

## Nanovialが可能にする分泌物ベースでのハイスループットシングルセルスクリーニング

(カリフォルニア大学バイオエンジニアリング分野 Joseph de Rutte, Dino Di Carlo教授)

### Suspendable Hydrogel Nanovials for Massively Parallel Single-Cell Functional Analysis and Sorting

ACS Nano 2022, 16, 5, 7242–7257, March 24, 2022

<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c11420>

### Introduction

表面抗原を指標とした細胞の解析とセルソーティング技術の進歩は、細胞生物学分野において重要な発見をもたらし、その進歩に大きく貢献してきました。しかし、サイトカインや抗体の分泌を指標とした解析を行うには細胞内染色が必要であるため、細胞を生きた状態でソーティングするのは難しいのが現状です。

Nanovialは内腔を持つマイクロビーズで、様々な担体で修飾することで細胞や分泌物をその内腔に保持することが可能です。この内腔は開放系であるため細胞の培養、試薬の添加や洗浄が容易である一方、オイル中に拡散させ、エマルジョン状態にしておけば分泌物の拡散やサンプル間のクロストークを防ぐこともできます。シングルセルを内腔に保持したまま、培養、洗浄ができるNanovialは、「ソーティング可能なマイクロウェル」として機能することで、ELISA等のバイオアッセイのシグナルを指標にしたセルソーターでのハイスループットな解析、ソーティングを可能にします。

細胞療法や抗体医薬品などの生物製剤のさらなる発展には、細胞からの分泌物を指標としたシングルセル解析とスクリーニングが必須です。本アプリケーションノートでは、抗体産生細胞のスクリーニング、免疫マウスからの抗原特異的なB細胞のスクリーニングを例に、Nanovialがそのニーズに応える非常に強力なツールであることをご紹介いたします。

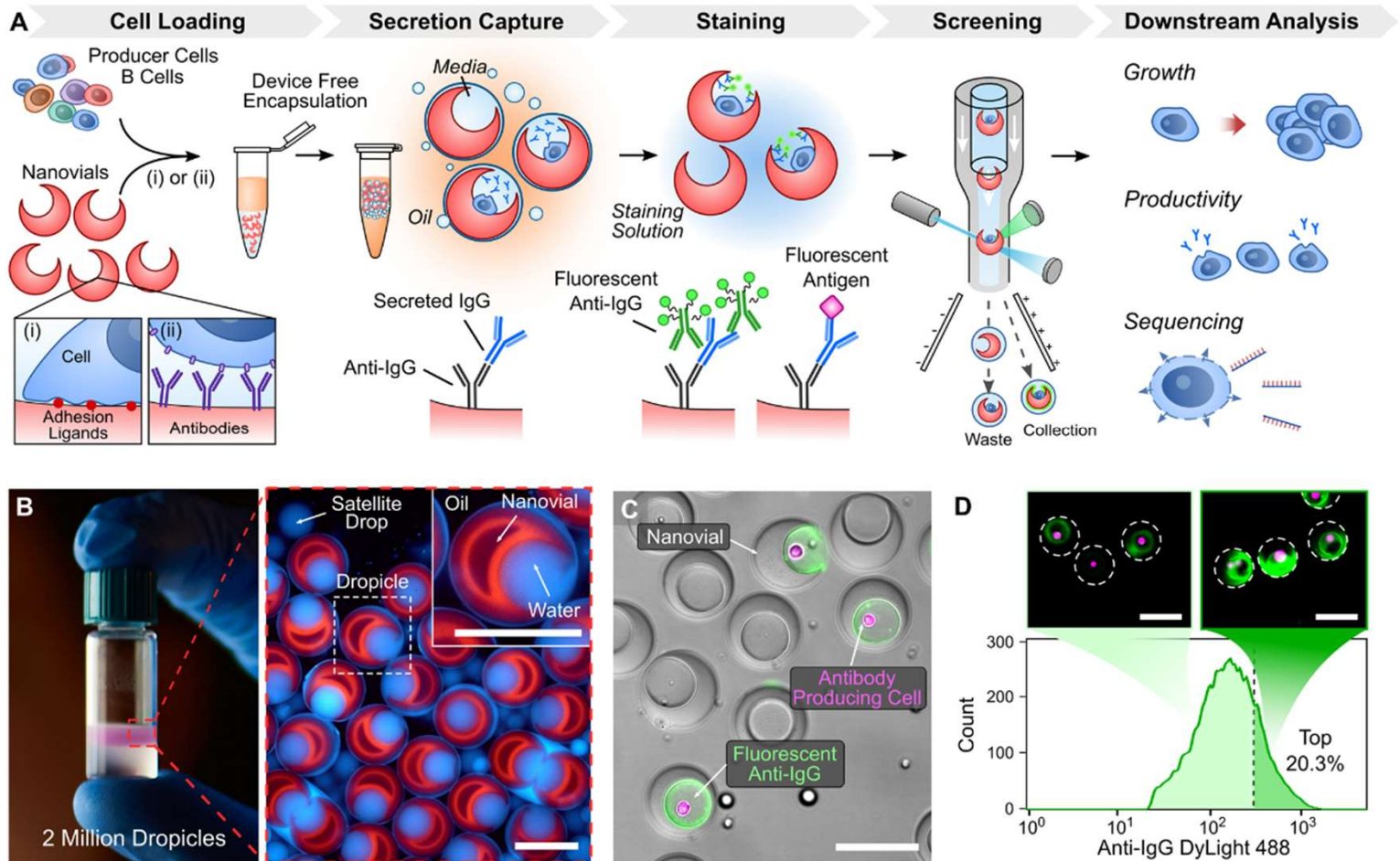


図1. Nanovialを用いた細胞からの分泌物を指標とするハイスループットスクリーニング法

(A) Nanovialを用いた抗体産生細胞スクリーニングのワークフロー図 (B) 油中水滴型エマルジョンにしたNanovialとその拡大図 (C) Nanovial中に保持された抗体産生細胞と、分泌された抗体の蛍光染色図 (D) フローサイトでのプロット図と各フラクションをソートした後の蛍光顕微鏡写真。

## Nanovial内腔への細胞の導入

培養液中に懸濁したNanovialは、その重心の偏りから内腔を上に向けて沈降していきます。その結果、培養プレート上には内腔が上を向いたNanovialの単層が形成されます。その上から細胞懸濁液を加える事で、細胞は内腔に向かって沈降していきます。内腔に取り込まれた細胞は修飾されていた担体を介してNanovialと強固に結合します。(図2. A)

この担体は細胞種に合わせて選択が可能です。例として、細胞接着分子であるフィブロネクチンの一部であり接着に重要なRGDモチーフやPoly-L-Lysinによる静電的結合、細胞外タンパク質をビオチン化した上でのストレプトアビジンを介した接着、さらには抗CD45抗体のような表面抗原を担体とした特定の細胞のみの吸着など、様々な方法で内腔に細胞を留めておくことが確認されています。(図2. B) 実際に接着細胞であるCHO DP-12細胞ではRGDによってその吸着は最大になるのに対し、浮遊培養に適応させたExpiCHO細胞の吸着にはRGD修飾のみでは不十分でPLLコートを組み合わせる必要があります。また、PLLでは吸着できなかったB細胞もCD45やCD19、その組み合わせによって効率よく吸着できることも確認されています。加えて細胞の表面タンパク質をビオチン化し、それによってビオチン-ストレプトアビジンを利用した細胞の吸着が可能であることもHEK293細胞を用いて確認されています。(図2. C)

細胞はポアソン分布に沿ってNanovialの内腔へ取り込まれます。(図2. D) したがって $\lambda \approx 0.1$ になるように細胞濃度を適切に調整することにより、シングルセル解析のために必要なNanovial1粒子に1細胞が吸着している状態を作り出すことができます。

以上の結果は、Nanovialが幅広い細胞に対して適応のある、極めて優れたシングルセル解析のプラットフォームであることを示しています。

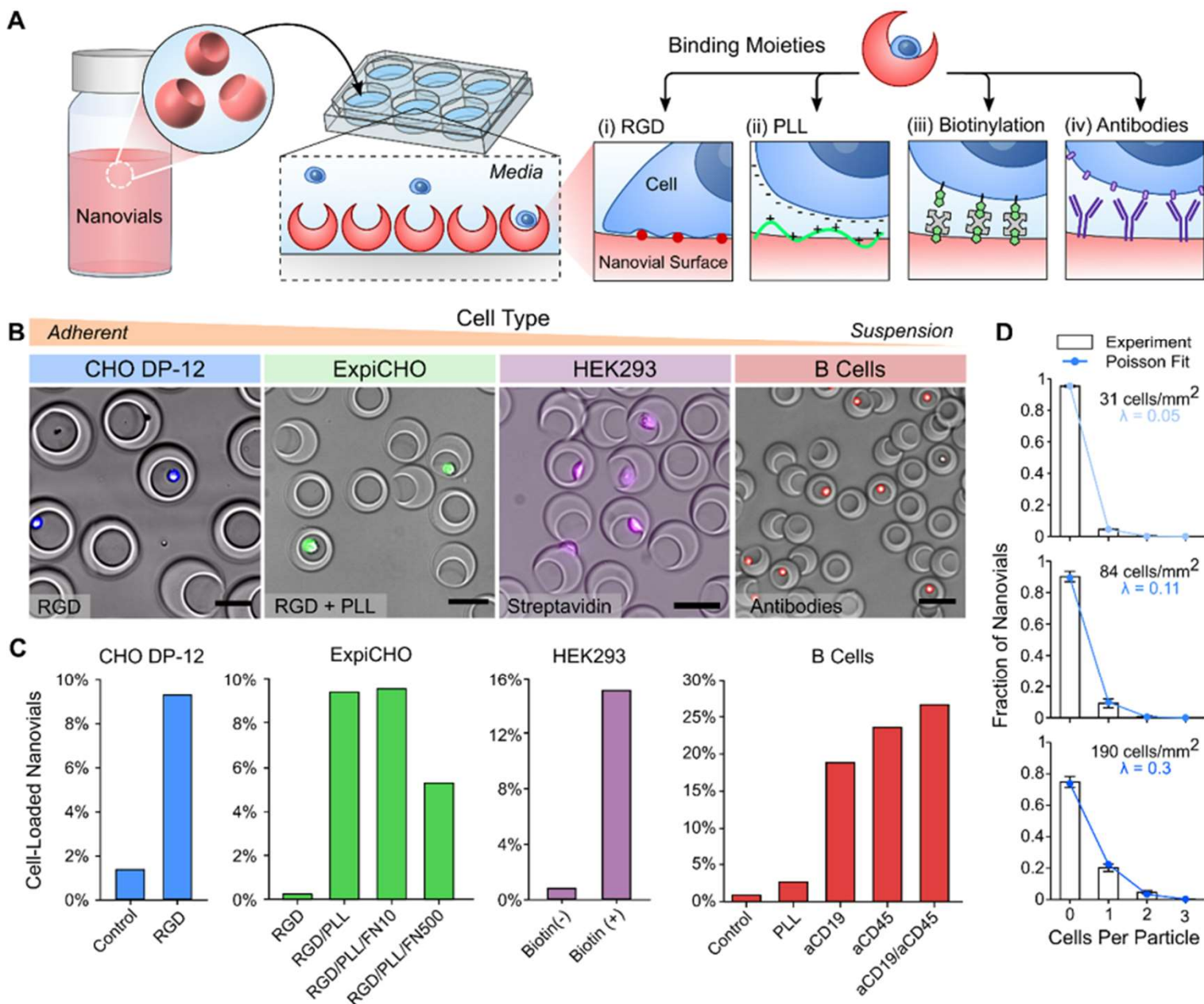


図2. Nanovialへの細胞の導入と修飾された担体を介した吸着

(A) Nanovial内腔への細胞の導入と担体を介した吸着 (B) Nanovial内腔に固着した細胞の蛍光顕微鏡図 (C) 修飾した担体の違いによる細胞の吸着効率の違い (D) 細胞濃度とNanovial内腔に入る細胞数の関連性とポアソン分布

# Nanovialのエマルジョン化と分泌物解析・ソーティング

Nanovialの内腔は開放系であり、捉えた細胞から分泌された物質は水相に拡散してしまいます。これを防ぎ、一つのNanovialの中で細胞と分泌物を1:1対応させるため、オイルでのコーティングを行います。Nanovialは十分な強度があるため、界面活性剤を含むオイルを重層し、1分間ピペティングすることによって、簡単に内腔に培地を含んだままの状態でもエマルジョン化します。(図3. A)

ヒト抗体産生CHO細胞を含むNanovialをエマルジョン状態で数時間培養した後、オイル相を除去し抗IgG抗体で染色したところ、細胞を含むNanovialのみが蛍光を発していることが確認できました。これはオイルでの封入が分泌物の拡散を防ぎ、偽陽性のNanovialの発生を防いでいることを強く示唆しています。(図3. B) 実際にヒト抗体産生CHO細胞と野生型CHO細胞を1:1000で混合しソーティングを実施したところ、85~99%の純度で陽性細胞を回収し、その濃縮率は850倍にもなりました。(図3. C)

加えてその蛍光強度は分泌物の産生量と比例することも明らかになっています。陽性群の中で蛍光が強い上位20%の群とそれ以外に分けてソーティングを行い、それぞれを10日間培養した結果、上位20%の群は陽性細胞の中でも特に強い抗体産生能を持つことが確認されました。(図3. D-F)

このように、エマルジョン化による細胞と分泌物の1:1対応、担体修飾による細胞と分泌物の内腔への吸着、それによって可能となった二次抗体染色と洗浄、これらを可能にするNanovialの特性が“分泌物を指標としたソーティング”を現実のものとししました。

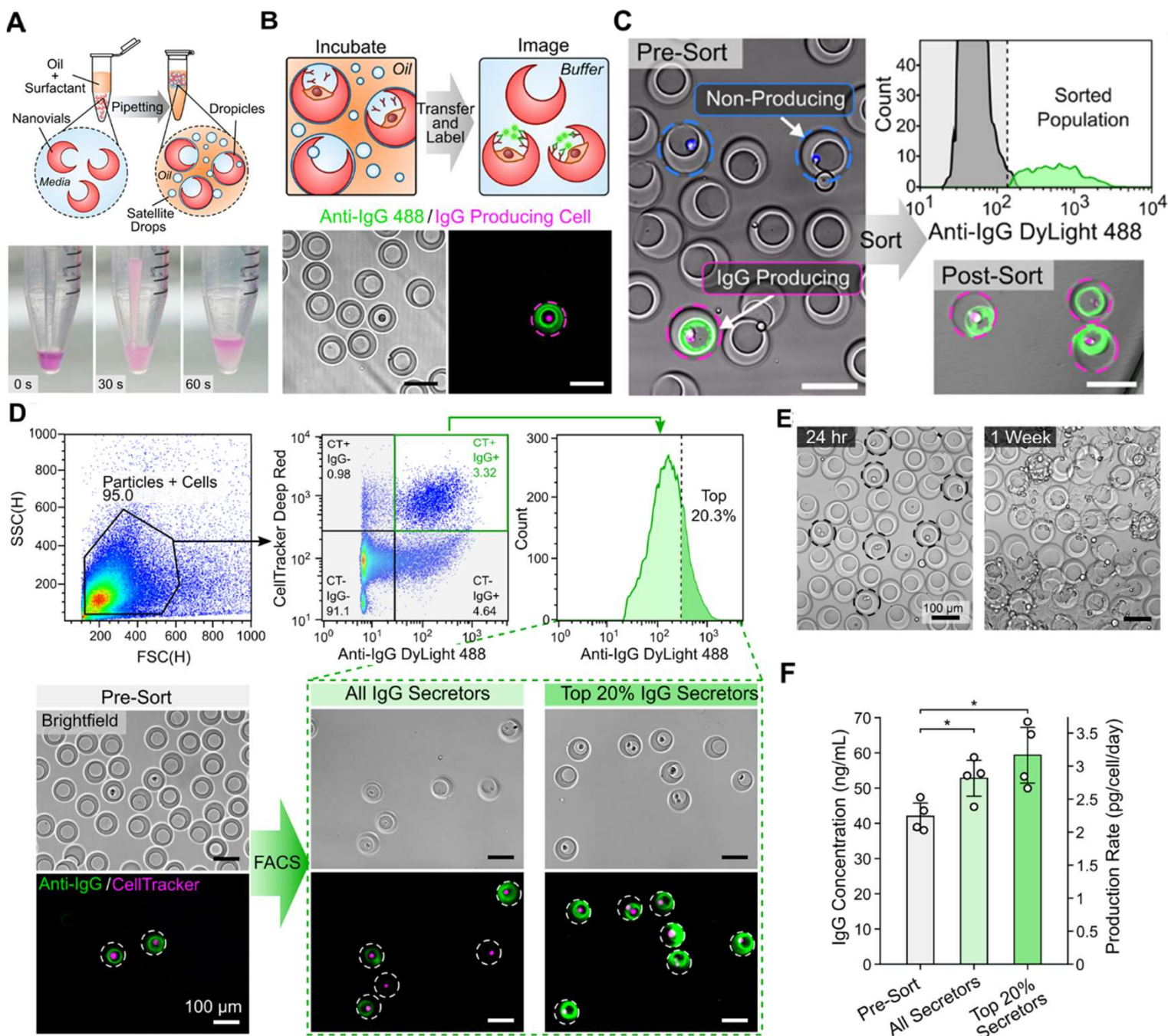


図3. Nanovialのエマルジョン化によるシングルセル分泌物解析とソーティングの検討

(A) ピペティングによるNanovialのエマルジョン化 (B) エマルジョン内部での細胞培養と分泌物の内腔への吸着、二次抗体による染色 (C) NanovialとBioSorter(Unionbio社)を用いた抗体産生細胞のソーティング (D) NanovialとOn-chip® Sortを用いた抗体産生細胞の解析と高産生細胞のスクリーニング (E) ソート後サンプルの培養像 (F) ソート前後の各サンプル間における培養上清中の抗体産生量の違い

# Nanovialを用いた抗原特異的抗体を産生する細胞スクリーニングの実例

Nanovialは抗原特異的な抗体とその産生細胞をスクリーニングすることもできます。卵白リゾチームを産生するハイブリドーマであるHyHEL-5株と抗Myc-tag抗体を産生する9E10株を混合し、ビオチンと抗CD45抗体で修飾したNanovialに吸着させます。産生された抗体はストレプトアビジンを介して結合させた抗マウスHC&LC抗体で捉えます。この中からHyHEL-5のみをスクリーニングするため、蛍光標識した卵白リゾチームを反応させます。(図4. A, B) この手法により、100万個以上の母集団に0.18%しか含まなかった抗卵白リゾチーム抗体産生細胞を90%の純度でソーティングすることに成功しています。(図4. C) また、ソーティングした細胞は、RT-PCRによる抗体遺伝子の増幅、拡大培養がそれぞれ可能であることも確認できています。(図4. D)

目的の抗体を産生するB細胞を免疫したマウスからソーティングすることも可能です。実際にOVAを免疫したマウスのB細胞をNanovialと蛍光OVAを組み合わせて解析、ソーティングしたところ、蛍光強度が強い上位2%の集団の中に細胞表面に強いシグナルがあるもの、細胞表面にシグナルは無いがNanovialから強いシグナルを発するもの等、様々な陽性Nanovialが含まれていました。これは既存のBCRと抗原の結合を利用した抗原特異的なB細胞のスクリーニングでは捉えることのできなかつた、より分化したプラズマ細胞も検出できていることを強く示唆しています。(図4. E)

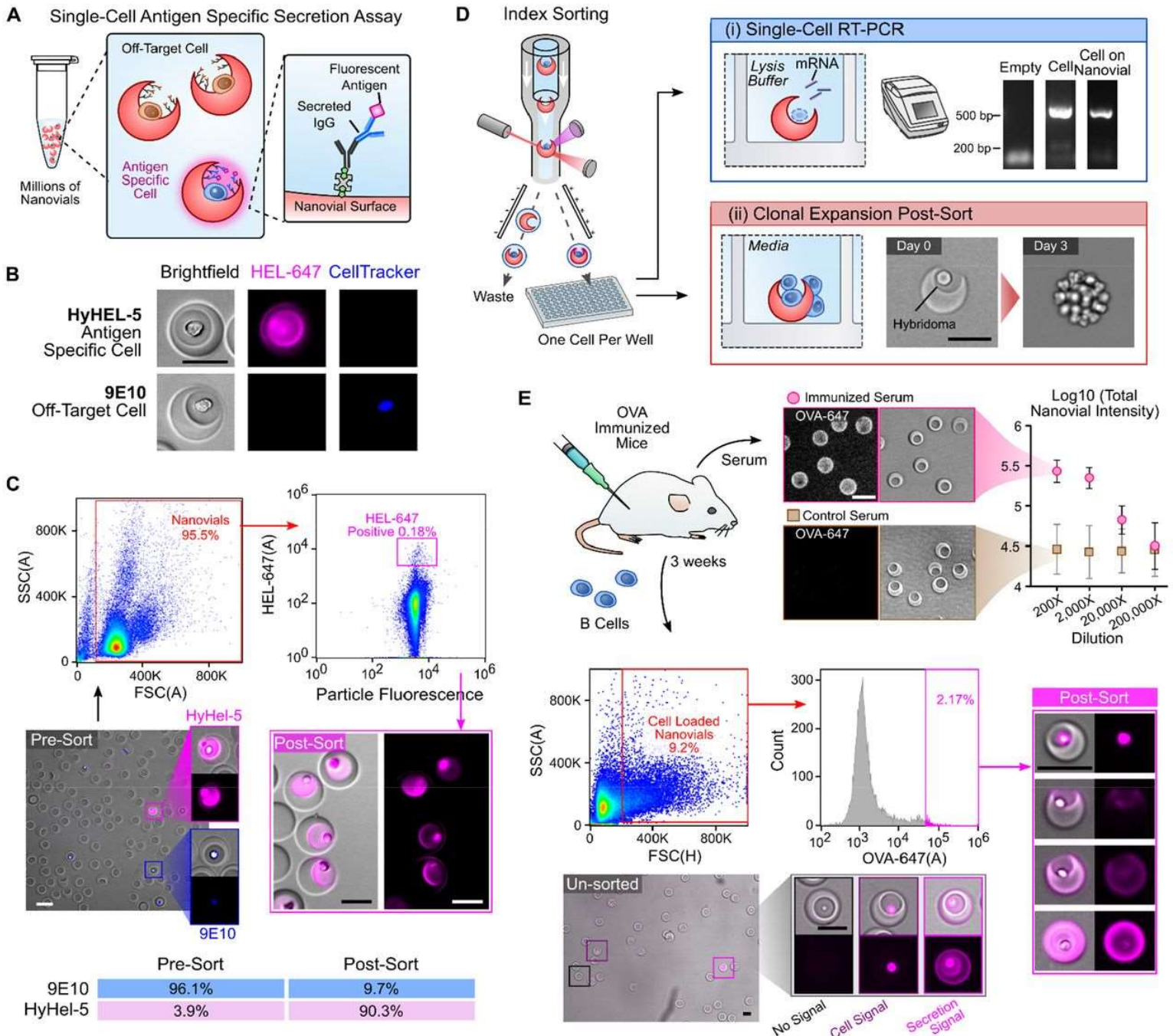


図4. Nanovialを用いた抗原特異的な抗体産生細胞のスクリーニング

(A) 蛍光抗原を用いた抗原特異的な抗体産生細胞スクリーニングの模式図 (B-D) HyHEL-5と蛍光標識抗原をモデルとした目的抗体を産生する細胞の検出 (C) ならびに解析、ソーティング結果と (D) RT-PCRによる抗体遺伝子の増幅、拡大培養の実例 (SH800; Sony社) (E) OVA免疫マウスにおける血清中の抗OVA抗体の検出と抗OVA産生B細胞のスクリーニング