

精製 CD138 形質細胞による 多発性骨髄腫検査感度の向上

多発性骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 のポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、サンプルにおけるゲノム異常の検出が容易となります。本技術資料では、多発性骨髄腫検査のための蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH)、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるための、形質細胞分離プロトコールをご紹介します。

背景

多発性骨髄腫

多発性骨髄腫はがんの一種で、B 細胞の腫瘍化により悪性の形質細胞 (CD138 (Syndecan-1) を発現し、免疫応答時の抗体産生に関与する細胞) の産生およびクローン増殖の調節不全を引き起こす疾患です¹。骨髄中の異常形質細胞数の過剰と、インタクトな単クローン性免疫グロブリン、単クローン性免疫グロブリンの遊離カッパおよびラムダ軽鎖の過剰産生を特徴としています。

多発性骨髄腫サンプルのゲノム異常解析

骨髄中の CD138⁺ 形質細胞の検出と定量が、骨髄腫に関する一般的なスクリーニング検査法です。多発性骨髄腫は、特徴的な染色体異常を有するため他の B 細胞の腫瘍との鑑別が可能です。染色体異常としては、がん遺伝子の活性化を引き起こす免疫グロブリン重鎖領域における染色体の転座、欠失 (特に 13 番染色体の部分欠失)、異数性が挙げられ、これらの情報を基にして、多発性骨髄腫を様々な特徴を示す亜型に分類することが可能です^{2,3}。

FISH のような分子細胞遺伝学の手法が、多発性骨髄腫の特徴を明らかにする手段として広く使用されています。FISH は核酸プローブを使用して、染色体中の特定の DNA 配列の有無と位置を検出します。ただし、FISH アッセイには、既存の核酸プローブによるゲノム異常の検出能力に限界があります。このため、FISH による多発性骨髄腫検査と併用する追加の検査として、解像度の高い他の手法 (マイクロアレイベースのゲノムプロファイリングアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなど) が検討されています^{4,5,6}。

CD138⁺ 形質細胞の濃縮による感度の向上

多発性骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。正常な核型を示す健全な B 細胞と非悪性形質細胞が大部分を占める中から、少量の悪性形質細胞を検出するのは難しい場合があります。また、このごくわずかな異常クローンを同定し、解析するには、大量の細胞から解析を行う必要があると考えられます。CD138 抗原はすべての形質細胞 (非悪性細胞と悪性細胞の両方) に存在する一方、成熟 B 細胞には存在しません。このため、CD138 抗原は、悪性の多発性骨髄腫細胞を含むすべての形質細胞の濃縮に適した選択マーカーとなり得ます。CD138 による分離で形質細胞を濃縮することにより、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合が高くなり、混在細胞集団のサンプルの解析に比べ、ゲノム異常の検出感度が向上します^{4,5,7}。したがって、CD138 の選択による形質細胞の濃縮は、多発性骨髄腫における FISH、マイクロアレイベースのゲノムプロファイリング、ゲノムシーケンス検査の感度と信頼性を高めるうえで、有用なステップであると考えられます。

National Comprehensive Cancer Network® (NCCN Guidelines Version 2.2020 Multiple Myeloma) は、FISH 解析による多発性骨髄腫検査の際に、骨髄穿刺での採取後に形質細胞を濃縮することを推奨しています。

- NCCN Guidelines® Version 2.2020 Multiple Myeloma;
NCCN.org

カラムフリーによる簡単な形質細胞濃縮

骨髄サンプルまたは末梢血単核細胞から CD138⁺ 形質細胞を採取する手法の 1 つとして、EasySep™ (図 1 参照) のような免疫磁気細胞分離テクノロジーがあげられます。EasySep™ は、細胞表面の CD138 を認識する抗体複合体を用いて細胞を磁性粒子に結合させます。次に EasySep™ 磁石内にサンプルを静置すると、標識された細胞がチューブの表面に引き寄せられるため、標識されなかった細胞を別のチューブにそのまま注ぐか、或いはピペットを用いて移すことが可能です。

EasySep™ による CD138⁺ 細胞の濃縮は、後続の多発性骨髄腫検査のための形質細胞を採取する効率的な手法であることが示されています^{5,6,8}。時間の短縮と、サンプルのハンドリングを最小限に抑えるために、EasySep™ による形質細胞の濃縮を RoboSep™ 装置で完全に自動化することもできます^{5,8}。RoboSep™ による CD138⁺ 形質細胞の濃縮について検討した研究で、形質細胞が低頻度 (2%未満) である場合にも、形質細胞を確実に単離できることが明らかにされています⁸。

次項では、後続の多発性骨髄腫検査のために、骨髄、全血、単核細胞調製液から形質細胞を濃縮するプロトコールについてご紹介します。

プロトコール

その1: サンプル調製

サンプルソース: 骨髄

EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II (商品コード 17887) によるサンプル調製

D-PBS (カルシウムおよびマグネシウム不含、商品コード 37350) でサンプルを 5 ~ 10 倍希釈し、ピペティング操作により静かに混和します。あらかじめ D-PBS で湿らせた 70 ~ 100 μm のストレーナー (商品コード 27260 または商品コード 27217) でサンプルを濾過し、骨の断片、細胞塊、組織片を取り除きます。骨髄のシングルセル懸濁液をチューブに移し、300 x g で 10 分間、ブレーキなしで遠心分離します。バフィーコート/赤血球ペレットを乱すことがないように、血漿を慎重に取り除いて破棄し、元のサンプル容量まで D-PBS で再懸濁します。サンプル採取から 24 時間以上経過している場合は、細胞凝集を減らすために DNase I Solution (商品コード 07900) 100 μg/mL を添加します。DNase I Solution をペレット状の細胞に直接添加し、静かに混和してから再懸濁することも可能です。

14 mL 丸底ポリスチレンチューブ (商品コード 38008) にシングルセル混濁液 (最大 4.5 mL) を移します。溶血バッファーと血液サンプルの比率を 1 対 1 として EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer (1X)* を添加し、しっかり混和します。ここからは、サンプルの細胞分離を手動 (その2-A) または自動 (その2-B) で行う工程に進みます。

EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II (商品コード 17877) によるサンプル調製

密度勾配媒体 (例: Lymphoprep™、商品コード 07801) の上に全骨髄を重層して遠心分離し、単核細胞 (MNC) 懸濁液を調製します。または、Ammonium Chloride Solution (商品コード 07800) を使用して溶血し、赤血球を取り除きます。調製後、2% ウシ胎仔血清 (FBS) および 1 mM EDTA を含有する PBS に細胞を 1×10^8 個/mL の濃度で再懸濁し、14 mL 丸底ポリスチレンチューブ (商品コード 38008) に、懸濁液 (最大 8.5 mL) を移します。ここからは、サンプルの細胞分離を手動 (その2-A) または自動 (その2-B) で行う工程に進みます。

サンプルソース: 末梢血

EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II (商品コード 17887) によるサンプル調製

抗凝固剤入り採血チューブに全血を採血します。14 mL 丸底ポリスチレンチューブ (商品コード 38008) に、全血 (最大 4.5 mL) を移します。溶血バッファーと血液サンプルとの比率を 1 対 1 として、EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer (1X)* を添加し、しっかり混和します。ここからは、サンプルの細胞分離を手動 (その2-A) または、自動 (その2-B) で行う工程に進みます。

EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II (商品コード 17877) によるサンプル調製

抗凝固剤入り採血チューブに全血を採血します。密度勾配媒体 (例: Lymphoprep™、商品コード 07801) の上に全血を重層して遠心分離し、末梢血単核細胞 (PBMC) 懸濁液を調製します。

調製後、2% ウシ胎仔血清 (FBS) および 1 mM EDTA を含有する PBS に 1×10^8 個/mL で再懸濁し、14 mL 丸底ポリスチレンチューブ (商品コード 38008) に、懸濁液 (最大 8.5 mL) を移します。ここからは、サンプルの細胞分離を手動 (その2-A) または自動 (その2-B) で行う工程に進みます。

サンプルソース: 凍結骨髄または末梢血単核細胞

EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II (商品コード 17877) によるサンプル調製

濃度 100 μg/mL の DNase I Solution (商品コード 07900) を使用し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分以上、細胞をインキュベートします。塊状の懸濁液を 37 μm Cell Strainer (商品コード 27305) で濾過し、最適な状態にします。調製後、2% ウシ胎仔血清 (FBS) および 1 mM EDTA を含有する PBS に 1×10^8 個/mL で再懸濁します。14 mL 丸底ポリスチレンチューブ (商品コード 38008) に、懸濁液 (最大 8.5 mL) を移します。ここからは、サンプルの細胞分離を手動 (その2-A) または自動 (その2-B) で行う工程に進みます。

*注記: キットの EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer (商品コード 20110) の濃度は 10X です。使用する 1 時間以上前に、溶血バッファー (10X) と蒸留水または Type 1 水を 1 対 9 の比率で混和して、溶血バッファー (1X) を調製します。しっかり転倒混和してから使用してください。

最適な細胞分離のために、サンプル採取後 24 時間以内に処理してください。



その2-A: 手動による形質細胞の濃縮

製品情報シートに従い、EasySep™ Selection Cocktail と RapidSpheres™ で細胞を標識します (図 1)。まず、EasySep™ Selection Cocktail と RapidSpheres™ をサンプルに添加し、CD138⁺ (Syndecan-1) と磁性粒子に対する抗体複合体で目的とする細胞を標識します。次に、EasySep™ 磁石内にサンプルチューブを静置してインキュベートしてから、上清をピペットで吸引するか、デカンテーションで取り除きます。目的の CD138⁺ 細胞はチューブ内に残り、不要な細胞は取り除かれます。目的とする細胞が入ったチューブを磁石から取り出し、適切な媒体で細胞を再懸濁します。分離された細胞の表面には EasySep™ の磁性粒子が結合しています。しかし、フローサイトメトリー、FISH、核酸分離などの後続のアプリケーションに影響することはありません。

詳細情報と製品情報シートのダウンロードについては、www.stemcell.com をご覧ください。

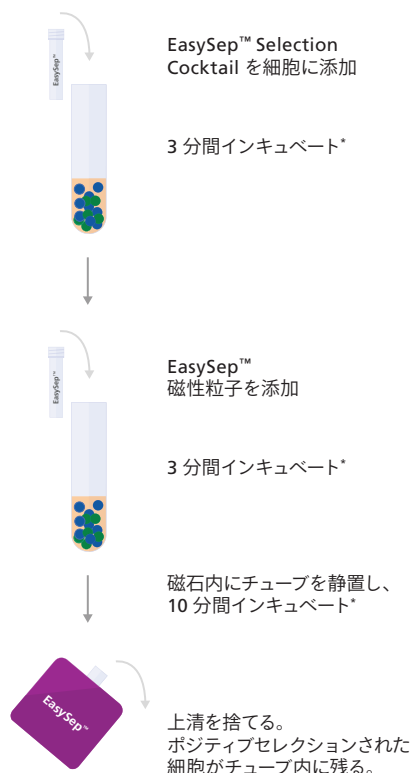


図 1. EasySep™ Positive Selection Kit による CD138⁺ 細胞の手動選択のプロトコール例

CD138⁺ 細胞は抗体と磁性粒子で標識され、EasySep™ 磁石を使用して分離されます。分離された細胞は、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH)、フローサイトメトリー、培養、DNA/RNA 抽出などの後続のアプリケーションですぐに使用可能です。

*インキュベート時間は、個々の試薬、分離プロトコール、分離プラットフォームにより異なります。

その2-B: 自動による形質細胞の濃縮

形質細胞を濃縮するための細胞標識と分離のすべての工程は、RoboSep™-S (商品コード 21000) および RoboSep™-16 (商品コード 23000) 装置を使用して完全に自動化できます。RoboSep™ で CD138⁺ 形質細胞の濃縮を行うには、装置搭載のプロトコール (詳細は対応する製品情報シートに記載) を選択し、サンプルと試薬をセッティングした後に、画面表示に従って細胞分離プロセスを開始します。プロセスが終了したら、分離された細胞が入っているチューブを取り出し、適切な媒体で再懸濁します。その際に、チューブ表面の細胞を必ず回収するようにしてください。

その3: 細胞分離後の細胞純度の評価

フローサイトメトリーによる CD138⁺ 細胞の純度の評価では、Anti-Human CD138 (Syndecan-1) Antibody, Clone MI15 (商品コード 60003) を使用します。形質細胞は κ (カッパ) または λ (ラムダ) 軽鎖を発現しており、細胞の純度は、Ahmann ら⁹ の報告のように、細胞内 κ 軽鎖および λ 軽鎖の染色で評価することもできます。また、Anti-Human CD38 Antibody, Clone HIT2 (商品コード 60014) や Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (商品コード 60018) などのマーカーを使用して、CD38⁺CD45 variable の細胞を検出することもできます¹⁰。

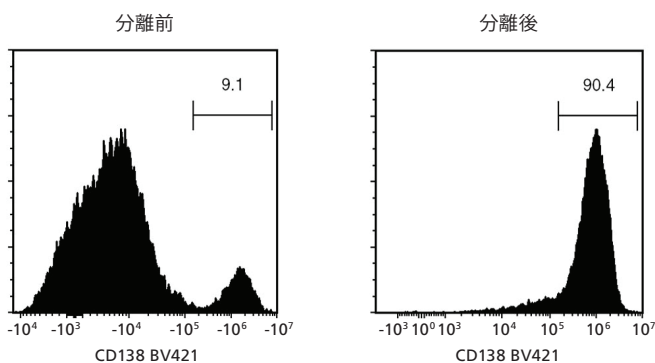


図 2. EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II (商品コード 17887)

多発性骨髄腫細胞株 U266 を添加した新鮮な全血を開始した場合、分離後の CD138⁺ 細胞の純度は 83.7 ~ 98.3% です。上の例では、分離前および分離後の画分の純度は 9.1% および 90.4% です。

注記: 分離前のサンプルから溶血により赤血球を取り除いた後で、フローサイトメトリーを実施しました。CD138⁺ の分離前の頻度が 10 ~ 15% 未満のサンプルでは、分離後 CD138⁺ の純度が変わる可能性があります。

その4: 後続の検査

濃縮した形質細胞は、FISH、マイクロアレイベースのゲノムプロファイリング、ゲノムシーケンスなどの技術を使用する後続の検査や解析に使用できます。

製品一覧

細胞分離製品

製品名	説明	処理対象	商品コード
EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II	免疫磁気ポジティブセレクションによる、新鮮または凍結保存されたヒト骨髄、もしくは末梢血単核細胞 (MNC) からの CD138 ⁺ (syndecan-1) 細胞の濃縮	細胞 2 x 10 ⁹ 個	17877 17877RF
EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II	免疫磁気ポジティブセレクションによる、新鮮骨髄または全血からの CD138 ⁺ (syndecan-1) 細胞の濃縮	血液または骨髄 60 mL	17887 17887RF
RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail	RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail	骨髄 40 mL	15129
	5 x 15129	骨髄 200 mL	15169

注記: RF キットは、RoboSep™ バッファーおよび RoboSep™ フィルターチップ同梱の EasySep™ キットです。

RoboSep™ 装置

RoboSep™-S および RoboSep™-16 は、EasySep™ による細胞標識と細胞分離のステップをすべて完全に自動化し、手動でのサンプルの取り扱いを最小限に抑えることが可能です。設定は簡単で、サンプルと試薬をセッティングし、分離された細胞を回収するのみです。分離された細胞は後続のアプリケーションですぐに使用できます。

詳細は、www.RoboSep.com をご参照ください。



RoboSep™-S



RoboSep™-16

製品名	商品コード
RoboSep™-S	21000
RoboSep™-16	23000

フローサイトメトリーによる純度評価用染色抗体

製品名	商品コード
Anti-Human CD138 (Syndecan-1) Antibody, Clone MI15	60003
Anti-Human CD38 Antibody, Clone HIT2	60014
Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30	60018

参考文献

- Huff CA & Matsui W. (2008) Multiple myeloma cancer stem cells. J Clin Oncol 26(17): 2895–900.
- Zandecki M et al. (1996) Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. Br J Haematol 94(2): 217–27.
- Facon T et al. (2001) Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. Blood 97(6): 1566–71.
- Pugh TJ et al. (2018) Assessing genome-wide copy number aberrations and copy-neutral loss-of-heterozygosity as best practice: An evidence-based review from the Cancer Genomics Consortium working group for plasma cell disorders. Cancer Genet 228–229: 184–196.
- Kjeldsen E. (2016) Identification of Prognostically Relevant Chromosomal Abnormalities in Routine Diagnostics of Multiple Myeloma Using Genomic Profiling. Cancer Genomics Proteomics 13(2): 91–127.
- Berry NK et al. (2014) Genomic profiling of plasma cell disorders in a clinical setting: integration of microarray and FISH, after CD138 selection of bone marrow. J Clin Pathol 67(1): 66–9.
- Glaskova L et al. (2017) CD138 Enrichment Strategy and Results of Chromosome Genomic Array Testing (CGAT) for Multiple Myelomas. Cancer Genet 214: 43.
- Shetty S et al. (2012) Utility of a column-free cell sorting system for separation of plasma cells in multiple myeloma FISH testing in clinical laboratories. Int J Hematol 95(3): 274–81.
- Ahmann GJ et al. (1998) A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. Cancer Genet Cytogenet 101(1): 7–11.
- Kumar S et al. (2010) Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. Best Pract Res Clin Haematol 23(3): 433–51.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Multiple Myeloma [Online], Version 2.2020. [https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/recently_updated.aspx] (accessed Oct 23, 2019)

Copyright © 2019 by STEMCELL Technologies Inc. 図や画像を含むすべての著作権を有しています。STEMCELL Technologies & Design、STEMCELL Shield Design、Scientists Helping Scientists、EasySep、RoboSep、および RosetteSep は STEMCELL Technologies Canada Inc. の商標です。National Comprehensive Cancer Network、NCCN、および NCCN Guidelines は National Comprehensive Cancer Network, Inc. の商標です。その他の商標はすべて、それぞれの所有者の所有権に属します。STEMCELL は、STEMCELL およびそのサプライヤーが提供する情報が正確であるよう万全を期しておりますが、こうした情報の正確性または完全性について何ら保証または表明するものではありません。

STEMCELL TECHNOLOGIES CANADA INC. の品質マネジメントシステムは ISO 13485 認証を取得しています。本書に掲載されている製品は研究用であり、特に明記されている場合を除き、ヒトまたは動物の診断または治療における使用を目的としたものではありません。