Lonza

Nucleofector® Voice of Customers

ー 遺伝子導入実験におけるお客様ご評価 ー

Nucleofector® は2001年にAmaxa Nucleofector 装置として日本国内で発売以来、数々のモデルチェンジやアプリケーションの拡充を経ながら、革新的な遺伝子導入装置としてお客様から高い評価をいただいてまいりました。このたび、Nucleofector® Voice of Customersと称しまして、お客様のNucleofector® を使用した研究内容とご評価例をご紹介させていただきます。今後も最先端のライフサイエンス研究をサポートするべく、Nucleofector® の技術向上に取り組んでまいります。

実績紹介 01

抗腫瘍効果を高めるT-cellの遺伝子探索

データ提供：
慶應義塾大学 微生物免疫制御学教室

吉村 昭彦 教授
三瀬 節子 助教

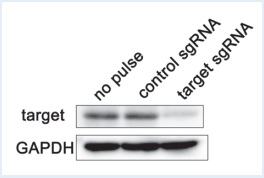
User's Voice 導入効率が大変良い。レトロウイルス導入後にもエレクトロポレーションを行うことができるため、CAR-T細胞での遺伝子のノックアウトに有効。

要約

がん組織に集積するT細胞の多くは、何度も抗原刺激を受けることで複数の免疫チェックポイント分子を高度に発現し『疲弊』する。本研究では、ロンザ社 4D-Nucleofector® Xユニットを用いて、疲弊化誘導遺伝子特異的なsgRNAとCas9タンパク質の複合体をマウスCD8⁺ T 細胞、およびヒトCD3⁺ CAR-T細胞に導入し、その遺伝子をノックアウトすることで抗腫瘍効果を高めることに成功した。

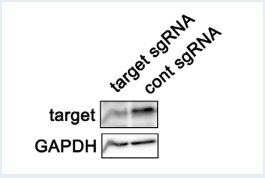
細胞	マウス CD8⁺ T-Cell	ヒト CAR-T細胞
試薬キット	**P4**（V4XP-4032）	**P2**（V4XP-2032）
プログラム	**CM-150**	**EH-100**
細胞数/ キュベットサイズ	1×10⁶ cells 20 ul Strip Well	1×10⁶ cells 20 ul Strip Well
導入基質	Cas9 RNP sgRNA：450 pmol Cas9 Protein*：180 pmol * 西増教授、濡木教授（東京大学）作成	
ノックアウト効率	50% - 90%	

マウスprimary CD8 T細胞への
Cas9/RNPの導入



Fig：マウスCD8T細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激し、2日後にエレクトロポレーションを行った。更に5日後にウェスタンブロットにてtargetの発現を調べた。

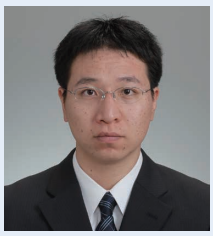
ヒトCD3+CAR-T細胞への
Cas9/RNPの導入



Fig：CARを導入したヒトpanT細胞にtargetのsgRNAを導入し、ウェスタンブロットでtargetの発現を調べた。

実績紹介 02

腎障害回復期のTregに発現するGATA3遺伝子の有益性



データ提供：
慶應義塾大学 微生物免疫制御学教室

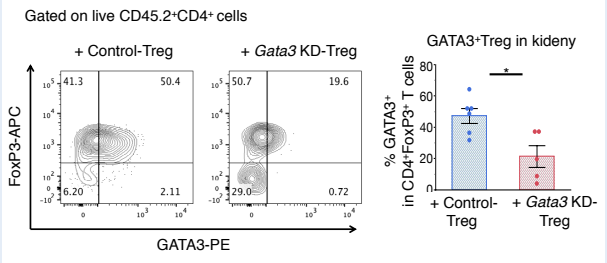
吉村 昭彦 教授
博士課程 酒井 亮太 様
（現、埼玉医科大学 助教）

User's Voice 初心者でも使いやすくて、編集効率も高く、様々な遺伝子を編集してみたい衝動に駆られた。

要約

組織に局在する制御性T細胞（組織Treg）のうち、腎障害の回復期に発現するGATA3遺伝子が大きな役割を果たすことが示唆されている。本研究では、腎炎モデルマウスに移植して評価する目的として、GATA3遺伝子欠損Tregの作成に、ロンザ社4D-Nucleofector® Xユニットでターゲット遺伝子の導入/疾患モデルマウスへの移植後の評価を行った。

細胞	マウス 脾臓 CD4⁺T-Cell
試薬キット	**P4**（V4XP-4024）
プログラム	**CM-137, CV-137, DS-158**（要条件検討）
細胞数/ キュベットサイズ	5×10⁶ cells 100 ul Cuvette
導入基質	Cas9 RNP 15 ul crRNA-tracrRNA duplex：180 pmol Cas9 Protein*：10 ng * 西増教授、濡木教授（東京大学）作成
編集効率	50% - 60%



Fig：遺伝子編集した脾臓Treg（CD45.2陽性）をFoxP3を発現しないTconv（conventional T）細胞（CD45.1陽性）と共移入してマウス腎炎を誘導した。腎炎回復期の腎臓におけるlive CD45.2陽性CD45.1陰性CD4陽性細胞をゲートしたフローサイトメトリー解析とTregあたりのGATA3陽性細胞の割合を示す。

論文情報：Kidney GATA3⁺ regulatory T cells play roles in the convalescence stage after antibody-mediated renal injury Cellular & Molecular Immunology. Published online: 11 Sep.2020
引用論文：Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. Nature volume 565, pages246–250(2019)

実績紹介 03

ヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞のゲノム編集について

要約

RIKEN BRCより購入した健常人由来CD34陽性造血幹細胞に対して、CRISPR-Cas9法によるゲノム編集を実施した。*ADH5*（alcohol dehydrogenase　5）を標的遺伝子とし、リボヌクレオ蛋白質（RNP）複合体をロンザ社 4D-Nucleofector® を用いて導入した。2箇所のgRNA配列に対するゲノム編集効率を、CD34陽性造血幹細胞からDNAを抽出し、サンガーシーケンス法にてゲノム編集効率を確認した。その結果、両配列共に80%以上の効率でゲノム編集（indel変異）が起きていることを確認した。

細胞	ヒトCD34（HSPCs）
試薬キット	**P3**（V4XP-3032）
プログラム	**EH-100**
細胞数/ キュベットサイズ	5×10^4 cells 20 ul Strip Well
導入基質	Cas9 RNP gRNA：27 pmol Cas9*：9 pmol　* 入手元：IDT社
導入効率および ゲノム編集効率（KO）	80% 以上

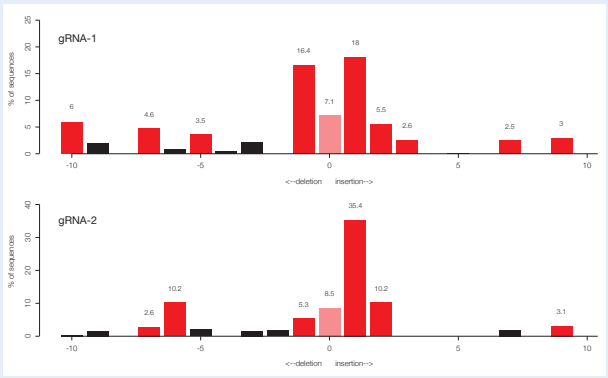
データ提供：

東海国立大学機構 名古屋大学 環境医学研究所 発生遺伝分野

荻 朋男 教授

岡 泰由 講師

User's Voice RNP導入効率・使い勝手ともに期待以上でした。



Fig：TIDEによるCD34陽性造血幹細胞のゲノム編集効率の確認

論文情報：Oka et al. Science Advances 6: eabd7197 (2020)

実績紹介 04

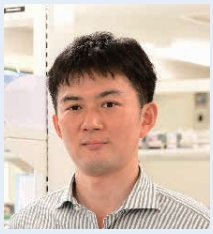
PiggyBac Transposonシステムによる多発性骨髄腫細胞株への遺伝子導入

要約

ロンザ社 Cell Line Optimization 4D-Nucleofector® X Kitを用いて、4D-Nucleofector® による多発性骨髄腫細胞株MM1Sへの遺伝子導入条件の最適化を行った。プロトコルに従って3種の試薬（SE，SF，SG）それぞれに15種のプログラムを試した結果、SF試薬／プログラムDN-100が最適であった。この最適化条件を用いて、PiggyBac TransposonシステムによるMM1S細胞への遺伝子導入を行った。Vectorサイズは約10kbであったが、容易に安定発現細胞を得ることができた。

細胞	多発性骨髄腫細胞株MM1S
試薬キット	**SF**（V4XC-2012）
プログラム	**DN-100**
細胞数/ キュベットサイズ	5×10^5cells 20ul Strip well
導入基質	Transposase発現ベクター　：500 ng/sample 目的遺伝子・GFP発現ベクター：100 ng/sample
安定発現株の構築効率	約0.4%

関連文献：K. Yusa et al., "A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications." Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 25;108(4):1531-6



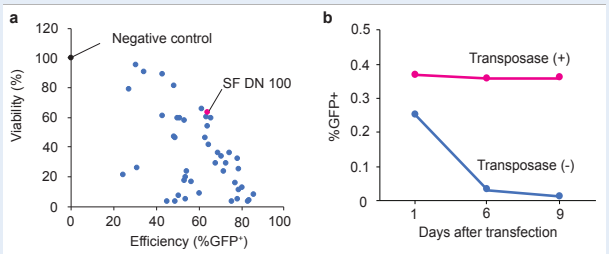
データ提供：

京都大学　ウイルス・再生医科学研究所 幹細胞遺伝学教室

遊佐 宏介 教授

青木 一成 助教

User's Voice 遺伝子導入の難しい細胞株であっても、効率よく遺伝子導入を行うことが可能。

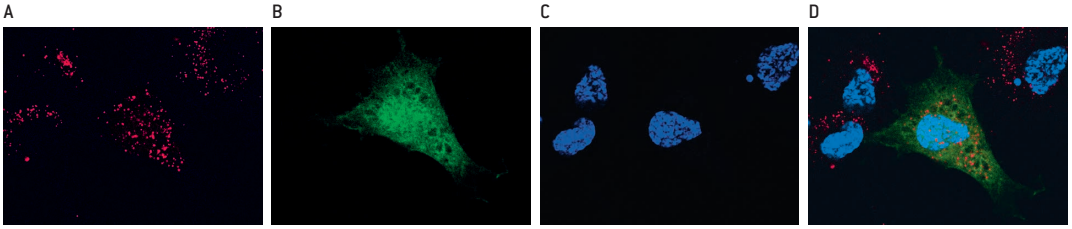


Fig：Nucleofector®　を用いたMM1S細胞への遺伝子導入。(a) 多発性骨髄腫細胞株MM1Sにおける4D-Nucleofetor® の最適条件を検討、SF試薬／プログラムDN-100が最適（図中赤点）であることが明らかになった。(b) (a)の最適化条件でMM1S細胞に目的遺伝子とGFPを発現するPiggyBac transposon vectorおよびTransposase 発現Vectorを同時に遺伝子導入したところ、導入後9日を経てもGFPの安定発現が観察され、目的とする安定発現細胞が得られたことが示された。

Nucleofector™ による核内への遺伝子導入実績

ヌクレオフェクションは電気パルスにより細胞膜に瞬時に細孔を形成する技術です。Nucleofector™　プログラムと細胞種ごとに最適化された専用試薬の開発による総合的な手法を採用し、細胞質へはもちろん、さらに核膜を通して核内への遺伝子の導入を実現しました。これにより、細胞種によっては99%という高導入効率と細胞増殖に依存しない遺伝子導入の実現が可能になりました。

核内へDNAを直接導入

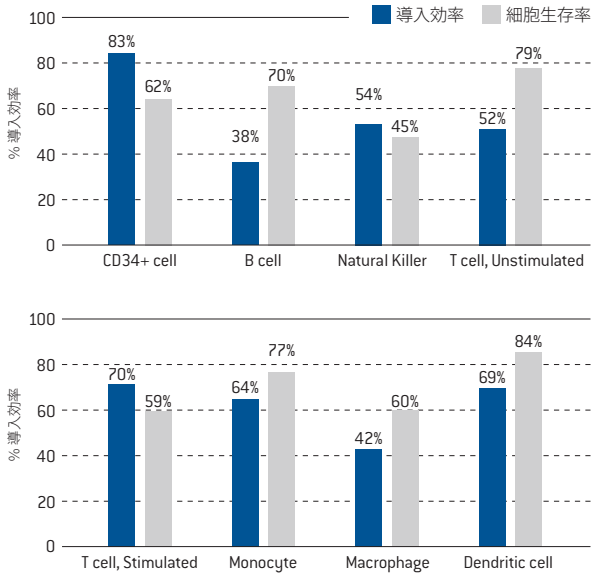


Fig：正常ヒト皮膚線維芽細胞（新生児）に2.5 μgのeGFP（高感度GFP）をコードするTMR標識したプラスミドDNAを導入。導入2時間後、細胞は3.5%PFAにより固定され、共焦点顕微鏡で観察された。導入プラスミド（TMR標識）〔A〕、導入、発現されたGFP〔B〕、核（DAPI染色）〔C〕、以上3つを重ね合わせたもの〔D〕を示した。

Nucleofector® は免疫細胞をはじめとした困難な導入を強力にサポートします

独自のパルスパラメーターとユニークな試薬の組合せで構成されるシステムは免疫細胞にも安定した高い遺伝子導入効率を実現。導電性ポリマーを電極材として採用することで、従来のエレクトロポレーション機器と比較して、細胞生存性を飛躍的に向上しました。

その他 免疫/血球細胞への遺伝子導入データ



Nucleofector®では有機化合物から各種核酸、ペプチド、たんぱく質などあらゆるサイズ、あらゆる種類の基質の導入・共導入が可能です。そのため急速に発展するゲノム編集技術に登場する多様なシステムにも柔軟に対応します。導入が困難な核酸タイプのssODNの導入もNucleofector®でならスムーズです。

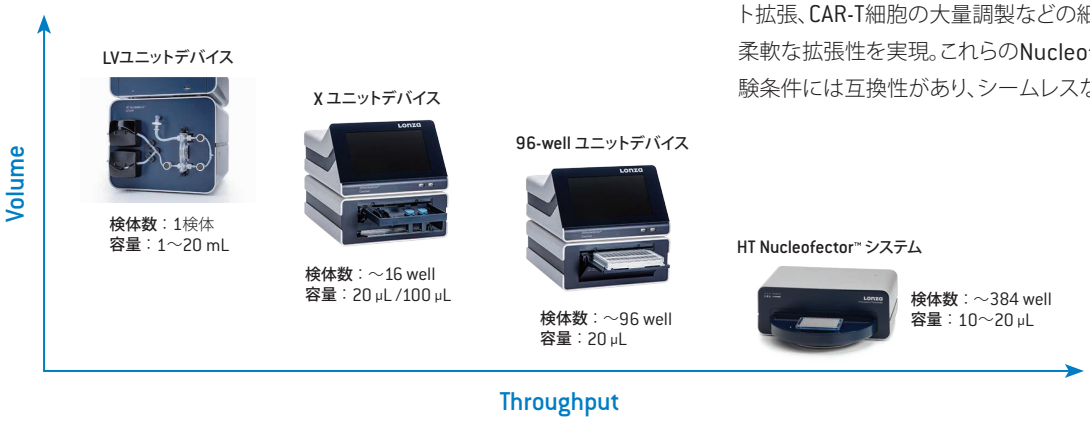
CRISPR/Cas9について報告されている基質量の範囲

	基質	20 uL Strip	100 uL Cuvette
Cas9	Cas9プラスミド	0.4～1 μg	2～5 μg
	Cas9 Nuclease	10 μg (60 pmol) *1	50 μg (300 pmol)
ガイドRNA	ガイドRNA	120～180 pmol *1	600～900 pmol
	ガイドRNAプラスミド	0.4～1 μg	2～5 μg
ドナー	dsDNA(lin)	0.4～2 μg	5～10 μg
	ssODN	50 pmol *2	250 pmol
		12 μg (100-mer) *3	60 μg (100-mer)

*1 J. Exp. Med. 2018 Vol. 215 No. 3 985–997　*2 弊社技術資料より
*3 SCIENTIFIC Reports (2018) 8:310 Ishida *et al.*

柔軟な拡張性　機器ラインナップ

基礎研究に最適な20 μL／100 μL 系のXユニットから、ご研究の進展に合わせて、スクリーニングなどの大量検体の処理に適したハイスループット拡張、CAR-T細胞の大量調製などの細胞療法に適した大容量拡張など、柔軟な拡張性を実現。これらのNucleofector®　デバイス間で使用する実験条件には互換性があり、シームレスな機器の移行が可能です。



ロンザ株式会社
バイオサイエンス事業部

http://www.lonzabio.jp/

RES-LF2109-01