

安定型細胞株作成のガイドライン

背景情報

目的の遺伝子の安定的な発現は、遺伝子導入される細胞の核内でエピソーム管理を行うベクターもしくはゲノムにプラスミドが直接組み込まれることによって達成されます。エピソームの安定性はしばしば限定されており、遺伝子導入されるベクターの段階的損失が起こり得ます。これは、プラスミドを喪失した細胞を選択するための抗生物質を使用することによって防ぐことができます。さらに、エピソームプラスミド要素の機能は特定の種ではしばしば制限されています。宿主細胞染色体への組み込みは起こりにくいため、多くのケースでクローニングは単独で行われる必要がありますが、意図的に遺伝子を組み換えた場合の安定性は通常はるかに高くなります。まず、対象となる遺伝子は細胞 (A) に導入される必要があります。その後、核 (B) に導入され、最終的に染色体DNA (C) に組み込まれる必要があります (図1)。

宿主染色体への染色体組み込みは起こりにくいため、安定型遺伝子導入される細胞は通常さまざまな方法で選択、培養される必要があります。安定型遺伝子導入される細胞の選択には同一コンストラクト上か、または2つ目の共遺伝子導入されるベクター上で選択マーカーを共発現します。遺伝子導入される細胞を選択するために次のようなさまざまなシステムがあります (カナマイシンキナーゼなどの抗生物質に対する耐性、G418、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、またはグルタミン合成酵素 (SouthernとBerg, 1982年) に対する耐性など)。遺伝子導入後、選択された試薬を含む培地で細胞を培養すると、薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドを組み込んだ細胞のみが生き残り

ます。実験の対象範囲に応じて、安定的な細胞株の作製に使用されるいくつかのオプションがあります (表1を参照)。薬剤耐性細胞の混合群 (バッチ培養) を実験分析目的で直接使用できます。これには迅速に結果を得られるという利点と、内容の不明な遺伝子混在の細胞群を取り扱うという欠点があります。クローン細胞を生成するには、単一の単離細胞の培養ができるように耐性のある細胞を希釈する必要があります。例) 96ウェルプレートまたはその他の方法によるプレーティング。その後、この選択プロセスが単一細胞の培養に適用されます。100%のクローニングを行うために、単一細胞のクローニング手順が数回繰り返される場合があります。この培養方法によって、内容が明らかで均質な細胞系を用いた研究やスクリーニングの実施が可能となります。全体的な遺伝子導入効率および/または組み込み頻度が低かったため、これまで安定型細胞株の作製は多くの細胞型 (例: Jurkat, MCF7またはU937) において大きな課題であり続けてきました。遺伝子導入を行いやすい細胞株 (例: HeLa, COS-7またはCHO) で安定的発現を得るためには、リポフェクションなどの一般的遺伝子導入を使用できますが、遺伝子導入の難しい細胞型で安定した発現を得るにはNucleofection™が最適な方法です。

安定型遺伝子導入される細胞株の作製は、遺伝子機能の研究 (Grimm, 2004年)、創薬アッセイ、または組み換えタンパク質の生成 (Wurm, 2004年) など、幅広い用途に不可欠です。一過性の発現とは対照的に、安定的発現によって目的の遺伝子の長期的で明確かつ再現性のある発現が可能となります。

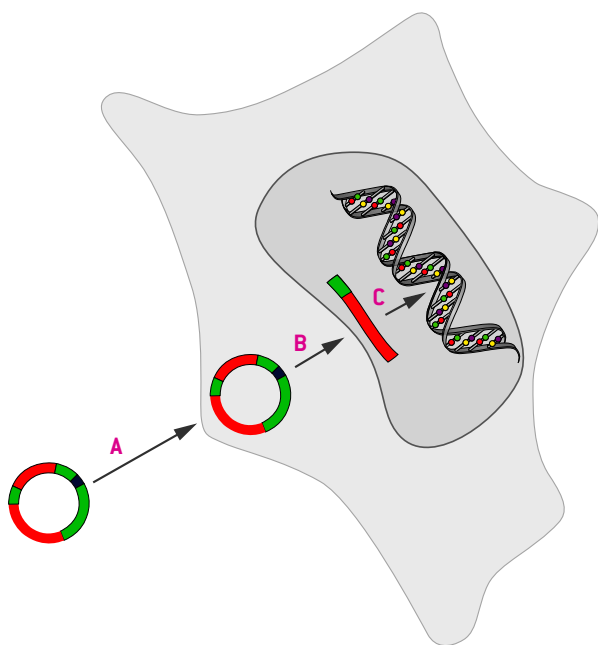


図1. The general path of stable integration.

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

表1：安定型クローン作製の方法

Culture System	Advantage	Application
Batch culture — polyclonal	Fast, useful for cells which do not grow in single cell culture	Overexpression, protein expression systems [e.g., for basic research]
Limiting dilution — monoclonal	Defined cell clones	Studies of gene function, protein production [e.g., for therapeutic applications]

In a batch culture system, a mixed population of drug resistant cells is selected on plates or in flasks and can be used directly for experimental analysis. During a limiting dilution procedure, cells are usually diluted and selected e.g., in a 96-well plate for outgrowth of cell clones or single colony growth. Subsequently, colonies can be picked and used to generate monoclonal cell lines.

安定型細胞株の作製のための培養条件

選択された細胞型の培養条件（継代数、分割リズムなど）、安定遺伝子導入される細胞株の生成において非常に重要です。最適な結果を得るには、American Type Culture Collection（ATCC®、www.atcc.org）の細胞株を使用し、各細胞型において、ATCC®による細胞培養の推奨項目に従ってください。一般に、良好な増殖と細胞生理を促進するには実験2日前の細胞株の継代を推奨しています。細胞継代数は30を超えてはなりません。継代数の多さを組み込み効率によってカバーすることは可能ですが、細胞型によって条件は異なります。実験の対象に応じて、遺伝子導入後に細胞は多クローン性バッチまたは単クローン性の単細胞クローンとして培養される場合があります。

遺伝子導入方法

安定的な発現は、使用される遺伝子導入方法によって影響を受ける可能性があります。遺伝子導入方法の選択によって安定的組み込みのためにどの細胞型を対象とするかが決定されます。標準的な細胞株には生化学的遺伝子導入試薬（例：HiFect™遺伝子導入試薬）を使用してDNAを導入できますが、遺伝子導入が困難なことでよく知られている浮遊細胞株や初代細胞へのDNAの効率的な導入はウイルスを用いる方法もしくはNucleofection™（図2）でのみ可能です。ウイルスを用いる方法には、時間のかかるベクターの作製や安全上の懸念などいくつかの問題点があります（Hacein-Bey-Abinaら、2003年）。

ロンザは、Nucleofector™Technology（168ページ参照）遺伝子導入の困難な細胞株の遺伝子導入を推奨しています。

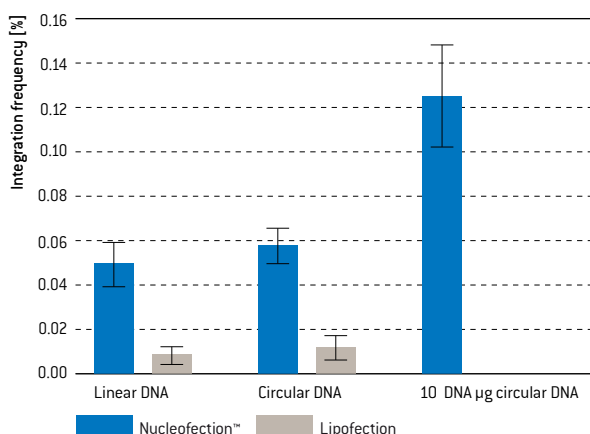
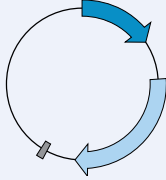
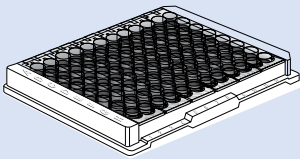
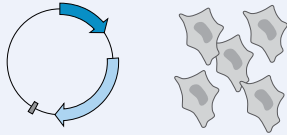
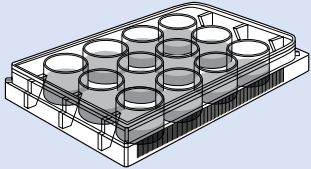
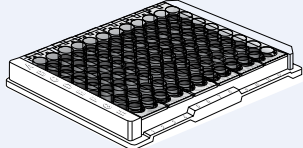
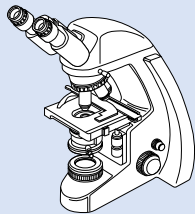


図2. Higher integration rates in difficult-to-transfect cell lines using Nucleofection™. Jurkat cells were transfected using either Nucleofection™ (2 µg DNA) or lipofection Reagent L (0.7 µg DNA) according to the respective manufacturer's instructions. 24 hours after transfection, cells were plated on a 96-well plate containing culture medium supplemented with G418 for selection of stably-transfected cells. 30 days after plating, cells were analyzed for clonal outgrowth [Integration frequency = number of resistant clones per number of living cells seeded]. Due to toxic effects, lipofection with 10 µg circular DNA could not be performed.

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

実験のアウトライン

	Procedure Outline	Important Information
Step 1 	Design experiment and choose cell type, expression vector and transfection method.	Make sure that transfection method and expression vector are suitable for your cell type.
Step 2 	Determine appropriate cell number per well (only for limiting dilution) and G418 concentration.	Cells differ in their susceptibility to G418. The active concentration of stock G418 can vary from batch to batch.
Step 3 	Transfect expression vector into cells.	Amount of expression vector per experiment is dependent on transfection method and cell type.
Step 4 	Plate transfected cells and cultivate cells in medium without G418.	Do not add G418 to culture medium immediately after transfection as this may drastically increase mortality.
Step 5 	Dilute cells into culture plates and start selection 24 – 48 hours post-transfection. Feed every 2 – 3 days (for batch culture) or 10 days (for limiting dilution) with selection medium.	Choose culture conditions (batch culture, limiting dilution) depending on your experimental design. Refreshed selection medium is important to avoid false positive cells.
Step 6 	Analyze stably transfected cells.	Make sure that the chosen assay is suitable for your application.

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

バッチ培養のためのプロトコル

■ バッチ培養を利用したG418濃度の測定

発現プラスミドが薬剤耐性遺伝子を含んでいる場合、薬剤を培養培地に添加することによって安定型遺伝子導入細胞を選択できます。本実験ではネオマイシン耐性システムについて説明します。これは選択マーカーとしてG418に対する耐性を使用します。G418に対する感受性は細胞によって異なります。また細胞型が同じであっても細胞継代数が違えば感受性が異なる場合があります。無血清培地で培養される細胞は、血清含有培地の細胞と比較して必要なG418濃度がずっと少なく済む場合があります。それぞれの細胞型に関する選択条件を実験的に設定する必要があります。細胞増殖を抑制するには、培地に添加する最小レベルのG418を決定する必要があります。ストックG418の活性濃度は、バッチによって著しく異なります。したがって、新規バッチ毎にG418感受性を試験するか、ロット単位で大量購入して選択条件を標準化するように推奨されます。

1. ATCC®の手順に従い、G418を含まない培養培地を移した12ウェルプレートに細胞を振り分けます。
2. 翌日、増殖培地を吸引し、G418濃度を増やして細胞を培養します（例：0.1 mg/ml ~ 1.5 mg/mlの範囲でG418を滴定します。血清を使用しない培養では範囲を20 µg/mlまで狭めてください）。
3. 選択した培地で細胞を2~3日培養します。
4. 7~14日後に光学顕微鏡下で細胞死を確認します。
5. 完全な細胞死を示す濃度から0.1 ~ 0.2 mg/ml上乗せした濃度を選択すべき適切なG418濃度として決定します。使用されたうちの最低の濃度で7日後に完全な細胞死が見られた場合は、さらに低い濃度幅で調整を繰り返してください。

■ 遺伝子導入

遺伝子導入については、お使いの遺伝子導入システムの手順書に従い、対象の遺伝子および薬剤耐性遺伝子用配列を含む発現プラスミドを、使用する細胞型に遺伝子導入してください。遺伝子導入後、手順書に従い、細胞をプレーティングします。通常、6ウェルプレートは106の接着細胞に、12ウェルプレートは106の浮遊細胞に使用されます。

重要対照群：ネガティブコントロール群として、遺伝子導入していない細胞サンプルを使用するよう推奨されます。また、pmaxFP™-GreenベクターなどのGFP制御プラスミドでカスタマーの実験の遺伝子導入効率と組み込み頻度を確認することが、強く推奨されています。pmaxFP™GreenベクターはPontellinaの緑色蛍光タンパク質（maxFP™Greenレポータータンパク質）をコード化します。pmaxFP™Greenレポータータンパク質発現細胞は、蛍光顕微鏡検査法またはフローサイトメトリーによって簡単に解析し実験効率をモニタリングできます。

■ 遺伝子導入後の細胞培養

選択条件下では、非耐性細胞に対して耐性細胞が増殖し、安定型発現を行う細胞の多クローン集団が発生します。耐性細胞の異種発現集団は解析に使用できます。

1. 遺伝子導入後、G418に対する耐性を獲得するため非選択条件下において24時間以上タンパク質を発現させます（高感受性の細胞ではG418の選択が48時間後に始まる場合があります）。
2. 接着細胞をトリプシン処理もしくは浮遊細胞を直接使用して分析します。可能な場合、ポジティブコントロールサンプルおよび対象とする遺伝子のアリコットについて、遺伝子導入の24~48時間後に遺伝子導入効率を解析してください（一過性遺伝子導入コントロール）。
3. 安定した発現を行う細胞の選択では、細胞型用にあらかじめ試験した適量のG418と添加因子を含む培地で細胞を培養します。
4. ATCC®の手順に従って培養プレートまたはフラスコに細胞を移し、標準条件下で細胞を培養します。
5. 耐性細胞の増殖が十分に拡大するまで培養し必要に応じて分注します。
6. バッチ培養の細胞を回収します。

通常、耐性遺伝子を組み込まなかった細胞は最初の選択から数日で死滅します。耐性細胞の増殖は、通常選択から2週間後に観察することができます。細胞によっては、4週間かかるものもあります。G418は37℃で不安定になります。そのため、2~3日毎にG418を含む培地を交換し、選択圧の損失を補完するよう推奨されます。1~2週間後にG418濃度を低下させることが適切な場合があります。細胞は、非耐性細胞の混入を避けるために選択圧下で少なくとも3週間増殖させてください。ネガティブコントロールウェル（例：発現プラスミドなしのサンプル）は、光学顕微鏡検下で観察し、細胞増殖の兆候が見られないことを確認します。細胞型や細胞の増殖度合いによって異なりますが、選択培養期間は最長で計4~5週間以上に及ぶことがあります。

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

■ バッチ培養の解析

耐性細胞バッチまたはクローン取得後、細胞を増殖させて対象の遺伝子をアッセイします。maxFP™Greenレポータータンパク質発現細胞（ポジティブコントロール）の分析では、蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターを使用します。

■ 希釈制限のプロトコル

■ G418濃度と播種密度の決定

発現プラスミドが薬剤耐性遺伝子を含有する場合、薬剤を培養培地に添加することによって安定遺伝子導入される細胞を選択することができます。ここでは、ネオマイシン耐性システムについて説明します。本実験では選択マーカーとしてのG418に対する耐性を使用します。G418に対する感受性は細胞によって異なります。また同じ細胞型でも細胞継代数が違えば感受性が異なる場合があります。無血清培地で培養される細胞は、血清を含む培地の細胞と比較してはるかに低いG418濃度を必要とする場合があります。個別の細胞型に関する選択条件を実験的に設定する必要があります。細胞増殖を抑制するために培養培地に添加する最小レベルのG418を定量します。ストックG418の活性濃度はバッチによって著しく異なることにご注意ください。したがって、新規バッチ毎にG418感受性を試験するか、ロット単位で大量購入し、選択条件を標準化するよう推奨されます。遺伝子導入後の最終播種密度は特定の細胞型の培養条件およびG418濃度によって異なります。そのため、G418濃度の調整と細胞数の調整を組み合わせることで播種密度の決定を二次元的に行なうことが推奨されます（図3）。

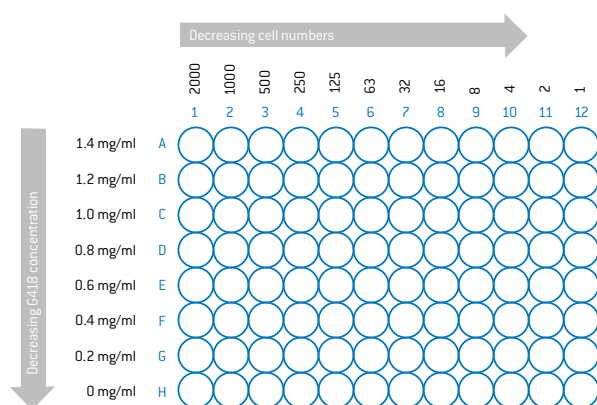


図3. Matrix titration of G418 and titration of cell number for determination of plating density in one 96-well plate.

1. プレーットの各ウェルに100 μ lの培地をセットします。
2. ウェル毎に4000の細胞を含む細胞懸濁液を100 μ l分最初のカラム（#1）に追加します。
3. ピペットを静かに上下させた後100 μ lを次のカラムにキャリーオーバーします。これによって1:2の比率に希釈されます。各連続カラムにおいてこの手順を繰り返します。
4. 完了後、最後のカラム（#12）から100 μ l分を廃棄します。最初のカラムには約2,000の細胞が含まれ、最後のカラムには平均で1つ未満の細胞が含まれるはずです。
5. G418を含む培地を100 μ l分（2.8 mg G418 / ml）最初の列（A）に追加し、G418の最終濃度を1.4 mg / mlにします。
6. G418をそれ以降の列に追加していきますが濃度は順番に0.2 mg/mlずつ減らしていきます。最後の列（H）ではG418なしの培地を添加します。
7. 標準条件下で細胞を培養します。
8. 顕微鏡で細胞の増殖を分析します。細胞の増殖が培地の色の变化として観察されることもあります。
9. G418を含まないウェルで（10日後以降）細胞増殖が観察される場合、これらの細胞が単細胞として増殖を開始したと判断できます。
10. 選択に適切なG418濃度として、完全な細胞死を示すものよりもわずかに高いG418濃度を選んでください。

特定の細胞型では、適切な増殖のために多くの細胞が隣接する必要があります。この場合、限界希釈実験はより高い細胞濃度でのみ行うことができます。これによって、純粋なクローンの獲得はさらに困難になります。このようなケースでは、適切な数の細胞を播種し、フィーダー細胞と同様の非遺伝子導入細胞と混在する耐性クローンを選択して希釈することにより、クローンが作製されます。96ウェルプレートを使って柔らかい寒天またはメチルセルロース上で細胞を培養することが推奨されます。

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

■ 遺伝子導入

遺伝子導入については、お使いの遺伝子導入システムに関する手順書に従い、対象の遺伝子および薬剤耐性遺伝子用配列を含む発現プラスミドを使用する細胞型に遺伝子導入してください。遺伝子導入後、手順書に従い、細胞を播種します（例：96ウェル組織培養ウェルプレート）。

重要対照群：ネガティブコントロールとして、遺伝子導入されていない細胞のサンプルを含めるよう推奨されます。

■ 遺伝子導入後の細胞培養

接着および浮遊細胞からの単細胞クローンは、96ウェルプレートの使用またはその他の方法で細胞を希釈することによって作製できます。これによって、選択圧下での単離細胞クローンの増殖が可能となります。

1. 遺伝子導入後、G418に対する耐性を獲得するために非選択条件下において24時間以上タンパク質を発現させます（高感受性の細胞ではG418の選択が48時間後に始まる場合があります）。
2. 標準手順で接着細胞をトリプシン処理または浮遊細胞を直接使用して分析します。可能な場合、ポジティブコントロールサンプルおよび対象とする遺伝子について遺伝子導入の24～48時間後に遺伝子導入効率を解析してください（一過性遺伝子導入コントロール）。
3. トリパンブルー染色などの適切な方法で、生細胞数をカウントします。
4. 細胞型に合わせてあらかじめ試験された、適量のG418と添加因子を含む標準培地を使用し、ウェル毎に少なくとも100 μ lの分量で異なる細胞数（例：10、100、1000）を有する96ウェルプレートに細胞を配置します。事前に決められた細胞濃度に応じて適切な希釈手順を順番に実行してください。播種前に十分に細胞を懸濁させることが重要ですが頻繁なピペット操作は行わないようにしてください。ウェル毎の最小細胞数として事前に決定した下限値を使用します（単細胞クローンの作製では統計的に96ウェルプレート毎に5～20のクローンを産生することが分かっている希釈液を選択し、ウェルに2つ以上のクローンが発生する確率を最小化します）。

5. 標準的条件下で、新鮮な選択培地を使って10～14日間細胞を培養します。
6. 非遺伝子導入コントロールウェルの細胞が完全に死滅したら、細胞を直ぐにクローン解析もしくはさらに増殖させることができます。
7. 選択された細胞集団が単一細胞からのクローンであることをより確かなものにするために、限界希釈法をもう一度行うことが推奨されます。通常、耐性遺伝子を組み込まなかった細胞は選択培養の開始から数日間で死滅します。耐性細胞の増殖は、通常選択培養の開始から2週間後に観察することができます。細胞によっては4週間かかるものもあります。G418は37℃で不安定になるため、10～14日後にG418を含む新しい培地を追加し、選択圧の損失を補完するよう推奨されます。1～2週間後にG418濃度を低下させた方がいい場合もあります。細胞は選択圧下で少なくとも3週間増殖させ、非耐性細胞の混入を防ぎます。ネガティブコントロールウェル（例：発現プラスミドなしのサンプル）は、光学顕微鏡下で観察し、細胞増殖が無いことを確認します。細胞型や細胞の増殖度合いによって異なりますが、選択培養期間は最長で計4～5週間以上に及びます。

■ 安定型クローンの分析

耐性クローンの同定後、細胞を増殖させて適切な分析方法（例：顕微鏡検査法、フローサイトメトリー、ELISA）で対象の遺伝子を解析します。ポジティブコントロール細胞の解析では、蛍光顕微鏡によって96ウェルプレートを観察します。

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

表2：トラブルシューティング

症状	解決策
一過性遺伝子導入効率が低くなっている。	最適な細胞密度は細胞型毎に決定してください。接着細胞では、遺伝子導入時の最適な細胞コンフルエンスは60～80%です。これより高い場合は、コンフルエンスが著しく低い場合と同様、細胞密度が原因で遺伝子導入効率が低下する場合があります。浮遊細胞は対数増殖段階にある細胞を使用する必要があります。 適切な遺伝子導入方法を選択します（例：遺伝子導入の困難な細胞株用Nucleofection™）。
遺伝子導入後24時間の細胞生存率は低くなっている。	DNA感受性が高いことが知られている細胞を使用する場合はDNA量を減らすようにしてください。細胞型に関してATCC®手順書で継代数、分割リズムおよび培地を確認してください。 適切な遺伝子導入方法を選択してください（例：遺伝子導入の難しい細胞株にはNucleofection™）。
G418を含まない場合であっても96ウェルプレートで遺伝子導入細胞が増殖しない。	細胞増殖の播種密度を再度調整し最適化します。調整しない場合でも、単一細胞増殖の最低細胞数を下回らないようにしてください。 使用する細胞型について、ATCC®手順書で継代数、分割リズムおよび培地を確認してください。接着細胞には平底プレートを使用し浮遊細胞には丸底プレートを使用してください。
96ウェルプレートの耐性クローン数が選択後に減少する。	遺伝子導入方法について、一過性遺伝子導入効率を確認してください（例：maxGFP™レポータータンパク質を対照として使用）。 DNAを増量して再度試みます。 単一細胞培養における最適な細胞増殖のためにG418量を再評価します。より低いG418濃度を試みます。 96ウェルプレートで最適な播種密度を再確認します。問題がなければウェル毎の細胞数を増やします。 遺伝子導入前に細胞の継代数とコンフルエンスを調整します。 適切な遺伝子導入方法を選択します（例：遺伝子導入の難しい細胞株にはNucleofection™）。
選択後、96ウェルプレートに多くの耐性クローンが非耐性細胞クローンと混在している。 クローンがネガティブコントロールプレートで増殖する。	遺伝子導入後、新鮮なG418選択培地で少なくとも14日間細胞を増殖させます。 最初のG418濃度調整で使ったものと同じG418バッチを使用してください。 96ウェルプレートでの最適なプレーティング密度を再確認します。正しければ、ウェル毎の細胞数を減らします。 G418濃度の調整、遺伝子導入および選択用の細胞については、継代数が同様になるようにしてください（差異は10以下とすること）。
クローンが選択後に増殖しない。	耐性クローンを回収する前に4～5週間培養し、培養拡大のために十分な細胞数を得るようにします。 最初のG418濃度調整に使用したものと同じG418バッチ（および濃度）を使用します。
クローンには耐性があるもののいくつかのクローンでは目的の遺伝子が発現しない。	可能な場合、一過性発現アッセイで対象の遺伝子の発現を確認するようにしてください。 遺伝子導入前にプラスミドの線形化を試みてください。これによって、組み込み中に目的の遺伝子が切断されるのを防ぐことができます。ATGおよび停止コドンについて、目的の遺伝子配列を確認してください。
ポジティブコントロールには多くの耐性クローンがあるものの目的の遺伝子には耐性がない。	目的の遺伝子が挿入されていることとシーケンシングや制限酵素によってプラスミドへの耐性マーカーが存在することを確認してください。発現される組み換えタンパク質が細胞にとって毒性があるか確認します。

参考文献

- Grimm S. [2004]. The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. Nature Rev Gen, 5: 179-189.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. [2003]. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science, 302: 415-419.
- Southern, P. J., Berg, P. [1982] Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter.
- J Mol Appl Genet, 1: 327-341.
- Wurm, F. M. [2004]. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnol, 22: 1393-1398.