

- ・Flow Cytometer (Becton Dickinson, BD FACSCantoII flow cytometer)
- ・FCM 解析用ソフトウェア (Becton Dickinson, FACSDiva)
- ・Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa, TP800)
- ・マルチシェイカー (EYELA, MULTI SHAKER MMS)

### 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

##### RBV-low temperature shaking (LTS)法

RetroNectin<sup>®</sup>コーティングプレートにウイルス液を添加し、低温で振盪を行うことでウイルス結合プレートを作製した後、細胞を添加し静置により遺伝子導入を行う方法

#### 3-3. RetroNectin<sup>®</sup>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

##### 3-3-1. ウイルスベクター容量依存性検討

###### 【方法】

RetroNectin<sup>®</sup>コーティングプレート(24 well plate)に、異なる希釈段階のレンチウイルスベクター溶液(×50、×150、×450、×1350)を1ml/well で添加し、マルチシェイカーにて4℃で16時間振盪を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製した。振盪終了後、1.5%HSA/生理食塩水で3回洗浄を行い、遺伝子導入まで4℃で保管した(RBV-LTS法)。また、RNコーティングプレートに異なる希釈段階のレンチウイルスベクター溶液を1ml/well で添加し、32℃、2000×g で2時間遠心を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製した。遠心終了後、1.5%HSA/生理食塩水で3回洗浄を行い、遺伝子導入まで4℃で保管した(RBV-spin法)。

これらのRBV-LTS法、RBV-spin法により作製したレンチウイルス結合プレートに $0.4 \times 10^6$  cells/mlの濃度に調整したKG-1a細胞を1ml/well で添加し、静置により遺伝子導入を行った(RBV-LTS法、RBV-spin(-)法)。これに加えて、RBV-spin法により作製したレンチウイルス結合プレートを用いて、遺伝子導入時(細胞添加直後)に32℃、1000×gで10分間遠心を行うことで、遺伝子導入を実施した(RBV-spin(+))法)。また、RetroNectin<sup>®</sup>コーティングプレートに、希釈したレンチウイルス液(×25、×75、×225、×675)とKG-1a細胞( $0.8 \times 10^6$  cells/ml)を前述の遺伝子導入法と総細胞量およびウイルス量は等しくなるように混和し、静置により感染を行った(Supernatant法)。

遺伝子導入効率を遺伝子導入48時間後の細胞を用いて、Flow CytometryによるZsGreen発現細胞率の測定および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により評価を行った。

###### 【結果】

遺伝子導入48時間後のZsGreen陽性細胞率をFCM解析により測定した結果、全ての遺伝子導入法においてウイルス容量依存的な遺伝子導入効率の増加が認められた。検討した遺伝子導入法のうち、RBV-spin法によりウイルスプレロードを行った条件が最も高い遺伝子導入効率を示した。(添付データ5-1及び5-2)。レンチウイルスのプロウイルスコピー数においても、RBV-spin法によりウイルスプレロードを行った条件が最も高い遺伝子導入効率を示した(添付データ5-3)。

### 3-3-2. 遺伝子導入時における細胞濃度比較検討

#### 【方法】

上記 3-2-1 と同様の遺伝子導入法 (RBV-LTS 法、RBV-spin 法、Supernatant 法) を用い、異なる細胞播種濃度 ( $1 \times 10^6$ 、 $0.5 \times 10^6$ 、 $0.25 \times 10^6$ 、 $0.125 \times 10^6$  cells/ml/well) の KG-1a 細胞株を用いて遺伝子導入効率の比較を行った。遺伝子導入 24 時間後に細胞数が一定となるように希釈培養を行った後、遺伝子導入 48 時間後に一部の細胞を回収し、Flow Cytometry により ZsGreen 発現細胞率の解析を行った。また、遺伝子導入効率を培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数を測定することにより評価を行った。

#### 【結果】

遺伝子導入 48 時間後の ZsGreen 陽性細胞率を FCM 解析により測定した結果、低い細胞播種密度で遺伝子導入効率の増加が認められた (添付データ 5-4 及び 5-5)。遺伝子導入法間では、細胞の遠心を用いない RBV-spin 法が最も高い遺伝子導入効率を示した。レンチウイルスのプロウイルスコピー数においても RBV-spin 法が最も高い遺伝子導入効率を示した (添付データ 5-6)。

### 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。

### 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

#### リアルタイム RT-PCR 解析

凍結保存細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) からリアルタイム RT-PCR 用に SimplePrep<sup>®</sup> reagent for DNA を用いて付属のプロトコールに従いゲノム DNA を抽出した後、これを用いてリアルタイム PCR を実施した。Lenti-X Provirus Quantitation Kit のプロトコールに従い実施した。なお、この測定においては、検量線をレンチウイルスとヒト IFN $\gamma$  (インターフェロン  $\gamma$ ) それぞれの最適領域が 1 コピークローニングされた DNA control を用いて 2 種類 (レンチウイルスとヒト IFN $\gamma$ ) により作成し、試料ゲノム DNA 中のレンチウイルスとヒト IFN $\gamma$  の定量を行った。ヒト IFN $\gamma$  の PCR 増幅には、Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time) のプライマーを使用した。ヒト IFN $\gamma$  は染色体中に 1 コピーであることから、レンチウイルスプロウイルスコピー数を相対的に定量した。リアルタイム PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて行い、試料中のプロウイルスコピー数の定量を行った。

#### ・PCR 産物増幅曲線 (Primary Curve)

サイクル数を X 軸に、蛍光強度を Y 軸にプロットしたグラフ。

#### ・二次微分曲線 (2nd Derivative)

PCR 産物増幅曲線の蛍光強度を 2 回微分したグラフ。

二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出した Ct 値を X 軸に DNA control 量を Y 軸にプロットしてレンチウイルスとヒト IFN $\gamma$  の検量線を作成した。この検量線より以下の方法で、レンチウイルスのプロウイルスコピー数を算出した。

レトロウイルス用検量線およびヒト IFN  $\gamma$  用検量線から、サンプルのレンチウイルスコピーとヒト IFN  $\gamma$  の濃度を算出

$$\text{プロウイルスコピー数} = (\text{サンプルのレンチウイルスコピー濃度} / \text{サンプルのヒト IFN } \gamma \text{ 濃度}) \times 2 *$$

\*: 正常細胞は常染色体が 2 倍体なので、2 を掛ける

#### 4. 納品物

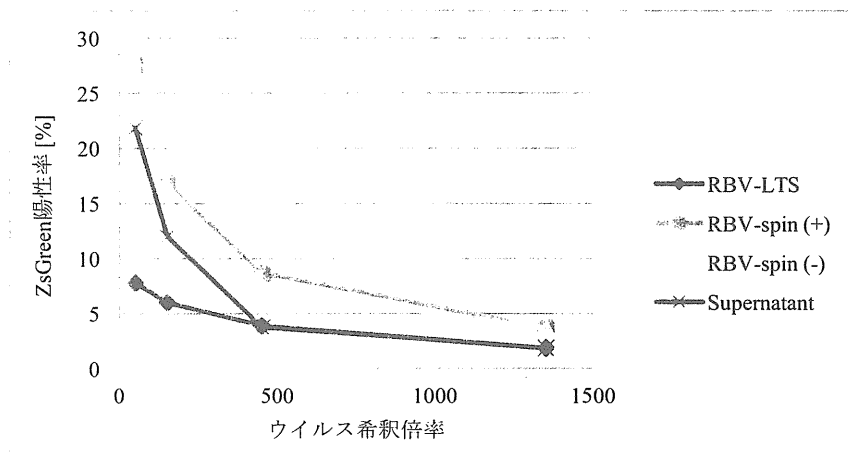
・本作業報告書 1部

#### 5. 添付データ

##### RetroNectin®を用いた非遠心感染法による遺伝子導入検討

##### ウイルスベクター容量依存性検討

##### 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



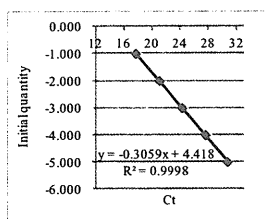
##### 5-2. ウイルスベクター容量依存性検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率

ウイルス希釈倍率 [folds]	ZsGreen 発現細胞率 [%]			
	RBV-LTS	RBV-spin (+)	RBV-spin (-)	Supernatant
50	7.80	27.6	28.1	21.9
150	6.00	16.9	16.6	12.0
450	3.90	8.70	7.40	3.75
1350	1.85	3.65	3.6	1.85

5-3. ウイルスペ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

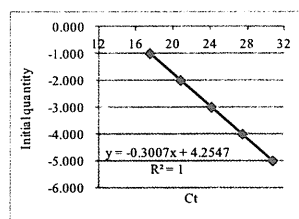
IFN $\gamma$  standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average	
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.64	17.68	17.66
	1.E-02	-2.000	21.02	21	21.01
	1.E-03	-3.000	24.27	24.27	24.27
	1.E-04	-4.000	27.72	27.49	27.61
	1.E-05	-5.000	30.67	30.74	30.71
D.W.	--	--	--	--	--
SLOPE				-0.3059	
INTERCEPT				4.418	
A.E. value				0.236	
RSQ				0.9998	



Lentivirus copy standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average	
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.34	17.6	17.47
	1.E-02	-2.000	20.78	20.81	20.80
	1.E-03	-3.000	24.1	24.13	24.12
	1.E-04	-4.000	27.36	27.59	27.48
	1.E-05	-5.000	30.64	30.87	30.76
D.W.	--	--	--	--	--
SLOPE				-0.3007	
INTERCEPT				4.255	
A.E. value				0.232	
RSQ				1.0000	

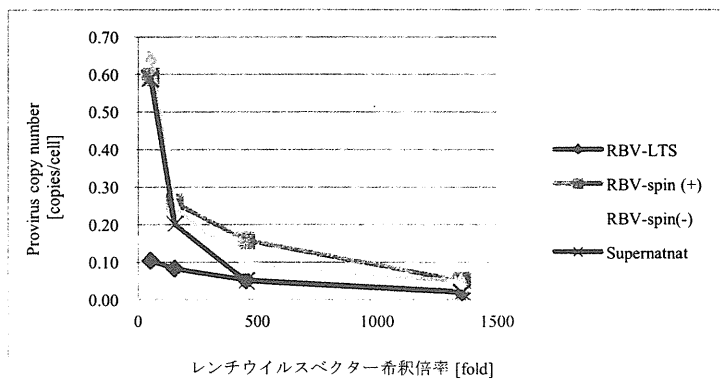


サンプルのIFN $\gamma$ 濃度

		Ct(SDM)		Average Ct	calculated Log(10)
NGMC		21.18	21.21	21.20	8.60.E-03
		21.8	21.77	21.79	5.68.E-03
		21.51	21.75	21.63	6.33.E-03
LTS	1	21.38	21.61	21.50	6.96.E-03
	0.5	20.84	21.17	21.01	9.83.E-03
		21.22	21.33	21.28	8.13.E-03
	0.25	20.67	21.15	20.91	1.05.E-02
		21.19	21.3	21.25	8.30.E-03
RBV-spin (+)	1	21.47	21.58	21.53	6.82.E-03
		21.47	21.45	21.46	7.14.E-03
	0.5	21.61	21.42	21.52	6.86.E-03
		21.6	21.64	21.62	6.38.E-03
	0.25	21.45	21.39	21.42	7.34.E-03
21.43		21.19	21.31	7.93.E-03	
RBV-spin(-)	1	21.18	21.04	21.11	9.13.E-03
		21.64	21.31	21.48	7.06.E-03
	0.5	21.78	21.13	21.46	7.16.E-03
		21.64	21.16	21.40	7.44.E-03
	0.25	21.59	21.62	21.61	6.44.E-03
21.69		21.82	21.76	5.80.E-03	
Supernatant	1	21.2	21.53	21.37	7.63.E-03
		20.86	21.17	21.02	9.76.E-03
	0.5	21.14	21.31	21.23	8.42.E-03
		21.27	21.22	21.25	8.30.E-03
	0.25	21.54	21.52	21.53	6.79.E-03
22		22.07	22.04	4.76.E-03	

サンプルのLentivirus copy濃度

		Ct(SDM)		Average Ct	calculated Log(10)	Provirus copy
NGMC		34.95	33.88	34.42	8.02.E-07	0.00
		32.18	32.13	32.16	3.84.E-06	0.00
		27.37	27.12	27.25	1.15.E-04	0.04
LTS	1	27.36	27.26	27.31	1.10.E-04	0.03
	0.5	26.31	26.19	26.25	2.29.E-04	0.05
		26.38	26.28	26.33	2.17.E-04	0.05
	0.25	25.89	25.63	25.76	3.22.E-04	0.06
		25.91	25.76	25.84	3.05.E-04	0.07
RBV-spin (+)	1	25.67	25.58	25.63	3.53.E-04	0.10
		25.28	25.42	25.35	4.27.E-04	0.12
	0.5	24.72	24.97	24.85	6.06.E-04	0.18
		24.83	25.16	25.00	5.46.E-04	0.17
	0.25	24.08	24.37	24.23	9.31.E-04	0.25
24.03		24.47	24.25	9.15.E-04	0.23	
RBV-spin(-)	1	23.4	23.61	23.51	1.53.E-03	0.34
		23.56	24.04	23.80	1.25.E-03	0.35
	0.5	23.65	23.81	23.73	1.31.E-03	0.37
		23.54	23.69	23.62	1.42.E-03	0.38
	0.25	24.97	24.79	24.88	5.92.E-04	0.18
25.26		25.34	25.30	4.42.E-04	0.15	
Supernatant	1	24.59	24.36	24.48	7.83.E-04	0.21
		24.1	24.05	24.08	1.03.E-03	0.21
	0.5	23.69	23.69	23.69	1.35.E-03	0.32
		23.55	23.67	23.61	1.43.E-03	0.34
	0.25	23.54	23.7	23.62	1.42.E-03	0.42
23.92		23.95	23.94	1.14.E-03	0.48	

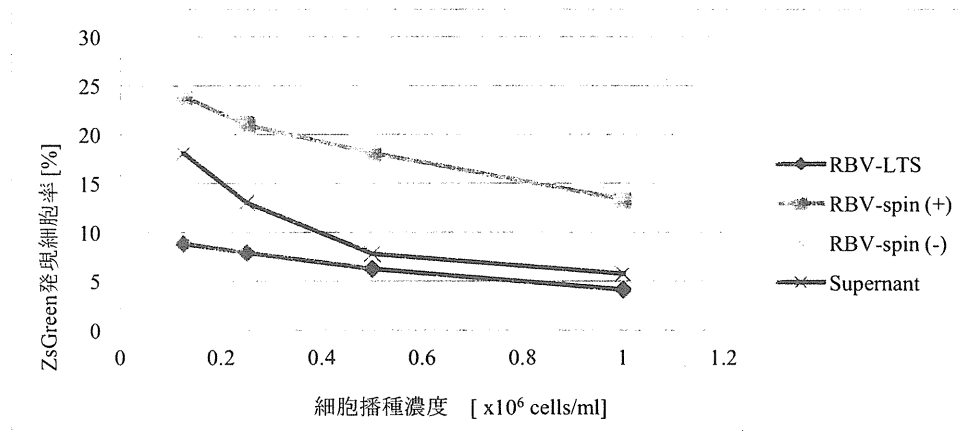


Average Provirus copy number

遺伝子導入法	ウイルス希釈倍率	Provirus copy
NGMC		0.00
RBV-LTS	50	0.10
	150	0.08
	450	0.05
	1350	0.02
RBV-spin (+)	50	0.59
	150	0.26
	450	0.16
	1350	0.05
RBV-spin(-)	50	0.65
	150	0.24
	450	0.09
	1350	0.05
Supernatant	50	0.59
	150	0.20
	450	0.05
	1350	0.02

遺伝子導入時における細胞濃度比較検討

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



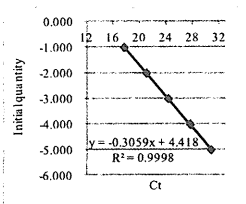
5-5. 細胞濃度比較検討における培養細胞の ZsGreen 発現細胞率

細胞播種濃度 [× 10 <sup>6</sup> cells/ml]	ZsGreen 陽性細胞率 [%]			
	RBV-LTS	RBV-spin (+)	RBV-spin (-)	Supernatant
1.0	4.15	13.4	14.3	5.8
0.5	6.25	18.1	19.6	7.8
0.25	7.90	21.0	23.5	13.0
0.125	8.80	23.9	24.9	18.1

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

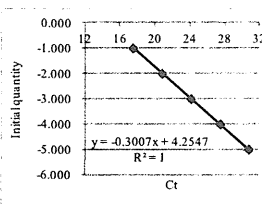
IFNy standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.64	17.66
	1.E-02	-2.000	21.02	21.01
	1.E-03	-3.000	24.27	24.27
	1.E-04	-4.000	27.72	27.49
	1.E-05	-5.000	30.67	30.74
D.W.	--	--	--	--
SLOPE				-0.3059
INTERCEPT				4.418
A.E. value				0.236
RSQ				0.9998



Lentivirus\_copy standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.34	17.6
	1.E-02	-2.000	20.78	20.81
	1.E-03	-3.000	24.1	24.12
	1.E-04	-4.000	27.36	27.59
	1.E-05	-5.000	30.64	30.87
D.W.	--	--	--	--
SLOPE				-0.3007
INTERCEPT				4.255
A.E. value				0.232
RSQ				1.0000

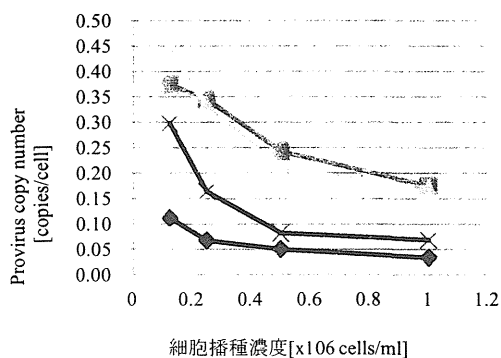


サンプルのIFNy濃度

遺伝子導入法	播種濃度	Ct(SDM)	Average Ct	calculated Log(10)
NGMC		21.18, 21.21	21.20	8.60.E-03
		21.8, 21.77	21.79	5.68.E-03
LTS	1	21.51, 21.75	21.63	6.33.E-03
		21.38, 21.61	21.50	6.96.E-03
	0.5	20.84, 21.17	21.01	9.83.E-03
		21.22, 21.33	21.28	8.13.E-03
	0.25	20.67, 21.15	20.91	1.05.E-02
		21.19, 21.3	21.25	8.30.E-03
RBV-spin(+)	1	21.47, 21.58	21.53	6.82.E-03
		21.47, 21.45	21.46	7.14.E-03
	0.5	21.61, 21.42	21.52	6.86.E-03
		21.6, 21.64	21.62	6.38.E-03
	0.25	21.45, 21.39	21.42	7.34.E-03
		21.43, 21.19	21.31	7.93.E-03
RBV-spin(-)	1	21.18, 21.04	21.11	9.13.E-03
		21.64, 21.31	21.48	7.06.E-03
	0.5	21.78, 21.13	21.46	7.16.E-03
		21.64, 21.16	21.40	7.44.E-03
	0.25	21.59, 21.62	21.61	6.44.E-03
		21.69, 21.82	21.76	5.80.E-03
Supernatnat	1	21.2, 21.53	21.37	7.63.E-03
		20.86, 21.17	21.02	9.76.E-03
	0.5	21.14, 21.31	21.23	8.42.E-03
		21.27, 21.22	21.25	8.30.E-03
	0.25	21.54, 21.52	21.53	6.79.E-03
		22, 22.07	22.04	4.76.E-03

サンプルのLentivirus\_copy濃度

遺伝子導入法	播種濃度	Ct(SDM)	Average Ct	calculated Log(10)	Provirus copy
NGMC		34.95, 33.88	34.42	8.02.E-07	0.00
		32.18, 32.13	32.16	3.84.E-06	0.00
LTS	1	27.37, 27.12	27.25	1.15.E-04	0.04
		27.36, 27.26	27.31	1.10.E-04	0.03
	0.5	26.31, 26.19	26.25	2.29.E-04	0.05
		26.38, 26.28	26.33	2.17.E-04	0.05
	0.25	25.89, 25.63	25.76	3.22.E-04	0.06
		25.91, 25.76	25.84	3.05.E-04	0.07
RBV-spin(+)	1	25.67, 25.58	25.63	3.53.E-04	0.10
		25.28, 25.42	25.35	4.27.E-04	0.12
	0.5	24.72, 24.97	24.85	6.06.E-04	0.18
		24.83, 25.16	25.00	5.46.E-04	0.17
	0.25	24.08, 24.37	24.23	9.31.E-04	0.25
		24.03, 24.47	24.25	9.15.E-04	0.23
RBV-spin(-)	1	23.4, 23.61	23.51	1.53.E-03	0.34
		23.56, 24.04	23.80	1.25.E-03	0.35
	0.5	23.65, 23.81	23.73	1.31.E-03	0.37
		23.54, 23.69	23.62	1.42.E-03	0.38
	0.25	24.97, 24.79	24.88	5.92.E-04	0.18
		25.26, 25.34	25.30	4.42.E-04	0.15
Supernatnat	1	24.59, 24.36	24.48	7.83.E-04	0.21
		24.1, 24.05	24.08	1.03.E-03	0.21
	0.5	23.69, 23.69	23.69	1.35.E-03	0.32
		23.55, 23.67	23.61	1.43.E-03	0.34
	0.25	23.54, 23.7	23.62	1.42.E-03	0.42
		23.92, 23.95	23.94	1.14.E-03	0.48



Average Provirus copy number

遺伝子導入法	播種濃度	Provirus copy
NGMC		0.00
RBV-LTS	1	0.03
	0.5	0.05
	0.25	0.07
	0.125	0.11
RBV-spin(+)	1	0.17
	0.5	0.24
	0.25	0.34
RBV-spin(-)	1	0.37
	0.5	0.45
	0.25	0.50
Supernatnat	1	0.07
	0.5	0.08
	0.25	0.16
	0.125	0.30

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

CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入条件の評価

< Lot. P1306-3 >

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. CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入条件の評価 .....	3
3-2. Flow Cytometry 解析 .....	4
3-3. 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 .....	6
5-1. ヒト由来 CD34 陽性細胞のサイトカイン刺激培養後の細胞形態 .....	6
5-2. ヒト由来 CD34 陽性細胞の遺伝子導入 48 時間後の細胞形態及び ZsGreen 蛍光顕微鏡像 .....	6
5-3. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞数測定結果 .....	7
5-4. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の免疫表現型解析 .....	7
5-5. 培養細胞中の CD34+CD38-CD133+細胞率及び CD34+CD90+CD133+細胞率 .....	7
5-6. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の ZsGreen 発現細胞率 .....	8
5-7. ZsGreen 発現細胞中の CD34+CD38-CD133+細胞率及び CD34+CD90+CD133+細胞率 .....	8
5-8. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞中の レンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果 .....	9

## 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。

CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入条件の評価

遠心感染法又は非遠心感染法による遺伝子導入効率の比較評価

ヒト由来 CD34 陽性細胞にサイトカインを添加した培地により刺激培養を行い、遠心感染法又は非遠心感染法による CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率および免疫表現型の比較評価を行う。

## 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:

ヒト由来 CD34 陽性細胞: ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Lonza Code. 2M-101C)

・使用培地:

X-VIVO10 培地(Lonza Code.04-380Q)

・Cytokine:

Recombinant human Stem Cell Factor (SCF) (R&D systems Code.255-SC-010)

Recombinant human Thrombopoietin (TPO) (Peprotech Code. IP1225)

Recombinant human Flt3-Ligand (Flt3-L) (Peprotech Code.IP1226)

Recombinant human IL-3 (Peprotech Code.IP1114)

・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<sup>®</sup> 25% 静注 12.5g/ml (CSL behring Code.46300727)

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

・Flow cytometry 用抗体:

PerCP-human CD34 (8G12) antibody (BD Pharmagen Code.340430)

PE-Cy7 mouse anti-human CD90 antibody (Becton Dickinson Code.561558)

PE-Cy7 CD38 antibody (Becton Dickinson Code. 335790)

CD133/1 (AC133)-APC antibody (Miltenyi, Code.130-098-829)

・qPCR 用 DNA 抽出試薬: SimplePrep<sup>®</sup> 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)

・CO<sub>2</sub> インキュベーター (Thermo, Forma Direct Heat CO<sub>2</sub> 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)
- ・Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa, TP800)
- ・マルチシェイカー (EYELA, MULTI SHAKER MMS)

### 3. 方法と結果

#### 3-1. CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入条件の評価

##### 遠心感染法又は非遠心感染法による遺伝子導入効率の比較評価

RetroNectin®を用いた非遠心感染法による遺伝子導入検討の結果より、非遠心感染法により高い遺伝子導入効率を得られたので、本検討では非遠心感染法による遺伝子導入法を用いた。

##### 【方法】

RetroNectin®コーティングプレート(24 well plate)に、希釈したレンチウイルスベクター溶液(×50倍)を1ml/wellで添加し、マルチシェイカーにて4°Cで16時間振盪を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製した(RBV-LTS法)。振盪終了後、1.5%HSA/生理食塩水で3回洗浄を行い、遺伝子導入に使用するまで4°Cで保管した。また、RN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溶液(×50倍)を1ml/wellで添加し、32°C、2000×gで2時間遠心を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製し、1.5%HSA/生理食塩水で3回洗浄を行い、遺伝子導入に使用するまで4°Cで保管した(RBV-spin法)。

ヒト由来 CD34 陽性細胞は、サイトカインを添加した X-VIVO10 培地 (SCF 300ng/ml、TPO 100ng/ml、Flt3-L 300ng/ml、IL-3 60ng/ml)にて24時間培養を行った後、 $0.3 \times 10^6$  cells/mlの細胞濃度に調整した。

RBV-LTS法、RBV-spin法により作製したレンチウイルス結合プレートに濃度調整したサイトカイン刺激培養細胞を1ml/wellで添加し、静置により遺伝子導入を行った(RBV-LTS法、RBV-spin(-)法)。また、RNコーティングプレートに、濃度調整したサイトカイン刺激培養細胞を1ml/wellで播種し、レンチウイルスベクター溶液を20µl/wellで添加し、静置により感染を行った(Supernatant法)。

遺伝子導入48時間後に培養細胞数の測定を行った後、培養細胞の一部を回収し、Flow Cytometryにより免疫表現型解析(CD34、CD133、CD38、CD90)及びZsGreen陽性細胞率の解析を行った。また、遺伝子導入効率を培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数を測定することにより評価を行った。

##### 【結果】

ヒト由来 CD34 陽性細胞のサイトカイン刺激後の細胞形態、遺伝子導入48時間後の細胞形態、及びZsGreen蛍光顕微鏡像を添付データ5-1および5-2に示す。遺伝子導入法条件間における細胞形態の明らかな差は認められなかった。遺伝子導入48時間後に培養細胞数の測定を行った結果、条件間において明らかな差は認められなかった(添付データ5-3)。遺伝子導入48時間後の培養細胞の免疫表現型解析を行った結果、CD34、CD133、CD90陽性細胞率及びCD38陰性細胞率は条件間で明らかな差は認められなかった(添付データ5-4)。また、CD34+CD90+CD133細胞率及びCD34+CD38-CD133+細胞率においても遺伝子導入条件間で明らかな差は認められなかった(添付データ5-5)。ZsGreen発現細胞率およびレンチウイルスプロウイルスコピー数の測定結果より、遺伝子導入効率はRBV-spin法とSupernatant法では差はなく、両者とも高い遺伝子導入効率が認められた(添付データ5-6及び5-8)。ZsGreen発現細胞中におけるCD34+CD38-CD133+細胞率及びCD34+CD90+CD133+細胞率を算出したところ、RBV-spin法とSupernatant法で差はなく、両者とも高い値を示した(添付データ5-7)。

### 3-2. Flow Cytometry 解析

#### 免疫表現型解析

BD FACSCanto II フローサイトメーターにより回収細胞中の CD34、CD38、CD90、CD133、及び ZsGreen 発現細胞率を計測した。

- 1) 1 サンプルあたり約  $1 \times 10^5$  cells を回収し FACS Buffer (0.5% BSA/PBS) 1ml で、洗浄後、下記条件で抗体染色を行った。抗体反応を 4℃、30 分間、暗所で行った後、FACS Buffer 1ml にて 2 度洗浄を行った。

Set1		Set2	
抗体	液量	抗体	液量
(ZsGreen)	—	(ZsGreen)	—
CD34-PerCP	2 $\mu$ l	CD34-PerCP	2 $\mu$ l
CD38-PECy7	1 $\mu$ l	CD90-PECy7	1 $\mu$ l
CD133-APC	1 $\mu$ l	CD133-APC	1 $\mu$ l
FACS Buffer	6 $\mu$ l	FACS Buffer	6 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l	Total	10 $\mu$ l

- 2) 各種細胞浮遊液をフローサイトメーターにアプライし、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。
- 3) 細胞集団を枠で囲んで設定し、更に設定領域の細胞について GFP-A で ZsGreen の蛍光極大波長 505 nm を検出した。PerCP-A では、PerCP-human CD34 (8G12) antibody の蛍光極大波長 678nm を測定した。PE-Cy7-A では、PE-Cy7 CD38 antibody 及び PE-Cy7 mouse anti-human CD90 antibody の蛍光極大波長 785nm を測定した。APC-A では、CD133/1 (AC133)-APC antibody の蛍光極大波長 660nm を測定した。CD34、CD38、CD90、CD133 及び ZsGreen を蛍光強度によりヒストグラムで展開し、各陽性細胞比率を算出した。
- 4) FSC-A と SSC-A にて二次元展開して設定した領域の細胞について CD34 及び CD38 又は CD90 の蛍光強度で二次元展開し、CD34 及び CD38 陰性細胞又は CD90 陽性細胞を枠で囲んで設定した後、さらにこの設定領域の細胞について、CD133 についてヒストグラムで展開し、CD34+ CD38-CD133+ 細胞率又は CD34+ CD90+CD133+ 細胞率を算出した。ZsGreen 陽性細胞中の CD34+ CD38-CD133+ 細胞率又は CD34+ CD90+CD133+ 細胞率も同様に算出した。

### 3-3. 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

#### リアルタイム RT-PCR 解析

凍結保存細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) からリアルタイム RT-PCR 用に SimplePrep<sup>®</sup> reagent for DNA を用いて付属のプロトコールに従いゲノム DNA を抽出した後、これを用いてリアルタイム PCR を実施した。Lenti-X Provirus Quantitation Kit のプロトコールに従い実施した。なお、この測定においては、検量線をレンチウイルスとヒト IFN $\gamma$  (インターフェロン  $\gamma$ ) それぞれの最適領域が 1 コピークローニングされた DNA control を用いて 2 種類 (レンチウイルスとヒト IFN $\gamma$ ) により作成し、試料ゲノム DNA 中のレンチウイルスとヒト IFN $\gamma$  の定量を行った。ヒト IFN $\gamma$  の PCR 増幅には、Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time) のプライマーを使用した。ヒト IFN $\gamma$  は染色体中に 1 コピーであることから、レンチウイルスプロウイルスコピー数を相対的に定量した。リアルタイム PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて行い、試料中のプロウイルスコピー数の定量を行った。

・PCR 産物増幅曲線 (Primary Curve)

サイクル数を X 軸に、蛍光強度を Y 軸にプロットしたグラフ。

・二次微分曲線 (2nd Derivative)

PCR 産物増幅曲線の蛍光強度を 2 回微分したグラフ。

二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出した Ct 値を X 軸に DNA control 量を Y 軸にプロットしてレンチウイルスとヒト IFN $\gamma$ の検量線を作成した。この検量線より以下の方法で、レンチウイルスのプロウイルスコピー数を算出した。

レトロウイルス用検量線およびヒト IFN  $\gamma$  用検量線から、サンプルのレンチウイルスコピーとヒト IFN  $\gamma$  の濃度を算出

プロウイルスコピー数 = (サンプルのレンチウイルスコピー濃度 / サンプルのヒト IFN  $\gamma$  濃度)  $\times$  2 \*

\*: 正常細胞は常染色体が 2 倍体なので、2 を掛ける

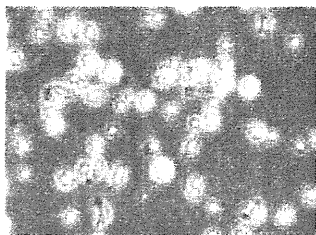
#### 4. 納品物

- ・本作業報告書 1 部

## 5. 添付データ

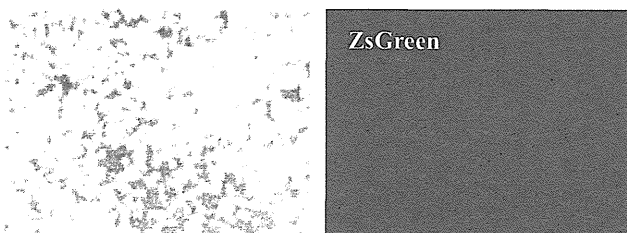
### CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入条件の評価

#### 5-1. ヒト由来 CD34 陽性細胞のサイトカイン刺激培養後の細胞形態

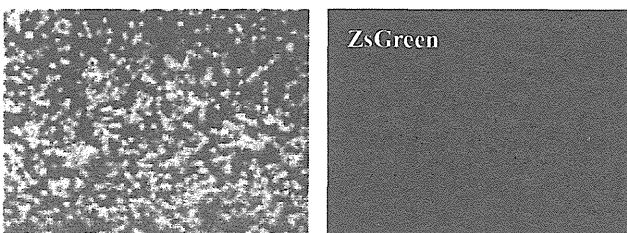


#### 5-2. ヒト由来 CD34 陽性細胞の遺伝子導入 48 時間後の細胞形態及び ZsGreen 蛍光顕微鏡像

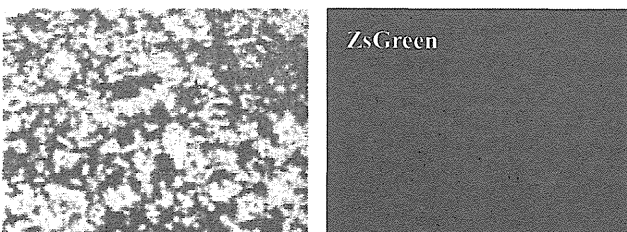
##### 非遺伝子導入細胞 (NGMC)



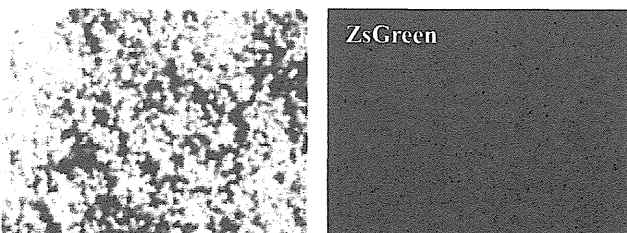
##### 遺伝子導入細胞 (RBV-spin 法)



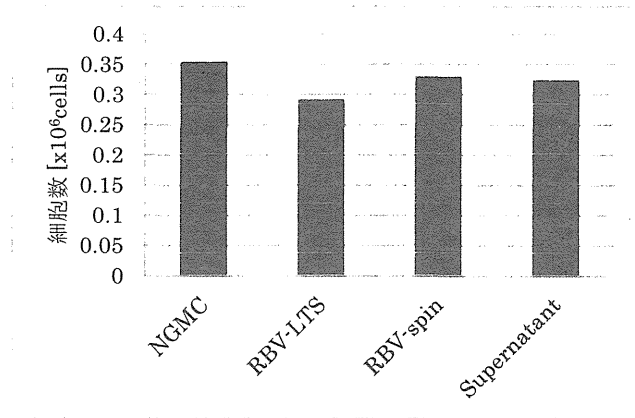
##### 遺伝子導入細胞 (RBV-LTS 法)



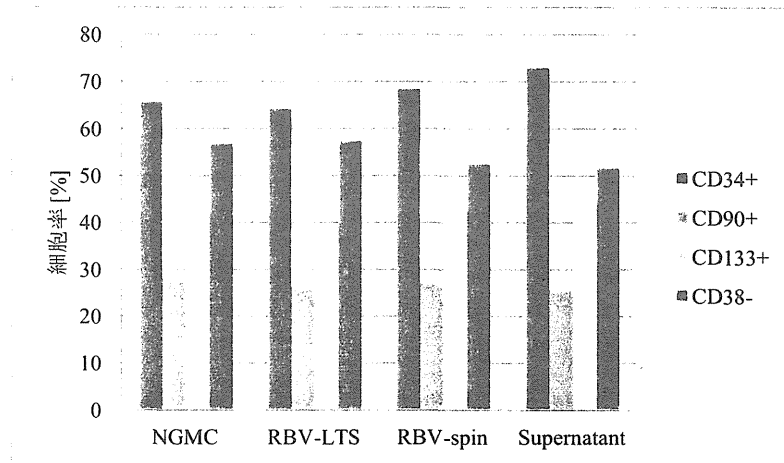
##### 遺伝子導入細胞 (Supernatant 法)



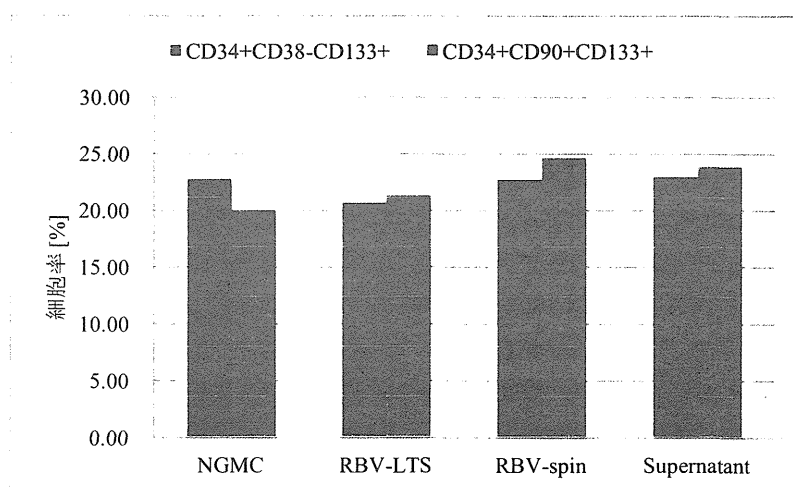
5-3. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞数測定結果



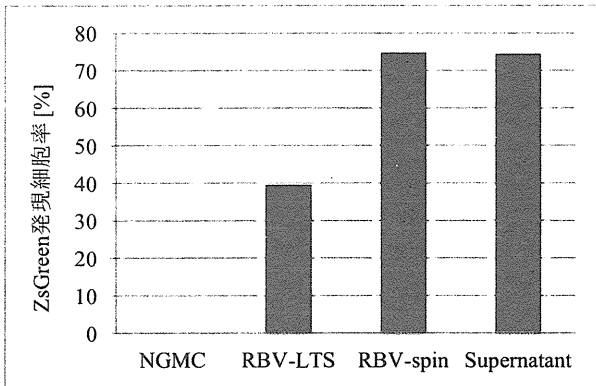
5-4. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の免疫表現型解析  
 CD34、CD90、CD133 陽性細胞及び CD38 陰性細胞率



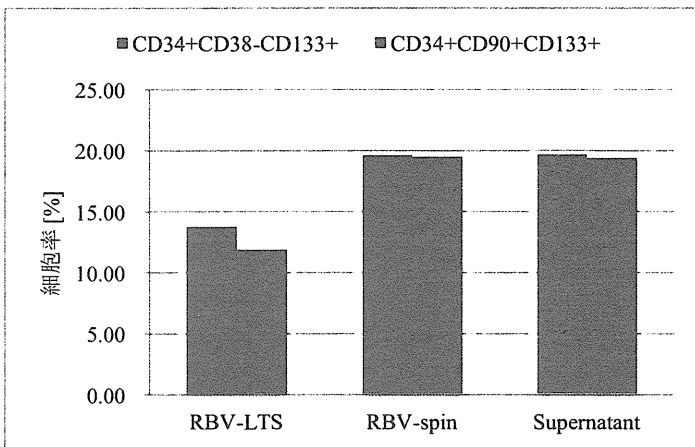
5-5. 培養細胞中の CD34+CD38-CD133+細胞率及び CD34+CD90+CD133+細胞率



5-6. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の ZsGreen 発現細胞率



5-7. ZsGreen 発現細胞中の CD34+CD38-CD133+細胞率及び CD34+CD90+CD133+細胞率

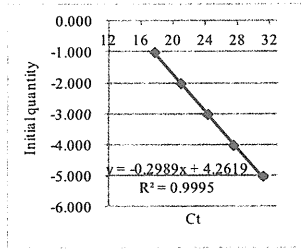




5-8. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞中の レンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果

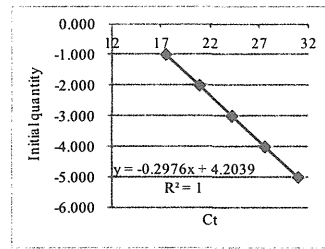
IFN $\gamma$  standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average	
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.67	17.7	17.69
	1.E-02	-2.000	20.93	20.92	20.93
	1.E-03	-3.000	24.26	24.29	24.28
	1.E-04	-4.000	27.48	27.48	27.48
	1.E-05	-5.000	31.26	31	31.13
SLOPE			-0.2989		
INTERCEPT			4.262		
A.E. value			0.230		
RSQ			0.9995		



Lentivirus\_copy standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average	
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.38	17.57	17.48
	1.E-02	-2.000	20.97	20.78	20.88
	1.E-03	-3.000	24.18	24.22	24.20
	1.E-04	-4.000	27.53	27.59	27.56
	1.E-05	-5.000	30.73	31.14	30.94
SLOPE			-0.2976		
INTERCEPT			4.204		
A.E. value			0.229		
RSQ			1.0000		

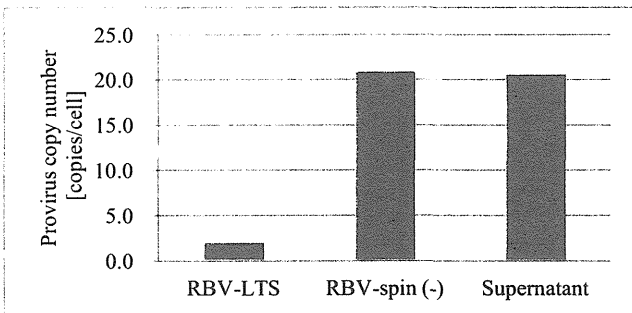


サンプルのIFN $\gamma$ 濃度

遺伝子導入法	Ct(SDM)		Average Ct	calculated Log(10)
NGMC	23.23	23.12	23.18	2.17.E-03
RBV-LTS	24.66	24.64	24.65	7.85.E-04
RBV-spin (-)	23.96	23.92	23.94	1.28.E-03
Supernatant	23.96	24.03	24.00	1.23.E-03

サンプルのLentivirus\_copy濃度

遺伝子導入法	Ct(SDM)		Average Ct	calculated Log(10)	Provirus copy
NGMC	31.78	31.37	31.58	6.43.E-06	0.0
RBV-LTS	24.53	24.63	24.58	7.76.E-04	2.0
RBV-spin (-)	20.4	20.45	20.43	1.34.E-02	20.9
Supernatant	20.46	20.54	20.50	1.27.E-02	20.6



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

生物由来原料非含有培養用培地による遺伝子導入効率の比較評価

< Lot. P1306-4 >

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.....	3
3. 方法と結果.....	3
3-1. KG-1a 細胞株の培養.....	3
3-2. 生物由来原料非含有培養用培地による遺伝子導入効率の比較評価.....	3
3-3. Flow Cytometry 解析.....	5
3-4. 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.....	6
4. 納品物.....	6
5. 添付データ.....	7
5-1. KG-1a 細胞株の生物由来原料非含有培養用培地(100%)への馴化培養の様子.....	7
5-2. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞数測定結果.....	8
5-3. 遺伝子導入 48 時間後の 培養細胞の ZsGreen 発現細胞率.....	8
5-4. 遺伝子導入 48 時間後の 培養細胞の ZsGreen 発現細胞率.....	8
5-5. 遺伝子導入 48 時間後の 培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果.....	9
5-6. ヒト由来 CD34 陽性の Day0 細胞播種時の細胞形態写真.....	10
5-7. ヒト由来 CD34 陽性の Day1 サイトカイン刺激 24 時間後の細胞形態写真.....	10
5-8. ヒト由来 CD34 陽性細胞の遺伝子導入 48 時間後の細胞形態及び ZsGreen 蛍光顕微鏡像.....	11
5-9. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の増殖率.....	12
5-10. 細胞播種前のヒト由来 CD34 陽性細胞の免疫表現型解析.....	12
5-11. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の免疫表現型解析.....	12
5-12. 培養細胞中の CD34+CD90+CD133+細胞率及び CD34+CD38-CD133+細胞率.....	13
5-13. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の ZsGreen 発現細胞率.....	13
5-14. ZsGreen 発現細胞中の CD34+CD38-CD133+及び CD34+CD90+CD133+細胞率.....	13
5-15. 培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果.....	14

## 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。

生物由来原料非含有培養用培地による遺伝子導入効率の比較評価

### 1) CD34 発現細胞株を用いた遺伝子導入効率評価

CD34 発現細胞株については、各培地にて事前培養を行い、遺伝子導入効率の評価を行う。

### 2) ヒト由来 CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入効率評価

ヒト由来 CD34 陽性細胞は、サイトカインを添加した培地により刺激培養を行い、生物由来原料非含有および含有培地を用いて、遺伝子導入効率および免疫表現型の比較評価を行う。

## 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)

ヒト由来 CD34 陽性細胞: ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Lonza Code. 2M-101C)

・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)

X-VIVO10 培地(Lonza Code.04-380Q)

CellGro-SCGM 培地(CellGenix Code.20802-0500)

GT-T-RetroIII 培地(TaKaRa Code.KB506)

硫酸ストレプトマイシン注射用 1g「明治」(明治製菓 承認番号 21700AMZ00683000)

Insulin Solution, Human, recombinant (Wako Code.093-0635)

GT-T551 培地(TaKaRa Code.KB551S)

・Cytokine:

Recombinant human Stem Cell Factor (SCF) (R&D systems Code.255-SC-010)

Recombinant human Thrombopoietin (TPO) (Peprotech Code. IP1225)

Recombinant human Flt3-Ligand (Flt3-L) (Peprotech Code.IP1226)

Recombinant human IL-3 (Peprotech Code.IP1114)

・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)

・Flow cytometry 用抗体:

PerCP-human CD34 (8G12) antibody (BD Pharmagen Code.340430)

PE-Cy7 mouse anti-human CD90 antibody (Becton Dickinson Code.561558)