

## MaxCyte STX—Scalability—

### 概要

遺伝子導入された均質な細胞の大量調製は、HCS /HTS(ハイコンテンツ/ハイスループットスクリーニング)、医薬候補のたんぱく質試作、そして細胞治療において重要性が増しつつあります。MaxCyteの電気穿孔システムは、生物活性測定系の開発やlead optimization\*等に必要とされる比較的少量( $5 \times 10^5$ 個)の細胞調製からライブラリースクリーニング、たんぱく質試作さらに細胞治療用に必要とされる大量( $\sim 10^{10}$ 個)の細胞調製と広範囲の処理スケールに対応しております。

他の遺伝子導入法による大量調製では、小スケール処理の繰り返しが必須で、また場合によってはプロトコルの再最適化も必要となり、結果として高価な専用試薬の大量使用を余儀なくされます。

MaxCyteの電気穿孔法は、処理スケールの違いがトランスフェクションの質(導入効率と細胞生存率)に影響をあたえず、結果として当該処理細胞を用いた安定した生物活性測定系構築を可能とします。さらに、小規模から大規模までシームレスで、さらなるトランスフェクションの最適化を必要としません。以下に代表的な3つ実施例を示します。

\*lead optimization(phase);創薬ではHit化合物から化学修飾等によりリード化合物群を生成させます。目標とする生物活性の増強、副作用を起こしかねない不要な活性の除去あるいは最小化、そして望ましい*in vivo*薬物動態を示唆する理化学的性状・代謝特性等を評価基準としてスクリーニングを行います。この開発工程を指してlead optimization (phase)と称します。

## MaxCyte STX—Scalability—

### 実施例 1 ; GPCR アゴニストに対する応答性はスケールアップで変化しない

現在、GPCR の活性化、受容体の阻害そしてシグナル伝達の評価に関して多くの方法が利用できます。これらの方法の多くが標的たんぱく質の過剰発現あるいは特異的な Gα サブユニットと人工的なカップリングなどの細胞改変が必要となります。一過性のトランスフェクション、特に MaxCyteSTX による電気穿孔法は、短時間で再現性良く大量の細胞に GPCR 遺伝子を導入することが出来ます。本法で得られた細胞は、非特異反応を最小限に抑えられ cAMP 調節やカルシウム流入などの GPCR アッセイにおいて適切な性能を発揮しております。

図 1 は、GPCR アッセイ用に GPCR 遺伝子をトランスフェクトした細胞の応答特性がその処理規模の大小で異なるかの検証結果をまとめたものです。MaxCyte 電気穿孔法で処理された HEK293F 細胞はその処理規模（細胞数）の大小にかかわらず GPCR リガンドに対して類似の用量依存的な cAMP 産生応答を示しました。この結果は MaxCyteSTX が GPCR 標的医薬開発のための HTS/HCS に必要とされる均質で大量の細胞調製に適していること

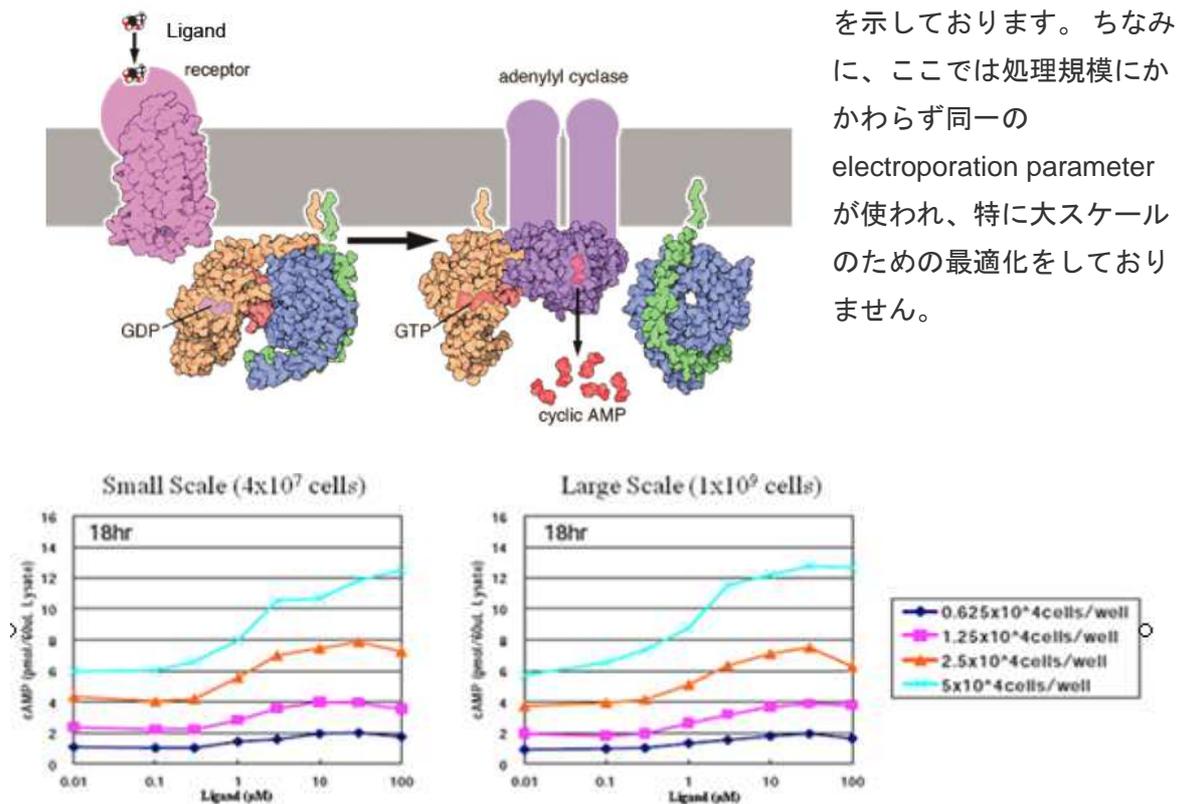


図 1. 小量処理と大量処理で調製した 2 群の細胞の cAMP GPCR アッセイにおける応答性比較

HEK 293F 細胞を MaxCyte 電気穿孔用緩衝液に 1x10<sup>8</sup> 個/mL の細胞密度で懸濁し、GPCR 発現プラスミッド (100 μg/mL) を加えフロー型（大量処理）あるいは静止型（小量処理）の MaxCyte 電気穿孔アセンブリを用いトランスフェクトした。調製後 18 時間を経過した二群の処理細胞に 0.01-100uM の 8 濃度の GPCR リガンドを加え、GPCR 活性化レベルを cAMP 産生量で評価した。

## MaxCyte STX—Scalability—

### 実施例 2； MaxCyteSTX の少量あるいは大量処理法で得られた二群の一過性発現細胞と同一標的遺伝子を安定発現している細胞株の性能比較

MaxCyte 電気穿孔法の Scalability（スケール拡張性）を示すため HCS による PI3 キナーゼアッセイを PI3P 結合たんぱく質 eGFP-2XFYVE の遺伝子を含む発現プラスミッドのトランスフェクトを大小 2 種類（各々 LSEP と SCEP と略す）のスケールで行いました。対照として同遺伝子を安定発現している細胞株を用いております。PI3 キナーゼ阻害剤 wortmannin による EC50 値はこれら 3 種類の細胞群間で有意な差が認められません（図 2）。この結果は、安定発現細胞と比べに遜色のない性能を持つ  $\sim 10^{10}$  個の細胞の調製が MaxCyte STX で可能であること及びその結果、時間とコストがかかる安定発現系に依存しない研究計画を立案できることを示しております。

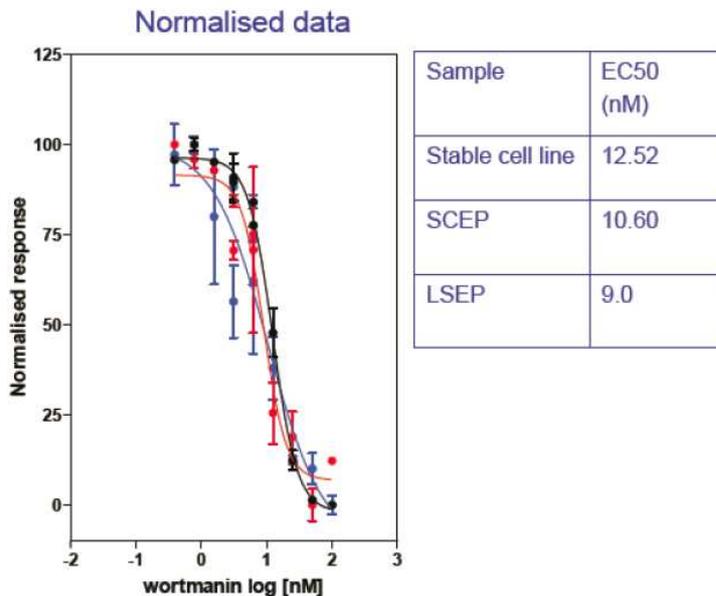
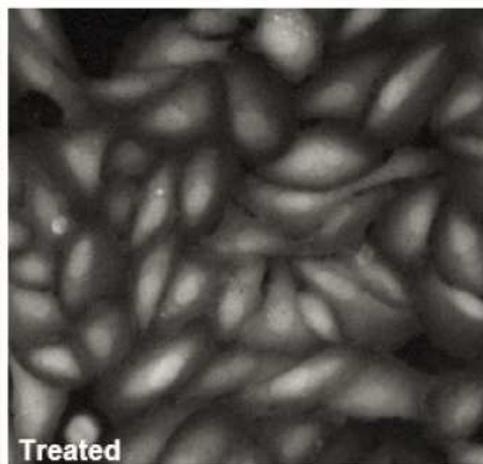
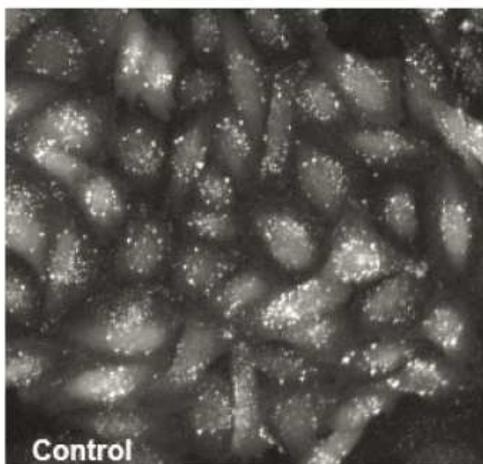


図 2. PI3P 結合ドメイン (2XFYVE) と eGFP の融合たんぱく質遺伝子を含むプラスミッドを導入した細胞を調製した。PI3 キナーゼにより、この GFP 融合たんぱく質はエンドソームに局在化し、顆粒として検出される。PI3 キナーゼの阻害により蛍光が細胞質に再分布される。被験細胞 3 種（eGFP-2XFYVE の LSEP 処理、SCEP 処理および安定発現細胞）を 30 分間 wortmannin で処理し、PI3 キナーゼ活性を画像解析（HCS）で評価した。

Untreated cell: eGFP-2XFYVE is concentrated in endosomes

Treated cell: eGFP-2XFYVE is redistributed to the cytoplasm



## MaxCyte STX—Scalability—

### 実施例 3； 核内受容体阻害剤のアッセイ系を用いた Scalability の検証

Jurkat 細胞に核内受容体アッセイのため GAL4 結合部位を含むレポーター遺伝子プラスミッドおよび GAL4DNA 結合ドメイン-核内受容体のリガンド結合部位の融合たんぱく質をコードするプラスミッドの 2 種を同時導入しました。同じ電気穿孔プロトコールで調製した大量処理 (CL-2) と小量処理 (OC-400) の二群の被験細胞に対して既知の核内受容体阻害剤処理後 luciferase レポーター遺伝子の発現レベルのアッセイを行ったところ、Signal-to-background (S/B) 比および阻害剤の EC50 は二群間で同等の結果を得ました。MaxCyte 電気穿孔法の性能安定性と scalability (トランスフェクション処理スケールの大小にかかわらず被験細胞の性能の同等性) が本実施例でも実証されております。

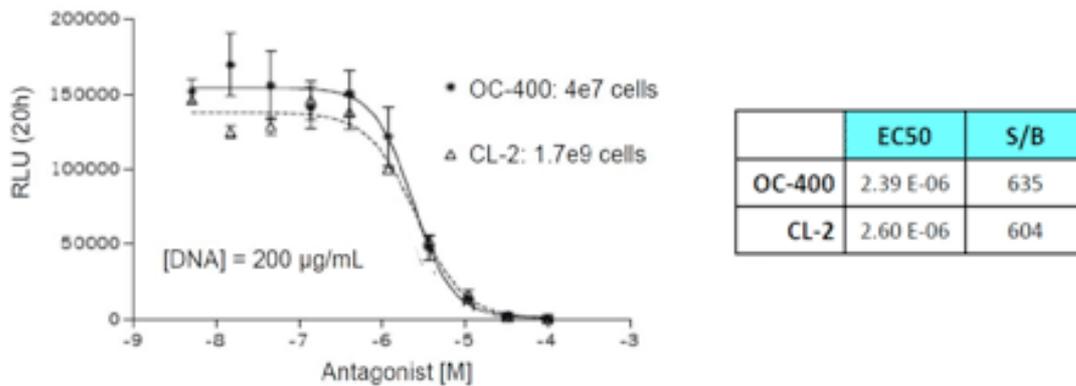


図 3. Scale up of a dual plasmid nuclear receptor assay. Jurkat 細胞を、2 種類計 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のプラスミッド (Promega 社 pGL4.31[*luc2P*/GAL4UAS/Hygro] および pBIND) を添加した MaxCyte 電気穿孔用緩衝液に懸濁した。OC-400 アセンブリを用い  $4 \times 10^7$  個の細胞を、CL-2 センブリでは  $1.7 \times 10^9$  個の細胞をトランスフェクション処理した。細胞は処理 30 後に凍結保存した。翌日、融解・洗浄し、各種濃度の核内阻害剤を添加したアッセイ用培地に懸濁した細胞をアッセイ用プレートに播き Luciferase reporter gene アッセイを行った。誤差バーは同一濃度 3 ウェルの標準偏差を示す。

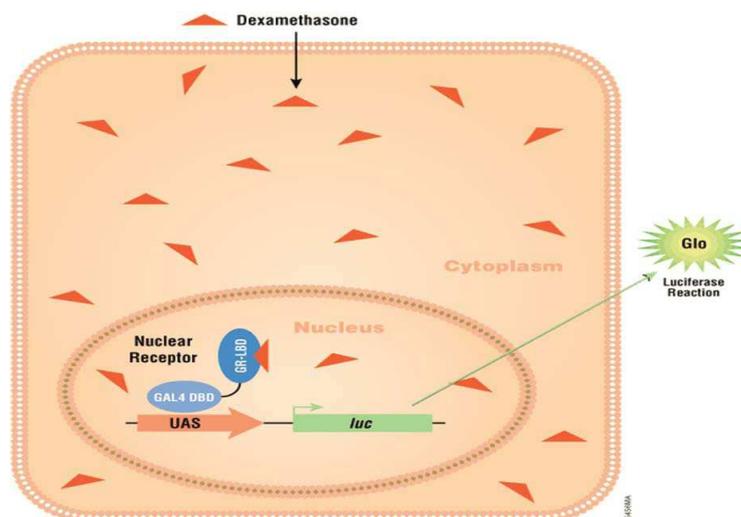


図 4. 遺伝子導入された被験細胞の概念図