

Empty Tetramerを用いた 抗原特異的T細胞の検出



東京大学医学部附属病院
免疫細胞治療学

小林由香利先生 垣見和宏先生

CD8⁺T細胞は、そのT細胞受容体(TCR)を用いて、標的細胞上のペプチドMHCクラスI分子に提示されたペプチドを認識する。したがって、MHCクラスI分子(ヒトHLA-A, B, C)/ペプチド複合体を蛍光標識して、直接関連するTCRに結合させることで、抗原特異的CD8⁺T細胞の検出が可能である。TCRとMHCクラスIの結合力が弱いので、1対1ではそれらの結合を保持できないため、MHCクラスI分子の多量体(マルチマー)を形成させて複数のTCRへ結合させることで、フローサイトメーターでの検出を可能にしている¹。今回我々はTetramer Shop (Denmark)から入手したEmpty Tetramerを用いた抗原特異的CD8⁺T細胞の検出を経験したので紹介したい。

MHCクラスI分子は、3つのドメイン($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$)からなる重鎖と、 $\beta 2$ マイクログロブリン($\beta 2m$)及びペプチドから形成されるヘテロ三量体で構成される。いずれかの構成因子を欠くと安定構造を保てない。そのため、抗原特異的T細胞検出用にテトラマーを作製するためには、あらかじめ特定のエピトープペプチドを含んだヘテロ3量体のMHCクラ

スIモノマー分子を作製して構造を安定させ、それを4量体にして蛍光標識したテトラマーが調製される¹。ウイルス抗原やがん抗原などCD8⁺T細胞のエピトープペプチドがあらかじめ同定されている場合には、それらのエピトープペプチドを用いたテトラマーを作製することが可能であり、ベンダーから入手可能である。しかしながら、既成のテトラマーとして提供されていない新規抗原ペプチドを用いたテトラマーは特注する必要があった。さらに複数の抗原特異的T細胞を検出するためには、同数のテトラマーを準備する必要があり、研究費への負担を考えると、テトラマーを用いた研究を思うように実施するのはなかなか困難であった。

近年、ペプチド交換可能なテトラマー技術が開発され、一種類のテトラマーを購入すれば、研究者が準備したペプチドを用いて任意の抗原特異的T細胞を検出できる、非常に柔軟な試薬が提供されるようになった。例えば、UV照射によって壊されるようなペプチドを用いてMHCクラスI分子の立体構造を保持させたテトラマーが開発された²。ユーザーが使いたいエピトープペプチドを添加してUV

照射すると、MHCクラスI分子に結合しているペプチドが壊れて、添加した目的のペプチドに入れ替わったテトラマーが調製される。温度や化学反応を用いたペプチド交換などの手法も開発されている。ペプチド交換可能なテトラマーの登場により、少量で複数のエピトープペプチドを用いた抗原特異的T細胞のスクリーニングが可能になった。しかしながら、MHCクラスI分子への結合親和性が低いペプチドなどではペプチド交換効率が低いこと、ペプチド交換した後にテトラマー化する必要性などが研究者にとっては負担であった。

Empty Tetramerは、その名の通り、ペプチド結合ポケットが“Empty”の状態を提供されるテトラマーであるため(図1)、ペプチド交換やMHCクラ

スIモノマーのテトラマー化のステップが不要で、エピトープペプチドを添加するだけで、目的のペプチド特異的T細胞を検出可能なテトラマーを調製可能である。MHCクラスI分子の重鎖にジスルフィド結合を導入してその立体構造を安定させることで、ペプチドを含まないヘテロ2量体(重鎖+ β 2m)でありながらクラスI分子3量体と同様の立体構造が保たれており、蛍光標識されたテトラマーが提供されている。目的のエピトープペプチドを添加して4℃/on ice、30分インキュベートするだけで、抗原特異的なテトラマーが得られる。凍結保存しても立体構造が保持されているため、実験に応じて必要な量だけテトラマーを都度調製して用いることが可能である。

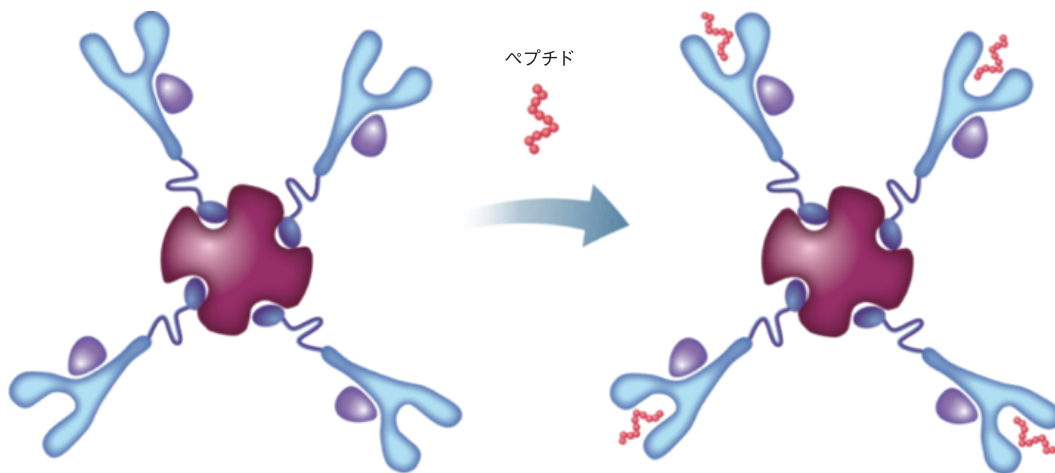


図1. Empty Tetramer
(<https://tetramer-shop.com/mhc-tetramer-assay-staining-protocol/>より引用)

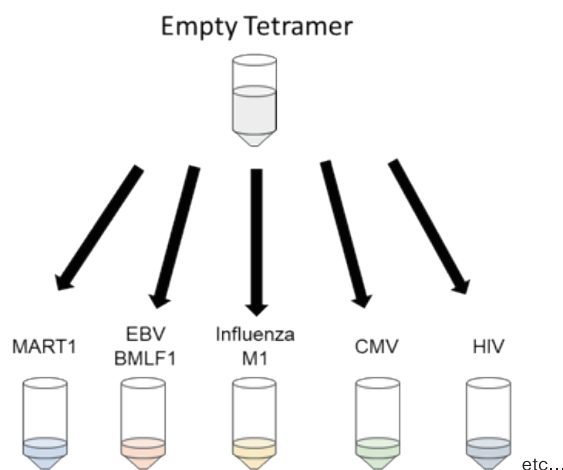


図2. 抗原特異的テトラマーの調製

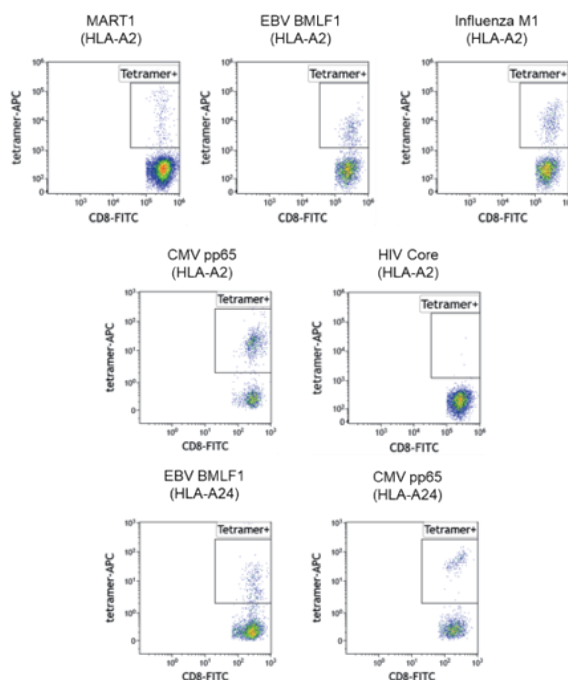


図3. テトラマーを用いた抗原特異的CD8⁺T細胞の検出

今回、我々はAPC標識されたHLA-A*02:01とHLA-A*24:02テトラマーを用いて抗原特異的T細胞の検出を試みた。HLA-A*02:01テトラマーには、MART-1 (26-35; ELAGIGILTV)、EBV BMLF1 (280-288; GLCTLVAML)、インフルエンザM1 (58-66; GILGFVFTL)、CMV pp65 (495-503; NLVPMVATV)、を添加し、HLA-A*24:02テトラマーには、EBV BMLF1 (320-328; DYNFVKQLF)、CMV pp65 (341-349; QYDPVAALF)を添加した(図2)。

健常者のPBMCに一致するペプチドを添加して10日間刺激培養し、抗原特異的T細胞の頻度をあらかじめ増幅してFACS解析に用いた。HLA-A2のコントロールにはHIV pol (476-484; ILKEPVHGV)を用いた。図3に示すように、バックも低く、高感度にテトラマー陽性細胞を染色し検出することが可能であった。

腫瘍免疫研究において、個々の患者の遺伝子変異産物に由来するネオアンチゲン特異的T細胞の検出が求められている。個々の患者により遺伝子変異が異なり、また患者のHLAが異なることから、既成のテトラマーを用いた検出は不可能である。Empty Tetramerを準備しておけば、その都度、自由にネオアンチゲンペプチドを添加してテトラマーを調製できることは、非常に好都合である。また、一人の患者でも数10種類あるいは100種類以上のネオアンチゲンペプチドに対する解析が求められることも少なくない。様々な蛍光色素で標識されたEmpty Tetramerが準備されているので、異なる2つの蛍光色素で標識されたテトラマーを1対1で組み合わせて複数のネオアンチゲン特異的T細胞を一度に解析する手法、組み合わせ蛍光標識法(Combinational Fluorescence Labeling)を用いたネオアンチゲン特異的T細胞の検出が報告されているので参考にされたい³。

このように、Empty Tetramerを用いた抗原特異的T細胞の検出は非常に柔軟であり、研究者に大きな自由度を与えてくれる。抗原特異的T細胞が重要な感染症やがんに対する免疫研究に非常に有用なツールになると期待される。

参考文献

- 1 Altman, J. D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science 274, 94-96, doi:10.1126/science.274.5284.94 (1996).
- 2 Toebe, M. et al. Design and use of conditional MHC class I ligands. Nat Med 12, 246-251, doi:10.1038/nm1360 (2006).
- 3 Saini, S. K. et al. Empty peptide-receptive MHC class I molecules for efficient detection of antigen-specific T cells. Science Immunology 4, eaau9039, doi:10.1126/sciimmunol.aau9039 (2019).

抗原特異的T細胞の迅速で簡単な検出 T細胞研究用ハイパフォーマンスMHCテトラマー



TETRAMER SHOP社は抗原特異的T細胞の迅速で簡単な検出を実現するテトラマーを提供しています。ご使用用途に合わせて既存製品、カスタム製品もしくはペプチドを含まないEmpty MHCテトラマーを提供しています。

テトラマー製品のメリット

高い特異性と安定性

MHCテトラマーは、独自の安定化技術と凍結適合性配合により明度高く染色されます。

優れた価値

独自のテクノロジープラットフォームにより、コスト効率の高いMHCテトラマーを提供します。

簡便に検出

あらゆるラボ環境で便利な幅広い蛍光色素ラインナップしています。19色の蛍光色素から選択するか、プロジェクトにスピードと正確さをもたらすカスタム蛍光色素にも対応します。

3種類のMHCテトラマー



既製品MHCテトラマー

300以上のMHCテトラマー-抗原特異性に利用可能。Ready to Useで直ぐに実験使用可能



カスタムMHCテトラマー

指定されたHLAとペプチドを結合させたカスタムテトラマー



Empty MHC テトラマー

お客様が用意したペプチドを自身で加えてペプチド結合(30分)させるテトラマー

ご依頼、詳細はこちらまで https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/custom_service/products/95171.html

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所 ●中国営業所
- 東海営業所 ●横浜営業所
- 筑波営業所 ●東北営業所
- 北海道営業所



フリーダイヤル 0120-052-099
フリーファックス 0120-052-806
試薬URL: <https://labchem.wako-chem.co.jp>

■FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA
TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791
■FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH Fuggerstraße 12, 41468 Neuss, Germany
TEL: +49-2131-3111-0 FAX: +49-2131-3111-100

Online Catalog: www.e-reagent.com