

## 技術革新とともにヒト免疫学を網羅的に読み解く研究最前線

京都大学大学院 医学研究科  
免疫細胞生物学  
上野 英樹教授

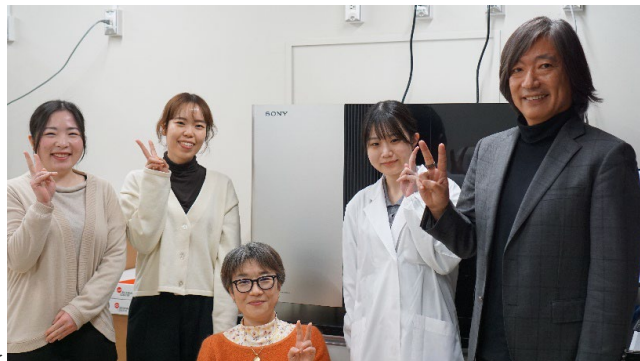
### 使用機種

Spectral Cell Analyzer ID7000

### 使用用途

免疫モニタリング

—40色以上のパネルを用いた免疫細胞の網羅解析



上野英樹先生は、ヒト免疫学の最前線で研究・教育を推進し国際的に活躍されています。研究内容は感染症やワクチン、がん免疫や自己免疫疾患など多岐にわたり、単一細胞解析など最新技術を用いたヒト免疫の解析を通じて新しい治療戦略の開発なども目指されています。今回はお忙しい中、貴重なお時間をいただき、お話を伺いました。

—先生のご研究における興味の対象を教えてください。

私は免疫学の中でもヒト検体を用いて免疫システムを研究する“ヒト免疫学者”だと考えています。

ヒト免疫システムはとてもユニークで、人それぞれの細胞の中でどのような現象が起こっているのか、またある疾患の原因が、人においてはこういったことが根本的な問題になるのか、病態がどのように形成されているのか、そういったことに非常に興味があります。

T細胞やがんワクチンなども含めたワクチン研究など、細胞を使った細胞生物学的な研究を長年進めています。その中でもフローサイトメトリーはなくてはならない機器ですね。

—なるほど。モデル生物による免疫学研究が先行してきた中で長年ヒト免疫学のご研究を進めてこられた先生が工夫されたことなどお聞かせいただけないでしょうか

ノックアウトマウスが開発されて、マウスモデルを使った研究は一気に進みましたが、その一方でヒト検体を使ってできることは、長い間とても限られていました。

例えば、昔はフローサイトメトリー解析も4色くらいしか使えなくて、そのくらいの色数だと、血液サンプルを解析しても機能までしっかり見るのは非常に難しかったですね。患者さん同士の違いや、その違いが病態とどう関係しているのかも、少ないマーカーを使ったパラメーター同士の相関を見るくらいでしか議論できませんでした。

その結果、「ヒト免疫とはこういうものだ」と言い切れるような明確さは本当に乏しくて、ヒト検体の解析からヒト免疫を理解するのが難しい時代が、長く続いていたと感じています。

また、一昔前の免疫の世界では、マウスを使った研究ばかりが盛んでした。その中で、ヒトの免疫系とマウスの免疫系には、実はかなり違いがあることが徐々に分かってきました。

ヒト特有の免疫調整機構のようなものを見つけて論文にしても、マウス免疫の研究者には、なかなか積極的に引用してもらえない、という状況がしばらく続きました。

当時のマウス研究者の立場からすると、モデルマウスを使っているいろいろなきれいに立証しているところへ、「でもヒトではちょっと違うんです」と言われると、あまり良い気持ちはしなかったのかもしれないな、と思います。

2000年代後半に入ると、徐々にフローサイトメトリーの技術革新が進み、10色を超えるような多色解析ができるようになってきました。その頃から、「ヒト検体の解析でも、かなり面白いことができるんじゃないか」という期待が高まってきたんです。

同じ時期に、サイトカインマルチプレックスアッセイも開発されて、それまでサイトカインごとにELISAをやっていたのが、少量の検体で一度にたくさんのサイトカインを測定できるようになりました。こうした技術の進歩が、「ヒトをちゃんと見ていこう」という流れを後押ししてくれたと感じています。

ヒト免疫学の研究の歴史というのは、まさに解析技術の革新とともに歩んできたものなんです。技術が追いついていなかった時代には、たとえ検体が手元にあっても、できることは限られていて、どうしても現象論や推測の域を出られませんでした。

—これまでのご研究の中で、先生のブレイクスルーになった発見・技術革新などはございますか？

1つは2011年に行った濾胞性ヘルパーT細胞（Tfh）の研究です。ヒト末梢血をフローサイトメトリーで解析して、CXCR5陽性CD4陽性T細胞という集団を詳しく見ていくと、リンパ組織にいるTfh細胞とよく似ていることがわかりました。さらにその中にTh1、Th2、Th17細胞に似たサブセットが含まれていて、それぞれが異なるかたちでB細胞を制御し、活性化していることを見出しました(1)。同時に、ヒトのTfhは1つではなく3つのサブセットから構成されていて、この3つのバランスが崩れると自己免疫疾患が起こるのではないか、という仮説も提案しました。その結果、「血液の情報だけで、ここまでのことが分かるのか」と、多くの研究者が強い関心を持ってくださったんですね。

その後、世界中の研究者がさまざまな自己免疫疾患や感染症の患者さんで追試をしてくださり、私たちの発見は次々と確認されました。今では、「ヒトTfh細胞には機能の異なる3つのサブセットが存在する」という考え方は定説になりました。こうした国際的なヒト免疫研究の流れの中で、末梢血中のTfh細胞サブセットを解析することで、さまざまな自己免疫疾患の病態理解につながるパラメーターを見いだすことができるようになりました。

つまり、「実際に生体内で起こっている現象を、血液検体というアクセスしやすいサンプルから読み解くための重要な指標がある」ということが示され、生体システム全体で何が起きているのかを理解する手がかりになってきたわけです。こうした発見の積み重ねが、ヒト免疫学そのものの流れを、少しずつ変えてきたのではないかと感じています。

もう1つは、マイクロアレイのような網羅的な遺伝子解析が可能になったことです。網羅的に遺伝子発現をとらえられるようになったことで、ヒトの免疫応答を「部分」ではなく、よりシステムとして見られるようになってきました。

例えばループス\*1の場合だと、サイトカインIFN- $\alpha$ が樹状細胞を活性化し、病態に重要な役割を果たしているそうだと、ということ自体は以前から指摘されていました。そこにマイクロアレイ解析が加わることで、さまざまな免疫細胞がIFN- $\alpha$ に暴露された結果として生じる「特異的なIFN gene signature」を、末梢血レベルで直接とらえられるようになったんです。その結果、「IFNが過剰になっている状態とループスの病態とは、間違いなく深く結びついている」という理解が、データとしても徐々に裏づけられてきました。このように、解析技術が進歩することで、これまでは「なんとなくそう見えていた」現象が、病態としっかり結びついた形で説明できるようになってきた。それが、ヒト免疫学の発展を大きく後押ししてきたと感じています。



上野教授

\*1 ループス：自己免疫疾患の一つで特に全身性エリテマトーデス（英語: systemic lupus erythematosus; SLE, ドイツ語: lupus erythematoses）として知られている。なんらかの原因によって種々の自己抗体を産生し、それによる全身性の炎症性臓器障害を起こす自己免疫疾患。lupusの語は「CNSループス」「ループス腎炎」などで見られる

ーブレイクスルーに挙げられた2011年の論文は例えばその後にご発表のワクチン効果に関する論文にも結びついていると思いますが、この2011年の論文から先生はどのように免疫の理解を深めていかれたのでしょうか。

2011年の論文は、Tfh反応の場であるリンパ組織で何が起きているかを末梢血のTfh細胞の解析から推測できる、ということを示した論文でした。その延長線上で、「ヒトの末梢血検体を使って、ワクチン接種後にリンパ組織でのTfh反応を評価できないか」と考えて取り組んだのが、2013年のインフルエンザワクチンによって誘導されるTfh応答に関する論文です(2)。この研究では、ワクチン接種後の末梢血で、活性化されたTh1型のTfh細胞（現在ではTfh1細胞と呼ばれている集団）が増えてくることを捉え、その出現の程度が、後から立ち上がってくる抗体反応ととてもきれいに正の相関を示す、ということを示しました。

一方で、この発見は、自分が始めたフィールドをある意味で「混乱」させることにもなりました。というのも、2011年の論文では「Tfh1細胞はあまりB細胞ヘルプ能力が高くない」という結果だったのに対して、2013年のワクチン研究では「Tfh1細胞が抗体産生誘導に重要だ」という結果になっていたからです。「じゃあ、どちらが真実なのか」と思われるかもしれませんが、実はどちらも真なんです。例えばインフルエンザワクチンは、効果がやや低いと指摘されることがありますが、その一因として、主に機能の弱いTfh1細胞を使っていることが関係しているのではないかと考えています(3)。

特に、まだインフルエンザにかかったことがない子どもの場合、naïveなB細胞からインフルエンザ特異的B細胞をプライミング（活性化）しなければなりません。ところが、現在広く使われているインフルエンザワクチンはTfh1細胞への依存度が高く、このTfh1細胞にはnaïve B細胞をしっかりプライミングする能力があまり備わっていない。その結果として、子どもでは十分な抗体応答が起こりにくく、ワクチン効果も出にくいのではないかと考えられるわけです。

こうした意味で、ヒト免疫学という分野は、ヒト検体を用いたデータを積み重ねることで「今まで見えていなかったことが見えてくる」かたちで発展してきた、とてもダイナミックな領域だと思います。

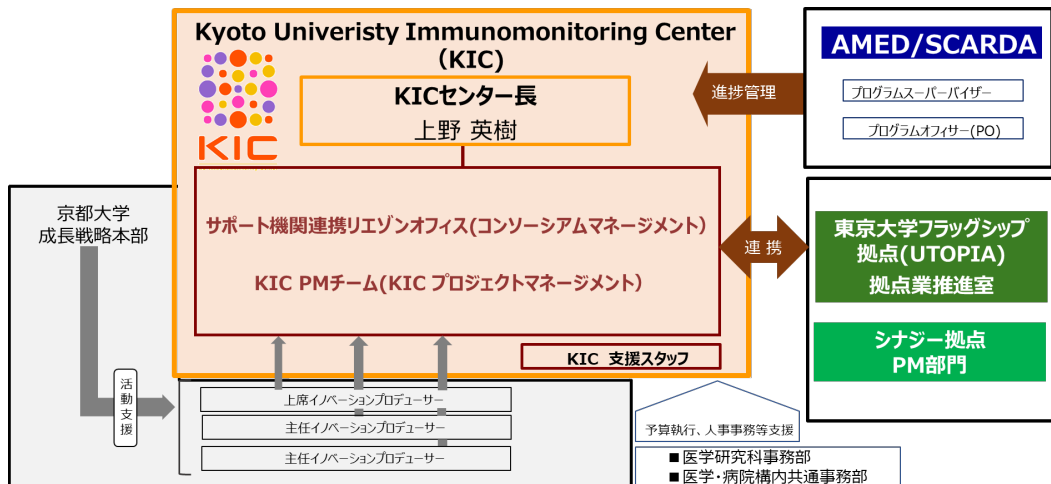
そして、自分が出した仮説に対して、多くの研究者が「なぜなのか」を追試や新しい解析で検証し、新たな知見を積み重ねてくださる。そうやってサイエンスが磨かれていく過程で、自分自身も考え続けざるを得なくなるのだと感じています。そのプロセスを通じて、より真の病態像に近づいてきた実感がありますし、まさに批判されたり、問われたりすることで、新しい発見が生まれてきたのだと感じています。

—先生は、京大の免疫モニタリングセンター(KIC)を設立されたかと思いますがそのセンターを作られた目標や今後の展開についてお聞かせください。

このセンターは、AMEDのSCARDAという国のワクチン拠点事業のサポート機関として、ワクチンで誘導される免疫応答の評価を標準化することを目的に立ち上げたものです。ただ、標準化だけをする場所ではなく、より尖ったサイエンスを展開するセンターでもあり、基礎的な研究や、ワクチンで誘導される免疫応答を包括的に理解しようという研究も並行して進めています。

実はセンター名に「ワクチン」と入れなかったのは、ワクチンに限らず、自己免疫疾患やがんなど、さまざまな疾患のモニタリングにも応用できるようにしたい、という思いがあったからなんです。そこで、あえて「免疫モニタリング」という広い意味をもつ名前にしています。ですので、「ここまでできたらゴール」という線を最初から決めているわけではありません。先ほどお話ししたように、フローサイトメトリーをはじめとした解析機器を使って、もう一度ゼロからヒト免疫を捉え直してみよう、というスタンスで臨んでいます。

例えば、血液検体を40色のフローパネルを使って解析する際に、従来のT細胞、B細胞、単球といった定義に従って進めるのではなく、「1細胞が40次元のデータを持つもの」として扱った場合、どのような情報が見えてくるのか、免疫システムを改めて描き出せないか、といったアカデミックなアプローチも考えています。一方で、実際の患者さんの1滴の血液から「あなたの治療の診断や反応性が、ある程度わかりますよ」というような、より実践的な使い方も視野に入れています。そうしたさまざまな試みを検証できる場であってほしい、という思いで、このセンターを運営しています。



KICの枠組みイメージ図

そのためには、京都大学附属病院や製薬会社をはじめ、さまざまなパートナーとの幅広い連携が欠かせません。私が2019年に帰国して京大でラボを立ち上げたときは、本当にゼロからのスタートでした。その後SCARDA事業に参加させて頂くことになり、KICを設立し、事業をきっかけに仲間が増えて、多様な解析機器を導入させてもらいました。それに合わせて、機器を動かして解析ができる人材を育てていく必要もあって、そうした積み重ねの中で、数年かけて今の体制ができあがってきたという感覚です。その結果として、今ようやく「本当に信頼できる、しっかりしたデータ」が取れるようになってきていて、本当に面白い、新しいことができるのは、まさにこれからだと思っています。基盤がきちんとしていないと、データもバラバラで、いくら解析しても結局は無駄になってしまふ。

その気になれば、その都度「それっぽい」論文を書くこともできてしまうんですが、本当に役に立つ成果にはなりません。だからこそ、検体をしっかり保存することも含めて、信頼に値するデータを丁寧に積み上げていくことが重要だと考えています。今ようやく、そのための基盤ができてきたな、という手応えがあります。

—先生方のご研究にSpectral Cell Analyzer ID7000がどういう形で貢献できているかお伺いしてもよいでしょうか。

免疫モニタリングにはID7000を使っているのですが、今、2つの大きなパネルを運用しています。1つは、免疫細胞を網羅的に解析するための40~42色のパネルで、数百マイクロリットルの血液から、できるだけ幅広く免疫細胞を見てみようというものです。現在、いくつかのコホート研究を進めて何千検体というヒトの臨床血液検体が集まってきていて、さまざまな基礎疾患を持つ少し高齢の男女の方々の検体を対象に、「どういう多様性があるのか」「その疾患や年齢・性別によって違いが出るのか」といった点を、パラメーターの違いから明らかにしていこうとしています。

もう1つのパネルは、抗原特異的なB細胞やT細胞の解析をさらに踏み込んで行うためのものです。現在の論文では、抗原特異的なT細胞の「数」や「頻度」を報告したものが多いたのですが、私たちはその一歩先に進んで、その中に含まれるサブセット、つまり機能の異なるT細胞集団をもっと細かく分けて解析しています。ただ従来の解析であれば、例えばT細胞なら「お手本」のようなゲーティング戦略があって、そのとおりに解析すればよかったのですが、ただ30色を超えてくると、そうしたお手本に載っていないパラメーターもたくさん含まれています。それらをどうバイアスなく活かしていくか、そこはまさに今も試行錯誤しているところです。

一膨大なパラメーター数が近年さらに増えていくことが予想されますが、たくさんの情報を処理されていく上で機械学習やAIなど活用されるご予定はありますでしょうか。

まさしくAIは必ず必要だと思っています。特にKICでは、マルチパラメーターかつマルチオミクスな解析結果を、最終的に統合していくことを目指しています。1つの検体から、シングルセルデータ、ハイパラメーターのフローサイトメトリーデータ、プロテオミクス、メタボロミクスといった複数のレイヤーのデータを出していくことができます。もちろん、それぞれ単体のデータだけでも論文にはなりますが、それだけでは病態の本質的な理解にはなかなか届きません。やはり、こうしたデータを統合して立体的な像としてとらえたときに初めて見えてくるものがあり、そのときに初めて「真に生きたデータ」になるのではないかと感じています。そのためには、例えばID7000で得られる40パラメーターの情報というのは、「1細胞が40次元のベクトルを持っている」ということになり、データ量としては相当“恐ろしい”スケールになります。

今、私たちは従来のように「このマーカー構成ならT細胞」「これはB細胞」といった“決まり”をいったん脇に置いて、アンバイアスにもう一度データを見直したいと考えています。

例えば、本当はT細胞なのにCD20というB細胞マーカーを持っている細胞が、かなりの数で存在します。ところが、現状では説明が付きにくいという理由で、そうした集団は解析の段階で外されてしまうことが多い。多発性硬化症ではCD20陽性T細胞が病態に関わっていることが分かっているにもかかわらず、そのCD20陽性CD3陽性T細胞を正面から取り上げた研究は、まだ非常に限られているのが現状です。ですので、私たちはもう一度、シングルセルから得られる遺伝子やフローサイトメトリーのデータを、できるだけ先入観なしに解析し直したいと思っています。

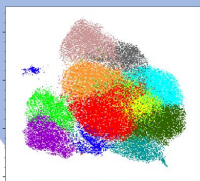
とはいえ、それを人手だけで1つ1つ見ていこうとすると、3年ぐらいいはあつという間に過ぎてしまうでしょう。そこで活かせるのがAIですね。1細胞を40次元の情報でとらえたときに、「どの集団が一番疾患と相関しているのか」を、免疫学的なラベルをいったん外してアンバイアスに探索していこうとしています。そうすることで、これまでの“当たり前”になっていたバイアスを少しずつ外していき、既存の概念を更新できるのではないかと期待しています。

そのためにも、AIは取り入れなければいけない技術ですし、実際にすでにプロジェクトは動き始めています。AIエージェントを導入して、1検体から得られるすべての情報を統合し、自動で並列解析できるような統合解析システムを構築しているところです。

## マルチプラットフォームシングルセル解析

### 超多色フローサイトメトリー

- ・ スペクトル

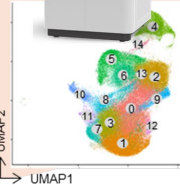


### ヒト血液、 組織検体



### シングルセル遺伝子解析

- ・ scRNAseq
- ・ scTCR/BCRseq
- ・ scATACseq
- ・ CITEseq



### シングルセル 空間遺伝子解析

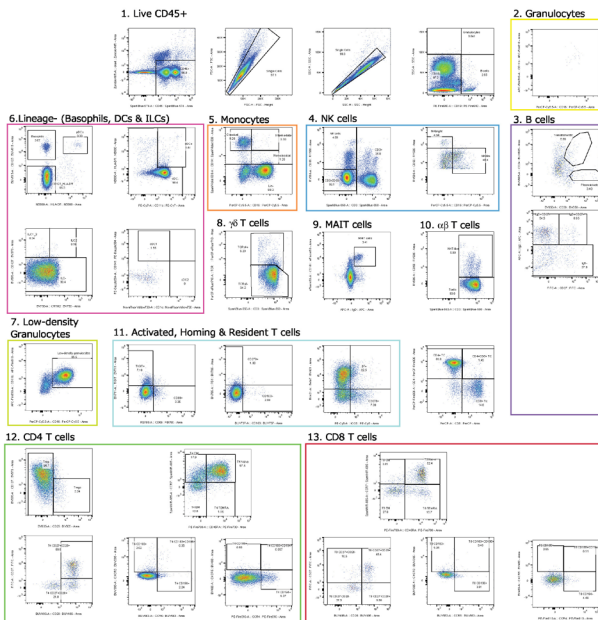
- ・ 細胞サブセット
- ・ 組織内の存在部位
- ・ 他の細胞との近接性



上野先生が描く1つの検体からマルチパラメーターな解析が可能となる統合解析システム

—先生のご研究において、特にID7000のどのようなポイントを気に入ってご使用いただいていますか？

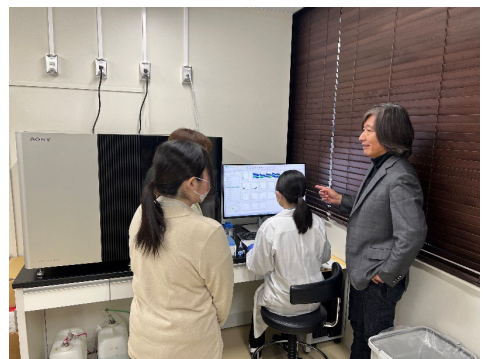
一番気に入っているのは、やはりディテクターの数圧倒的に多いところですね。先ほどお話したようなハイパラメーターのアンバイアスな解析をしようとする、コンペンセーションやアンミキシングが少しでもずれると、もうアウトなんです。その点、ID7000はアンミキシングが非常に安定していて、補正エラーがほとんど出ない感覚があります。おそらく、理論的にもディテクター数が多いほうが安定してシグナルを検出できて、アンミキシングもうまくいく可能性が高いのだろうと考えています。それから、今は染色装置Biomekを導入してID7000を組み合わせて使っているのですが、これは本当に驚くくらいうまく回っています。一度テンプレートを作ってしまうと、抗体の入れ忘れといったヒューマンエラーも防げますし、次のサンプルもほとんど微調整なしでそのまま測定できる。膨大な検体数を扱うなかでバイアスを極力なくするために、SOP (Standard Operating Procedure) を作ってオペレーションを徹底的にマニュアル化しています。検体の凍結方法や染色手順など、プロセスをすべて統一して、人によるばらつきやテクニカルな差をできる限り抑えようとしてきましたが、今のところその仕組みがかなりうまく機能していると感じています。



ヒト末梢血における免疫細胞の網羅的ゲーティング戦略例

—最後にこれから研究を志される学生さんや研究者の方に送られるメッセージをお伺いできればと。

自由であれ、と伝えたいですね。自由である。自由であること。自由な発想で、「これ面白そうだな」と思うことをどんどんやってみてほしいと思います。今はテクノロジーがどんどん進んでいて、基本的にはとても面白い時代なんですよね。ただ、その一方で「せっかくの新しい技術なのに、まだ使い方がよく分かっていない」という場面もたくさんあります。新しく研究を始めた人は、どうしても「先輩がこうやっているから」「こう使うのが正解だと教わったから」と、その型に従ってしまいがちです。でも、必ずしもそれに従う必要はないと思っています。「こういう使い方をしたら、ひょっとしてこんなこともできるんじゃないか」「こんな解析もできるんじゃないか」と、少し型からはみ出すような発想を、ぜひ遠慮なく狙ってほしい。何かを恐れず、「間違ってもいい」「間違いというものは本当はそんなにない」というくらいの意識でチャレンジすることが大事だと思います。その自由さが、最終的には新しい発見や、自分にしかできない研究につながっていくと思います。



ID7000で解析中の上野先生、研究員の皆様

—大変貴重なお話をありがとうございました。

## 参考文献

(1) Rimpei Morita, Hideki Ueno, et al. Human blood CXCR5+CD4+ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion.

[Immunity. 2011 Jan 28;34\(1\):108-21.](#)

(2) Salah-Eddine Bentebibel, Hideki Ueno, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination.

[Sci Transl Med. 2013 Mar 13;5\(176\):176ra32.](#)

(3) Hideki Ueno. Tfh cell response in influenza vaccines in humans: What is visible and what is invisible.

[Curr Opin Immunol. 2019 Mar 25;59:9-14.](#)

### スペクトル型セルアナライザーID7000

多数のサンプルを高速・簡便に解析できる  
全自動スペクトル型セルアナライザー

- ・ 先進のスペクトル光学技術による高精度かつ安定した解析
- ・ 機器管理から解析までの快適なワークフローを実現
- ・ 日々の実験をより効率的にする384対応3Dオートローダーとシンプルで直感的な操作/設定



### 発行元

ソニー株式会社  
ライフサイエンス&テクノロジー事業部  
ライフサイエンス事業部門 ライフサイエンス営業部

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1  
Tel : 0120-667-010  
URL : <https://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/>

