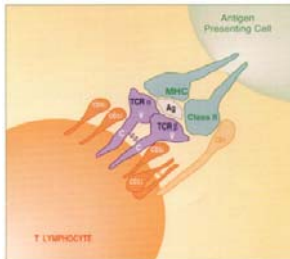


抗原特異的 T 細胞のマルチカラー分析 (5カラー-MHC テトラマー アッセイ)

はじめに ……MHC テトラマーとは

T 細胞は、細胞表面の T 細胞レセプタと CD3 分子の複合体 (TCR/CD3) を介して抗原を認識し、活性化して様々な免疫応答を惹起しています。通常の細胞表面マーカー分析では、T 細胞に特異的な分化抗原を指標に T 細胞サブセットを機能的に分類、定量できますが、その T 細胞の認識抗原を知ることはできません。

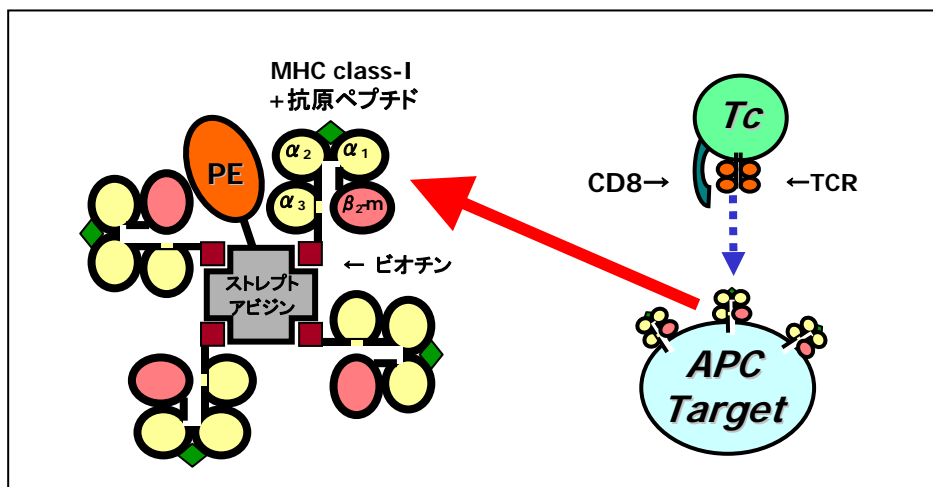


T 細胞レセプタ (TCR) は可溶性の抗原分子には直接結合せず、抗原提示細胞 (APC) や細胞障害標的細胞 (Target cell) の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識しています。CD4 陽性の T 細胞は、APC に発現する MHC class-II (ヒトの場合 HLA-D/DR) 分子と外来抗原ペプチドの複合体を、CD8 陽性の T 細胞は、APC や Target cell に発現する MHC class-I (ヒトの場合 HLA-A/B/C) 分子と内在性抗原ペプチドの複合体をそれぞれ認識しています。

したがって、MHC/抗原ペプチド複合体をプローブとして、特定の抗原に特異的な T 細胞を検出することが理論的に可能です。TCR との高い結合アビディティを得るために MHC/抗原ペプチド複合体をビオチン-streptavidin 法で 4 量体化した **MHC テトラマー (MHC Tetramer)** が開発され¹⁾、一部の MHC アレルでは蛍光標識した高品質のテトラマー試薬が製品化されています¹⁾。

感染症やがん免疫、移植免疫などの研究では、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の動態やその機能の解析は有用な情報をもたらします。MHC テトラマーと各種の CD/non-CD モノクローナル抗体を組み合わせたマルチカラー分析は、従来の方では得ることのできなかつた抗原特異的 T 細胞に限定したサブセットの機能解析を可能にします。

本編では、Cytomics FC500 フローサイトメーターを用いた 5 カラーの MHC テトラマー分析例をご紹介します。

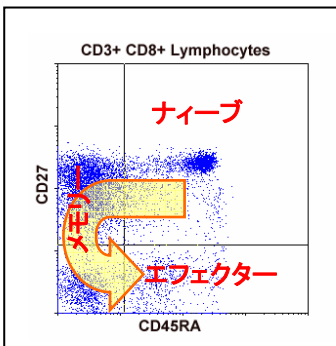
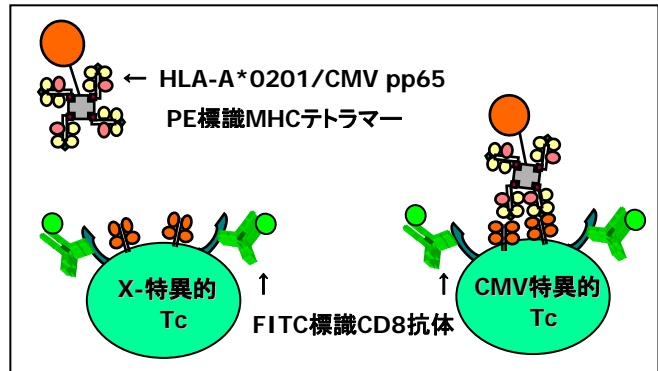


^{*1} 蛍光標識 MHC テトラマー試薬は、国内では (株) 医学生物学研究所 (MBL) から入手できます。
(試薬推進部 TEL: 052-971-2089 URL: <http://www.mbl.co.jp>)

CMVpp65 MHC テトラマーを用いた 5 カラー分析例^{*2}

サイトメガロウイルス (CMV) は、造血幹細胞移植や臓器移植後の免疫抑制治療時にしばしば重篤な感染症を引き起こします。そのため、CMV に対する特異的細胞免疫能のモニタは、臨床的にも有用であると考えられます。

CMV の pp65 被包タンパクには CTL が認識する MHC class-I 結合ペプチドシーケンス (CTL エピトープ) が存在します。したがって、供血者の HLA 型と同じ HLA-A 分子 (例えば HLA-A*0201、HLA-A*2402) とそれに親和性の高い CTL エピトープペプチドによる PE



標識 MHC テトラマー試薬と FITC 標識 CD8 抗体を用いて、CMV 特異的な CTL を検出することができます²⁾。

一方で、CD45RA または CD45RO と CCR7、CD27、CD28 などのマーカーを組み合わせ、T 細胞をさらに機能的に細分類できることが報告されています³⁾⁻⁵⁾。例えば、CD8 陽性 T 細胞は CD45RA と CD27 でナイーブ (CD45RA⁺ CD27⁺)、メモリー (CD45RA⁻ CD27⁺)、エフェクター (CD45RA⁺ CD27⁻) に細分することができます⁴⁾。MHC テトラマー試薬を組み合わせたマルチカラー分析により、特定の抗原に特異的な T 細胞の機能的分化を調べることができます⁵⁾。

試薬

- ・CYTO-STAT/COULTER CLONE T8-FITC (CD8; 製品番号 6603861)
- ・CMV pp65/HLA-A*0201 Tetramer-PE^{*3}
- ・IOTest CD45RA-ECD (製品番号 IM2711)
- ・IOTest CD27-PC5^{*4} (製品番号 6607107 = 近日発売予定)
- ・IOTest CD3-PC7 (製品番号 6607100)

Cytomics FC500 の ADC 機能で蛍光補正を自動調整する場合は、FITC、PE、ECD、PC5、PC7 の各蛍光標識 CD45 抗体など、強蛍光かつ陽性率の高い染色サンプルを較正用試料として用いてください。

染色手順

- 1) 試験管に規定量の MHC テトラマー試薬および規定の 2 倍量の IOTest 抗体試薬を分注します。
- 2) 全血 200 μ L もしくは 10×10^6 /mL に調製した末梢血分離単核球 (PBMC) 浮遊液 100 μ L を分注します。
- 3) よく攪拌し、室温で 30 分間インキュベーションします。
- 4) 全血の場合のみ、OptiLyse C で溶血処理します。溶血試薬を 1mL (=規定の 2 倍量) 加えてよく攪拌し、室温 10 分放置した後、PBS を 1mL (=規定量の倍量) 加えて室温 15 分放置します。
- 5) PBS を 2mL 加えて、400 \times g で 5 分間遠心分離します。
- 6) 沈さを 0.5mL の 0.5% パラホルムアルデヒド加 PBS に再浮遊し、Cytomics FC500 フローサイトメーターで測定します。測定前のサンプルは、4°C、遮光保存してください。

^{*2} Meryl Forman (Beckman Coulter Inc.): 未発表データ

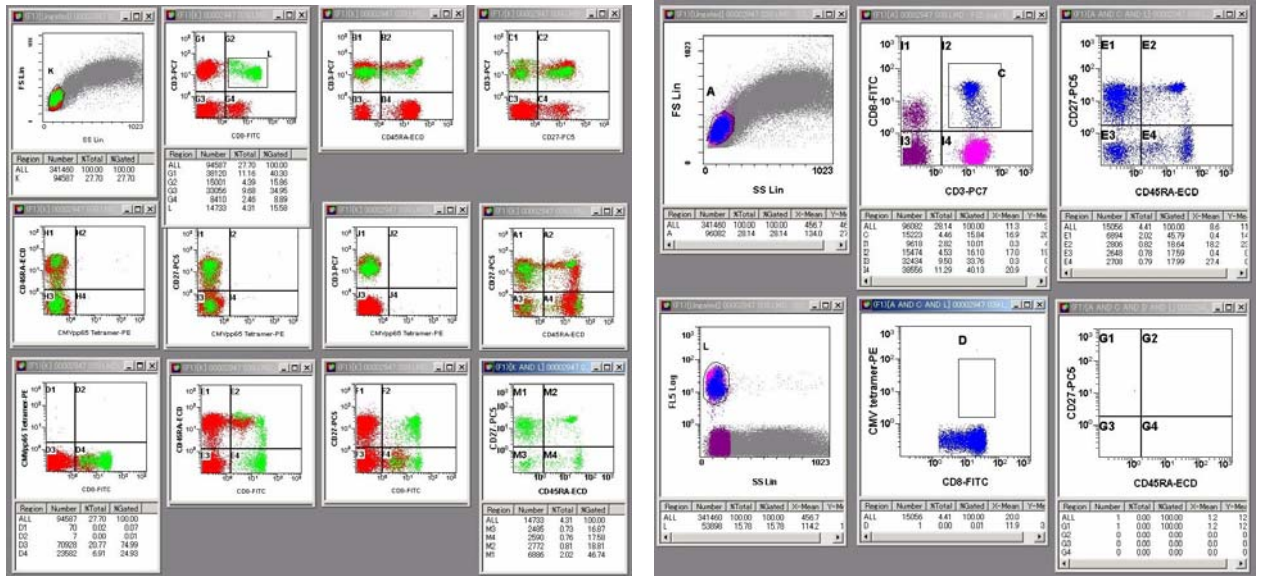
^{*3} 国内では (株) 医学生物学研究所 (MBL) から入手できます

(試薬推進部 TEL: 052-971-2089 URL: <http://www.mbl.co.jp>)。

^{*4} 弊社 Custom Design Service (抗体試薬の受託蛍光標識サービス) もございます。詳細はお問合せください。

5 カラー解析

下に健常者末梢血の5カラー-MHC テトラマー解析プロトコル例を示します。MHC テトラマー陽性細胞の頻度は非常に少なく、通常はCD3⁺CD8⁺リンパ球の1%未満です。AcquisitionのStopをCD3⁺リンパ球もしくはCD3⁺CD8⁺リンパ球に設定し、陽性分画のマルチカラー解析に十分な数の細胞数(CD3⁺CD8⁺リンパ球数で6万個以上)を取得してください。また、1サンプルあたりのリストモードファイルサイズが10~30MB以上になりますので、データの保存には十分な空き容量を確保してください。

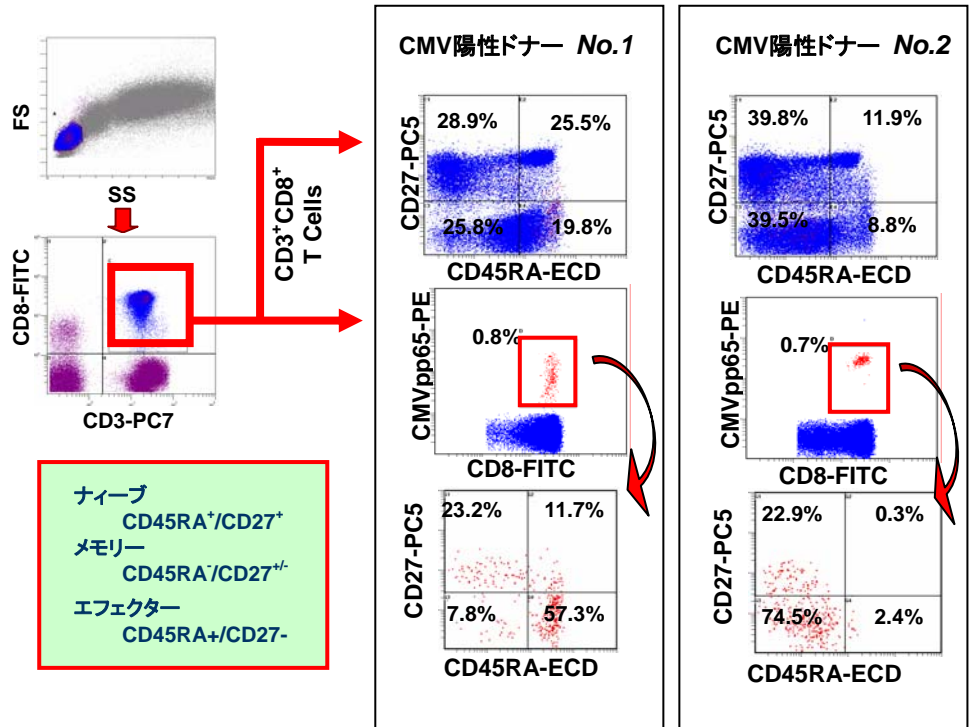


右図はCMV陽性ドナー2例(No.1, No.2)の5カラー-MHCテトラマー分析結果です。No.1, No.2ともにCMV特異的T細胞はCD3⁺CD8⁺リンパ球の1%未満です(中段)が、No.2ではメモリーT細胞(CD45RA⁻)がそのほとんどを占める

のに対し、No.1はエフェクターT細胞(CD45RA⁺CD27⁻)主体です。

すなわち、No.1ではCMVに対して体内で特異的免疫反応が起こっている可能性が強く示唆されます(下段)。

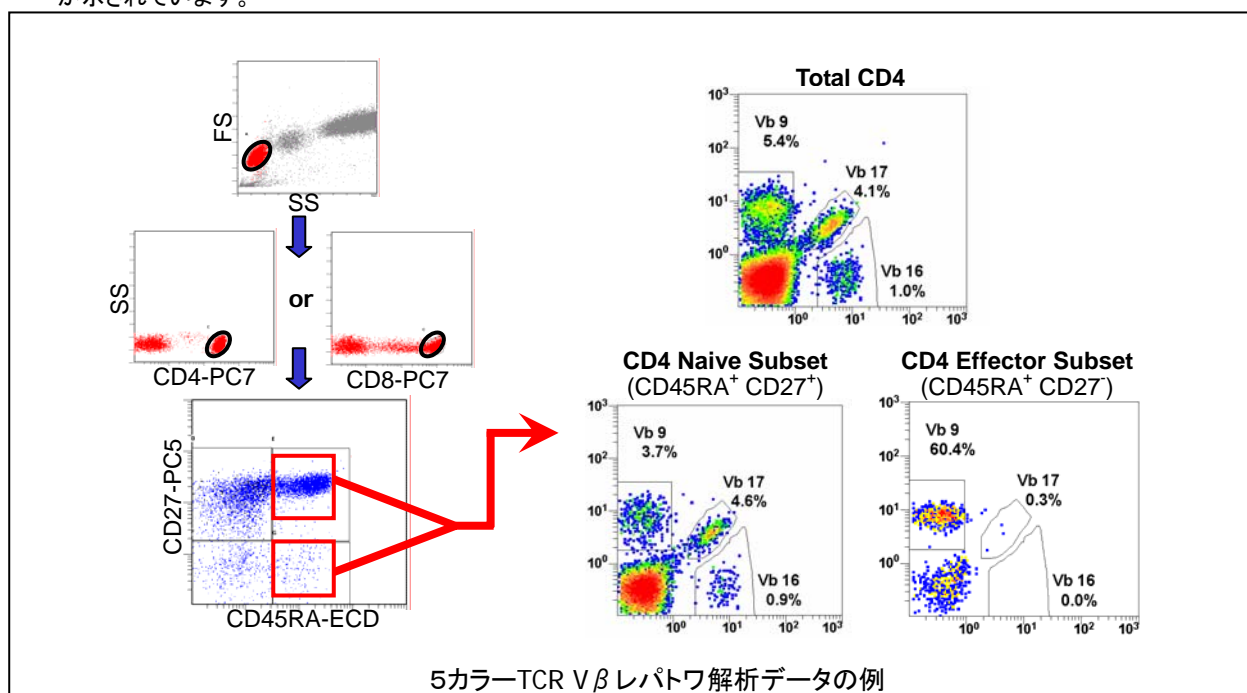
従来のCD3⁺CD8⁺T細胞全体の解析(上段)ではこのような情報は得られず、抗原特異的な免疫応答の研究に5カラーMHCテトラマー分析が有用であることが強く示唆されます。



補遺: TCR Vβレパトワ解析キットを用いた5カラー分析

MHC テトラマーは抗原特異的な T 細胞を直接的かつ容易に定量できる方法ですが、供血者の HLA 型に一致したテトラマー試薬を用いる必要があります。供血者の HLA 型が不明なとき、もしくは適当な MHC テトラマー試薬が得られないときには、代わりに TCR Vβレパトワをマルチカラーフローサイトメトリーで同時解析することにより、特定のリンパ球サブセットに限定した Vβレパトワの偏りや特定の Vβセグメントを発現する T 細胞の機能的分化から、特定の抗原に対する宿主の細胞性免疫応答を検知し得る可能性があります。

その一例として、Beta Mark TCR Vβレパトワ解析キット(FITC, PE, FITC+PE)と CD45RA-ECD、CD27-PC5、CD4-PC7または CD8-PC7の5カラー分析で、HIV 感染症患者の CD4⁺ T 細胞または CD8⁺ T 細胞と、そのナイーブ (CD45RA⁺CD27⁺)、メモリー (CD45RA⁻)、エフェクター (CD45RA⁺CD27⁻) サブセットの TCR Vβレパトワ同時解析を行った研究⁶⁾では、CD4⁺ T 細胞全体では目立たない Vβレパトワの偏りがエフェクター T 細胞でより顕著に表れるとともに、CD4 細胞数が 200/μL 未満の患者群ではナイーブ CD4⁺ T 細胞においても多くの Vβレパトワが枯渇していることが示されています。



参考文献

- 1) Altman JD, et al. (1996): *Science* 274: 94-96.
- 2) Kuzushima K, et al. (2001): *Blood* 98: 1872-1881.
- 3) Sallusto F, et al. (1999): *Nature* 401: 708-712.
- 4) Hamann D, et al. (1997): *J. Exp. Med.* 186: 1407-1418.
- 5) Tussey L, et al. (2000): *Eur. J. Immunol.* 30: 1823-1829.
- 6) Snow C, et al.: Presentation in ISAC XXI (San Diego, 2002).