

Agilent Seahorse XF HS ミニプレートによるシグナル増幅と感度の向上の決定

Authors

Kellie Chadwick,
Natalia Romero,
Ned Jastromb, and
James Hynes
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Agilent Seahorse XF アナライザーのユーザーの多くは、利用可能な細胞サンプルの量によって実験デザインが制限されます。Agilent Seahorse XF HS Mini用ミニプレートは、Agilent Seahorse XF HS Miniアナライザーの検出感度を3倍に向上させるために開発されました。この改良により、細胞量が制限されている場合に可能な技術的replicateの数を増やすことができます。そのため、低い呼吸レベルの細胞モデルをより確実に調べることができ、細胞の分離にかかるコストと時間を削減し、サンプルを他の関連する直交測定に充てることができます。このホワイトペーパーでは、XF HS Mini用ミニプレートの特徴と、このプレートがどのようにシステムの基本的な改良を支えているか、そしてこれらにより、研究者がわずか3分の1の必要サンプル数でXF代謝解析を行えることについて説明しています。

Introduction

Agilent Seahorse XF テクノロジーは、さまざまな細胞モデルの研究に使用されています。どのサンプルウェルでも、80~90%のコンフルエントな状態であれば、ウェル全体で一貫性の高い代謝シグナルが得られるため、一般的に最高品質の結果が得られます。ほとんどの細胞モデルではこの方法が有効ですが、初代免疫細胞やその他の非増殖性細胞のように、細胞数が限られているモデルでは、この推奨事項を守るのが難しい場合があります。研究者は、必要な細胞播種密度を達成するために replicate ウェルの数を減らしたり、複数のドナーからの初代細胞をプールしたり、高価な実験を繰り返したり、推奨の速度範囲外のデータを受け入れたりして、この問題に対処することがあります。

アジレントはこのような課題を認識し、これらのアプリケーションに特化した Agilent Seahorse XF HS Mini用ミニプレートを開発しました。標準的な Agilent Seahorse XFp用ミニプレートでの使用が推奨される細胞材料の3分の1で済むため、サンプルあたりの技術的 replicate 数を増やすことができます。これにより、時間、コスト、初代細胞の分離に関連する動物の数が減り、実験デザインが簡略化されます。また、サンプルを他の関連する直交的な計測に使えるようになり、低い呼吸レベルの細胞モデルをより確実に調べることができます。

このホワイトペーパーでは、Agilent Seahorse XF HS Mini用ミニプレートがどのようにしてこの改善を達成し、より少ないサンプル数に対応したか、また、このサンプルの削減が根本的な感度の改善にどのように関連するかを説明しています。さらに、XF HS Mini用ミニプレートが、重要な初代細胞モデルのXFベースの代謝の調査に新たな機会を提供することについても詳しく説明しています。

Approach

Agilent Seahorse XFテクノロジーは、サンプル内の溶存酸素(O₂)とpHの変化を敏感にモニターすることで、細胞の酸素消費速度と細胞外酸性化速度を計測します。計測時には、酸素センサーとpHセンサーを内蔵した使い捨てのカートリッジプローブをアッセイウェル内に降下させます。カートリッジはウェルの底から200µmの高さに位置し、一過性の低容量マイクロチャンバーを形成します(XFp用ミニプレートの場合は2.28 µL)。このマイクロチャンバー内では、細胞の活動により、好気性代謝による酸素の減少と、主に解糖系の活性によるpHの低下が生じます。これらのアナライトは、計測サイクル(通常3分)の間、継続的に計測され、酸素消費速度(OCR)

および細胞外酸性化速度(ECAR)の計算に使用されるデータが生成されます。マイクロチャンバーは容量が小さいため、細胞の代謝によるマイクロチャンバー内のO₂とpHの変化が、ウェルの全容量で計測した場合の変化に比べて「拡大」されます。計測期間が終了すると、プローブが上昇し、O₂とpHのレベルがベースライン状態に戻ります。この動作により、同じ細胞を繰り返し計測することができ、代謝反応の経時的な解析が可能になります。

XF HS Mini用ミニプレートは、ウェル底面の最適化された成形リング構造を特長としており、シリコンマスクインサートと共に、細胞を狭い範囲に集中させます。この新しい形状の細胞播種面積は、標準的な8ウェルのXFp用ミニプレートの約3分の1です。(Table 1のXFpおよびXF HS Mini用ミニプレートの寸法を参照)。従って、計測時に形成されるマイクロチャンバーは、標準的なXFp用ミニプレートのマイクロチャンバーと比べて3分の1の容量となります。より小さな容量では、同じ単位のO₂消費量やプロトン生成量でもアナライトの濃度変化がより大きくなり、同じ数の細胞で3倍のシグナル増幅が達成されます。

Table 1. XFp用ミニプレート および XF HS Mini用ミニプレートの細胞播種面積とマイクロチャンバー容量

	細胞播種面積 (mm ²)	マイクロチャンバー容量 (µL)
XFp用ミニプレート	11.40	2.28
XF HS Mini用ミニプレート	3.40	0.63

このシグナル増幅により、計測感度は向上しますが、OCR値には影響しません。なぜなら、OCR値は単位体積あたりで計算されるため、マイクロチャンバー容量の減少が考慮されるからです。酸性化の計測に関する状況は、ECARが mpH/minの単位で計測されるため、もう少し複雑になります。従って、サンプル容量が1/3に減少すると、H⁺濃度の変化がより急速になり、ECAR値が3倍になります。

しかし、ECARは、培地の緩衝能、計測系の緩衝能、およびpH変化に対する計測系の固有の感度に大きく影響されるため、細胞外酸性化流出量の絶対的な計測値ではありません。従って、細胞のプロトン流出速度 (PER、pmol H⁺/min) を求めるには、計測系の緩衝能 (培地およびセンサーの特性を含む) を表すBuffer Factor (BF) と、計測チャンバーの有効容量 (K_{vol}) を表す、実験に基づいたスケーリングファクターが必要です。従って、PERの値は、ウェルの形状の変化と、その結果のサンプル容量

およびK_{vol}の値 (XFp用ミニプレートでは1.19、XF HS Mini用ミニプレートでは1.53) を考慮したものとなっています。これは、OCRと同様に、XF HS Mini用ミニプレートを用いて計測されたPER値は、XFp用ミニプレートに同じ数の細胞を播種した場合に生成されたものと同様になるということです。これらの値の使用法は、Equation 1に記載されています。K_{vol}の決定に関する詳しい説明については、Glycolytic Rateアッセイのホワイトペーパーを参照してください。

Equation 1.

$$\text{PER (pmol H}^+/\text{min)} = \text{ECAR (mpH/min)} \times \text{BF (mmol/L/pH)} \times \text{Vol microchamber (}\mu\text{L)} \times K_{\text{vol}}$$

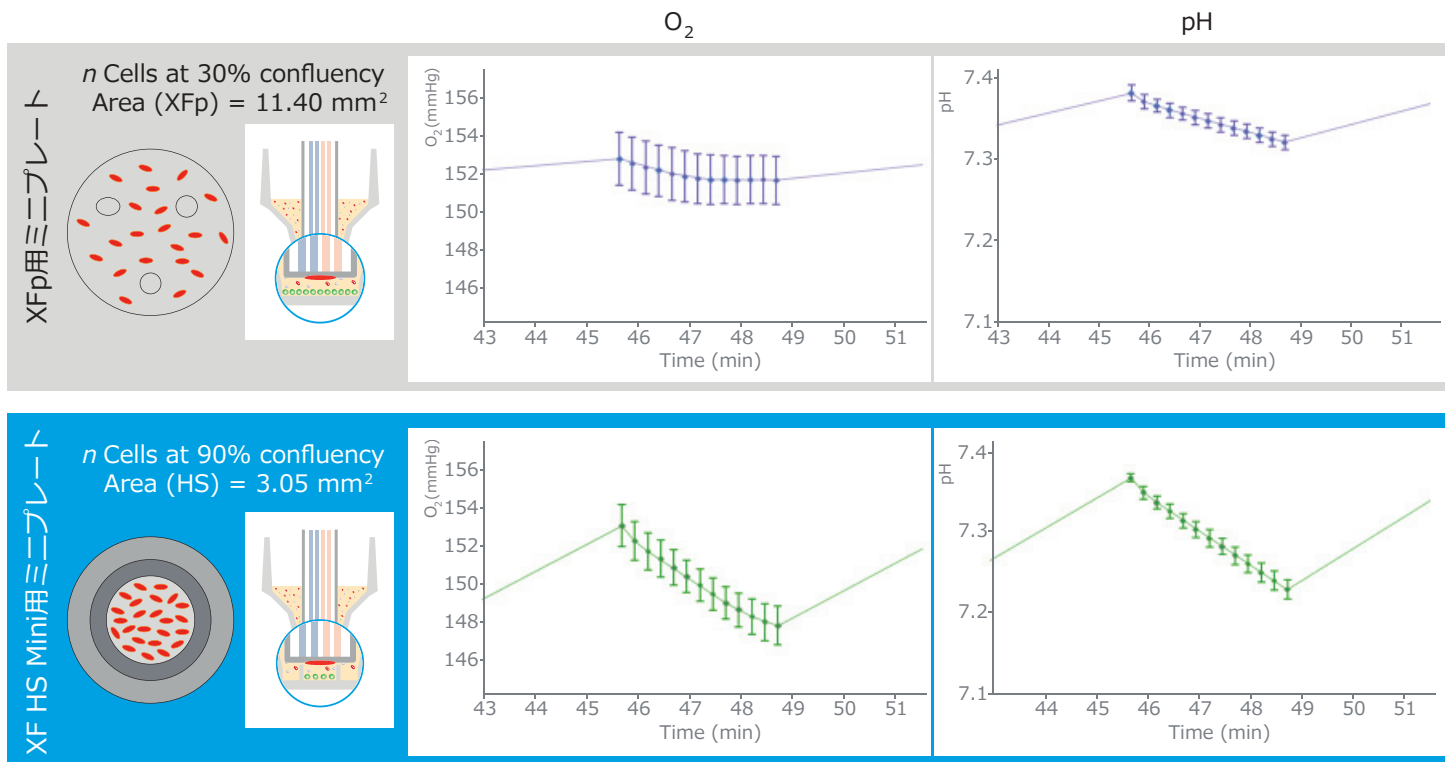


Figure 1. XF HS Mini用ミニプレート と XFp用ミニプレートに同量の生物学的物質を入れて生成したシグナル。上段はXFp用ミニプレートで生成されたO₂とpHレベル、下段はXF HS Mini用ミニプレートで生成された同じデータを示す。

XF HS Mini用ミニプレートは、OCRやPERの値に影響を与えませんが、効果的なシグナル増幅により、ウェルあたりの細胞数を少なくして計測することができます。これを実証するために、THP-1、Jurkat、C2C12細胞を用いて生物学的な量の滴定を行いました。この目的は、さまざまな種類の細胞や形態の細胞を用いて、さまざまな速度の範囲でシグナルの増加が維持されることを確認することでした。XFpとXF HSの両方のミニプレートに、5種類の細胞密度のプレートを3枚ずつ用意し、3分間の計測での全アナライトのシグナル変化 (ΔO_2 または ΔpH) とウェルあたりの細胞量に関連付ける線形回帰分析を行いました (Fig.2)。 O_2 とpHの両計測チャンネルにおいて、各細胞タイプの線形回帰の傾きを解析したところ、XF HS Mini用ミニプレートを使用した場合、XFp用ミニプレートで観察されたシグナルよりも少なくとも3倍高いシグナルが得られました。この解析結果をTable 2にまとめました。

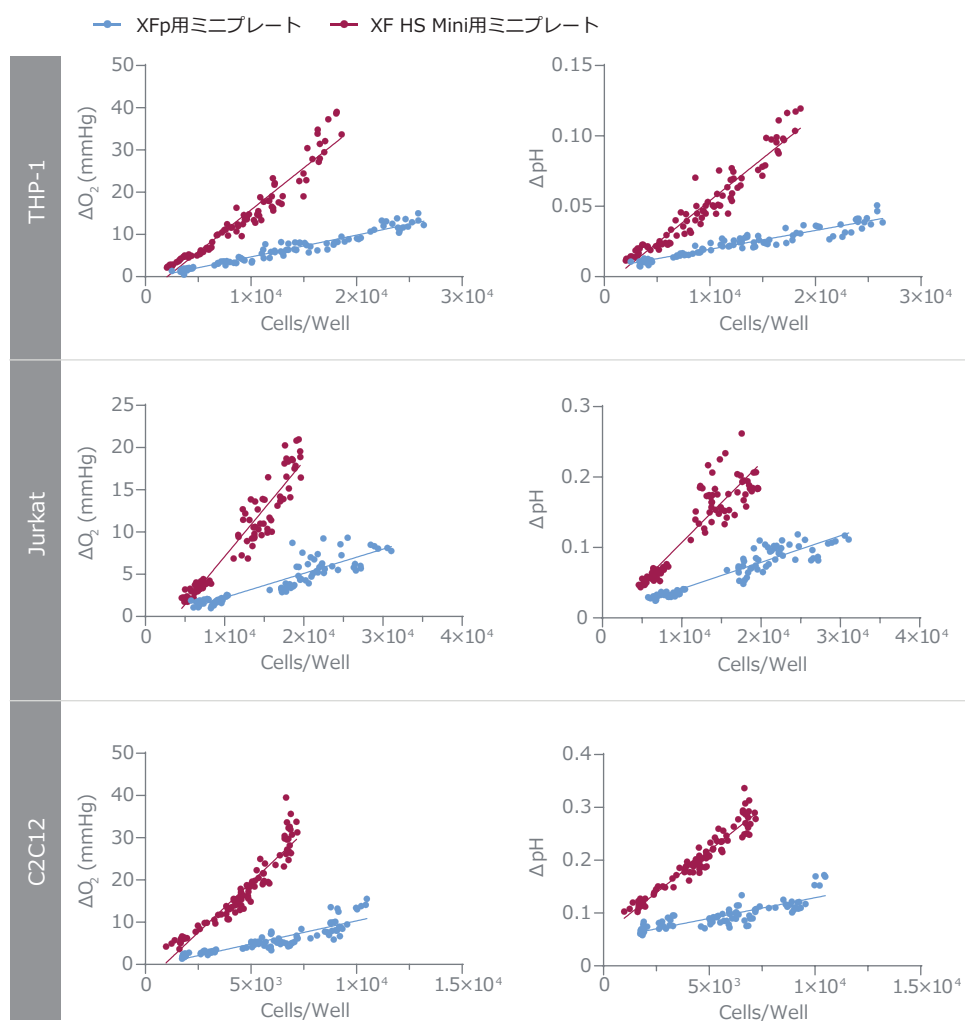


Figure 2. THP-1 (ATCC TIB-202)、Jurkat (ATCC TIB-152)、C2C12細胞 (ATCC CRL-1772) を用いて、基底の条件 (測定3) で計測した O_2 またはpHシグナル (計測時間中の O_2 とpHレベルの変化から得られる) とウェルあたりの細胞数との関係を示したものの。

Table 2. Figure 2の線形回帰トレースの傾きを示す。Fold-Changeは、XF HS Mini用ミニプレートの傾きをXFp用ミニプレートの傾きで割って、シグナルの増幅ファクターを算出したもの。

	Oxygen			pH		
	XFp	XF HS Mini	Fold-Change	XFp	XF HS Mini	Fold-Change
Jurkat	2.9×10^{-4}	11.3×10^{-4}	3.90	3.8×10^{-6}	11.3×10^{-6}	2.97
THP-1	5.2×10^{-4}	19.9×10^{-4}	3.83	1.3×10^{-6}	6.0×10^{-6}	4.62
C2C12	11.0×10^{-4}	47.3×10^{-4}	4.30	7.8×10^{-6}	31.9×10^{-6}	4.09

この感度の向上がJurkat細胞の測定に及ぼす影響をFig.3に示します。XF HS Mini用ミニプレートは 2.0×10^4 cells/wellで調製し、XFp用ミニプレートは 6.0×10^4 cells/wellおよび 2.0×10^4 cells/wellで調製しました。次に、XFミトストレステストを実施し、オリゴマイシン、FCCP、およびロテノンとアンチマイシンAの混合物を順番に添加して、基礎呼吸、ATP

産生呼吸、最大呼吸と予備呼吸能、および非ミトコンドリア呼吸に関する情報を得ました。XFp用ミニプレートで推奨される細胞密度 (6.0×10^4 cells/well) で計測したJurkat細胞は、OCR速度が推奨範囲内 (基底の計測値: 20 ~ 160 pmol/min) の期待されるミトストレステストのプロファイルを示しました。しかし、細胞の播種量を 2.0×10^4 cells/wellに減らすと、

一部の基底速度が推奨レベルを下回り、データ品質が低下しました。一方、XF HS Mini用ミニプレートでは、 2.0×10^4 cells/wellの細胞を確実に測定することができ、XFp用ミニプレートと比べて1/3の細胞量で、XFp用ミニプレートと同様のデータ品質が得られました。

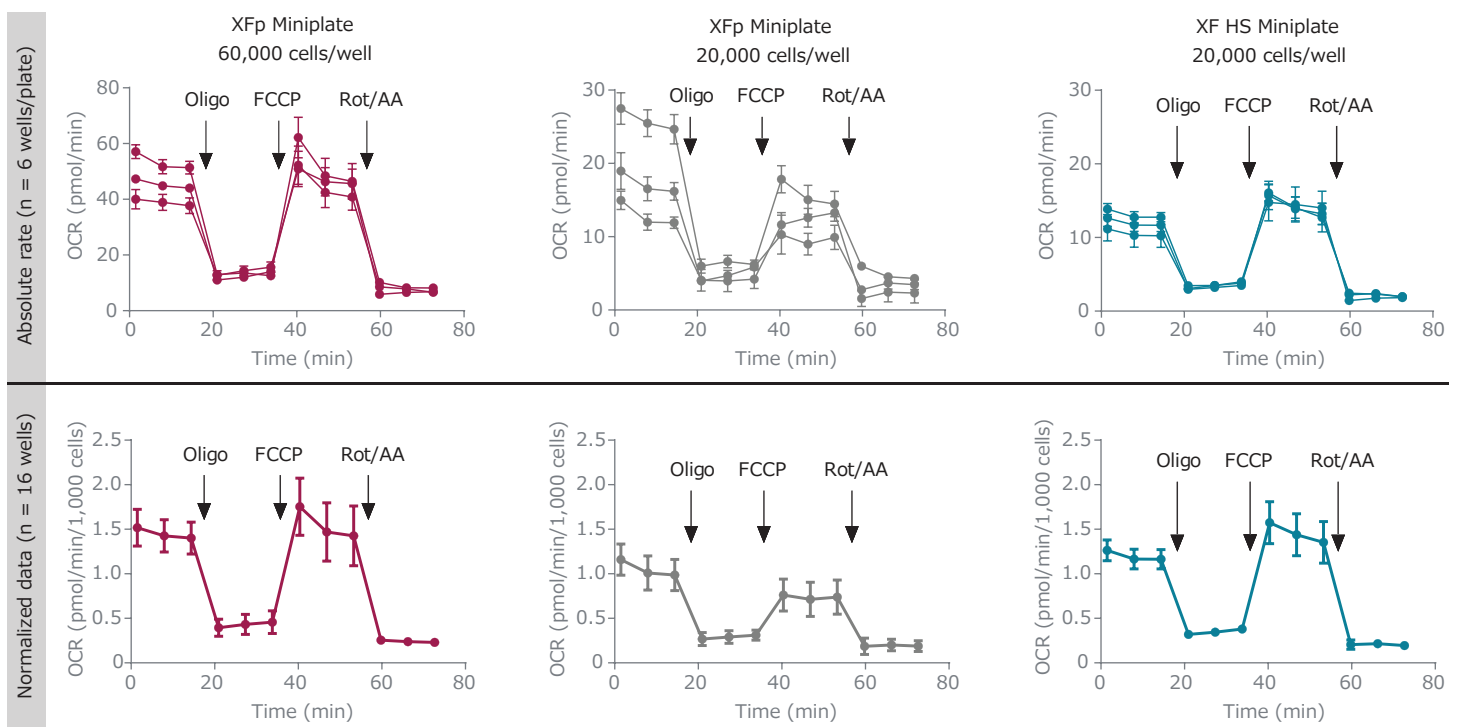


Figure 3. XFp用PDLミニプレート (型式103722-100) または XF HS Mini用PDLミニプレート (型式 103727-100) 上に図に示す細胞密度で播種した Jurkat 細胞 (ATCC TIB-152) のXFミトストレステスト。アッセイは、10mMグルコース、2mMグルタミン、1mMピルビン酸塩を添加したpH7.4のXF RPMI培地で行った。実験は、各条件につき独立した3枚のプレートで、3日に分けて行った。上のパネルは、3枚の独立した replicateプレートを示し、各データポイントは、プレートごとの6つのreplicateウェルの平均±SDを表す。下のパネルは、細胞数でノーマライズした3枚のreplicateプレートの平均±SDを示す。

前述したように、この性能の向上は、XF HS Mini用ミニプレートではウェル形状が変わりマイクロチャンバー容量が小さくなったために、生物学的な活性がアナライト濃度のより大きな変化をもたらすことに起因します。Fig.4には、XFp (Fig.4A) とXF HS Mini用ミニプレート (Fig.4B) の両方で、 2.0×10^4 cells/wellのJurkat細胞を用いたXFミトストレステスト解析から得られた代表的な O_2 レベルのデータが示されており、この違いは明らかです。Y軸は、XF HS Mini用ミニプレートのマイクロチャンバー内で起こっている O_2 のより大きな変化を、スケールを同様に示しており、ここでは、より頑健なOCRの計算が可能になり、推奨される基底のOCRおよびPER速度の最低値を下げることができます。XF HS Mini用ミニプレートを使用する場合の基底の代謝速度の推奨範囲をTable 3にまとめてあり、ウェルあたりの最適な細胞密度を決定する際の指針として使用する必要があります。重要なのは、Fig.3に見られるように、この感度の向上がOCRやPERの計算値に影響を与えず、これらの値を細胞数でノーマライズすると、1,000細胞あたりの速度はほぼ同等になるということです。

Table 3. XF HS Mini用ミニプレートの基底の代謝速度の範囲。PER範囲は、buffer factor 2.5を使用して算出した。この範囲は、XF解析時に使用するカートリッジのbuffer factorによって異なる。

	最小	最大
OCR (pmol/min)	7	55
ECAR (mpH/min)	10	90
PER (pmol/min)	25	228

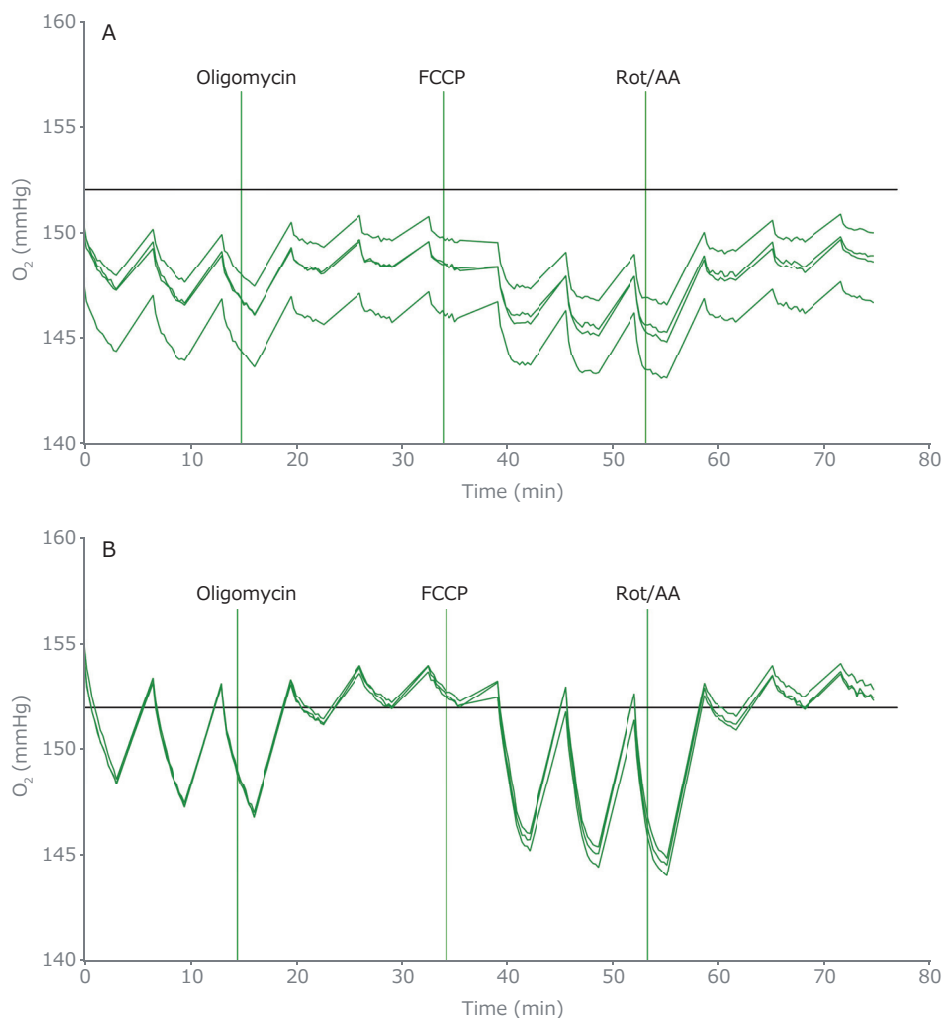


Figure 4. (A) XFp用PDLミニプレート (型式103722-100) または (B) XF HS Mini用PDLミニプレート (型式103727-100) を用いて20,000 cells/wellで行った、Jurkat 細胞の XFミトストレステストの O_2 レベルのトレース。アッセイは、10 mMグルコース、2 mMグルタミン、1 mMピルビン酸塩を添加したXF RPMI培地 (pH 7.4) で行った。

Application

この10年間で、代謝の測定が免疫細胞の機能に関する洞察的な情報を提供することが明らかになってきました。代謝の調節によって免疫細胞の運命も変化させることができるため、代謝は免疫細胞の機能の指標であると同時にコントローラーにも位置付けてられています。T細胞リンパ球は、活性化していなかったり急速に増殖していなかったりすると、解糖系とミトコンドリアの活性が低い静止状態の表現型を持ち、エネルギー需要を維持するために大部分をミトコンドリアの酸化的リン酸化に依存しています。このように基礎的なエネルギー活性が低いので、頑健な計測値を得るために、XFアッセイに使用する細胞の数を最大限に増やす必要があります。また、さまざまな免疫細胞サブセットの特性評価に対する関心も高まっており、その中の一部は非常に低い頻度で存在しています。そのため、これらの免疫細胞集団の代謝測定を行うための適切な量の出発物質を入手できるかどうか、実験計画を立てる際の特別な課題となります。

このような生物学的な解析上の課題は、自然に発生する、および、*in vitro*で産生するヒト幹細胞様メモリーT細胞集団 (T_{SCM}) にも及びます。T_{SCM}は、解糖系フラックスが少なく、予備呼吸能 (SRC、最大呼吸と基礎呼吸の差) が高いというメモリー細胞の典型的な「代謝シグネチャー」を示します^{1,2}。実際、幹細胞性はCAR-T治療の際に使用される細胞の持続性を高めることと関連しており、免疫療法の設計においてこの種の測定が重要であることを強調しています。さらに、ミトコンドリアの予備呼吸能が高い腫瘍浸潤性のリンパ球は、腫瘍微小環境で活性化されたときに適切性が向上し、疲労に対してより耐性があります³。このことも、これらの細胞集団のミトコンドリア

機能と代謝状態を確実に計測するためのツールを改良する必要性を強調しています。

XF HS Mini用ミニプレートは、頑健なデータを得るために必要な細胞数を3分の2減らすことができるため、これらの細胞タイプの計測に適しています。この削減により、わずかな量の出発物質を使用したり、同数の細胞でより多くのreplicateウェルを作成したりすることが可能となり、得られる結果の信頼性が高まります。

このような細胞タイプの研究に新しいXF HS Mini用ミニプレートを使用するメリットを例示するために、この研究では、XF HS Mini用ミニプレートとXFp用ミニプレートの両方で実施したnaïve T細胞のXFミトストレステスト解析から得られた結果を比較しました。Fig.5に示すように、XFp用ミニプレートで200,000 cells/well (推奨播種密度) を用いてNaïve CD4+ T細胞のXFミトストレステストを実施した場合、得られた基底のOCR速度は、このプレートタイプで推奨される下限値 (20 pmol/min) に近いものでした。同じプレートタイプで減らした細胞数 (70,000) を用いた場合、得られた速度は推奨範囲を下回り、その結果、標準偏差が高くなり、アッセイ化合物に対して効果的でない反応を示すようになりました。しかし、この少ない細胞数 (70,000cells/well) をXF HS Mini用ミニプレートで用いた場合、得られたOCRプロファイルは、XFp用プレートで3倍の細胞数を使用して得られたものと同様でした。データを細胞数でノーマライズすると、XFp用ミニプレートで200,000個、HS Mini用ミニプレートで70,000個の細胞を用いた場合に同様の反応が観察されました。

免疫細胞の機能における代謝測定の重要性を示すもう一つの例は、naïve T細胞の活性化による増殖の促進です。T細胞活性化の初期の特

徴は、急速な代謝スイッチと解糖の増加で、これは活性化の直後に続き、他の表現型の変化に先行して起こります。XF Hu T Cell 活性化アッセイ (型式103759-100) を用いたXF解析によって、この解糖活性の初期の上昇をリアルタイムに観察することができます。これにより、活性化後に起こる代謝のリプログラミングに関する貴重な洞察が得られ、モジュレーションの結果をプロファイルすることができ、活性化がエフェクター応答を達成するプロセスをより深く理解することができます。前述のように、非活性化T細胞は解糖活性が非常に低いため、活性化剤の添加後に解糖の著しい増加が観察されるにもかかわらず、XFpまたはXFe96用マイクロプレートでこれらのアッセイを行う場合は200,000 cells/wellが推奨されます。

T細胞の活性化に伴う代謝のリプログラミングをプロファイリングする上でのXF HS Mini用ミニプレートの利点を説明するために、2人の異なるドナーの細胞を両プレートタイプで並行して評価しました。推奨細胞密度 (200,000cells/well) のXFp用プレートでは、両ドナーの細胞外酸性化が急速に増加しており、Fig.6にCD3/CD28抗体を添加する直前の計測値に対してノーマライズした%PER変化で示しています。しかし、このアッセイを3分の1の細胞 (70,000cells/well) を用いて行った場合、基底の計測値はこのプレートタイプの推奨速度範囲を下回り、計測ノイズが増加するか、ドナーBの場合は活性化が検出されない結果となりました。一方、少ない細胞数でXF HS Mini用ミニプレートを用いてアッセイを行ったところ、XFp用ミニプレートで必要とされる細胞数の3分の1を用いたにもかかわらず、再び強い反応が観察されました。これらの強い反応は、細胞数がアッセイデザインを制限する場合に、XF HS Mini用ミニプレートの利点を明確に示しています。

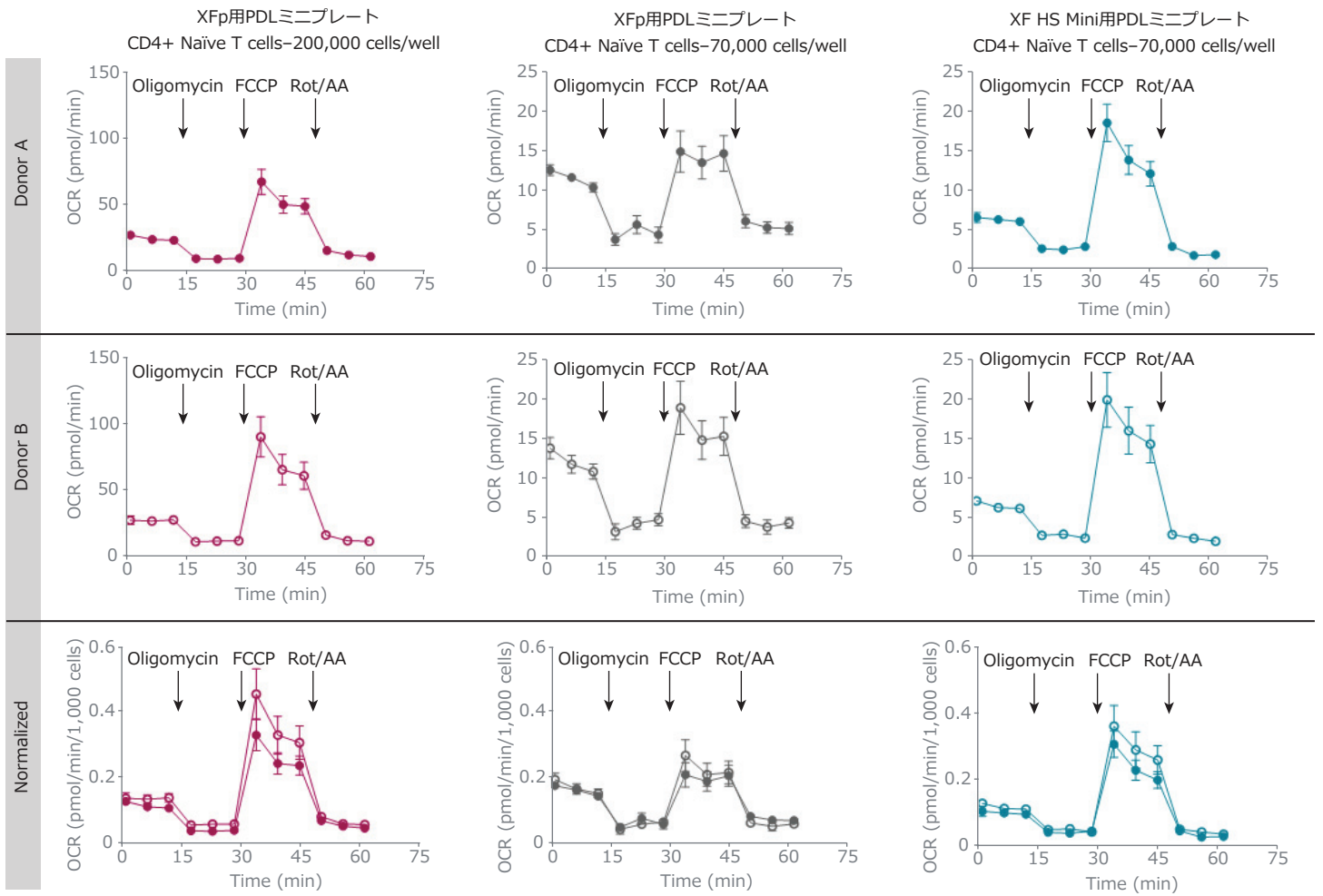


Figure 5. XFP用PDLミニプレート (型式103722-100) または XFP HS Mini用PDLミニプレート (型式 103727-100) に、図に示す細胞密度で播種したCD4+ naïve T細胞のXFミトストレステスト。XFミトストレステストは、10 mMグルコース、2 mMグルタミン、1 mMピルビン酸塩を添加したpH 7.4のXF RPMI培地で行った。実験は、2人のドナーのNaive CD4+ T細胞 (Stem Cell Technologies, part number 70026) を用いて行った。最初の段は、3つのプレート条件それぞれにおけるドナーAの細胞の平均OCR±SDを示す。各データセットには、プレートごとに6つの replicateウェルが含まれる。二番目の段はドナーBの細胞の平均OCR±SDを示す。最下段は各ドナーのデータ (平均OCR±SD) を細胞数によってノーマライズしたものである。

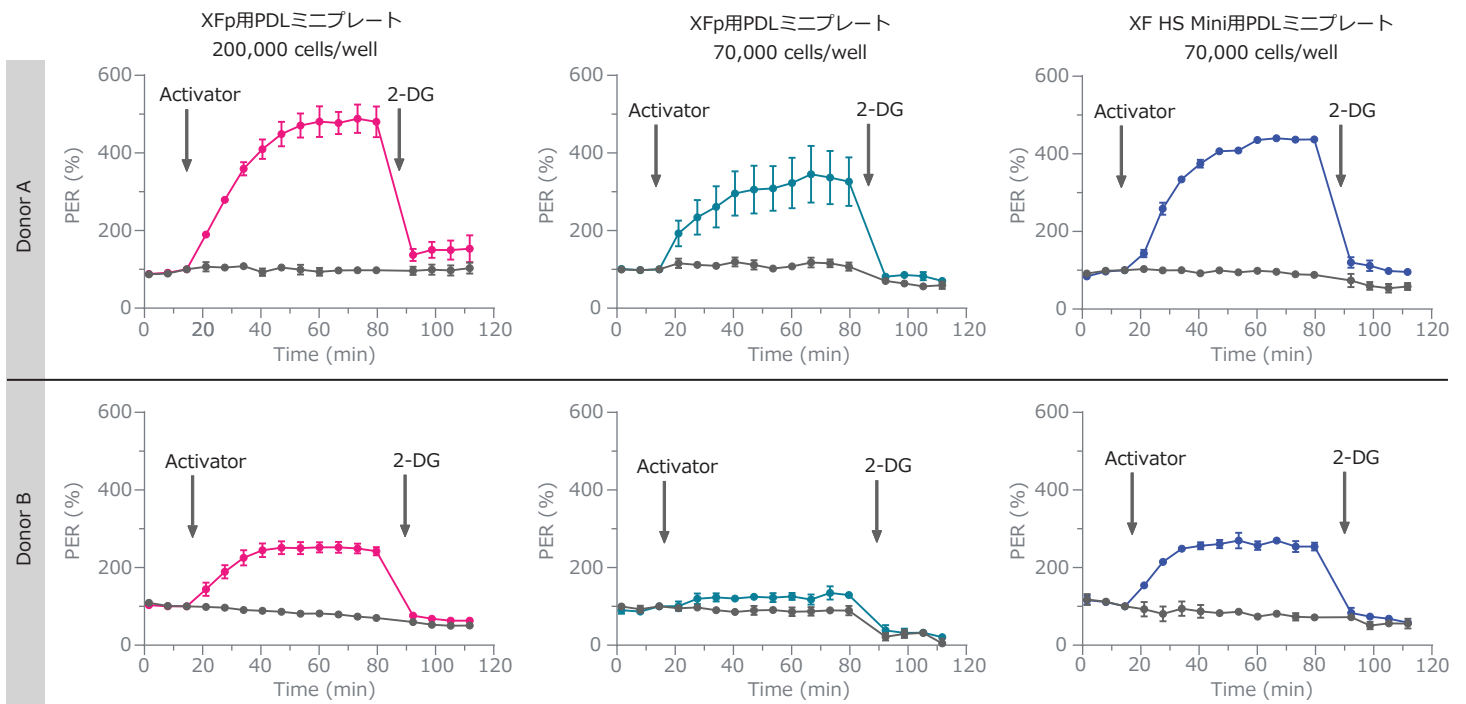


Figure 6. 図に示した細胞密度でXFP用PDLミニプレート (型式103722-100) またはXF HS Mini用PDLミニプレート (型式103727-100) に播種した2人の異なる健康なドナーのCD4+ naïve T細胞のXF Hu T Cell活性化アッセイ。アッセイは、10 mMグルコース、2 mMグルタミン、1 mMピルビン酸塩を添加したpH 7.4のXF RPMI培地で行った。各グラフは、アクチベーター (または培地、灰色のトレース) を添加する前の最後の計測からの%PERとしてノーマライズされた3つのreplicateウェルの平均±SDを示す。

Conclusion

代謝は、細胞の運命や機能を決定する上で中心的な役割を果たしており、細胞の活性化や分化にはその後の細胞イベントに影響を与える代謝状態の劇的な変化が伴うという証拠が増えていきます。そのため、代謝をターゲットにすることは、細胞の反応を調節するための強力な手段であると考えられており、免疫学、細胞治療や関連分野で特に重要になりつつあるアプローチです。Agilent Seahorse XF アナライザーは、酸化的な代謝と解糖の代謝の両方を直接同時に計測するスタンダードな方法で、細胞の代謝表現型を完全に特徴づけるユニークなツールを提供しており、これらの分野の研究で広く使用されています。しかし、初代免疫細胞やその他の非増殖性細胞などの一部の細胞タイプでは、細胞数が限られており、基底の代謝

速度が低いため、細胞播種の推奨事項を守ることが難しい場合があります。この問題は、実験デザインを著しく制限し、細胞分離にかかる時間とコストを増大させます。

Agilent Seahorse XF HS Mini用ミニプレートの開発によって、これらの課題が対処されてきています。XF HS Mini用ミニプレートは、標準的なXFプラットフォームで実行されるのと同様に情報量の豊富な代謝調査を、大幅に少ない細胞数で行うことができます。革新的なプレートデザインとマイクロチャンバー容量の減少によって感度の向上を実現し、計測感度を3倍向上、頑健な解析に必要な細胞数を3分の1に削減することができます。この性能の向上は、接着性細胞株、浮遊性細胞株、初代T細胞など、さまざまな種類の細胞で実証されています。この性能の向上は、naïve CD4+T細胞の解析を

とりわけ可能にすることが示されています。これらの静止した低いエネルギー状態の細胞は、以前は頑健なデータ・アウトプットを得るために非常に多くの細胞数を必要としていましたが、XF HS Mini用ミニプレートを使用することで、データ品質を維持しながら、1/3の細胞数で調査することができます。XF HS Mini用ミニプレートとXF HS Miniアナライザーを組み合わせることで、細胞分離ごとに実行できる技術的replicateの貴重な数を増やすことができ、初代培養細胞の分離にかかる時間とコストを削減し、サンプルを直交測定に充てることができます。また、このシステムは、低呼吸性の細胞モデルをより頑健に調べることができるため、重要な初代細胞モデルを対象としたXFベースの代謝研究に新たな機会をもたらします。

References

1. Sabatino, M. et al. Generation of Clinical-Grade CD19-Specific CAR-Modified CD8+ Memory Stem Cells for the Treatment of Human B-Cell Malignancies. *Blood* **2016**, 128, 519–528, doi:10.1182/blood-2015-11-683847.
2. Scholz, G. et al. Modulation of mTOR Signalling Triggers the Formation of Stem Cell-like Memory T Cells. *EBioMedicine* **2016**, 4, 50–61, doi:10.1016/j.ebiom.2016.01.019.
3. Scharping, N. E. et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* **2016**, 45, 374–388, doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.009.

※本パンフレットに記載の製品は、すべて研究・実験用です。
人・動物の診断あるいは治療等の臨床用途に使用することはできません。

●お問合せ先（Seahorse XFシリーズ 販売店）：



プライムテック株式会社

東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大団ビル2F
Phone: [東京] 03-3816-0851 [大阪] 06-6310-8077
<http://www.primetech.co.jp/> sales@primetech.co.jp

●製造元：



DE44270.8179050926
rev00 (202110B)