

2. レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入

三好 浩之

血球細胞への遺伝子導入には、レトロウイルスベクターが最もよく使われているが、分裂している細胞にしか遺伝子導入することができないため、その使用には制限がある。造血幹細胞も通常はほとんど分裂していないため、いくつかのサイトカインで増殖刺激した後、レトロウイルスベクターを感染させる方法が用いられている。この方法により、遺伝子導入効率はある程度改善されるものの、サイトカインで刺激すると幹細胞の持つ自己複製能力が失われるということが報告されており、遺伝子治療の臨床試験では長期的な影響も懸念されている。一方、HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) に代表されるレンチウイルスは、非分裂細胞にも感染しウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれることから、この性質を利用して作製されたレンチウイルスベクターは、サイトカイン刺激の有無に関わらず非常に高い効率で造血幹細胞に遺伝子導入できる。

はじめに

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を持ち、個体の一生にわたってすべての系列の血球細胞を産生し続ける。それゆえ、造血幹細胞は血液細胞の増殖・分化の研究を行う上で欠かすことのできない材料である。また造血幹細胞は、骨髄、末梢血、臍帯血などから比較的容易に得ることができるため、白血病などの治療においては骨髄移植といった形ですでに臨床応用されており、遺伝性血液疾患、癌、ウイルス感染症などの遺伝子治療の標的細胞としても大変注目されてきた。したがって、基礎研究あるいは臨床応用

の点からも造血幹細胞に効率良く遺伝子を導入する技術は非常に重要である。

これまで、血球細胞への遺伝子導入には、MLV (murine leukemia virus) などの哺乳類C型レトロウイルス由来のベクターが最もよく使われてきた。しかし、これらレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれるためには細胞分裂を必要とするため、造血幹細胞のように通常ほとんど分裂していない細胞に遺伝子を導入することは非常に困難である。そこで、造血幹細胞の増殖をIL-3, IL-6, SCFなどのサイトカインで刺激した後、レトロウイルスベクターを感染させるという方法が試みられた¹⁻⁷⁾。この方法により、遺伝子導入効率はある程度改善されるものの、サイトカインで刺激すると幹細胞の持つ自己複製能力が失われるということが報告されている⁸⁻¹⁵⁾。また、レトロウイルスベクターの場合、*in vivo*での導入遺伝子の発現のシャットオフといった問題もある。

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターの欠点を克服するために開発された非分裂細胞にも効率よく遺伝子導入することができるベクターである。本稿では、レンチウイルスベクターの概説と著者らが行った造血幹細胞への遺伝子導入の例を紹介する。

理化学研究所・筑波研究所 バイオリソースセンター
細胞運命情報解析技術開発サブチーム
(〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1)
Transduction of hematopoietic stem cells by lentiviral vectors
Hiroyuki Miyoshi
Subteam for Manipulation of Cell Fate, BioResource Center, RIKEN Tsukuba Institute
3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan
TEL: 0298-36-9056
FAX: 0298-36-9144
E-mail: miyoshi@brc.riken.go.jp

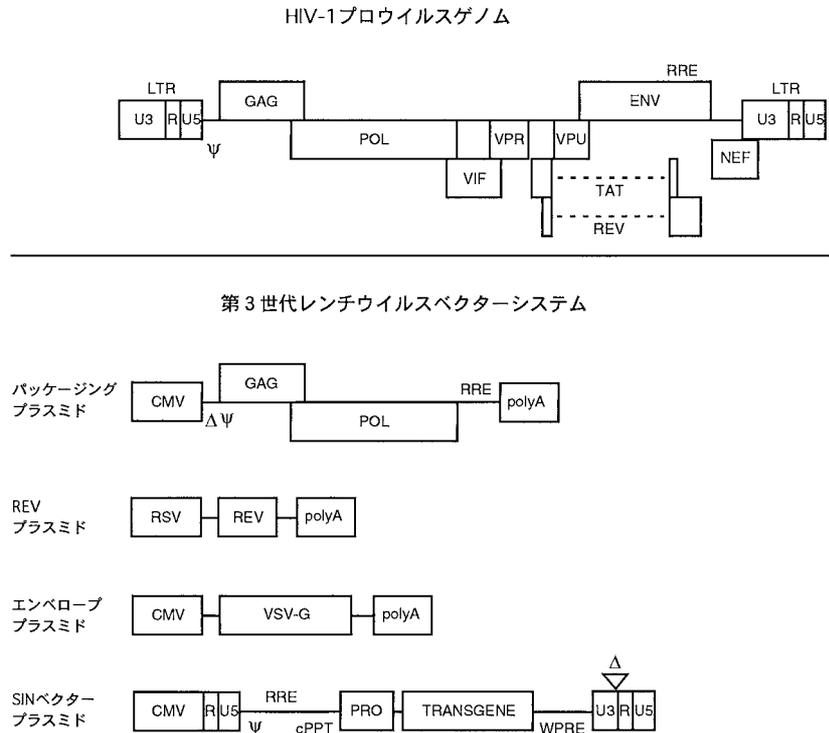


図 1 HIV-1 プロウイルスゲノムと第 3 世代レンチウイルスベクターシステム
 第 3 世代レンチウイルスベクターでは、システム全体で HIV-1 ゲノムの1/3以上を
 削除している。

レンチウイルスの特徴

レンチウイルスはレトロウイルス科に属し、HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) はその代表的なウイルスである (図 1)。レンチウイルスのゲノム構造は基本的に他のレトロウイルスと同じで、両端にプロモーター活性を持つ LTR (long terminal repeat), その間に gag, pol, env 遺伝子をコードしている。gag 遺伝子産物はプロテアーゼによってマトリックス, カプシド, スクレオカプシドに分割される。レンチウイルスはさらに、修飾遺伝子 (HIV-1 の場合 vif, vpr, vpu, nef) と制御遺伝子 (tat, rev) をコードしており、この点で哺乳類 C 型や ALSV (avian leucosis/sarcoma virus) グループなどのレトロウイルスよりも複雑である。ウイルス粒子はその中心に 2 本のプラス鎖 RNA ゲノムが含まれており、これをコア蛋白質 (カプシド) が囲んでいる。コアの中には逆転写酵素, インテグラーゼ, プロテアーゼなどが含まれている。コアの外側をマトリックスが囲んでおり、さらにその外側をエンベロープ蛋白質がスパイクした脂質二重膜が囲んでいる。ウイルスは、標的細胞に感染後、細胞内に入ったコアの中で逆転写酵素によって RNA ゲノムから 2 本鎖 cDNA が合成され、ウイルスが持ち込んだカプシド, マトリックス, インテグラーゼ, vpr 遺伝子産物などと宿主由来の蛋

白質とがプレインテグレーション複合体を形成する。レンチウイルスが哺乳類 C 型レトロウイルスと異なり、なぜ分裂していない細胞の染色体にウイルスゲノムを組み込むことができるのかはまだよくわかっていないが、レンチウイルスのプレインテグレーション複合体は核膜孔を積極的に通過できるのではないかと考えられている。一方、哺乳類 C 型レトロウイルスのプレインテグレーション複合体は核膜孔を通過できないため、ウイルスゲノムの染色体への組み込みには細胞分裂にともなう核膜の消失が必要なのではないかと考えられている。

レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、HIV-1 をもとにしたものが最初に開発され、現在最も広く使用されている。以下では、HIV-1 をもとにしたレンチウイルスベクターについて紹介する。ベクターの作製方法は、従来のレトロウイルスベクターと基本的に同じで、まず HIV-1 のプロウイルスゲノムをパッケージング, エンベロープ, ベクターの 3 つのプラスミドに分割する¹⁶⁾。

パッケージングプラスミドは、エンベロープ以外のウイルス遺伝子をコードしておりウイルス粒子を作るための蛋白質をトランスに供給する。当初は gag, pol の他に修飾遺伝子 (vif, vpr, vpu, nef) と制御遺伝子 (tat, rev) も

含まれていたが、現在では、非分裂細胞への感染に修飾遺伝子産物は必要でないことがわかったため、修飾遺伝子を削除したものが使用されている(図1)¹⁷⁾。また、後で理由を述べるように tat も削除され、rev は別のプラスミドに移している。修飾遺伝子産物は HIV-1 の複製に必須ではないが重要であり、HIV-1 の病原性とも深くかかわっている。特に Nef は AIDS の症状を引き起こす主要な役割を担っているのではないかと考えられている。また、Tat は HIV-1 の複製に必須であるので、tat をパッケージングプラスミドから削除することより安全性は非常に高くなるといえる。パッケージングプラスミドは、パッケージングシグナル(ψ)を持たないので、このプラスミドから転写された RNA はウイルス粒子内には取り込まれない。

エンベローププラスミドは、HIV-1 のエンベロープでは CD4 陽性細胞にしか感染することができないので、宿主域を広げるため VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein) を用いている。VSV-G のレセプターは燐脂質であると考えられており、VSV-G をエンベロープとして用いることにより、細胞表面の受容体には依存せずにウイルスと細胞の膜融合が起こる。したがって、基本的に動物種、細胞種を問わずに感染させることができるようになる。また VSV-G は物理的に強く、超遠心によってウイルス粒子を容易に濃縮することができる。

ベクタープラスミドは、LTR、パッケージングシグナル(ψ)、逆転写に必須のプライマー結合部位を持ち、このプラスミドから転写された RNA はウイルス粒子内に取り込まれる。HIV-1 の LTR プロモーター活性は、Tat 非存在下では非常に弱いので、組み込んだ外来遺伝子の発現には内部プロモーターを使用する。内部プロモーターには、CMV (cytomegalovirus) プロモーターを用いている場合が多いが、組織特異的なプロモーターや tet 発現制御プロモーター等を用いることも可能である¹⁸⁻²¹⁾。ベクターに挿入可能な DNA のサイズは野性型 HIV-1 のゲノムサイズから推測すると約 8.5kb であり、実験的にもこの大きさの DNA を挿入できることを著者らは確かめている。しかし最近、挿入サイズが大きくなるに従ってウイルスベクターの力価は下がるものの、挿入サイズに限界はなく 18kb の DNA でも挿入可能であったということが報告されている²²⁾。RRE (rev responsive element) は、Rev が結合し完全長のウイルスゲノム RNA が効率よく核から細胞質へ輸送されるのに必要である。レトロウイルスは逆転写の際、3'LTR の直上流にある PPT (polypurine tract) 配列からプラス鎖の合成が始まるが、レンチウイルスにはゲノムの中央部分に cPPT (central polypurine tract) と呼ばれる同じ配列がもう一カ所あり、ここからも合成が行われるため、最終的な二本鎖 cDNA には中央に DNA フラップと呼ばれる約 100塩基対の 3 本鎖構造ができる。最近、この cPPT がないとプレインテグレーション複合体が核膜孔

を通過する割合が著しく減少するという報告がなされた^{23,24)}。しかし、それまでの cPPT の含まれていないベクターでも非分裂細胞に対して高い遺伝子導入効率が得られておりこの報告と矛盾するが、cPPT によって遺伝子導入効率が高くなることは間違いないようである。WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) は mRNA の安定性を高めると考えられており、この配列をベクターに組み込むことにより発現効率が上がることが報告されている²⁵⁾。現在おもに使用されているベクターは、SIN (self inactivating) ベクターと呼ばれる LTR のエンハンサー/プロモーター部分を削除して安全性を高めたベクターである²⁶⁾。また、5'LTR の U3 を CMV プロモーターに置換することにより Tat 依存性がなくなり、パッケージングプラスミドから tat を削除することが可能になっている。

レンチウイルスベクターの調製は、4つのプラスミドをリン酸カルシウム法により 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を回収して用いる。超遠心を行うことにより 1000 倍以上 ($>10^9$ /ml) に濃縮することも可能である。また、パッケージング細胞株も樹立されており、スケールアップも容易である。pol 遺伝子にコードされているプロテアーゼや VSV-G の発現は細胞毒性が高いので、パッケージング細胞ではこれらの遺伝子がベクターを産生させる時だけ発現するように、テトラサイクリンやエクダインによる発現制御プロモーターによってコントロールされている^{27,28)}。

上記の 4 つのプラスミドのシステムは第 3 世代レンチウイルスベクターと呼ばれており、システム全体で HIV-1 ゲノムの 1/3 以上を削除しており、野性型の HIV-1 が産生する可能性はまずないと言ってよい。また、各プラスミド間の相同領域も最小限にしてあるので、相同組み換えによって自立増殖能を持ったウイルスが産生する可能性もほとんどない。実際、ベクターを調製する度にそのようなウイルスの産生を検査しているが、これまで一度も検出されたことはない。現段階のベクターシステムは、従来のレトロウイルスベクターと比較しても同程度に安全であると思われる。この第 3 世代レンチウイルスベクターは、アメリカ NIH の基準では P2 (BL2) レベルで扱うことができる。しかし、日本には基準がなく P3 レベルでの扱いであったが、最近ようやくレベルダウン申請をすることによって P2 レベルでの実験の許可を得ることができるようになった。HIV-1 以外に、HIV-2、HFV (human foamy virus)、SIV (simian immunodeficiency virus)、FIV (feline immunodeficiency virus)、EIAV (equine infectious anemia virus) などのレンチウイルスをもとにしたベクターも開発されているが、HIV-1 をもとにしたベクターが最も開発が進んでおり、今のところ遺伝子治療の臨床試験にも最も近い。

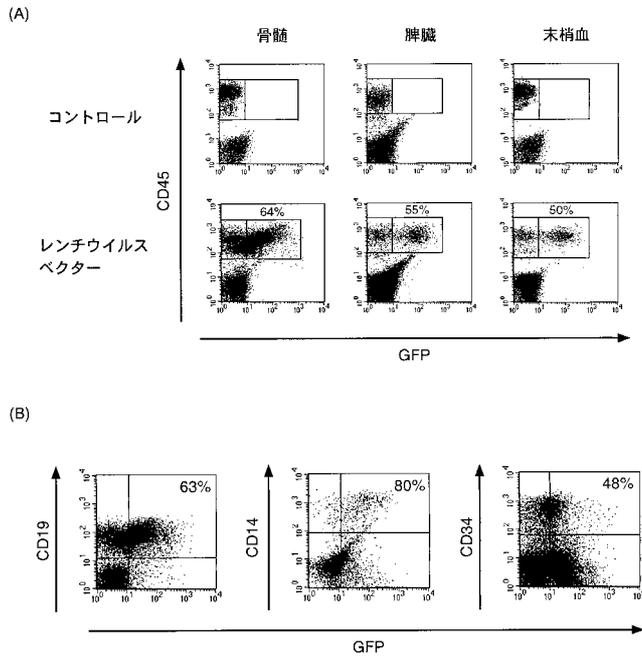


図2 ヒト造血幹細胞への遺伝子導入

(A) ヒト臍帯血より単離した CD34陽性細胞とレンチウイルスベクターを共培養後、半致死量放射線照射した NOD/SCID マウスに移植し、3ヶ月後の骨髄、脾臓、末梢血における GFP レポーター遺伝子の発現の割合を FACS によって解析した代表例。このマウスでは、ヒト CD45陽性細胞のうち骨髄で64%、脾臓で55%、末梢血で50%が GFP 陽性であった。コントロールは単に CD34陽性細胞を移植したマウス。
 (B) (A) のマウスの骨髄細胞を CD19 (B 細胞マーカー)、CD14 (単球・マクロファージマーカー)、CD34 (前駆細胞・幹細胞マーカー) に対する抗体で染色し FACS 解析した結果。

レンチウイルスベクターは、脳の神経細胞、肝細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、網膜細胞、気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、膵内分泌細胞、腎細胞などの終末分化した様々な非分裂細胞に効率よく遺伝子導入できることが証明されている²⁹⁻³⁰⁾。

造血幹細胞への遺伝子導入

著者らは、レンチウイルスベクターがヒト造血幹細胞にサイトカインの刺激なしで非常に高い効率で遺伝子導入できることを初めて証明した⁴⁰⁾。その際に使用したベクターは第1世代、つまりすべての修飾遺伝子の入ったパッケージングコンストラクトを用いて作製したものであったが、その後第3世代レンチウイルスベクターを用いて再検討した。造血幹細胞を含む細胞集団として、臍帯血より CD34⁺細胞を単離し、サイトカインによる刺激なしで GFP (green fluorescent protein) レポーター遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを約6時間感染させた後、半致死量の放射線を照射した NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) 免疫不全マウスに移植し

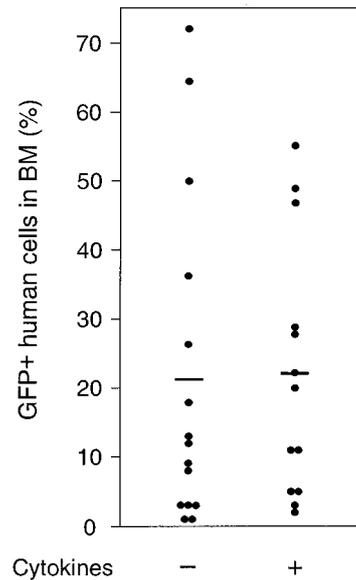


図3 ヒト造血幹細胞への遺伝子導入効率
 レンチウイルスベクターによるヒト造血幹細胞への遺伝子導入効率をサイトカインによる増殖刺激の有無で比較した。移植した個々の NOD/SCID マウスの骨髄細胞におけるヒト CD45陽性細胞のうち GFP 陽性細胞の割合をプロットした。

た。6~22週間後に末梢血、骨髄、脾臓のヒト血液細胞における GFP レポーター遺伝子の発現をフローサイトメトリーで解析し、遺伝子導入効率を検討したところ、第3世代ベクターは第1世代と同等以上に高い効率(骨髄で平均21.3%)でヒト造血幹細胞に遺伝子導入できることがわかった(図2)。また、CD34⁺細胞をサイトカインで刺激した後レンチウイルスベクターを感染させた場合、遺伝子導入効率は変わらなかったが、ヒト血液細胞のキメリズムが低くなる傾向があった(図3)。骨髄細胞中にある前駆細胞を検出するため CFC アッセイを行ったところ、検出できるすべての種類のコロニーに GFP の発現がみられた。さらに、骨髄細胞を NOD/SCID マウスに二次移植し、6週間後に解析したところ、ヒト血液細胞のキメリズムは低くなるものの GFP の発現が認められた。これらのことから、第3世代レンチウイルスベクターはヒト造血幹細胞にサイトカインの刺激なしで非常に高い効率で遺伝子導入でき、安定した遺伝子発現が得られることが証明された。

また造血幹細胞だけでなく、ヒト末梢血より単離した静止期の T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞に対しても、第3世代レンチウイルスベクターは非常に効率よく遺伝子導入できることを *in vitro* で確認している。

著者らは、ヒト CD34⁺細胞よりも造血幹細胞としてはるかに純度の高いマウス CD34^{-/low}c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ (CD34⁻ KSL) 細胞への遺伝子導入も同様に可能であることを確認した⁴¹⁾。CD34⁻KSL 細胞は、移植実験により少な

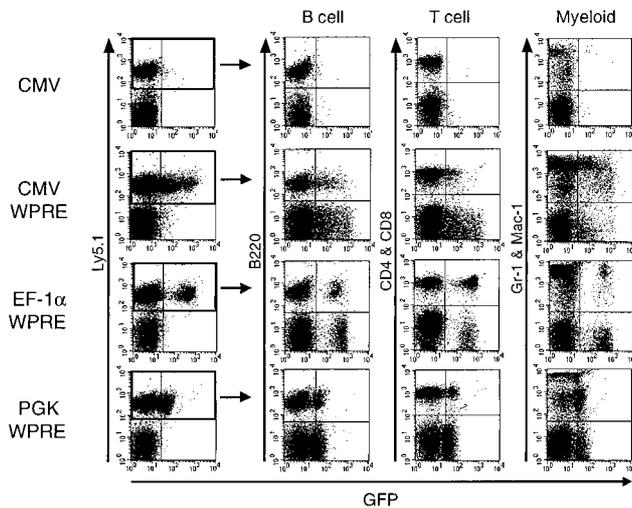


図4 マウス造血幹細胞への遺伝子導入

マウス (B6-Ly5.1) 骨髄から CD34⁻KSL 細胞を FACS により単離し, GFP レポーター遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターと共培養後, 致死量の放射線照射したマウス (B6-Ly5.2) に移植し, 3~4ヶ月後に末梢血における GFP レポーター遺伝子の発現を FACS によって解析した. WPRE を挿入することによって GFP 発現レベルが10倍以上あがる. CMV プロモーターによる発現レベルはブロードでかつ, myeloid 系細胞と比較して T 細胞と B 細胞では発現がかなり弱い. これに対して, PGK と EF-1 α プロモーターは均一な発現レベルが得られる.

くとも約 3 個に 1 個は長期骨髄再建能を持った造血幹細胞であり, 細胞周期も完全に G0 の静止期にある. マウス (B6-Ly5.1) 骨髄から, CD34⁻KSL 細胞を FACS により単離し, GFP レポーター遺伝子を組み込んだ第 3 世代レンチウイルスベクターを感染させ, 致死量の放射線照射したマウス (B6-Ly5.2) 1 匹あたり 50 個の CD34⁻KSL 細胞を 2×10^5 個の全骨髄細胞 (B6-Ly5.2) とともに移植し, 3~4ヶ月後に末梢血における GFP の発現をフローサイトメトリーで解析した. その結果, マウス血球細胞における遺伝子発現レベルは非常に低いということがわかった (図 4). しかし, WPRE を挿入することによって発現レベルが10倍以上あがり, ヒト血液細胞と同程度の発現レベルが得られる. さらに, cPPT sequence を挿入することによって遺伝子導入効率が約 2 倍上昇する. また, CMV プロモーターによる発現レベルはブロードでかつ, myeloid 系細胞と比較して T 細胞と B 細胞で発現がかなり弱いことがわかった (図 4). これに対して, PGK と EF-1 α プロモーターは均一な発現レベルが得られる. 発現レベルは, EF-1 α の方が PGK よりも高く, CMV の平均レベルと同じくらいである. また 2 次移植実験の結果, CMV プロモーターは発現のシャットオフが起こるが, PGK, EF-1 α プロモーターではシャットオフはみられず安定した発現が得られることもわかった. これまでレンチウイルスベクター

では発現のシャットオフが起こるとい報告はなく, 我々が初めてレンチウイルスベクターにおいてもプロモーターによってはシャットオフが起こることを示した (投稿準備中).

レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞に対する遺伝子治療実験も数多く行われており, 例えば赤芽球特異的なプロモーターを用いて, β サラセミアと鎌状赤血球症マウスに β グロビン遺伝子を, 骨髄性プロトポルフィリン症マウスに ferrochelatase 遺伝子をそれぞれ導入し, 貧血や赤血球の形態変化を改善するのに十分な発現を得ることに成功している⁴²⁻⁴⁴. AIDS の遺伝子治療として, HIV-1 に対するアンチセンス RNA, リボザイム, RNA デコイ等を発現させることも行われている⁴⁵.

おわりに

レンチウイルスベクターは, もともとレトロウイルスベクターの欠点を克服するために開発された遺伝子治療用のベクターである. アメリカでは, 第 3 世代レンチウイルスベクターを用いた血友病, アデノシンデアミナーゼ欠損症, AIDS 等に対する遺伝子治療の臨床試験が計画中である. しかし, レンチウイルスベクターは遺伝子治療の分野だけではなく, 基礎研究の分野においてもその有用性は非常に高いと考えられる. 日本でも P2 での使用が可能になり, レンチウイルスベクターを利用した研究が今後ますます増えると思われる.

文 献

- 1) Cheng, L. et al. Sustained gene expression in retrovirally transduced, engrafting human hematopoietic stem cells and their lympho-myeloid progeny. *Blood* **92**, 83-92, 1998.
- 2) Conneally, E. et al. Efficient retroviral-mediated gene transfer to human cord blood stem cells with *in vivo* repopulating potential. *Blood* **91**, 3487-3493, 1998.
- 3) Marandin, A. et al. Retrovirus-mediated gene transfer into human CD34⁺38^{low} primitive cells capable of reconstituting long-term cultures *in vitro* and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1497-1511, 1998.
- 4) Schilz, A. J. et al. High efficiency gene transfer to human hematopoietic SCID-repopulating cells under serum-free conditions. *Blood* **92**, 3163-3171, 1998.
- 5) van Hennik, P. B. et al. Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice. *Blood* **92**, 4013-4022, 1998.
- 6) Cavazzana-Calvo, M. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672, 2000.
- 7) Dorrell, C. et al. Expansion of human cord blood CD34⁺CD38⁻ cells in ex vivo culture during retrovi-

- ral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency : dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* **95**, 102-110, 2000.
- 8) van Beusechem, V. W. et al. Influence of interleukin-3, interleukin-6, and stem cell factor on retroviral transduction of rhesus monkey CD34+ hematopoietic progenitor cells measured *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* **2**, 245-255, 1995.
 - 9) Peters, S.O. et al. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* **87**, 30-37, 1996.
 - 10) Yonemura, Y. et al. Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4040-4044, 1996.
 - 11) Yonemura, Y. et al. *In vitro* expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells : comparison between FLT 3 /FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* **89**, 1915-1921, 1997.
 - 12) Bhatia, M. et al. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J. Exp. Med.* **186**, 619-624, 1997.
 - 13) Gothot, A. et al. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* **92**, 2641-2649, 1998.
 - 14) Rebel, V. I. et al. One-day ex vivo culture allows effective gene transfer into human nonobese diabetic/severe combined immune-deficient repopulating cells using high-titer vesicular stomatitis virus G protein pseudotyped retrovirus. *Blood* **93**, 2217-2224, 1999.
 - 15) Szilvassy, S. J. et al. Effects of cell cycle activation on the short-term engraftment properties of ex vivo expanded murine hematopoietic cells. *Blood* **95**, 2829-2837, 2000.
 - 16) Naldini, L. et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, **272** : 263-267, 1996.
 - 17) Dull, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463-8471, 1998.
 - 18) Miyoshi, H. et al. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10319-10323, 1997.
 - 19) Moreau-Gaudry, F. et al. High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. *Blood* **98**, 2664-2672, 2001.
 - 20) Kafri, T. et al. Lentiviral vectors : regulated gene expression. *Mol. Ther.* **1**, 516-521, 2000.
 - 21) Reiser, J. et al. Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J. Virol.* **74**, 10589-10599, 2000.
 - 22) Keller, B. et al. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1893-1905, 2001.
 - 23) Follenzi, A. et al. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nature Genet.* **25**, 217-222, 2000.
 - 24) Zennou, V. et al. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185, 2000.
 - 25) Zufferey, R. et al. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73**, 2886-2892, 1999.
 - 26) Miyoshi, H. et al. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* **72**, 8150-8157, 1998.
 - 27) Farson, D. et al. A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 981-997, 2001.
 - 28) Pacchia, A. L. et al. An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology*, **282**, 77-86, 2001.
 - 29) Naldini, L. et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11382-11388, 1996.
 - 30) Blomer, U. et al. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.* **71**, 6641-6649, 1997.
 - 31) Kafri, T. et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Genet.* **17**, 314-317, 1997.
 - 32) Pfeifer, A. et al. Transduction of liver cells by lentiviral vectors : analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol. Ther.* **3**, 319-322, 2001.
 - 33) Zhao, J. et al. Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*. *Basic Res. Cardiol.* **97**, 348-358, 2002.
 - 34) Tarantal, A. F. Lentiviral vector gene transfer into fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) : lung-targeting approaches. *Mol. Ther.* **4**, 614-621, 2001.
 - 35) Borok, Z. et al. Vesicular stomatitis virus G-pseudotyped lentivirus vectors mediate efficient apical transduction of polarized quiescent primary alveolar epithelial cells. *J. Virol.* **75**, 11747-11754, 2001.
 - 36) Johnson, L. G. et al. Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia *in vivo*. *Gene Ther.* **7**, 568-574, 2000.
 - 37) Gallichan, W. S. et al. Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2717-2726, 1998.
 - 38) Ju, Q. et al. Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia*. **41**, 736-739, 1998.
 - 39) Gusella, G. L. et al. Lentiviral gene transduction of kidney. *Hum. Gene Ther.*, **13**, 407-414, 2002.
 - 40) Miyoshi, H. et al. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* **283**, 682-686, 1999.
 - 41) Tahara-Hanaoka, S. et al. Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34- hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **30**, 11-17, 2002.

- 42) May, C. et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* **406**, 82-86, 2000.
- 43) Pawliuk, R. et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* **294**, 2368-2371, 2001.
- 44) Richard, E. et al. Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol. Ther.* **4**, 331-338, 2001.
- 45) Mautino, M. R. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr. Gene Ther.* **2**, 23-43, 2002.