

Amnis™ テクノロジーを用いた細胞外小胞のイムノフェノタイピング

Haley R. Pugsley, Bryan R. Davidson, Phil Morrissey | Luminex, Seattle, WA, United States

はじめに

細胞外小胞 (以下、EVs) は、近年の解析から細胞間コミュニケーションのメディエーターとして機能することがわかり、注目を集めています。EVsは膜由来の小胞であり、エクソソーム、細胞外小胞、アポトーシス小体などが知られています。特にエクソソームは細胞から細胞に分子を輸送することが示されているため、細胞間のシグナル伝達に利用できる可能性があります。エクソソームは、通常の生理的条件下で放出されますが、その一方で神経変性疾患、血管性疾患、血液疾患、自己免疫疾患やがんの発症メディエーターとしても機能していると考えられています。

EVsはサイズが小さいため (エクソソームの直径は30nmから100 nm)、十分な再現性と信頼性をもって定量し特性解析を行うことは容易ではありません。EVsの分析は、高倍率の顕微鏡を用いて実施できますが、この手法はスループット性に難があります。他方、従来の光電子増倍管 (PMT) ベースのフローサイトメーターによるEVsの分析の場合、EVsは低屈折率の微粒子であるため、検出感度の点で十分とはいえませんでした。

これらの限界を克服するために、Luminexは、Amnis™ CellStream™ フローサイトメーターを開発しました。この装置には、Amnis™ Time Delay Integration (TDI) と呼ばれる画像キャプチャー技術が用いられています。この検出技術によって、Amnis CellStream フローサイトメーターは、ハイスループットで測定できるフローサイトメーターの利点とサブミクロン粒子に対する高感度な光検出能力を兼ね備えることができました。

本研究では、Amnis CellStreamを用いて赤血球 (RBC) と血小板に由来するEVsのイムノフェノタイピングを実施しました。

方法

EVsを下記の方法で血液から分離します。まず、赤血球 (RBC) と血小板を洗浄し、カルシウムイオノフォア (A23187) で処理後、小胞形成を誘発させます。その際に産生された小胞を遠心分離で単離し、RBC由来の小胞と血小板由来の小胞を混ぜ合わせます。

取得したEVsサンプルに、抗CD235ab-PE (BioLegend) 抗体と抗CD41-APC (BioLegend) 抗体を加えて室温で1時間インキュベートし、RBC由来のEVsと血小板由来のEVsを上記の蛍光抗体で標識しました。次に、サンプルをPBSバッファーで段階的に希釈しました (1:60, 1:120, 1:240, 1:480および1:960)。

Amnis CellStream フローサイトメーターを用いて、1サンプルあたり3分間データを取得しました。取得の際、488 nmおよび642 nmのレーザーは100%のレーザー出力に設定し、閾値は設定していません。サンプル測定は、3台のCellStreamを用いて各機器で計2回実行しました。取得したデータをCellStreamシステムの解析ソフトウェアを用いて分析しました。

コントロールサンプルとして、以下のサンプルを準備しました：抗体のみ、緩衝液のみ、抗体標識したEVsサンプル (0.1% Triton® X-100で10分間インキュベートしたもの)、抗体のみ (0.1% Triton® X-100で10分間インキュベートしたもの)。コントロールサンプルは、測定サンプルと同様にすべてPBSで希釈し、EVsサンプルの測定方法にならってCellStream システムで測定しました。

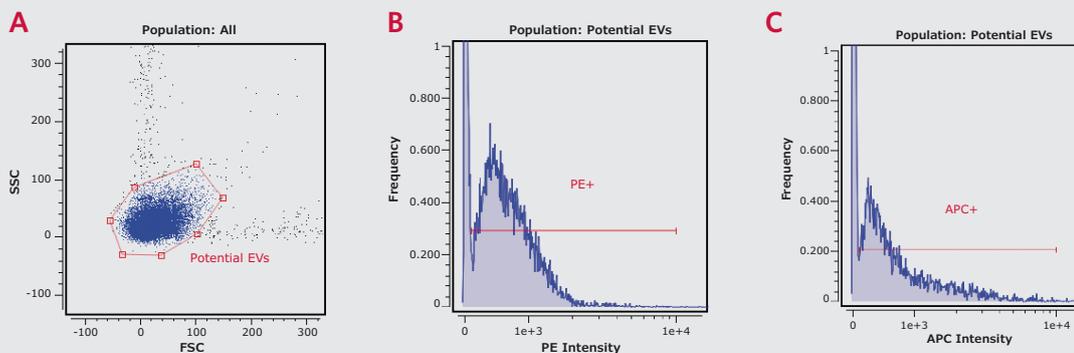


結果

EVs集団のゲーティング

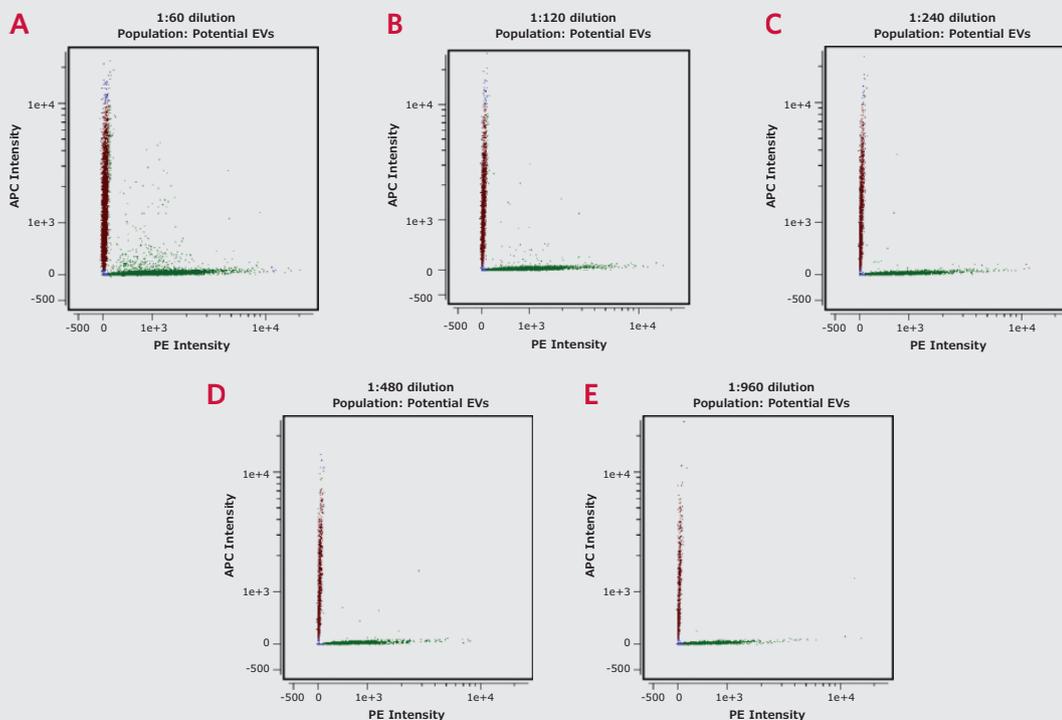
EVs集団をゲーティングするために、SSCとFSCの測定プロットを用いてゲートを設定しました (図1A)。次に、EVs集団と考えられるこのゲート内でPE陽性集団 (PE+: 図1B)、APC陽性集団 (APC+: 図1C)のイベントをゲーティングしました。PE+集団は抗CD235ab-PE抗体で標識されたRBC由来のEVs、APC+ゲート内の粒子は抗CD41-APC抗体で標識された血小板由来のEVsと考えられます。

図 1



抗CD235ab-PE抗体、および抗CD41-APC抗体でそれぞれ標識したRBC-EVs、および血小板-EVsの希釈系列について二変量解析したドットプロットを図2に示します。図1BのPE+イベントは緑色で、図1CのAPC+イベントは赤で色分けされています。

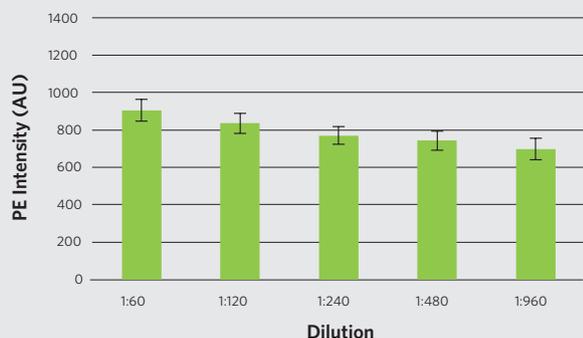
図2



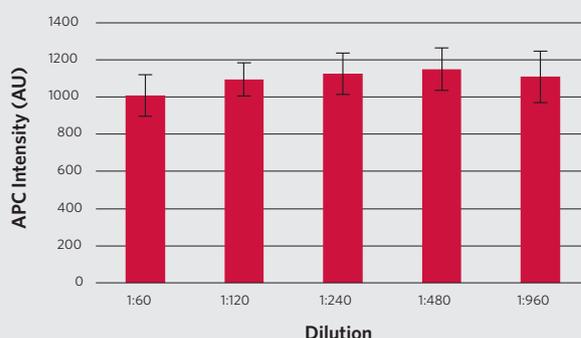
凝集したEVsではなくシングレットのEVs粒子が検出されていることを確認するために、段階希釈したサンプルを用いて測定を行いました。単一のEVs粒子が検出される場合、陽性イベントの平均蛍光強度はほぼ一定のまま、そのイベント数は希釈率に沿って直線的に減少します。図3は各希釈系列におけるPE (図3A) およびAPC (図3B) の平均蛍光強度を示しています。平均蛍光強度は図1のPE+またはAPC+のゲート内の測定値を用いました。なお、両データ間で蛍光漏れ込みの補正は行っていません。

図3

A. PEの平均蛍光強度



B. APCの平均蛍光強度

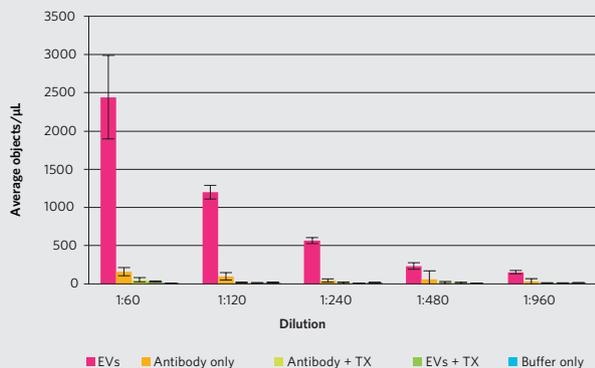


Amnis™ CellStream™ フローサイトメーターを用いたEVsの検出

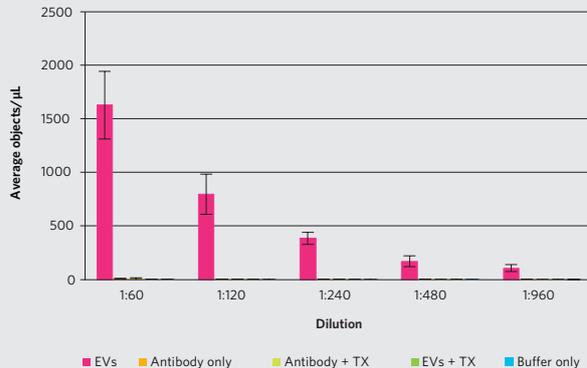
図4Aと図4Bは、各測定サンプルとコントロールサンプルの1 μLあたりのPE+粒子数とAPC+粒子数を示しています。測定グループは、抗体標識したEVs、抗体のみ、抗体+Triton®X-100、抗体標識したEVs + Triton X-100、バッファーのみに分かれます。1 μLあたりの粒子数は図1に示すPE+またはAPC+ゲートのイベントに相当します。図4Cと図4Dの表は、図4Aおよび図4Bの各測定結果における1 μLあたりの平均粒子数と標準偏差を示しています。

図4

A. PE+ 粒子数/μL



B. APC+ 粒子数/μL



C. PE+ 平均粒子数/μL

希釈率	EVs		抗体のみ		抗体+Triton X		EVs + Triton X		バッファーのみ	
	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD
1:60	2442	546	160	54	55	28	30	8	5	4
1:120	1199	89	99	49	17	7	13	5	19	1
1:240	566	39	44	22	15	9	9	3	17	1
1:480	235	43	64	108	18	14	13	9	9	1
1:960	154	21	32	37	10	5	10	5	15	2

D. APC+ 平均粒子数/μL

希釈率	EVs		抗体のみ		抗体+Triton X		EVs + Triton X		バッファーのみ	
	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD	平均粒子数	SD
1:60	1629	316	9	2	9	9	3	0	1	1
1:120	798	187	4	1	2	1	1	1	0	0
1:240	386	56	2	1	2	1	1	0	0	0
1:480	172	50	2	3	1	1	1	1	0	0
1:960	109	33	1	1	0	0	1	0	0	0

まとめ

本研究では、赤血球(RBC)と血小板由来するEVsについて、Amnis CellStream フローサイトメーターを用いてイムノフェノタイピングを実施しました。RBC由来のEVsは抗CD235ab-PE抗体で、血小板由来のEVsは抗CD41-APC抗体で、それぞれ同時に標識されました。CD235abは、RBC由来のEVsに特異的に発現し、CD41は血小板由来のEVsに特異的に発現しています。また、PE+およびAPC+のイベントの集団にゲーティングを実行することで、RBC由来のEVsを血小板由来のEVsから分離することができました(図1および図2)。そして、3台のAmnis CellStreamを用いた測定において、希釈系列間の平均蛍光強度は各機器間でほぼ一定であること(図3)、加えて、各希釈系列におけるEVsおよびコントロールサンプルの1μLあたりの粒子数を示すことができました(図4)。これらの結果から、高感度なAmnis CellStream フローサイトメーターはEVsの測定やイムノフェノタイピングにおいて優れたプラットフォームになると期待されます。

謝辞

RBCおよび血小板EVsのサンプルの提供、そして本研究のご指導をいただきました、Cellarcus Biosciences社のJohn Nolan氏に感謝申し上げます。

Amnis™ CellStream™ 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/cellstream-flow-cytometers/>

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CellStream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。
Tritonは、The Dow Chemical Company、またはその関連会社の商標です。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。