

テクニカルノート

Phosphoflow法を用いた細胞内シグナルの解析

安達圭志, 玉田耕治

山口大学大学院医学系研究科細胞シグナル解析学(寄生体学) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 細胞内シグナル伝達, リン酸化, フローサイトメトリー

和文抄録

感染症, がん, 自己免疫疾患等, 様々な疾患と免疫反応とは不可分な関係にあり, 病態を理解する上で, あるいは治療法を開発していく上で, 免疫学は欠かすことのできない学問である. 生体において免疫をコントロールするものは, 主にT細胞, B細胞, 樹状細胞, マクロファージ等の免疫担当細胞であるが, 健康を保った定常状態から発症/病態形成に至る過程での, 免疫担当細胞の機能的・質的变化が, いかなるメカニズムによってコントロールされているかについては, 未だ不明の疾患が多い.

細胞の反応・動態を一義的に規定するものは, 細胞内のシグナルである. 従って, 細胞内, 特に免疫担当細胞内のシグナルの変化を時空間的に解析することは, 特定の疾患を理解して制御するために, あるいはバイオマーカーとして用いるために, 非常に重要であると言えよう. 本稿では, 細胞内シグナル解析に関して比較的新しい技術であり, 今後応用範囲の広がりが期待される“Phosphoflow法”の特色と利点について概説した後, 方法論, 実際の応用例について紹介する.

Phosphoflow法とは

Phosphoflow法の特色

抗原やサイトカイン等の刺激を契機とする細胞内のシグナルは, 主にシグナル伝達分子の連続的なり

ン酸化および脱リン酸化によって伝達される (signaling cascadeと呼ばれる). 従来の細胞内シグナルの解析方法としては, シグナル伝達分子のリン酸化部位をエピトープとする抗体を用いたWestern blotting法が多く用いられてきた. 実際, この方法を用いた研究により, これまで多くのシグナル伝達経路が解明され, 医学, 生命科学の発展に大きく貢献してきた. しかし, Western blotting法には, 細胞内シグナルを解析する研究者の頭を悩ませる問題が少なからず存在していた (表1). ある特定の細胞の細胞内シグナルを解析する際, Western blotting法を行なうのに十分な蛋白を得るためには, 大量の細胞を準備する必要があり, かつ, その

表1 細胞内シグナル解析におけるWestern blotting法とPhosphoflow法の比較

Western blotting法	Phosphoflow法 (フローサイトメトリー)
homogeneousなサンプルであることが必要 培養細胞, もしくは精製した細胞に限られる	heterogeneousな細胞集団で解析が可能 複数の細胞集団を含むプライマリーサンプルにも適用可能
大量の細胞が必要 多くの場合, <i>in vitro</i> での培養が必要となる	少量の細胞数で解析可能 希少な細胞集団に対しても直接解析が可能
1パラメーター解析 一回の解析で一つの分子を標的とする	マルチパラメーター解析 細胞表面および細胞質内の複数のマーカーを同時に使用可能
細胞集団としての解析 データは, 複数の細胞の平均値として得られる	シングルセルレベルの解析 個々の細胞のデータが得られる
時間と手間を要する実験系 ラージスケールのスクリーニングには適用が困難	迅速で簡便な実験系 多くのサンプルを同時に処理することが可能

サンプルは単一の細胞集団 (homogeneous) でなければならない。また、Western blotting法は、基本的には一回の解析で一つの分子を標的とするものであり、1パラメーターの解析方法であった (注・LI-COR社のOdysseyシリーズ〈http://www.licor.com/bio/products/imaging_systems/odyssey_family.html〉に代表されるように、最近の技術革新によって2パラメーター以上の解析も可能になっている)。なにより、シングルセルレベルでの解析は、Western blotting法では不可能である (表1, 図1)。

上記のようなWestern blotting法の問題点を克服するため、シングルセルレベルの解析に力を発揮し、それまで主に細胞表面マーカーの解析に使用されてきた、フローサイトメーターを用いた細胞内シグナルの解析方法が、1994年頃から報告されるようになる^{1, 2)}。21世紀に入り、フローサイトメーターの急速な発達と共にPhosphoflow法が技術的に確立され、Stanford大学のGarry P. Nolanらのグループによって大きな発展を遂げることとなった^{3, 4)}。Phosphoflow法の基本的な原理は、標的となる分子を蛍光抗体で標識するという点において、細胞表面マーカーに対するフローサイトメーターと同様であ

る。ただし、Phosphoflow法では、標的となる分子は細胞内に存在しているだけではなく、リン酸化部位を特異抗体に暴露させるために、しばしば蛋白を変性させてその立体構造を変化させる必要があるという点で、細胞表面マーカーに対するフローサイトメーターにはない処理が必要となる (後述)。また、Phosphoflow法では、シグナル伝達分子のリン酸化部位をエピトープとする抗体を用いる点についてはWestern blotting法と同様であるが、フローサイトメーターの特性として『少量の細胞でも解析が可能である』点が、Western blotting法とは大きく異なっている。しかもそのサンプルはhomogeneousなものである必要は無く、『heterogeneousな細胞集団でも構わない』。従って、Western blotting法の適用が困難な、目的の細胞が少数しか含まれていないプライマリーのサンプルに対しても、Phosphoflow法は適用可能である。また、細胞表面マーカーの解析と同様に、『マルチパラメーターの解析』が『シングルセルレベルで実施可能』で、これはWestern blotting法と比較しての最大の利点の一つである⁵⁾ (表1, 図1)。

方法論 (methodology)

Phosphoflow法の基本的な流れとしては、

- 1) サンプルの刺激
- 2) リン酸化誘導後のサンプルの固定
- 3) 細胞膜の透過処理および蛋白の変性
- 4) 細胞表面マーカーおよびシグナル伝達分子の染色

となる。以下に、各ステップについて解説を行なう。

1) サンプルの刺激

一般的に、シグナル伝達分子は恒常的にリン酸化されているわけではなく、刺激が加わって初めてリン酸化が誘導される。しかも、そのリン酸化が長時間持続するケースは少ない。刺激が加わった後、一過性にシグナル伝達分子はリン酸化され、伝達経路の“下流”の分子を活性化した後、脱リン酸化されて定常状態に戻る。また、長時間の刺激は、サイトカイン等の産生を誘導し、autocrine/paracrineによる二次的な刺激がサンプルに加わってしまう可能性があることを念頭に置いておくべきである。そのため、Western blotting法でのサンプル調整でも同様の注意が必要であるが、標的となるシグナル伝達

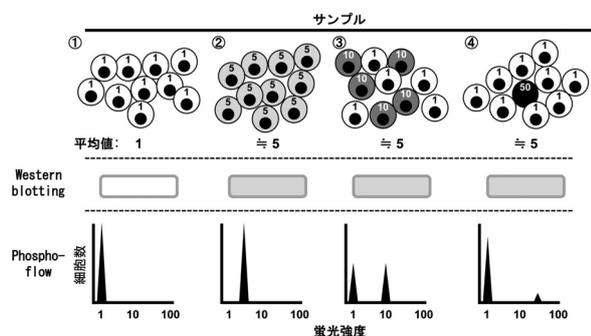


図1 Phosphoflow法に特有のシングルセルレベルでの解析 (概念図)

ある実験系において、細胞内のリン酸化レベルが

- ① 1のものが10個含まれるサンプル、
- ② 5のものが10個含まれるサンプル、
- ③ 1のものが5個と、10のものが5個含まれるサンプル、
- ④ 1のものが9個と、50のものが1個含まれるサンプル、

があったとする。

Western blotting法では、リン酸化レベルはサンプル内の平均値として表されるため、①以外の②、③、④はほぼ同程度の濃さのバンドとなり、区別することは非常に困難である。一方Phosphoflow法では、シングルセルレベルでの解析が可能であるため、個々の細胞のリン酸化レベルを把握することが可能で、②、③、④が異なったリン酸化状態にあるサンプルであることを識別できる。(出典元：引用文献5を参考にし、改変して使用)

分子のリン酸化を誘導する際、最適な刺激条件を探索・決定することが、このステップで最も重要となる。刺激条件を決定する主要要素としては、

I. 刺激物

II. 刺激濃度と刺激時間

III. (in vitroで刺激を行なう場合) サンプルの培養条件

等が挙げられる。I, IIが重要であるのは改めて書く必要もないであろうが、IIIについても考慮する必要がある。冷培養液中でサンプルを調整した後、37°Cの温度条件下で短時間の刺激を与える場合、例えば、細胞を1 mlに懸濁している場合と、50 μ lに懸濁している場合では、37°Cに達するまでの時間は全く異なる。また、気相(例:CO₂インキュベーター)を用いる場合と液相(例:ウォーターバス)を用いる場合でも、空気と水の熱伝導率の違いによって、培養液温度の上昇速度は大きく異なってくる。温度の上昇速度が遅ければ遅いほど、細胞にとってストレスとなる温度に暴露されている時間も長くなり、そのこと自体が細胞に様々な反応を引き起こしてしまう可能性があることにも注意しなければならない。

2) リン酸化誘導後のサンプルの固定

1) でも述べたが、リン酸化された分子は、短時間のうちに脱リン酸化されてしまう場合が多い。そのため、刺激後直ちに固定化(fixation)を行ない、刺激と脱リン酸化酵素の反応を止めて、リン酸化されたシグナル分子の脱リン酸化を防ぐ必要がある。一般にこのステップではパラホルムアルデヒド溶液を用いる場合が多く、筆者は2%のものを用いている。

3) 細胞膜の透過処理および蛋白の変性

細胞内に存在するシグナル伝達分子を蛍光抗体で標識するためには、細胞膜に“穴”を空けて、抗体が膜を通過できるようにしなければならない(透過処理, permeabilization)。同じく細胞内の分子(サイトカイン)を染色する技術であるIntracellular cytokine staining法では、この処理にサポニンが用いられることが多い。しかしPhosphoflow法では、サポニンが用いられることは殆どない。その理由は複数あるが、上で述べたように、「リン酸化部位を特異抗体に暴露させるために、しばしば蛋白を変性させてその立体構造を変化させ

る必要がある」ことは特に重要である(図2)。すなわちPhosphoflow法では、細胞膜の透過性を高めるのと同時に、蛋白の立体構造を変化させる試薬を選択することが重要である。代表的なものとしては、高濃度の冷メタノールを元にした試薬が使用されることが多く、筆者は90%もしくは100%の冷メタノールを使用している。

4) 細胞表面マーカーおよびシグナル伝達分子の染色

現在、Phosphoflow法に使用可能な、シグナル伝達分子のリン酸基をエピトープとする抗体は、Cell Signaling Technology社(<http://www.cellsignal.com/>)やBD Biosciences社(<http://www.bdbiosciences.com/home.jsp>, BD Biosciences社では、“Phosflow”と呼称されている)等、数社のメーカーから入手可能である。それらの抗体は、メタノール等による変性後の蛋白をエピトープとしているものであるため、メタノール処理後のサンプルに使用可能である。

しかし、メタノール処理は、細胞内のシグナル伝達分子のみに作用するわけではない。当然、細胞表面マーカーとなる分子にも変性が誘導され、多くの

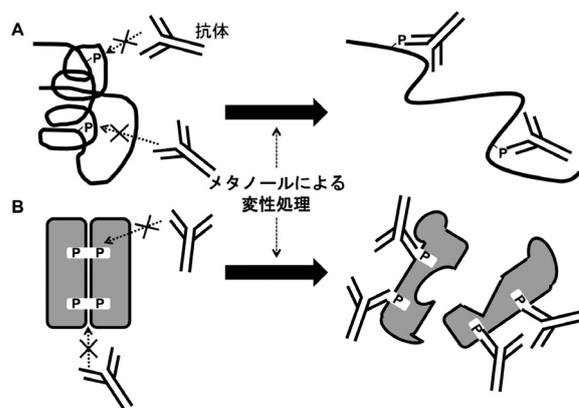


図2 メタノールによるシグナル伝達分子の変性(概念図)

シグナル伝達分子のリン酸化部位は、その分子内ではしばしばそのままでは抗体がアクセスできないような位置に存在している。例えば、

A: 標的となる分子のリン酸化部位が複雑な立体構造の中に含まれている場合

B: 標的となる分子が複合体を形成し、その接合面/接合部にリン酸化部位が存在する場合

等がある。そのような場合でも、メタノールによる変性処理を行なうことで標的分子の立体構造が変化し、抗体がリン酸化部位にアクセスできるようになる。

P: リン酸化部位

場合、特異抗体が結合できなくなってしまう。さりとてメタノール処理前に細胞表面マーカーを蛍光抗体で標識し、その後にメタノール処理を行なったとしても、蛍光蛋白がメタノール処理によって変性してしまい、その蛍光を失ってしまう。FITCのような小さな分子 (fluorescein isothiocyanate, 分子量: 約389Da) であれば多少蛍光が残るが、PE (phycoerythrin, 分子量: 約240kDa) や APC (allophycocyanin, 分子量: 約105kDa) のような巨大分子の場合、その蛍光はほぼ完全に失われてしまう。従って、予備実験や他の研究者との情報共有を行なうこと、あるいは、BD Biosciences社の提供以下のファイルを参考にする (筆者注・ただし、ファイルに記載されている情報を鵜呑みにせず、実際に予備実験を行うことを強く勧める) により、メタノール処理に抵抗性のエピトープを認識する抗体を選択することは、マルチパラメーターの Phosphoflow法を行なう上で最も慎重に検討すべき条件の一つである。

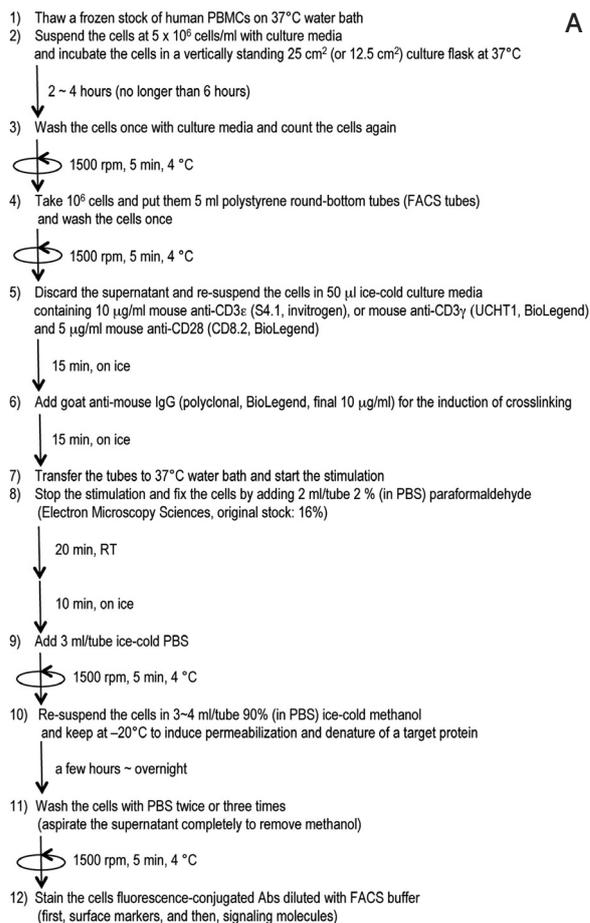
http://www.bdbiosciences.com/documents/antibodies_human_cellsurface_marker.pdf

Phosphoflow法の実際の応用例

以下に、筆者が実際に行なったPhosphoflow法の一例を解説する⁶⁾。

一般的に、一度抗原に感作されたT細胞 (感作T細胞, experienced T cell) は、未感作のT細胞 (未感作T細胞, naïve T cell) に比べて迅速かつ強力な抗原反応性を示すことが知られているが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。そこで筆者らはヒト末梢血を用いて、感作T細胞と未感作T細胞のTCR (T細胞レセプター, T cell receptor) シグナルを詳細に解析した。実際に使用したプロトコールのチャート図と試薬類を図3に示している。着目した分子としては、多くの細胞種で活性化とその抑制に関わることが知られる、“MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) 系”に属する分子、「ERK (extracellular signal regulated kinase)」と「p38」である。

Ficoll-Paque PLUSを用いた比重遠心法でPBMCs (末梢血単核球, peripheral blood mononuclear cells) を分離した後、FACS (fluorescence-



Preparation of reagents

- B**
- PBS
 - Culture medium: RPMI supplemented with 10% FCS, 2% human serum, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 50 μM of 2-ME, and 2 mM L-glutamine
 - FACS buffer: 2.5% FCS (or NBSC)- and 0.05% NaN₃-containing PBS
 - Abs for surface markers:
 - anti-CD3-PE/Cy7 (UCHT1, BioLegend)
 - anti-CD4-PE/Cy5 (RPA-T4, BioLegend)
 - anti-CD45RA-Pacific Blue (HI100, BioLegend)
 - anti-CD45RO-PE (UCHL1, BioLegend)
 - anti-CD8-FITC (G42-8, BD Biosciences)
 - Abs for phospho-signaling molecule (primary Abs)
 - rabbit anti-phosphorylated ERK (Thr202/Tyr204, 197G2, Cell Signaling Technology),
 - rabbit anti-phosphorylated p38 (Thr180/Tyr182, 3D7, Cell Signaling Technology),
 - Secondary Ab
 - Alexa Fluor® 647-conjugated donkey anti-rabbit IgG (polyclonal, invitrogen)

図3 筆者らがヒト末梢血T細胞のTCRシグナル解析に用いたプロトコールと試薬類

A: 細胞をチューブ内のごく少量の冷培養液に懸濁し、氷上で抗CD3抗体と抗CD28抗体を加えて予めクロスリンクさせておく。37°Cのウォーターバスにチューブを浸すことで迅速な反応の誘導を図った。

B: 筆者らが使用した試薬類

2-ME: 2-mercaptoethanol, Ab: antibody, ERK: extracellular signal regulated kinase, FACS: fluorescence-activated cell sorter, FCS: fetal calf serum, min.: minutes, FITC: fluorescein isothiocyanate, NaN₃: sodium azide, NBSC: newborn calf serum, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PBS: phosphate-buffered saline, PE: phycoerythrin, RT: room temperature

activated cell sorter) チューブ内のごく少量 (50 μ l) の冷培養液に懸濁し, 氷上で抗CD3抗体と抗CD28抗体を加えて, 刺激反応が発生するのを防ぎつつクロスリンクを予め誘導しておく. 37°Cのウォーターバスにチューブを浸すことで培養液の温度は一気に上昇し, TCR刺激がT細胞に誘導されることとなる (予めクロスリンクを誘導しておき, 培養液温度を迅速に上昇させることは, シグナル伝達経路のリン酸化kineticsを解析するうえで重要である).

2分間の刺激後, 2%パラホルムアルデハイド溶液で固定化を行なった後, メタノール処理を施して, 蛍光抗体で細胞表面マーカー, リン酸化ERK (ppERK), リン酸化p38 (ppp38) を染色した. 細胞表面マーカーとしては, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45ROを用いた (図3B). フローサイトメーターでデータを取得後コンピューター上でCD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞をゲーティングし,

それぞれの細胞集団の中でCD45RA⁺ CD45RO⁻のものをnaïveな細胞集団, CD45RA⁻ CD45RO⁺のものをexperiencedな細胞集団とした.

図4に示すように, CD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞ともに, naïveな細胞集団ではERKが, experiencedな細胞集団ではp38が, それぞれ優位にリン酸化されていることが分かった. すなわち, naïveな細胞集団とexperiencedな細胞集団では, 同じようにTCR刺激を受けても, その細胞内で活性化されるシグナル伝達経路は, 全く異なることが明らかとなった⁶⁾.

もし上記の実験をWestern blotting法で行なうとすれば, ヒトの末梢血から, 充分な数のnaïve CD4陽性T細胞 (CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ CD3⁺), naïve CD8陽性T細胞 (CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD8⁺ CD3⁺), experienced CD4陽性T細胞 (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD4⁺ CD3⁺), experienced CD8陽性T細胞 (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD8⁺ CD3⁺), の4種類のサンプルをセルソーターやMACS (磁気細胞分離装置) 等で分離し, 調整しなければならない. そのためには, 相当量の血液と手間, 時間, さらに分離のための試薬 (とそのコスト) が必要である. しかしPhosphoflow法では事前のサンプル調整は不要であり, 少量の末梢血を使用するだけで上記のような解析が可能である.

おわりに

近年のフローサイトメーターの技術革新は凄まじい. 例えばBD Biosciences社のBD LSRFortessaでは, 最大18カラーの同時解析が可能である. このようなフローサイトメーターを用いることで, ごく少量の細胞サンプルでも非常に多くの情報が得られるようになることが容易に想定される. 細胞内シグナル解析のように, これまで大量のサンプルを用意し, 手間と時間をかけなければ行なえなかった解析も, 最新のフローサイトメーターとPhosphoflow法と組み合わせることで, 今後は容易に, 迅速に行なえるようになるであろう. このような解析方法は, 臨床検体のような, 量に限りのあるサンプルの解析にも適していると言える. 今後はPhosphoflow法が, 実験室での基礎研究だけではなく, 臨床の現場で直面している疾患を対象にした研究にも応用され, 細胞

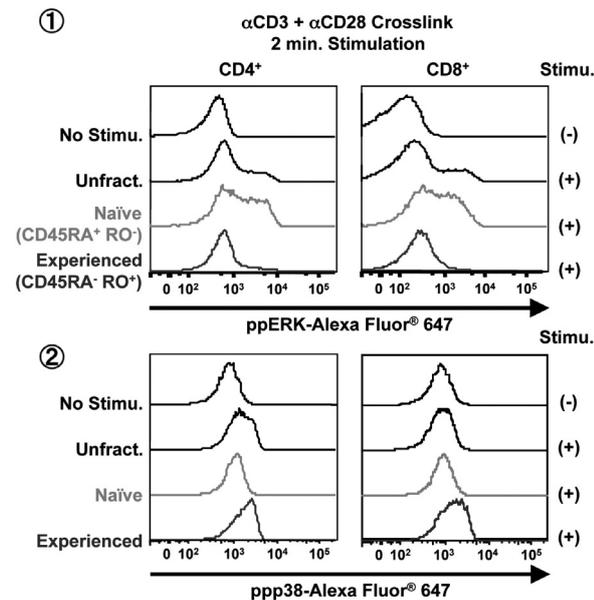


図4 筆者らがPhosphoflow法を用いて行なったヒト末梢血T細胞のTCRシグナル解析の一例

(A, B) 図3で示したプロトコールに従って2分間刺激した (α CD3 + α CD28 Crosslink) ヒトPBMCsについて, 各T細胞分画のERK (A) とp38 (B) のリン酸化を検討した. CD4陽性T細胞 (CD4⁺ CD3⁺), CD8陽性T細胞 (CD8⁺ CD3⁺) のうち, それぞれCD45RA陽性, CD45RO陰性集団をNaïve, CD45RA陰性, CD45RO陽性集団をExperiencedとした. フローサイトメーターはBD Biosciences社のLSRIIを用いて行ない, 得られたデータはTree Star社のFlowJoソフトウェアで解析した. ppERK: phosphorylated ERK, ppp38: phosphorylated p38, Stimu.: stimulation, Unfract.: unfractionated

内シグナル解析研究の臨床応用に向けた発展が期待される。

引用文献

- 1) Farahi Far D, Peyron J-F, Imbert V, Rossi B. Immunofluorescent Quantification of Tyrosine Phosphorylation of Cellular Proteins in Whole Cells by Flow Cytometry. *Cytometry* 1994 ; 15 : 327-334.
- 2) Vuillier F, Scott-Algara D, Cayota A, Siciliano J, Nugeyre M-T, Dighiero G. Flow cytometric analysis of protein-tyrosine phosphorylation in peripheral T cell subsets. Application to healthy and HIV-seropositive subjects. *J Immunol Methods* 1995 ; 185 : 43-56.
- 3) Perez OD, Nolan GP. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol* 2002 ; 20 : 155-162.
- 4) Sachs K, Perez O, Pe'er D, Lauffenburger DA, Nolan GP. Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. *Science* 2005 ; 308 : 523-529.
- 5) Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry : techniques and clinical applications. *Clin Immunol* 2004 ; 110 : 206-221.
- 6) Adachi K, Davis MM. TCR ligation induces distinct signaling pathways in naïve versus antigen-experienced T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 1549-1554.