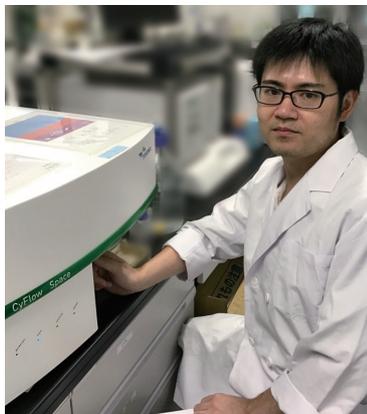
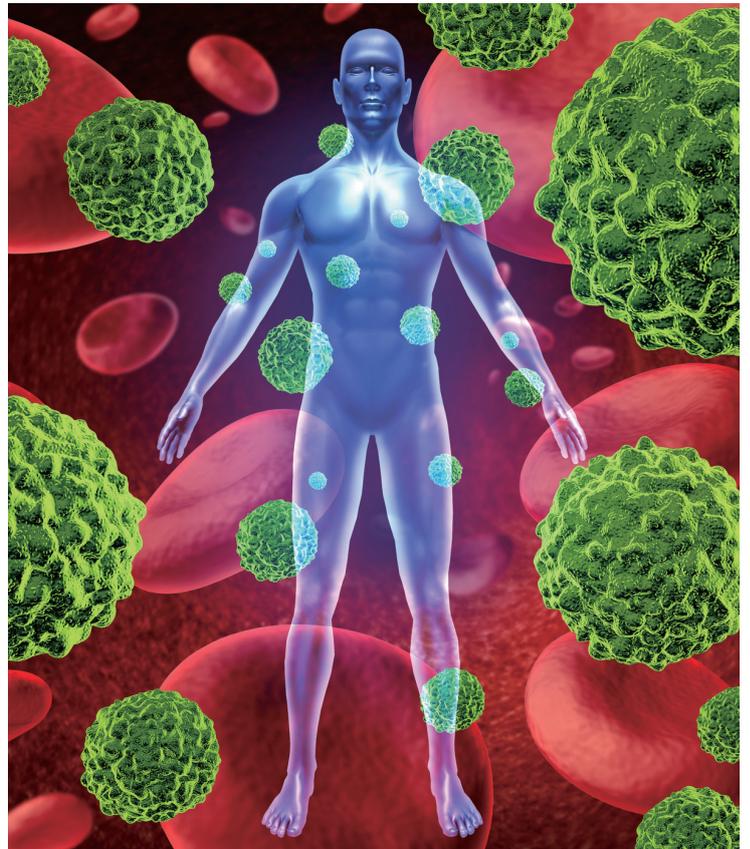


## ヒト腫瘍組織浸潤リンパ球(TIL) マルチカラー解析



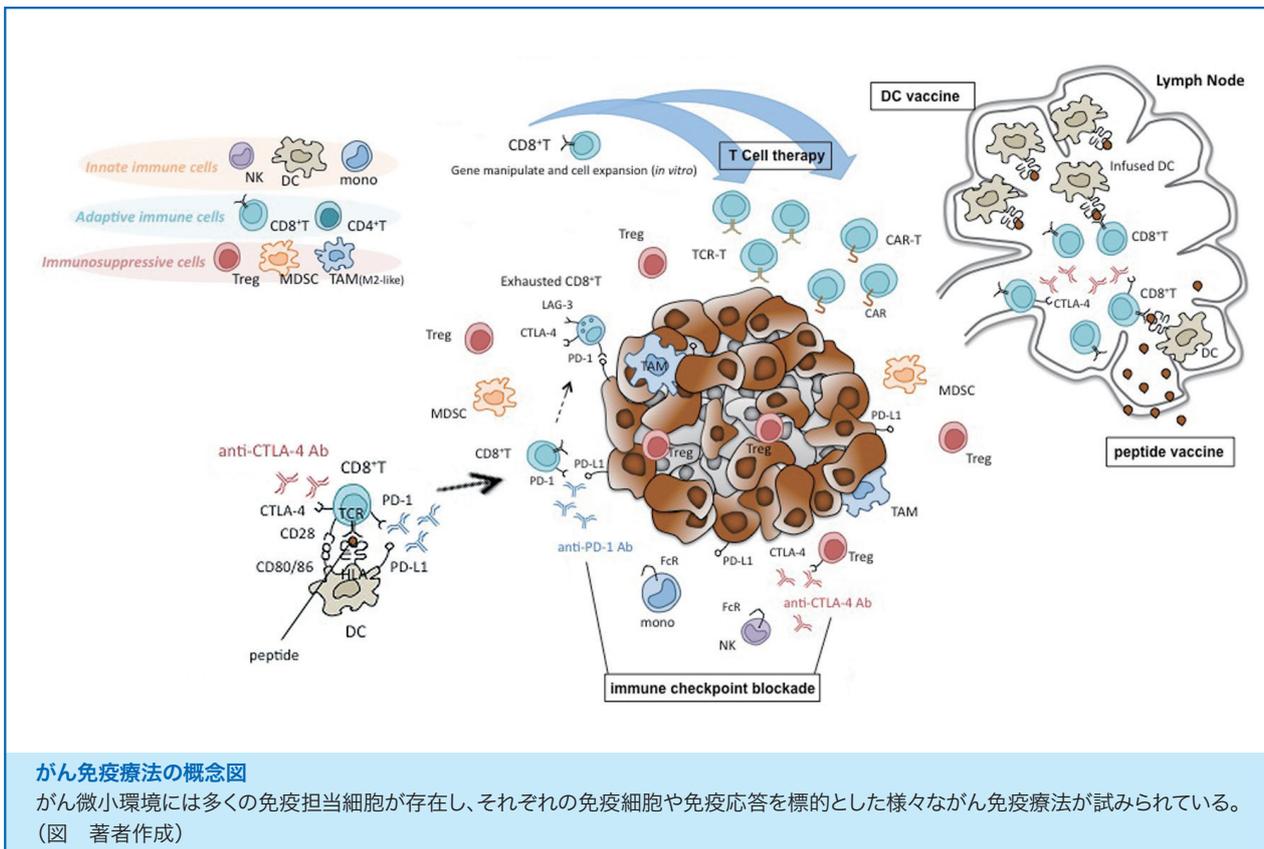
藤岡 優樹 (写真)  
西川 博嘉

国立がん研究センター  
先端医療開発センター  
免疫 TR 分野



### はじめに

近年、がん免疫療法は手術、放射線療法、化学療法に続く第4のがん治療法として注目されている。がん細胞は、免疫細胞に発現しているPD-1 (Programmed cell death 1) やCTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) などの免疫チェックポイント分子を利用しがん免疫応答を抑制し、免疫細胞からの攻撃から逃れている。現在、それらの免疫抑制機構を解除し、本来の抗腫瘍免疫応答を再活性化させることでがん免疫応答を増強させる試みが広く研究されている。既存の免疫チェックポイント阻害薬(ニボルマブなどの抗PD-1抗体、イピリムマブなどの抗CTLA-4抗体等)は、悪性黒色腫や肺癌を始めとするがん腫に対する抗腫瘍効果が認められ、現在さらに適応拡大が検討されている。またLAG-3などの新規の免疫チェックポイント阻害薬の開発も急速に進められている。しかしながら、これら免疫チェックポイント阻害剤の単剤による臨床効果は十分とは言えず、これら免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせた複合的がん免疫療法、さらに分子標的薬など既存治療も組み合わせた治療法も試みられている。さらに、よりよい臨床効果を導くためには、個々の患者で異なる免疫状態を適切に把握し、患者毎に適切ながん免疫療法を提供していくことが重要と考えている。本アプリケーションレポートでは、悪性リンパ腫患者検体のがん組織に浸潤するTIL (Tumor-infiltrating lymphocytes: 腫瘍組織浸潤性リンパ球)および末梢血中のPBMC (Peripheral blood mononuclear cells: 末梢血単核球)を使用した免疫細胞のフローサイトメーターによるマルチカラー解析について紹介する。特に今回はがん免疫の中でも免疫抑制機構において重要な役割を果たし、がん免疫応答を負に制御する細胞であるTreg (Regulatory T cell: 制御性T細胞)に着目して解析を進めた。また、このような免疫細胞のフローサイトメトリーを用いた解析には、死細胞を除外し生細胞のみを適切に解析することが重要である。ここでは、死細胞がデータの解析結果に与える影響についても検討したので紹介する。



### リンパ球のサンプル調整

組織破砕機を用いて腫瘍組織を破壊し、その後、セルストレナーにより破壊した組織をフィルトレーションし、腫瘍組織中のリンパ球を抽出した (TIL)。一方、PBMCの調整においては、末梢血をRPMI1640により希釈し、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) に重層し遠心を行う密度勾配遠心法によりPBMC層を回収し抽出した(図1)。

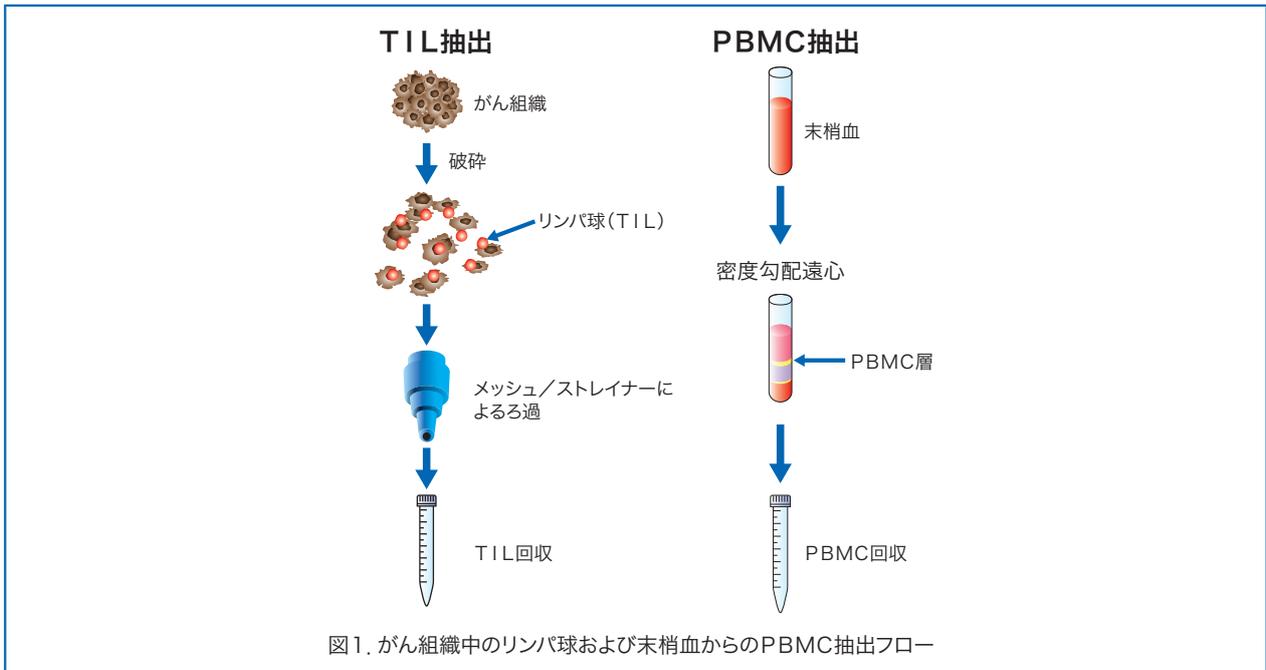
### マルチカラーフローサイトメトリー解析のための細胞染色

回収したPBMCおよびTILは次に加える抗体の非特異結合を最小限にするためにFc block (BD Fc Block™ Reagent for human) (BD Bioscience) を加え4℃にて反応させた。その後、死細胞除去のためにFVD (Fixable Viability Dye) および細胞表面の抗原染色のために抗ヒトCD3、CD4、CD8a、CD45RA、CCR7、PD-1、CTLA-4 (PE-Dazzle™ 594) 抗体を加え、さらに4℃にて抗体反応を行った。洗浄後、細胞内染色のためFoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (affymetrix eBioscience) を用いて細胞固定および膜透過処理を行った。細胞内染色には、Tregのマスター遺伝子として知られている

転写因子FoxP3に対する抗FoxP3抗体および免疫チェックポイント分子の1つであるCTLA-4に対する抗CTLA-4 (APC) 抗体を加え4℃にて反応を行った。洗浄後、フローサイトメーターCyFlow Space (シスメックス) によりマルチカラー測定を行った。なお、今回細胞染色に使用した抗体等は次にまとめたとおりである。

#### (使用した抗体等)

- Fixable Viability Dye (FVD-eFluor® 506) (affymetrix eBioscience)
- anti-human CD3 Alexa Fluor® 700 (affymetrix eBioscience)
- anti-human CD4 APC-eFluor® 780 (affymetrix eBioscience)
- anti-human CD8a PE-Cy7 (affymetrix eBioscience)
- anti-CCR7 (CD197)-Brilliant Violet 605™ (BioLegend®)
- anti-human FoxP3 PE (affymetrix eBioscience)
- anti-human CD45RA FITC (BioLegend®)
- anti-human PD-1 (CD279)-Brilliant Violet 421™ (BioLegend®)
- anti-human CTLA-4 (CD152) PE-Dazzle™ 594 (細胞表面染色のため) (BioLegend®)
- anti-human CTLA-4 (CD152)-APC (細胞内染色のため) (BioLegend®)

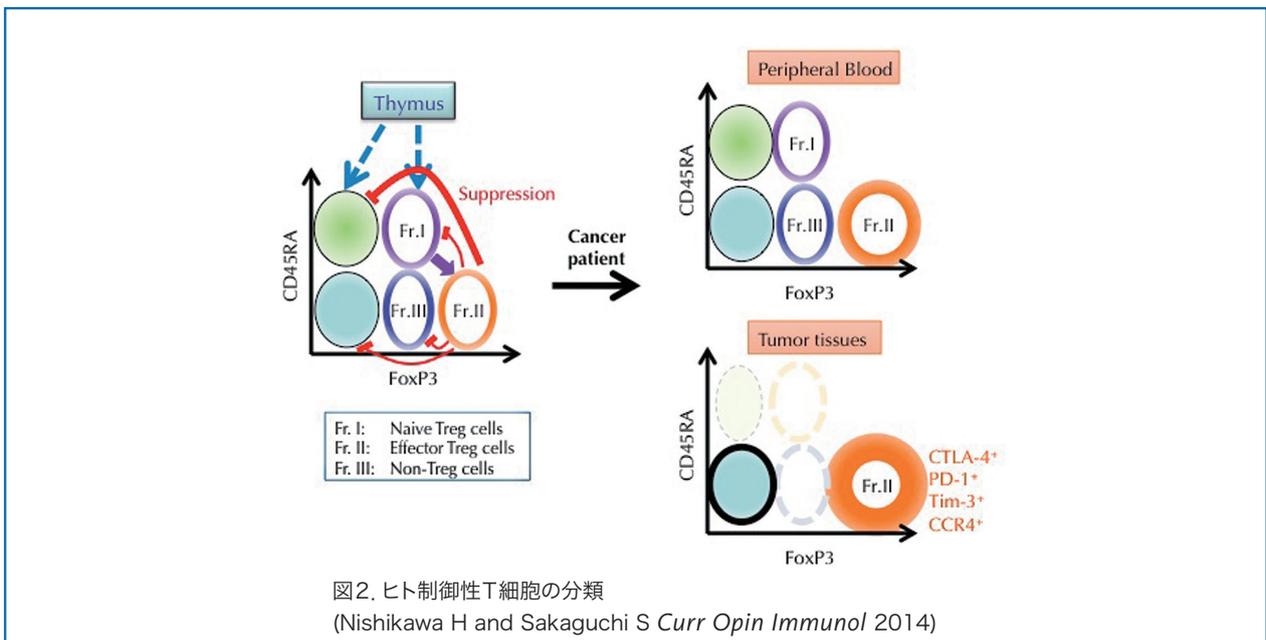


### フローサイトメーターによるヒト免疫細胞解析

ヒト制御性T細胞(Treg)はこれまでマスター遺伝子であるFoxP3の発現をもって定義されてきた。しかし、非TregナイーブCD4陽性T細胞の一部も活性化によってFoxP3の発現が誘導されることが明らかとなり、よりTregを厳密に分類する必要があった。我々はCD4陽性集団をCD45RAとFoxP3分子を用いて展開することによりCD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T細胞をさらに3つの亜集団(Fr.I, Fr.II, Fr.III)に分類できることをこれまでに報告している(Miyara M 2009)。3つの亜集団とは naïve-Treg (Fr.I; FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>)、effector-Treg (Fr.II; FoxP3<sup>high</sup>CD45RA<sup>-</sup>) および non-Treg (Fr.III;

FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>-</sup>)である(図2)。Non-Treg (Fr.III) 分画ではFoxP3の発現は陽性であるが、免疫抑制活性は有しておらず、通常のナイーブCD4陽性T細胞が刺激によって一過性にFoxP3の発現が誘導されたと考えられている。本アプリケーションレポートにおいてもこのTreg分類に基づいてフローサイトメトリーによるマルチカラー解析を行った。

図3に健康人のPBMC、図4に悪性リンパ腫患者のPBMC (a) およびTIL (b) 検体の測定結果を示す。解析手順は、まず、必要に応じてダブレット除去を行い、FSC/SSCによりリンパ球をゲーティングした。さらにFVD陰性の領域(細胞固定前には生きてい



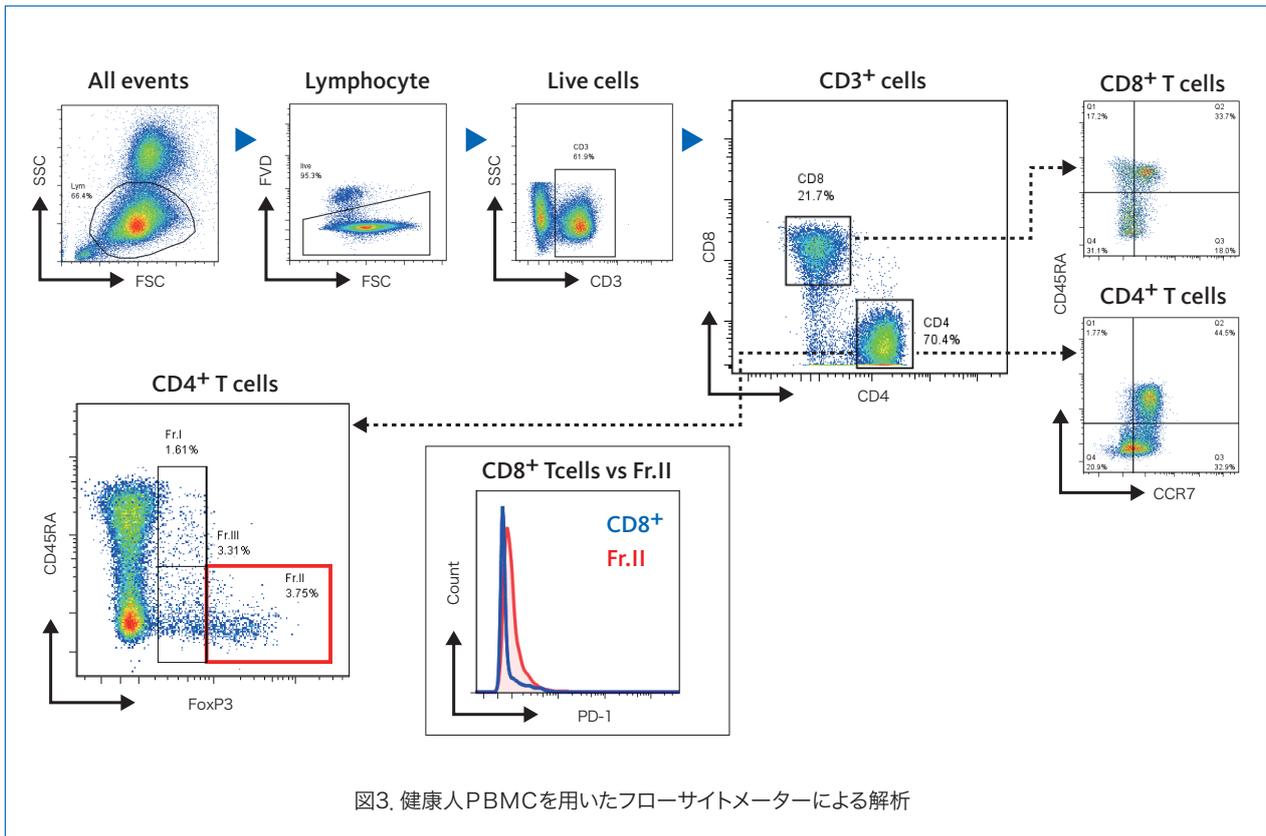


図3. 健康人PBMCを用いたフローサイトメーターによる解析

た細胞)にゲーティングし、解析対象となる細胞集団を決定した。次に、CD3陽性領域をゲーティングし、さらにCD4/CD8で展開し、CD8陽性およびCD4陽性の各細胞集団をゲーティングした。それぞれの細胞集団をCCR7/CD45RAで展開することで、各細胞のメモリー分画を確認することができる。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞は、ナイーブT細胞(Naive; CCR7+CD45RA+)からセントラルメモリーT細胞(CM; CCR7+CD45RA-)、エフェクターメモリーT細胞(EM; CCR7-CD45RA-)、CD45RA陽性エフェクターメモリーT細胞(EMRA; CCR7-CD45RA+)へと分化することが知られている。また、CD4陽性細胞集団はFoxP3/CD45RAのドットプロットで表示し、図2で示した分類にもとづいてTregを3つの亜集団(Fr.I, Fr.II, Fr.III)に分画した。さらに、抗腫瘍免疫応答において中心的な役割を担うCD8+ T細胞、およびその機能抑制を担っているeffector-Treg (Fr.II) におけるPD-1やCTLA-4の発現量を比較した。

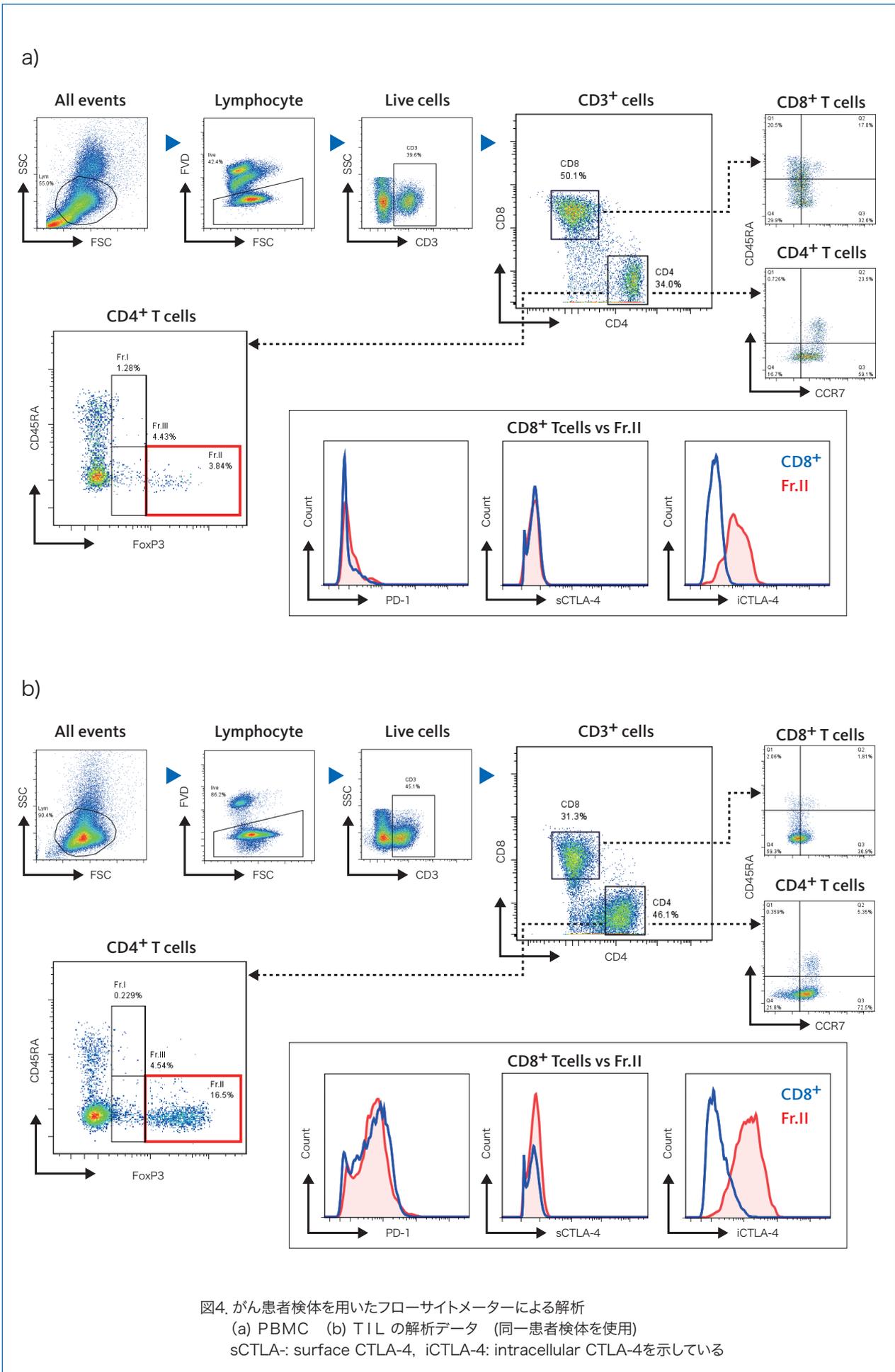
通常、個人差はあるものの、図3に示すように健康人PBMCに存在するeffector-Treg (Fr.II) のCD4+ T細胞に対する割合は2-4% (Sugiyama 2013) 前後程度であり、またそれと同程度の割合のnon-Tregが存在している。一方、がん患者においては、PBMC中

のeffector-Tregの割合は健康人と比べて大きな違いが見られないものの、TILにおけるeffector-Tregの割合は16%程度であり、末梢血に比べてがん局所(腫瘍組織)では明らかにeffector-Tregが増加していることがわかる。同一患者検体であってもPBMCと比べTIL中のeffector-TregおよびCD8+ T細胞ではPD-1の発現量の高い細胞が多く存在していた。一方、CTLA-4の発現に関しては今回のがん検体ではPBMCとTILのサンプル間で大きな差は認められなかった。また、がん患者のTIL中のナイーブT細胞(CCR7+CD45RA+)の割合は、CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞ともにPBMC中の割合と比べ減少がみられた。

### 死細胞除去の重要性

TILのような組織からのサンプルや、凍結保存を経たサンプルなどではゲートアウトによる死細胞の除去が非常に重要である。

図5は悪性リンパ腫患者のTILのデータを死細胞除去し生細胞のみを解析した場合と死細胞除去をせず解析した場合との比較を示している。死細胞除去しない場合では死細胞除去をした場合と比べて、CD4陽



性集団中のFoxP3陽性細胞の各フラクション(Fr.I, Fr.II, Fr.III)の割合がやや増加しており、PD-1の発現においてはFr.IIのPD-1発現量に大きな違いが認められる。このように死細胞は本来発現している分子の消失を引き起こすだけでなく、自家蛍光や非特異結合等も引き起こす。そのため、適切に死細胞をゲートアウトし、生細胞のみを解析対象として解析を進めることが重要である。当然のことながら死細胞の割合が多いサンプルでは特に死細胞除去の効果を実感するのではないと思われる。今回使用しているような死細胞染色試薬は、いわゆるPIなどで死細胞を染色するDNA染色試薬とは違い、細胞中のフリーアミンをターゲットとして結合している。生細胞でも細胞表面に結合するが、死細胞では細胞内へ試薬が浸透し細胞内のアミンと結合するため、生細胞と死細胞では明確な蛍光強度の差を生じ、ゲーティングによる死細胞除去が可能となる。細胞内染色などで細胞固定を必要とするような場合でも、固定前に細胞表面抗原染色とともにFVDのような死細胞染色試薬で染色することで、その後の細胞固定・膜透過処理の影響を受けることな

く死細胞の染色ができ、通常通りのフローサイトメーターにより検出することができる。最近では、今回使用したFVDのようにアミンをターゲットとした死細胞の染色試薬が各社から販売されており、様々な蛍光波長にも対応している。

参考文献

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 27, 1-7, 2014.

西川博嘉, 坂口志文 ヒト制御性T細胞の解析  
医学のあゆみ Vol.252 No.1 2015.

Miyara M, *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30, 899-911, 2009.

Daisuke D, *et al.* Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *PNAS*, 110, 17945-17950, 2013.

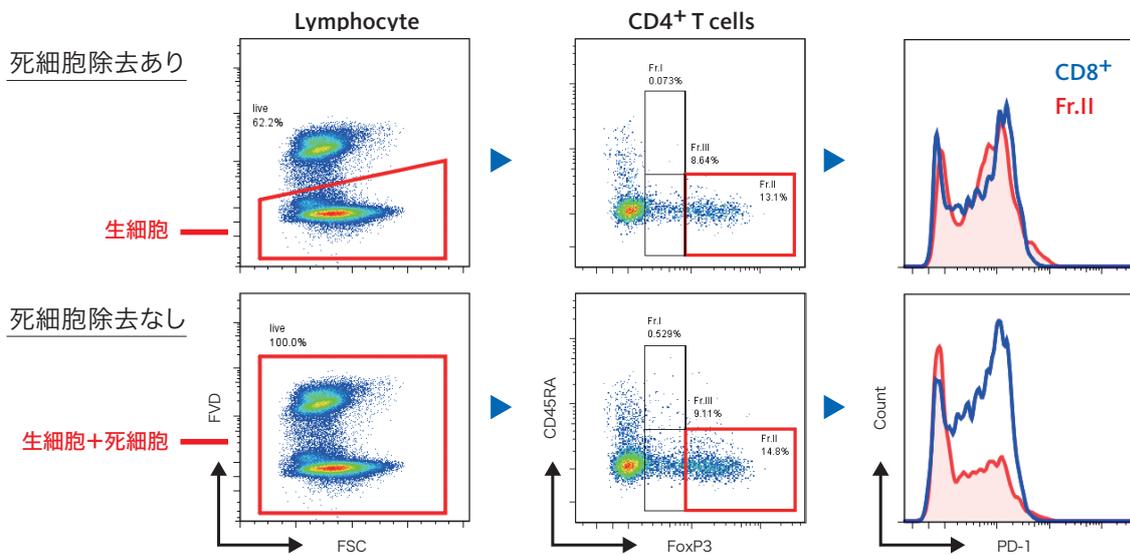


図5. 死細胞除去によるデータへの影響

著者プロフィール

藤岡 優樹(M.D.)  
国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫TR分野  
外来研究員  
秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓・膠原病内科学

西川 博嘉(M.D., Ph.D.)  
国立がん研究センター 研究所 腫瘍免疫分野/先端医療開発センター  
免疫TR分野 分野長  
名古屋大学大学院医学系研究科 分子細胞免疫学 教授

発行：シスメックス株式会社 日本・東アジア地域本部 R&I営業部

リレーションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317  
東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557

<http://sysmex-fcm.jp>

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。