

T-Select MHC class I mouse Tetramer

H-2D^b human gp100 Tetramer

-KVPRNQDWL (50 tests)

使用は研究用に限りません。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。

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 (テトラマー) 化した試薬です。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 にマウス H-2D^b を、抗原ペプチドに human gp100 由来のペプチド配列 hgp100₂₅₋₃₃ 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。

悪性黒色腫 (メラノーマ) は、外科的に切除できない場合は非常に予後が悪く、高い確率でリンパ節転移を起します。gp100 [Pmel 17/silver locus protein (SILV)] はメラノソーム蛋白のひとつで、メラノサイトの分化やメラニン形成に関与し、メラノーマをはじめ、メラニン形成細胞への分化を示す腫瘍で発現が報告されています。gp100 をはじめとする、メラノーマ関連抗原を標的とした癌免疫療法の前臨床試験には、マウス B16 メラノーマモデルが広く用いられています。

また、マウス生体内では orthologous な抗原を用いた異種免疫で免疫反応を惹起できることが知られています。human gp100 (hgp100₂₅₋₃₃, KVPRNQDWL) は、mouse gp100 (mgp100₂₅₋₃₃, EGSRNQDWL) より MHC 分子との

アフィニティが強く、DNA 免疫により B16 メラノーマ細胞を拒絶することが知られています¹⁾。gp100 ペプチドを用いた癌免疫療法の III 相臨床試験も既に試みられており、非常に研究が進んでいる腫瘍抗原のひとつです。

MHC-Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、同じ allele (本試薬の場合は H-2D^b) で、違う抗原に対する Tetramer 試薬をネガティブコントロールとして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。

hgp100₂₅₋₃₃ の参考文献:

- 1) Gold JS, *et al. J. Immunol.* **170**: 5188-5194 (2003)
- 2) Wang L-X, *et al. Cancer Res.* **65**: 10569-10577 (2005)
- 3) Cohen AD, *et al. Cancer Res.* **66**: 4904-4912 (2006)
- 4) Fujita M, *et al. J. Immunol.* **180**: 2089-2098 (2008)
- 5) Rizzuto GA, *et al. J. Exp. Med.* **206**: 849-866 (2009)

MHC 拘束性: H-2D^b

抗原ペプチドの由来と配列:

human gp100 (25-33 aa, KVPRNQDWL)

マウスの主な系統による H-2D allele:

H-2D allele	H-2D ^b	H-2D ^d	H-2D ^k
Mouse strains	C57BL/-, BXSB/Mp, 129/-, NOD	BALB/c, DBA/2	C3H/He

標識物

TS-M505-1: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)

励起波長: 486-580 nm
蛍光波長: 586-590 nm

TS-M505-2: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)

励起波長: 633-635 nm
蛍光波長: 660-680 nm

性状: 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 µg/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やすく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。

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の液体)は、劣化している可能性がありますので使用しないでください。

染色方法:

マウス脾細胞を用いる場合

目的とする抗原特異的 CTL の誘導方法や条件は、それぞれの研究目的に合った方法で行ってください。

1. 1×10^6 個の細胞を 50 μL の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3 /PBS] に懸濁します。
2. オプション A と B のいずれかでブロッキング処理をします。

(オプション A)

blocking 試薬として抗 CD16/32 抗体を適量加え、4°C で 15 分間インキュベーションします。

(オプション B)

10 μL の Clear Back (MBL code no. MTG-001) を加え、5 分間室温にて反応させます。

3. 10 μL の T-Select MHC class I mouse Tetramer-PE 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. マウス CD8 抗体等を加え、2-8°C で 30 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer 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 μL の FCM buffer に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8°C で保管し、数時間以内に分析してください。

染色の注意点:

- A. 免疫したマウスを使用する場合、免疫応答には個体差が生じる可能性があります。最低 2 個体以上での検証をお勧めします。
- B. CD8 分子は MHC 分子と結合し、MHC 分子と TCR の結合を補助します。このため MHC Tetramer 試薬にも非特異的に CD8 分子が結合する可能性があります。染色に用いる MHC Tetramer 試薬と抗 CD8 抗体の使用量に関しては、十分な条件検討を実施してください。
- C. マウス 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。マ

ウス CD8 抗体として、クローン KT15 (MBL code no. D271) を推奨しております。

- D. 染色する細胞集団に赤血球の残存が認められる場合は、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. 抗 CD16/32 抗体で処理することで FcR を介した非特異的な CD8 抗体の結合を抑制する効果が期待されません。
- F. Clear Back (MBL code no. MTG-001) を用いることで、成分中のアジ化ナトリウムにより、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。
- G. 培養したリンパ球を染色する場合は、ステップ 8 で 7-AAD を加えて死細胞を染色し、解析ゲート内から除去してください。
- H. 染色後、数時間以内に解析できない場合は、ステップ 8 で細胞を 500 μL の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁してください。

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. 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。
4. 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。

ライセンスを受けている特許:

US Patent Number 5,635,363

Inventors: Altman JD, et al. (Stanford University)

“Compositions and methods for the detection, quantitation and purification of antigen-specific T cells.”

特許第 3506384 号

抗原特異的な T 細胞の検出および精製のための MHC 抗原複合体

MHC Tetramer 試薬の参考文献:

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

関連製品:

弊社ホームページ (<https://ruo.mbl.co.jp>) より最新情報を確認してください。

染色例:

H-2D^b 拘束性 human gp100 由来の抗原ペプチド hgp100₂₅₋₃₃ (KVPRNQDWL, MBL code no. TS-M505-P) と、ヘルパー作用の報告がある抗原ペプチドを混合して免疫賦活剤とエマルジョン化し、2 個体の C57BL/6 マウスに 2 回腹腔免疫した。10 日後に脾臓を摘出し、脾細胞を調製後、一部をサンプリングして MHC Tetramer 試薬を用いて染色した (day 0)。これらの脾細胞は、hgp100₂₅₋₃₃ ペプチド (1 μg/mL) で *in vitro* にて 1 週間刺激培養し、一部をサンプリングして MHC Tetramer 試薬を用いて染色した (day 7)。

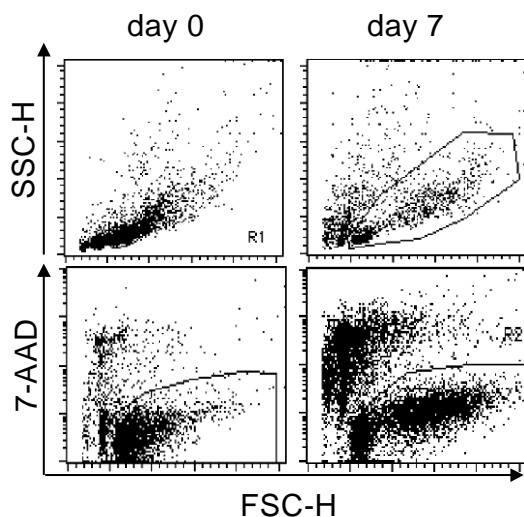
染色方法:

1. C57BL/6 マウスについて、マウス脾細胞 (1 × 10⁶ cells) あるいは *in vitro* で刺激培養した細胞集団 (1 × 10⁶ cells) を ACK lysis buffer にて溶血処理し、適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN₃/PBS] にて 1 回洗ったものをそれぞれ 2 本ずつ用意した。
2. 20 μL の Clear Back (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. 10 μL の H-2D^b human gp100 Tetramer-KVPRNQDWL-PE (MBL code no. TS-M505-1)、あるいは 10 μL の H-2D^b Influenza NP Tetramer-ASNENMDTM-PE (Negative Tetramer として使用、MBL code no. TS-M502-1) をそれぞれ加え、4°C で 20 分間反応させた。
4. 10 μL の mouse CD8-FITC (clone KT15, MBL code no. D271-4) をそれぞれ加え、ピペティングした。
5. 4°C で 20 分間反応させた。
6. 適量の FCM buffer を加え 400 × g で 5 分間遠心した。
7. 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。このとき、死細胞を染色するために、7-AAD を 5 μL 加えて染色した。
8. FCM にて解析した。

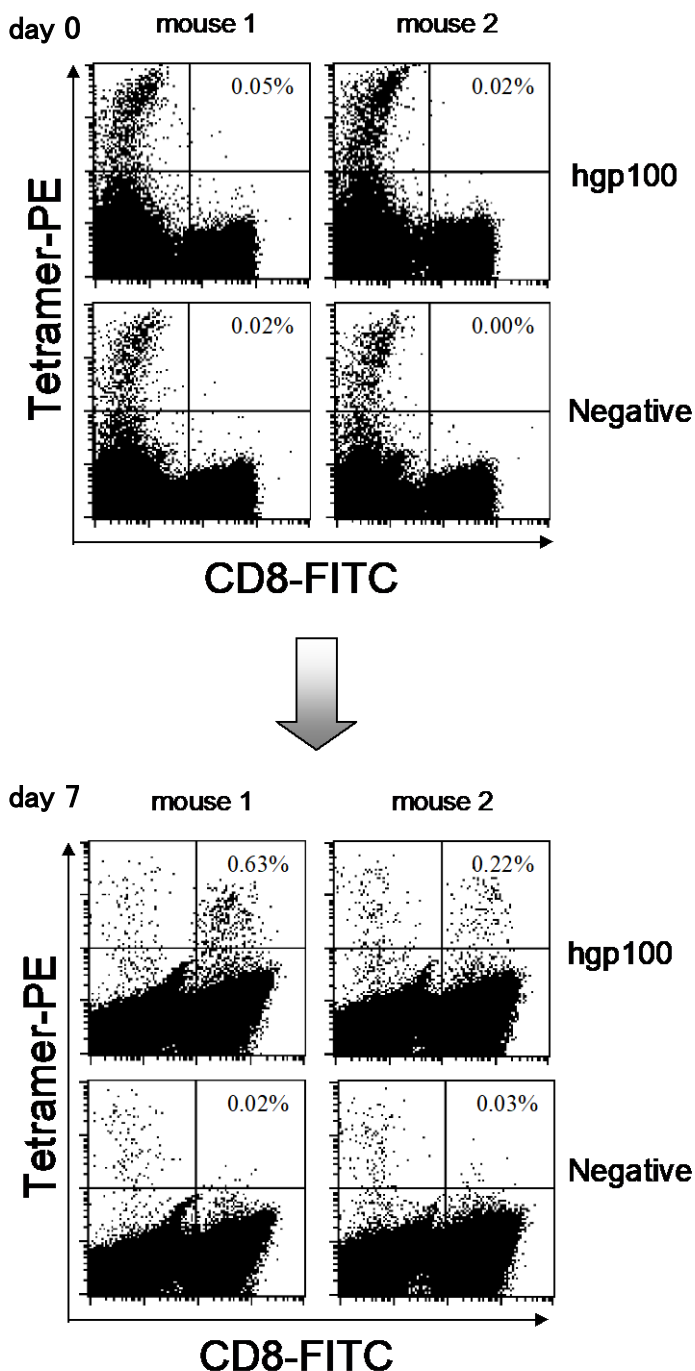
結果:

FSC/SSC 展開にて T 細胞領域を 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。

<FSC/SSC ドットプロット展開図>



<Tetramer 染色像>



human gp100 由来の抗原ペプチド hgp100₂₅₋₃₃ (KVPRNQDWL) を免疫したマウスにおいて、*in vitro* stimulation により human gp100 特異的 CTL の誘導が確認された。

Negative Tetramer (H-2D^b Influenza NP Tetramer-ASNENMDTM-PE) を用いた比較染色により、特異的 CTL であることが明示された。