

独立行政法人 国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部

小野寺 雅史 様

作業報告書

レンチウイルスベクター製造一式

< Lot. L1308 >

平成 26 年 2 月 27 日

タカラバイオ株式会社
細胞・遺伝子治療センター

受託総責任者: 高蔵 晃

目次

1. 概要.....	2
2. 使用プラスミド DNA、細胞株および試薬.....	2
3. 方法と結果.....	3
3-1. 組換えレンチウイルスベクターの調製.....	3
3-2. 組換えレンチウイルスベクターの精製.....	3
3-3. 精製組換えレンチウイルスベクターの純度判定.....	3
4. 納品物／返却物.....	3
5. 添付データ.....	4
5-1. pLVSIN-MSCV-ZsGreen1 Vector Map.....	4
5-2. イオン交換クロマトグラフィー チャート.....	5
5-3. 生物学的感染力価.....	6
5-4. 残存 Benzonase 濃度、Total Benzonase 量.....	7
5-5. 残存 BSA 濃度、Total BSA 量.....	8
5-6. 残存 HCP(Host Cell Protein)濃度、Total HCP 量.....	9

1. 概要

レンチウイルスベクターを作製した後、精製を行い医薬品グレードに近い製品として製造を行う。製造したベクターは無菌的に分注を行う。

2. 使用プラスミド DNA、細胞株および試薬

・トランスフェクションプラスミド DNA:

pLVSIN-MSCV-ZsG1

pCA-GPLV

pRev-JK

pE-VSV-G

pBApo-tat(JK)

・組換えレンチウイルスベクター調製細胞株:

HEK293T

・使用基本培地(HEK293T):

10% FBS/DMEM

DMEM (SIGMA, Code: D5796-500ML)

Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, Cat.No 10099-141)

・ウイルス調製時使用培地(HEK293T):

GT-T551 (TAKARA bio, Code: KB551S)

・ウイルス充填時使用培地(HEK293T):

X-Vivo15 (TAKARA bio, Code: B4744)

・PBS(-): (GIBCO, Code.10010-049)

・TrypLE 溶液 (GIBCO, Code.12563-011)

・PenStrep (GIBCO, Code.15140-163)

・イオン交換クロマトグラフィー:

バッファー

Hepes (Merck, Code: 1101101000)

MgCl₂・6H₂O (SIGMA, Code: M7304-500G)

Glycerol (小堺製薬)

NaCl (和光純薬, Code:193-13715)

・Albumin, Bovine Serum, ELISA Kit (フナコシ, Code:F030)

・HEK 293 Host Cell Protein, ELISA Kit, 2nd Generation (フナコシ, Code:F650)

・Benzonase® ELISA kit II (Merck, Code: 101681)

3. 方法と結果

3-1. 組換えレンチウイルスベクターの調製

calcium phosphate transfection 法を用いて、HEK293T 細胞に pLVSIN-MSCV-ZsG1、pCA-GPLV、pRev-JK、pE-VSV-G、pBApo-tat(JK)を共導入し、組換えレンチウイルスベクターを調製した。方法は以下の通りである。pLVSIN-MSCV-ZsG1 の構造を添付データ 5-1 に示す。

Cell STACK10 チャンバーに 1.17×10^8 cells/1.3L で H 293T 細胞を播種し、72 時間培養した後、calcium phosphate transfection 法により、pLVSIN-MSCV-ZsG1、pCA-GPLV、pRev-JK、pE-VSV-G、pBApo-tat(JK)を共導入した。DNAトランスフェクション開始から約 6 時間後に GT-T551 培地(1272ml)に交換し、さらに培養を行った。DNAトランスフェクション開始から約 48 時間後に 1 回目の上清を回収し、1st Harvest 培地とした。上清回収後 GT-T551 培地(636ml)を加え約 24 時間後に 2 回目の上清を回収し、2nd Harvest 培地とした。1st Harvest 培地と 2nd Harvest 培地を混合したものを組換えレンチウイルスベクターとした。

3-2. 組換えレンチウイルスベクターの精製

精製工程では 1, 清澄化、2, Benzonase 処理、3, イオン交換クロマトグラフィー、4, 限外ろ過、5, 滅菌濾過の 5 段階で精製を行った。方法は以下の通りである。

1, 組換えレンチウイルスベクターを全量(約 1800ml)ろ過し、死細胞等の不純物を除く清澄化を行った。2, 清澄化後の組換えレンチウイルスベクターに Benzonase を加え 4℃、オーバーナイトで反応を行った。処理後のサンプルは -80℃で凍結し保存した。3, Benzonase 処理後のサンプルを Water バスで溶解させ、AKTA purifier を用いて塩濃度のグラジエントをかけて精製を行った。15ml/min の速度でカラムにレンチウイルスを吸着させ、30CV(カラムボリューム)で Wash 後、15CV で溶出を行った。回収したサンプルボリュームはこの段階で約 80ml である(添付データ 5-2)。4, 限外ろ過膜を用いて組換えレンチウイルスベクターの濃縮およびバッファー置換を行った。最終バッファーには X-Vivo15 を使い、30ml まで濃縮を行った。5, 限外ろ過が終わった組換えレンチウイルスベクターを滅菌濾過フィルターに通して精製組換えレンチウイルスベクターとした。精製組換えレンチウイルスベクターの感染力価評価には HT1080 細胞を用いた。感染力価については $\text{Titer(IFU)} = \text{感染細胞数} \times \text{導入率} \times \text{ウイルス希釈倍率} \times \text{細胞感染時 Volume}/100$ の式に基づいて計算を行った。結果を添付データ 5-3 に示す。

3-3. 精製組換えレンチウイルスベクターの純度判定

ELIZA キットを用いて、Benzonase、BSA、Host Cell Protein の残存濃度測定を行った。方法はキットのマニュアルに従って行った。測定の結果、Benzonase 除去率 99.8%(添付データ 5-4)、BSA 除去率 99.9%(添付データ 5-5)、Host Cell Protein 除去率 99.2%(添付データ 5-6)であった。

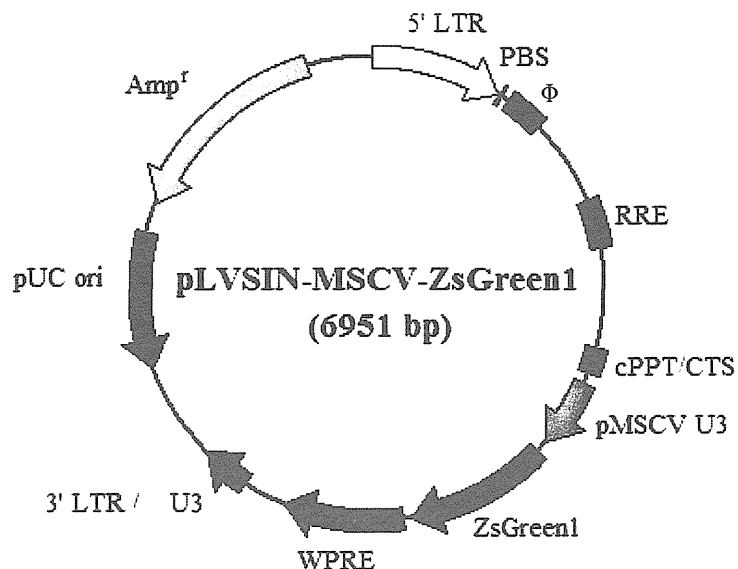
4. 納品物/返却物

- ・本作業報告書 1 部
- ・精製レンチウイルス (遺伝子導入評価で使用)

Lot.1308

5. 添付データ

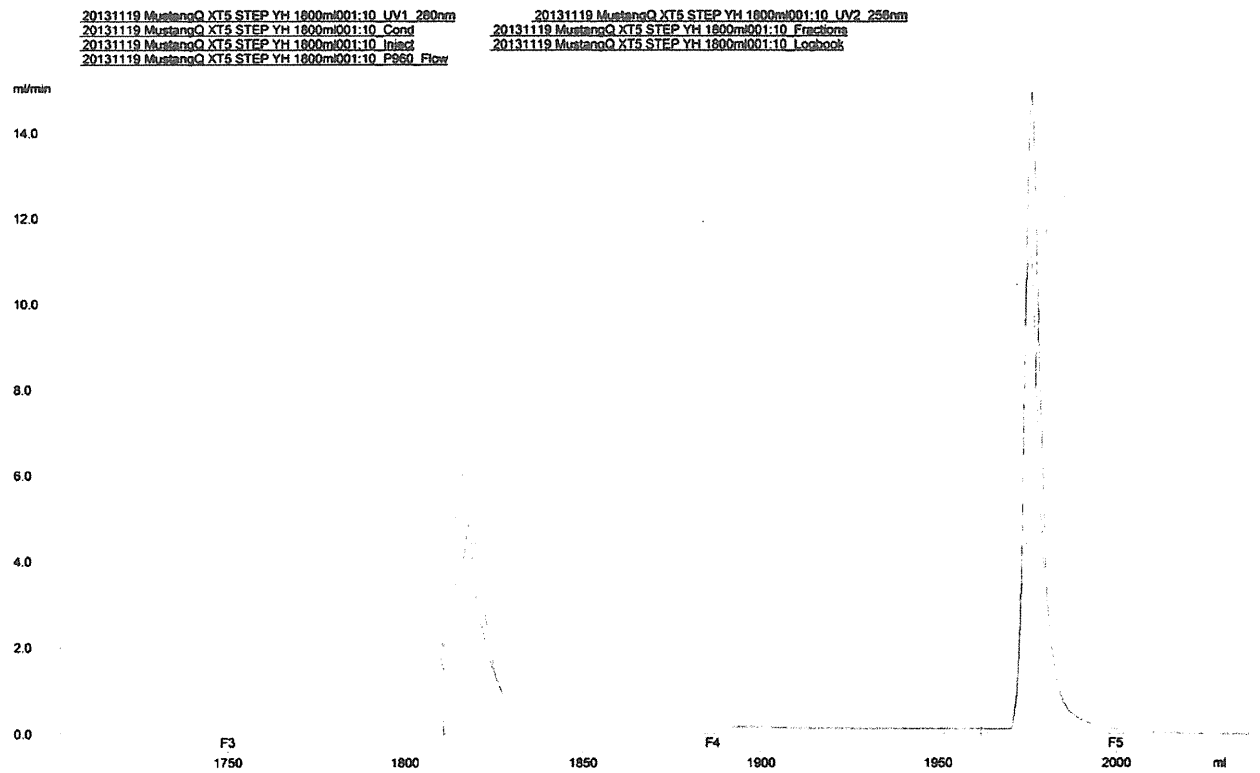
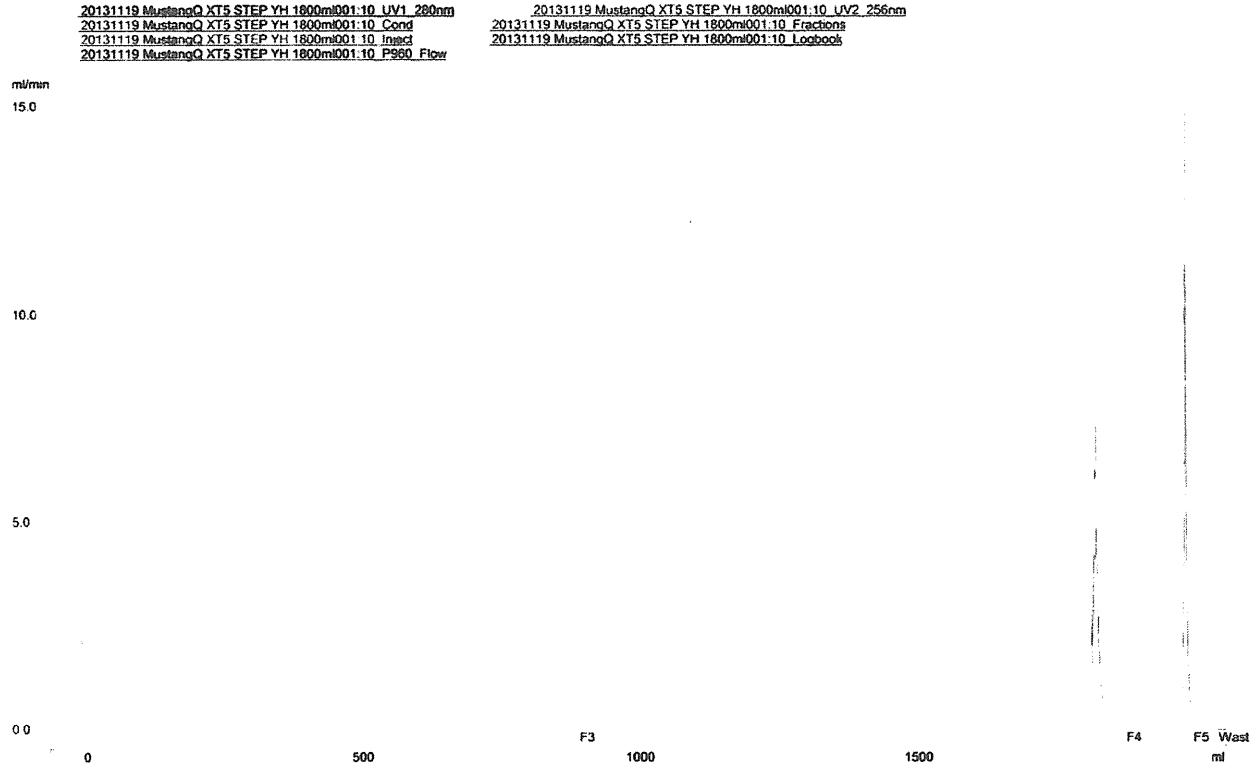
5-1. pLVSIN-MSCV-ZsGreen1 Vector Map



Vector Elements	Location
5' LTR (5' long terminal repeat)	1..635
PBS (primer binding site)	636..653
Φ(Packaging signal)	685..822
RRE (Rev-response element)	1303..1536
cPPT/CTS (central polypurine tract/central termination sequence)	2028..2151
MSCV U3 promoter	2203..2535
ZsGreen1	2593..3288
WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)	3319..3911
3' SIN-LTR (3' self-inactivating long terminal repeat)	4114..4350
pUC origin of replication	4821..5491
Ampicillin resistance gene	5636..6632

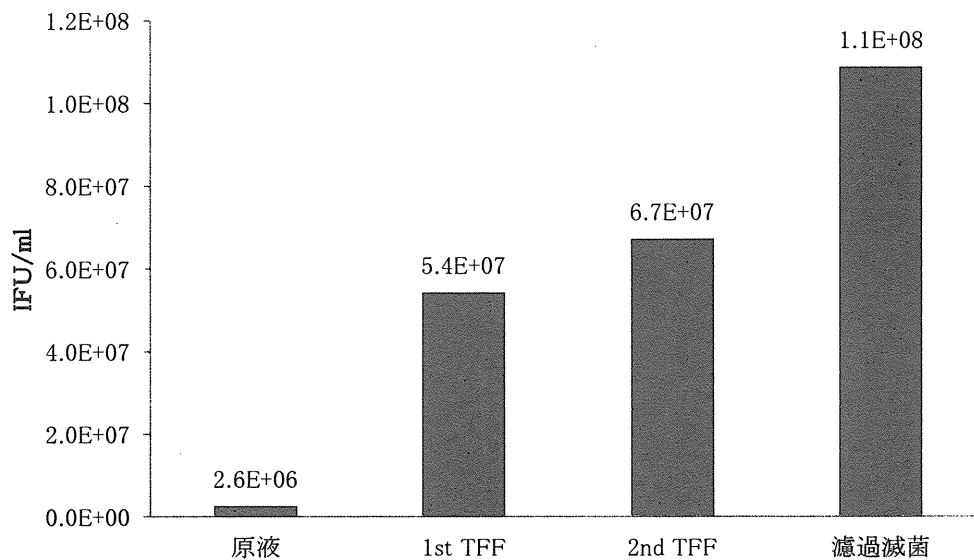
5-2. イオン交換クロマトグラフィー チャート

上: 全体図 下: Wash & Elution 部拡大(F4:Wash F5:Elution)

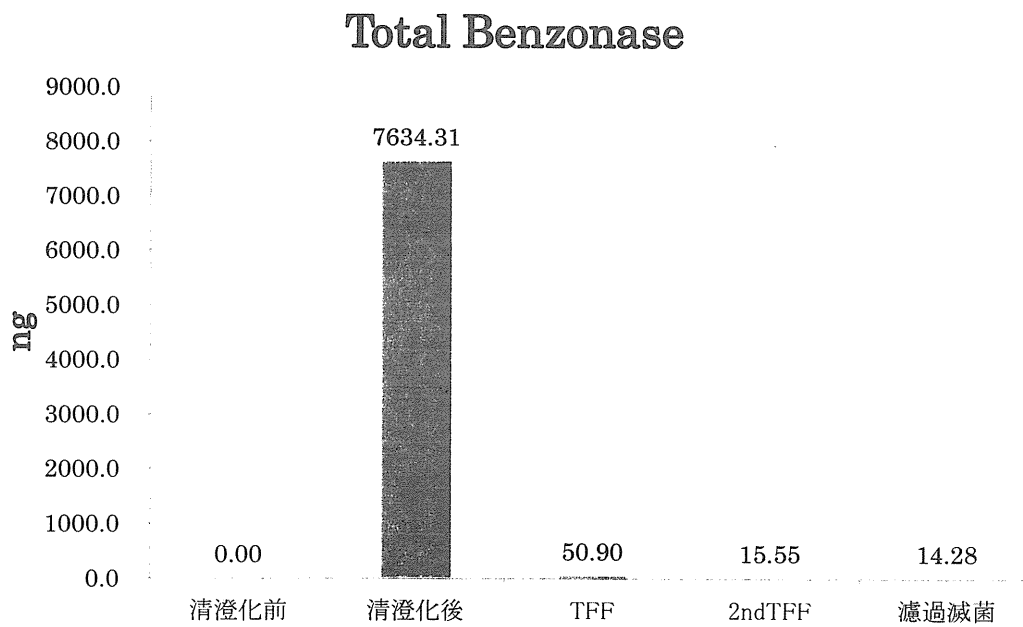
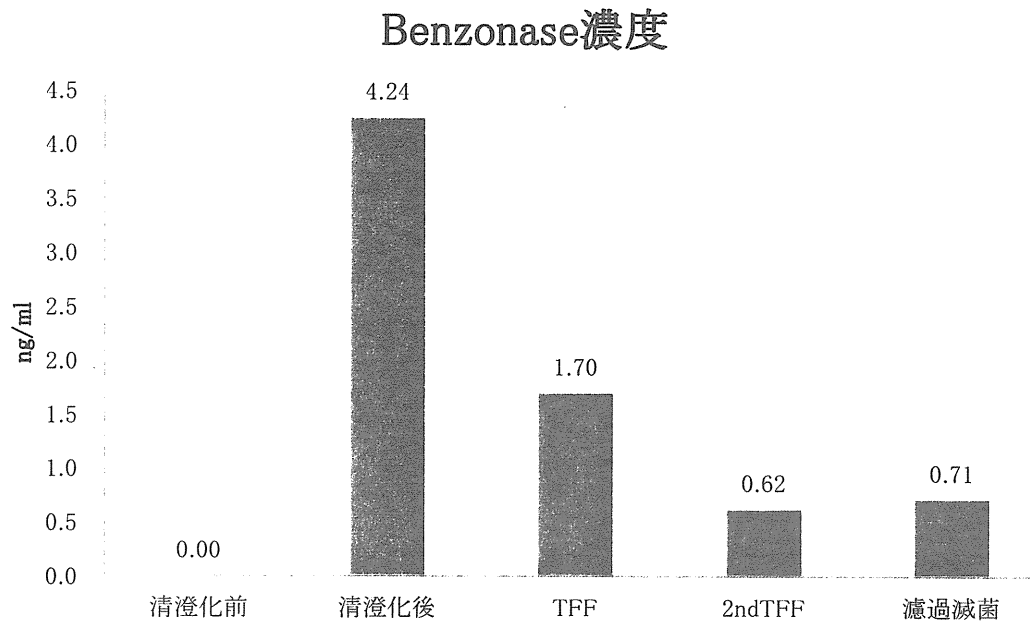


5-3. 生物学的感染力価

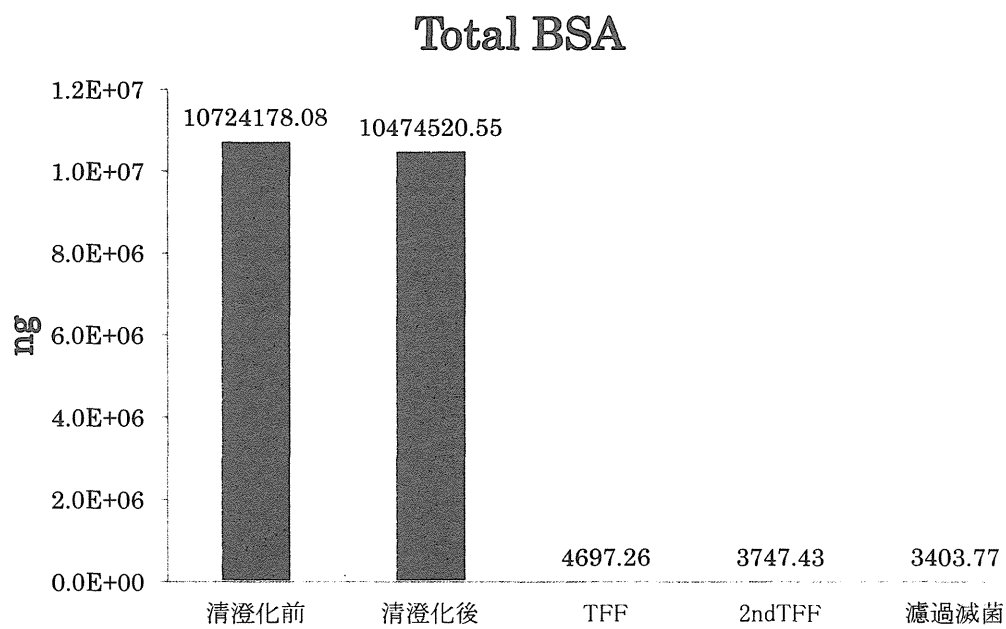
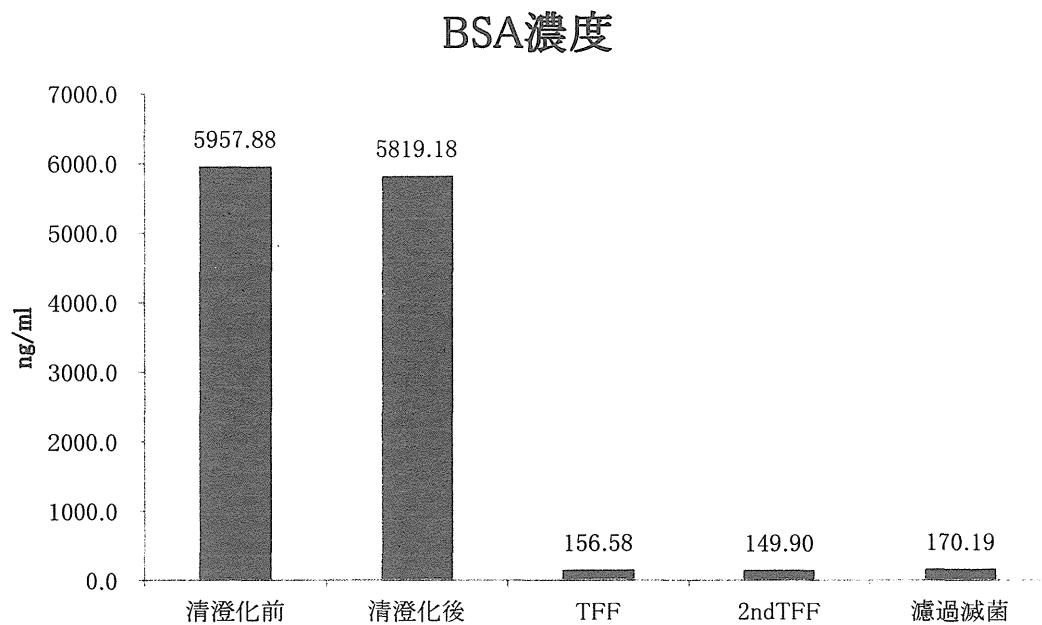
各精製サンプルの力価



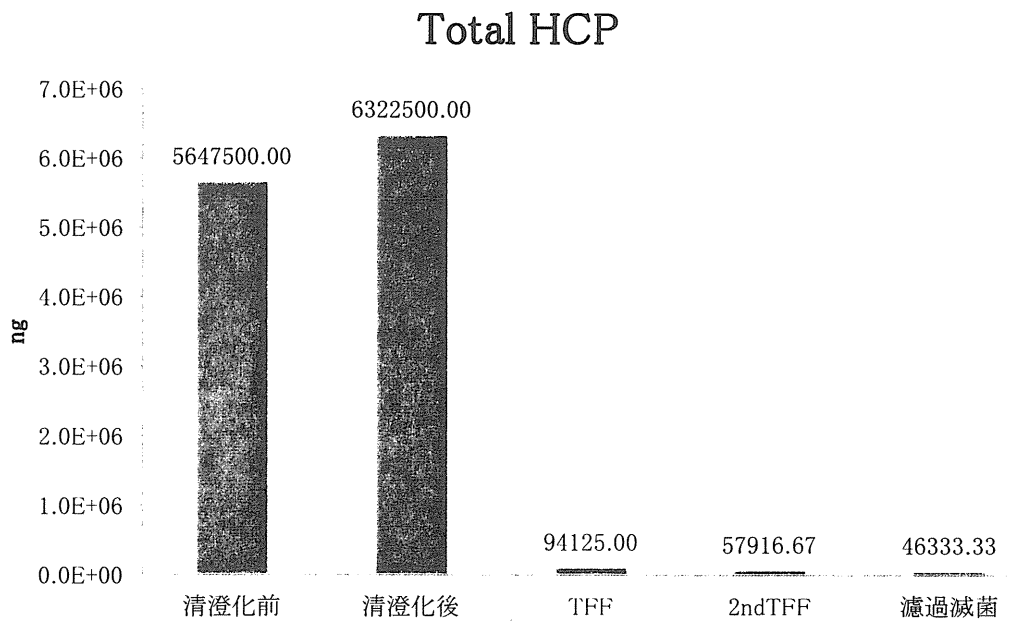
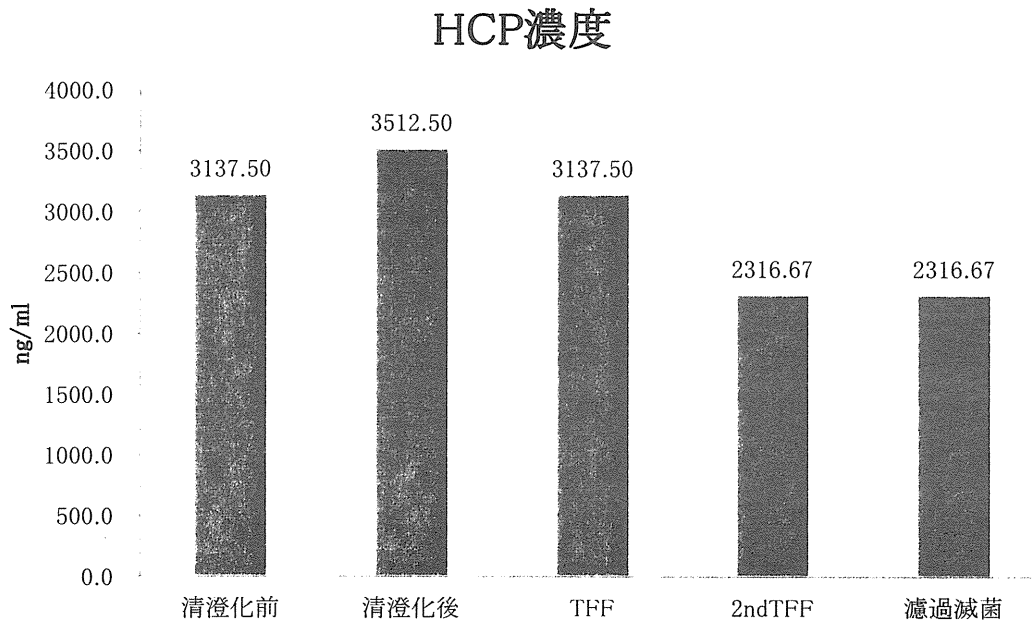
5-4. 残存 Benzonase 濃度、Total Benzonase 量



5-5. 残存 BSA 濃度、 Total BSA 量



5-6. 残存 HCP(Host Cell Protein)濃度、Total HCP 量



以上

独立行政法人 国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部

小野寺 雅史 様

作業報告書

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入法検討

RetroNectin®を用いた遠心感染法による遺伝子導入検討

< Lot. P1306-1 >

平成 26年 2月 27日

タカラバイオ株式会社

細胞・遺伝子治療センター

受託総責任者: 糠谷 育衛

目次

1. 概要	2
2. 使用材料および機器	2
2-1. 主な使用材料	2
2-2. 主な使用機器	2
3. 方法と結果	3
3-1. KG-1a 細胞株の培養	3
3-2. 遺伝子導入法	3
3-3. RetroNectin を用いた遠心感染法による遺伝子導入検討	3
3-4. Flow Cytometry 解析	4
4. 納品物	5
5. 添付データ	6
5-1. RetroNectin [®] を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討-1 における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	6
5-2. RetroNectin [®] を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討-2 における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	6
5-3. RetroNectin [®] Binding Virus (RBV)-spin 法を用いた遺伝子導入検討及び、遠心感染時におけるプロタミンの併用効果検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	6

1. 概要

レンチウイルスベクターの遺伝子導入方法の検討を以下の通り実施する。

RetroNectin[®]を用いた遠心感染法による遺伝子導入検討

1) RetroNectin[®]を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討

CD34 発現細胞株を用い、レンチウイルスを使用した遺伝子導入について、RetroNectin[®]および遠心 G の条件を組合せて検討を行い、遺伝子導入効率に対する効果を評価する。

遺伝子導入における遠心 G を掛けるタイミングを検討する。細胞播種前または後に遠心を掛ける条件で検討を行い本工程の効果の検討を行う。

2) RetroNectin[®] Binding Virus (RBV)-spin 法を用いた遺伝子導入検討

遠心感染時におけるプロタミンの併用効果検討

CD34 発現細胞株を用い、異なる希釈段階のウイルス、遺伝子導入法として Spinoculation 法及び RetroNectin[®] Binding Virus (RBV)-spin 法による遺伝子導入条件を組み合わせた検討を行う。同時にプロタミンを遺伝子導入時に添加することにより、遺伝子導入効率に対する効果を評価する。

2. 使用材料および機器

2-1. 主な使用材料

- ・一過性作製レンチウイルス
- ・使用細胞:
CD34 発現細胞株: KG-1a 細胞株 (ATCC Code. CCL246.1)
- ・使用培地:
10% FBS / RPMI-1640
RPMI-1640 (SIGMA Code.R8758)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Life technologies Code.10099-11)
Penicillin-Streptomycin (Life technologies Code.15140)
- ・PBS(-) (Life technologies Code.10010-023)
- ・RetroNectin[®] (TaKaRa Code.T100A)
- ・ACD-A 液 (Terumo Code.TP-A05ACD)
- ・生理食塩水 (Terumo Code.TP-A10NS)
- ・Human Serum Albumin (HSA):
アルブミン[®] 25% 静注 12.5g/ml (CSL behring Code.46300727)
- ・Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA Code.A9647-500G)

2-2. 主な使用機器

- ・バイオハザード対策用キャビネット (HITACHI, SCV-1307ECIAB3)
- ・CO₂ インキュベーター (Thermo, Forma Direct Heat CO₂ incubator)
- ・遠心機 (TOMY, AX-321)
- ・遠心機 (TOMY, LX-121)
- ・微量遠心機 (TOMY, MX-200)
- ・蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, IX71)
- ・Flow Cytometer (Becton Dickinson, BD FACSCantoII flow cytometer)
- ・FCM 解析用ソフトウェア (Becton Dickinson, FACSDiva)

3. 方法と結果

3-1. KG-1a 細胞株の培養

10cm Non-tissue culture treatment dish で培養を行なった。KG-1a 細胞株は浮遊細胞のため、培養細胞懸濁液を回収し、遠心分離(500×g, 5min)により上清を除いた後、10%FBS 添加 RPMI-1640 培地にて再懸濁を行い、細胞数の測定を行った。その後、適当な細胞濃度となるように、10%FBS 添加 RPMI-1640 培地で希釈し、培養を行った。以降、同様に継代し、培養を続けた。

3-2. 遺伝子導入法

3-2-1. Spinoculation 法

細胞とウイルスを混和し、遠心により遺伝子導入を行う方法

3-2-2. Supernatant 法

細胞とウイルスを混和し、静置により遺伝子導入を行う方法

3-2-3. RBV-spin 法

RetroNectin[®]コーティングプレートにウイルス液を添加し、遠心を行うことでウイルス結合プレートを作製した後、細胞を添加し遠心により遺伝子導入を行う方法

3-3. RetroNectin を用いた遠心感染法による遺伝子導入検討

RetroNectin[®]を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討-1 (RetroNectin[®]および遠心 G の条件を組合せた検討)

【方法】

RetroNectin[®]コーティングプレートを、48well plate (non-tissue culture treat)に RetroNectin[®] (2mg/ml)を 250μl/well で添加し、4℃で一晩静置した後、ACD-A 液により 2 回洗浄することで上清中の RetroNectin[®]を除去することで作製した。(以降の検討では、同様の方法にて RetroNectin[®]コーティングプレートを作製し使用した。)

KG-1a 細胞株 (0.8×10⁶ cells/ml)と ZsGreen 搭載レンチウイルスベクター (希釈倍率:2、8、32 倍)を 150μl/well ずつ等量混和し、RetroNectin[®]コーティング有無の両方のプレートに播種し、遠心を 1000×g で 15 分間行うことで遺伝子導入を行った (Spinoculation 法)。一方で、比較対象として、静置により遺伝子導入を行う条件を設定した (Supernatant 法)。

ZsGreen 陽性細胞率を遺伝子導入効率の指標として測定を行った。

【結果】

RetroNectin[®]をコーティングしたプレートを用いた遺伝子導入条件において、遺伝子導入効率の顕著な増加が認められた。また、遠心による遺伝子導入法 (Spinoculation 法)は、他に比べ高い遺伝子導入効率を得られた (添付データ 5-1)。

RetroNectin[®]を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討-2 (遠心 G を掛けるタイミングの検討)

【方法】

48well plate の RetroNectin[®]コーティングプレートを用いて検討を行った。細胞に遠心 G を掛けるタイミングを検討するため、KG-1a 細胞株と希釈レンチウイルス液を以下に示す条件で混和し、1000×g で 15 分間遠心を行った後、RetroNectin[®]コーティングプレートに細胞を播種した (播種前遠心条件)。もう一方は、同様に KG-1a 細胞株と希釈レンチウイルス液を異なる液量で混和し、RetroNectin[®]コーティングプレートに細胞を播種した後、遠心を 1000×g で 15 分間行った (播種後遠心条件)。その後、液量を揃えるために培養用培地を添加し、培養を行った。

遺伝子導入条件

導入条件	レンチウイルス		細胞		追加培地
	希釈倍率 [fold]	液量 [μl]	濃度 [cells/ml]	液量 [μl]	液量 [μl]
1	1	37.5	3.2×10^6	37.5	225
2	2	75	1.6×10^6	75	150
3	4	150	0.8×10^6	150	0

【結果】

播種後遠心条件で、播種前遠心条件に比べて高い導入効率が得られた。

また、RetroNectin®コーティングプレート条件の方が非コーティング条件よりも高い遺伝子導入効率を示した（添付データ 5-2）。

RetroNectin® Binding Virus (RBV)-spin 法を用いた遺伝子導入検討

遠心感染時におけるプロタミンの併用効果検討

【方法】

RetroNectin®コーティングプレート(48well plate)に、培養用培地にて希釈したレンチウイルスベクター溶液を150μl/wellで添加し、32°C、2000×gで2時間遠心を行った。その後、上清に残った余剰ウイルスを1.5%HSA添加生理食塩水で3回洗浄を行い、ウイルス結合プレートを作製した(RBV-spin法)。このウイルス結合プレートにKG-1a細胞(0.4×10^6 cells/ml)を1ml添加し、32°C、1000×gで10分間遠心することにより遺伝子導入を行った。

Spinoculation法による遺伝子導入には、RetroNectin®コーティングプレートに希釈したレンチウイルスベクター150μl/wellとKG-1a細胞(0.8×10^6 cells/ml)を150μl/wellで添加し、25°C、1000×g、10分間遠心を行うことで遺伝子導入を実施した。また、プロタミンによる遺伝子導入効率への影響を検討するために、遺伝子導入時の細胞懸濁液にプロタミンを終濃度10μg/mlとなるように添加した条件を設定した。コントロールとして、添加無し条件を設定した。

【結果】

遺伝子導入48時間後の遺伝子導入効率を比較した結果、Spinoculation法よりもRBV-spin法によりウイルスプレートを実施した遺伝子導入法の方が高い遺伝子導入効率を示した。プロタミン添加により、RBV-spin法による遺伝子導入時においてはわずかに遺伝子導入効率が高くなった。一方、Spinoculation法では、プロタミン添加による影響は認められなかった(添付データ 5-3)。

3-4. Flow Cytometry 解析

ZsGreen 発現細胞率解析

BD FACSCanto II フローサイトメーターにより細胞のZsGreen発現細胞率を計測した。

- 1) 各細胞の、FSC-A (前方散乱光: 細胞の大きさを反映) とSSC-A (側方散乱光: 細胞の内部構造の複雑さを反映) により二次元展開した。
- 2) 細胞集団を枠で囲んで領域を設定し、更に設定領域の細胞についてGFP-A (計測波長 515-545 nm) でZsGreenの蛍光波長 520 nmを検出し、FSC-AとZsGreenの蛍光強度により二次元展開した。非遺伝子導入KG-1a細胞をコントロールとしてZsGreen陽性領域を設定した。

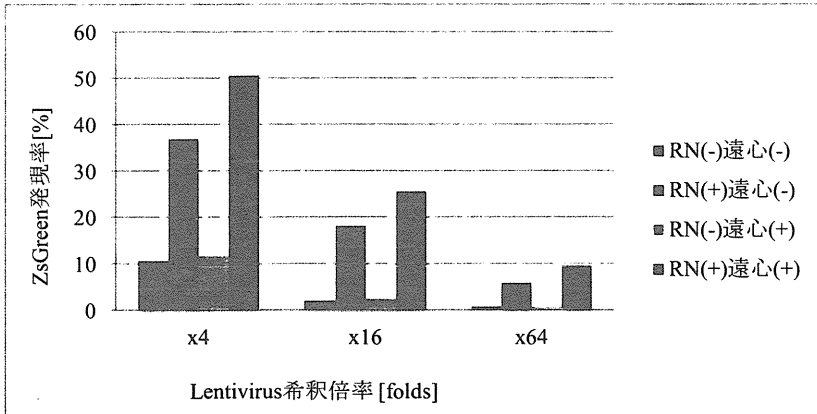
4. 納品物

- ・本作業報告書 1部

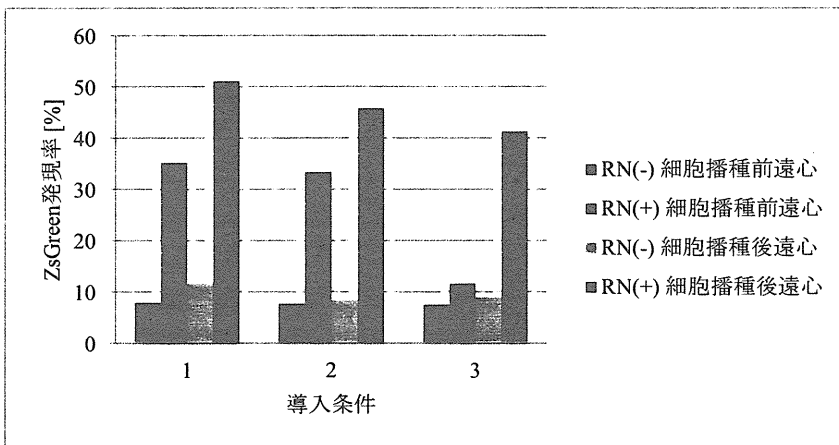
5. 添付データ

RetroNectin®を用いた遠心感染法による遺伝子導入検討

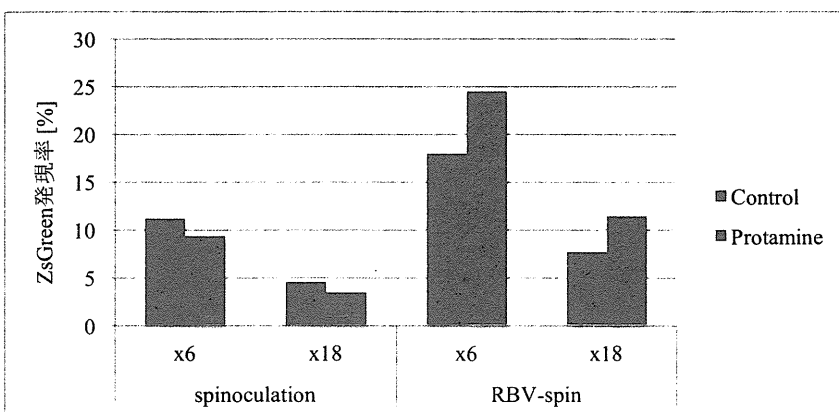
5-1. RetroNectin®を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討-1における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率



5-2. RetroNectin®を用いた Spinoculation 法による遺伝子導入検討-2における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率



5-3. RetroNectin® Binding Virus (RBV)-spin 法を用いた遺伝子導入検討及び、遠心感染時におけるプロタミンの併用効果検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率



以上

独立行政法人 国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部

小野寺 雅史 様

作業報告書

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入法検討

RetroNectin®を用いた非遠心感染法による遺伝子導入検討

< Lot. P1306-2 >

平成 26年 2月 27日

タカラバイオ株式会社

細胞・遺伝子治療センター

受託総責任者: 糠谷 育衛

目次

1. 概要	2
2. 使用材料および機器	2
2-1. 主な使用材料	2
2-2. 主な使用機器	2
3. 方法と結果	3
3-1. KG-1a 細胞株の培養	3
3-2. 遺伝子導入法	3
3-3. RetroNectin [®] を用いた非遠心感染法による遺伝子導入検討	3
3-4. Flow Cytometry 解析	4
3-5. レンチウイルスベクターによる遺伝子導入細胞中のプロウイルスコピー数測定	4
4. 納品物	5
5. 添付データ	5
5-1. ウイルスベクター容量依存性検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	5
5-2. ウイルスベクター容量依存性検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	5
5-3. ウイルスベクター容量依存性検討における培養細胞のレンチウイルスのプロウイルスコピー数の測定結果	6
5-4. 細胞濃度比較検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	7
5-5. 細胞濃度比較検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率	7
5-6. 細胞濃度比較検討における培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数の測定結果	8

1. 概要

レンチウイルスベクターの遺伝子導入方法の検討を以下の通り実施する。

RetroNectin®を用いた非遠心感染法による遺伝子導入検討

RBV-low temperature shaking (LTS)法による遺伝子導入検討

1) ウイルスベクター容量依存性検討

CD34 発現細胞株を用い、複数の希釈段階のレンチウイルスを用いて、遺伝子導入用容器(①RBV-spin 法、②RBV-LTS 法)を作製した後、これを用いて遺伝子導入効率の比較検討を行う。(①Supernatant 法、②RBV-spin 法、③RBV-LTS 法)

2) 遺伝子導入時における細胞濃度比較検討

ウイルス結合容器作成法により用意した遺伝子導入用容器を用いて、遺伝子導入時の細胞濃度の検討を行い、遺伝子導入効率の評価を行う。

2. 使用材料および機器

2-1. 主な使用材料

・精製レンチウイルス:Lot. L1308 報告書参照

・使用細胞:

CD34 発現細胞株: KG-1a 細胞株 (ATCC Code. CCL246.1)

・使用培地:

10% FBS / RPMI-1640

RPMI-1640 (SIGMA Code.R8758)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Life technologies Code.10099-11)

Penicillin-Streptomycin (Life technologies Code.15140)

・PBS(-) (Life technologies Code.10010-023)

・RetroNectin® (TaKaRa Code.T100A)

・ACD-A 液 (Terumo Code.TP-A05ACD)

・生理食塩水 (Terumo Code.TP-A10NS)

・Human Serum Albumin (HSA):

アルブミン® 25%静注 12.5g/ml (CSL behring Code.46300727)

・Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA Code.A9647-500G)

・qPCR 用 DNA 抽出試薬: SimplePrep® reagent for DNA (TaKaRa Code.9180)

・レンチウイルスプロウイルスコピー数測定試薬:

Lenti-X Provirus Quantitation Kit (TaKaRa Code.Z1239N)

Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time) (TaKaRa Code.6167)

2-2. 主な使用機器

・バイオハザード対策用キャビネット (HITACHI, SCV-1307ECIIAB3)

・CO₂ インキュベーター (Thermo, Forma Direct Heat CO₂ incubator)

・遠心機 (TOMY, AX-321)

・遠心機 (TOMY, LX-121)

・微量遠心機 (TOMY, MX-200)

・蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, IX71)