

# 臨床免疫ヒトデータ解析における 有用データベースとプロトコール レポジトリ

2024 年 7 月

日本臨床免疫学会ヒトデータ共同研究小委員会 編

## 目次

トランスクリプトームデータベース .....	5
Monaco Immune Cell dataset .....	5
ARCHS4: Massive Mining of Publicly Available RNA-seq Data from Human and Mouse .....	5
The Immunological Genome Project (ImmGen) .....	6
Interferome v2.01: Database of annotated interferon-regulated genes .....	6
Blueprint .....	7
FANTOM5 .....	7
Long non-coding RNA (lncRNA) atlas .....	8
Micro RNA (miRNA) atlas .....	8
BIOS Consortium .....	9
<i>Single-cell RNA-seq データベース .....</i>	<i>9</i>
JingleBells .....	9
Accelerating Medicines Partnership (AMP)-RA/SLE database .....	10
Human Cell Atlas (HCA).....	11
<i>統合 Single-cell RNA-seq データベース .....</i>	<i>11</i>
はじめに : .....	11
fibroXplorer.com .....	12
Autoimmune-wide peripheral CD4+ T cell.....	12
<i>Expression Quantitative Trait Loci (eQTL)データベース .....</i>	<i>13</i>
Database of Immune Cell Expression, Expression quantitative trait loci (eQTLs) and	

Epigenomics (DICE) database .....	13
Geuvadis .....	13
Immune Cell Gene Expression Atlas from the University of Tokyo (ImmuNexUT).....	14
<i>Epigenome</i> データベース .....	14
Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) Project .....	14
ChIP atlas.....	15
プロテオーム、蛋白アレイ .....	17
はじめに : .....	17
自己抗体・自己抗原データベース .....	17
AAgAtlas 1.0 (human autoantigen database) .....	17
蛋白質(自己抗原)データベース .....	18
HGPD (Human Gene and Protein Database) .....	18
メタボロームデータベース .....	19
Human Metabolome Database (HMDB) .....	19
Metabolomics Workbench.....	19
MetaboLights .....	20
マスサイトメトリー.....	21
CyTOF 染色プロトコール.....	21
ヒト末梢血免疫フェノタイピングプロトコール.....	25
採血からフローサイトメーター解析までの概要 .....	25
手順 .....	25
各測定用パネル.....	27

各測定パネル用抗体カクテル .....	28
各測定パネル展開： gating strategy について .....	31
T cell パネル展開 .....	32
B cell パネル展開 .....	42
Dendritic cell (DC)、monocyte、natural killer (NK) cell パネル展開 .....	43
原発性免疫不全症のフローサイトメトリー解析に関する文献紹介 .....	45

## 原発性免疫不全症の遺伝子解析に有用なデータベース

Mutation @ A Glance

gnomAD (Genome Aggregation Database)

[Combined Annotation Dependent Depletion \(CADD\) と PopViz](#)

## トランスクリプトームデータベース

### Monaco Immune Cell dataset

リンク：

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE107011>

説明：

健康人末梢血よりフローサイトメトリーを使用して回収した 29 種類に及ぶ免疫担当細胞サブセットの RNA-seq に関するデータベース（一部マイクロアレイデータも含まれる）。豊富なサブセット毎の遺伝子発現データは、各細胞サブセット特異的な遺伝子発現情報を与えることに留まらず、bulk RNA-seq などの混合データから細胞サブセット割合を推定する手法である deconvolution 解析に活用することも可能であり、有用性の高いデータセットである(1, 2)。

参考文献：

1. Monaco G, Lee B, Xu W, Mustafah S, Hwang YY, Carre C, et al. RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. Cell Rep. 2019;26(6):1627-40 e7.
2. Xu W, Monaco G, Wong EH, Tan WLW, Kared H, Simoni Y, et al. Mapping of gamma/delta T cells reveals Vdelta2+ T cells resistance to senescence. EBioMedicine. 2019;39:44-58.

### ARCHS4: Massive Mining of Publicly Available RNA-seq Data from Human and

#### Mouse

リンク：

<https://amp.pharm.mssm.edu/archs4/>

説明：

マウントサイナイ医科大学の Ma'ayan Lab によるヒトおよびマウスなどの 20 万サンプル以上の RNA-seq データを統合したデータベース。解析が必要な生データではなく、遺伝子レベルの発現情報を公開している。各遺伝子と共発現する遺

伝子などの情報もアクセスしやすい。各組織や培養細胞の発現データを検索し、ダウンロードして利用する事もできる(1)。

**参考文献：**

1. Lachmann A, Torre D, Keenan AB, Jagodnik KM, Lee HJ, Wang L, et al. Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse. Nat Commun. 2018;9(1):1366.

**The Immunological Genome Project (ImmGen)**

リンク：

<http://www.immgen.org/>

説明：

免疫学と計算生物学を専門とする 20 以上の研究室による国際コンソーシアム。免疫細胞の網羅的な遺伝子発現や制御ネットワークの解析を目指している。主にマウスの各免疫細胞における発現データを中心に、近年はエピゲノム情報、シングルセル RNA-seq、micro-RNA など多彩な情報を公開している。ただし、データのダウンロードは一部に限られる(1, 2)。

**参考文献：**

1. Heng TS, Painter MW, Immunological Genome Project C. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. Nature immunology. 2008;9(10):1091-4.
2. Yoshida H, Lareau CA, Ramirez RN, Rose SA, Maier B, Wroblewska A, et al. The cis-Regulatory Atlas of the Mouse Immune System. Cell. 2019;176(4):897-912 e20.

**Interferome v2.01: Database of annotated interferon-regulated genes**

リンク：

<http://www.interferome.org/interferome/home.jsp>

説明：

マウスもしくはヒトの細胞をインターフェロンで刺激した際の発現マイクロアレイに関する公共データベース。インターフェロン調節因子(Interferon Regulated Genes (IRGs))や IRG signature の同定を可能とし、また個々の遺伝子の染色体の

位置および組織発現の同定も支援している。様々な免疫関連の実験系における遺伝子発現変化や、ヒト疾患におけるインターフェロン関連遺伝子の動きを把握するのに有用である(1)。

**参考文献：**

1. Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D1040-6.

**Blueprint**

**リンク：**

<http://dcc.blueprint-epigenome.eu/#/home>

**説明：**

ヨーロッパのコンソーシアムが作成した血球系のエピゲノムデータベース。ChIP-seq が主体だが、一部 DNase-seq, RNA-seq, Bisulfite-seq のデータも存在する(1)。

**参考文献：**

1. Adams D, Altucci L, Antonarakis SE, Ballesteros J, Beck S, Bird A, et al. BLUEPRINT to decode the epigenetic signature written in blood. Nat Biotechnol. 2012;30(3):224-6.

**FANTOM5**

**リンク：**

<https://fantom.gsc.riken.jp/5/>

**説明：**

遺伝子転写産物の機能解析やアノテーションを主な目的とした、理化学研究所主導の国際的な共同研究プロジェクトである FANTOM の 5 期プロジェクト。ヒトとマウスの 500 種類以上の細胞種や臓器を対象に、転写開始点(5'端)を正確に同定することができる CAGE 法を用いて全 RNA を解析することにより、プロモーター、エンハンサーの活性を網羅的に測定した。データは FANTOM SSTAR ([https://fantom.gsc.riken.jp/5/sstar/Main\\_Page](https://fantom.gsc.riken.jp/5/sstar/Main_Page))、ZENBU

(<https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/>)、RefEx (<http://refex.dbcls.jp>) 等から参照できる(1)。

**参考文献：**

1. Consortium F, the RP, Clst, Forrest AR, Kawaji H, Rehli M, et al. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*. 2014;507(7493):462-70.

**Long non-coding RNA (lncRNA) atlas**

**リンク：**

<http://fantom.gsc.riken.jp/cat/>

**説明：**

FANTOM5 のデータを用いて作成された、ヒトの主要な初代培養細胞や組織のサンプルから Long non-coding RNA (lncRNA)の転写開始点および発現プロファイルの網羅的なカタログ。27,919 種の lncRNA のうち、19,175 種が機能しており、そのうち 1,970 種が疾患に関与している可能性があることが示された(1)。

**参考文献：**

1. Hon CC, Ramilowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJ, Gough J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*. 2017;543(7644):199-204.

**Micro RNA (miRNA) atlas**

**リンク：**

[https://fantom.gsc.riken.jp/5/suppl/De\\_Rie\\_et\\_al\\_2017/vis\\_viewer\\_novel/#/human](https://fantom.gsc.riken.jp/5/suppl/De_Rie_et_al_2017/vis_viewer_novel/#/human)

**説明：**

FANTOM5 のヒトおよびマウスの 100 種類以上の初代培養細胞に由来する RNA サンプルを対象に新たにシーケンスされた MicroRNA(miRNA)の発現プロファイルの網羅的なカタログ(1)。

**参考文献：**

1. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):872-8.



## BIOS Consortium

リンク：

<https://www.bbmri.nl/acquisition-use-analyze/bios>

説明：

オランダの 6 つのバイオバンクに登録された 4,000 人以上のトランスクリプトーム、ゲノム、DNA メチル化、フェノタイプを含むデータセット。

データは <https://omics-explorer.bbmri.nl> から参照できる。

## Single-cell RNA-seq データベース

### JingleBells

リンク：

<http://jinglebells.bgu.ac.il>

説明：

イスラエルの Ner-Gaon 等により 2017 年に作成された免疫細胞に限定した single cell RNA-seq (scRNA-seq) のデータセットのリポジトリ。scRNA-seq の raw data を公共データベースから収集し、統一したフォーマットで alignment し、どの細胞種由来かの annotation を行っている。また、各々の single cell レベルのデータセットを Integrated Genome Viewer ([www. Broadinstitute.org/igv/](http://www.broadinstitute.org/igv/)) を介して可視化できる機能も備えている(1)。

参考文献：

1. Ner-Gaon H, Melchior A, Golan N, Ben-Haim Y, Shay T. JingleBells: A Repository of Immune-Related Single-Cell RNA-Sequencing Datasets. J Immunol. 2017;198(9):3375-9.

## Accelerating Medicines Partnership (AMP)-RA/SLE database

リンク :

[https://www.immport.org/resources/amp-ra-sle#AMP\\_datasets](https://www.immport.org/resources/amp-ra-sle#AMP_datasets)

<https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn52297840.3/datasets/>

説明 :

Accelerating Medicines Partnership (AMP) Rheumatoid Arthritis – Lupus Program により形成された炎症臓器の遺伝子発現情報を含むデータセット。マスマイトメトリデータ、scRNA-seq データなど、関節リウマチや全身性エリテマトーデスの炎症局所における単細胞レベルからの病態解明に有用なデータが揃っている(1-6)。

参考文献 :

1. Der E, Suryawanshi H, Morozov P, Kustagi M, Goilav B, Ranabothu S, et al. Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways. *Nature immunology*. 2019;20(7):915-27.
2. Arazi A, Rao DA, Berthier CC, Davidson A, Liu Y, Hoover PJ, et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis. *Nature immunology*. 2019;20(7):902-14.
3. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nature immunology*. 2019;20(7):928-42.
4. Orange DE, Agius P, DiCarlo EF, Robine N, Geiger H, Szymonifka J, et al. Identification of Three Rheumatoid Arthritis Disease Subtypes by Machine Learning Integration of Synovial Histologic Features and RNA Sequencing Data. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(5):690-701.
5. Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hiCXCR5- T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight*. 2019;4(20).
6. Zhang F, Helena Jonsson A, Nathan A, et al. Deconstruction of rheumatoid arthritis synovium defines inflammatory subtypes. *Nature*. 2023; 623(7987): 616-624.

## Human Cell Atlas (HCA)

リンク：

<https://www.humancellatlas.org>

説明：

Human Cell Atlas Consortium は人体を構成する 37 兆の細胞を網羅的に解明することを目的として 2016 年に設立された国際共同コンソーシアムである(1)。2024 年 4 月現在では 700 超の研究室で取得された 6000 万程度の細胞データが公開されている。免疫細胞に限らず様々な組織の scRNAseq データが揃っており、HCA data portal を通じて取得可能である。また、同サイトの resources には education/training material として scRNAseq 解析のチュートリアルが準備されており、こちらも初学者に有用な資料である。

参考文献：

1. Orit Rozenblatt-Rosen, Michael J T Stubbington, Aviv Regev, Sarah A Teichmann. The Human Cell Atlas: from vision to reality. Nature. 2017; 550(7677): 451-453.

## 統合 Single-cell RNA-seq データベース

はじめに：

昨今では優れた batch 処理ツールの登場・進歩により既存の公開データを統合するメタ解析を精度良く施行することが可能となっている。具体的には解析対象となる細胞数が増えることで、従来の bulk 解析では検出が難しかった rare population の特徴を捉えることや解析にあたっての検出感度が向上している。

ここでは、一次情報となる scRNA-seq データベースとは別に、特定の状況下における統合 scRNA-seq データベースについての紹介を行う。このうちの一部は Seurat で読み込み可能な形のオブジェクトのほか、Web サイト上での操作も可能となっている。正式名称がついていないものも一部存在するが、ここでは便宜的に暫定的なタイトルを記す。

## **fibroXplorer.com**

リンク :

<https://www.fibroexplorer.com>

説明 :

マウスの steady-state、perturbed-state およびヒトの perturbed-state における線維芽細胞データセットの統合シングルセルアトラスである(1)。web による Seurat オブジェクトのダウンロードのほか、Web サイトベースにおけるインタラクティブな操作も行える。

参考文献 :

1. Matthew B Buechler, Rachana N Pradhan, Akshay T Krishnamurty, et al. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. Nature. 2021; 593(7860): 575-579.

## **Autoimmune-wide peripheral CD4+ T cell**

リンク :

[https://singlecell.broadinstitute.org/single\\_cell/study/SCP1963/autoimmune-wide-peripheral-cd4-t-cell](https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP1963/autoimmune-wide-peripheral-cd4-t-cell)

説明 : 自己免疫疾患における CD4 陽性 T 細胞が果たす役割を研究すべく公共データから渉猟した 953 名、1800 万細胞からなるヒト CD4+ T cell シングルセルアトラスデータである。CD4+ T cell を 18 種の細胞種に細分類し、自己免疫疾患の発症や臨床データに関与する 12 個の gene program を同定している(1)。

参考文献 :

1. Yasumizu Y, Takeuchi D, Morimoto R, et al. Single-cell transcriptome landscape of circulating CD4+ T cell populations in autoimmune diseases. Cell Genom. 2024;4(2):100473.

## Expression Quantitative Trait Loci (eQTL)データベース

### Database of Immune Cell Expression, Expression quantitative trait loci (eQTLs) and Epigenomics (DICE) database

リンク :

<https://dice-database.org/>

説明 :

健常人 91 人から回収した 13 種類の免疫担当細胞と、さらに活性化ナイーブ CD4 陽性 T 細胞、活性化ナイーブ CD8 陽性 T 細胞も含めた 15 の細胞条件における遺伝子発現データを含むデータセットであり、single nucleotide polymorphism (SNP)に対する細胞種特異的な遺伝子発現変動まで評価したデータが公開されている。cis-eQTL 効果を認める 12,245 遺伝子が同定されており、genome wide association study (GWAS) variant に対する免疫担当細胞の遺伝子発現プロファイルに与える効果などをホームページ上で容易に確認することが可能である(1)。

参考文献 :

1. Schmiedel BJ, Singh D, Madrigal A, Valdovino-Gonzalez AG, White BM, Zapardiel-Gonzalo J, et al. Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. Cell. 2018;175(6):1701-15 e16.

### Geuvadis

リンク :

<https://www.internationalgenome.org/data-portal/data-collection/geuvadis>

説明 :

460 を超えるドナーの末梢血から作成された不死化 B 細胞株の RNA-seq, small RNA-seq データ。ドナーは 1000 genome project と重複しているため、対応するゲノム情報も公開されている。人種はヨーロッパ人が主体で、一部アフリカンが含まれる(1)。

**参考文献：**

1. Lappalainen T, Sammeth M, Friedlander MR, t Hoen PA, Monlong J, Rivas MA, et al. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. Nature. 2013;501(7468):506-11.

**Immune Cell Gene Expression Atlas from the University of Tokyo (ImmuNexUT)**

**リンク：**

<https://www.immunexut.org>

**説明：**

10 個の免疫介在性疾患および健常対象者計 416 名からなる 28 の免疫担当細胞の bulk RNA-seq データを公開している(1)。Web 上では遺伝子名を指定することで細胞種横断的な発現データの比較、疾患ごとに細分類された発現量データ、eQTL データの閲覧が可能である。細胞種ごとの expression データは NBDC で取得可能である。(https://humandbs.biosciencedbc.jp/hum0214-v9)

**参考文献：**

1. Ota M, Nagafuchi Y, Hatano T, et al. Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases. Cell. 2021;184(11):3006-3021.

**Epigenome データベース**

**Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) Project**

**リンク：**

<https://www.encodeproject.org>

**説明：**

アメリカ国立ヒトゲノム研究所(NHGRI) が 2004 年に立ち上げた、ヒトゲノム

上の機能エレメントについての包括的な解明を目的としたプロジェクトである。統一プロトコルにしたがった実験・解析により得られた ChIP-seq, DNase-seq をはじめとする各種 NGS データはスタンフォード大学が管理しているポータルページを通じて公開され、エピゲノムデータのプラットフォームとして広く利用可能である(1)。近年では ENCODE4 project としてより多様な細胞種、解析手法によるデータが蓄積されつつある(2)。

#### 参考文献：

1. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.
2. ENCODE Project Consortium, Michael P. Snyder, Thomas R. Gingeras, et al. Perspectives on ENCODE. *Nature*. 2020;583(7818):693-698.

#### ChIP atlas

##### リンク：

<https://chip-atlas.org>

##### 説明：

NCBI, DDBJ, ENA などの公共データベースに登録されたシーケンスデータのうち ChIP-seq, ATAC-seq, DNase-seq および Whole-genome Bisulfite-seq データを統一されたプロトコルにしたがって処理したものである。元データは定期的に更新されており(1-2)、結果は web インターフェースにおいて閲覧できるほか、API 提供もしている。一次データではないが、転写因子により制御を受ける遺伝子の網羅的なデータベースとして有用である。

#### 参考文献：

1. Oki S, Ohta T, Shioi G, Hatanaka H, Ogasawara O, Okuda Y, Kawaji H, Nakaki R, Sese J, Meno C. ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public chip-seq data. *EMBO Rep*. 2018;19:e46255.
2. Zou Z, Ohta T, Miura F, Oki S. ChIP-Atlas 2021 update: a data-mining suite for exploring epigenomic landscapes by fully integrating ChIP-seq, ATAC-seq and Bisulfite-seq data. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W175-W182.





## プロテオーム、蛋白アレイ

### はじめに：

自己免疫疾患において、自己抗体の出現は最も大きな特徴の一つである。日常臨床において自己抗体の同定は、診断の一助となり、病型の判断や予後予測にも役立つ。しかしながら、全身性自己免疫疾患に見出される多くの自己抗体は、核内を含めた細胞内蛋白質に対するものがほとんどであり、通常、抗体は細胞の内部には侵入しないため、生体内における自己抗体の病原性については議論が続けられている。自己抗体に病原性があると想定した場合、もっともそれを理解しやすい病態仮説は、細胞内自己抗原とホモロジーを持つ細胞膜蛋白質あるいは分泌型蛋白質が存在しており、これに対して自己抗体が作用するというモデルである。近年、細胞膜蛋白質を含めた蛋白質の理解が進み、また、立体構造を維持した蛋白質の合成技術の進歩などにより、自己抗原・自己抗体研究の新たな展開が期待されようになってきた。このような背景を踏まえ、本領域では、自己抗原のデータベースを紹介した。さらに、自己抗体研究を行う際には、自己抗体がターゲットとする蛋白質の情報が重要となる。したがって、本領域では研究に有用と思われるヒト蛋白質のデータベースについても触れた。

### 自己抗体・自己抗原データベース

#### **AAgAtlas 1.0 (human autoantigen database)**

##### リンク：

<http://biokb.ncpsb.org/aagatlas/index.php>

##### 説明：

中国(State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences-Beijing (PHOENIX Center), Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing)、米国(The Virginia G. Piper Center for Personalized Diagnostics, Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ)、英国(European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge)の3施設によって作成された自己抗体のデ

データベース。PubMed 検索により”autoantigen”や”autoantibody”などの語句をキーワードとして得られた 45830 本の論文から、専門家によって選び出された 1126 個の自己抗原と、それに関連する 1071 種の疾患との関係性について、オントロジーが構築されている(1)。

#### 参考文献：

1. Wang D, Yang L, Zhang P, LaBaer J, Hermjakob H, Li D, et al. AAgAtlas 1.0: a human autoantigen database. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D769-D776.

### 蛋白質(自己抗原)データベース

#### HGPD (Human Gene and Protein Database)

リンク：

<http://hgpd.lifesciencedb.jp/cgi/index.cgi>

#### 説明：

国立研究開発法人 産業技術総合研究所によって運営されるデータベースサイト。「タンパク質機能解析プロジェクト」及び「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」において作成された、ヒト遺伝子(約 22,000 種)の 70%にあたる 15,000 種に対応する世界最大のヒト GatewayR エントリークローンの詳細情報を網羅している。SDS-PAGE による発現タンパク質情報、クローンの入手案内も掲載されているため、研究において極めて実用的なデータベースと考えられる(1, 2)。

#### 参考文献：

1. Maruyama Y, Kawamura Y, Nishikawa T, Isogai T, Nomura N, Goshima N. HGPD: Human Gene and Protein Database, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D924-9.
2. Maruyama Y, Wakamatsu A, Kawamura Y, Kimura K, Yamamoto J, Nishikawa T, et al. Human Gene and Protein Database (HGPD): a novel database presenting a large quantity of experiment-based results in human proteomics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D762-6.

## メタボロームデータベース

### Human Metabolome Database (HMDB)

リンク：

<https://hmdb.ca/>

説明：

ヒトにおける低分子代謝物に関するデータベース。物性、構造、分類などの化学データ、関連する疾患や生理学的効果についての臨床データ、代謝経路や体内での局在、定量結果などの分子生物学・生化学データが含まれる(1-5)。

参考文献：

1. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. 2007; 35(Database issue):D521-6.
2. Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al., HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. Nucleic Acids Res. 2009; 37(Database issue):D603-610.
3. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, et al., HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. Nucleic Acids Res. 2013;41(D1):D801-7.
4. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, et al., HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D608-17.
5. Wishart DS, Guo AC, Oler E, et al., HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. Nucleic Acids Res. 2022;50(D1):D622–31.

### Metabolomics Workbench

リンク：

<https://www.metabolomicsworkbench.org>

説明：

米国のメタボロミクスデータのデポジット。National Metabolomics Data Repository (NMDR)では、Metabolomics Workbenchを通じて、細胞、組織、生物のメタボロミクスデータを登録できる。Mass spectrometry (MS)や nuclear magnetic

resonance (NMR)に限らず、様々な代謝物分析に対応している。NMDR で収集された実験データは、オンライン上で検索・解析することができる。また、Metabolomics Workbench Metabolite Database には 164,000 を超える代謝物構造が登録されており、RefMet データベースではメタボロミクス実験において MS や NMR 技術によって同定された代謝物構造および同重体種の標準的な参照命名法を提供している(1)。

**参考文献：**

1. Howell A, Yaros C. Downloading and Analysis of Metabolomic and Lipidomic Data from Metabolomics Workbench Using MetaboAnalyst 5.0. *Methods Mol Biol.* 2023;2625:313-321.

**MetaboLights**

**リンク：**

<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/index>

**説明：**

英国のメタボロミクスのデータデポジット。代謝物の構造、参照スペクトル、代謝物の生物学的役割、位置、濃度、代謝実験の実験データなどが掲載されている(1)。

**参考文献：**

1. Yurekten O, Payne T, Tejera N, Amaladoss FX, Martin C, Williams M, O'Donovan C. MetaboLights: open data repository for metabolomics. *Nucleic Acids Res.* 2024; 2(D1):D640-D646.

## マスサイトメトリー

### CyTOF 染色プロトコール

サンプル：Cell Banker を基液として液体窒素で保管された Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)を用いる。

#### \*PBMC の処理

ヘパリン採血で得られた血液 (10~20 ml)を血液と同量の RPMI に混合する。  
血液と同量の Ficoll を加えた 50 ml tube へオートピペッターで静かに上乗せ、  
1200 rpm (500 G)、23℃で 40 分間遠心する。

- ・ バフィーコートを抽出する。
- ・ 1200 rpm 23℃で 10 分間遠心する。
- ・ 上清を decantation し、RPMI 5 ml 加え混和する。  
→細胞数カウントチェックをこの時点で実施する。
- ・ 1200 rpm 5 分間、4℃で遠心
- ・ Cell Banker で保存 (1 tube  $2 \times 10^6$ /ml となるように調整)
- ・ 細胞凍結専用容器で-80℃フリーザーで数日保管→その後液体窒素へ長期保管

#### 試薬：

RPMI

Cell-ID Cisplatin-198Pt (1M)Cat: #201198 (PBS で 1000 倍希釈しておく)

Cell-ID™ Intercalator-Ir 125  $\mu$ M Cat: #201192A

Maxpar Water Cat: #201069

EQ™ Four Element Calibration Beads Cat: # 201078

eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set Cat: 00-5523-00

各種抗体

#### \*CD45 バーコーディング手法

注) 今後の解析を考慮し、できればサンプルは一度にまとめて染色したいと考えている。サンプル間の染色のムラをなくすこと、コストを下げるのがバーコー

ディングの目的である。

#### 1. サンプルの準備

保存していた PBMC を 37 度恒温槽で溶解する。

4°C（氷中）の PBS 1 ml と混和し、4 ml の PBS を加えた 15 ml tube へ混和。

1200 rpm 4°C 5 分間遠心する。

デカンテーション後、PBS 5 ml 加えた 15 ml tube へ混和する。

1200 rpm 4°C 5 分間遠心する。

#### 2. シスプラチンによる細胞染色

\*今後の処理を容易にするために、各サンプルを 96 well 丸底プレートへ移す  
2200rpm 4°C 2 分間遠心する。

各サンプルに対して、Cell-ID Cisplatin 1  $\mu$ M (PBS で 1000 倍希釈しておく) 100  $\mu$ l/well を加え、5 分間常温静置する。

FACS Buffer (B)を 200  $\mu$ l 加え Washing→遠心 (2200 rpm, 2 分 4°C or 常温)  
上記 2 回 Wash を繰り返し

(正式なプロトコールでは CSB と記載あるが FACS Buffer で処理可と判断しています)

#### 3. Fc block (必要であればこの作業を追加)

FACS B : Fc block 抗体=25 : 1 で準備→25  $\mu$ l/well 5-10 分静置

#### 4. CD45 barcoding

サンプル数に応じた数の CD45 抗体を準備 (CSB で希釈)

(抗体の希釈倍率は各抗体でタイトレーションでの評価が必要、市販のものであれば final 400~800 倍)

Fc Block で反応させている Well へそのまま CD45 抗体液を 25  $\mu$ l 追加。常温で 15 分間静置する。

(Fc Block を実施していなければ 50  $\mu$ l/well となるように抗体液を調整する。)

FACS B 150  $\mu$ l を加え Wash→(2200 rpm, 2 分で遠心 <300g 3 分でも問題ないと考慮中>)

遠心後デカンテーション、200  $\mu$ l の FACS B 加え Wash×2 回

全てのサンプルを 15 ml tube へ混和し一つにまとめる

#### 5. 細胞表面染色

この時点までに FACS B をベースに抗体カクテルを作成しておく  
(基本的には 1:100 で作成、特別に作成した抗体はタイトレーション評価の上適切な希釈とする)

(1 次抗体で染色する場合は 1:50)

Total 200  $\mu$ l で染色 15 分 常温 (先に FACS B 100  $\mu$ l を tube へ加え細胞攪拌した後抗体カクテル 100  $\mu$ l を加えるのが正式なプロトコールで記されているが一度に 200  $\mu$ l の抗体カクテルを加えても問題ないと考慮している)

染色後 1 ml CSB 加え Washing→500g 5 分 遠心×3 回

6. 2 次抗体による染色 (5 で biotin, FITC, PE, APC, rabbit 抗体使用した場合)

抗体カクテル (FACS B : 抗体 = 100 : 1) 作成し、Total 200  $\mu$ l で染色 15 分 常温で静置する。

染色後 FACS B 1 ml 加え Washing→500g 5 分 遠心×3 回

7. 細胞固定(Fixation)

eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set 使用

500ul/tube Fix/Perm (Reagent と diluent を混合したもの)を加え 1 時間静置

→FACS B 1 ml 加えて Washing→500g 5 分遠心×2 回

→Perm Buffer (Permeabilization Reagent×10) 1 ml 加え Washing→500g 5 分遠心

8. 細胞内染色+Permeabilization

細胞内染色用抗体カクテルを Perm Buffer で 100 倍希釈を作成 (Foxp3 のみ 50 倍希釈)

200  $\mu$ l/tube 加えて 20 分 常温 静置 (2 日間で測定実施する場合ここで Over night とする)

→Perm B 1 ml 加えて Washing→500g 5 分 遠心×3 回

9. 2 次抗体による染色 (2 次抗体が必要な場合)

Perm B で抗体カクテル作成 (100 倍希釈)

200  $\mu$ l 加え 30 分 常温で静置

→FACS B 1 ml 加え 500g 5 分 遠心×3 回

10. インターカレーターで細胞標識

Maxpar Fix and Perm Buffer (#201067) 1 ml にイリジウム 1  $\mu$ l を加え常温 1 時間 静置 (ここで Over night とするプロトコールも可)

→静置後 CSB 2 ml で Wash (ここは FACS buffer を使用せず必ず CSB で Wash するルールになっています。)

→500g 5 分 遠心

→Maxpar Water (#201069) 3 ml で 2 回 Wash

#### 11. 測定前の細胞調整

Total cell count 実施し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  以下の濃度になるように、Maxpar Water を用いて濃度調整する

EQ beads を 20%ほどになるように加える

#### 12. CyTOF 測定へ



## ヒト末梢血免疫フェノタイピングプロトコール

### 採血からフローサイトメーター解析までの概要

ヘパリンコートしたシリンジを用いて 10ml<sup>\*1</sup> を採血し、Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)を作成する。無染色 1 本および測定パネル用 (後述) 6 本の計 7 本のスピッツに分注して、それぞれ 100  $\mu$ l ずつになるように調整した後、抗体カクテル (後述)を加えて、30 分間 4℃の冷暗所で染色する。FACS バッファ<sup>\*2</sup> で洗浄、遠心して検体を作成し、フローサイトメーターで解析を行う。

\*1 白血球減少 (<3000/ $\mu$ l)やリンパ球減少 (<1000/ $\mu$ l)がない場合は、全血 10mL から概ね  $5.0-10.0 \times 10^6$  個程度の PBMC を作成できる。白血球減少やリンパ球減少がある場合は 20-30ml の全血を採血する。

\*2 FACS バッファ<sup>\*</sup>： PBS: 500ml+25%HSA (ヒトアルブミン): 10ml (final 0.5%)+NaN<sub>3</sub> (アジ化ナトリウム): 0.5g (final 0.1%)+5% $\gamma$  グロブリン: 5ml (final 500 $\mu$ g/ml)

### 手順

1. Leucosep tube 10 ml tube にリンパ球分離溶液を 3ml ずつ入れて、800G、1min 遠心。
2. 末梢血 10 ml に対して等量の PBS で希釈する。
3. 遠心後の Leucosep に 2.を 6 ml ずつ入れる。
4. 20℃、800G、20 min (ブレーキなし)で遠心。
5. パスツールピペットで上清を捨てて、PBMC 層をとり、15ml tube に入れる。  
PBS 10ml 追加後、20℃、250G、10min 遠心。
6. 上清を捨てて、PBS 10ml 追加後、20℃、250G、10min 遠心。
7. 上清を捨てて、 $1 \times 10^6$ につき 100  $\mu$ l の FACS バッファ<sup>\*</sup>に溶解する。
8. 5ml round tube に分注し、15min、4℃で静置。
9. 抗体カクテル (後述)を入れ、30min、4℃で暗所に静置。
10. FACS バッファ<sup>\*</sup> 1000  $\mu$ l で wash (4℃、250G、5min)。
11. FACS バッファ<sup>\*</sup> 200  $\mu$ l を追加し、冷暗所 (4℃のフリーザー)に保管。

12. 4 時間以内にフローサイトメーター (FACS Verse®, FACS Lyric® など) にて解析する。

## 各測定用パネル

Human Immunology Project Consortium (HIPC)の標準化プロトコール(1)を基礎とした解析パネルを用いた末梢血フローサイトメトリー解析の一例を示す。

	T cells	Treg	Th1, Th2, Th17	B cells	DCs, monocytes, NK cells	Tfh
FITC	CD28	Live or dead	Live or dead	Live or dead	Live or dead	CD28
PE	CCR7	CD25	CXCR3	CD24	CD56	CXCR5
PerCP-Cy5.5	CD4	CD4	CD4	CD19	CD123	CXCR3
PE-Cy7	CD45RA	CCR4	CCR6	CD27	CD11c	CCR6
APC	CD38	CD127	CD38	CD38	CD16	ICOS
APC-H7	CD8	CD45RO	CD8	CD20	CD3, 19, 20	CD69
V450	CD3	CD3	CD3	CD3	CD14	CD3
V500	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	IgD	HLA-DR	CD4

1. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat Rev Immunol. 2012;12(3):191-200.

各測定パネル用抗体カクテル

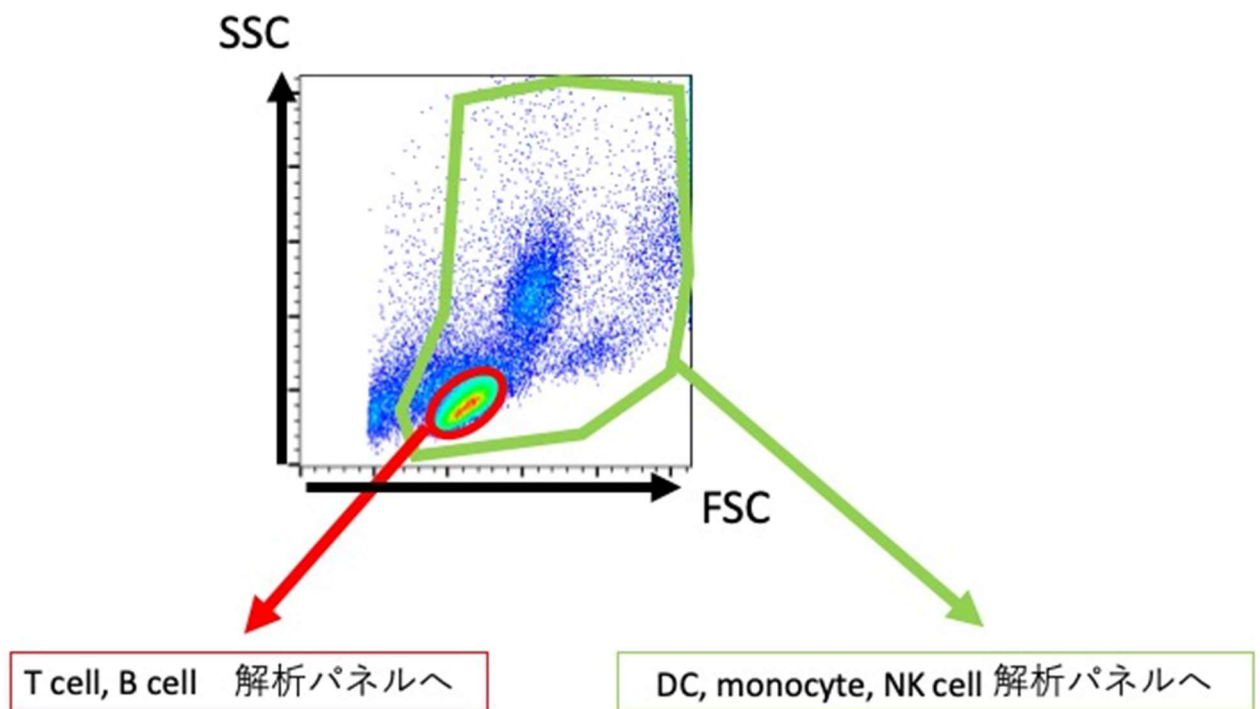
<b>1. T cell</b>			
製品名	会社	カタログ番号	volume (μl)
FITC Mouse anti-human CD28	BD	555728	20
PE Mouse anti-human CD197 (CCR7)	BD	560765	20
PerCP/Cy5.5 anti-human CD4	BioLegend	300530	5
PE-Cy™7 Mouse anti-human CD45RA	BD	560675	5
APC Mouse anti-human CD38	BD	555462	20
APC-H7 Mouse anti-human CD8	BD	561423	5
V450 Mouse anti-human CD3	BD	561812	5
V500 Mouse anti-human HLA-DR	BD	561224	5
<b>2. Treg cell</b>			
製品名	会社	カタログ番号	volume (μl)
Fixable Viability Dye eFluor™ 520	Thermo Fisher	65-0867-18	1
PE Mouse anti-human CD25	BD	555432	20
PerCP/Cy5.5 anti-human CD4	BioLegend	300530	5
PE-Cy™7 Mouse anti-human CD194	BD	557864	5
CD127 Monoclonal antibody, APC	eBioscience	17-1278-42	5
APC-H7 Mouse anti-human CD45RO	BD	561137	5
V450 Mouse anti-human CD3	BD	561812	5
V500 Mouse anti-Human HLA-DR	BD	561224	5
<b>3. Th1/Th2/Th17 cell</b>			
製品名	会社	カタログ番号	volume (μl)
Fixable Viability Dye eFluor™ 520	Thermo Fisher	65-0867-18	1

PE Mouse anti-human CD183	BD	550633	20
PerCP/Cy5.5 anti-human CD4	BioLegend	300530	5
PE-Cy <sup>TM</sup> 7 Mouse anti-human CD196 (CCR6)	BD	560620	5
APC Mouse anti-human CD38	BD	555462	20
APC-H7 Mouse anti-human CD8	BD	561423	5
V450 Mouse anti-human CD3	BD	561812	5
V500 Mouse anti-human HLA-DR	BD	561224	5
<b>4 . B cell</b>			
製品名	会社	カタログ番号	volume (μl)
Fixable Viability Dye eFluor <sup>TM</sup> 520	Thermo Fisher	65-0867-18	1
PE Mouse anti-human CD24	BD	555428	20
PerCP-Cy5.5 Mouse anti-human CD19	BD	340951	20
PE/Cy7 anti-human CD27	BioLegend	302838	5
APC Mouse anti-human CD38	BD	555462	20
APC-H7 Mouse anti-human CD20	BD	560853	5
V450 Mouse anti-human CD3	BD	561812	5
V500 Mouse anti-human IgD	BD	561490	5
<b>5 . DC, monocyte, NK cell</b>			
製品名	会社	カタログ番号	volume (μl)
Fixable Viability Dye eFluor <sup>TM</sup> 520	Thermo Fisher	65-0867-18	1
PE Mouse anti-human CD56	BD	555516	20
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Mouse anti-human CD123	BD	558714	20
PE-Cy <sup>TM</sup> 7 Mouse anti-human CD11c	BD	561356	5
APC Mouse anti-human CD16	BD	561304	5

APC-H7 Mouse anti-human CD3	BD	560176	5
APC-H7 Mouse anti-human CD19	BD	560177	5
APC-H7 Mouse anti-human CD20	BD	560853	5
V450 Mouse anti-human CD14	BD	560349	5
V500 Mouse anti-human HLA-DR	BD	561224	5
<b>6 . Tfh cell</b>			
製品名	会社	カタログ番号	volume (μl)
FITC Mouse anti-human CD28	BD	555728	20
Human CXCR5 PE-conjugated Antibody	R&D	FAB190P-100	10
PerCP-Cy™5.5 Mouse anti-human CD183	BD	560832	5
PE-Cy™7 Mouse anti-human CD196 (CCR6)	BD	560620	5
CD278 (ICOS) Monoclonal Antibody, APC	ThermoFisher	17-9948-42	5
APC-H7 Mouse anti-human CD69	BD	560737	5
V450 Mouse anti-human CD3	BD	561812	5
V500 Mouse anti-human CD4	BD	560768	5

### 各測定パネル展開： gating strategy について

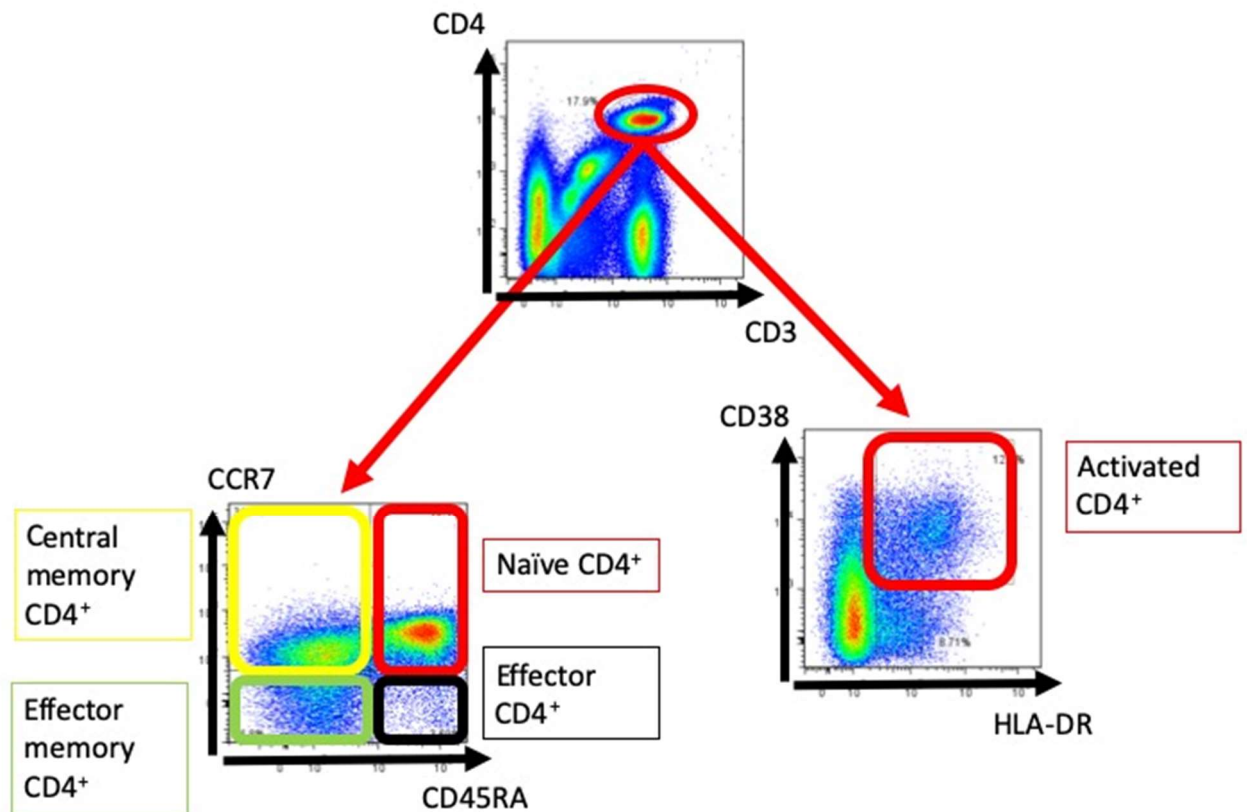
リンパ球領域 (T cell, B cell 解析パネル)、DC、monocyte、NK cell 領域を展開し、以降の細分化した免疫担当細胞サブセットの解析を行う。



## T cell パネル展開

リンパ球領域から、それぞれ、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 領域を展開する。さらに両領域を  $CD45RA/CCR7$  で展開し、各分化段階に分けて評価する。また、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 両領域を  $CD38/HLA-DR$  で展開し、活性化した  $CD4^+$  T cell、 $CD8^+$  T cell の割合を評価する。

## $CD4^+$ T cell パネル展開



$CD3^+ CD4^+ CCR7^+ CD45RA^+$  cell (Naïve  $CD4^+$  T cell)

$CD3^+ CD4^+ CCR7^+ CD45RA^-$  cell (Central memory  $CD4^+$  T cell)

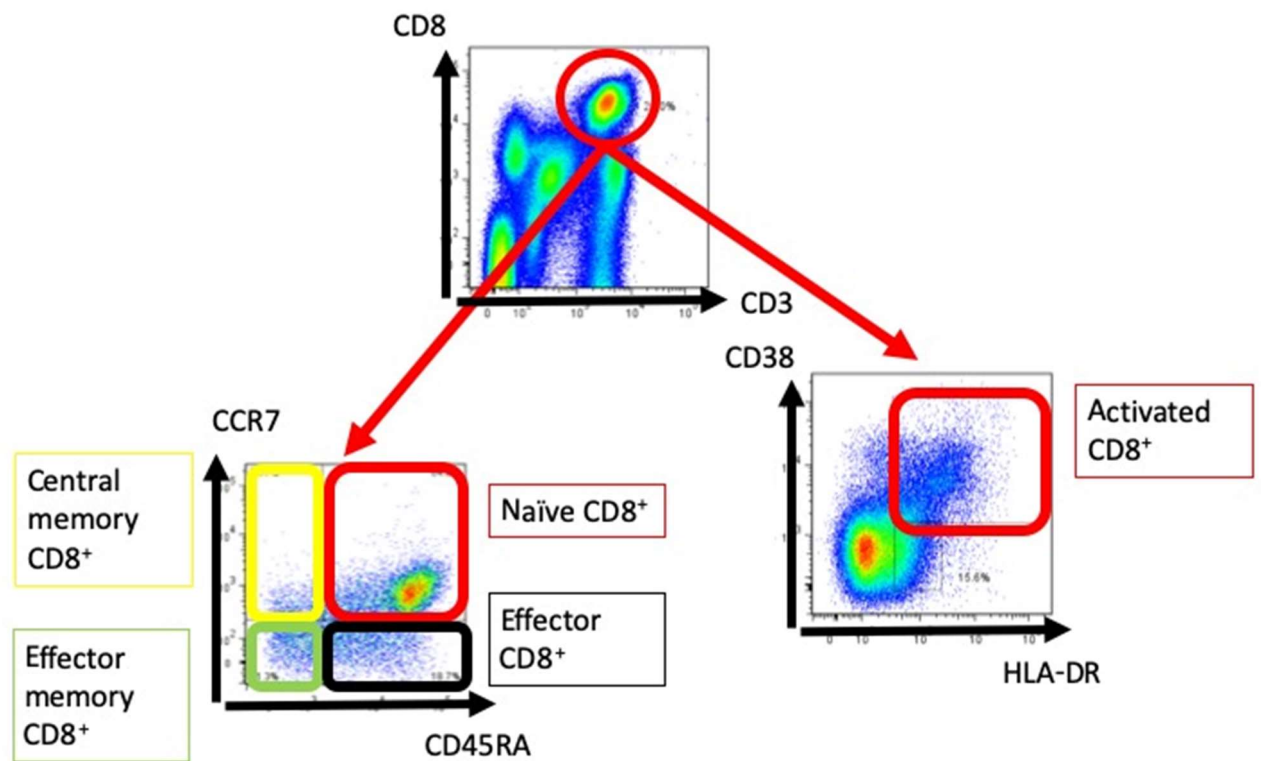
$CD3^+ CD4^+ CCR7^- CD45RA^-$  cell (Effector memory  $CD4^+$  T cell)

$CD3^+ CD4^+ CCR7^- CD45RA^+$  cell (Effector  $CD4^+$  T cell)

$CD3^+ CD4^+ CD38^+ HLA-DR^+$  cell (Activated  $CD4^+$  T cell)



## CD8<sup>+</sup> T cell パネル展開



CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> cell (Naïve CD8<sup>+</sup> T cell)

CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> cell (Central memory CD8<sup>+</sup> T cell)

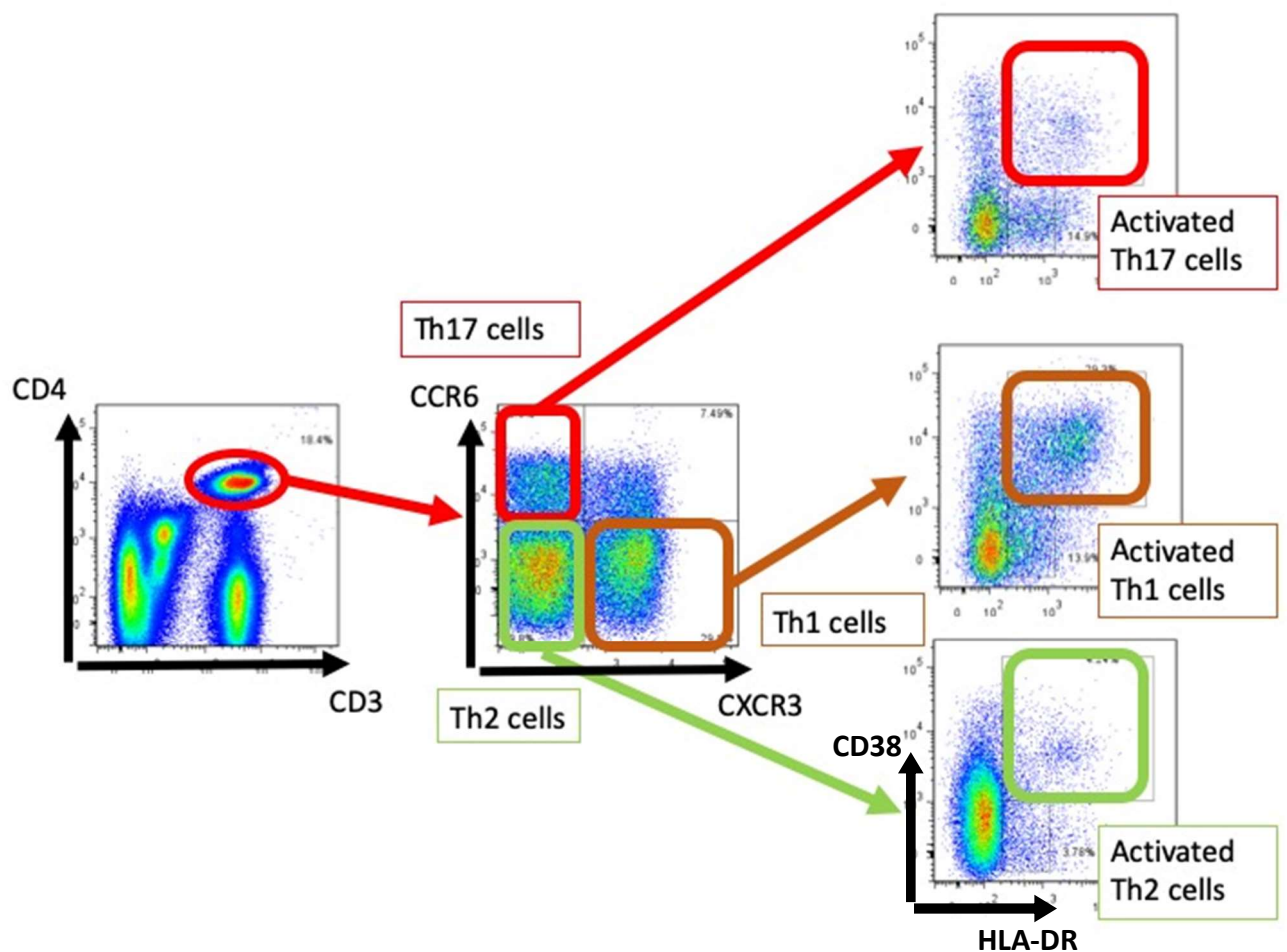
CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> cell (Effector memory CD8<sup>+</sup> T cell)

CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> cell (Effector CD8<sup>+</sup> T cell)

CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> cell (Activated CD8<sup>+</sup> T cell)

## Th cell サブセットパネル展開

リンパ球領域から、 $CD3^+CD4^+$ 領域を展開する。さらに CXCR3/CCR6 で展開し、各 Th cell サブセットに分けて評価する。さらにそれぞれの Th cell サブセットを CD38/HLA-DR で展開し、活性化した各 Th cell サブセットの割合を評価する。



$CD3^+ CD4^+ CXCR3^+ CCR6^-$  cell (Th1 cell)

$CD3^+ CD4^+ CXCR3^- CCR6^-$  cell (Th2 cell) <sup>\*3</sup>

$CD3^+ CD4^+ CXCR3^- CCR6^+$  cell (Th17 cell)

$CD3^+ CD4^+ CXCR3^+ CCR6^- CD38^+ HLA-DR^+$  Th1 cell (Activated Th1 cells)

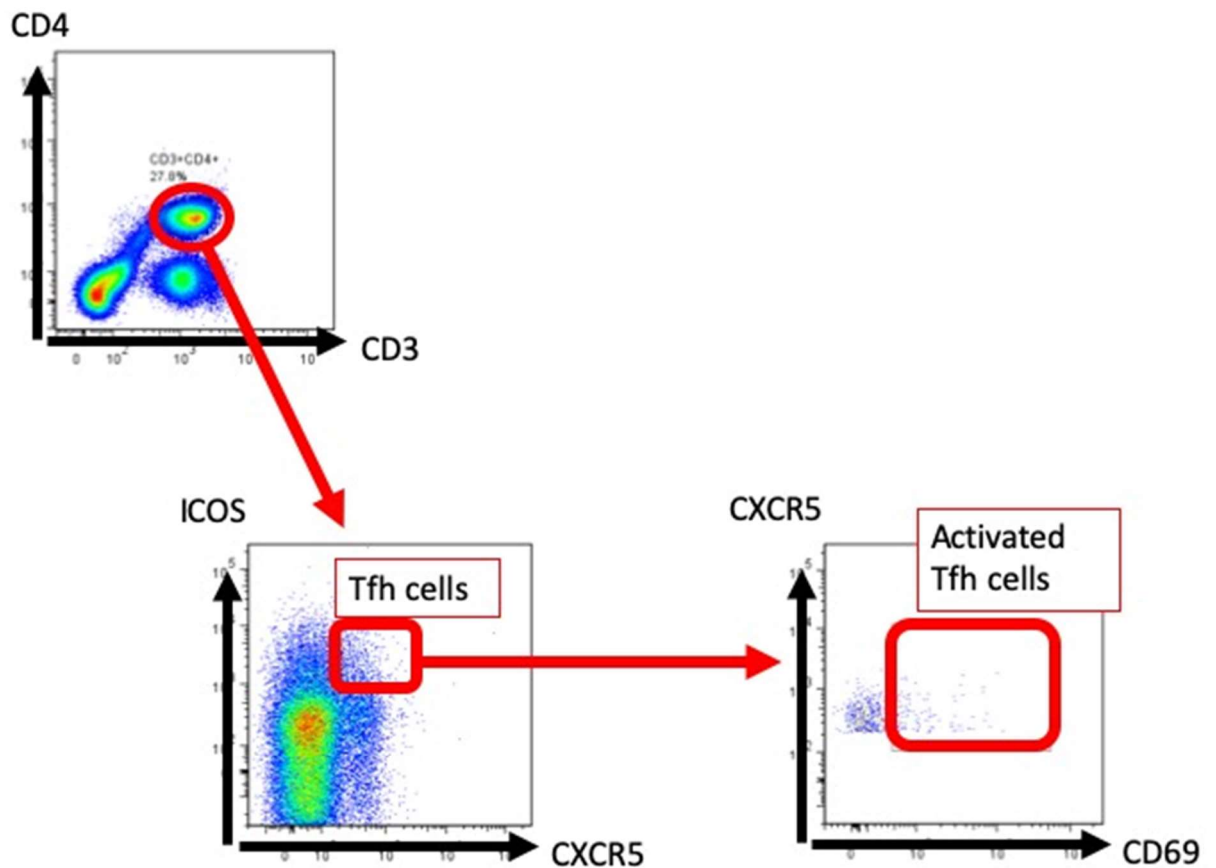
$CD3^+ CD4^+ CXCR3^- CCR6^- CD38^+ HLA-DR^+$  Th2 cell (Activated Th2 cells) <sup>\*3</sup>

$CD3^+ CD4^+ CXCR3^- CCR6^+ CD38^+ HLA-DR^+$  Th17 cell (Activated Th17 cells)

\*<sup>3</sup> この場合の Th2 cell は純粋な Th2 ではなく、non Th1/non Th17 cell を指しているため、解析対象から外すこともある。

### Tfh cell パネル展開

リンパ球領域から、 $CD3^+CD4^+$ 領域を展開する。さらに CXCR5/ICOS で展開し、Tfh cell を評価する。さらに Tfh cell を  $CD69/CXCR5$  で展開し、活性化した Tfh cell の割合を評価する。

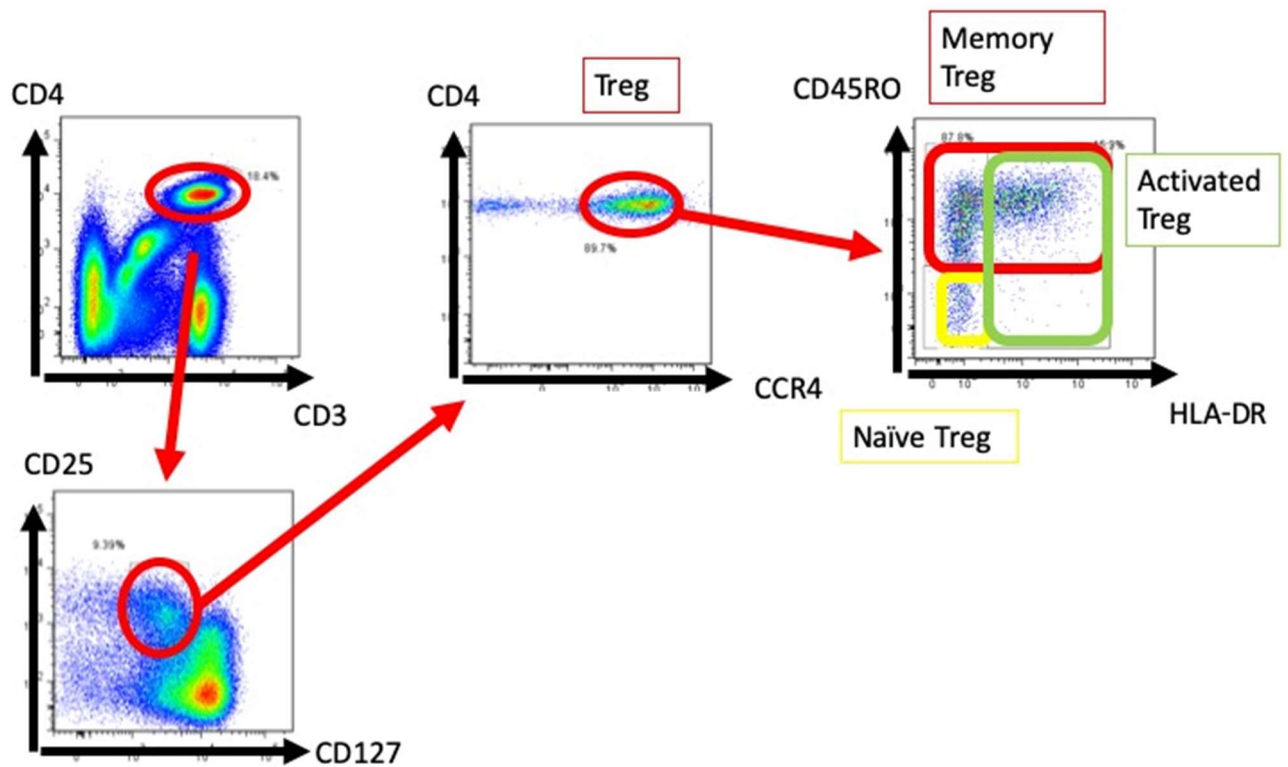


$CD3^+ CD4^+ CXCR5^+ ICOS^+$  cell (Tfh cell)

$CD3^+ CD4^+ CXCR5^+ ICOS^+ CD69^+$  Tfh cell (Activated Tfh cell)

## Treg cell パネル展開

リンパ球領域から、 $CD3^+CD4^+$ 領域を展開する。さらに  $CD127/CD25$ 、 $CCR4/CD4$  で展開し、Treg cell を評価する。さらに Treg cell を  $HLA-DR/CD45RO$  で展開し、naïve、memory、活性化した Treg cell の割合を評価する。



$CD3^+ CD4^+ CCR4^+ CD25^+ CD127^{low}$  cell (Treg cell)

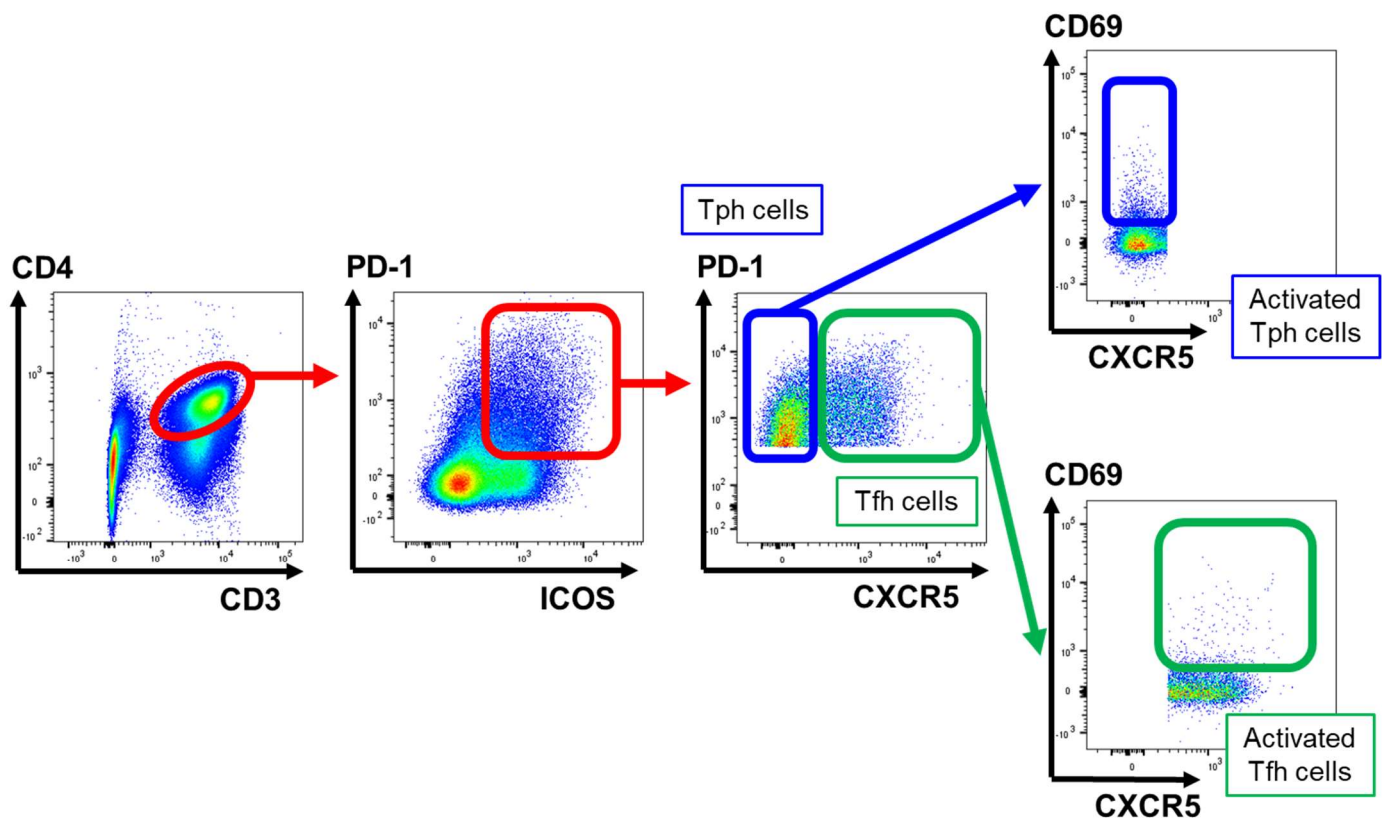
$CD3^+ CD4^+ CCR4^+ CD25^+ CD127^{low} CCR45RO^-$  cell (Naïve Treg cell)

$CD3^+ CD4^+ CCR4^+ CD25^+ CD127^{low} CD45RO^+$  cell (Memory Treg cell)

$CD3^+ CD4^+ CCR4^+ CD25^+ CD127^{low} HLA-DR^+$  cell (Activated Treg cell)

## Tph cell サブセットパネル展開

リンパ球領域から、CD3+CD4+領域を展開する。さらに ICOS+PD-1+領域を展開し、CXCR5 発現の有無で Tph cell と Tfh cell を評価する。さらに、Tph/Tfh cell を CXCR5/CD69 で展開し、活性化した Tph/Tfh cell の割合を評価する。



CD3+CD4+CXCR5-PD-1+ICOS+ cell (Tph cell)

CD3+CD4+CXCR5-PD-1+ICOS+CD69+ cell (Activated Tph cell)

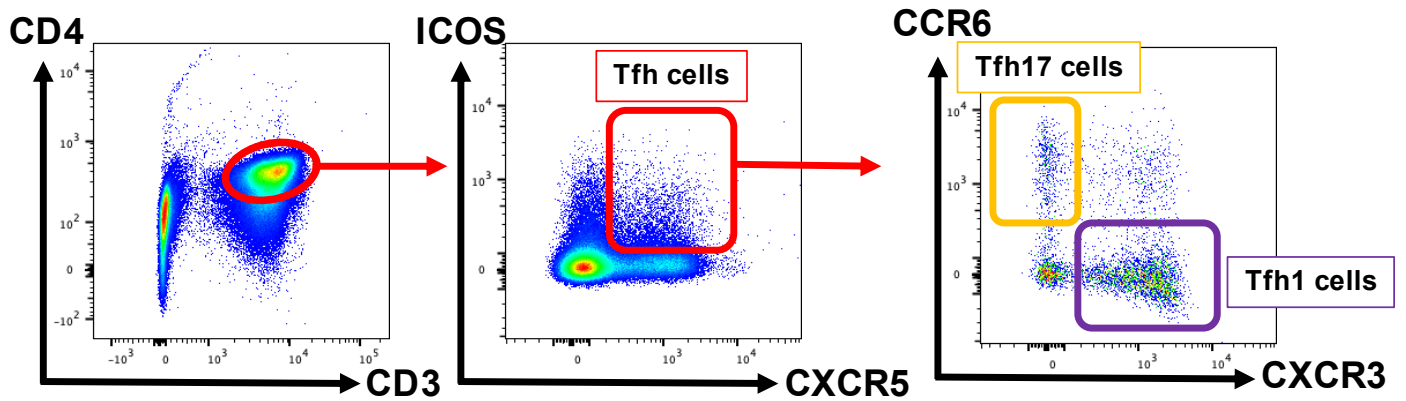
CD3+CD4+CXCR5+PD-1+ICOS+ cell (Tfh cell)

CD3+CD4+CXCR5+PD-1+ICOS+CD69+ cell (Activated Tfh cell)

8. Tph cell			
製品名	会社	カタログ番号	Volume (μl)
FITC Mouse Anti-Human CD279 (PD-1)	BD	557860	5
Human CXCR5 PE-conjugated Antibody	R&D	FAB190P-100	10
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Mouse Anti-Human CD183 (CXCR3)	BD	560832	5
PE-Cy <sup>TM</sup> 7 Mouse Anti-Human CD196 (CCR6)	BD	560620	5
CD278 (ICOS) Monoclonal Antibody	eBioscience	17-9948-42	5
APC-H7 Mouse Anti-Human CD69	BD	560737	5
V450 Mouse Anti-Human CD3	BD	561812	5
V500 Mouse Anti-Human CD4	BD	560768	5

## Tfh1/Tfh17 cell サブセットパネル展開

リンパ球領域から、CD3+CD4+領域を展開する。さらに CXCR5+ICOS+領域



域を展開し Tfh 細胞を評価する。さらに Tfh 細胞を CXCR3/CCR6 で展開し、

Tfh1 細胞、Tfh17 細胞を評価する。

CD3+CD4+CXCR5+ICOS+ cell (Tfh cell)

CD3+CD4+CXCR5+ICOS+CXCR3+CCR6- cell (Tfh1 cell)

CD3+CD4+CXCR5+ICOS+CXCR3-CCR6+ cell (Tfh17 cell)

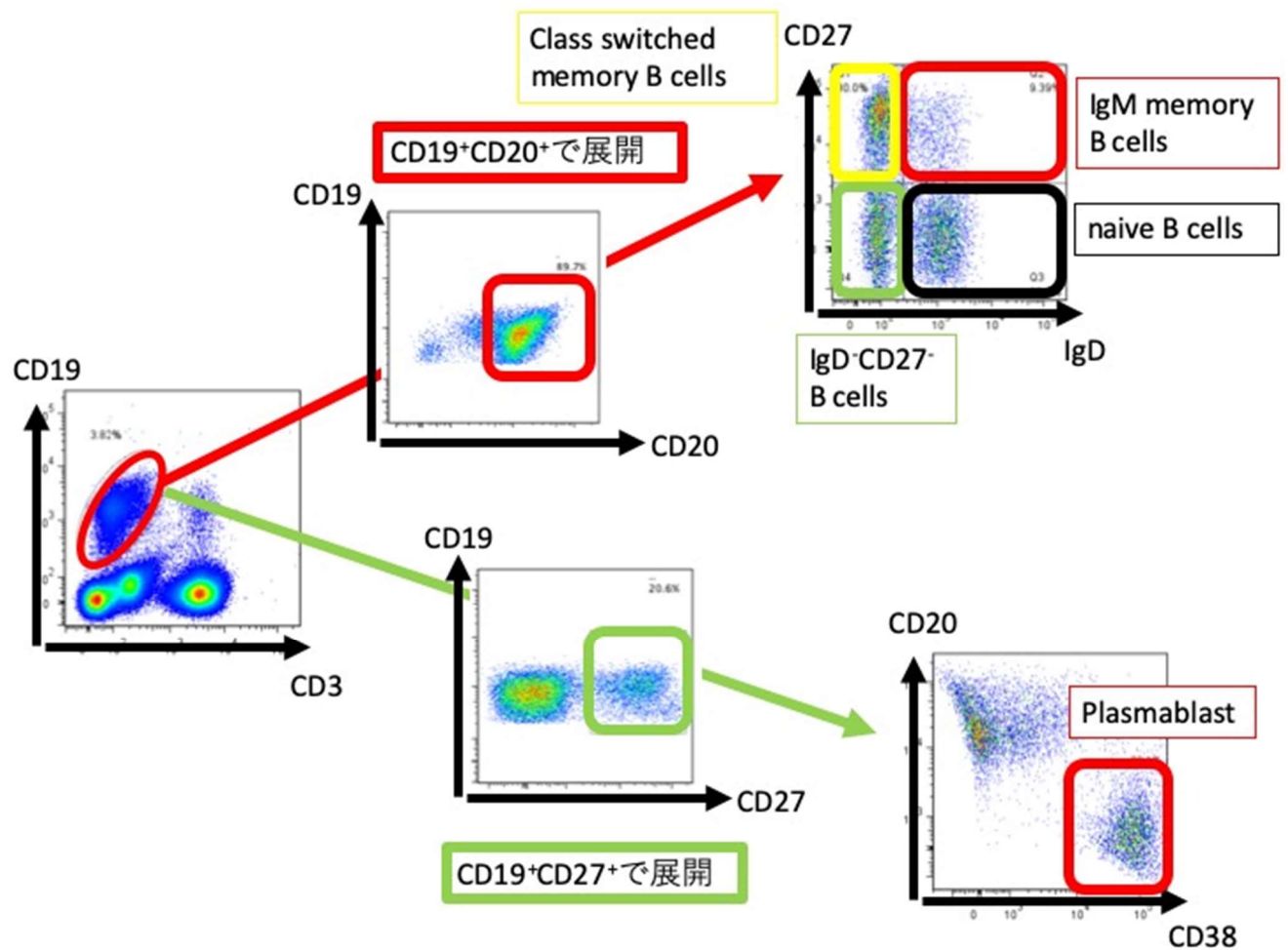
\* パネル用カクテルは Tfh 細胞と同様





## B cell パネル展開

リンパ球領域から、CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>領域を展開する。さらに CD19/CD20 で展開し、CD20<sup>+</sup>領域を展開する。CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>領域を IgD/CD27 で展開し、B cell の分化段階を評価する。CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>領域、CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>領域を展開し、さらに CD20/CD38 領域を順に展開し、plasmablast を評価する。



CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> cells

↓

CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> cell (Naive B cell)

CD27<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> cell (IgM memory B cell)

CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> cell (Class switched memory B cell)

CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> cell (Double negative B cell)

CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> cell (Plasmablast)

## Dendritic cell (DC)、monocyte、natural killer (NK) cell パネル展開

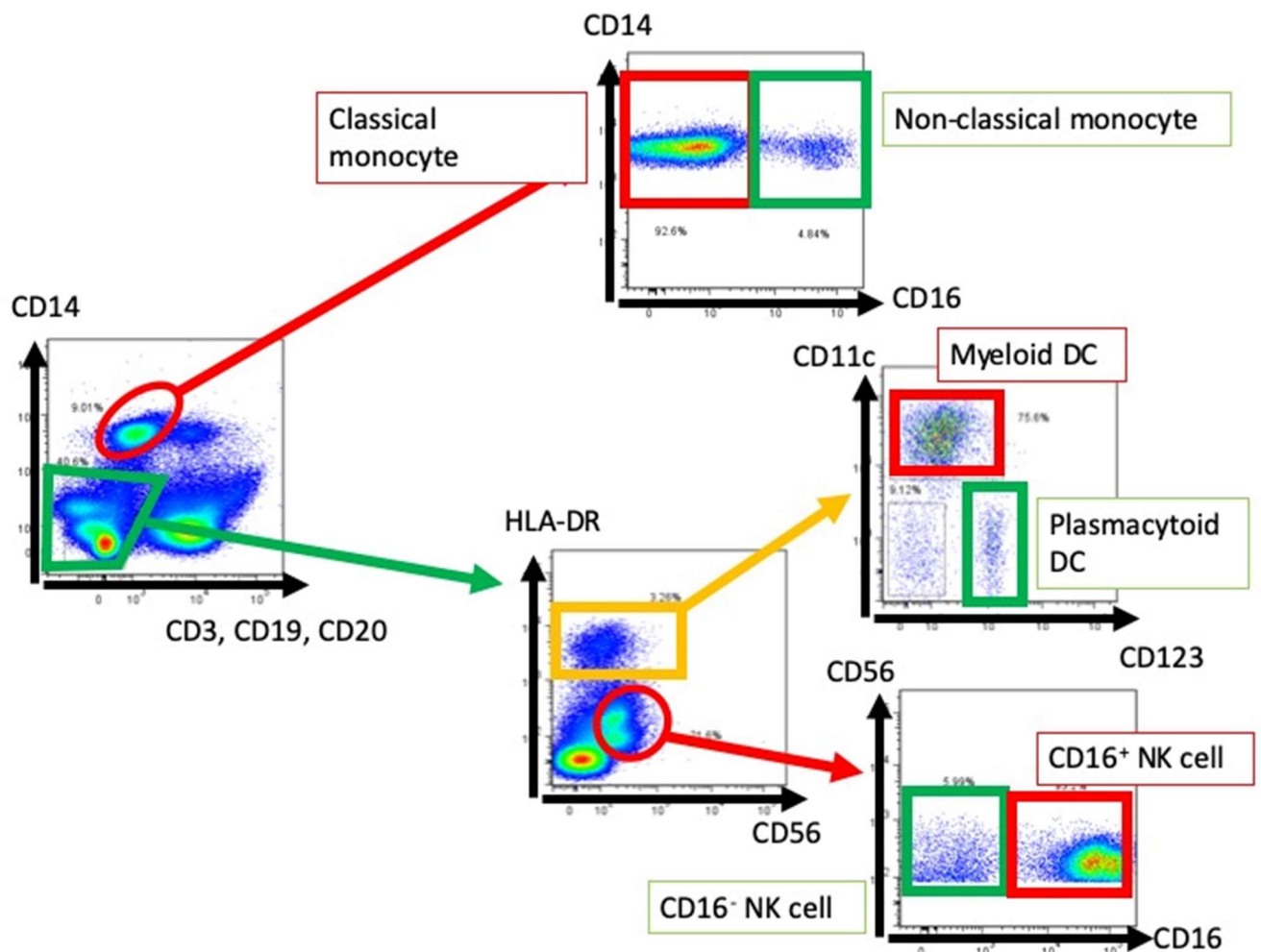
NK cell、monocyte、DC 領域から、CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup>/CD14 で展開する。

### ① DC、NK cell パネル

CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> 領域を HLA-DR/CD56 で展開する。HLA-DR<sup>+</sup>領域を CD11c/CD123 で展開し、DC を評価する。HLA-DR<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>領域を展開し、CD16/CD56 で展開し、NK cell を評価する。

### ② Monocyte パネル

CD3<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup>領域を CD14/CD16 で展開し、monocyte を評価する。



CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cell (monocytes)

↓

CD16<sup>-</sup> cell (Classical monocyte)

CD16<sup>+</sup> cell (Non-classical CD16 monocyte)

CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> cell (DCs and NK cells)

HLA-DR<sup>+</sup> cell (Dendritic cells)

↓

CD11c<sup>+</sup> cell (Myeloid DC)

CD123<sup>+</sup> cell (Plasmacytoid DC)

CD56<sup>+</sup> cell (NK cells) → CD16<sup>-</sup> cell (NK cell), CD16<sup>+</sup> cell (NK cell)

## 原発性免疫不全症のフローサイトメトリー解析に関する文献紹介

1. 59 人の健常児と 75 人の原発性免疫不全症患者の末梢血をフローサイトメトリーで解析し、各免疫不全症の免疫学的特徴を明らかにした論文(1)。原発性免疫不全症には、X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID)、X-linked agammaglobulinemia (XLA)、X-linked hyper IgM syndrome (X-HIGM)、ataxia telangiectasia (AT)、Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)、hyper IgE syndrome (HIES)、chronic mucocutaneous candidiasis disease (CMCD)の患者が含まれている。

2. 1075 人の中国人健常児（0-18 歳）を対象に、末梢血リンパ球サブセット解析を行った結果が報告された論文(2)。健常児末梢血リンパ球サブセット解析の際、Reference としての使用が想定される。

3. Euroflow コンソーシアム：欧州 8 ヶ国 18 の研究グループと 2 社で組織されたコンソーシアムで、フローサイトメトリーなどに関する標準作業手順書などを整備している。造血器腫瘍の解析に関して定評があるが、原発性免疫不全症・免疫異常症に関するフローサイトメトリー解析についても標準化を行っている (3-7)。

## 参考文献:

1. Takashima T, Okamura M, Yeh TW, Okano T, Yamashita M, Tanaka K, et al. Multicolor Flow Cytometry for the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases. J Clin Immunol. 2017;37(5):486-95.
2. Ding Y, Zhou L, Xia Y, Wang W, Wang Y, Li L, et al. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China. J Allergy Clin Immunol. 2018;142(3):970-3 e8.
3. van der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, et al. The EuroFlow PID Orientation Tube for Flow Cytometric Diagnostic Screening of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. Front Immunol. 2019;10:246. Published 2019 Mar 4. doi:10.3389/fimmu.2019.00246
4. van Dongen JJM, van der Burg M, Kalina T, et al. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. Front Immunol. 2019;10:1271. Published 2019 Jun 13. doi:10.3389/fimmu.2019.01271

5. Botafogo V, Pérez-Andres M, Jara-Acevedo M, et al. Age Distribution of Multiple Functionally Relevant Subsets of CD4+ T Cells in Human Blood Using a Standardized and Validated 14-Color EuroFlow Immune Monitoring Tube. *Front Immunol.* 2020;11:166. Published 2020 Feb 27. doi:10.3389/fimmu.2020.00166
6. Kalina T, Bakardjieva M, Blom M, et al. EuroFlow Standardized Approach to Diagnostic Immunophenotyping of Severe PID in Newborns and Young Children. *Front Immunol.* 2020;11:371. Published 2020 Mar 19. doi:10.3389/fimmu.2020.00371
7. Neirinck J, Emmaneel A, Buysse M, et al. The Euroflow PID Orientation Tube in the diagnostic workup of primary immunodeficiency: Daily practice performance in a tertiary university hospital. *Front Immunol.* 2022;13:937738. Published 2022 Sep 13. doi:10.3389/fimmu.2022.937738

### **Mutation @ A Glance**

リンク :

<https://mutation.nagahama-i-bio.ac.jp>

説明 :

ヒトにおけるバリエントに関するデータベース。多型、変異を含むバリエントについて、一次構造、二次構造、三次構造まで、グラフィカルに示されている。また、各遺伝子に関するリンクについても示されている(1)。

参考文献 :

1. Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, et al. Mutation@A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res.* 2010;17(3):197-208. doi:10.1093/dnares/dsq010

### **gnomAD (Genome Aggregation Database)**

リンク :

<https://gnomad.broadinstitute.org>

説明 :

ヒトにおける健常者バリエントに関するデータベース。v4 データセット (GRCh38)には、730,947 人の Exome データと 76,215 人の全ゲノムシーケンスを元にしたバリエントについて示されている (1)。

**参考文献：**

1. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, et al. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes. Nature. 2024;625(7993):92-100. doi:10.1038/s41586-023-06045-0

**・ jMorp (Japanese Multi-Omics Reference Panel)**

リンク：<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>

説明：日本人から得られたオミックス解析のデータベース。約 **54,000** 人の日本人に対する全ゲノム解析で得られたバリエーション情報や、トランスクリプトーム情報などを収載

**参考文献：**

1. Tadaka S, Kawashima J, Hishinuma E, et al. jMorp: Japanese Multi-Omics Reference Panel update report 2023. Nucleic Acids Res. 2024 Jan 5;52(D1):D622-D632. doi:10.1093/nar/gkad978

**Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)**

**PopViz**

リンク：

<https://cadd.gs.washington.edu/snv>

<https://hgidsoft.rockefeller.edu/PopViz/>

説明：

ヒトにおけるバリエーションを、その影響について、複数のスコアを統合的にスコア化するデータベース(1-4)。CADD スコアと MAF(minor allele frequency)を図式化することが可能なサイト PopViz も有用である(5)。

**参考文献：**

1. Schubach M, Maass T, Nazaretyan L, Röner S, Kircher M. CADD v1.7: using protein language models, regulatory CNNs and other nucleotide-level scores to improve genome-wide variant predictions. Nucleic Acids Res. 2024;52(D1):D1143-D1154. doi:10.1093/nar/gkad989
2. Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving

- genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 2021;13(1):31. Published 2021 Feb 22. doi:10.1186/s13073-021-00835-9
3. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D886-D894. doi:10.1093/nar/gky1016
  4. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014;46(3):310-315. doi:10.1038/ng.2892
  5. Zhang P, Bigio B, Rapaport F, et al. PopViz: a webserver for visualizing minor allele frequencies and damage prediction scores of human genetic variations. *Bioinformatics.* 2018;34(24):4307-4309. doi:10.1093/bioinformatics/bty536