

HEK293 細胞株の高密度培養および効率的な一過性トランスフェクションのための無血清培地の最適化

Gerald D. McEwen, Christopher B. Bitner, Kalle Johnson, and Mark E. Wight

GE Healthcare Life Sciences, 925 West 1800 South, Logan, Utah 84321, USA

要約

バイオ医薬品業界では頻りに、一過性遺伝子発現 (TGE) を用いた組換えタンパク質が、構造的・機能的なさまざまな特性の評価および臨床評価等の目的で作られています。これらの技術は、目的の遺伝子をヒト胎児腎臓 (HEK293) 細胞に迅速に導入することを必要とします。多くの場合、このような遺伝子導入は、組換え DNA をトランスフェクション試薬と複合体化することによって行われます。複合体形成プロセスおよびその後の細胞への導入は、培地成分によって阻害、消滅することが多いため、遺伝子導入時には非常に栄養成分の少ない無血清培地を用い、タンパク質生産用には別の培地を用いるようになりました。本ポスターでは、増殖および一過性トランスフェクションの両方を目的とした無血清培地組成の開発をするための実験計画法 (DoE) による培地組成デザインおよびハイスループットスクリーニング (HTS) 技術の使用法について紹介します。分子量 25,000 の直鎖状ポリエチレンイミン (PEI) およびリポソームベースのトランスフェクション法などの、従来のトランスフェクション試薬および技術を使用し、今回使用した培地組成内で非常に高いトランスフェクション効率およびタンパク質力価が得られたことを示しています。

材料および方法

細胞培養

浮遊化 HEK293E および HEK293F 細胞を、HyCell TransFx-H トランスフェクション培地および比較用培地を 125 mL 振とうフラスコで培養しました。培養液を、オービタルシェーカー (軌道 19 mm) で約 120 rpm で一定に攪拌しながら、37°C、5% CO₂ で培養しました。

培地

無血清で動物由来成分不含の HyCell TransFx-H をトランスフェクションおよび増殖培地として使用しました。比較対象の培地として、一般的にトランスフェクション培地として使用されている市販の FreeStyle 293 (Life Technologies) (Comp1) および Expi293 (Life Technologies) (Comp2) を使用しました。

予備培地スクリーニングおよび分析

HEK 細胞株と相性のよいことが知られているプロトタイプファミリーからベース培地を選択しました。培地に 4 mM の HyClone L- グルタミン溶液 (SH30034.01) を添加し、生存率が 80% を下回るまでバッチ培養で細胞を増殖させました。増殖曲線および生存率を確認して、HEK 細胞株を高細胞密度で培養できるベース培地を選択しました。

DoE 培地組成デザイン

各細胞株のベース培地スクリーニングから選択された上位 3 種のプロトタイプを用いて、培地組成の DoE シンプレックスデザイン研究を設計しました。 JMP 統計ソフトウェアを使用して組成条件を作成しました。研究結果は 21 の条件およびコントロール培地から構成しました。

HTS 細胞培養

3 つの HEK293 細胞株の実験 (n = 6) を DoE 培地組成条件で検討しました。細胞および培地 (全量 1 mL) を Microlab ID STARlet を用いて 96 ディープウェル細胞培養プレートに播種しました。1,000 rpm に設定されたオービタルシェーカー (軌道 3 mm) 上で、37°C、5% CO₂ でプレート培養しました。96 ディープウェル細胞培養プレート内の培養液を、Precision 液体ハンドラーを用いて底部が透明な 200 μL の 96 ウェルプレートに回収しました。トリパンブルーを含むリン酸緩衝生理食塩水を、Multidrop Combi プレートスタンパー (Thermo Scientific) を用いて回収した細胞に添加しました。Cellavista イメージングシステムを用い、トリパンブルー色素排除法により細胞を数えました。

バッチ培養検討および分析

プロトタイプ培地すべてに 4 mM の L- グルタミンを添加し、生存率が 80% を下回るまでバッチ培養で増殖させました。21 のプロトタイプとコントロール培地に対する増殖および生存率曲線を作成しました。各条件についてピーク生細胞密度 (PVCD) と積分生細胞面積 (IVCA) を生成し、生産量 (図示なし) と比較しました。

一過性トランスフェクション

トランスフェクション複合体の添加前に、対数増殖する細胞約 0.5 × 10⁶ cells/mL を 35 mL の培地と共に振とうフラスコ内に播種し、約 120 rpm で 24 時間絶えず攪拌しながら 37°C、5% CO₂ で培養しました。この方法で、トランスフェクション時に培養細胞が約 1.0 × 10⁶ cells/mL で対数増殖期となるようにしました。分子量 25,000 の直鎖状 PEI (Polysciences、コード番号 23966) の懸濁液を、GFP 発現ベクター (Genlantis、コード番号 040400) または β gal (Genlantis、コード番号 010200) を含むプラスミド DNA と 3 : 1 (w/w) の比で混合しました。試薬 / DNA ポリプレックスを形成するために、PEI および DNA を室温 (約 22°C) で 20 分間インキュベートしました。試薬 / DNA 複合体を細胞培養液に滴下して添加しました。トランスフェクションの 24 時間後と 48 時間後にサンプルを採取して、BD Accuri C6 フローサイトメーターを用いて GFP 発現効率を評価しました。β gal 分析のため、培養終了 (<80% 生存) まで 24 時間ごとにサンプルを採取しました。

結果

TransFx-H で培養およびトランスフェクトされた細胞のトランスフェクション効率を比較対象の培地と比較しました。三角図は、シンプレックス格子デザインで 3 種のプロトタイプ培地をさまざまな比率で組成調製した際の性能を示しています (図 1)。赤色斜線部は、HEK293 細胞の PVCD および IVCA に対する予測最適培地組成を示しています。星印は、3 種のプロトタイプで選択された組成比率を示しています。HyCell TransFx-H の最終的な組成はすべての HEK293 (E, F) 細胞株からのデータ分析をもとにしました。図 2 は、HyCell TransFx-H と比較対象培地中で Lipofectamine および PEI を用いた GFP トランスフェクション効率を示しています。図 3A、4A は、Lipofectamine トランスフェクション後の HEK293

(E, F) の増殖および生存率を示しています。図 3B、4B は、HEK293 (E, F) 内で Lipofectamine を用いた β gal のピークトランスフェクション効率を示しています。図 5A、6A は、PEI トランスフェクション後の HEK293 (E, F) の増殖および生存率曲線を示しています。図 5B、6B は、HEK293 (E, F) 内で PEI を用いた β gal のピークトランスフェクション効率を示しています。



図 1. HTS のワークフロー。

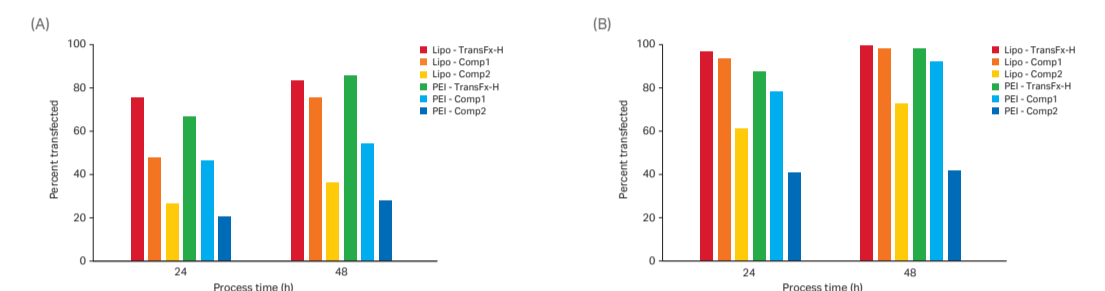


図 2. (A) HEK293E、(B) HEK293F においてリポフェクタミンおよび PEI を用いて発現された GFP のトランスフェクション効率。

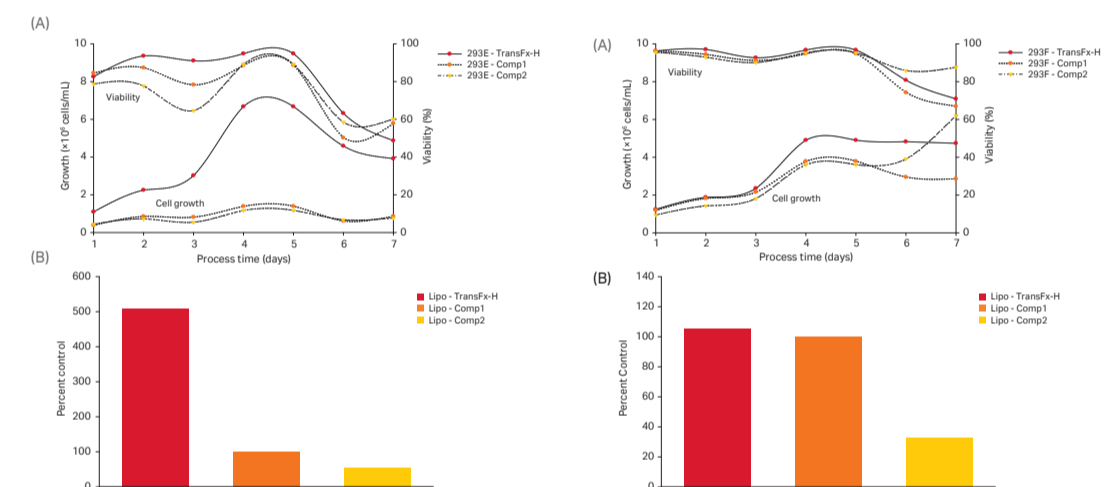


図 3. Comp1 をコントロール (100%) とした場合の (A) HEK293E の増殖および生存率曲線、(B) Lipofectamine の β gal トランスフェクション効率。

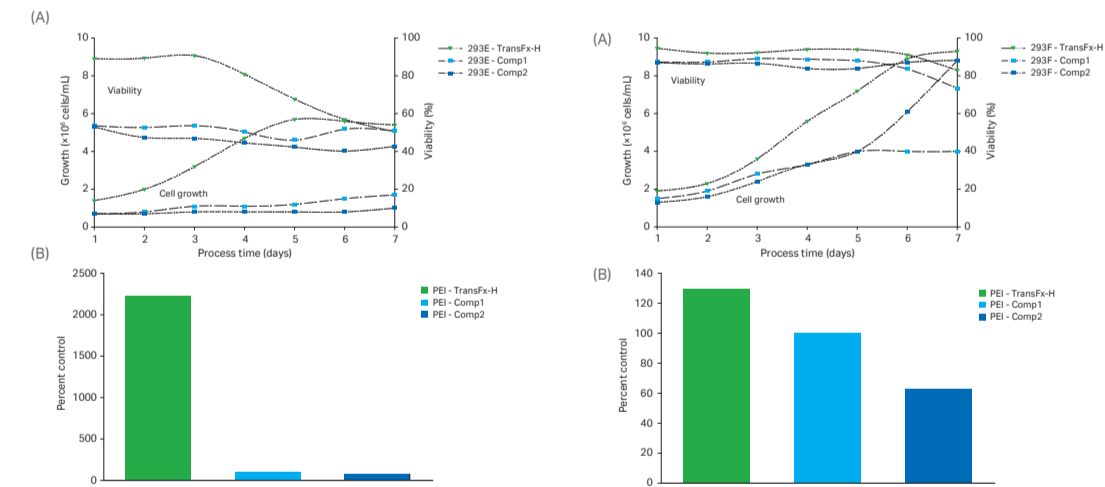


図 4. Comp1 をコントロール (100%) とした場合の (A) HEK293F の増殖および生存率曲線、(B) Lipofectamine の β gal トランスフェクション効率。

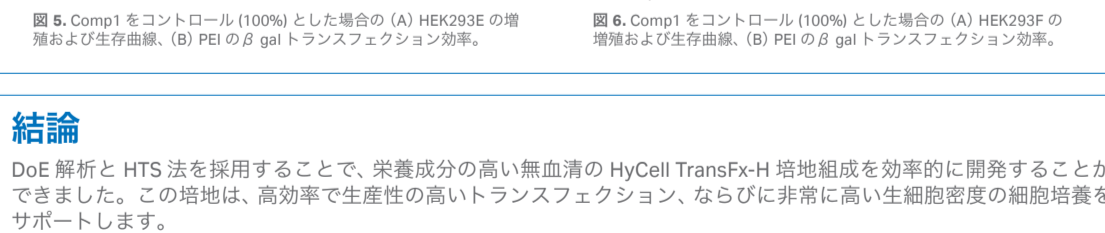


図 5. Comp1 をコントロール (100%) とした場合の (A) HEK293E の増殖および生存率曲線、(B) PEI の β gal トランスフェクション効率。

図 6. Comp1 をコントロール (100%) とした場合の (A) HEK293F の増殖および生存率曲線、(B) PEI の β gal トランスフェクション効率。

結論

DoE 解析と HTS 法を採用することで、栄養成分の高い無血清の HyCell TransFx-H 培地組成を効率的に開発することができました。この培地は、高効率で生産性の高いトランスフェクション、ならびに非常に高い生細胞密度の細胞培養をサポートします。

※記載されている所属は、執筆/取材当時のものです。

Cytiva (サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジー株式会社
〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング
お問合せ: バイオダイレクトライン
TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370
e-mail: Tech-JP@cytiva.com



掲載されている内容および価格は 2019 年 2 月現在のものです。価格は希望小売価格 (消費税は含まれておりません) であり、単なる参考価格のため、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客様よりいただいた情報は、お客様への回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。