

T-Select MHC Tetramer

HLA-A*24:02 survivin-2B Tetramer -AYACNTSTL (50 tests)

使用は研究用に限りです。診断目的には使用しないでください。
当試薬は米国 Beckman Coulter 社のライセンスのもとに製造販売しています。
エピトープ配列は北海道公立大学法人 札幌医科大学よりライセンスを受けています(特許第 4780540 号)。

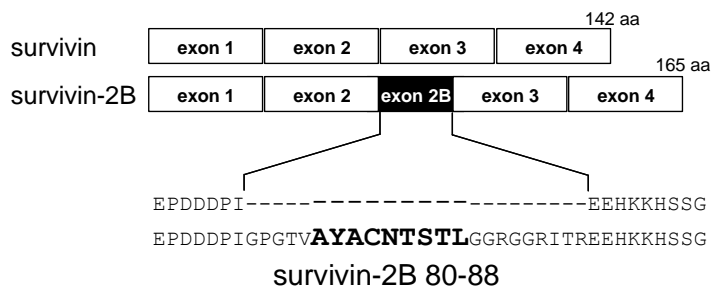
背景

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。

本試薬は、MHC に HLA-A*24:02 を、抗原ペプチドに癌抗原サバイビン 2B 由来のペプチドを用いて合成しており、これに特異的な CTL 集団を検出定量することが可能です。

サバイビン(survivin)は、アポトーシスを抑制する IAP (inhibitor of apoptosis)ファミリーに属する分子で、正常細胞では非常に低いレベルで発現が認められています。survivin のスプライスバリエーションのひとつである survivin-2B は、胸腺以外の正常組織では発現が認められませんが、さまざまながん細胞で高発現していることが報告されています。札幌医科大学 佐藤らが同定した survivin-2B 80-88 エピトープは正常組織で発現している survivin には存在しない配列であることから、癌免疫療法における理想的な標的と考えられています。既に国内では札幌医科大学を中心にこのエピトープを用いた臨床試験が進められています。



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

survivin-2B (80-88 aa, AYACNTSTL)

標識物

TS-M025-1: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)

励起波長: 486-580 nm

蛍光波長: 586-590 nm

TS-M025-2: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)

励起波長: 633-635 nm

蛍光波長: 660-680 nm

性状: 容量 500 μ L, 10 μ L/test

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.09% NaN₃, 0.2% BSA にテトラマー試薬としてモノマーが 100 μ 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量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。凍結は絶対に行わないでください。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。

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。

survivin-2B₈₀₋₈₈の参考文献

- 1) Hirohashi Y, et al. *Clin Cancer Res* **8**: 1731-1739 (2002)
- 2) Tsuruma T, et al. *J Transl Med* **2**: 19-29 (2004)
- 3) Idenoue S, et al. *Clin Cancer Res* **11**: 1474-1482 (2005)
- 4) Kurotaki T, et al. *J Immunol* **179**: 1803-1813 (2007)
- 5) Tsuruma T, et al. *J Transl Med* **6**: 24-34 (2008)
- 6) Kutomi G, et al. *J Immunol* **183**: 5861-5869 (2009)
- 7) Miyazaki A, et al. *Cancer Sci* **102**: 324-329 (2011)
- 8) Kameshima H, et al. *Cancer Sci* **104**: 124-129 (2013)

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

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 μ L の T-Select MHC Tetramer を各試験管に加えます。
3. 各試験管に 200 μ 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 (BD Biosciences 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・固定プロトコー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 x 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 μ 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、 2×10^7 cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50 μ L (1×10^6 cells)の細胞懸濁液に 10 μ 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 μ 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% NaN_3 /PBS]を加え 400 x 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 μ 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. 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にご注意ください。
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。

Tetramer 試薬の参考文献

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

関連製品

T-Select Human Tetramers

Cancer

- TS-M014-1 HLA-A*24:02 WT1 (mutant) Tetramer-CYTWNGMNL-PE
TS-M014-2 HLA-A*24:02 WT1 (mutant) Tetramer-CYTWNGMNL-APC
TS-M016-1 HLA-A*02:01 WT1 Tetramer-RMFPNAPYL-PE
TS-M016-2 HLA-A*02:01 WT1 Tetramer-RMFPNAPYL-APC
TS-M010-1 HLA-A*24:02 hTERT Tetramer-VYGFVRACL-PE
TS-M115-1 HLA-A*02:01 hTERT Tetramer-ILAKFLHWL-PE
TS-M115-2 HLA-A*02:01 hTERT Tetramer-ILAKFLHWL-APC
TS-M011-1 HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-PE
TS-M011-2 HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC
TS-M105-1 HLA-A*02:01 NY-ESO-1 C9V Tetramer-SLLMWITQV-PE
TS-M105-2 HLA-A*02:01 NY-ESO-1 C9V Tetramer-SLLMWITQV-APC
TS-M025-1 HLA-A*24:02 survivin-2B Tetramer-AYACNTSTL-PE
TS-M025-2 HLA-A*24:02 survivin-2B Tetramer-AYACNTSTL-APC
TS-0009-1C HLA-A*02:01 Mart-1 Tetramer-ELAGIGILTV-PE
TS-0009-2C HLA-A*02:01 Mart-1 Tetramer-ELAGIGILTV-APC
TS-0013-1C HLA-A*02:01 gp100 Tetramer-IMDQVPFSV-PE
TS-0013-2C HLA-A*02:01 gp100 Tetramer-IMDQVPFSV-APC
TS-0014-1C HLA-A*02:01 gp100 Tetramer-ITDQVPFSV-PE
TS-0014-2C HLA-A*02:01 gp100 Tetramer-ITDQVPFSV-APC
TS-0015-1C HLA-A*02:01 Her-2/neu Tetramer-KIFGSLAFL-PE
TS-0015-2C HLA-A*02:01 Her-2/neu Tetramer-KIFGSLAFL-APC
TS-0016-1 HLA-A*02:01 Her-2/neu Tetramer-RLLQETELV-PE
TS-0016-2 HLA-A*02:01 Her-2/neu Tetramer-RLLQETELV-APC
TS-0017-1 HLA-A*02:01 PR-1 Tetramer-VLQELNVTV-PE
TS-0017-2 HLA-A*02:01 PR-1 Tetramer-VLQELNVTV-APC
TS-0019-1C HLA-A*02:01 Tyrosinase Tetramer-YMDGTMQV-PE
TS-0019-2C HLA-A*02:01 Tyrosinase Tetramer-YMDGTMQV-APC
TS-M112-1 HLA-A*24:02 CA9 Tetramer-EYRALQLHL-PE
TS-M112-2 HLA-A*24:02 CA9 Tetramer-EYRALQLHL-APC
TS-M114-1 HLA-A*01:01 MAGe-A1 Tetramer-EADPTGHSY-PE
TS-M114-2 HLA-A*01:01 MAGe-A1 Tetramer-EADPTGHSY-APC
TS-M101-1 HLA-A*02:01 CD33 Tetramer-AIISGDSPV-PE

- TS-M101-2 HLA-A*02:01 CD33 Tetramer-AIISGDSPV-APC
TS-M102-1 HLA-A*02:01 CD33 A65Y Tetramer-YIISGDSPV-PE
TS-M102-2 HLA-A*02:01 CD33 A65Y Tetramer-YIISGDSPV-APC
TS-M103-1 HLA-A*02:01 CEA Tetramer-YLSGANLNL-PE
TS-M103-2 HLA-A*02:01 CEA Tetramer-YLSGANLNL-APC
TS-M104-1 HLA-A*02:01 RHAMM Tetramer-ILSLELMKL-PE
TS-M104-2 HLA-A*02:01 RHAMM Tetramer-ILSLELMKL-APC
TS-M116-1 HLA-A*02:01 PRAME₃₀₀₋₃₀₉ Tetramer-ALYVDSLFFL-PE
TS-M116-2 HLA-A*02:01 PRAME₃₀₀₋₃₀₉ Tetramer-ALYVDSLFFL-APC
TS-M117-1 HLA-A*02:01 PRAME₁₀₀₋₁₀₈ Tetramer-VLDGLDVLL-PE
TS-M117-2 HLA-A*02:01 PRAME₁₀₀₋₁₀₈ Tetramer-VLDGLDVLL-APC
TS-M118-1 HLA-A*02:01 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ Tetramer-SLLQHLIGL-PE
TS-M118-2 HLA-A*02:01 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ Tetramer-SLLQHLIGL-APC
TS-M119-1 HLA-A*02:01 PRAME₁₄₂₋₁₅₁ Tetramer-SLYSFPEPEA-PE
TS-M119-2 HLA-A*02:01 PRAME₁₄₂₋₁₅₁ Tetramer-SLYSFPEPEA-APC
TS-M120-1 HLA-A*02:01 PSA₁₄₁₋₁₅₀ Tetramer-FLTPKKLQCV-PE
TS-M120-2 HLA-A*02:01 PSA₁₄₁₋₁₅₀ Tetramer-FLTPKKLQCV-APC
TS-M136-1 HLA-A*24:02 PBF A24.2 Tetramer-AYRPVSRNI-PE
TS-M136-2 HLA-A*24:02 PBF A24.2 Tetramer-AYRPVSRNI-APC

Control

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

T-Select Peptides

- TS-M027-P HLA-A*02:01 HIV gag peptide
TS-M007-P HLA-A*24:02 HIV env gp160 peptide
TS-M011-P HLA-A*02:01 NY-ESO-1 peptide
TS-M025-P HLA-A*24:02 survivin-2B peptide
TS-0009-P HLA-A*02:01 Mart-1 peptide
TS-M136-P HLA-A*24:02 PBF A24.2 peptide

Others

- 4844 IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit
8223 IMMUNOCYTO IFN- γ ELISPOT Kit
AM-1005 IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit
6603861 CD8-FITC (T8)
6607011 CD8-PC5 (T8)
A07704 7-AAD Viability Dye (死細胞検出試薬)
IM-1400 OptiLyse B
A11895 OptiLyse C
MTG-001 Clear Back (Human FcR blocking reagent)

T-Select MHC Tetramer 試薬、誘導用ペプチド等の製品ラインナップ、MHC Tetramer 試薬のカスタム合成に関しては、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。

ここにお示しする全てのデータは、北海道公立大学法人
 札幌医科大学 病理学第一講座 鳥越俊彦先生と佐藤
 昇志先生から御提供頂きました。

染色例

HLA-A*24:02 拘束性 survivin-2B 由来の抗原ペプチド
 (AYACNTSTL, MBL code no. TS-M025-P)を用いて末梢血から CTL を誘導した。7~9 日後に Tetramer 試薬を用いて染色した。12 日後にソーティング後、限界希釈法にて樹立したクローンの染色を示す(day 26、染色例 1)。

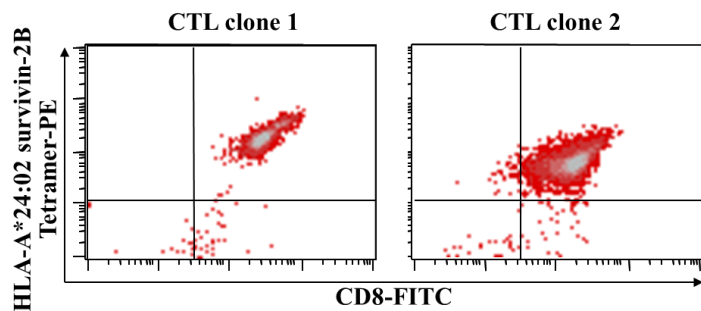
染色方法 2カラー解析 (染色例 2)

1. 抗原ペプチドにて刺激培養したリンパ球を適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% Na₃/PBS]にて 1 回洗ったものを 2 本用意した。
2. 以下の各テトラマー試薬をそれぞれ 10 μL ずつ加え、室温で 30 分間遮光反応させた。
 - ・ HLA-A*24:02 survivin-2B Tetramer-PE
 - ・ HLA-A*24:02 Negative Tetramer-PE (MBL code no. TS-M007-1)
3. 適量の PBS にて 1 回洗浄後、10 μL の FITC 標識抗 CD8 抗体をそれぞれ加え、室温で 15 分間遮光反応させた。
4. 適量の PBS で 2 回洗浄後、FCM buffer を加えて細胞を懸濁し FCM にて解析した。

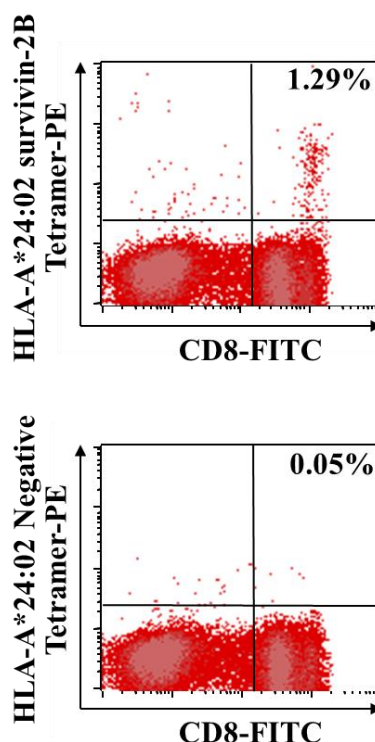
染色方法 3カラー解析 (染色例 3)

1. 抗原ペプチドにて刺激培養したリンパ球を適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% Na₃/PBS]にて 1 回洗ったものを 1 本用意した。
2. 以下の 2 種類の試薬を混合後添加し、室温で 30 分間遮光反応させた。
 - ・ HLA-A*24:02 survivin-2B Tetramer-PE 10 μL
 - ・ HLA-A*24:02 Negative Tetramer-FITC 10 μL (MBL code no. TS-M007-3)
3. 適量の PBS にて 1 回洗浄後、10 μL の PC5 標識抗 CD8 抗体を加え、室温で 15 分間遮光反応させた。
4. 適量の PBS で 2 回洗浄後、FCM buffer を加えて細胞を懸濁し FCM にて解析した。

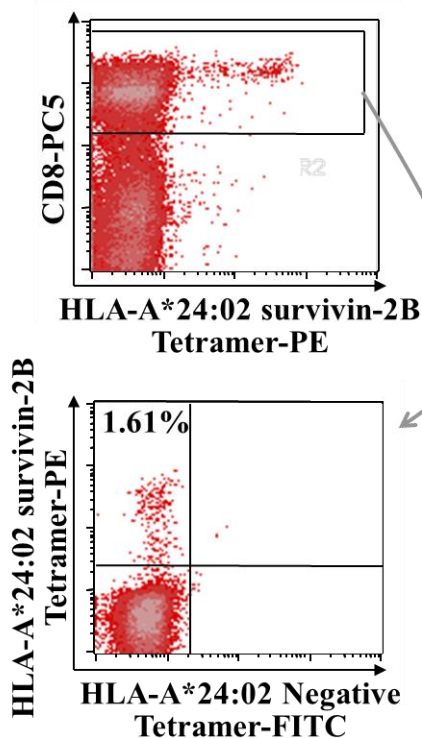
染色例 1: CTL クローンの染色像



染色例 2:2 カラー解析の結果



染色例 3:3 カラー解析の結果



T-Select MHC Tetramers use patented technology (US patent No. 5,635,363, French application No. FR9911133, and Japanese patent No. P3506384) of Beckman Coulter, Inc..
 MBL manufactures and distributes these products under license from Beckman Coulter, Inc..