



CHO-K1細胞の シングルセルクローニング

はじめに

シングルセルクローニングは、抗体医薬の開発など、細胞株を作製する研究開発分野において非常に重要な手法です。遺伝子導入・編集された細胞は培養プレートへ限界希釈法により播種されます。通常、播種された細胞が形成するコロニーが単クローン性かどうかは、顕微鏡などによって評価されるため、信頼性に乏しく、労力がかかります。

Cell3iMager NXは、コロニーの単クローン性や増殖性を評価するための機能を備えており、簡便かつ迅速にシングルセルクローニングを実施することが可能です。また、監査証跡、操作権限管理など、セキュリティ管理が可能です。本稿では、抗体医薬などの開発及び生産に汎用されるCHO-K1細胞を用いたアプリケーション例を紹介します。細胞を経時的に撮像し、形成したコロニーから播種直後まで遡り、単クローン性を評価しました。

Materials&Methods

使用製品

Cell3iMager NX

Deep Learningプラグイン

ディスペンサー

NichiMartCUBE(ニチリョー)

サンプルおよび試薬

CHO-K1細胞(ATCC)

F-12K培地(ATCC)

FBS(Biosera)

ペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク)

96ウェルプレートF底(CORNING)

方法

10cmディッシュで培養したCHO-K1細胞をTrypsin/ED-TAで剥離し、限界希釈法により2cells/well、1cell/well、0.5cell/wellとなるように細胞数を調整してから、96ウェルプレートへ細胞ディスペンサーを用いて播種しました。播種直後(Day0)および定期的にCell3iMager NXの対物レンズ10倍で明視野撮像を行いました。(図1)

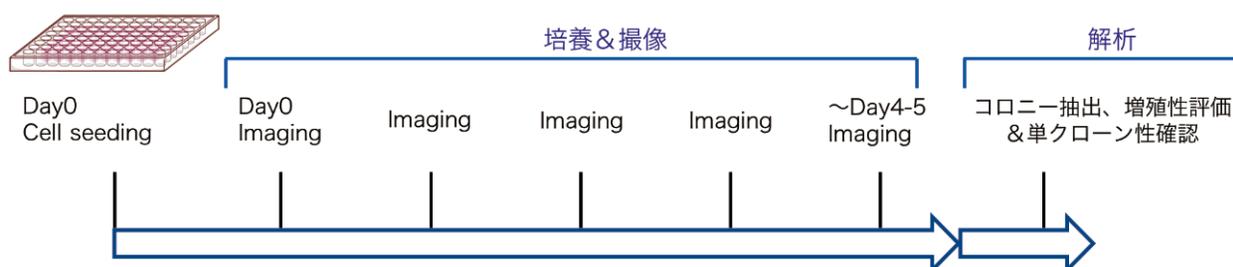


図1：撮像・解析のフロー

次に、付属ソフトウェアであるディープラーニング解析機能を用いて、画像中のCHO-K1細胞のコロニーを抽出しました。コロニー部分をラベルし、教師データを作成しました。さらに、作成した教師データのセットを用いて学習を1時間行い、モデルを作成しました。モデルを撮像した画像に適用することにより、照明の明暗やデブリなどによる影響を受けずに正

確にコロニーのみをセグメンテーションすることができます。セグメンテーションされたコロニーについて、面積などの特徴量やウェル内の位置の把握が可能となります。(図2)なお、一度モデルを作成すると繰り返し使えるため、同様の実験を繰り返す場合、モデル作成の手間を省くことができます。



図2: コロニーのセグメンテーションと特徴量

結果

コロニーのセグメンテーション

96ウェルプレートに各播種密度で播種し、経時的 (Day0、1、4、5) に撮像しました。撮像時のフォーカス位置の設定は、200cells/wellで播種したウェルを用いて決定しました。フォーカス位置の±5µmの位置も撮像し、スタッキングすることによってより鮮明な画像を取得できます。各播種密度で播種したDay5のウェルプレートについて、コロニーをセグメンテーションし、各ウェルに含まれるコロニー数をヒートマップ表示しました。(図3) 単クローン性を一目

で把握することができます。また、Crop Object機能を用いることによって、コロニーの位置に基づいて経時的な画像を自動切り出しすることが可能です。さらに、ウェルプレート内でコロニーの位置が強調表示されます。Time Course機能を用いることによって、同一プレートの同一箇所が経時的に表示されます。(図4) Day5のコロニーからDay0の播種直後まで遡ると、単クローン性を判定できます。(図5)

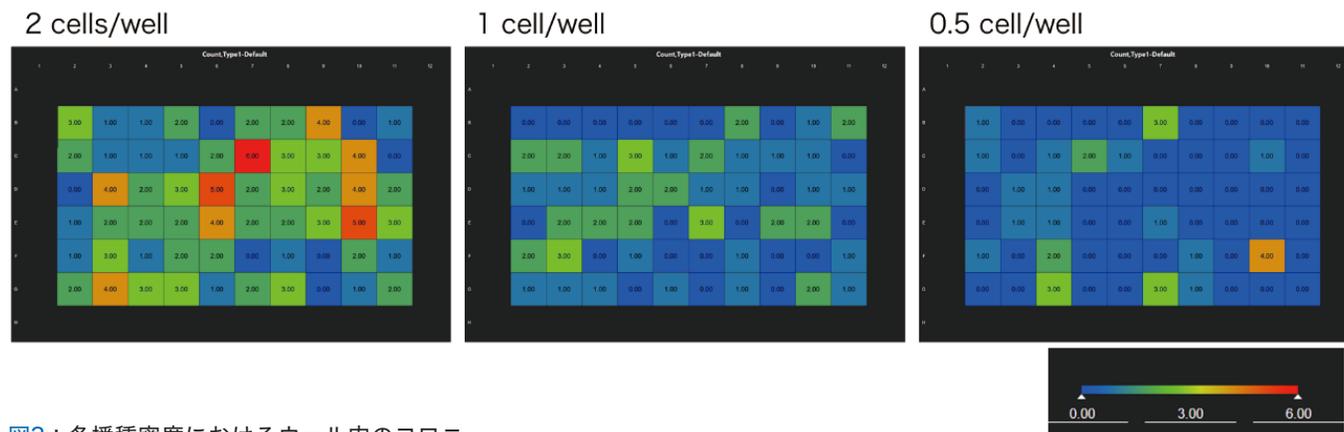


図3: 各播種密度におけるウェル内のコロニー

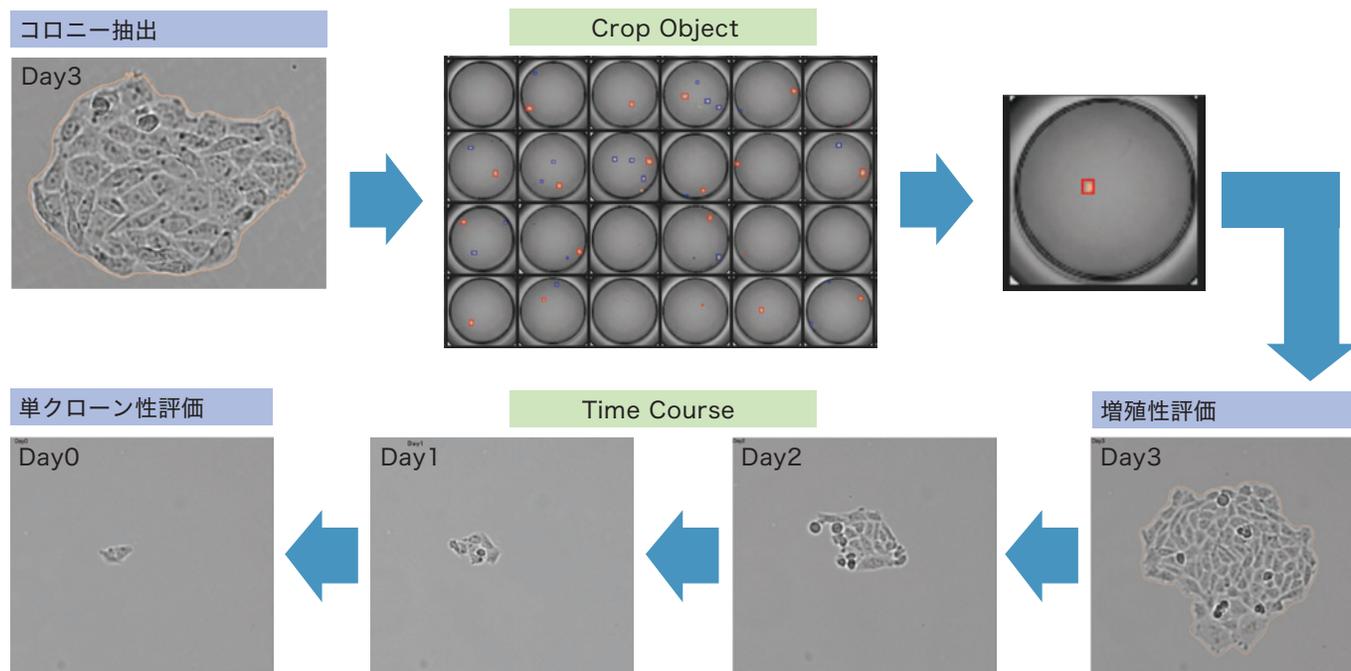


図4： Crop Object機能とTime Course機能によるコロニー位置把握と経時的観察

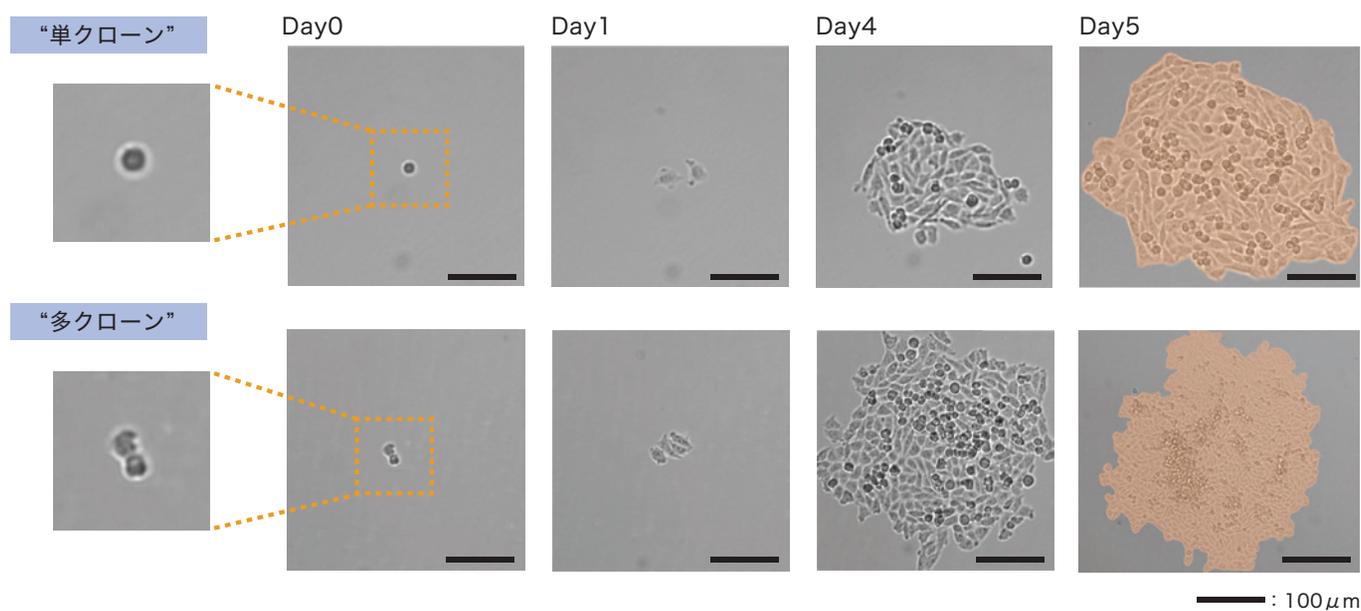


図5： コロニーのセグメンテーション（Day5）と単クローン性評価

コロニーの定量評価

次に、コロニーの特徴量から面積の値を用いて、コロニーの増殖性を評価しました。1cells/wellで播種したプレート (Day5) に含まれるコロニーの面積をヒストグラムにしました。(図6) 単クローン性のコロニーの面積平均値は0.118mm²であり、

コロニー面積の最大値は0.266mm²でした。Day5のコロニーに着目して面積の分布を示していますが、各日でセグメンテーションし、同一のコロニーを経時的に増殖性評価することも可能です。

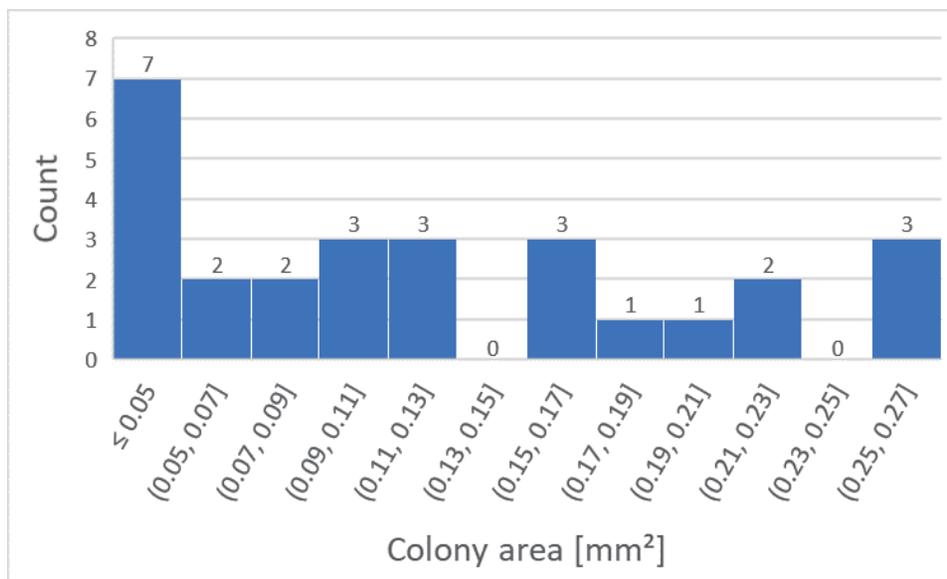


図6：コロニーサイズの分布

まとめ

Cell3iMager NXを用いて、CHO-K1細胞の単クローン性確認及び増殖評価を行いました。単クローン性については取得した画像を時系列で比較することができ、撮像後すぐに判定することも可能です。また、シングルセルクローニングでは、ウェルあたり1細胞由来であることが理想ですが、細胞が存在しない、あるいは複数のコロニーが存在する場合があります。コロニーのセグメンテーションとコロニーの計測機能によって単クローン性と増殖能を直ちに評価できる為、作業の効率化に貢献できると考えられます。

株式会社 SCREENホールディングス

京都 (本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る四丁目天神北町1番地の1

ライフサイエンス事業室

京都 (洛西) / 〒612-88486 京都市伏見区羽束師古川町322
Tel:075-931-7824 Fax:075-931-7826

東京 / 〒135-0044 東京都江東区越中島一丁目2-21 ヤマトネビル7階
Tel:03-4334-7977 Fax:03-4334-7978

<https://screen-cell3imager.com/>

