

T-Select MHC Tetramer

# HLA-A\*24:02 modified WT1 Tetramer -CYTWNQMNL (50 tests)

使用は研究用に限り、診断目的には使用しないでください。  
本製品のエピトープ配列は特許第 3728439 号の実施許諾を受けています。

## 背景

T 細胞は、T 細胞受容体 (TCR) を介して、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞やがん細胞に発現する MHC 分子と抗原ペプチドの複合体 (MHC/peptide complex) に結合することにより、自己・非自己を識別し、状況に応じて活性化してさまざまな免疫応答を惹起します。MHC class I 分子に提示された抗原ペプチドを認識する CD8 陽性 T 細胞は、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) と呼ばれ、ウイルス感染細胞やがん細胞の殺傷に重要な役割を担っています。一方 MHC class II 分子に提示された抗原ペプチドを認識する CD4 陽性 T 細胞は、ヘルパー T 細胞と呼ばれ、さまざまなサイトカインを産生して細胞性免疫を調節するだけでなく、液性免疫も賦活化します。

従来、抗原特異的 T 細胞を検出・定量することは非常に困難でしたが、1996 年 Altman らによって開発された MHC-Tetramer 試薬は、抗原特異的な TCR を有する T 細胞集団をフローサイトメーターによって簡単に可視化し定量することを可能にしました。MHC-Tetramer 試薬は、ビオチン化した MHC 分子と抗原ペプチドの複合体 (モノマー) を、蛍光標識したストレプトアビジンで 4 量体化 (テトラマー) した試薬です。さまざまな分化マーカーや、機能アッセイと組み合わせることで、特異的 T 細胞の分化状態や、機能を同時に解析することが可能です。

HLA-A\*24:02 WT1 のエピトープ配列 (CMTWNQMNL) は、HLA との結合力が非常に弱いことが知られています。2002 年、大阪大学の坪井らは、HLA 分子と結合するアンカーペプチドである 2 番目のアミノ酸を Y に変えることで、HLA 分子とエピトープペプチドの結合力を高め、WT1 特異的な抗腫瘍免疫応答をより強く誘導できる modified WT1 ペプチド (CYTWNQMNL) をデザインすることに成功しました<sup>3)</sup>。

Wilms 腫瘍因子 WT1 は、成長因子などの転写を制御する転写因子です。WT1 遺伝子は、白血病や種々の固形癌で高発現しており、その発症、進行に関与することが知られています。WT1 特異的 CTL は、WT1 発現量の高い癌細胞を傷害し、正常細胞は傷害しないことが示されており、既に WT1 を用いた臨床試験が開始されています。WT1 は免疫療法のターゲット分子として注目されている癌抗原のひとつです。

MHC-Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、ネガティブコントロール Tetramer 試薬を対照に用いる事をお勧めします。製品情報に関しましては、関連製品欄をご覧ください。

**HLA 拘束性:** HLA-A\*24:02

## 抗原ペプチドの由来と配列

modified WT1 (235-243 aa, CYTWNQMNL)

**性状:** 容量 500  $\mu$ L, 10  $\mu$ L/test

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.09% Na<sub>3</sub>N, 0.2% BSA にテトラマー試薬としてモノマーが 100  $\mu$ g/mL の濃度で含まれています。

\*当試薬に含まれるアジ化ナトリウムは、酸性条件下でアジ化水素酸という強力な毒性化合物を産生します。また金属配管に堆積されますと爆発性のアジ化合物が産生されることがありますので流水でよく洗い流して廃棄してください。皮膚や目に入った場合には十分の水で洗い流してください。

**保存法:** 2-8°C で遮光保存してください。凍結は絶対しないでください。製品有効期限は、チューブに貼られているラベルをご確認ください。

## 標識物

TS-M014-1: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)

励起波長: 486-580 nm

蛍光波長: 586-590 nm

TS-M014-2: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)

励起波長: 633-635 nm

蛍光波長: 660-680 nm

**試薬の劣化について:** 試薬に沈殿物などの物理的な変化が観察された場合 [通常は透明でわずかにピンク色 (SA-PE) または青紫色 (SA-APC) の液体] は、劣化している可能性がありますので使わないでください。

## WT1 の参考文献

- 1) Ohminami H, *et al. Blood* **95**: 286-293 (2000)
- 2) Oka Y, *et al. J Immunol* **164**: 1873-1880 (2000)
- 3) Tsuboi A, *et al. Cancer Immunol Immun* **51**: 614-620 (2002)
- 4) Oka Y, *et al. J Immunol* **164**: 1873-1880 (2000)
- 5) Oka Y, *et al. Int J Hematol* **78**: 56-61 (2003)
- 6) Azuma T, *et al. Clin Cancer Res* **10**: 7402-7412 (2004)
- 7) Oka Y, *et al. Curr Med Chem* **13**: 2345-2352 (2006)
- 8) Tsuboi A, *et al. Int J Hematol* **86**: 414-417 (2007)
- 9) Chiba Y, *et al. Jpn J Clin Oncol* **40**: 395-403 (2010)
- 10) Narita M, *et al. Int J Med Sci* **7**: 72-81 (2010)
- 11) Saitoh A, *et al. Med Oncol* **28**: 219-230 (2011)
- 12) Tamanaka T, *et al. Anticancer Res* **32**: 5201-5209 (2012)
- 13) Watanabe K, *et al. Biomedical Res* **34**: 41-50 (2013)
- 14) Kobayashi M, *et al. J Ovarian Res* **7**: 48 (2014)
- 15) Koido S, *et al. Clin Cancer Res* **20**: 4228-4239 (2014)

## T-Select human HLA class I Tetramer の特徴

T-Select human HLA class I Tetramer は特定の HLA allele と抗原ペプチドとの複合体に特異的に結合するヒト CD8 陽性 T 細胞集団を検出できます。CD8 分子は HLA class I 分子に結合し、TCR と HLA class I/抗原ペプチド複合体との結合をサポートしています。この CD8 分子による HLA 分子への結合が、非特異的な CTL 検出の原因でした。本試薬では HLA class I 分子の $\alpha 3$  領域のアミノ酸配列に変異を入れることにより CD8 分子との非特異的結合を最小限に抑えたことで、特異性が飛躍的に向上しています。French Application Number; FR9911133

## Tetramer 試薬の参考文献

- Altman JD, *et al. Science* **274**: 94-96 (1996)  
Mcmichael AJ, *et al. J Exp Med* **187**: 1367-1371 (1998)  
Bodinier M, *et al. Nat Med* **6**: 707-710 (2000)  
村上昭弘, 鈴木進 臨床免疫 **42**: 134-138 (2004)

## 染色方法

### 1) 全血を用いる場合

1. 適切な抗凝固剤を使用して、静脈血を採取します。
2. 10  $\mu$ L の T-Select MHC Tetramer を各試験管に加えます。
3. 各試験管に 200  $\mu$ L の全血を添加します。
4. ゆっくりとボルテックスをかけます。
5. 2-8°C または室温 (15-25°C) で 30~60 分間インキュベーションします。
6. OptiLyse C (Beckman Coulter 社製分析機器用)、もしくは OptiLyse B (Becton Dickenson 社製分析機器用) を用いて溶血・固定処理します。各々の説明書にて推奨の手順に従ってください。
7. 溶血・固定プロトコルの最終ステップ後、適量の PBS を加えて再懸濁します。
8. 400  $\times$  g で 5 分間遠心します。

9. 上澄みをアスピレートします。
10. ペレットを 500  $\mu$ L の PBS に再懸濁します。
11. サンプルは暗室にて 2-8°C で保管し、24 時間以内に分析してください。

## 染色の注意点

- A. 細胞培養を行う場合は、必ずヘパリンナトリウムを抗凝固剤として選択してください。
- B. CD8 等の抗体を追加する場合は、ステップ 2. で同時染色するか、ステップ 5. 終了時に追加染色してください。抗 CD8 抗体 (クローン T8) は、Tetramer 試薬の染色性を阻害しませんので同時染色する事が可能です。
- C. 溶血処理が不十分な場合、赤血球の乱反射による非特異的染色像が観察されることがあります。CD45 を同時染色してリンパ球ゲートで解析してください。

## 2) 末梢血単核球 (PBMC) を用いる場合

1. 定法に従って PBMC を調製し、 $2 \times 10^7$  cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50  $\mu$ L ( $1 \times 10^6$  cells) の細胞懸濁液に 10  $\mu$ L の Clear Back (human FcR blocking reagent, MBL code no. MTG-001) を加え、5 分間室温にて反応させてください。
3. 10  $\mu$ L の T-Select MHC Tetramer を加えます。
4. 2-8°C または室温 (15-25°C) で 30~60 分間インキュベーションします。
5. CD8 抗体等を加え、2-8°C で 20 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer [2% FCS/0.09%  $\text{NaN}_3$ /PBS] を加え 400  $\times$  g で 5 分間遠心します。
7. 上澄みを注意深く捨てます。
8. 細胞を 500  $\mu$ L の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8°C で保管し、24 時間以内に分析してください。

## 染色の注意点

- D. PBMC を分離後、赤血球が残っている場合は、溶血処理を行ってください。溶血処理後も赤血球の混入が認められる場合は CD45 を同時染色し、リンパ球ゲートにて解析してください。
- E. Blocking buffer あるいは Clear Back を用いることで、マクロファージなどのエンドサイトーシスによる非特異的染色を抑制する効果が期待されます。
- F. CD8 抗体はクローンによっては Tetramer 試薬と TCR の結合を阻害することが報告されています。クローン T8 に阻害作用はありません。
- G. 培養したリンパ球を染色する場合は、7-AAD を用いて死細胞を染色し、解析ゲート内から除去してください。
- H. 染色後、数時間以内に解析する予定でしたら、パラフォルムアルデヒドによる固定処理は必要ありません。

## 一般的な注意事項

1. 検体、サンプル、およびそれらと接触する全ての材料は感染の可能性を持つものとして、取り扱いには十分注意してください。
2. 保管もしくは反応中、試薬に光をあてないようご注意ください。
3. 全血にて最適な結果を得るため、検体は採血管にて室温で保存し、染色操作直前にも倒立攪拌してください。冷蔵検体では異常な結果が出ることがありますので使用しないでください。
4. 静脈血液検体の推奨細胞生存率は $\geq 90\%$ です。
5. 細胞を溶血試薬と長時間反応させないでください。白血球の破壊や目的細胞損失の原因となります。
6. 有核赤血球、異常タンパク濃度を有する検体、もしくは異常血色素症では、必ずしも全ての赤血球が溶血されないことがあります。こうした場合、溶血されない赤血球が白血球としてカウントされることで、陽性率の低下をもたらすことがあります。

## 関連製品

### WT1 Tetramers and Peptide

TS-M140-1	HLA-A*02:01 WT1 <sub>37-45</sub> Tetramer-VLDFAPPGA-PE
TS-M140-2	HLA-A*02:01 WT1 <sub>37-45</sub> Tetramer-VLDFAPPGA-APC
TS-M140-P	HLA-A*02:01 WT1 <sub>37-45</sub> peptide
TS-M016-1	HLA-A*02:01 WT1 <sub>126-134</sub> Tetramer-RMFPNAPYL-PE
TS-M016-2	HLA-A*02:01 WT1 <sub>126-134</sub> Tetramer-RMFPNAPYL-APC
TS-M014-1	HLA-A*24:02 modified WT1 Tetramer-CYTWNQMNL-PE
TS-M014-2	HLA-A*24:02 modified WT1 Tetramer-CYTWNQMNL-APC
TS-M504-1	H-2D <sup>b</sup> WT1 <sub>126-134</sub> Tetramer-RMFPNAPYL-PE
TS-M504-2	H-2D <sup>b</sup> WT1 <sub>126-134</sub> Tetramer-RMFPNAPYL-APC

### Human Tetramers

#### Cancer

TS-M141-1	HLA-A*24:02 ACC-1 Tetramer-DYLQYVLQI-PE
TS-M137-1	HLA-A*01:01 AIM-2 Tetramer-RSDSGQQARY-PE
TS-M112-1	HLA-A*24:02 CA9 <sub>219-227</sub> Tetramer-EYRALQLHL-PE
TS-M103-1	HLA-A*02:01 CEA Tetramer-YLSGANLNL-PE
TS-M080-1	HLA-A*02:01 CEA (N6D) Tetramer-YLSGADLNL-PE
TS-M101-1	HLA-A*02:01 CD33 Tetramer-AIISGDSPV-PE
TS-M102-1	HLA-A*02:01 CD33 A65Y Tetramer-YIISGDSPV-PE
TS-M084-1	HLA-A*02:01 EphA2 Tetramer-TLADFDPRV-PE
TS-0014-1C	HLA-A*02:01 gp100 (wild) Tetramer-ITDQVPFVS-PE
TS-0013-1C	HLA-A*02:01 gp100 (mutant) Tetramer-IMDQVPFVS-PE
TS-0035-1C	HLA-A*02:01 gp100 <sub>154-162</sub> Tetramer-KTWGQYWQV-PE
TS-M082-1	HLA-A*02:01 gp100 Tetramer-YLEPGPVTA-PE
TS-M089-1	HLA-A*24:02 gp100-intron 4 Tetramer-VYFFLPDHL-PE
TS-0016-1	HLA-A*02:01 Her-2/neu Tetramer-RLLQETELV-PE
TS-0015-1C	HLA-A*02:01 Her-2/neu E75 Tetramer-KIFGSLAFL-PE
TS-M083-1	HLA-A*02:01 HM1.24 Tetramer-KLQDASAEV-PE
TS-M010-1	HLA-A*24:02 hTERT Tetramer-VYGFVRACL-PE
TS-M115-1	HLA-A*02:01 hTERT Tetramer-ILAKFLHWL-PE
TS-M086-1	HLA-A*02:01 IDO Tetramer-ALLEIASCL-PE
TS-M070-1	HLA-A*02:01 MAGE-A1 Tetramer-KVLEYVIKIV-PE
TS-M071-1	HLA-B*07:02 MAGE-A1 Tetramer-RVRFPPSL-PE
TS-M072-1	HLA-A*02:01 MAGE-A2 Tetramer-YLQLVFGIEV-PE
TS-M073-1	HLA-A*24:02 MAGE-A2 Tetramer-EYLQLVFGI-PE
TS-M075-1	HLA-A*02:01 MAGE-A3 <sub>112-120</sub> Tetramer-KVAELVHFL-PE
TS-M076-1	HLA-A*02:01 MAGE-A3 <sub>271-279</sub> Tetramer-FLWGPRLV-PE
TS-M077-1	HLA-A*24:02 MAGE-A3 Tetramer-IMPKAGLLI-PE
TS-M078-1	HLA-A*02:01 MAGE-A10 Tetramer-GLYDGMEHL-PE
TS-M138-1	HLA-A*02:01 MAGE-C1 Tetramer-ILFGISLREV-PE
TS-0009-1C	HLA-A*02:01 Mart-1 Tetramer-ELAGIGILTV-PE
TS-M091-1	HLA-A*24:02 MCPyV large TAg Tetramer-EWWRSRGGFSF-PE

TS-M088-1	HLA-A*02:01 MUC1 Tetramer-LLLLTVLTV-PE
TS-M011-1	HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-PE
TS-M105-1	HLA-A*02:01 NY-ESO-1 C9V Tetramer-SLLMWITQV-PE
TS-M109-1	HLA-B*07:02 P2X5 Tetramer-TPNQRQNV-PE
TS-M081-1	HLA-A*02:01 p53 Tetramer-LLGRNSFEV-PE
TS-M107-1	HLA-A*02:01 PAP <sub>299-307</sub> Tetramer-ALDVYNGLL-PE
TS-M136-1	HLA-A*24:02 PBF A24.2 Tetramer-AYRPVSRNI-PE
TS-M117-1	HLA-A*02:01 PRAME <sub>100-106</sub> Tetramer-VLDGLDVL-PE
TS-M119-1	HLA-A*02:01 PRAME <sub>142-151</sub> Tetramer-SLYSFPEPE-PE
TS-M116-1	HLA-A*02:01 PRAME <sub>300-309</sub> Tetramer-ALYVDSLFFL-PE
TS-M118-1	HLA-A*02:01 PRAME <sub>425-433</sub> Tetramer-SLLQHHLI-PE
TS-M120-1	HLA-A*02:01 PSA <sub>141-150</sub> Tetramer-FLTPKKLQCV-PE
TS-0017-1	HLA-A*02:01 PR-1 Tetramer-VLQELNVTV-PE
TS-M087-1	HLA-A*02:01 PSA Tetramer-KLQCVDLHV-PE
TS-M104-1	HLA-A*02:01 RHAMM Tetramer-ILSLELMKL-PE
TS-M095-1	HLA-A*02:01 PP2A Tetramer-SLLPAIVEL-PE
TS-M079-1	HLA-A*02:01 SSSX-2 Tetramer-KASEKIFYV-PE
TS-M025-1	HLA-A*24:02 survivin-2B Tetramer-AYACNTSTL-PE
TS-M085-1	HLA-A*02:01 Survivin (T2M) Tetramer-LMLGEFLKL-PE
TS-0019-1C	HLA-A*02:01 Tyrosinase Tetramer-YMDGTMSQV-PE
TS-M090-1	HLA-A*24:02 Tyrosinase Tetramer-AFLPWHRFL-PE

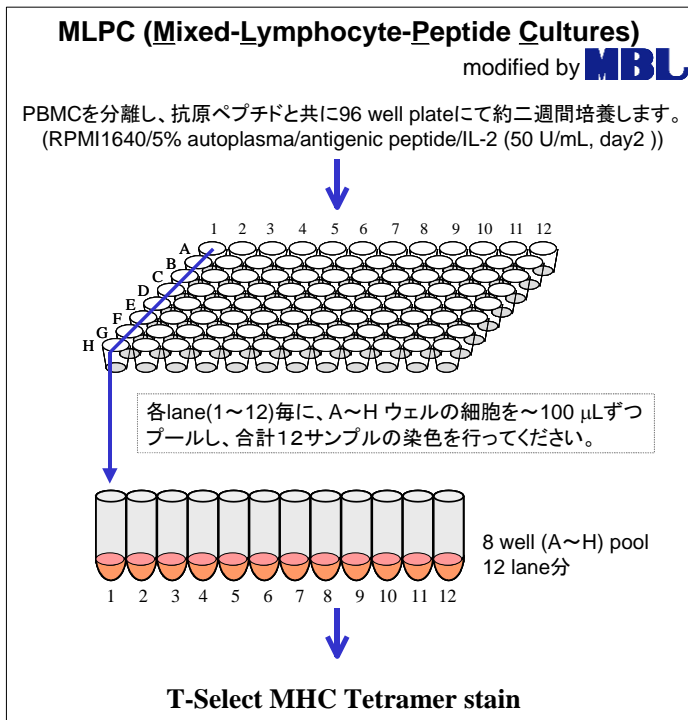
### Control

TS-M007-1	HLA-A*24:02 Negative Tetramer-RYL RDQQL-PE
TS-M007-2	HLA-A*24:02 Negative Tetramer-RYL RDQQL-APC
TS-M007-3	HLA-A*24:02 Negative Tetramer-RYL RDQQL-FITC
TS-0029-1C	HLA-A*02:01 Negative Tetramer-PE
TS-0029-2C	HLA-A*02:01 Negative Tetramer-APC

### Others

4844	IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit
8223	IMMUNOCYTO IFN- $\gamma$ ELISPOT Kit
AM-1005	IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit
6603861	CD8-FITC (T8)
6607011	CD8-PC5 (T8)
A07704	7-AAD Viability Dye
IM-1400	OptiLyse B
A11895	OptiLyse C
MTG-001	Clear Back (Human FcR blocking reagent)

MHC Tetramer 試薬、誘導用ペプチド等の製品ラインナップ、MHC Tetramer 試薬のカスタム作製に関しましては、弊社ホームページ (<http://ruo.mbl.co.jp>) より最新情報をご確認ください。



**染色例**

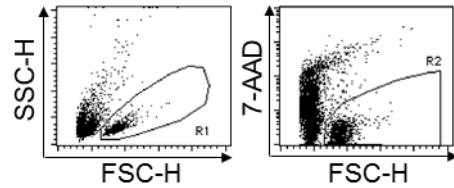
HLA-A\*24:02 拘束性の modified WT1 peptide (CYTWNQMNL)を用いて、健康人末梢血からCTLを誘導し、2週間後に Tetramer 試薬を用いて染色した。特異的CTLの誘導法は、PBMCと抗原ペプチドを混合して培養するMLPC法を用いた(上図)。MBLの社内検討では、採血直後の測定において Tetramer 陽性細胞の有無が判定不可能な検体でも、10~16日間の培養を上記方法にて実施することで、HLA-A\*24:02 陽性健康人(n=3)から modified WT1 peptide 特異的なCTLを誘導することができた。

**染色方法**

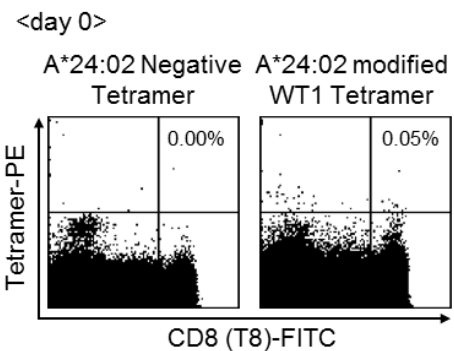
1. MLPC 法(MBL 改変)にて培養したリンパ球( $0.5 \times 10^6$  cells)を適量の FCM buffer [2% FCS/0.05%  $\text{Na}_3\text{P}_10\text{S}_6$ /PBS]にて1回洗ったものを3本用意した。
2. 10 μL の Clear Back (Human FcR blocking reagent, MBL code no. MTG-001) と 20 μL の FCM buffer を加え、室温にて5分間反応させた。
3. 以下の各テトラマー試薬をそれぞれ 10 μL ずつ加え、4°Cで30分間反応させた。
  - HLA-A\*24:02 natural WT1 Tetramer-CMTWNQMNL-PE
  - HLA-A\*24:02 modified WT1 Tetramer-CYTWNQMNL-PE
  - HLA-A\*24:02 Negative Tetramer-RYLRDQQLL-PE (MBL code no. TS-M007-1)
4. 10 μL の CD8-FITC (T8)をそれぞれ加え、4°Cで20分間反応させた。
5. 適量の FCM buffer を加え 400 x g で5分間遠心した。
6. 上澄みを注意深く捨て、400 μL の FCM buffer を加えて細胞を懸濁した。
7. 5 μL の 7-AAD(死細胞検出薬)をそれぞれ加え、軽く攪拌後、FCMにて解析した。

**結果**

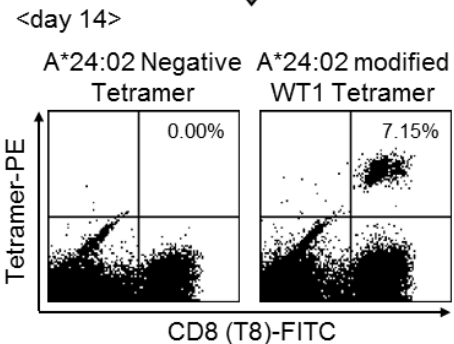
FSC/SSC展開にてリンパ球領域をR1とし、7-AAD 陰性細胞領域をR2とした。このR1かつR2領域にて解析を行った。ドットプロット展開図右上の数字は、CD8 陽性細胞中の MHC Tetramer 陽性細胞の割合を示す。



**染色例 1:** MLPC 法にて誘導培養した細胞集団の染色像 MLPC 法により、健康人末梢血から 1~2 wells/96 wells の頻度で HLA-A\*24:02 WT1 (mutant) 特異的 CTL を誘導できた。



↓ MLPC



**染色例 2:** modified と natural WT1 Tetramer 試薬の染色性比較 HLA-A\*24:02 拘束性 modified WT1 peptide (CYTWNQMNL) 特異的 CTL は、HLA-A\*24:02 natural WT1 Tetramer でも検出できた。

