

## SMARTer法を用いたT細胞受容体プロファイリング

### マルチプレックスPCRを用いないライブラリー増幅

SMARTテクノロジーと半ネステッドPCR法は、バイアスのない完全長TCR可変配列の増幅を可能にします >>

### 幅広いサンプル量で安定したパフォーマンス

10 ng、100 ng、1,000 ngのRNAサンプル量で同等の配列決定の結果が得られています >>

### 卓越した感度と再現性

0.1%のクローン型特異的配列をバックグラウンドと区別して検出することが可能です >>

## 背景

### T細胞受容体とは？

ヒトやその近縁種では、病原体の検出と中和に直接関与するT細胞(またはTリンパ球)が細胞性免疫を担っています。T細胞の機能には、抗原提示細胞(APC)表面の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子によって提示された特定の抗原に選択的に結合する、高度に専門化した細胞外受容体(T細胞受容体またはTCR)が必須です(図1、パネルA)。TCRが抗原を認識するとT細胞は活性化され、急速に増殖するとともに、サイトカインを放出して免疫応答を開始します。

TCR-抗原相互作用の相対的な特異性を考えると、遭遇する可能性のある広範な病原体を認識するには、TCRは驚異的な多様性をもつ必要があります。この目的を達成するために、適応免疫系は、生物学において全く比類のない、TCRの体細胞多様化システムを発達させました。TCRの大部分は2種類のサブユニット鎖( $\alpha$ と $\beta$ )からなるヘテロダイマーで、両サブユニットとも可変ドメインを含み、ヒトでは単一コピーの遺伝子によってコードされています。「クローン型」という用語は通常、特定のTCR変異体(TCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ サブユニット)、またはあるT細胞クローン集団に共通するTCRサブユニット変異体の組み合わせ(TCR- $\alpha$ +TCR- $\beta$ )のいずれかを指すために用いられます。

TCRの多様性は、T細胞発生の初期段階で生じます。T細胞の前駆細胞は、胸腺において造血幹細胞(HSC)から派生し、これらの細胞が分裂するにつれ、TCR- $\alpha$ 遺伝子のVセグメントとJセグメントの間、ならびにTCR- $\beta$ 遺伝子のVセグメント、Dセグメント、およびJセグメントの間で大規模な再構成が起こり、この再構成のメカニズムには追加のヌクレオチドの挿入および除去も含まれます(図1、パネルB)。一般に「V(D)J再構成」と呼ばれるこのプロセスにより、想像し得るあらゆるペプチドを認識するのに十分なTCR多様性を集団としてもつT細胞群が最終的に得られます。V-DジャンクションとD-Jジャンクションにまたがる、TCR- $\beta$ の「相補性決定領域3」(CDR3)と呼ばれる領域は、TCR- $\beta$ の各変異体に固有であり、ハイスループットプロファイリングの実験においてTCR多様性を定量するためによく使用されます。体細胞多様化の後、T細胞のうちMHC分子に十分な親和性を持たないもの、および自己抗原を認識するものは除去され(それぞれ正および負の選択)、機能的なT細胞の多様性となります。

$10^6 \sim 10^7$  (Six et al., 2013) から  $10^{15} \sim 10^{20}$  (Murphy, 2012; Laydon et al., 2015) 種類のクローン型があると推定されているTCRクローン型は、ヒトの発生や病気の観点からT細胞レパートリーを特徴付けるには莫大な量のデータを得なければならず、研究者にとって難題となります。従来のクローニングとサンガーシーケンス法やタンパク質ベースの抗原特異的TCR同定法(例えばテトラマーアッセイ)によって多くの重要な知見が得られましたが、次世代シーケンス(NGS)技術の発展によりこの研究分野の展望は劇的に広がりました。

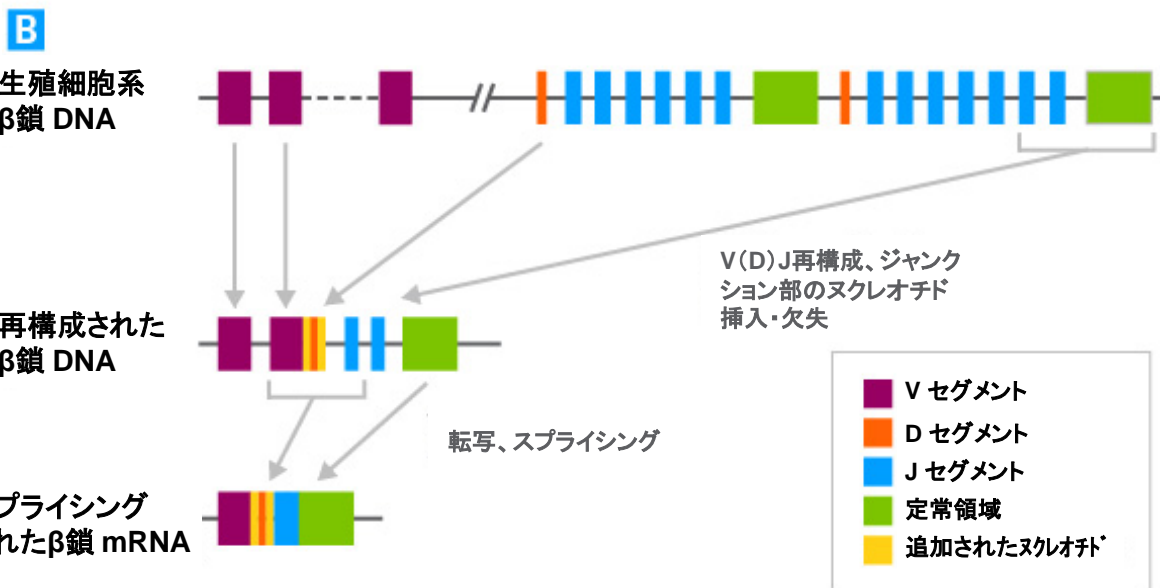
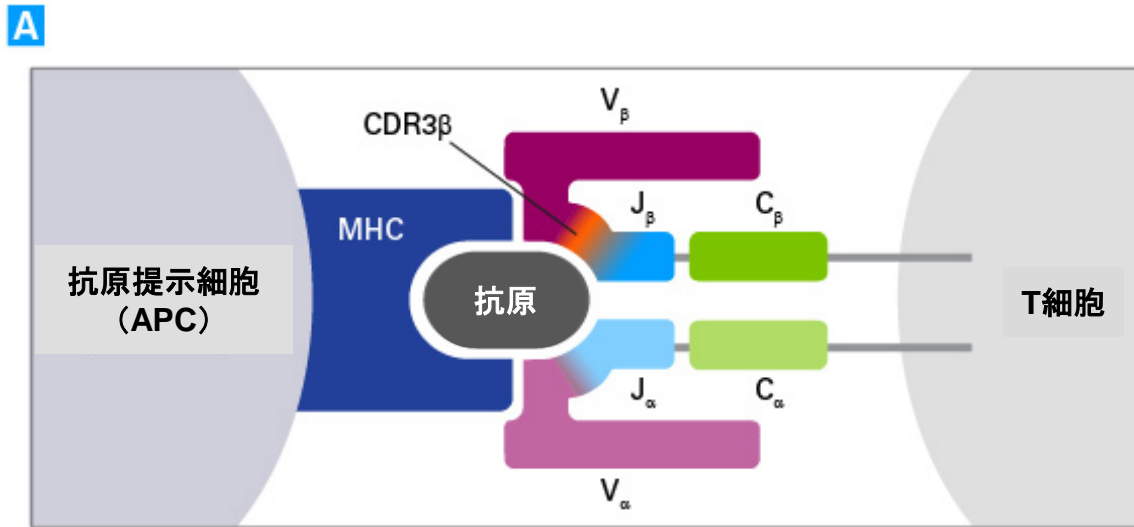


図1. T細胞受容体の構造と多様化。

パネルA. αおよびβサブユニット鎖からなる機能性αβ TCRヘテロダイマー。TCRのαサブユニット鎖は、それぞれ赤紫色、青色、緑色で示す「可変部」(V)、「連結部」(J)、「定常部」(C)の3セグメントから成り、TCRのβサブユニット鎖はこれらに加えて、オレンジ色で示す「多様性部」(D)セグメントをもつ。TCRのβサブユニットのCDR3領域は色分けされている。TCRはT細胞表面に示されており、APC表面のMHC分子に結合した抗原と結合している。

パネルB. TCRβサブユニット鎖のV(D)J再構成と転写後プロセッシング。TCRβ遺伝子座には、50を超えるVセグメント(赤紫色)、2つのDセグメント(オレンジ色)、および13のJセグメント(青色)が含まれている。体細胞再編成の間、各セグメントタイプの少なくとも1つがランダムに選択され、追加ヌクレオチド(黄色)の挿入および/または除去によって更に多様性が導入される。選択された各セグメントは(定常領域と共に)、TCR mRNAのスプライシングにより連続したユニットに結合される。TCRαサブユニット鎖は類似したメカニズムによって生成される。

### TCRプロファイリングの目的

ハイスループットTCRプロファイリングにより、T細胞の発生とTCRの多様性に関する基本的な知見が既に得られています(Calis and Rosenberg, 2014; Woodsworth et al., 2013)。例えば、TCRの変化はT細胞の運命を決定しないこと(Wang et al., 2010)、および、いわゆる「パブリックTCR」あるいは「パブリッククローン」には集団全体に、偶発に起こる頻度よりかなりの重複があること(Robins et al., 2010)が、これらの方法を使って示されています。TCRクローンの多様性は年齢とともに直線的に減少し、自己免疫疾患や癌患者では健康な人に比べて有意に減少していることが、種々の集団のサンプル抽出により明らかにされています(Britanova et al., 2014; Sherwood et al., 2013; Klarenbeek et al., 2012)。

臨床では、TCRプロファイリングは、造血幹細胞移植(HSCT)を受けた患者の免疫系の回復を分析するため、およびこのプロセスの促進を目的とした治療法の有効性を比較するために使用されてきました(Van Heijst et al., 2013)。将来的には、ハイスループットTCRプロファイリングは、診断ツールとして、および新しい治療法や治療様式の開発手段として非常に有望です(Calis and Rosenberg, 2014; Woodsworth et al., 2013)。例えば、TCRレパトア解析を使ってワクチン候補の防御免疫応答を誘発する能力を評価することができます。

## TCRレパトア解析のためのシーケンス法

これまでに行われたTCRプロファイリング実験の大半は、TCR-βサブユニット鎖のCDR3領域に対応するゲノムDNAまたはmRNAの配列を把握することに重点を置いてきました(Calis and Rosenberg, 2014; Woodsworth et al., 2013)。CDR3領域は各TCR-β変異体に固有であると考えられていることから、この領域の配列多様性は、T細胞レパートリー全体の多様性の有用な代用としての役割を果たしてきました。

TCRプロファイリングのある種の用途—様々なT細胞亜集団の定量を含む場合など—ではゲノムDNAの配列を決定することが望ましいこともあります。このアプローチに限界がないわけではなく、mRNA配列の分析に基づく方法には重要な利点があります。任意の単一T細胞においてTCRのmRNAテンプレートはDNAテンプレートよりも多い場合が多いので、mRNAシーケンスの方が高い感度が得られ、非常に小スケールのT細胞に存在するものも含めて、固有のTCR変異体をより包括的に同定することが可能となります。

ゲノムDNAではなくmRNA配列を決定することのもう一つの重要な利点は、スプライシングと転写後プロセッシングを受けた後の、機能性タンパク質を産生する可能性が高いTCR配列の同定が可能になることです。対照的に、DNA配列を元にした解析では、TCR配列は翻訳された形で同定されず、機能に無関係な非生産的配列が多く得られることとなります。このため、mRNAシーケンスは、特定のTCR変異体の機能的側面の研究を行う研究者にとって良好な結果が得られます。

ゲノムDNAのシーケンスによるTCRプロファイリング法は、重大な技術的制約も受けます。DNA由来のテンプレートはスプライシングを受けていないため、RNAよりも大幅に長く、そのためTCRの(CDR3を含む)可変領域に対応するゲノムDNAの増幅にマルチプレックスPCRを必要とし、様々なプライマー対に起因するバイアスの影響を受けやすくなる可能性があります。以下に示すように、TCRのmRNAは比較的長さが短いため、TCR-αとTCR-βの可変領域を単一プライマー対で増幅する、より単純な増幅スキームを用いることができ、増幅バイアスの可能性を最小限とするとともに、両サブユニット鎖を同じ実験で分析することが可能となります。

## SMARTer法を用いたT細胞受容体プロファイリング

ここではSMARTer Human TCR a/b Profiling Kit(製品コード635014、635015、635016)について示します。これは、SMART(Switching Mechanism at the 5' end of RNA Template)テクノロジーとセミ-ネステッドPCRを活用して、TCR-αサブユニットとTCR-βサブユニットの可変領域を完全に増幅し、イルミナ®プラットフォーム上で配列を決定するためのライブラリーを調製する、ハイスループットなTCR mRNAプロファイリングの方法です。この方法の優れた感度により、微量のヒト末梢血RNAまたは精製ヒトT細胞をサンプルとして、わずかしか存在しないTCR変異体の検出が可能となり、またマルチプレックスPCRを使用しないため、増幅バイアスに起因するプロファイリング誤差の可能性が最小限に抑えられます。ヒトT細胞レパトアの全体像が容易かつ信頼性良く得られるので、基礎研究および応用研究の目的をより速く達成することができ、新規臨床診断ソリューションの開発の基礎となることが期待できます。

## 実験ワークフロー

### 一本鎖cDNAの合成とテンプレートスイッチング

本法では、ヒト末梢血またはT細胞から抽出された白血球RNAを出発物質として使用します。一本鎖cDNAの合成は、TCR dT プライマーでdTプライミングし、各mRNAの5'末端に到達するとテンプレートに由来しないヌクレオチドを付加する、MMLV由来のSMARTScribe逆転写酵素(RT)によって行います(図2、パネルA)。SMARTSeq v4 oligonucleotide —感度と特異性の向上のためLocked Nucleic Acid(LNA)テクノロジーで改良—は、付加ヌクレオチドにアニールし、一本鎖cDNAに追加ヌクレオチド配列を組み込まれるためのテンプレートとして機能します(これがテンプレートスイッチング段階です)。この追加配列—「SMART配列」と呼ばれます—は、以降のPCRサイクルのプライマーアニーリング部位として働き、完全長cDNAに由来する配列のみが増幅されることを確実にします。

### セミ-ネステッドPCRによるcDNA増幅とイルミナアダプターの付加

逆転写と伸長の後、2段階のPCRを連続して行って、TCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ の転写物の可変領域に対応するcDNA配列を増幅します。最初のPCRでは、一本鎖cDNAをテンプレートとして用い、SMART配列に相補的なフォワードプライマー(SMART Primer 1)と、TCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ いずれかの定常(非可変)領域に相補的なリバースプライマー(TCR a/b Human Primer 1)を含みます。両方のTCRサブユニット鎖を解析したい場合は、両方のリバースプライマーを単一反応に入れることができます。SMART配列と定常領域のプライマーを使用することにより、最初のPCRではTCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ のcDNAの可変領域全体と定常領域の大部分を特異的に増幅します(図2、パネルB)。

2番目のPCRでは、最初のPCR産物をテンプレートとし、セミ-ネステッドプライマー(TCR Primer 2とTCR a/b Human Primer 2)を用いてTCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ のcDNAの可変領域全体と定常領域の一部を増幅します(本反応でも、単一反応で増幅するのはTCRサブユニット鎖の片方でも両方でも良い)。フォワードおよびリバースプライマーには、イルミナのシーケンシングプラットフォームに合うアダプター配列とインデックス配列(それぞれread 2 + i7 + P7とread 1 + i5 + P5)が含まれています。PCR後に精製、サイズセレクション、および品質分析の後、ライブラリーはイルミナシーケンスに使用することができます。



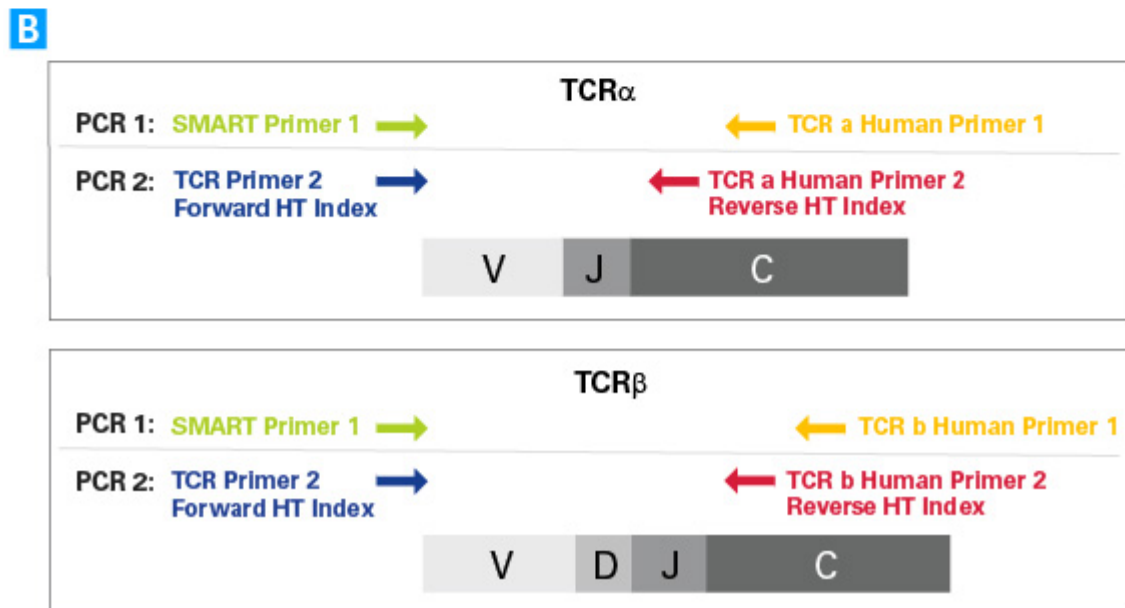
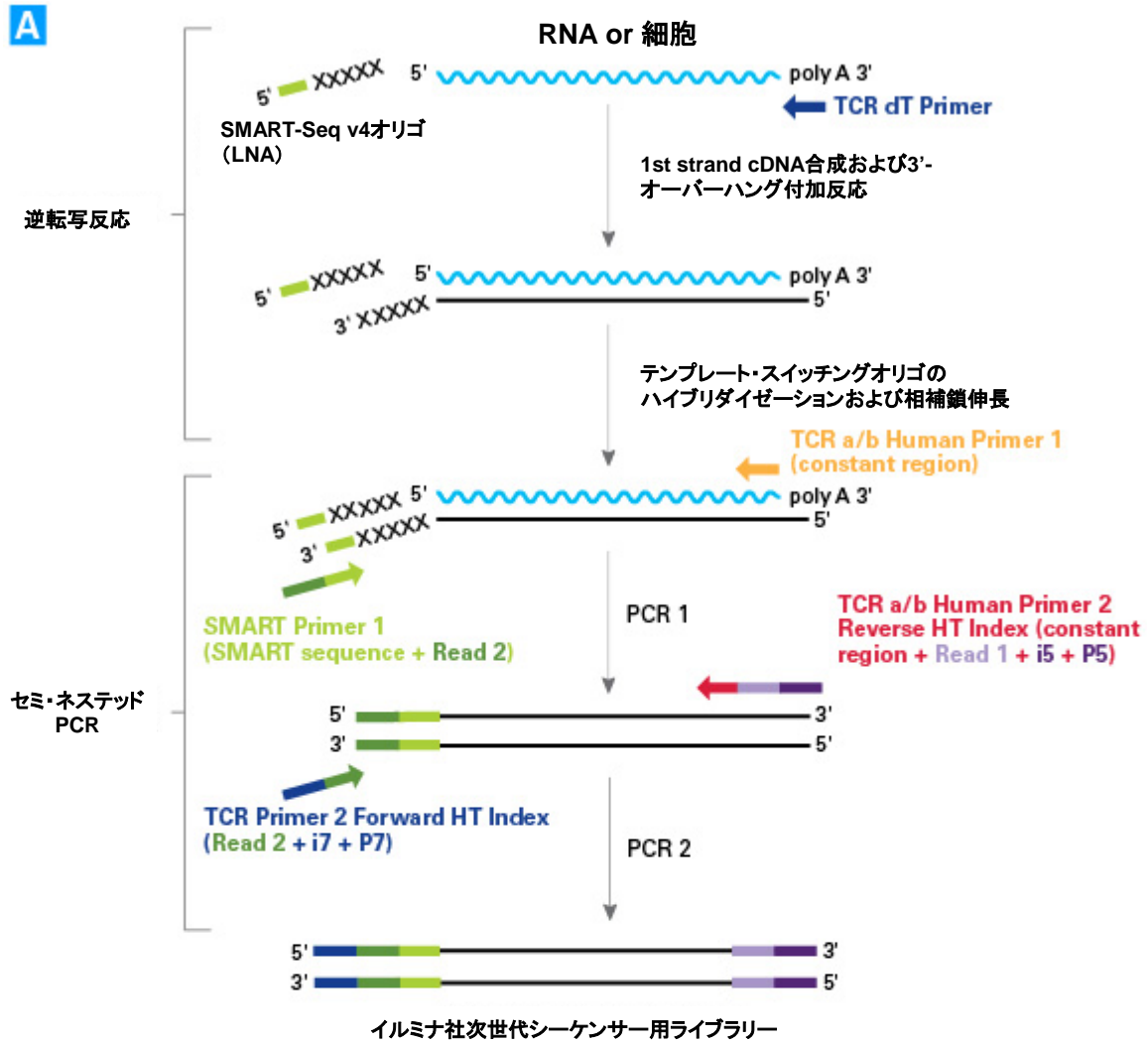


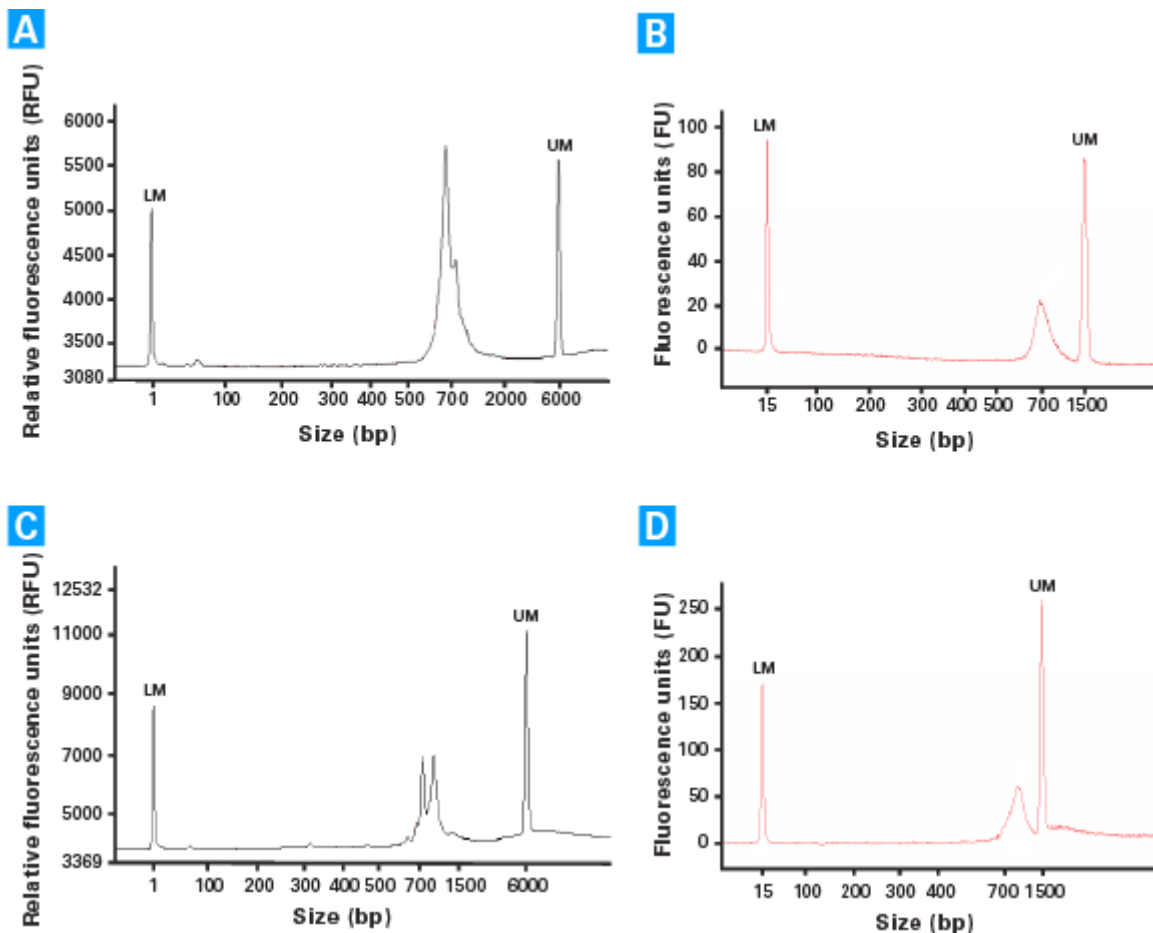
図2. SMARTer法を用いたTCRプロファイリングのためのライブラリー作製ワークフローとPCR手順。

**パネルA.** TCRサブユニットのmRNA配列の逆転写とPCR増幅。一本鎖cDNAの合成は、TCR dTプライマーによってプライミングし、MMLV由来のRTIによって行う。各mRNAの5'末端に達すると、RTは非テンプレートヌクレオチドを一本鎖cDNAに付加する。SMARTSeq v4 Oligonucleotideは、RTによって付加されたヌクレオチドに相補的な配列を含み、一本鎖cDNAにハイブリダイズする。テンプレートスイッチング段階では、RTはSMARTSeq v4 Oligonucleotideの残り部分は、一本鎖cDNAの末端に追加配列を組み入れるためのテンプレートとして使用される。TCR cDNAの完全長可変領域は、オリゴヌクレオチドをテンプレートとする配列 (SMART Primer 1) とTCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ サブユニットの定常領域 (TCR a/b Human Primer 1) に相補的なプライマーを用いたPCRによって選択的に増幅される。その後、TCR Primer 2とTCR a/b Human Primer 2を用いて、TCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ サブユニットの可変領域を増幅するとともに、アダプター配列とインデックス配列を組み込むためのPCRをさらに行う。これらのプライマーには、イルミナシーケンスプラットフォームに合うアダプター配列とインデックス配列 (それぞれread 2 + i7 + P7とread 1 + i5 + P5) が含まれる。精製、サイズセレクション、および品質分析の後、TCR cDNAライブラリーはシーケンスに使用することができる。

**パネルB.** セミネステッドPCRに基づくTCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ サブユニットの増幅法。第1ラウンドの増幅に使用したプライマー対は、TCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ のcDNAの可変領域全体と定常領域の大部分を増幅する。第2ラウンドの増幅では、TCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ のcDNAの可変領域全体と定常領域の一部が増幅される。最終的なTCRライブラリーcDNAの予想サイズ (インサート+アダプター) は約700~800 bpである。

## ライブラリー品質管理とイルミナシーケンス

シーケンスに先立ち、Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) ビーズを用いてライブラリーを精製・サイズセレクションします。ライブラリーの増幅と精製の確認のために、サンプルをFragment AnalyzerまたはBioanalyzerで分析します (図3)。電気泳動ピークの位置と形状は、TCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ のDNA断片がライブラリーに含まれているかどうか、サンプル性状、および解析法によって異なります。各精製ライブラリーの品質とサイズが確認できたら、各cDNAに含まれるTCR配列を十分に捉えることができる300bp paired-end readを用いて、シーケンスをイルミナプラットフォーム上で行います。



**図3. TCRシーケンスライブラリーの電気泳動プロファイル。** TCR- $\alpha$ およびTCR- $\beta$ の両方の配列を含むライブラリーは、末梢血白血球または単一のT細胞クローンJurkat細胞株から得られたRNAを10 ng使用して作製した。得られたライブラリーの電気泳動パターンを、Advanced Analytical Fragment AnalyzerとAgilent 2100 Bioanalyzerの両方により得た。各電気泳動図の左端と右端に位置するピークは、それぞれの解析サンプルに添加したDNAマーカである。

**パネルA.** 末梢血白血球のRNAから得たTCR- $\alpha$ およびTCR- $\beta$ シーケンスライブラリーの典型的なFragment Analyzerプロファイル。

**パネルB.** 末梢血白血球のRNAから得たTCR- $\alpha$ およびTCR- $\beta$ シーケンスライブラリーの典型的なBioanalyzerプロファイル(パネルAと同じライブラリー)。Fragment AnalyzerおよびBioanalyzerによって得られたライブラリープロファイルはいずれも、末梢血白血球のRNAから得たライブラリーでは、約650~1150 bpの幅広いピークと約700~800bpの最大ピークを示す。

**パネルC.** Jurkat T細胞のRNAから得たTCR- $\alpha$ およびTCR- $\beta$ シーケンスライブラリーの典型的なFragment Analyzerプロファイル。Jurkat細胞のRNAから得たライブラリーのFragment Analyzerプロファイルは、TCR- $\beta$ とTCR- $\alpha$ の配列断片の予想サイズにそれぞれ対応する約700 bpと800 bpの位置に明瞭なピークを示す。

**パネルD.** Jurkat T細胞のRNAから得たTCR- $\alpha$ およびTCR- $\beta$ シーケンスライブラリーの典型的なBioanalyzerプロファイル(パネルCと同じライブラリー)。JurkatのRNAから得たライブラリーのBioanalyzerプロファイルは、形状と位置がパネルAおよびパネルBで示すピークと似たピークを示す。

## 結果

### クローン形質のサンプル間比較

SMARTer Human TCR a/b Profiling Kitを用いて、血液がん患者8人から得た末梢血単核球(PBMC)の2連サンプルから抽出されたRNAを解析されました。得られた16のcDNAライブラリーのシーケンス結果は、下図に示す通り、計算免疫学プラットフォーム(a computational immunology platform)を用いて解析しました。解析の一形態として、TCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ のCDR3領域に位置付けられた配列に基づいて、サンプル間で共有される共通TCR- $\alpha$ およびTCR- $\beta$ クローン型の数を決定しました。その結果を、各ペアで共有されるクローン形質の数(常用対数)を異なるタイル色で表したヒートマップを用いて示します。図4からわかるように、クローン形質の重複は同じ患者由来の2連のPBMCサンプル間で最大レベルになっています。対照的に、異なる患者由来のPBMCサンプル間では、重複レベルが劇的に低くなっています。これらの結果は、2連サンプルについて同様のTCRプロファイルデータが得られ、異なる患者から得たサンプルについては著しく差のあるTCRプロファイルデータが得られるという点で、SMARTer法の再現性と感度の両方を実証しています。

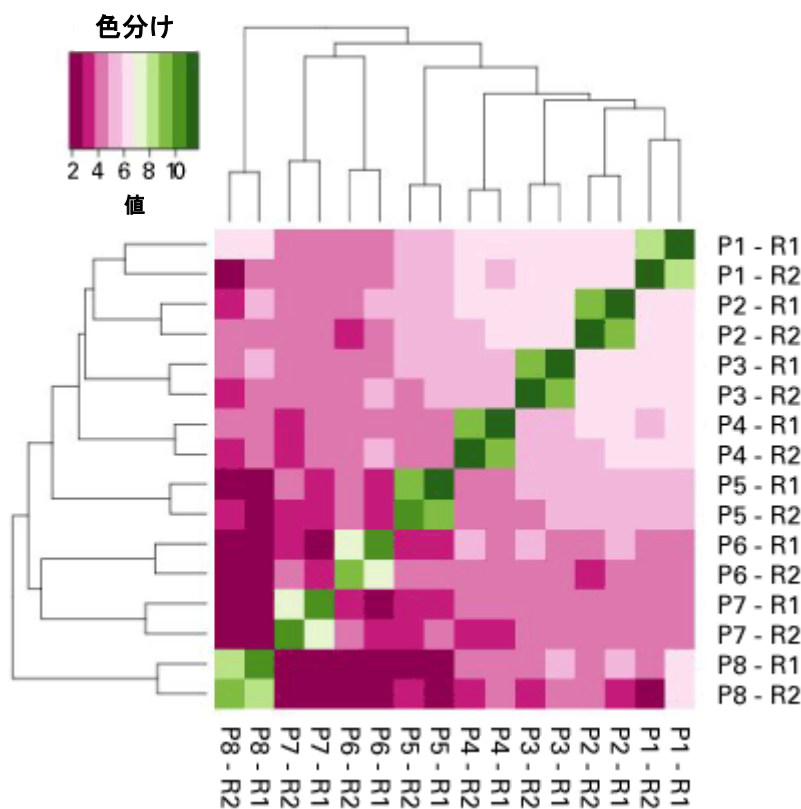


図4. クローン形質のサンプル間比較のヒートマップ。実験プロトコルは、8人の血液がん患者(P1~P8)から得たPBMCの2連サンプル(R1, R2)から抽出したRNAについて実施した。シーケンスで得られたリードをTCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ のCDR3領域にマップして、各サンプル中に存在するクローン型を同定しました。ヒートマップの下側と右側に示した各ペアの比較のために、タイルの色は、両試料に共通するクローン型の数を常用対数に変換した値を示す。両方の軸上の樹状図は、サンプル間の相対的な類似性を示す。



## ターゲット上のシーケンスリード

サンプル量の範囲についてキット性能を評価するために、3種類の異なる量(10 ng、100 ng、1000 ng)の末梢血RNAについてSMARTer法により得られたcDNAライブラリーのDNA配列を上記と同様に決定しました。シーケンスの出力は、分析方法に応じて約260,000リードまたは約275,000リードのいずれかにダウンサンプリングし、下に報告する通り、イルミナBaseSpaceで提供されるアプリケーションを使用して処理しました。解析した各RNAサンプル量について、シーケンスリードの70%以上はTCR- $\alpha$ またはTCR- $\beta$ のいずれかのCDR3領域にマップされ、10 ngのサンプル量で最も高いオンターゲットリード率が得られました(図5、パネルA)。これらの結果は、SMARTer法が広範囲のサンプル量にわたって、高い特異性でtotal RNAからTCR配列を増幅できることを示しています。

## クローン型数とサンプル量変化との相関

別解析として、サンプル量を変化させ、それぞれで最も代表的なクローン型100種の検出数をプロットした。クローン型数をサンプル量100 ngと1,000 ngで比較したところ、0.80のピアソン相関係数と0.80のスピアマン係数が得られ(図5、パネルB)、この結果は、RNAサンプル量の少なくとも一桁の変化でもSMARTer法が再現性が良いことを証明するものです。

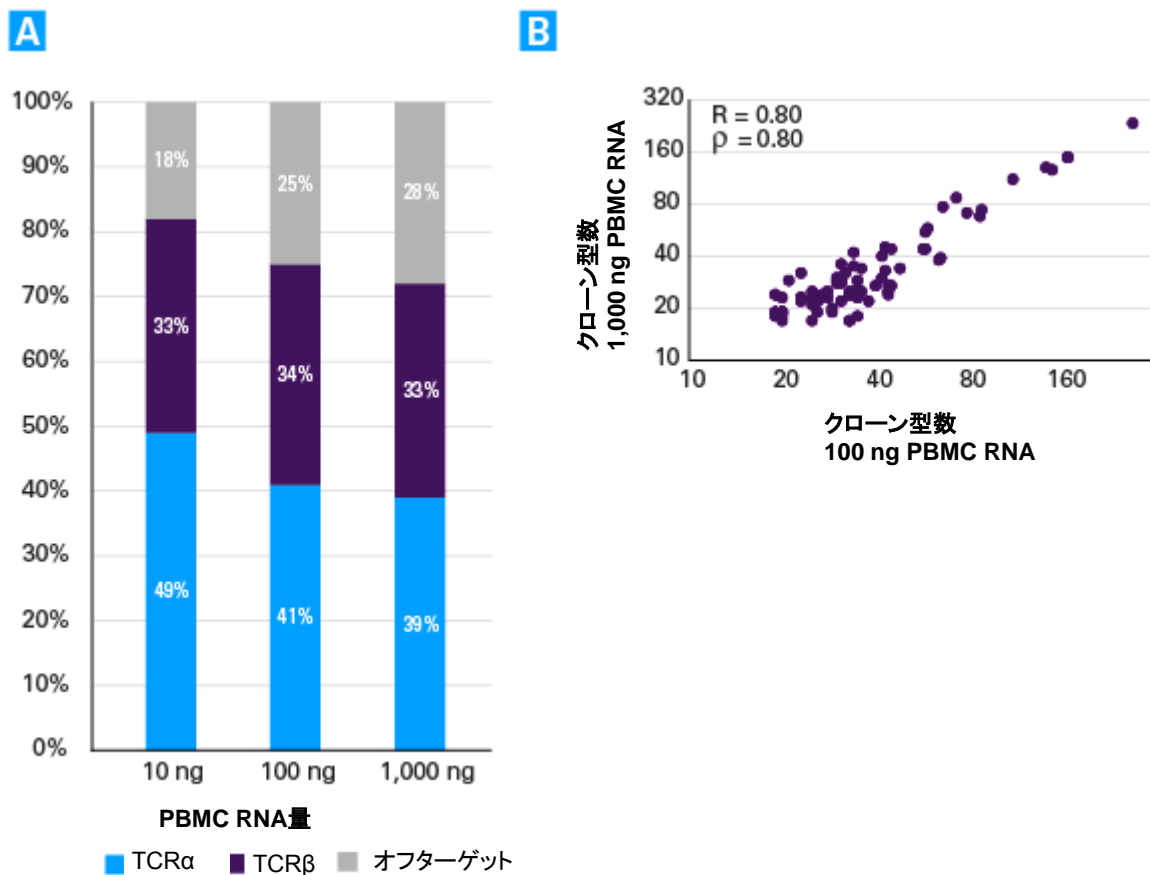


図5. RNAサンプル量を変化させた時のシーケンスリードのオンターゲット率とクローン型数との相関。

パネルA. TCR- $\alpha$ (青色)またはTCR- $\beta$ (紫色)のCDR3領域にマップされたシーケンスリード、またはオフターゲット(灰色)のシーケンスリードの割合(%). 実験プロトコールは、以下の3種類の異なる量の末梢血RNAについて行った: 10 ng、100 ng、1,000 ng。

パネルB. 100 ng RNA対1,000 ng RNA間のクローン型数の相関。ピアソン(R)およびスピアマン( $\rho$ )の相関係数を含める。を示す。

## TCR-βクローン型分布の視覚的表現

シーケンスデータで同定されたTCRクローン型の分布は、コードダイアグラムを用いて視覚的に表現することもできます(図6)。ここでは各RNA量で観察された、表示したTCR-βの可変-接合(V-J)セグメントの組み合わせの分布を表すコードダイアグラムを示します。(ダイアグラム周縁部の)各円弧は1つのVまたはJセグメントを表し、円弧の長さはそのセグメントのデータセット内での分布に比例しています。(円弧を接続する)各コードは、表示したV-Jの組み合わせを含むクローン型の集合を表し、その組み合わせのデータセット内での分布に応じて重み付けされています。3つのダイアグラムの比較により、表示したクローン型は各RNA量でほぼ同じ割合で同定されることが示唆されます。

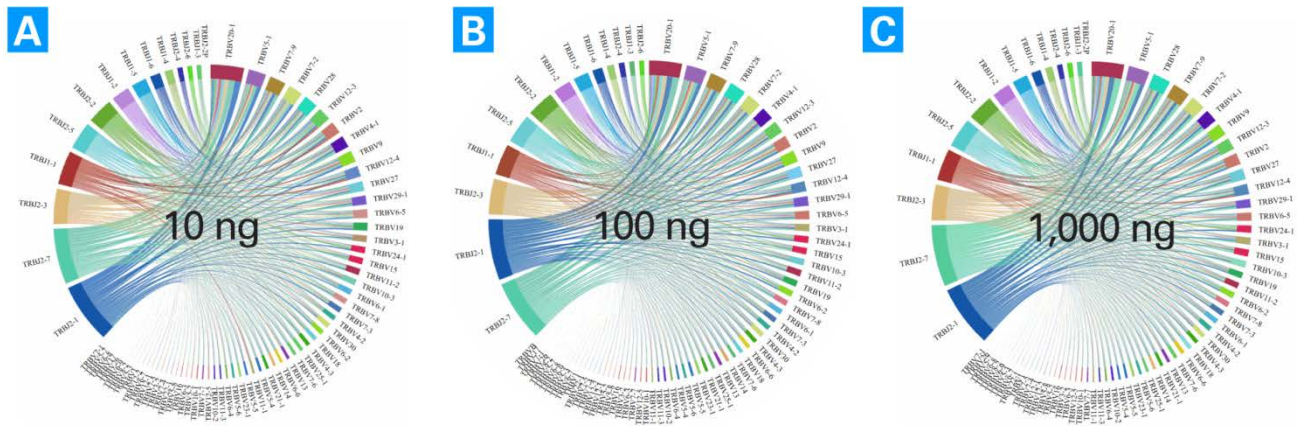
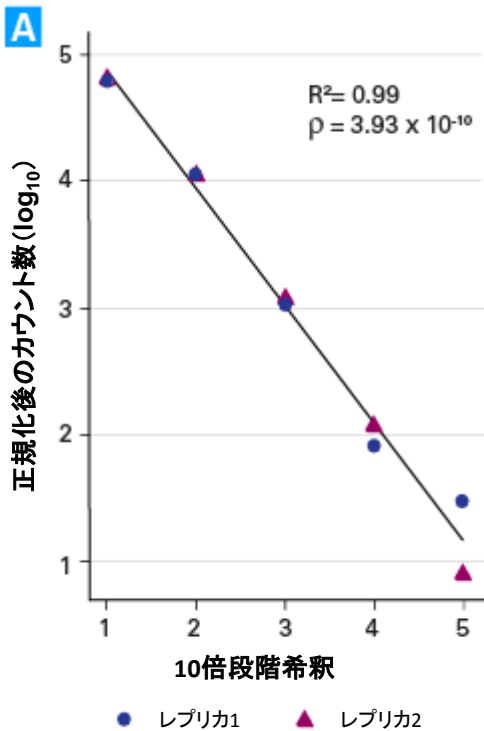


図6. RNAサンプル量を変化させた時のTCR-βクローン型分布のコードダイアグラム。各コードダイアグラムは、表示したRNA量での表示したTCR-β可変-接合(V-J)セグメントの組み合わせの分布を示す。(ダイアグラム周縁部の)各円弧は1つのVまたはJセグメントを表し、円弧の長さはそのセグメントがデータセット内で占める割合に比例する。(円弧を接続する)各コードは、表示したV-Jの組み合わせを含むクローン型の集合を表し、その組み合わせのデータセット内での存在比に応じて重み付けされている。パネルA. 10 ng PBMC RNAのコードダイアグラム。パネルB. 100 ng PBMC RNAのコードダイアグラム。パネルC. 1,000 ng PBMC RNAのコードダイアグラム。

## SMARTer法の感度と再現性

SMARTer法の感度と再現性を評価するため、Jurkat T細胞(TRAJ8-4-TRAJ3、TRBV12-3-TRBJ1-2のクローン型)から得られたRNAをさまざまな濃度(10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%)で添加したPBMC RNAを調製し、2連のサンプルを用いて実験を実施しました。各サンプルで得られたTRBV12-3-TRBJ1-2に特異的な配列リード数は、Jurkat RNAを添加していないPBMC RNAの陰性コントロールから得られたリード数を差し引くことにより標準化しました。常用対数に変換した後、データをプロット(スパイクイン希釈率: 標準化リード数)し、線形回帰分析を行ったところ、スパイクインしたJurkat RNA量とTRBV12-3-TRBJ1-2特異的な配列リード数との間に、統計的に有意な相関( $p = 3.93 \times 10^{-10}$ ,  $R^2 = 0.99$ )が明らかになりました(図7、パネルA)。この結果、特定のTCRクローン型RNAの相対量の違いが、SMARTer法を使って作製したシーケンスライブラリー中に忠実に、かつ再現性よく表われていることを示しています。TRBV12-3-TRBJ1-2特異的な配列リード数をコントロールサンプルとスパイクしたサンプルで比較したところ、0.1%濃度で添加したJurkat RNAは、シーケンスデータでバックグラウンドよりも約275,000リードの冗長さの差で検出可能( $p < 0.005$ )であることを示しています。(図7、パネルB)。



**B**

Jurkat RNA量	% スパイクイン(10 ngのPBMC RNA中のJurkat RNA%)	同定されたTRBV12-3-TRBJ1-2クローン型の数		シグナル:ノイズ比(xスパイクイン/x対照(0%))	両側スチューデントのt検定(p値)	p<0.005	p<0.001
		レプリカ1	レプリカ2				
0	0.000%	619	480	1.0000	–	–	–
100 fg	0.001%	649	488	1.0346	0.87498	False	False
1 pg	0.010%	702	597	1.1820	0.36972	False	False
10 pg	0.100%	1,695	1,673	3.0646	0.00382	True	False
100 pg	1.000%	12,074	11,206	21.1829	0.00157	True	False
1 ng	10.000%	62,395	63,006	114.1592	0.00003	True	True

**図7. SMARTer法の感度と再現性。**

Jurkat T細胞 (TRAV8-4-TRAJ3、TRBV12-3-TRBJ1-2のクローン型) から得られたRNAのさまざまな濃度 (10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%) をスパイクしたPBMC RNAを調製し、2連の実験を行った。パネルA. スパイクしたJurkat RNA濃度とTRBV12-3-TRBJ1-2特異的配列リード数との間の相関。X軸の数字はスパイクしたJurkat RNA段階希釈した濃度 (質量) を示す: 1 = 10%、2 = 1%、3 = 0.1%、4 = 0.01%、5 = 0.001%。TRBV12-3-TRBJ1-2特異的配列リードの計数データは、スパイクしていないPBMC RNAからなる陰性コントロールから得られたリード数を差し引くことにより標準化した。標準化した計数データは、その後、常用対数に変換した。円と三角形は、各サンプル濃度の実験に対応する。線形回帰分析の結果を、グラフ内の右上に示す。パネルB. スパイクしたRNAから得られたTRBV12-3-TRBJ1-2特異的配列リードの計数データ、シグナル対ノイズ比、および統計解析。シグナル対ノイズ比、各実験対でのTRBV12-3-TRBJ1-2特異的配列の平均リード数を用いて求めた。黄色のカラムは、スパイクされていない陰性コントロールRNAで観察されたバックグラウンド数と比べて、TRBV12-3-TRBJ1-2特異的配列リード数の統計的に有意な上昇が検出された、スパイクJurkat RNAの濃度を含む。

## 概要

SMARTer Human TCR a/b Profiling Kitは、ヒト白血球またはT細胞RNA中に存在するTCR- $\alpha$ および/またはTCR- $\beta$ サブユニットの多様性を解析するための強力なソリューションを提供します。ゲノムDNA増幅によるプロファイリング法とは対照的に、5' RACEに基づく本方法では、total RNAを材料として使用します。RNAを出発材料とすることで、TCR V(D)J可変領域を完全に増幅でき、マルチプレックスPCRを使用する必要がなく、低存在量のTCRクローン型を検出することが可能になります。TCR RNAから得られたシーケンスデータからは、対応するサブユニットの機能に関して、価値ある知見を得ることもできます。SMARTer Human TCR a/b Profiling Kitを使用することによって、サンプル量の範囲全体にわたって再現性に優れ、ターゲットリードが大部分を占めるデータが得られることが実証されています。また、全RNAのうち0.1%の割合で存在するTCRクローン型を、比較的浅いリード深度で検出することが可能であることが示されています。高い信頼性と正確さを備えたSMARTer法を用いたTCRプロファイリングは、ヒトの免疫レパトア解析を必要とする基礎研究および応用研究を進める一助となるでしょう。

## 方法

すべてのシーケンスライブラリーは、SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit(製品コード635014、635015、635016)に含まれる試薬を用いてプロトコールに従って作製された。

## 材料

品質分析(図3)に使用されたライブラリーは、10 ngの市販RNAから作製された。Human Blood, Peripheral Leukocytes Total RNA(製品コード636592)とTotal RNA Human Tumor Cell Line: Jurkat(BioChain社カタログ番号R1255815-50)が使用された。TCRクローン型のサンプル間比較(図4)では、Conversant Biologics社のRNAを5 ng~2  $\mu$ g使用してライブラリーを作製された。ターゲットリード(図5)と同定されたTCR- $\beta$ のクローン型(図6)の解析に使用したライブラリーは、10 ng、100 ng、および1,000 ngのHuman Blood, Peripheral Leukocytes Total RNAから作製された。感度と再現性の評価(図7)に使用したライブラリーは、段階希釈したTotal RNA Human Tumor Cell Line: Jurkatを各濃度でスパイクされた、10 ngのHuman Blood, Peripheral Leukocytes Total RNAから作製された。

## PCRパラメーター

SMARTer Human TCR a/b Profiling Kitのマニュアルに示されている通り、すべてのライブラリーは2ラウンドのセミ-ネステッドPCR増幅が実施された。品質分析(図3)および感度と再現性の評価(図7)に使用したライブラリーは、PCR1に21サイクル、PCR2に20サイクルで増幅された。クローン型のサンプル間比較(図4)に使用したライブラリーは、PCR1に20サイクル、PCR2に15~20サイクルを(RNA量に応じて)で増幅された。ターゲットリード(図5)と同定されたTCR- $\beta$ クローン型(図6)の解析には、各サンプル量で、以下のPCRサイクル数を使用した。

10 ng: PCR1に21サイクル、PCR2に20サイクル

100 ng: PCR1に21サイクル、PCR2に15サイクル

1,000 ng: PCR1に21サイクル、PCR2に12サイクル

すべての実験で、TCR- $\alpha$ 特異的プライマーとTCR- $\beta$ 特異的プライマーの混合物を、PCR1とPCR2の両方に2:1の比(TCR- $\alpha$ :TCR- $\beta$ )で入れた。

## ライブラリー精製

増幅されたライブラリーは、Agencourt AMPure XP PCR精製キット(5 mlサイズ: Beckman Coulter社商品番号A63880; 60mlサイズ: Beckman Coulter社商品番号A63881)を用いて精製された。Fragment Analyzerで検証したライブラリーは1回のダブルサイズセレクションを行い、Bioanalyzerで検証したライブラリーは2回のダブルサイズセレクションを行った。ビーズは、Magnetic Separator PCR Strip(製品コード635011)を用いて沈殿させた。



## ライブラリー検証

ライブラリーの検証は、Advanced Analytical Fragment AnalyzerとHigh Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (Advanced Analytical社カタログ番号DNF-474)、またはAgilent 2100 BioanalyzerとDNA 1000 Kit (Agilent社カタログ番号5067-1504)を用いた。Fragment Analyzerを用いた検証では、精製ライブラリーを1:5に希釈し、1  $\mu$ lの希釈ライブラリーを分析しました。Bioanalyzerを用いた検証では、精製ライブラリーを希釈することなく、1  $\mu$ lを分析した。

## イルミナシーケンス

ライブラリーは、終濃度4 nMで保存した。ライブラリーは、10% PhiX Control v3 (Illumina社カタログ番号FC1103001)のスパイクインを含め、終濃度13.5pMに希釈した。ライブラリーは、Illumina MiSeq<sup>®</sup>シーケンサーで、600サイクルMiSeq Reagent Kit v3 (Illumina社カタログ番号MS1023003)を用いて、ペアエンドの2 × 300塩基対のリードで配列を決定した。

## データ解析

クローン型のサンプル間比較 (図4) は、Distributed Bio社 : <http://www.distributedbio.com/abgenesis.html> 提供のAbGenesis計算免疫学プラットフォームを用いて、シーケンスデータを解析した。他の解析には、シーケンスデータを約260,000リード (図5、図6) または約275,000リード (図7) のいずれかにダウンサンプリングし、イルミナの次世代シーケンス用クラウドコンピューティング環境であるBasespace : <https://basespace.illumina.com/home/prep> 上のMiXCRソフトウェアパッケージ (Bolotin et al., 2015) を用いて解析した。統計解析は、Excel (Microsoft社) を用いて行った。

## 参考文献:

Bolotin, D. A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I. Z., Putintseva, E. V., & Chudakov, D. M. (2015) MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* **12**(5):380–381.

Britanova, O.V., Putintseva, E.V., Shugay, M., Merzlyak, E.M., Turchaninova, M.A., Staroverov, D.B., Bolotin, D.A., Lukyanov, S., Bogdanova, E.A., Mamedov, I.Z. & Lebedev, Y.B. (2014) Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J. Immunol.* **192**(6):2689–2698.

Calis, J.J.A. & Rosenberg, B.R. (2014) Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol.* **35**(12):581–590.

Klarenbeek, P.L., De Hair, M.J.H., Doorenspleet, M.E., van Schaik, B.D.C., Esveldt, R.E.E., van de Sande, M.G.H., Cantaert, T., Gerlag, D.M., Baeten, D., van Kampen, A.H.C. & Baas, F. (2012) Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann. Rheum. Dis.* **71**(6):1088–1093.

Laydon, D.J., Bangham, C.R. & Asquith, B. (2015) Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **370**(1675):20140291.

Murphy, K. (2012) Janeway's Immunobiology. 8th Edition. (Garland Science, NY).

Robins, H.S., Srivastava, S.K., Campregher, P.V., Turtle, C.J., Andriesen, J., Riddell, S.R., Carlson, C.S. & Warren, E.H. (2010) Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci. Transl. Med.* **2**(47):47ra64.



Sherwood, A.M., Emerson, R.O., Scherer, D., Habermann, N., Buck, K., Staffa, J., Desmarais, C., Halama, N., Jaeger, D., Schirmacher, P. & Herpel, E. (2013) Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**(9):1453–1461.

Six, A., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Chaara, W., Magadan, S., Pham, H.P., Lefranc, M.P., Mora, T., Thomas-Vaslin, V., Walczak, A.M. & Boudinot, P. (2013) The past, present, and future of immune repertoire biology—the rise of next-generation repertoire analysis. *Front. Immunol.* **4**(413):1–16.

Van Heijst, J.W., Ceberio, I., Lipuma, L.B., Samilo, D.W., Wasilewski, G.D., Gonzales, A.M.R., Nieves, J.L., van den Brink, M.R., Perales, M.A. & Pamer, E.G. (2013) Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat. Med.* **19**(3):372–377.

Wang, C., Sanders, C.M., Yang, Q., Schroeder, H.W., Wang, E., Babrzadeh, F., Gharizadeh, B., Myers, R.M., Hudson, J.R., Davis, R.W. & Han, J. (2010) High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(4):1518–1523.

Woodsworth, D.J. Castellarin, M. & Holt, R.A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* **5**(10):98.

## Webページを見る >>

[http://www.clontech.com/US/Products/cDNA\\_Synthesis\\_and\\_Library\\_Construction/NGS\\_Learning\\_Resources/Technical\\_Notes/Human\\_TCR\\_Profiling](http://www.clontech.com/US/Products/cDNA_Synthesis_and_Library_Construction/NGS_Learning_Resources/Technical_Notes/Human_TCR_Profiling)

製品名	容量	製品コード	価格 (税別)
SMARTer® Human TCR a/b Profiling Kit	12回	635014	¥180,000
	48回	635015	¥580,000
	96回	635016	¥920,000