

RetroNectin®を用いた遺伝子導入法の最適化

RetroNectin®はヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン、ヘパリン結合ドメイン、CS-1配列の3つの機能ドメインから構成されるポリペプチドであり、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入プロトコルに用いられています(図1)。RetroNectin®を用いることにより、レトロウイルスベクターでの遺伝子導入が従来困難とされていた造血幹細胞などの標的細胞に、容易に高効率で遺伝子導入できるようになりました^{1,2)}。

しかし、RetroNectin®でコートした容器にウイルスベクターと標的細胞を同時に加える方法(Supernatant infection; SN法)では、ウイルス液中に含まれる産生細胞由来の物質の影響により感染阻害が起こることが明らかとなりました。

現在、遺伝子導入プロトコルとしては、まずウイルスベクターをRetroNectin®コート容器に加え(pre-load)一定時間インキュベートしてウイルスベクターのみをRetroNectin®上に結合させ、感染阻害物質を含む上清を除去した後、標的細胞を加える方法(RetroNectin® bound virus infection; RBV法)を推奨しております³⁾(図2)。

ここでは、RBV法で遺伝子導入する際の、pre-loadするウイルス液量、pre-loadする時間、感染時の細胞密度についての最適条件をご紹介します。

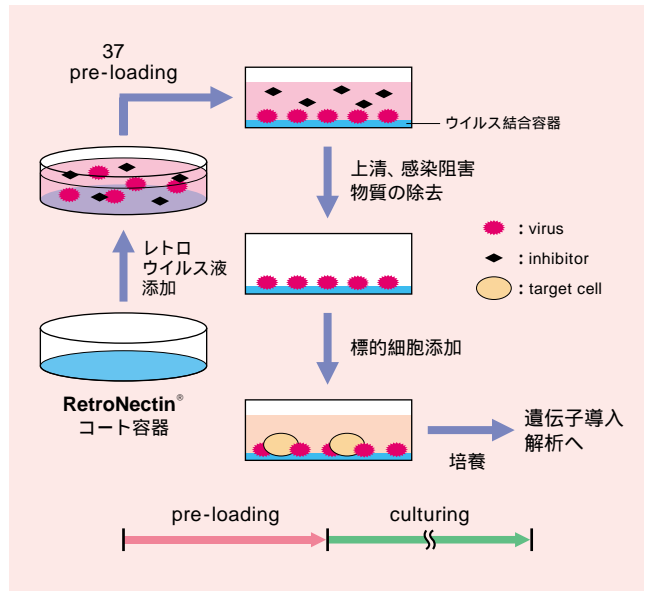


図2 RBV法の概略

ウイルス液を先にRetroNectin®コート容器に加え、37°CのCO₂インキュベーターに置く。次に上清を除去し、PBSで容器を洗浄する(これによりウイルス液中の感染阻害物質が除去され、遺伝子導入効率が向上する。上清を除去したときに、容器が乾かないように注意する必要がある)。最後に標的細胞を速やかに加える。

RetroNectin®コート容器にpre-loadするウイルス液量の検討

【方法】

24ウェルRetroNectin®コート容器(1ウェルの面積2cm²)に、GFPをマーカーとして持つレトロウイルスベクター(エンベロープはGALVとAmphoの2種類)を含む溶液を125μl、250μlまたは500μl加え、37°Cで4時間インキュベートした(pre-load)。上清を除去した後、K562細胞、TF-1細胞、HL-60細胞を添加して培養し、3日後にフローサイトメーターでGFP陽性細胞率を測定し、遺伝子導入効率を算出した。

【結果】

図3に示すように、GALVとAmphoのいずれのウイルスでも、添加量がウェルあたり250μl以上であれば導入効率は変わらないことがわかりました。すなわち、RBV法で必要な最低ウイルス液量は1cm²あたり125μlであることが明らかとなりました。また、図4に示すように、SN法ではウイルス原液および2倍希釈液を用いると感染阻害が起こり、RBV法よりも感染効率が低くなります。一方、RBV法では遺伝子導入効率とウイルス希釈率は直線的な関係を示し、目的の導入効率を得るにはウイルス液を何倍希釈すればよいかを予測することができます。

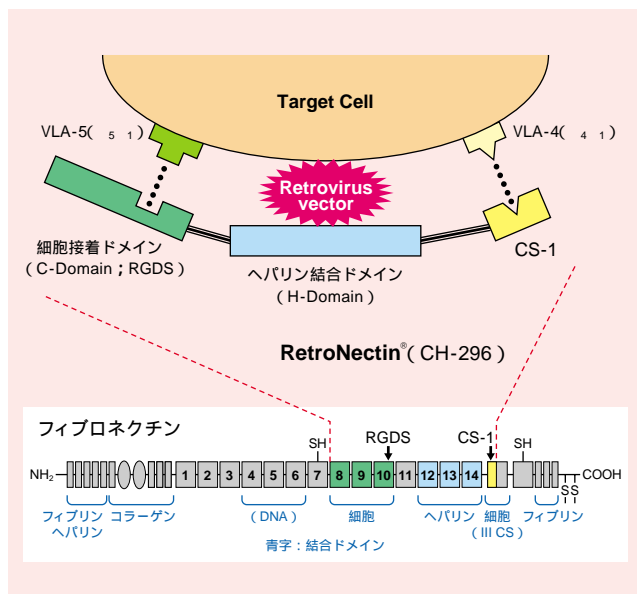


図1 フィブロネクチンのドメイン構造、モジュール構造と、RetroNectin®による遺伝子導入メカニズム

Hドメインにレトロウイルスベクターが結合し、CドメインまたはCS-1に細胞が接着することによる共配置によりウイルス感染が成立する。

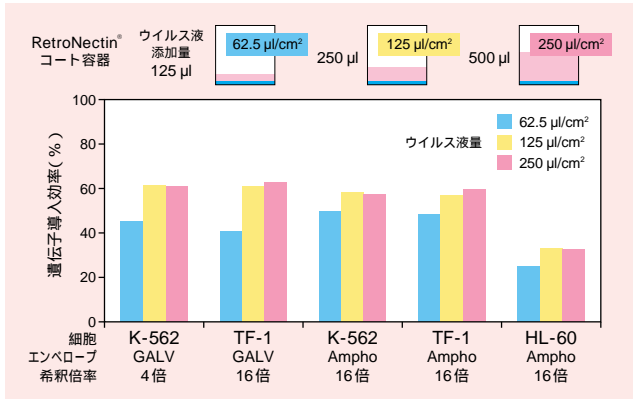


図3 ウイルス液の添加量の検討
ウイルス液量が125 µl/cm²以上であれば、遺伝子導入効率は変わらないことがわかる。

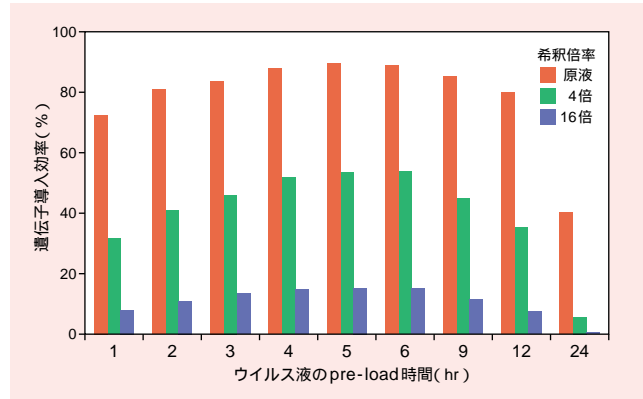


図5 ウイルス液の pre-load 時間の検討
RBV 法での遺伝子導入効率は pre-load 時間が 4 ~ 6 時間の範囲で最大となる。

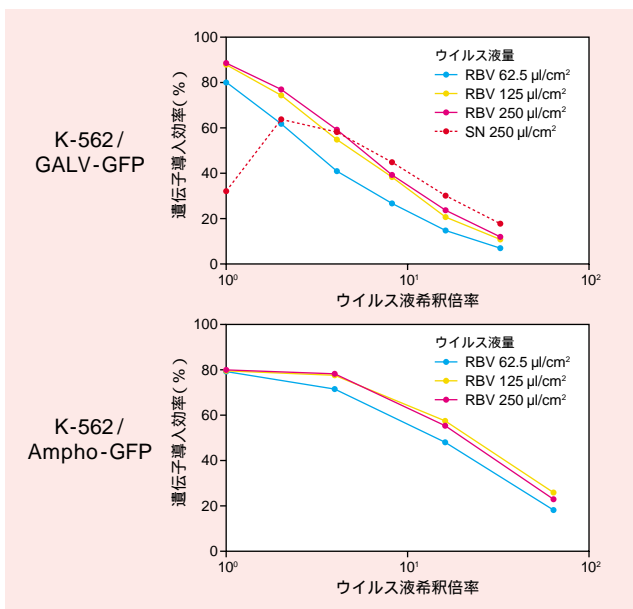


図4 ウイルス液の希釈倍率と遺伝子導入効率の関係
細胞とウイルスを同時に RetroNectin[®] コート容器に加える SN 法では、ウイルス原液および 2 倍希釈液の使用で感染阻害が見られる。一方、RBV 法では遺伝子導入効率と希釈倍率は比例関係にある。なお、本実験では標的細胞として K-562 細胞を用いた。

RetroNectin[®] コート容器に pre-load する時間の検討

【方法】

24 ウェル RetroNectin[®] コート容器に、GFP をマーカーとして持つレトロウイルスベクター(エンベロップは GALV) を 250 µl 加え、37 °C でインキュベート(1 ~ 24 時間)した。上清を除去した後、K-562 細胞を添加して培養し、3 日後にフローサイトメーターで GFP 陽性細胞率を測定し、最適な pre-load 時間を調べた。

【結果】

図5に示すように、pre-load 4 ~ 6 時間の範囲で遺伝子導入効率が最大となりました。RBV 法での最適な pre-load 時間は 37 °C で 4 ~ 6 時間の範囲にあることが明らかとなりました。短時間の pre-load ではウイルスの RetroNectin[®] への結合が不十分なため、また、6 時間以上の pre-load ではウイルスの失活のため、遺伝子導入効率が低下するものと考えられます。

感染時の細胞密度の検討

【方法】

24 ウェル RetroNectin[®] コート容器に、GFP をマーカーとして持つレトロウイルスベクター(エンベロップは GALV と Ampho) の 2 種類を含む溶液を 250 µl 添加し、37 °C で 4 時間インキュベートした。上清を除去した後、K-562 細胞、TF-1 細胞、HL-60 細胞、CEM 細胞、ヒト CD34 陽性造血幹細胞を種々の細胞密度で添加して培養し、3 日後にフローサイトメーターで GFP 陽性細胞率を測定し、遺伝子導入効率を算出した。

【結果】

図6に示すように、各細胞において一定の導入効率が見られる細胞密度の範囲があり、細胞が容器に接着できないほど多くの細胞を加えると導入効率は低下しました。より多くの遺伝子導入細胞を得たい場合は、容器に接着可能な限りの細胞を添加すればそれが可能です。また、感染後しばらく同一の容器で培養したい場合は、目的の日にコンフルエントになるように感染時の細胞密度を薄くすればそれが可能です。この場合では、遺伝子導入効率は一定となるため、一度予備実験をしておけば、それ以降の実験における遺伝子導入効率を予測することができます。

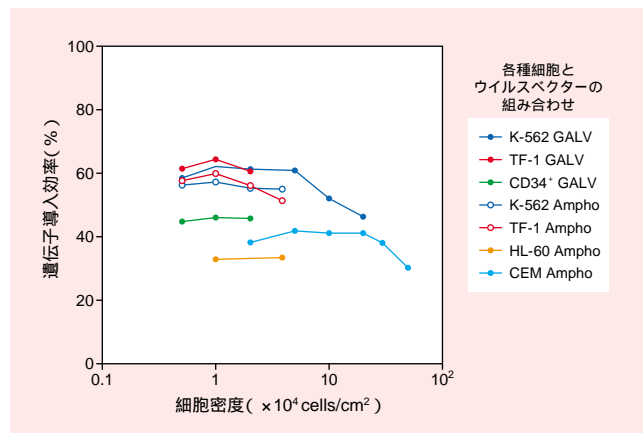


図6 細胞密度と遺伝子導入効率の関係
各種ウイルスベクターを RetroNectin[®] コート容器に接着させた後、種々の細胞を種々の細胞密度で加えた時の遺伝子導入効率を示す。RetroNectin[®] コート容器に接着できる細胞密度の範囲において、遺伝子導入効率は一定であることがわかる。

遺伝子導入効率向上のためのRetroNectin®へのウイルススペクター結合増強法

RetroNectin®へのウイルススペクターの結合は、pre-loading中に容器を振盪したり、遠心力をかけることによって増強できます。これらの方法を用いることによって、遺伝子導入効率の向上が期待できます。これらの場合でも、ウイルス液とRetroNectin®の接触時間は4～6時間が望ましく、振盪の場合は定期的に容器を手で揺すっても、また、CO₂インキュベーター内に振盪機を入れて振盪し続けても結合効率は増大し、遺伝子導入効率は向上します(図7)。

遠心力をかける場合には、安全上の問題からRetroNectin®をコートした遠心管を用いることを推奨します。遠心管(ポリスチレン製丸底)の底面にRetroNectin®をコートし、ウイルススペクターをpre-loadし、32、2900 × gで4時間遠心します。これにより、RetroNectin®へのウイルススペクターの結合が増強されます。4時間遠心後、上清を除き、標的細胞を遠心管に加え、遠心管内で遺伝子導入を行います。特にウイルス濃度が薄い場合では、この遠心RBV法が有効です(図8)。

まとめ

RetroNectin®を用いた遺伝子導入法の内、RBV法では遺伝子導入効率とウイルス希釈倍率は直線的な関係を示すため、目的の導入効率を得るにはウイルス液を何倍希釈すればよいかを、直線回帰分析によって予測することができます。また、pre-loadする液量は、125～250 μl/cm²で十分であり、液量を節約できます。容器の振盪や、遠心力の負荷により、ウイルススペクターのRetroNectin®への結合量が増大し、それに伴って遺伝子導入効率が向上します。さらに高い導入効率を得たい場合には、これらの方法が有効です。

【参考文献】

- 1) Hanenberg, H. et al. (1996) *Nat. Med.*, 2, 876-882.
- 2) Hanenberg, H. et al. (1997) *Hum. Gene Ther.*, 8, 2193-2206.
- 3) Chono, H. et al. (2001) *J. Biochem.*, 130, 331-334.

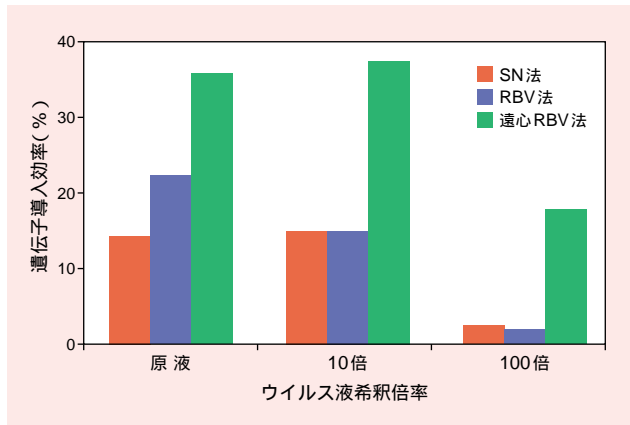


図8 遠心力によるRetroNectin®へのウイルススペクターの結合の増強
ウイルスをpre-loadしたRetroNectin®コート遠心管を遠心することによってウイルススペクターの結合が増強し、遺伝子導入効率が向上する。なお、本実験では標的細胞としてNIH/3T3細胞を用いた。

本稿でご紹介した製品

- RetroNectin® Code T100A 0.5 mg ¥26,000
Code T100B 2.5 mg ¥103,000
- RetroNectin® Dish(35 mm) Code T110A 10 dishes ¥52,000
- Retrovirus Packaging Kit Eco Code 6160 10回分 ¥52,000
- Retrovirus Packaging Kit Ampho Code 6161 10回分 ¥52,000
- Retrovirus Packaging Cell MP34 Code 6162 2 × 10⁶ cells/vial ¥75,000

[レトロウイルススペクター]

- pDON-AI DNA Code 3650 20 μg ¥52,000
- pSINsi-hH1 DNA Code 3660 20 μg ¥37,000
- pSINsi-hU6 DNA Code 3661 20 μg ¥37,000
- pSINsi-mU6 DNA Code 3662 20 μg ¥37,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は52ページをご覧ください。8 | 9

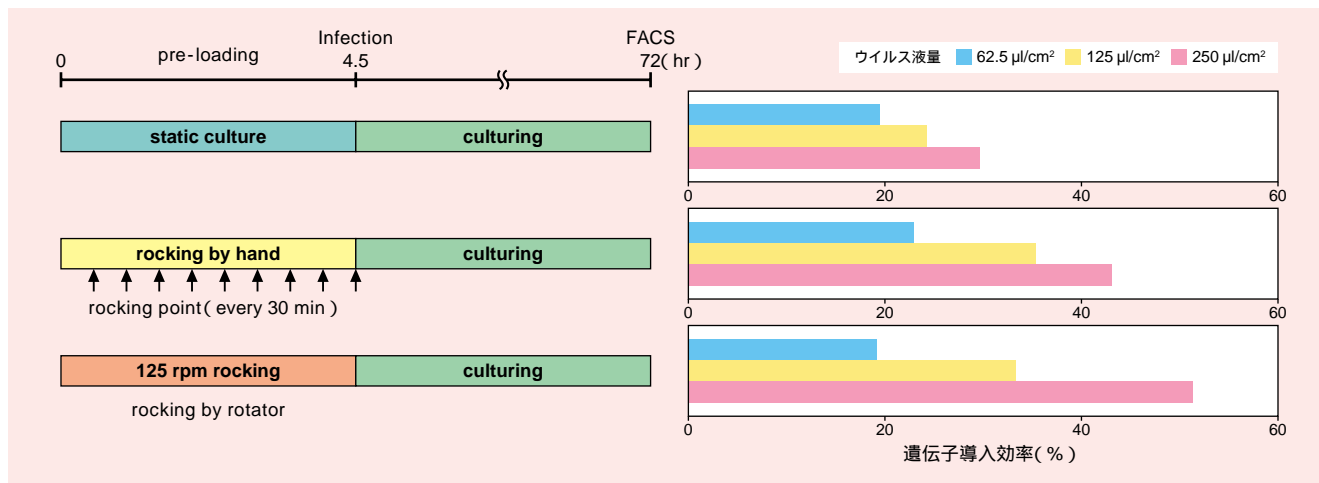


図7 振盪によるRetroNectin®へのウイルススペクターの結合の増強

ウイルスをpre-loadしたRetroNectin®コート容器を振盪することによってウイルススペクターの結合が増強し、遺伝子導入効率が向上する。なお、本実験では標的細胞としてK-562細胞を用いた。