

短 報**RAW264細胞への遺伝子導入条件の検討****大西素子, 仙石裕美**

中部大学応用生物学部応用生物化学科

序 論

RAW264細胞は、白血球の1種である単球から樹立された培養細胞株であり、主にマクロファージ様細胞としての機能の解析のため、様々な研究に使われてきた (Ralph and Nakoinz, 1977). 1996年から1997年にかけて、破骨細胞分化因子 (RANKL, OPGL, TRANCE, and ODF) が発見されるまでは (Yasuda et al, 1998; Anderson et al, 1997; Wong et al, 1997; Lacey et al, 1998), 破骨細胞誘導モデルとして造血細胞と骨芽細胞との共存培養系が主に用いられていたが (Takahashi et al, 1988), このようなマウスの初代培養系を使わなくても, 上記のRAW264細胞にRANKLを加えて培養することによって, 骨吸収活性を持つ成熟破骨細胞を得ることができるようになった (Matsumoto et al, 2000).

現在我々は, RAW264細胞に一過性に遺伝子を導入, 発現することによって, RAW264細胞の破骨細胞への分化におけるその遺伝子の機能を解析したいと考えている. RAW264細胞への遺伝子の導入は以前よりDEAE-デキストラン法などで行われてきたが (Ohmori and Hamilton, 1993), サイトカイン刺激後の転写因子の活性解析など, レポーター遺伝子を導入する目的で用いられる場合が多く (Zheng et al, 1991), レポーターアッセイが高感度であるため, 高い導入効率は必要不可欠ではなかった. 培養細胞に遺伝子を導入, 発現することによって, その作用を調べる事が目的である場合には, 遺伝子を効率良く導入することが必要であり, RAW細胞の場合は安定的な遺伝子導入株を作製するか, 100%近い導入効率が得られるウイルスベクターを用いることが一般的である (Govoni et al, 1999; Matsumoto et al, 2000). 安定的な遺伝子導入株を作製してその遺伝子の作用を調べ

る方法は, 対象となる遺伝子が必ず導入されたものを使うため, 導入効率を気にする必要はないが, 導入される染色体の部位によっては細胞本来の遺伝子を破壊するなど細胞の機能に影響を与えたり, また導入された遺伝子が発現しないなどの可能性があるため, 通常複数の細胞株を作成し, それらの表現系を検討する必要がある. そのため煩雑であり, また遺伝子導入細胞株の確立まで時間がかかる. ウイルスベクターを用いる場合は, 他の導入方法に比べ導入効率は非常に高いものの, その構築に時間と技術が必要であり, さらに感染の危険性を避けるために培養機器を別にするなど設備も必要となる. リポフェクション法は, これらの方法に比べ簡便であり, DEAE-デキストラン法などに比べると様々な種類の動物細胞に比較的効率良く遺伝子を導入できることが知られている. そこで本研究では, 市販の3種類のリポフェクション法による遺伝子導入試薬を使用して導入条件の最適化を行い, 必要な導入効率が得られるかどうかを検討した.

実験方法**試薬および細胞**

RAW264細胞はRIKEN GENE BANKから購入した. 細胞は非動化した牛胎児血清 (旭テクノグラス, TOKYO) 10%, 100U/ml penicillin及び100 μ g/mlストレプトマイシンを含むMinimum Essential Medium Alpha Medium (α -MEM, Invitrogen Co., USA)を用いて, 37°C, 5%CO₂下で培養した. 3種類のリポフェクション法による遺伝子導入試薬であるFu-Gene6, LipofectamineおよびTfx-50は, それぞれRoche (USA, IN), InvitrogenおよびPromega (USA, WI) から購入した. pCX-EGFPはClontech社 (USA, CA) のものを用いた.

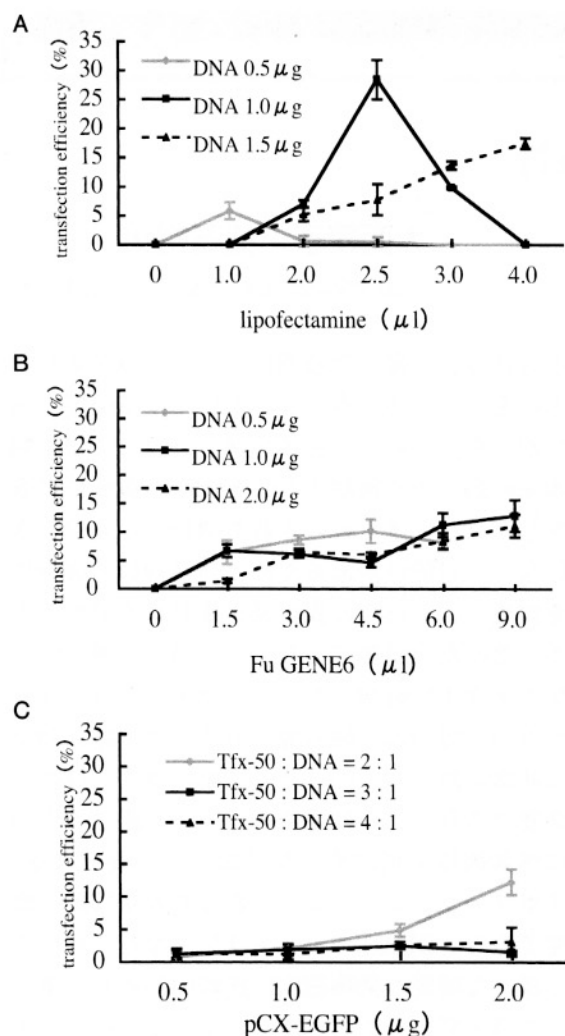


図1 市販の遺伝子導入試薬を用いたリポフェクション法によるRAW264細胞へのEGFP遺伝子の導入
試薬およびDNA量はいずれも1wellあたりの使用量を示す

プラスミドDNAの導入

RAW264細胞はトリプシン処理によって、培養用プレートから剥離した後、1 mlあたりの細胞数を計測し、 2×10^5 cell/wellとなるよう12 well 組織培養用プレートに加えて24時間培養した。このように準備したRAW264細胞への遺伝子導入は、それぞれの試薬の使用説明書に記載の方法に従って行った。即ち、Fu-Gene6を用いた場合は、Fu-Gene6、プラスミドDNAを順に加えて、室温で15分間静置した無血清培地を、直前に培地交換しておいた細胞に1 wellあたり50 μl加え、培養した。Lipofectamineの場合は、Lipofectamineを加えた無血清培地と、プラスミドDNAを加えた無血清培地を別々に

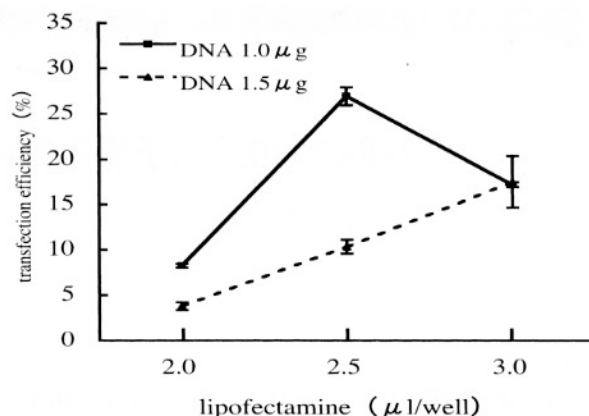


図2 リポフェクタミンによるRAW264細胞へのEGFP遺伝子の導入

準備し、それぞれを等量混合して、30分間室温にて静置した。この溶液を無血清培地で4倍希釈し、無血清培地で培地交換した細胞に1 wellあたり400 μl加えた。5時間培養後、さらに牛胎児血清濃度が約10%となるよう、血清を含む培地を加えて19時間培養した。再度培地交換を行い、さらに培養を続けた。Tfx-50の場合は、無血清培地にプラスミドDNAとTfx-50を順に加えて、15分間室温で静置した。培地を除去したプレートに、この溶液を1 wellあたり400 μl加えた。1時間培養後、10%牛胎児血清含有培地を1 wellあたり1 ml加え、さらに培養を続けた。

蛍光顕微鏡による発光細胞の計測は、細胞培養液へプラスミドDNAの添加48時間後に行った。

結果および考察

動物細胞にプラスミドDNAを導入すると、プラスミドDNAは当初導入された数以上には増えず、動物細胞の分裂に従い導入効率が低下する。RAW264細胞場合、少なくとも当初の導入効率が30%近くないと、一過性の遺伝子発現が分化に対して与える影響を解析するのは難しいと考えられた。そこで様々な遺伝子導入法のうち、比較的簡便で導入効率の良いリポフェクション法を試みた。市販のリポフェクション法による遺伝子導入試薬のうち、RAW264に効果があると聞いたもの3種類を選び、培養細胞数を一定にして、DNA量と試薬量を変化させて導入効率を検討した。導入効率は、明視野検鏡

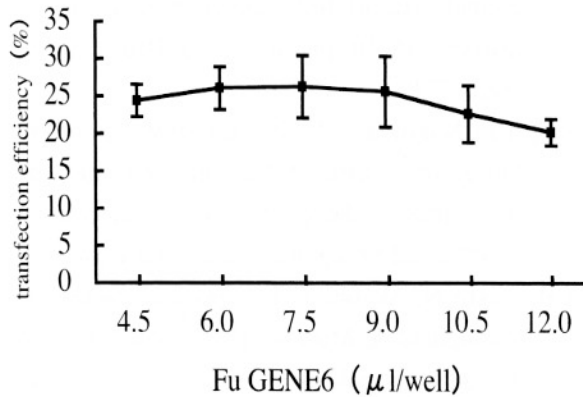


図3 Fu-gene6によるRAW264細胞へのEGFP遺伝子の導入
プラスミドDNAは1 wellあたり1 μg用いて導入を行った。

でまずその視野中の総細胞数を計測し、同視野における510～560nmの蛍光を発する細胞数を計測して、総細胞数に対する蛍光を持つ細胞数の割合を求めることによって、算出した。その結果、1.0 μgのプラスミドDNAと2.5 μlのLipofectamineを用いた時に、28.4%と最も高い導入効率を得られた(図1A)。Tfx-50では、プラスミドDNAと導入試薬の量と割合を様々に変えて最適な導入効率を得られる条件を検討したにもかかわらず、導入効率はほとんどの場合10%に満たず、最も良い場合にも12.3%止まりであったため、RAW264細胞には不向きであると考えた(図1C)。Fu-Gene6もDNA 1 μg, Fu-gene6 9 μlを用いた場合の12.9%の導入効率が最高であったが、Fu Gene6を4.5 μl以上使った場合にはDNAの量によっては10%以上の導入効率を得られ、薬剤の使用量を増やすことによって、さらに導入効率が上昇するかもしれないと考えられた(図1B)。そこでLipofectamineとともに再度DNAと試薬量の割合を変化させ、より詳細な検討を行うことにした。

Lipofectamineの場合は、プラスミドDNA量は1 μgと1.5 μgの2種類導入し、Lipofectamine量を2 μlから3 μlまで変化させた。その結果、Lipofectamineを使った場合には図1Aの結果と同様、DNA 1 μgに対しリポフェクタミン2.5 μlを使用した時に最も導入効率が高く、26.9%だった(図2)。この結果は1回目よりもやや少な

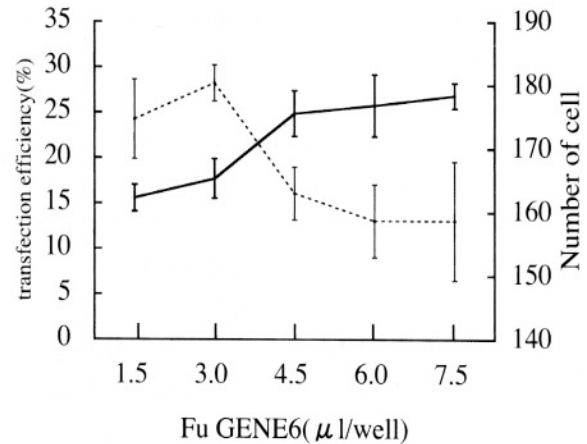


図4 Fu-gene6によるRAW264細胞へのEGFP遺伝子の導入と生存細胞
—— 1 wellあたりプラスミドDNA 1 μgを使用した時の導入効率
----- 1 視野あたりの総細胞数

いものの、その後行った同様の実験でも確認され(未発表データ)、リポフェクタミンを用いれば、必要量の遺伝子を導入できる可能性が示唆された。1.5 μgのDNAを用いた場合には、リポフェクタミン量を3 μlよりもさらに多く使用した場合は、DNA 1 μg/リポフェクタミン2.5 μlの時よりもさらに高い導入効率を得られる可能性があるため、よりリポフェクタミン量を増やして検討する必要がある。

Fu-gene6の場合はDNAを1 μgに固定し、Fu-gene6の量を4.5から12 μlまで変化させて検討を行ったが、12 μlまで増やしてもDNAの導入効率にあまり変化は見られず、最初の時と異なりFu-gene6を7.5 μl使用した場合には26.3%と高い導入効率を示した(図3)。この導入効率の結果の違いは、図1と図3に示された実験の前後で使用したFu-gene6の試薬のロットが変わり、凍結融解を繰り返していない新しいものを使用したことに起因するかもしれない。図3以降の実験ではFu-gene6を6から7.5 μl用いた場合、常に25%を超える高い導入効率を示した。Fu-gene6の場合、DNAと試薬の比率が多少変化しても、安定して高い導入効率を示し使い易いが、リポフェクタミンに比べ細胞毒性が高く、遺伝子導入後の生存細胞数が少ない。そこで試薬量をどこまで減少できるか検討したが、3 μl以下に減少すると生存細胞数はやや増加するものの、導入効率は著しく減少した(図4)。

以上の結果から, RAW264細胞に遺伝子を導入する場合, 遺伝子導入されていない細胞を薬剤で選択的に殺す方法を併用すれば, DNA 1 μ g に対しリポフェクタミン2.5 μ lを使用した時に最も多くの遺伝子導入細胞を得ることができると考えられた。当初の目的であるRAW264細胞の分化における遺伝子の機能を解析するためには, 遺伝子を導入した後細胞を分化させる必要があるため, 今回の導入効率の検討結果をふまえ, 今後は導入試薬が細胞の分化能に影響しないかどうかをさらに検討する必要がある。

引用文献

- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 390:175-9.
- Govoni G, Canonne-Hergaux F, Pfeifer CG, Marcus SL, Mills SD, Hackam DJ, Grinstein S, Malo D, Finlay BB, Gros P. 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun*. 67:2225-32.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 93:165-76.
- Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. 2000. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem*. 275:31155-61.
- Ohmori Y, Hamilton TA. 1993. Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter. *J Biol Chem*. 268:6677-88.
- Ralph P, Nakoinz I. 1977. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J Immunol*. 119:950-54.
- Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. 1988. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 123:2600-2.
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*. 272:25190-4.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:3597-602.
- Zheng SA, McElwain CM, Taffet SM. 1991. Regulation of mouse ornithine decarboxylase gene expression in a macrophage-like cell line: synergistic induction by bacterial lipopolysaccharide and cAMP. *Biochem Biophys Res Commun*. 175:48-54.

Title : Optimaization of liposome-mediated gene transfer in RAW264 cells

Author : Motoko Ohnishi and Hiromi Sengoku (Dept. of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology).

Keywords : Osteoclast, RAW264 cell, lipofec-tion