

Amnis™ ImageStream™X Mk II イメージングフローサイトメーターを用いた細胞外小胞の検出

Uta Erdbrügger,¹ Sabrina La Salvia,¹ Joanne Lannigan²

¹Department of Medicine, Division of Nephrology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA;

²Department of Microbiology, Immunology and Cancer Biology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA.

本研究は、上記著者らによる研究内容であり、Luminexが独自に検証した内容ではありません。

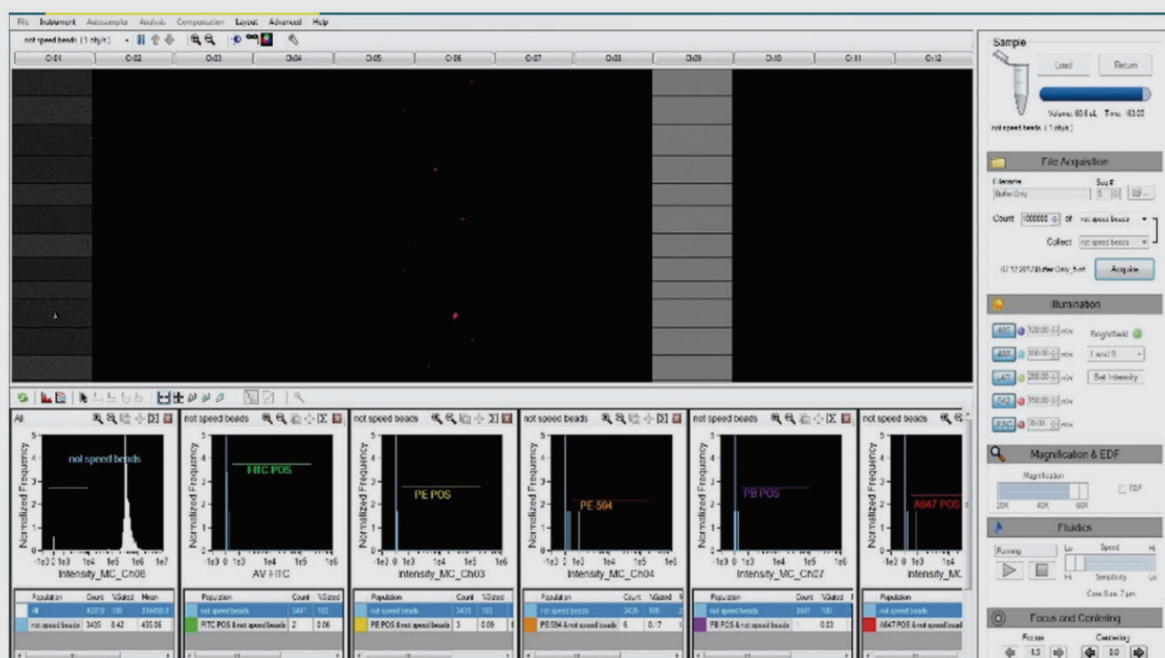
はじめに

細胞外小胞 (以下、EVs) は、健康状態や疾患を評価するバイオマーカーとして考えられており、バイオアクティベーターとしても大きな関心を集めています。EVsはサブミクロンサイズの小胞ですが、その中に含まれるタンパク質、脂質、核酸を伝達することで細胞間コミュニケーションを促進していると考えられています。しかし、EVsはサイズが小さく、不均一で高濃度かつ低屈折率、また組成と形態が多様なため検出は容易ではありません。そこで、優れたS/N比、画像による確認機能、そして強力なデータ解析ツールを組み合わせたイメージングフローサイトメトリーでEVsを検出するプロトコルを用いました。EVsは、自らを産生した親細胞のマーカーを保持しているため、イメージングフローサイトメーターでそれらのマーカーを測定しハイスループットで表現型の分析を行うと、EVの産生細胞を特定することも可能です¹。

方法

本研究では、ヒトの血液中を循環するEVsの特性解析と計数を行いました。EVsは、クエン酸処理した血液から分画遠心法を用いて分離しています。まず、採取した血液を2,000xgの低速遠心で15分間遠心分離し、細胞やデブリ、大きな粒子を除去した後、21,000xgの高速遠心で30分間遠心してEVのペレットを調製しました。EVを精製する各種のプロトコルは、実験の目的や測定する体液の種類によって変わるため、このアプリケーションノートでは言及していません。本研究では、CD31 (血小板内皮細胞接着分子 - 1) とアネキシンV (AnV: 循環しているEVsに発現している膜マーカー) を測定し、血小板と血管内皮由来のEVsの特性解析を行いました。

図 1. INSPiRE™ ソフトウェアでバッファーを測定したスクリーンショット



イメージングフローサイトメトリーの基本プロトコール

1. 設定: Amnis™ ImageStream™ Mk IIのすべてのレーザーを、SSCレーザーを含めて最大出力に設定します(図1)。対物レンズの倍率を60倍に設定し、流路内のコアサイズを7μmに調整します。不使用のチャンネルは解除し、「remove beads」をオフにします。サンプルをロードし、全サンプルについて2分間取得します(または、設定した時間で各サンプルを取得します)。流速設定を最小にします。イメージギャラリー上に取得されたイベントが表示されるので、ディスプレイ上で適切なポピュレーションを選択します。

2. 取得時のゲーティング: スピードビーズを示す集団のSSC値よりも2~3ディケード低いSSC値に認められる散乱光を、測定対象として選択します(図2)。散乱光を実際にゲーティングする際は、ゲーティング領域を調整します。SSCの値が小さい集団にEVsが含まれることが多いので、スピードビーズが含まれるSSC値が大きい集団をゲーティングで除きます。この際、ゲーティング時のSSC値が大きすぎるとデブリや小さな細胞、スピードビーズが除外されずに測定対象に含まれる可能性があります。大きなサイズのEVsを測定する場合は、SSCレーザーの出力を下げます。そうすることで、小さいサイズのEVを見逃す可能性はありますが、イメージングフローサイトメーターは各EVsを蛍光像で確認しながら測定できるため、その機能を活用してSSCレーザーの適切な出力範囲を設定することができます。

図2. SSCの測定レンジ例

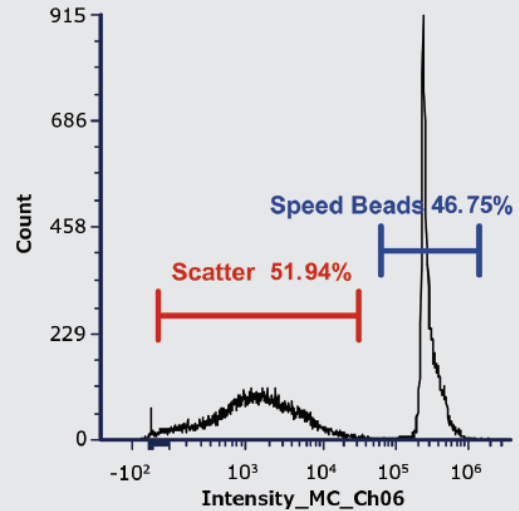


図3. コントロールサンプルのゲート設定

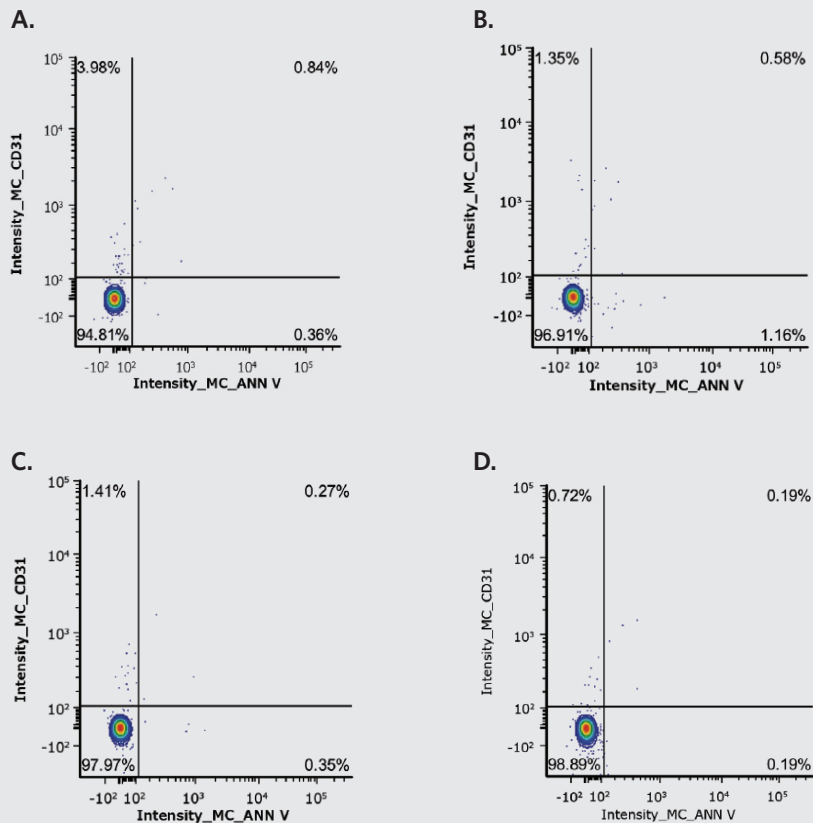


図3A. バッファーのみ(各サンプルを2分間取得、または設定した時間で取得):
バッファーは、0.1μmフィルターでろ過して夾雑物を除去して用います。シース液も同様にろ過することが理想的です。

図3B. バッファーと試薬(抗体や色素等):
最近の知見によると特に抗体や、分子量が大きな蛍光色素、一部の親油性色素を用いる場合、凝集やミセルによってEVs様の分子が生じることが報告されています。このコントロールは、そうしたアーティファクトを除外するために必要です。すべての試薬は、実験で使用した濃度と同じ濃度でバッファーに添加し、全サンプルを2分間または時間を設定して測定します。

図3C. EVサンプルと界面活性剤(0.01% SDS または他の界面活性剤; 脂質ベースのサンプルを用いる場合に実施):
界面活性剤の種類と濃度は、EVの組成や由来に応じて異なる場合があります²。

図3D. 未標識サンプルの測定による陽性EVsの決定:
抗CD31抗体とAnVで標識していないサンプル(コントロールサンプル)の測定を行います。

3. コンペーンションコントロール: 単一染色のEVサンプルをコンペーンションコントロールとして測定します。

4. その他の重要なコントロール: 実験内容に応じて、必要なコントロールを設けます。詳細は各プロトコル、または該当する論文を参照してください。いくつかの例を図3に示します。

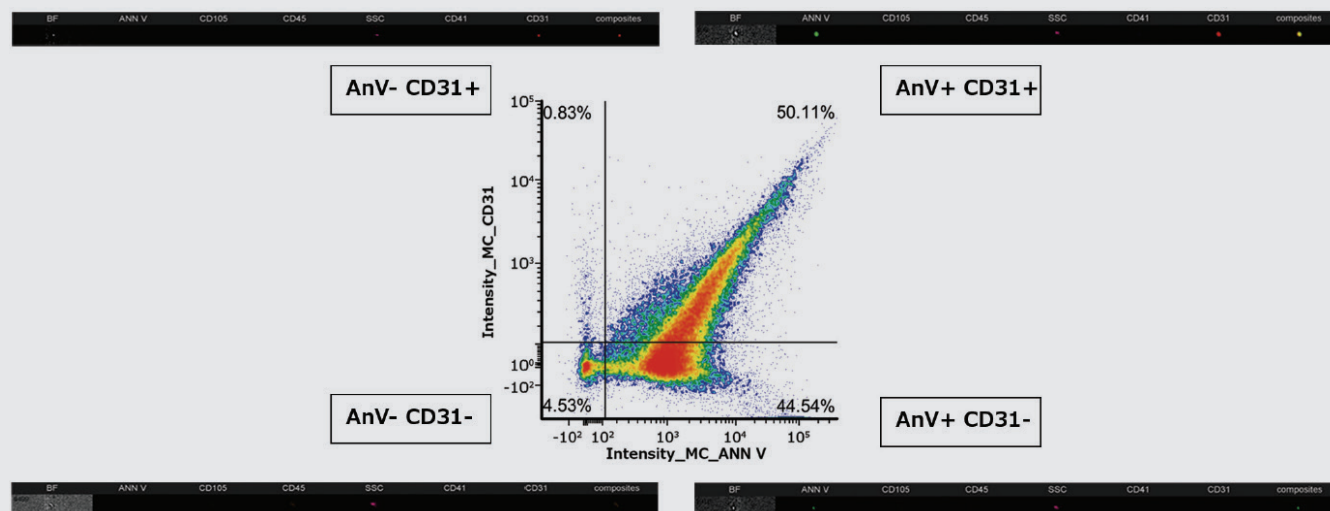
5. 内皮細胞マーカー、および細胞膜マーカーの検出抗体によるEVサンプルの分析: コンペーンションマトリクスは、各プロトコルごとに作成します。図4Bで示しているように、ここではEVを抗CD31 APC抗体(血小板内皮細胞接着分子、PECAM-1)とAnV FITCを用いて染色し、単位体積あたりの粒子数で測定しています。

6. 蛍光キャリブレーション: 蛍光色素の分子数(Molecules of Equivalent Soluble Fluorochromes、以下MESF)で蛍光強度を補正したビーズ(Bangs Laboratoryなど)を用いて、MESF単位で蛍光強度を校正します。MESFという標準単位を用いることで、異なるプラットフォームで測定した蛍光量の比較が可能になります。このビーズを用いると、限界分解能(バックグラウンドを超えるシグナルを検出するために必要な蛍光分子の数)を計算することも可能です。

MESFビーズ溶液は一般的にビーズの濃度が低いため、ボルテックス後、希釈せずに使用します。ポリスチレンビーズによる強い散乱光を避けるため、SSCレーザーの出力は5mWに設定しますが、他のレーザー出力は最大出力に設定します。ビーズごとに少なくとも2,000イベントのデータを取得します。rifファイルは、IDEAS™ソフトウェアを搭載しているAmnis ImageStream® Mk II システムからFCSファイルとしてエクスポートできます。ゲーティングしたシングルレット集団(図5A: Ch01のAreaとCh01のAspect ratio値のドットプロット)に対して、FCS Express 6(De Novo™ ソフトウェア)を用いてこの細胞集団に含まれる各ビーズの蛍光強度をヒストグラムで表示しました(図5A右および図5B: チャネルキャリブレーションは選択せずに各ビーズの蛍光強度のヒストグラムを作成)。各蛍光強度のマーカーは、ドットで表示された集団を形成します。ToolsのメニューにあるFCS Express Channel Calibrationを用いてMESF値を各ピークに入力し(ビーズメーカーのデータを参照)、測定ボタンを押して線形回帰直線を作成します。この計算値を保存し、後続の実験レイアウトにロードすると、蛍光強度の中央値をMESF値に変換できます。あるいは、蛍光強度の中央値とMESF値の対数値をプロットすることで、線形回帰直線を手動で計算することもできます。

図 4. EVサンプルの測定例

A. イメージングフローサイトメトリーによる分析結果



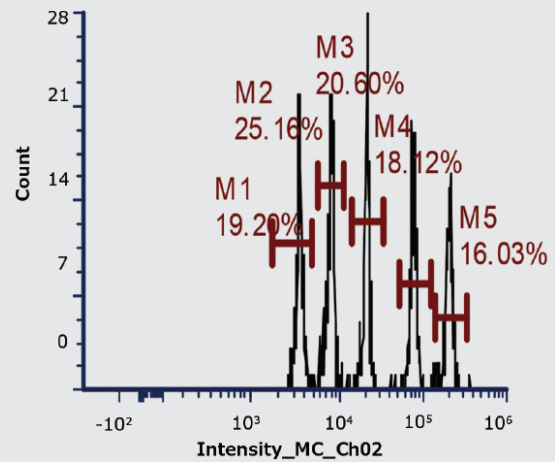
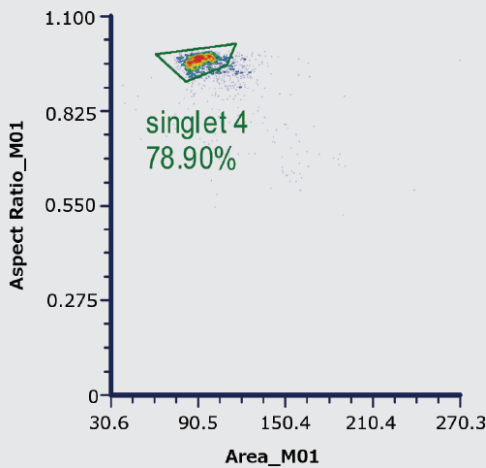
B. イメージングフローサイトメトリーによる統計分析

AnN V、およびCD31の蛍光強

ポピュレーション	計数	粒子数/mL
Low Scatter	10,998	5,943,163
AnV-CD31- & Low Scatter	2,915	1,575,225
AnV-CD31+ & Low Scatter	1,492	806,256
AnV+CD31+ & Low Scatter	5,297	2,862,424
AnV+CD31- & Low Scatter	1,232	665,755

図5. キャリブレーションビーズのゲーティング例

A. 測定した各ビーズのシングルレットゲート(左)とヒストグラム(右)



B. FCS Express 6で示されるチャンネルキャリブレーション

Channel Calibration

Parameter	Equation	F:P	R	Min.	# Decades	Active
87	$y = 1.25x - 1.13$	1	0.998	1259.64	3.25	<input checked="" type="checkbox"/>
96	$y = 0.81x + 0.99$	1	0.997	3142.46	2.72	<input checked="" type="checkbox"/>
88	$y = 1.01x + 0.02$	1	1.0	0.0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>
87	$y = 1.32x - 1.21$	1	0.991	451.68	3.82	<input checked="" type="checkbox"/>

New Calibration

Calibration Information

Create calibration for: Intensity_MC_Ch02

Calculate regression

Calculate regression from: 9 - Histogram - FITC MIX_3.daf (Intensi)

Overlay: Overlay #1 - FITC MIX_3.daf (Parameter # 87)

Number of peaks to use for regression: 5

Markers	Molecules/Bead
Marker 1	2003
Marker 2	11639
Marker 3	43155
Marker 4	179437

Dye molecules: Antibodies 1 : 1

Use calibration

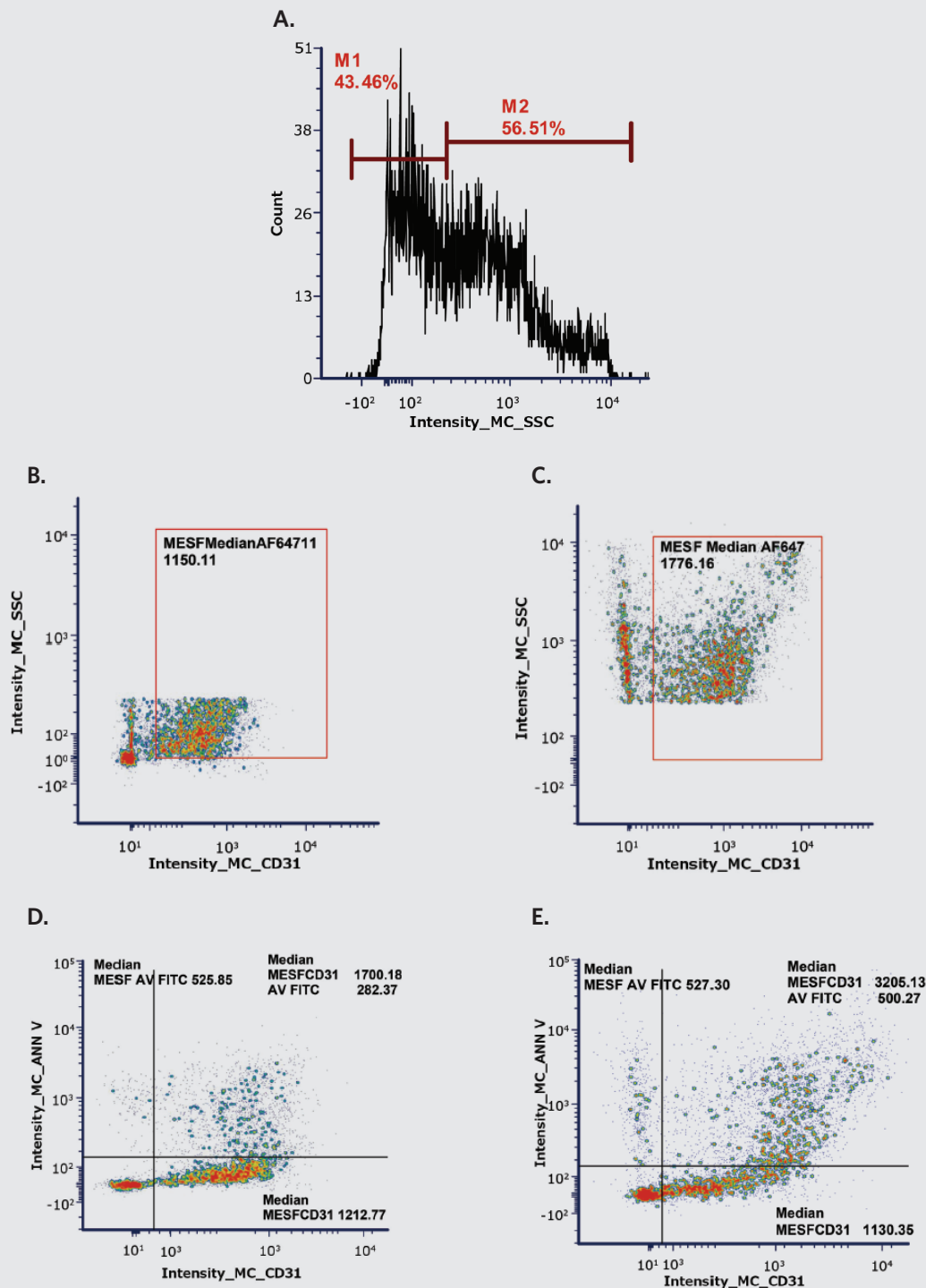
Results

Slope: 1.32 Correlation coefficient: 0.99

Y Intercept: -1.21

図6Aは、SSCの値が小さい集団と大きい集団の二つを各々測定した結果を示しています。この二つの集団のうち、SSCの値が小さい集団ではCD31の発現が低く(図6B)、SSCの値が大きい集団ではCD31の発現が高い(図6C)ことを示しています(MESFのメディアン値は各々1,160と1,776)。図6D及び図6Eは、抗CD31(PECAM-1)APC抗体とAnV FITCで二重染色したドットプロットの結果です。各象限の橙色の枠内にMESFの中央値を示しています。MESFの値は、各象限で異なりますが約200~1,300の範囲です。全体で比較すると、この手法で測定された全細胞のMESFの値は、約100,000~200,000の値です²。

図6. EVサンプルの例



結論

A) イメージングフローサイトメトリーによって、ターゲットを絞ったEVsの表現型解析が可能となります。しかしながら、詳細な分析には、各EVのサイズ(ナノトラッキング法や抵抗パルスセンシングなど)、形態(例;低温電子顕微鏡法)、密度(デンストメトリー)、タンパク質含有量(ウェスタンブロットティングなど)といった、EVsの特徴を解析できる他のツールを活用して包括的な分析を行うことが重要です^{1,3}。

B) シングレットのイベントでEVの表現型解析ができない場合、誤った結論を導く可能性があります。しかし、イメージングフローサイトメトリーでは、IDEAS ソフトウェアの画像情報を組み合わせた定量解析ができるため、これらの誤検知イベントを特定する際に役立ちます¹。一般的に Amnis ImageStream[™] Mk II のプラットフォームを用いると、分子凝集(偶発的な発生頻繁が比較的高い)はそれほど起こりません。ただし、 1×10^8 を超える濃度の場合は希釈する必要があります。また、1画像内に複数のEV像が見える場合はEVサンプルの濃度が高すぎる可能性が考えられます。

C) EVを測定する場合は、下記の情報が重要です。

- サンプルの由来と精製方法の詳細
- EVsサイズの範囲
- 1 mL あたりの総EV濃度
- 1 mL あたりの表現型EVサブセットの濃度
- 蛍光陽性集団のMESF値
- 代表的な画像

まとめ

EVを検出できるイメージングフローサイトメトリーにより、高感度の蛍光検出、バックグラウンドの低減、画像による判別能力、強力なデータ分析ツールが可能になりました。本装置によって 100 nm という小さなEVsの測定も高いスループットで可能となります。また、蛍光分子と抗原の密度比の付加的情報となるMESFの測定は励行すべき実験です。MESFの情報をを用いることで、他の研究や使用機器との比較も可能になります。EVsの測定方法の最適化は現在も検討が進められており、今後解決すべき課題と考えています。

REFERENCES

1. Erdbrügger U, et al. Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry A* 2014;85:756-70.
2. Osteikoetxea X, et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem* 2015;13:9775-82.
3. Lannigan J, Erdbruegger U. Imaging flow cytometry for the characterization of extracellular vesicles. *Methods* 2017;112:55-67.

Amnis[™] ImageStream[™] Mk II イメージングフローサイトメーターについての詳細は、Luminexのウェブサイトでご確認ください。
<https://www.luminexcorp.com/ja/imagestreamx-mk-ii/>

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

©2020 Luminex Corporation. All rights reserved.
AmnisとIDEAS、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。
De Novoは、De Novo Software社の商標です。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。