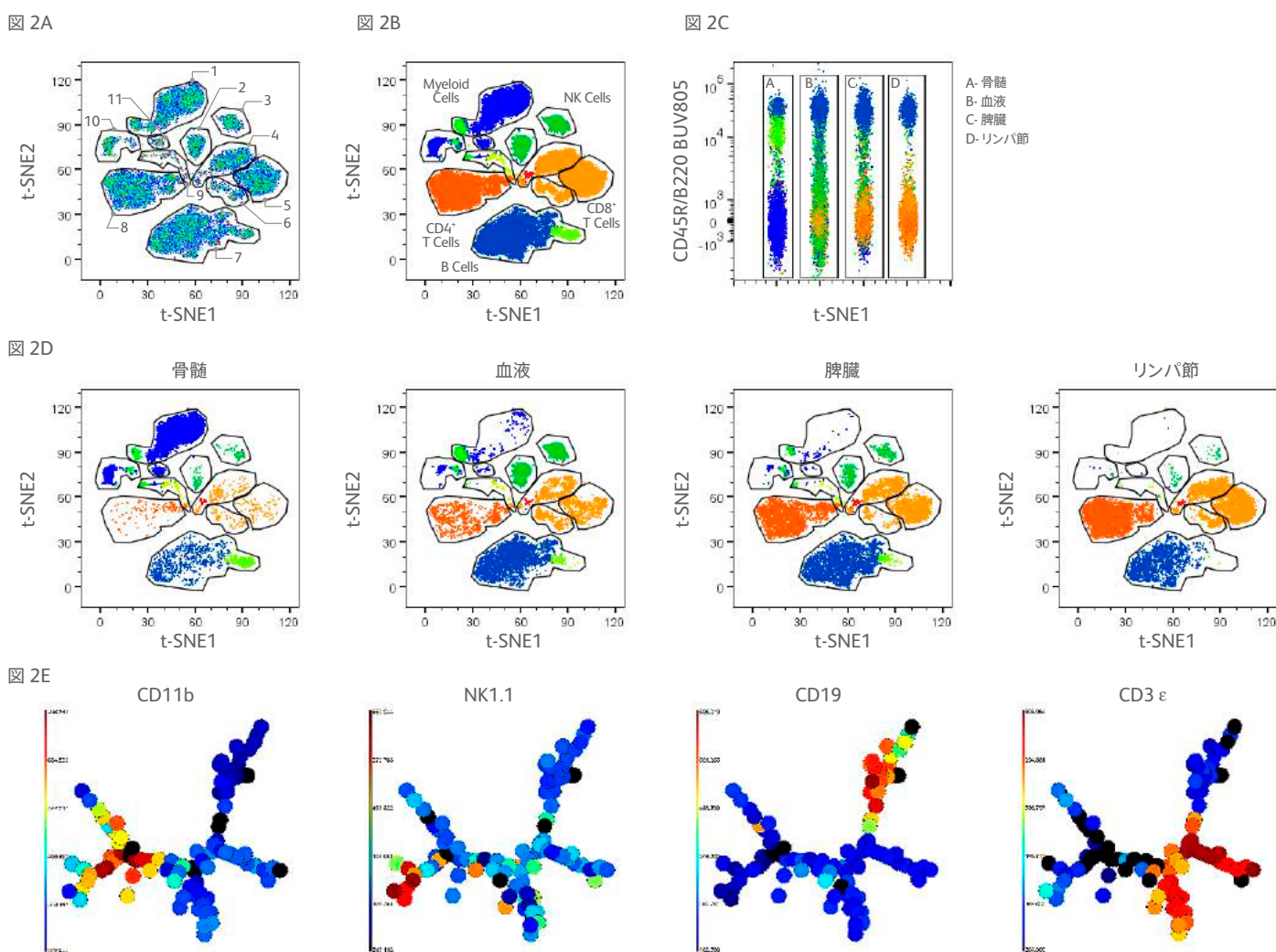


図 2. マウスの各組織にまたがる白血球集団の分布を示す自動細胞クラスタリング解析

C57BL/6 マウスの骨髄、血液、脾臓、およびリンパ節の細胞を、単一細胞懸濁液調製の標準プロトコールに従って処理しました。機械的な組織解離に加えて、脾細胞では Spleen Dissociation Medium (STEMCELL Technologies 社) で酵素処理もしました。BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer で赤血球を溶解した後、細胞を BD Pharmingen™ Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) を含む BD Pharmingen™ Stain Buffer (FBS) に再懸濁しました。その後、細胞に BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer Plus と図 1B に記載した 27 種類の抗体を含むカクテルを加えて水中で 30 分間遮光状態でインキュベートしました。BD FACSsymphony™ フローサイトメーターで細胞を収集する直前に、BD Pharmingen™ 7-AAD をサンプルに添加しました。A. FlowJo™ 解析用ソフトウェアでの細胞解析時に、ダブレットと死細胞 (7-AAD-陽性細胞) を除外し、各組織の生細胞 10,000 シングレットをプールした後、t-SNE 解析を実施しました。各クラスターは相対的な細胞密度を表現しています。B. FlowSOM ソフトウェアで作成した細胞クラスターに対応する色分けを、t-SNE マップに適用しました。C と D. 統合された個々の組織データをキーワードにより再区分し、統合データセットで作成した t-SNE マップでそれぞれ表示しました。E. FlowSOM スパニングツリーは主要なリネージマーカーの発現を示します。スパニングツリーにおけるヒートマップは、それぞれの組織で示されたマーカーの発現レベルを示しています。FlowJo™ 解析用ソフトウェア v10 は、FlowSOM のプラグインを実行することが可能です。<sup>1</sup>

これまでに示した解析結果のように、t-SNE による次元削減と FlowSOM によるクラスター解析は、血液とリンパ系組織に由来する細胞の表現型を幅広く比較することができました。もちろん同じデータを用いることで、従来からの 2 パラメータープロットによる各マーカーの染色性を評価することも可能です（図 3 と 4）。

この結果により、t-SNE と FlowSOM が想定された白血球サブポピュレーションを分離できるかどうかの判定を行いました（図 5）。その結果、図 3 と 4 に示したゲーティング手法を使用することで、t-SNE および FlowSOM で得られたクラスターが対応する免疫細胞サブセットを特定することができました。

図 3

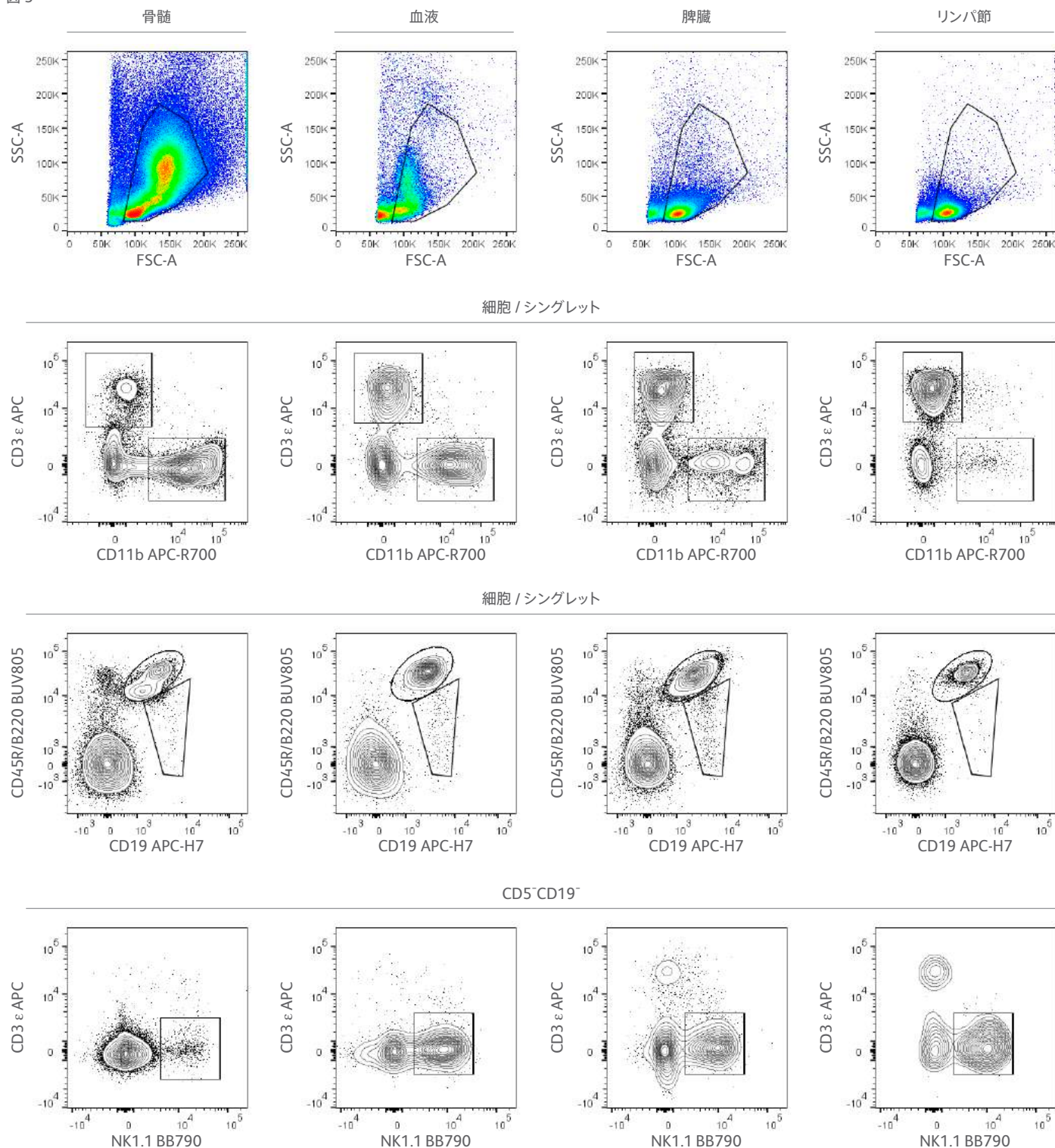


図 3. マウスの複数の組織における白血球集団の解析

図 2 に記載のように染色した細胞サンプルを、従来の手動ゲーティング法を用いて解析しました。CD11b<sup>+</sup> 骨髄系細胞、CD19<sup>+</sup> B 細胞、CD3ε<sup>+</sup> T 細胞、および NK1.1<sup>+</sup> NK 細胞の主要な免疫細胞集団を、プロット内に示したようにゲーティングしました。NK 細胞と同様に、CD5<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> 細胞内で DC 集団も解析しました（未掲載）。細胞サブセットをさらに解析するための連続的なゲーティングを、図 4 に示します。

リンパ系細胞集団の中で、T細胞をメモリーサブセットとナイーブサブセットに分け(図4A)、B細胞を未成熟/移行および成熟細胞のさまざまなサブセットに分けて解析しました。各B細胞サブセットでのIgDまたはCD21の発現解析で、これらの集団の表現型をさらに確認しました(図4B)。NK細胞内でCD11b<sup>high</sup>CD27<sup>low</sup>が最も多いサブセットであり、全NK細胞のごく一部がNKG2A/C/Eを高レベルで発現しましたが、NKG2Dの発現レベルは全体的に非常に低いものでした(図4C)。単球、マクロファージ、DC、好中球の骨髄系サブセットも、各組織で測定しました(図4D)。

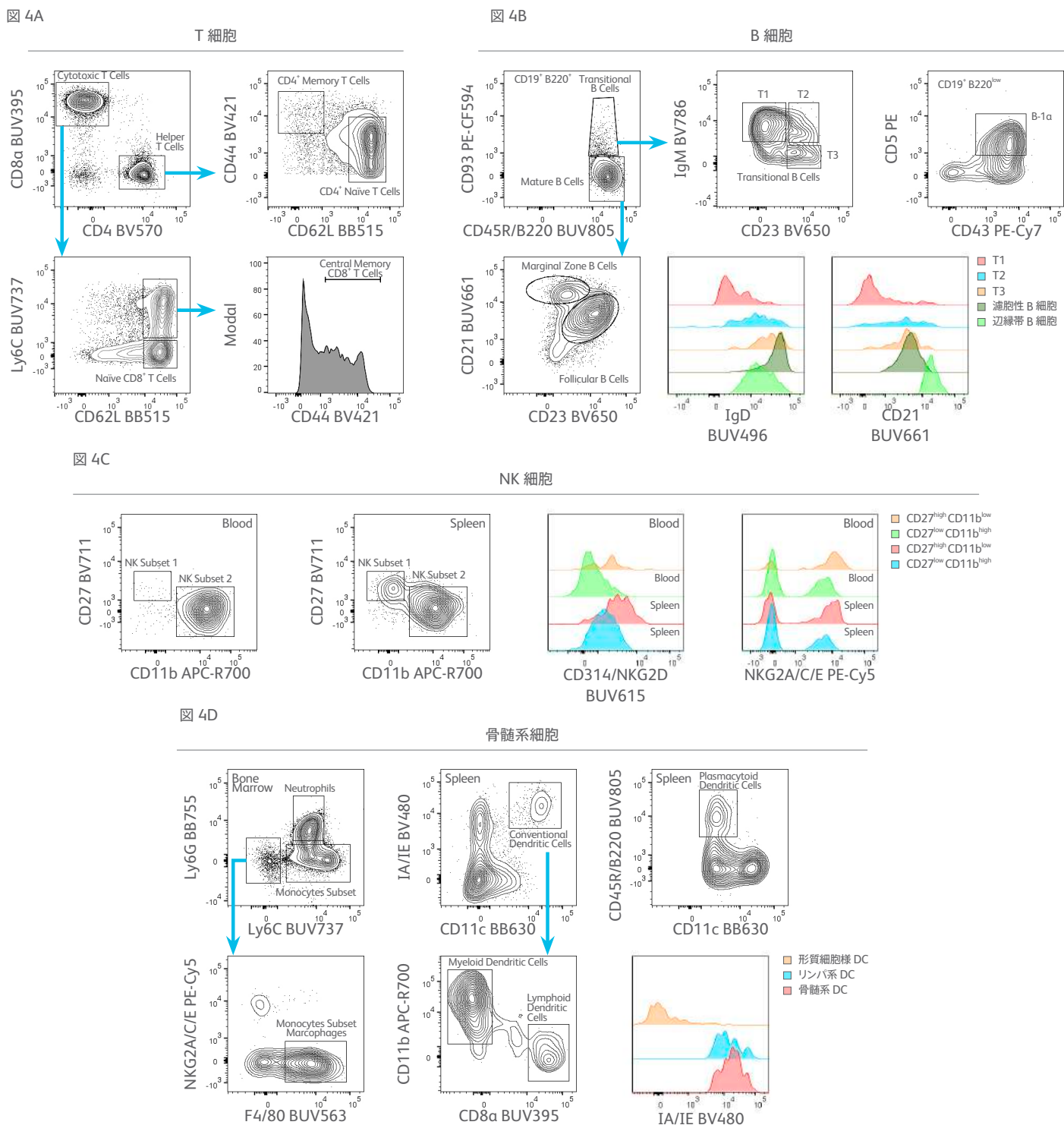


図 4. さまざまなマウス組織の白血球サブセットの解析

図 3 に記載のように、CD11b<sup>+</sup> 骨髄系細胞、CD19<sup>+</sup> B 細胞、CD3<sup>+</sup> T 細胞、NK1.1<sup>+</sup> NK 細胞および DC の主要な免疫細胞集団を最初に得ました。次に、追加の手動ゲーティングを用いて、骨髄、血液、脾臓、リンパ節の全 4 組織で示された細胞サブセットを区別しました。A. リンパ節の T 細胞サブセット。B. 脾臓の B 細胞サブセット。C. 血中および脾臓中の NK 細胞サブセット。D. 骨髄および脾臓中の骨髄系細胞サブセット。CD5<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> 細胞のゲート内で形質細胞様 DC サブセットを解析しました。

手動でゲーティングした集団を、前述の t-SNE マップに重ね合わせると、ゲーティングした細胞集団は t-SNE マップにおける個々のクラスタリング領域とそれぞれ対応しました (図 5A)。上記から、各組織データで t-SNE が主要な白血球集団の分離をカバーし、番号付けした細胞クラスター集団とそのサブpopulation名を対応させることができました (図 5B)。ただし、重要なこととして、手動ゲーティングでは分類されなかった細胞クラスターも t-SNE 解析では観察されたため (例えば、クラスター 6)、細胞集団を重ね合わせたものが t-SNE 解析での細胞のすべてに対応したわけではありません。クラスター 6 については、更に解析したところ、大部分が CD8<sup>+</sup> エフェクターメモリー T 細胞であることが示されました (データ未掲載)。

図 5A

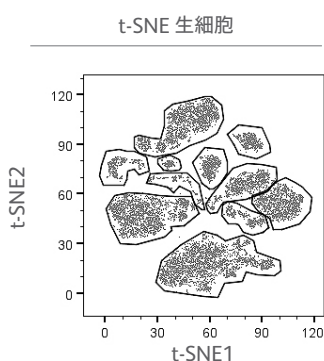


図 5B

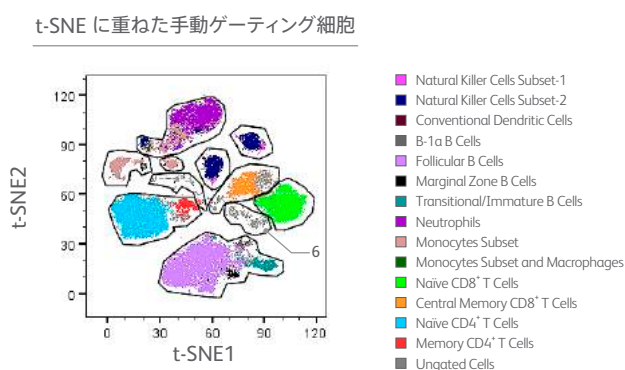


図 5C

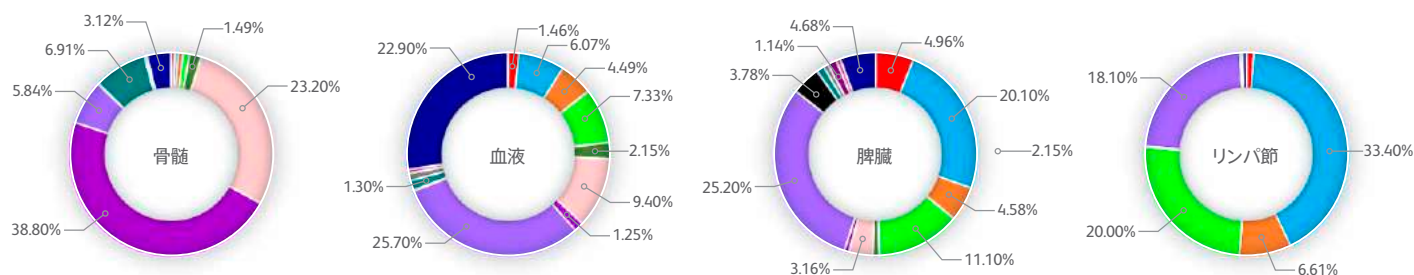


図 5.t-SNE または手動ゲーティング法による細胞集団の比較分離

A. 図 2 に記載のように、骨髄、血液、脾臓、リンパ節に由来する細胞を統合した後に作成した二次元 t-SNE マップ。B. プロットは、図 3 と 4 に記載のように手動でゲーティングし、t-SNE プロットに重ね合わせたさまざまな細胞集団の概要を示します。C. 個々の組織で示された細胞集団の頻度を示すドーナツグラフ。グラフの中で細胞の頻度が 1% を超えるものに注記しています。

以上の結果から、30 パラメーターの BD FACSymphony™ フローサイトメーターで 28 カラーパネルを用いた解析を行うことで、さまざまなマウスの白血球集団とサブpopulationの表現型プロファイルを包括的に解析できることが示されました。さらに FlowJo™ 解析用ソフトウェアで利用できる次元削減アプリケーションとクラスタリングアルゴリズムを用いると、多数の組織における細胞集団を明瞭に可視化し、自動で識別できました。重要なこととして、クラスタリングではあらかじめ予見された細胞集団を認識するだけでなく、手動ゲーティングでは区分できなかった細胞集団を検出できたことが挙げられます。つまり、この包括的なイムノフェノタイピングパネルは、特徴が明確な白血球集団を識別することができるだけでなく、このような包括的な細胞表現型を発見できる可能性があることを示しています。

# 製品リスト

## 機械

### 製品名

BD FACSymphony™ フローサイトメーター

## 試薬

### 製品名

### カタログ番号

BD Pharmingen™ APC-H7 Rat Anti-Mouse CD19	560143
BD Pharmingen™ APC Hamster Anti-Mouse CD3ε	553066
BD Pharmingen™ PE Rat Anti-Mouse CD5	553022
BD Horizon™ APC-R700 Rat Anti-CD11b	564985
BD Horizon™ PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD93 (Early B Lineage)	563805
BD Pharmingen™ PE-Cy™ 7 Rat Anti-Mouse CD43	562866
BD Horizon™ BB515 Rat Anti-Mouse CD62L	565261
BD Horizon™ BV480 Rat Anti-Mouse I-A/I-E	566086
BD Horizon™ BV421 Rat Anti-Mouse CD44	563970
BD Horizon™ BUV395 Rat Anti-Mouse CD8α	563786
BD Horizon™ BV786 Rat Anti-Mouse IgM	564028
BD OptiBuild™ BV711 Hamster Anti-Mouse CD27	740699
BD OptiBuild™ BV650 Rat Anti-Mouse CD23	740456
BD OptiBuild™ BV605 Rat Anti-Mouse CD192 (CCR2)	747969
BD OptiBuild™ BUV805 Rat Anti-Mouse CD45R/B220	748867
BD Horizon™ APC-R700 Mouse Anti-Human CD27 Clone M-T271	565116

## 試薬

### 製品名

### カタログ番号

BD OptiBuild™ BUV563 Rat Anti-Mouse F4/80	749284
BUV737 Rat Anti-Mouse Ly6C	Custom
BUV661 Rat Anti-Mouse CD21	Custom
BUV615 Rat Anti-Mouse CD314 (NKG2D)	Custom
BUV496 Rat Anti-Mouse IgD	Custom
BV750 Rat Anti-Mouse CD25	Custom
BV570 Rat Anti-Mouse CD4	Custom
BB790 Mouse Anti-Mouse NK1.1	Custom
BB755 Rat Anti-Mouse Ly6G	Custom
BB660 Rat-Anti-Mouse CD127	Custom
BB630 Hamster Anti-Mouse CD11c	Custom
PE-Cy5 Rat Anti-Mouse NKG2A/C/E	Custom
BD Pharmingen™ 7-AAD	559925
BD Pharmingen™ Stain Buffer (FBS)	554656
BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer	555899
BD Pharmingen™ Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)	553142
BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer Plus	566385

Class 1 Laser Product.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Cy™ is a trademark of GE Healthcare. Cy™ dyes are subject to proprietary rights of GE Healthcare and Carnegie Mellon University, and are made and sold under license from GE Healthcare only for research and in vitro diagnostic use. Any other use requires a commercial sublicense from GE Healthcare,

800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08855-1327, USA.

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/](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

