

Amnis™ ImageStream™ Mk II イメージングフローサイトメーターによる 免疫細胞の機能測定

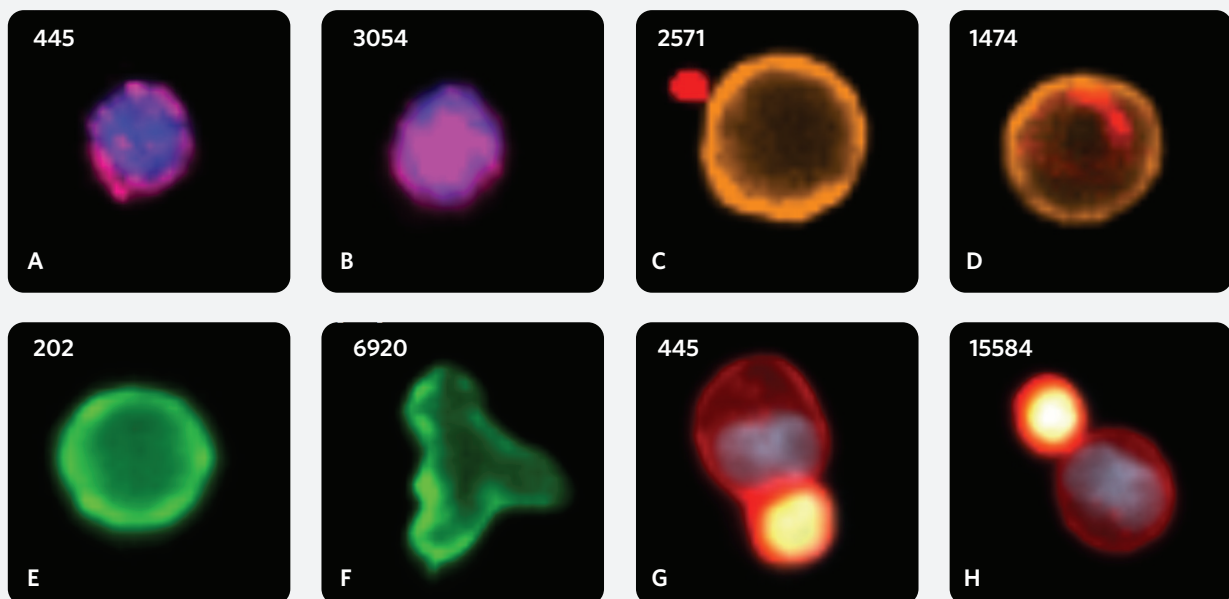
はじめに

自然免疫系や獲得免疫系に属する細胞群は、自己抗原に対する寛容を維持しながら、病原体から宿主を防御します。これらの免疫機能に調節不全が生じると、感染症や自己免疫疾患を引き起こす可能性があります。免疫細胞は炎症性メディエーターへの結合やプロセッシング、あるいは他の細胞との直接的な相互作用によって生体内環境を感知し、シグナル伝達やその活性化、または機能の抑制をもたらします。

免疫機能のメカニズムを研究する多くのアッセイは、イメージングを必要としますが、免疫細胞は細胞数が少なく、マルチスペクトルで複数の細胞種を同時に解析することは困難な場合があるため、統計的に堅牢な定量化が難しいとされています。しかし、Amnis™ ImageStream™ Mk II イメージングフローサイトメーターは、細胞集団から各細胞像を取得し画像情報を定量化できるため、ハイス

ループットの免疫機能アッセイを実行するのに最適な装置です。このアプリケーションノートでは、Amnis ImageStream™ Mk II イメージングフローサイトメーターを用いて測定できる免疫機能アッセイのいくつかの例を示します。その中には、全血細胞におけるNFκBの局在解析(図1A、1B)、形質細胞様樹状細胞(pDC)へのウイルスDNAの取り込み(図1C、1D)、ケモカインによる単球の形態変化(図1E、1F)、T細胞とAPCの免疫シナプス形成(図1G、1H)が含まれます。これらの結果は、さまざまな免疫機能アッセイを実施できるAmnis ImageStream™ Mk IIの独自のパフォーマンスを示しています。

図1. Amnis™ ImageStream™ Mk II による免疫機能アッセイの代表的な画像



二本鎖のウイルスDNAが形質細胞様樹状細胞 (pDC) に結合すると、強力な抗ウイルス応答が誘導され、大量のIFN- α の分泌を引き起こします。まず、ヒトpDCsにおけるCy5標識CpGBの内在化 (y軸) およびトラフィック (x軸) を、Amnis ImageStream[®] Mk II システムを使用して測定しました (図2)。ここでは、血中の樹状細胞マーカー (BDCA2) を用いてゲーティングしたpDCsを分析しています。測定の結果、時間経過とともにx軸のCD71/CpGBのBD Similarityスコアが大きくなる細胞 (図2A-2C) が増加していることから、CD71で標識されたエンドソームにCpGBの局在が移行していきることが分かりました。また、図2D-2Fの結果では、x軸のCD107a/CpGBのBD Similarityスコアが時間経過とともに大きくなる細胞が増加したことから、CD107aで標識されたリソソームにCpGBの局在が移行していきことが分かりました。これらの結果から、CpGBはエンドソームからリソソームに局在が移行することが示唆されました。示されたゲート内の細胞の代表的な画像を示しています。(図2G-2I)。

図2. ヒト形質細胞様樹状細胞内でのCpGBの内在化とトラフィック

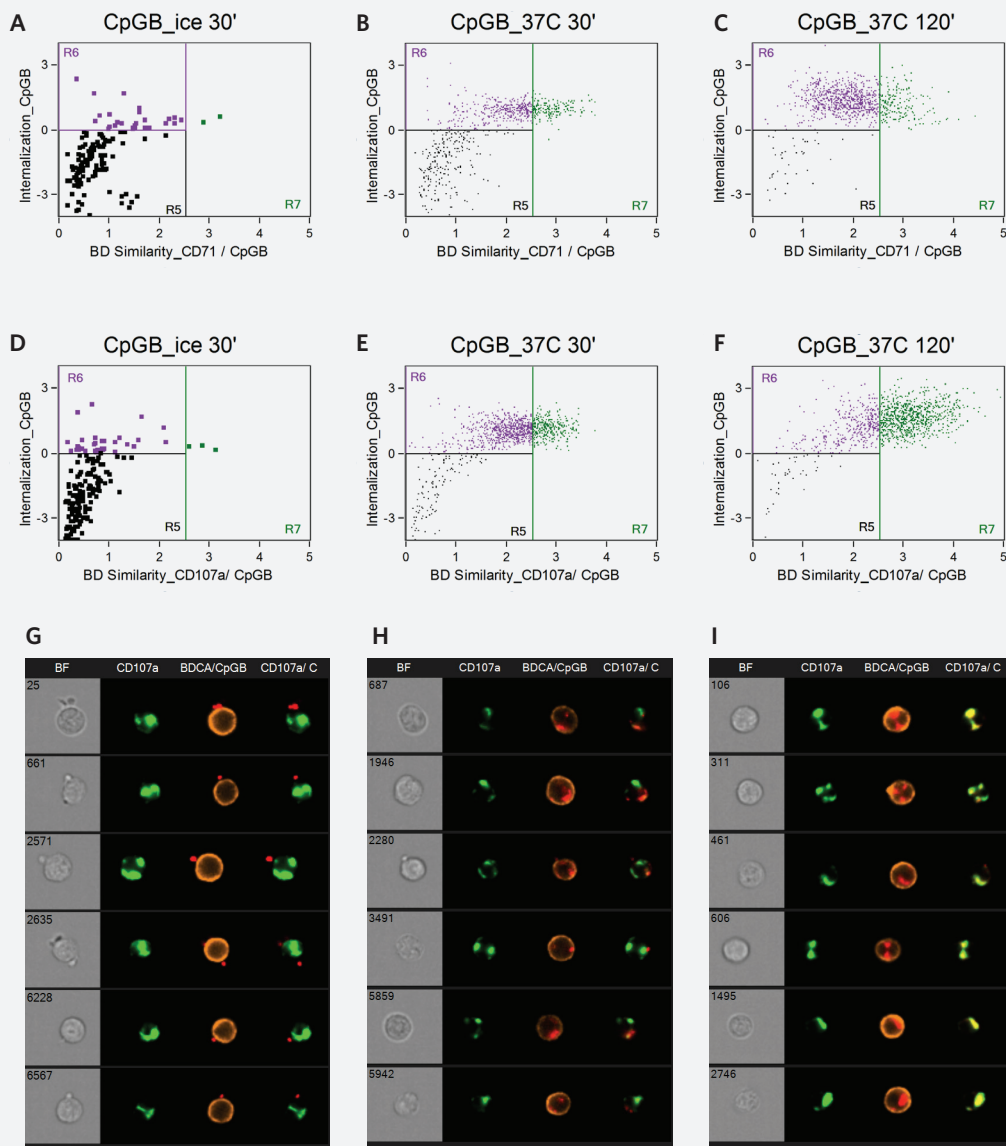
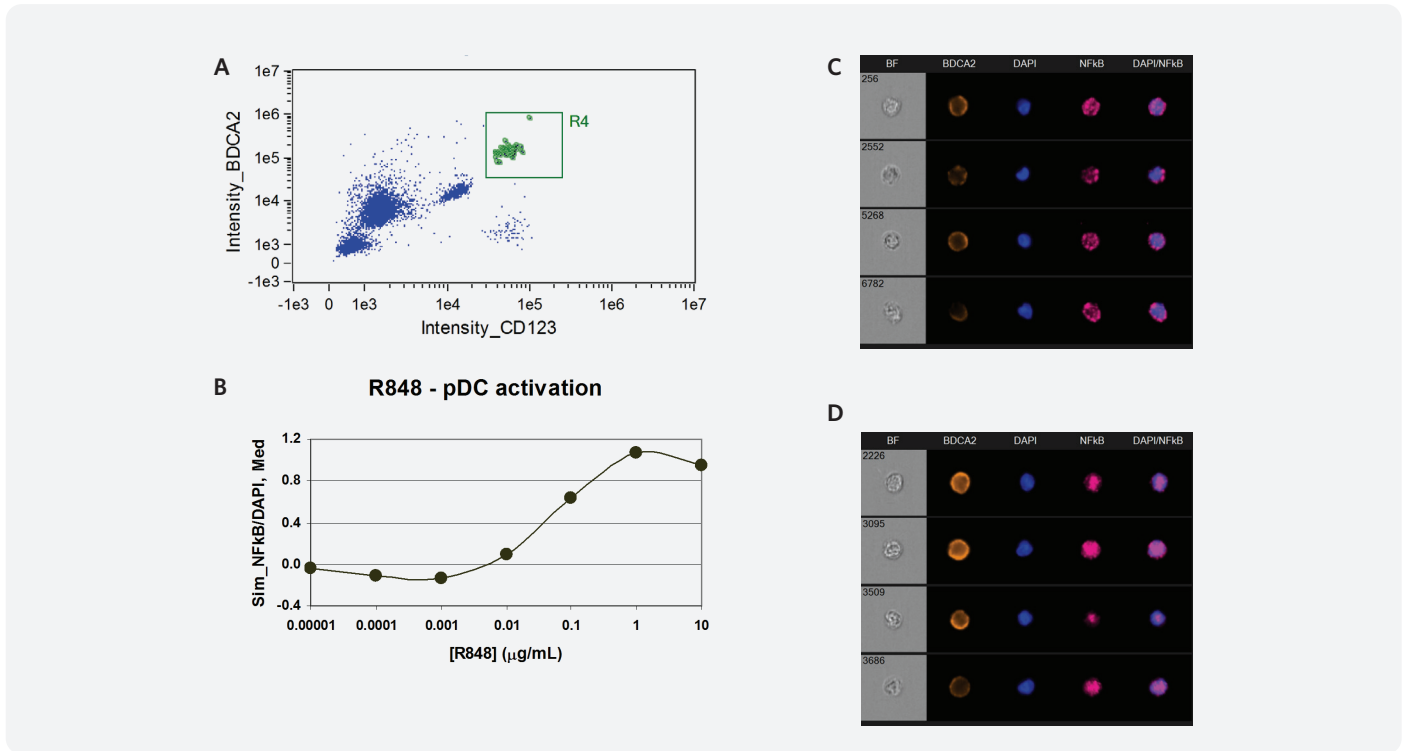
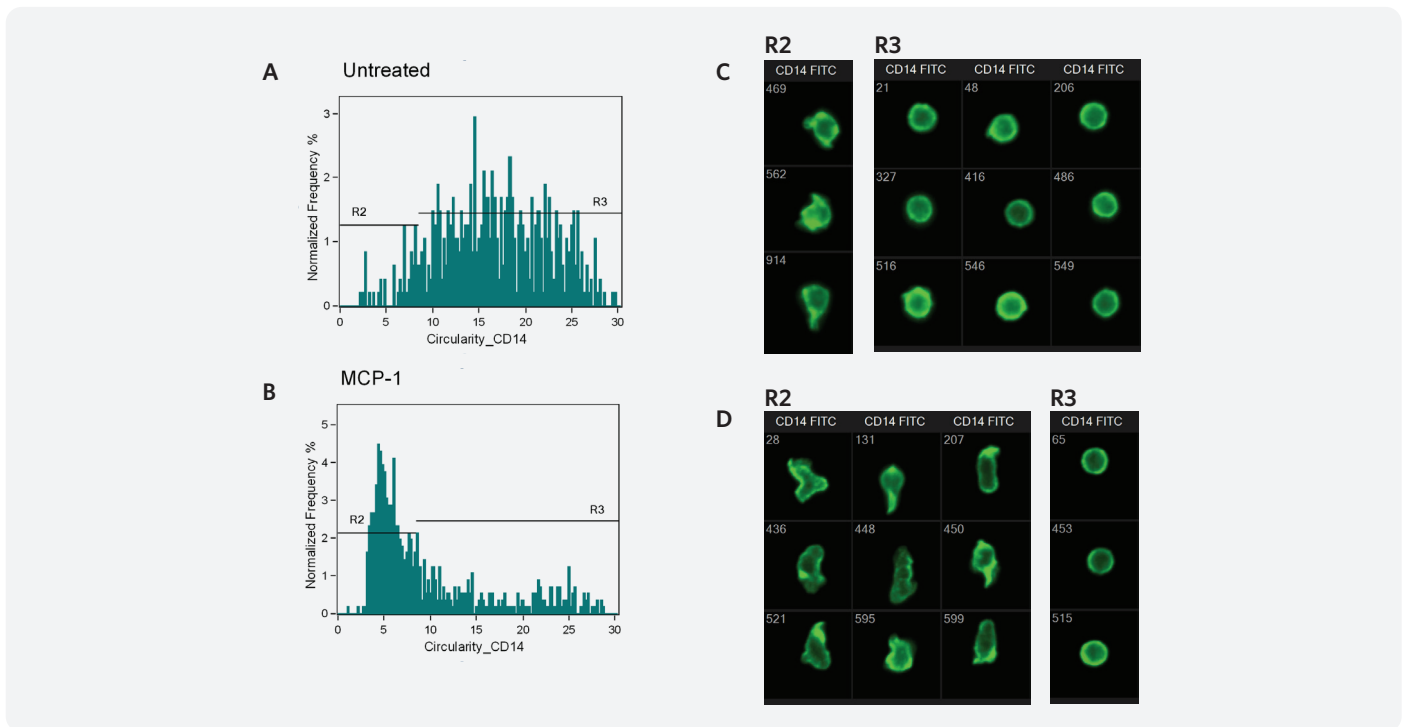


図3. 全血形質細胞様樹状細胞におけるNFκBの局在変化の測定



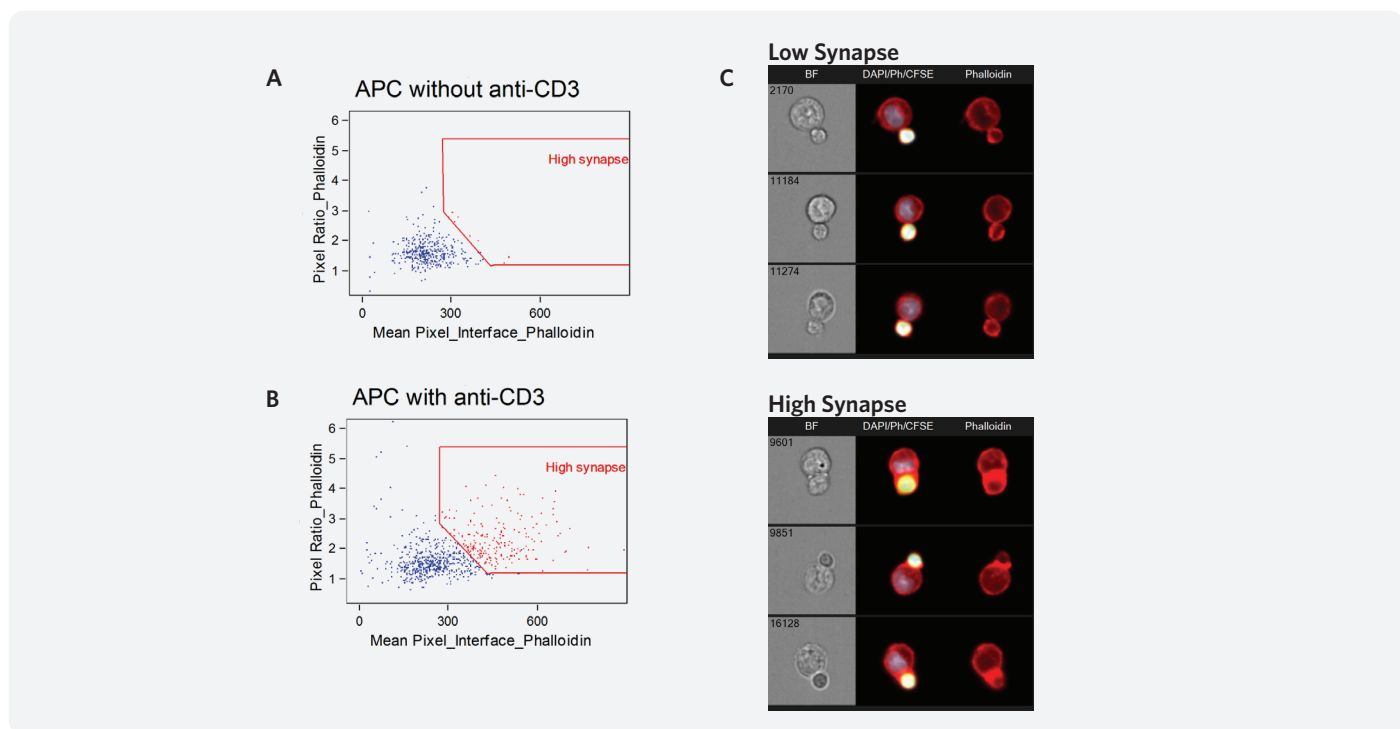
pDCはリガンド結合時に活性化シグナルを伝達するパターン認識受容体を発現しています。そこで、全血中のpDCsに発現しているTLR7 (パターン認識受容体の一つ)の活性化を調べるために、TLR7を介したシグナルによって活性化されるNFκBの局在変化を測定しました。まず、R848 (TLR7活性化リガンド)を添加した全血細胞中のpDCsをゲーティングしました(図3AのR4領域)。続いて、R4に含まれるpDCsを用いて細胞内のNFκBの局在変化をSimilarity スコア¹を用いて測定しました(図3B)。1 ng/ml(図3C)および1,000 ng/ml(図3D)の濃度のR848で刺激したサンプルの代表的な細胞画像を示しています。

図4. ケモカインによる単球の形態変化の測定



濃度勾配を有するケモカインにさらされると、循環する単球の形態が急速に変化します。ケモカインによる細胞形態変化を測定するために、ヒトPBMCsをMCP-1で30分間処理して抗CD14FITC抗体で染色後、赤血球を溶解して単球の形態変化(Circularity)を分析しました(図4)。領域R2およびR3のCD14+単球の代表的な画像を示しています(図4C、4D)。

図5. 免疫シナプス形成



マウスのリンパ節細胞を、コントロール抗体 (図5A) または抗CD3抗体 (図5B) でコーティングされた人工抗原提示細胞 (APCs) と反応させて、免疫シナプスでのアクチン集積を分析しました。図5Cの画像は抗CD3抗体を用いて得られたプロット領域に含まれる代表的な細胞画像です。

本製品の詳細は、以下のウェブサイトでご確認ください。

www.luminexcorp.com/ja/imagestreamx-mk-ii/

REFERENCES:

1. George T, Fanning S, Fitzgerald-Bocarsly P, et al. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multispectral cellular images obtained in flow. J Immunol Methods. 2006 Apr 20; 311(1-2): 117-129. 2006 Mar. doi: 10.1016/j.jim.2006.01.018.

Luminex
complexity simplified.

ルミネックス・ジャパン株式会社

〒106-0041 東京都港区麻布台 1-7-2 神谷町麻布台ビル
www.luminexcorp.com/ja

テクニカルサポートお問い合わせ窓口
Tel: 03.5545.7444 (受付時間 9:00 ~ 18:00)
Email: supportjapan@luminexcorp.com

©2019-2020 Luminex Corporation. All rights reserved.

Amnis、ImageStreamは、米国および他の国々で登録されたルミネックス・コーポレーションの商標または登録商標です。

本製品は研究用機器です。体外診断用には使用できません。研究用試薬と併せてお使いください。諸般の理由により、予告なく仕様を変更する場合がございますのであらかじめご了承ください。