

# 1. アデノウイルスベクターによる遺伝子治療

中野 正和, 近藤 小貴, 鐘ヶ江 裕美, 齋藤 泉

## 1. アデノウイルスベクターの特徴と作製法

アデノウイルスは2本鎖DNA型のウイルスで、古くから遺伝子レベルでの解析が進められてきた。アデノウイルスをヘルパーフリーのウイルスベクターとして応用する試みは1980年ころから始まったが、作製効率が低く汎用されるには至らなかった<sup>1,2)</sup>。これらのベクターは主にE3やE1へ目的遺伝子を挿入していたが、齋藤は1985年に2.8kbのB型肝炎ウイルスのDNAをアデノウイルスゲノムの右端の新規の位置に挿入したベクターを構築し報告した<sup>3)</sup>。このベクターの作製において、初めて末端蛋白付きのウイルスゲノムを用いたが、ウイルスゲノムを2箇所しか切断しないEcoRIを用いたこともあり、ほとんどが目的遺伝子を持たないクローンであった。

その後アデノウイルスゲノムの左端を7箇所切断するEcoT22Iが発売されたこともあり、EcoT22Iで切断した末端蛋白付きのウイルスゲノムとウイルスゲノムのほぼ全長を含むコスミドカセットを用いたCOS-TPC法の開発に成功した(図1)<sup>4)</sup>。このCOS-TPC法はE1領域を目的遺伝子と置換するベクターの作製法としては生成効率が極めて高く、日本では多くの研究分野においてアデノウイルスベクターが応用され有用性が実証されてきた。

アデノウイルスベクターの特徴は、多くの細胞種に高い遺伝子導入効率を示すことであり、レトロウイルスベクターと異なり細胞の染色体には積極的に組み込まれることが無く、細胞の増殖も必要としない。従って一過性の発現ベクター系であり、100%の細胞へのトランスフェクション

を可能とする方法と言い換えることもできる(図2)。これまでの研究からも、例えば細胞でのシグナル伝達機構の研究において、アデノウイルスベクターを用いることで、*in vitro*だけでなく*in vivo*での解析が可能となり、NFκBが四肢発生の初期段階に関与していたことを示した<sup>5)</sup>。特に*in vitro*の解析においてはトランスフェクションでは細胞毎の遺伝子導入効率が大きく異なるため比較検討が難しかったが、アデノウイルスベクターでは細胞間での導入効率はウイルス感染量の調節によりほとんど考慮せずに検討を行うことが可能であった。このように作製法の効率化はアデノウイルスベクターの可能性の拡大に貢献してきた。

## 2. アデノウイルスベクターの問題点

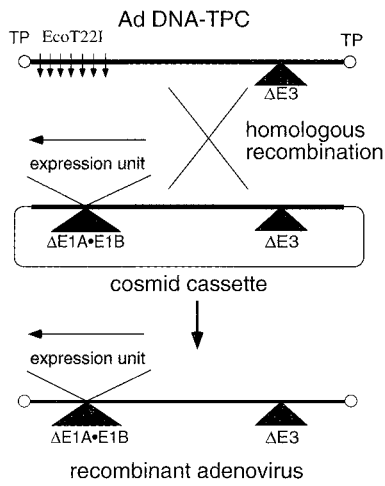
しかし世界的にみれば、5年ほど前までのアデノウイルスベクターの作製はウイルスゲノムのほぼ全長をクローニングした大きなプラスミドと目的遺伝子を組み込んだプラスミドカセットを用いた方法が主流であったため<sup>6)</sup>、生成効率が極めて低くベクターの作製は数カ所のウイルスの専門家に委ねられており、その応用は一般研究と言うよりは遺伝子治療への応用研究に偏っていた。そのためウイルスベクターそのものの研究より、とにかく作製されたベクターによる治療への可能性の探求に力点が置かれてきた結果、安全性に疑問が残るウイルスベクターを用いた研究や臨床試験が先行してしまったことも事実である。

例えばウイルスそのものの毒性は治療効果に大きな影響を与えることに対する問題があげられる。我々はこの問題を回避するためには、強力なプロモーターを用いて目的遺伝子からの発現量を高めることが必須であると主張していた。不幸な死亡例が認められたOTC欠損症の治療用アデノウイルスベクターでは、実際に臨床試験に用いられたベクター(E2欠失型ベクター)<sup>7)</sup>と我々と熊本大学医学部小児科の松田前教授らの共同研究で作製した強力なCAGプロモーターからOTCを発現するベクター<sup>8)</sup>では、論文で発表された治療効果において既に大きな違いが認められていた。死亡に至った原因については諸説あるものの、日本のベクターを用いればベクター投与量を下げて少しでも安全性を高めることが出来たのではないかと推測される。

また初期にはウイルス学の予備的な知識の不足による問

東京大学医科学研究所・遺伝子解析施設  
(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)  
Adenovirus vectors for gene therapy  
Masakazu Nakano, Saki Kondo, Yumi Kanegae, Izumu Saito  
Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Medical Science, University of Tokyo  
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku 108-8639, Japan  
TEL: 03-5449-5556 (研究室) 03-5449-5627 (齋藤)  
FAX: 03-5449-5432  
E-mail: isaito@ims.u-tokyo.ac.jp

a) COS-TPC法



b) 完全長ウイルスゲノム導入法

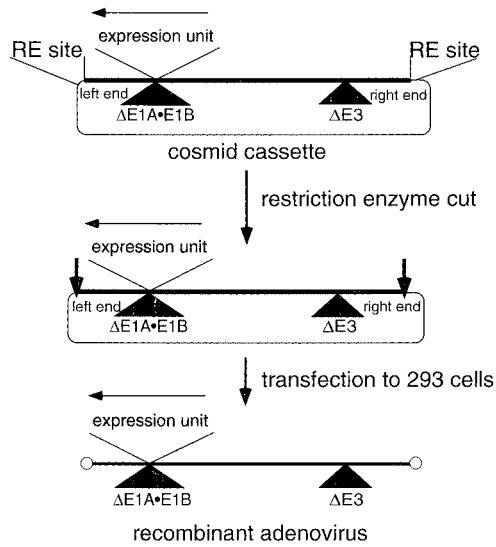


図1 第一世代 (E1 置換型) アデノウイルスベクター作製法.

a) COS-TPC 法. EcoT22I で切断した末端蛋白付きのウイルスゲノムとウイルスゲノムのほぼ全長を含むコスミドカセット間での相同組換えによりベクターが生成する. b) 完全長ウイルスゲノム導入法. ウイルスゲノムの両末端まで完全に含むコスミドカセットを Csp45 I で切断し293細胞に導入するとベクターが生成する.

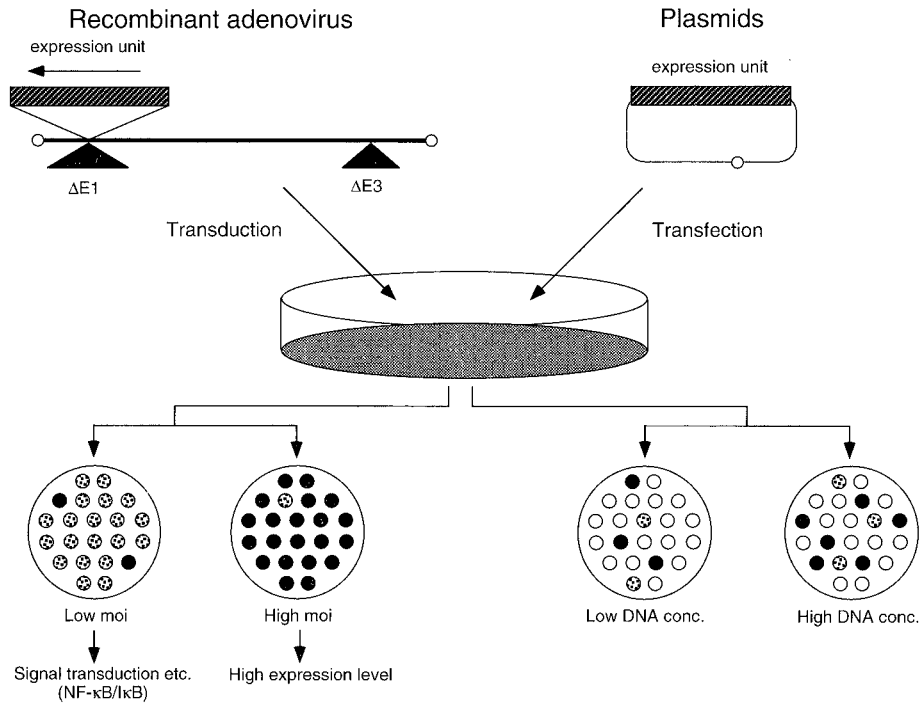


図2 アデノウイルスベクターによる遺伝子導入.

アデノウイルスベクターは一過性の発現ベクターではあるが、細胞毎の導入効率が大きく異なるトランスフェクション法に比べ、ほぼ100%の細胞に均一なコピー数での遺伝子導入が可能である。そのため、ウイルス感染量を調節することで定量的な解析が可能である。

表1 COS-TPC法と完全長ウイルスゲノム導入法における組換えアデノウイルス生成効率の比較

		ウイルス生成数	目的ウイルス割合(%)
完全長ウイルスゲノム導入法	両端欠失型	0	
	両端完全型 (uncut)	0-1	
	両端完全型 (Csp45I cut)	50-340	99
COS-TPC法	両端欠失型	340-1440	70±15

各々のコスミドカセットに目的遺伝子を挿入し、10マイクログラムのDNAを293細胞に導入後14-21日後までに出現した総ウイルス数とその12クローン中に占める目的ウイルスの割合

題も生じた。例えば我々はE1領域へ目的遺伝子を挿入するベクターの作製に際して、E1と同方向(右向き)に目的遺伝子を挿入したベクターと逆方向(左向き)に挿入したベクターを作製し、生成効率及び発現を比較した<sup>9)</sup>。その結果世界的に用いられていた右向きのベクターは高発現するプロモーターを用いた場合には力価が低下する傾向があり、しかもプロモーターが無い状態においても発現が認められた。プロモーターが無くても発現するのはウイルス学的には極めて明解で、E1のエンハンサーが置換領域の上流に残っていたことによる。これらの結果を踏まえて我々は強力なプロモーターや細胞特異的プロモーターを用いる場合には力価への影響が少なくしかもプロモーターの特異性を保持することが可能となる左向きの挿入を推奨してきた。しかしながら、細胞特異的プロモーターを用いたベクターの開発においては右向きに目的遺伝子を挿入した研究が行われ、その結果が発表されたこともあり、混乱を引き起こしたこともあった<sup>9)</sup>。

これらの問題は遺伝子治療用ウイルスベクターにおいては、まず作製法を確立し、多くのベクターを簡便に作製できることと、ウイルスそのものの研究を深めることがベクターの有用性を高める意味で極めて重要であることを示唆している。

### 3. 新しいアデノウイルスベクター作製法

作製法に関してはこの数年多くの方法が開発されてきた。完全長のウイルスゲノムに目的遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、ウイルスゲノムの両端のみを切断する制限酵素で切断後293細胞へ遺伝子導入する方法は、水口らによりキット化され日本においてもすでに販売されている<sup>10)</sup>。我々もCOS-TPC法と完全長ウイルスゲノム導入法のいずれにも応用可能なデュアルコスミドカセットを構築した(図1)<sup>11)</sup>。このコスミドカセットは既に理化学研究所に寄託されており、(株)ニッポンジーンとタカラバイオ(株)からも販売された。

我々の検討では、COS-TPC法は完全長ウイルスゲノム導入法の10倍以上のベクター生成効率を示すものの、操作性においては完全長ウイルスゲノム導入法の方が優れており、目的遺伝子の性質により生成効率が劣る場合にはCOS-TPC法を用いることを推奨している(表1)。また完全

長ウイルスゲノム導入法においても、限界希釈を行って得られたクローンのゲノム配列を調べた結果、わずかではあるが目的遺伝子の組み込まれていないベクターが混在していた。完全長ウイルスゲノム導入法においてはウイルスクローンを作製しなくても調製可能であるという説もあるが、この結果はもしクローンを調製しない場合には増殖に優れた目的遺伝子を持たないウイルスの混在により目的とするクローンがベクター増幅過程で消失する可能性を示している。従っていずれの方法においても96穴プレート等を用いた限界希釈法やブランク法でクローンを単離することが必須であると考えられる。最近の各種ベクター作製法の開発・改良により第一世代のアデノウイルスベクターと言われるE1置換型ベクターの作製は既に一般的な技術となっており、今では遺伝子治療だけでなく多くの一般研究に応用されている。

### 4. 第3世代アデノウイルスベクター (guttet ベクター)

近年ウイルスゲノムが残存していること自体の危険性への危惧と最近のゲノムプロジェクトの発展によりE1置換型ベクターへの挿入可能限界の7.5kbを超えるcDNAが多く単離されてきた諸事情から、ウイルスゲノムを目的遺伝子と置換する第3世代のアデノウイルスベクター(通称guttetベクター)作製法の開発研究が盛んに行われている<sup>12-14)</sup>。これは古くから研究が行われているヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。Grahamらはウイルスのパッケージングシグナルの両側に部位特異的組換え酵素CreやFLPの標的配列を挿入したguttetベクター作製法の開発に成功した<sup>12,13)</sup>。部位特異的組換え酵素は同一分子上同方向に2分子の標的配列が存在する時、その間の配列を効率よくかつ正確に切り出す反応(欠失反応)を組換え酵素単独で行うことが知られている(図3)。そこで部位特異的組換え酵素を発現する293細胞を用いることによりヘルパーウイルスのみのパッケージングシグナルが組換え酵素の欠失反応の結果環状に切りだされ、ヘルパーウイルスの混入を少なくすることが可能である。現在この方法が一般的に用いられているが、ベクターの生成効率が高いわけではなく、応用可能なウイルス量を得るためにはまだ工夫が必要であると考えられている。実際にguttetベクターを用いることにより、目的遺伝子の発現持続が伸びる傾

向は認められているものの<sup>15)</sup>, 先にも述べたように評価が確定するためには作製法の効率化が必要であると考えている。

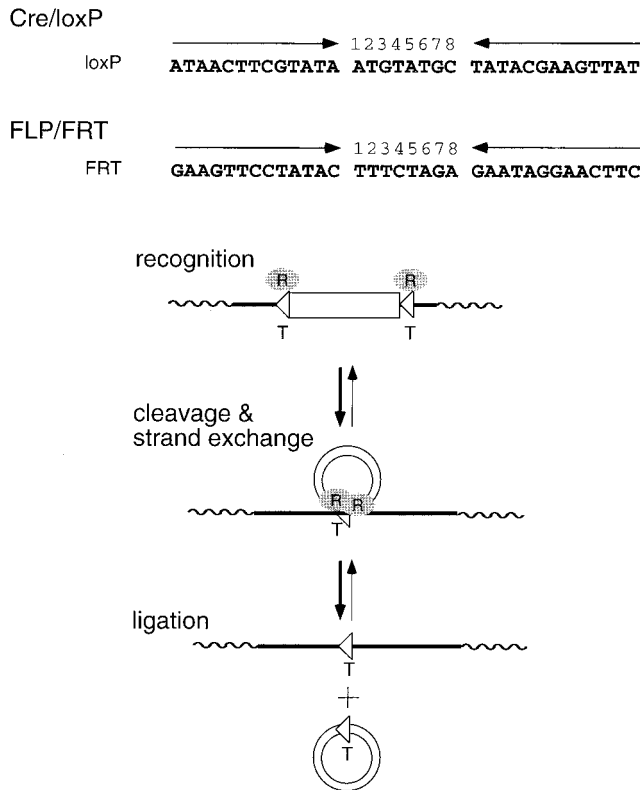


図3 部位特異的組換え酵素による欠失反応。P1ファージ由来のCreや出芽酵母由来のFLPはそれぞれの標的配列loxPとFRTを認識し、同一分子上同方向に二分子の標的配列が存在する時、それらの間の配列を環状に切り出す。

### 5. 細胞特異的導入法

最近のアデノウイルスベクターによる遺伝子治療においては、細胞への標的化についても多くの研究が進められている。アデノウイルスベクターは先に述べた通り広い細胞へ遺伝子を導入することが可能であるが、例えばがん細胞でも導入効率の低い細胞があり、それらががん細胞への治療効果を上げるためにウイルスの改変が行われてきた。そのためにウイルスの吸着・侵入に関与するファイバーやペントンベースを改変した新規のベクターの開発が行われ、いくつかの改変は成功している。この方法はがん細胞の表面に発現している分子を標的化する方法としても応用が可能である。問題点としては、ベクターの作製効率が低い点<sup>16,17)</sup>。

我々はアデノウイルスベクターでは任意のプロモーターの応用が可能であるという特徴を利用して、細胞特異的プロモーターを用いた方法によるがん細胞特異的発現制御系の検討を行っている。当初がん細胞特異的プロモーターから目的遺伝子を発現するベクターが構築されていたが、一般的に細胞特異的プロモーターの活性は汎用されているプロモーターよりも低いため、この方法では大量のウイルスの導入が必要となり、ウイルスそのものの毒性が大きな問題となっていた。そこで、我々は遺伝子の発現制御法として効率の高さから有用性を明らかにしていたCreによるON/OFF発現制御系(Cre/loxP系)に細胞特異性を付加した「アデノウイルス二重感染法」を考案した(図4)<sup>18)</sup>。

### 6. アデノウイルス二重感染法

本法にはアデノウイルスベクター作製時に目的遺伝子の特徴によりベクター作製が不可能なケースを解決する方法

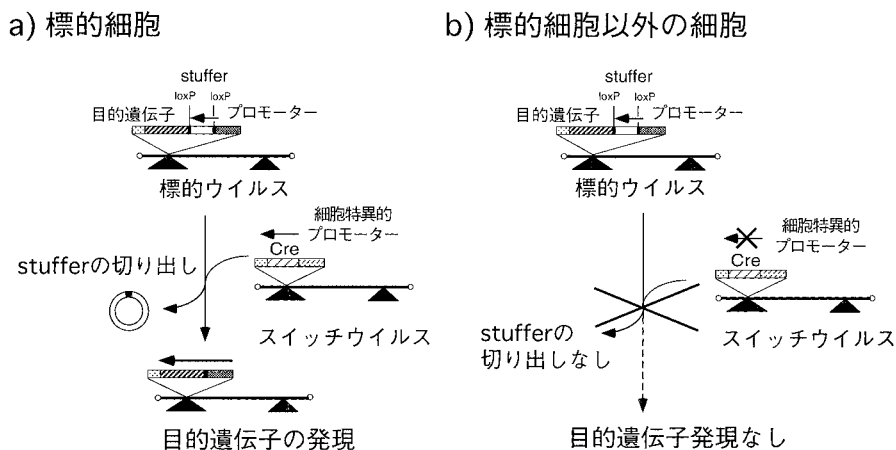


図4 アデノウイルス二重感染法。a) 細胞特異的プロモーターの標的細胞内では、「スイッチウイルス」から発現するCreによる欠失反応により目的遺伝子の発現がOFFからONへ制御される。b) 標的細胞以外の細胞では、細胞特異的プロモーターからのCreの発現が無いため、「標的ウイルス」上のstufferが除去されず目的遺伝子の発現はOFFのままである。

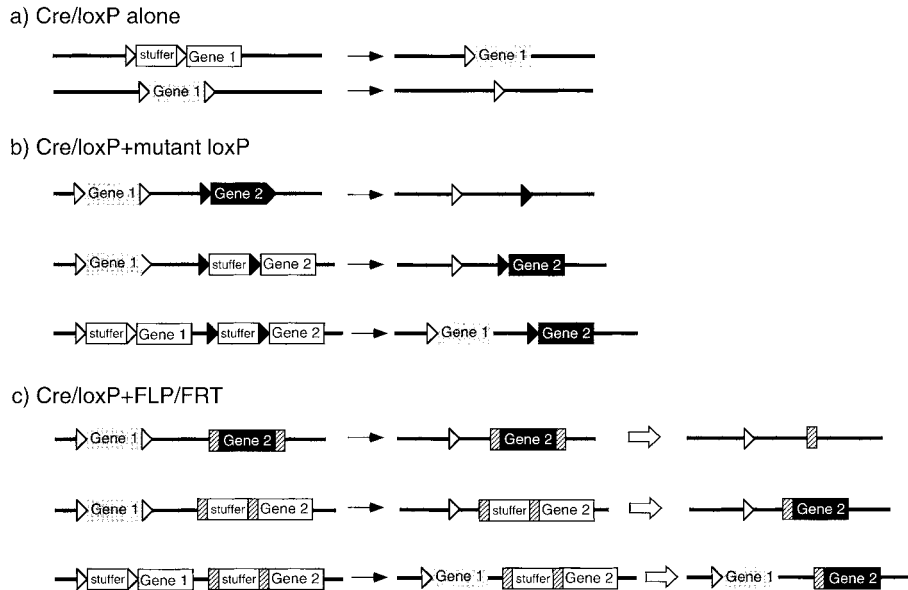


図5 部位特異的組換え酵素による発現制御系。

- a) Cre/loxP 系単独では、単一遺伝子の発現を ON または OFF に一度だけ制御できる。  
 b) Cre/loxP 系と Cre により loxP とは独立に認識される変異型 loxP を組み合わせることによって、2 種類以上の遺伝子の発現を同時に ON または OFF に制御できる。  
 c) Cre/loxP 系と FLP/FRT 系を組み合わせることによって、複数の遺伝子の発現を時期を変えて制御できる。

として、プロモーターと目的遺伝子の間に 2 分子の Cre の標的配列である loxP に挟まれたスタッパー配列を有する「標的ウイルス」を作製する方法を応用した。「標的ウイルス」は Cre の無い状態では目的遺伝子の発現が OFF の状態であるため 293 細胞で通常通りの方法でベクターの生成が可能である。また使用する場合には「Cre 発現ウイルス」と共感染することにより、「標的ウイルス」上の loxP 間のスタッパー配列が欠失反応により切り出され、プロモーターと直結した目的遺伝子の発現が OFF から ON に制御される。我々が開発した Cre 発現アデノウイルスベクターによる「分子スイッチ」は、アデノウイルスベクター上<sup>19)</sup>だけでなく染色体上<sup>20)</sup>においても有効に目的遺伝子の発現を ON に制御することが可能であった。この方法により例えば Fas を発現している 293 細胞を用いて Fas リガンドを発現するアデノウイルスベクターの生成が可能であったことから、本法の厳密な ON/OFF 制御が証明された<sup>21)</sup>。

Cre は非常に高い組換え効率を示すため、「Cre 発現ウイルス」のプロモーターは汎用型の強力なプロモーターの必要は無いことが示されていた。そこで活性の低い細胞特異的プロモーターから標的細胞だけで Cre を発現させる細胞特異的 Cre 発現ウイルス（スイッチウイルス）と強力な汎用プロモーターから Cre 依存的に目的遺伝子が発現するアデノウイルスベクター（標的ウイルス）を共感染する「二重感染法」により、標的細胞のみに治療用遺伝子

を高発現させることで、安全性と有効性を兼ね備えたウイルスベクターの開発が検討された。

本法のモデルとして、肝細胞癌特異的プロモーターの  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) プロモーターから Cre を発現させるスイッチウイルスと強力な CAG プロモーターからレポーター遺伝子 (LacZ) を発現する標的ウイルスを AFP 発現肝細胞癌由来細胞株である HepG 2 に共感染したところ、組織特異的プロモーターから LacZ を直接発現させた場合に比べ約 50 倍の発現増強が認められた。また、AFP 非発現肝癌細胞株や他の癌細胞株では標的ウイルスのみを感染した時と同様に LacZ 発現細胞はほとんど認められず、特異性も高いことが示された。本法は、マウス肝臓での播種モデルの腫瘍に対しても特異性・有効性が認められ、個体レベルでの応用も可能であることが実証された<sup>22)</sup>。

細胞特異的プロモーターを応用する方法は、特異性を付加するために作製するウイルスが簡便に調製可能であることから、細胞特異的プロモーターの開発に伴い順次作製・検討が可能であるというメリットがある反面、2 種類のウイルスが同時に細胞へ導入されて始めて効果を示すというデメリットがある。現在同一アデノウイルスゲノム上にスイッチユニットと標的ユニットを挿入した新しいベクターの開発にも取り組んでいる。今後遺伝子治療分野では有用性と安全性の両面からの検討が必要となり、これらの標的化が重要な課題になると考えている。

## 6. 複数遺伝子同時・連続発現制御系の構築

Cre/loxP系はCre発現アデノウイルスベクターを用いることによって高効率に標的ユニットからの目的遺伝子の発現を制御できるだけでなく、制御前の発現のリークがほとんど無い上、あらゆるプロモーターが選択可能である点においても薬剤による発現誘導系に比べより実用性の高い系を提供し得ると考える。しかし、現行のCre/loxP系では一種類の遺伝子を一度だけしか制御することができない点において制限がある。そこで最近我々はCre/loxP系の汎用性をより高めるため、2種類以上の遺伝子の発現を同時に制御可能な「同時発現制御系」および異なる時期に制御可能な「連続発現制御系」の構築を試みている(図5)。

同時発現制御系には、Creの標的配列であるloxPとは組換えを起こさず、変異型どうしでは効率良く組換えを起こす変異型loxPを応用する。CreがloxPおよび変異型loxPを独立に認識することによって、2分子のloxPおよび2分子の変異型loxPに挟まれた配列はCreが供給されるとそれぞれ独立に欠失反応によって切り出される。我々は既に同時発現制御系へ応用可能な変異型loxPを複数同定しており、中でもloxPの中央8塩基のスペーサー領域に2塩基の変異を導入したloxP2272(V)および5171(S)は組換え効率・精度共に高いことを*in vitro*の組換えアッセイ系を用いた検討により明らかにした<sup>23)</sup>。

更に、野生型loxPの標的ユニットと変異型loxPの一つVを含む標的ユニットを同一染色体上に有する細胞株を複数樹立化し、Cre発現アデノウイルスベクターによりCreを供給したところ、設計通り野生型loxPとVの独立した組換えの結果2種類の目的遺伝子の同時発現ON/OFF制御が可能であった<sup>24)</sup>。この時、野生型loxPとVとの期待されない組換えは検出されず、細胞染色体上における精度も高いことが示された。本制御系を応用することにより、これまで樹立化が困難であった細胞毒性を示す2種類以上のウイルス抗原をCreの制御下で高度に供給するウイルスベクター作製用のパッケージング細胞の樹立化が可能になると考えられる。

連続発現制御系には、Cre/loxPと組み合わせて用いる第二の発現制御系の確立が必須である。我々は出芽酵母由来の部位特異的組換え酵素FLPをその候補と考え、FLP発現アデノウイルスベクターによるON/OFF発現制御系の有用性を検討してきた。FLPはFLP recognition target(FRT)を認識しCreと同様の作用機序による組換え反応を起こすことが知られている。しかし、FLPの活性の至適温度が30℃であるため、ショウジョウバエや植物での研究に用いられていたが、動物細胞、特に動物個体への応用には適さないと考えられていた。我々はFLPを強力なプロモーターから発現するアデノウイルスベクターを作製し、*in vitro*法や培養細胞レベルで検討を行った。その結果、

FLPはCreに比べ至適温度においても1/30の組換え効率しか示さないものの、アデノウイルスベクターやCAGプロモーターなどの高発現系を組み合わせることによって、動物培養細胞においても100%の細胞で発現ON/OFF制御が可能であることを実証した<sup>25)</sup>。この結果を受け独立に働くFLP発現アデノウイルスベクターとCre発現アデノウイルスベクターを組み合わせ、時期を変えて導入することで、複数遺伝子の連続発現制御が可能となった。

## 7. おわりに

本稿で述べたように、アデノウイルスベクターは遺伝子治療のみならずウイルス学の研究用ベクターとしても応用価値の高いベクターであると考えられる。一過性の発現ベクターであること、部位特異的組換え酵素との組み合わせにより細胞毒性の高いタンパク質の発現も可能であること、複数遺伝子の同時あるいは連続発現制御も可能となったこと等、ウイルスのライフサイクルの研究にも多くの貢献が可能な系として確立したと考えている。今後はヘルパーウイルスを用いたguttledベクターの効率的な作製法やライブラリーへの応用も可能な迅速ベクター作製法などベクター作製法の開発・改良を行い、ウイルスベクターの有用性を示していきたいと考えている。

## 謝 辞

本稿をまとめるにあたり多大なるご協力・ご助言を頂いた福田尋充、梅本博仁、脇澤未佳、越川道子、高橋ゆず香、近藤恵美子および西嶋京子、各氏に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Berkner, K. L. and Sharp, P. A. (1982) Preparation of adenovirus recombinants using plasmids of viral DNA. In Gluzman, Y. (ed), Eukaryotic viral vectors. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 193-198.
- 2) Gluzman, Y., Reichl, H. and Solnick, D. (1982) Helper-free adenovirus type-5 vectors. In Gluzman, Y. (ed), Eukaryotic viral vectors. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 187-192.
- 3) Saito, I., Oya, Y., Yamamoto, K., Yuasa, T. and Shimojo, H. (1985) Construction of nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobase hepatitis B virus DNA near the right end of its genome. *J Virol*, **54**, 711-719.
- 4) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I. (1996) Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1320-1324.
- 5) Kanegae, Y., Tavares, A. T., Izpisua Belmonte, J. C. and Verma, I. M. (1998) Role of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature*, **392**, 611-614.
- 6) Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L. and Graham, F. L.

- (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8802–8806.
- 7) Ye, X., Robinson, M. B., Batshaw, M. L., Furth, E. E., Smith, I. and Wilson, J. M. (1996) Prolonged metabolic correction in adult ornithine transcarbamylase-deficient mice with adenoviral vectors. *J Biol Chem*, **271**, 3639–3646.
  - 8) Kiwaki, K., Kanegae, Y., Saito, I., Komaki, S., Nakamura, K., Miyazaki, J. I., Endo, F. and Matsuda, I. (1996) Correction of ornithine transcarbamylase deficiency in adult spf (ash) mice and in OTC-deficient human hepatocytes with recombinant adenoviruses bearing the CAG promoter. *Hum Gene Ther*, **7**, 821–830.
  - 9) Kaneko, S., Hallenbeck, P., Kotani, T., Nakabayashi, H., McGarrity, G., Tamaoki, T., Anderson, W. F. and Chiang, Y. L. (1995) Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression. *Cancer Res*, **55**, 5283–5287.
  - 10) Mizuguchi, H. and Kay, M. A. (1998) Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum Gene Ther*, **9**, 2577–2583.
  - 11) 寺島美保, 近藤小貴, 鐘ヶ江裕美, 斎藤 泉 (2003) : アデノウイルスベクターの簡便な作製法. *実験医学* **21**, 931–936.
  - 12) Parks, R. J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M. A. and Graham, F. L. (1996) A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13565–13570.
  - 13) Ng, P., Beauchamp, C., Eveleigh, C., Parks, R. and Graham, F. L. (2001) Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther*, **3**, 809–815.
  - 14) Umana, P., Gerdes, C. A., Stone, D., Davis, J. R. E., Ward, D., Castro, M. G. and Lowenstein, P. R. (2001) Efficient FLP<sub>e</sub> recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol*, **19**, 582–585.
  - 15) Hartigan-O'Connor, D., Barjot, C., Salvatori, G. and Chamberlain, J. S. (2002) Generation and growth of gutted adenoviral vectors. *Methods Enzymol*, **346**, 224–246.
  - 16) Krasnykh, V. N., Mikheeva, G. V., Douglas, J. T. and Curiel, D. T. (1996) Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol*, **70**, 6839–6846.
  - 17) Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Saito, K., Shinoura, N. and Hamada, H. (1998) Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Hum Gene Ther*, **9**, 2503–2515.
  - 18) Sato, Y., Tanaka, K., Lee, G., Kanegae, Y., Sakai, Y., Kaneko, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T. and Saito, I. (1998) Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 455–462.
  - 19) Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S. and Saito, I. (1995) Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3816–3821.
  - 20) Kanegae, Y., Takamori, K., Sato, Y., Lee, G., Nakai, M. and Saito, I. (1996) Efficient gene activation system on mammalian cell chromosomes using recombinant adenovirus producing Cre recombinase. *Gene*, **181**, 207–212.
  - 21) Okuyama, T., Fujino, M., Li, X. K., Funeshima, N., Kogusa, M., Saito, I., Suzuki, S. and Yamada, M. (1998) Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Ther*, **5**, 1047–1053.
  - 22) Sakai, Y., Kaneko, S., Sato, Y., Kanegae, Y., Tamaoki, T., Saito, I. and Kobayashi, K. (2001) Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/loxP system. *J Virol Methods*, **92**, 5–17.
  - 23) Lee, G. and Saito, I. (1998) Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, **216**, 55–65.
  - 24) Kondo, S., Okuda, A., Sato, H., Tachikawa, N., Terashima, M., Kanegae, Y. and Saito, I. (2003) Simultaneous on/off regulation of transgenes located on a mammalian chromosome with Cre-expressing adenovirus and a mutant loxP. *Nucleic Acids Res*, **31**, e76.
  - 25) Nakano, M., Odaka, K., Ishimura, M., Kondo, S., Tachikawa, N., Chiba, J., Kanegae, Y. and Saito, I. (2001) Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP recombinase-expressing recombinant adenovirus. *Nucleic Acids Res*, **29**, E40.