

## レンチウイルスベクターの作製方法

三好 浩之 (理研 BRC 細胞運命情報解析技術開発サブチーム)

### 準備するもの

#### <試薬>

- Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA・4Na) 溶液 (SIGMA 社、GIBCO 社など)
- 0.01% Poly-L-Lysine 溶液 (SIGMA 社)  
PBS で 1/5 に希釈して使用。

- 2×BBS

(最終濃度)

BES	2.665 g	(50 mM)
NaCl	4.091 g	(280 mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	150 mM を 2.5 ml	(1.5 mM)

Milli-Q 水で 245 ml にする。2N NaOH(約 2.5 ml) で pH 6.95 にする。Milli-Q 水で 250 ml にする。0.22 μm フィルター滅菌後、分注して-20°C で保存。

- 2.5M CaCl<sub>2</sub> 溶液

0.22 μm フィルター (Milli-Q 水であらかじめ湿らせておく) 滅菌後、分注して-20°C で保存。

- HBSS (Hank' s Balanced Salt Solution) (GIBCO 社)
- 5 mM Forskolin (500×) (SIGMA 社) 25 mg/12.18 ml DMSO、-20°C で保存。

#### <細胞>

293T 細胞

#### <培地>

- DMEM 培地

Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (SIGMA 社) に最終濃度が 10% fetal bovine serum、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、100 mg/ml streptomycin sulfate となるように加える。

#### <器具・機械>

- Poly-L-Lysine コートディッシュ
- CO<sub>2</sub> インキュベーター (3%, 10%)
- 遠心機
- 超遠心機 (スイングローター)

## プロトコール

### 1. レンチウイルスベクターの調製

直径 10cm の Poly-L-Lysine 処理したディッシュに、サブコンフルエント状態の 293T 細胞を  $5 \times 10^6$ /10 ml DMEM 培地/dish (5-6 倍希釈) で細胞を播く①。

↓

37°C、10% CO<sub>2</sub> インキュベーターで約 24 時間培養し、70-80%コンフルエントにする②。

↓

1.5 ml エッペンドルフチューブまたは 5 ml ポリスチレンチューブ (Falcon 2058) に③、ディッシュ 1 枚あたり以下の DNA 溶液を用意する④。

パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp)	10 $\mu$ g
VSV-G, Rev プラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev)	10 $\mu$ g
SIN ベクタープラスミド	17 $\mu$ g

滅菌 Milli-Q 水で 450  $\mu$ l にした後、2.5M CaCl<sub>2</sub> を 50  $\mu$ l 加えボルテックスで混合する。

↓

上記の溶液を攪拌しながら 500  $\mu$ l の 2×BBS⑤を少しずつ加え、室温で 10-20 分放置する⑥。

↓

ピペットマン (P1000) を使用して少量ずつ均一にディッシュに播く。ディッシュを持ち、培地をよく攪拌する⑦。

↓

37°C、3% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 12-16 時間培養する⑧。

↓

培養上清を吸引除去し、新しい DMEM 培地 (+10  $\mu$ M Forskolin) 7.5 ml (37°C) と置換する。

↓

37°C、10% CO<sub>2</sub> インキュベーターで約 48 時間培養する。

↓

ウイルス含有培養上清を回収し⑨、0.45  $\mu$ m フィルターを通して浮遊細胞等を除去する⑩。

↓

濃縮しない場合には、このまま分注して -80°C で保存する。

### 2. レンチウイルスベクターの濃縮⑪

0.45  $\mu$ m フィルターを通したウイルス含有培養上清を、50,000×g (BECKMAN SW28 だと 19,400 rpm) ⑫、20 °C で、2 時間超遠心を行なう。

↓

上清をデカントまたは吸引除去し、ピペットマン（P200）を使用して遠心前の 1/200 量程度（ $<50 \mu\text{l}/\text{dish}$ ）の HBSS<sup>⑬</sup>に懸濁する<sup>⑭</sup>。

↓

遠心チューブに移し、HBSS でメスアップし、 $50,000 \times g$ （BECKMAN SW55 だと 24,000 rpm）、 $20^\circ\text{C}$ で、2 時間超遠心を行なう。

↓

上清をデカントまたは吸引除去し、ピペットマンを使用して遠心前の 1/1,000 量程度（ $<10 \mu\text{l}/\text{dish}$ ）の HBSS に懸濁する<sup>⑮</sup>。

↓

スクリーキャップのついたチューブに分注し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存する<sup>⑯</sup>。

### 3. レンチウイルスベクターのタイター（力価）測定

ベクターに GFP などのマーカー遺伝子が組み込まれている場合は、以下のようにして測定する。

6 well ディッシュに 293T または HeLa  $\text{CD4}^+$ 細胞を  $1 \times 10^5/\text{well}$  で播き、約 24 時間培養する。

↓

様々な量のウイルス液を細胞に感染させる。

↓

さらに 48–72 時間培養する。

↓

マーカー遺伝子の陽性細胞数をフローサイトメトリー等で測定し、タイターを算出する<sup>⑰</sup>。タイターはインサートの大きさや遺伝子によって異なるが、濃縮前では  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  IU(infectious units)/ml、濃縮後では  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$  IU/ml になる<sup>⑱</sup>。

ベクターにマーカー遺伝子が組み込まれていない場合は、p24 ELISA kit を用いて、ウイルス液中の p24 量を測定する。1 ng の p24 が  $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  IU に相当する。

### 4. 細胞への遺伝子導入

培養細胞への感染は、MOI<sup>⑲</sup>を上げれば導入効率も上がり、ウイルスが多重感染することにより導入遺伝子の発現レベルも上がる。しかし、VSV-G の細胞に対する毒性もあり、細胞によってその感受性がかなり異なるので、最初は MOI を何段階かに変えて至適 MOI を決定する。感染はできるだけ少量の培地中で行う方が、感染効率が高くなり導入効率も上がる。通常、感染後 48–72 時間で、導入遺伝子産物の発現が確認できる。

in vivo に直接インジェクションする場合には、タイターが  $>1 \times 10^9$  IU/ml のウイルス液を使用する。

## プロトコールの注意点

- ①293T 細胞は、約 0.5ml の Trypsin-EDTA 溶液で 2-3 分処理し細胞を剥がした後、培地を加え細胞の塊がないようによく懸濁し、ディッシュに均一に播く。細胞の塊があったり、細胞分布が不均一だとトランスフェクションの効率が悪くなる。
- ②トランスフェクション後は、細胞はあまり増殖しないので、これくらいの細胞密度で播くと、1 日後にはコンフルエントになり titer の高いウイルスが産生される。
- ③DNA の吸着の低いチューブを用いる。エッペンドルフチューブはシリコンコートするとさらによい。
- ④プラスミド DNA はカラム等で精製したクオリティーの高いものを使用し、TE でなく Milli-Q 水に溶解する。各プラスミド DNA の濃度は分光光度計で正確に測定し用いる。
- ⑤2×BBS の pH は 6.95 に正確に合わせる事が重要。トランスフェクションの効率に影響する。
- ⑥プラスミド DNA とリン酸カルシウムの複合体が形成され、溶液が少し白濁する。
- ⑦培養 1-2 時間後に、プラスミド DNA とリン酸カルシウムの複合体沈殿物が細胞と比べてかなり小さく砂粒状であればトランスフェクションの効率は高い。大きな沈殿物が見られた場合は、プラスミド DNA のクオリティーか濃度、2×BBS の pH に問題があり、トランスフェクションの効率も低くなり細胞に対する毒性も高い。
- ⑧インキュベーターの CO<sub>2</sub> 濃度は 5% でも可だが、3% の方がトランスフェクションの効率は高い。(Chen, C. & Okayama, H.: Mol Cell Biol 7: 2745-2752, 1987)
- ⑨培養上清を回収後、ディッシュに新しい DMEM 培地 (+10 μM Forskolin) 7.5 ml (37°C) を加え、さらに約 48 時間培養することにより、ウイルスを 2 回収することができる。(タイターは、1 回目の 1/4 くらいになる。)
- ⑩浮遊細胞が多い場合には、フィルターを通す前に遠心 (1,500rpm 程度) により細胞を除く。
- ⑪大量のレンチウイルスベクターを濃縮したい、あるいはウイルス液の培地成分を除きたい場合に行なう。Microcon Ultracel (Millipore 社) 等のフィルターを使用しても濃縮できるが、濃縮度を上げたいまたは培地成分を完全に除きたい場合には超遠心の方がよい。
- ⑫丸底よりコニカルチューブの方が、沈殿が 1ヶ所に集中してよい。
- ⑬感染させる細胞を培養する培地から血清を抜いたものに懸濁してもよい。
- ⑭泡立てないように注意して懸濁する。1 回目の遠心後、-80°C で保存し使用してもよい。
- ⑮2 回目の遠心後には沈殿はかなりパックされた状態なので、泡立てないように注意しながら根気強く数百回ピペッティングして懸濁する。いくら懸濁しても残る debris は、チューブに移した後軽く遠心して除く。2 回目の超遠心の代わりに Microcon Ultracel (Millipore 社) 等のフィルターで濃縮してもよい。
- ⑯-80°C で保存の場合、少なくとも 6 ヶ月は安定であるが、凍結融解を繰り返すとその度に

タイターは少しずつ低くなる。解凍して使用する際は、よくピペッティングして懸濁してから使用する。

⑰タイターは、感染時の細胞数（約  $4 \times 10^5$ /well）で計算する。

⑱タイターは、標的細胞によって異なるので、あくまでもウイルス液中の感染可能ウイルス数の目安ではあるが、いつも同じ細胞を同じ状態で測定に用いる。

⑲MOI(multiplicity of infection)は、細胞1個に対するウイルスの数。例えば、タイターが  $1 \times 10^9$  IU/ml のウイルス液  $1 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^6$  IU) を  $1 \times 10^5$  の細胞に感染させた時、MOI は 10 である。

## トラブルシューティング

トラブル	可能性	解決のための処置
レンチウイルスベクターの タイターが低い	プラスミド DNA の純度が低い	カラム等を使って精製する
	プラスミド DNA の濃度が正確でない	濃度を分光光度計で正確に測定する
	ベクターにインサートした遺伝子のサイズが大きい	なるべく ORF だけにして余分な配列を削除する
	2×BBS が古い（6ヶ月以上）または pH が正確でない	新しく作る、pH6.95 に正確に合わせる
	293T 細胞の状態が悪い	新しい細胞を起こす。トランスフェクション時には、均一に 70~80%コンフルエントにする
	超遠心による各ステップでロスしている	各ステップでサンプリングし遠心前と比較する
超遠心によるウイルスの沈殿がよく懸濁されていない	泡立てないように注意しながら根気強く数百回ピペッティングして懸濁する	
細胞への遺伝子導入効率が低い	MOI が低い	MOI を上げる
	感染時の培地の量が多い	できるだけ少量の培地中で感染させる
	細胞でのプロモーターの発現レベルが低い	他のプロモーターに換える

## 参考文献

- 1) Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267 (1996).
- 2) Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72, 8463-8471 (1998).
- 3) Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10319-10323 (1997).
- 4) Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* 72, 8150-8157 (1998).
- 5) Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M., and Torbett, B. E. Transduction of human CD34<sup>+</sup> cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283, 682-686 (1999).
- 6) Tahara-Hanaoka, S., Sudo, K., Ema, H., Miyoshi, H., and Nakauchi, H. Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34<sup>-</sup> hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 30, 11-17 (2002).
- 7) Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., and Shibuya, A. CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J. Exp. Med.* 198, 1829-1839 (2003).
- 8) Miyoshi, H. Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Methods Mol. Biol.* 246, 429-438 (2004).
- 9) 三好浩之：遺伝子導入法（レンチウイルスベクター） 実験医学(別冊) 免疫学的プロトコール（羊土社），127-137（2004）
- 10) 三好浩之：蛍光タンパク質遺伝子導入法 レンチウイルスベクターによる導入 バイオテクノロジージャーナル（羊土社）7, 97-105（2007）。
- 11) 三好浩之：レンチウイルスベクター 最新医学 幹細胞研究の最近の進歩（最新医学社）Vol. 64（3月増刊号），232-242（2009）。