

### 3. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子治療

小澤 敬也

#### はじめに

アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) に由来するベクターを用いた遺伝子治療の可能性を探る研究がここ数年活発になっている。その理由としては、非病原性の AAV に由来するベクターは安全性が高いと考えられること、筋細胞・神経細胞・肝細胞などの非分裂細胞に効率よく遺伝子導入することができ、そのような細胞が標的である場合には遺伝子発現が長期間持続することなどが挙げられる。したがって、様々な疾患を対象として、AAV ベクターを利用した遺伝子治療法の開発が進められている。このような状況の中で、最近、AAV の血清型と標的細胞の関係が注目されている。ヒト細胞に感染しうる AAV の血清型には、現在、1 型から 8 型が知られており、従来、その中で AAV-2 ベクターがもっぱら研究されてきた。しかしながら、標的組織・臓器によって各血清型の AAV ベクターの遺伝子導入効率が異なることが判明し、標的細胞の種類に応じて、異なった血清型の AAV ベクターを使い分ける必要性が出てきた。

本稿では、AAV ベクターの特徴、その血清型と組織特異性の関係、AAV ベクターを用いた遺伝子治療の研究状況について、現状を簡単に解説する。

#### 代表的なウイルスベクターの特徴

遺伝子治療のために様々な遺伝子導入法が開発されてお

り、目的に応じて使い分けられている。従来のレトロウイルスベクターは、非分裂細胞に遺伝子導入できず、他のベクターの開発が進んでいることから、その標的細胞は造血系細胞に絞られつつある。アデノウイルスベクターは非分裂細胞に遺伝子導入可能で遺伝子発現効率も高いが、遺伝子発現が長期間持続しないこと、細胞毒性や遺伝子導入細胞に対する免疫反応などの問題点がある。したがって、癌などに対する免疫遺伝子治療への応用が最適である。非分裂細胞に効率よく遺伝子導入することができ、しかも一回の遺伝子導入で長期間遺伝子発現が持続するものとしては、AAV ベクターとレンチウイルスベクター (HIV ベクターが代表的) が知られている。但し、前者の AAV ベクターの方が安全性の点で優れている。レンチウイルスベクターが適しているのは、静止期にある幹細胞であり、また ES 細胞にも効率よく遺伝子導入できる<sup>1)</sup>。AAV ベクターによる未分化な幹細胞への遺伝子導入効率は低いことが知られている。

#### AAV のウイルス学的特徴

AAV は、アデノウイルスの培養系に混入してくる小型ウイルスとして発見され、動物ウイルスの中で最も小型の線状一本鎖 DNA ウイルスであるパルボウイルスの仲間属する。

パルボウイルス科 (Parvoviridae) は従来大きく三つの属に分かれ、脊椎動物に感染するパルボウイルスには、ウイルス複製にヘルパーウイルスを必要とせず宿主細胞内で自律的に増殖するパルボウイルス属 (Autonomous Parvovirus) とヘルパーウイルスを必要とするデPENDウイルス属 (Dependovirus) が存在する。その他、昆虫に感染するデンソウイルス属 (Densovirus) も知られる。なお、ヒトに感染するパルボウイルス B19 とサルパルボウイルスは、赤血球系に対する特異性とその特徴的な転写機構から他の Autonomous Parvovirus と区別され、エリスロウイルス属 (Erythrovirus) と呼ばれるようになった。Autonomous Parvovirus や Erythrovirus は宿主動物に様々な病態を引き起こす。一方、Dependovirus である AAV には特に病原性が認められていない。ヒト細胞に感染しうる AAV には 1~8 型の血清型が知られており、その

自治医科大学 内科学講座血液学部門、輸血・細胞移植部 分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 (〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1)

Gene therapy using AAV (adeno-associated virus) vectors  
Keiyo Ozawa, M.D., Ph.D.

Division of Hematology, Department of Medicine; Division of Cell Transplantation and Transfusion; Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine Jichi Medical School

3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan

TEL: 0285-58-7353

FAX: 0285-44-5258

E-mail: kozawa@ms2.jichi.ac.jp

中で2, 3, 5型がヒトより分離されたもので、2型が特に良く研究されている。現在一般的に用いられているAAVベクターも2型をベースにしている。本稿で単にAAVと記載している場合は、2型AAV (AAV2)のことを指すものとする。

AAVはごくありふれたウイルスであり、成人の約85%がAAVに対する抗体を有している。ウイルス粒子は直径20~26nmで、エンベロープはなく、物理化学的に極めて安定である。AAVは宿主域が広く、種々の細胞に感染するが、AAV2のレセプターとしてはヘパラン硫酸が想定されており<sup>2)</sup>、またFGFレセプター<sup>3)</sup>や $\alpha V\beta 5$ インテグリン<sup>4)</sup>などがコレセプターとして働くことが示唆されている。その他、AAV4やAAV5はシアル酸に結合し<sup>5)</sup>、さらに最近、AAV5のレセプターがPDGFレセプターであることが明らかにされた<sup>6)</sup>。

ウイルスゲノムは約5kbの線状一本鎖DNAで、プラス鎖あるいはマイナス鎖がほぼ半々を占める。ゲノムの両末端には145塩基のITR (inverted terminal repeat) と呼ばれるT字型のヘアピン構造が存在する。このITRの部分が複製の開始点となり、プライマーの役割を果たす。また、ウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組込みにもこのITRが必要である。ウイルス蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が複製や転写を司る調節蛋白質のRepをコードしている。p5プロモーターからはRep78とRep68のmRNAが転写され、p19プロモーターからはRep52とRep40のmRNAが転写される。large Rep (Rep78/68) は、endonuclease, helicase, ATPaseなどの活性を持ち、1) AAVプロモーター活性の調節、2) AAVゲノムの複製、3) AAVS1領域へのAAVゲノムの組込みなどにおいて重要な役割を担っている。また、small Rep (Rep52/40) は一本鎖ゲノムDNAの蓄積に必要とされている。ゲノムの右半分は構造蛋白質であるVP1, VP2, VP3の三つのカプシド蛋白質をコードしている。カプシド蛋白質のmRNAはp40プロモーターより転写される。AAVの遺伝子発現については、複雑な調節機構が存在し、またアデノウイルスなどのヘルパーウイルスの有無により大きく変わってくる。

AAVの生活環は潜伏感染と溶解感染に分けられる。前者は単独で感染した場合で、宿主細胞の第19番染色体長腕のAAVS1領域 (19q13.3-qter) へ組み込まれるのが特徴的である。この組込みは非同相組換えによるものでありRepが関与している<sup>7,8)</sup>。実験的には、AAVS1領域とITRのRep結合領域の両者に共通して存在する塩基配列 (GAGC繰返し配列) に、Rep78/Rep68が結合することが示されている。したがって、野生型AAVが標的細胞に感染した際には、RepがAAVのITRとAAVS1の両者に結合し、Repが介在することによりAAVゲノムの19番染色体への部位特異的組込みが起こるものと想定されてい

る。アデノウイルスなどのヘルパーウイルスが同時に感染した場合や、あるいはAAVが潜伏感染している細胞にさらにヘルパーウイルスが重複感染すると、AAVの複製が起こり、細胞破壊により大量のウイルスが放出されることになる (溶解感染)。

アデノウイルスのヘルパー作用に関しては、E1AがAAVのp5, p19プロモーターをトランスに活性化し、E1BはAAV mRNAの安定化、核から細胞質へのmRNAの移行などを促進する。E2A産物とVA RNAはp40からのmRNAの翻訳を促進する。AAVのゲノムは一本鎖DNAであるため、ウイルス遺伝子が発現するためには二本鎖DNAになる必要があるが、このステップ (セカンド鎖の合成) をアデノウイルスのE1BとE4orf6産物の複合体が促進する<sup>9)</sup>。

### AAVベクターの作製法

基本的なAAVベクター作製法 (アデノウイルスフリーシステム)<sup>10)</sup>では、野生型AAVの両端のITRを残し、その間に目的の遺伝子を挿入したプラスミドを作製する (ベクタープラスミド)。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質 (Rep, Cap) は別のAAVヘルパープラスミドより供給する。さらに、AAVの増殖に必要とされるアデノウイルスのヘルパー作用を担う遺伝子領域は上述のように既に判明しているため (E1A, E1B, E2A, VA, E4orf6), 293細胞 (アデノウイルスのE1A, E1Bでトランスフォームしたヒト胎児腎組織由来細胞) が元々持っているE1A, E1B以外のものをアデノウイルスヘルパープラスミドとして供給する。これら三者のプラスミドを293細胞にトランスフェクションにより一括して導入すると、組換えAAV (AAVベクター) が産生されるようになる。このAAVベクターは核内に存在するため、細胞を凍結融解して回収する<sup>11,12)</sup>。AAVベクターを精製するには、塩化セシウムを用いた密度勾配超遠心法を行うのが一般的であるが、最近ではカラム法も検討されている<sup>13,14)</sup>。

臨床グレードのベクターの大量作製が煩雑であることが、臨床応用のネックとなっているが、バキュロウイルスを利用した高効率ベクター作製法の開発が最近進んでいる<sup>15)</sup>。一方、AAV蛋白質を発現するパッケージング細胞株の開発も精力的に行われてきているが、細胞毒性を持つRepの厳格な発現制御が難しく、実用レベルのものは依然として得られていない<sup>16)</sup>。

### AAVベクターの特徴

野生型AAVが非病原性ウイルスであることからAAVベクターは安全性が高いと考えられている。この点がAAVベクターの最大のメリットである。標的細胞としては、神経細胞<sup>17,18)</sup>・筋細胞<sup>19)</sup>・肝細胞<sup>20,21)</sup>などの非分裂細胞

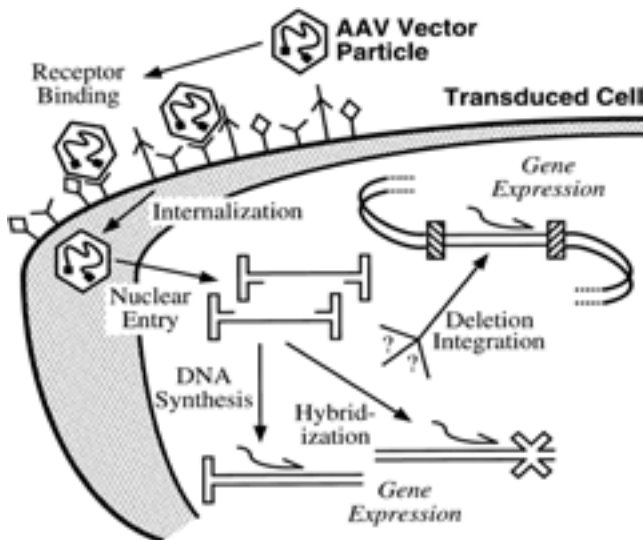


図1 AAVベクターの標的細胞への結合と遺伝子発現までの経路<sup>22)</sup>

が適しており、さらに、このような細胞では遺伝子発現が長期間（年の単位）持続する（AAVベクターで導入した遺伝子はそのほとんどがエピソームとして存在すると考えられており、増殖細胞の場合は導入遺伝子が早期に失われやすい）。尚、肝細胞の場合は、遺伝子導入効率に性差があり、雄の方が良好である<sup>22)</sup>。また、ベクターにはウイルス固有の蛋白質をコードする遺伝子が含まれないため、遺伝子導入細胞に対する免疫反応が惹起されにくい。

一方、弱点としては、ゲノムが一本鎖DNAであるため、遺伝子発現が起こるには二本鎖になる必要がある（図1<sup>22)</sup>）、その効率が必ずしも良くないことから、ある程度の発現量を得るには膨大な量のベクターを必要とすることになる。遺伝子発現がピークに達するのに1、2週間かかることも、そのような事情によると考えられる。また、小型ウイルスに由来するベクターであるため、挿入できる遺伝子のサイズに限界がある。但し、重複感染が可能なウイルスであるため、複数の遺伝子を別々のベクターで導入することが可能である<sup>17,18)</sup>。さらに、スプリットベクターというユニークな方法の開発も行われている。その要点は、AAVベクターで導入した遺伝子が細胞内でコンカタマー（複数個、タンデムに連結した構造）を形成する性質を利用し、発現ユニットを二分して別々のベクターで導入し、細胞内で再結合させるというものである<sup>23-25)</sup>。スプリットする箇所については、1) エンハンサー領域とプロモーター/蛋白質コード領域の間で分ける方法、2) エンハンサー/プロモーター領域と蛋白質コード領域の間で分ける方法、3) イントロンの部分で分ける方法などが実験的に検討されている。この新技術により、大きな遺伝子でもAAVベクターが利用できる可能性が示されたが、実用化にはまだ時間がかかりそうである<sup>26)</sup>。

その他、AAVの大きな特徴である第19番染色体への部位特異的組込みという性質が現行のAAVベクターでは失われている。この点については、ベクタープラスミドからRepをコードする遺伝子を取り除いてあるのが原因と考えられている。尚、導入遺伝子が低頻度であるが組み込まれた場合、その部位は基本的にランダムな傾向があるが、アクティブな遺伝子領域に起こりやすいことが示されている<sup>27)</sup>。但し、非分裂細胞の場合は、挿入変異をそれほど心配する必要はないと思われる。

#### AAVベクターの血清型/プロモーターと組織特異性

AAVベクターに関しては、血清型と組織特異性の問題がトピックスとなっている。従来、AAV2をベースとしたベクターが用いられてきたが、最近になって、神経系<sup>28)</sup>や気道系<sup>29)</sup>では遺伝子導入効率がAAV5ベクターの方が優れていると報告されており、さらに、AAV5ベクターを用いると神経細胞だけでなくグリア細胞への遺伝子導入も可能であるとされている（神経細胞へ特異的に遺伝子導入するにはAAV2ベクターが適している）。網膜への遺伝子導入にはAAV4ベクターとAAV5ベクターが良好であるとされている（前者は網膜色素細胞特異的に、後者は光受容体細胞へより強く遺伝子導入可能である）<sup>30,31)</sup>。その他、AAV4ベクターは脳室上衣細胞への遺伝子導入に適していると報告されている<sup>28)</sup>。また、筋肉を標的とする場合には、AAV1ベクターやAAV7ベクターの効率が良く、AAV5ベクターがそれに次ぎ、AAV2ベクターはあまり適していない<sup>30,32,33)</sup>。さらに肝細胞への遺伝子導入にはAAV8ベクターが最適である<sup>33)</sup>。

AAV3ベクターは構造上AAV2ベクターに近いので、両者の性質はほぼ類似していると思われる<sup>34)</sup>。また、AAV6ベクター（AAV6はAAV1とAAV2の組換えによるものであることが示されている）については、カプシドの構造がAAV1ベクターと同一であるため、独立した存在とはみなされない傾向にある。

このように、各臓器・組織によってAAVベクターの至適血清型は異なっており、標的組織の種類に応じて種々の血清型のAAVベクターを使い分けることが重要である。尚、異なった血清型のAAVベクターの研究が行われた背景としては、血清型を変えることによりAAVベクターの再投与が行いやすくなるのではという発想があった。しかし、血友病患者などで調べられたところ、複数の血清型に対して抗体を持っている患者がかなり存在するようである。

さて、ベクター構築にあたっては、ベクターに搭載される発現ユニットに含まれるプロモーターに関しても考慮する必要がある。一般にCMVプロモーターが汎用されているが、導入遺伝子の十分な発現を得るためには、標的組織の種類に応じて至適プロモーターを検討する必要がある。

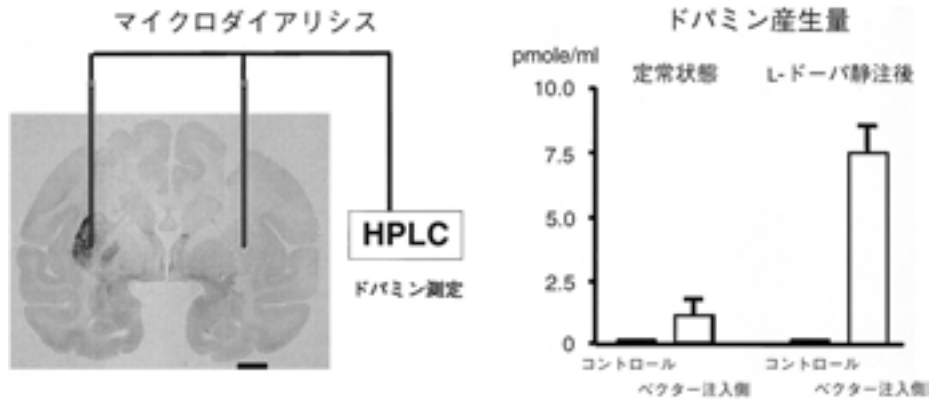


図2 遺伝子治療を行ったパーキンソン病モデルサルにおける脳内ドパミン産生量の測定<sup>46)</sup>パーキンソン病モデルサルにおいて、片側の被殻に AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH を注入した。左図は、イメージとして、TH 染色の写真を示したものであるが、濃く染色されている部分が被殻である。被殻の広い範囲で TH の発現が認められる。また、被殻におけるドパミン産生量については、マイクロダイアリシスで採取したサンプルを用いて HPLC 法で測定した。右図はその結果である。ベクターを注入した被殻でドパミン産生が増えており、さらに L-ドーパを静注することにより一段と増加した。このことは遺伝子治療により被殻で発現させた AADC が有効に機能していることを示している。

例えば、海馬への遺伝子導入では、血清型とプロモーターの組み合わせ次第でかなり異なった遺伝子発現パターンを示すことが示されている<sup>35)</sup>。その他、導入遺伝子の産物に対する免疫反応を抑えるには、抗原提示細胞での遺伝子発現をできるだけ低くすることが望ましいが、そのような目的で組織特異的プロモーターの利用も検討されている。但し、組織特異的プロモーターの場合は遺伝子発現レベルが低くなるのが難点である。

#### AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発

AAV ベクターを用いた遺伝子治療の応用では、血友病 B を対象とした臨床研究が行われている。筋肉を標的とした方法では、一部の例で効果が観察されたが<sup>36)</sup>、その後は順調に進んでいない<sup>37)</sup>。現在、肝臓を標的とした方法（肝動脈へのベクターの注入）に切り換えられているが、まだ評価できる段階には至っていない（ベクターゲノムが精液中に一過性に検出され問題となったが、生殖細胞のゲノムへの遺伝子組込みは認められていない）。尚、いずれのアプローチでも AAV2 ベクターが用いられている。今後、至適血清型の AAV ベクターを臨床研究で使用することが可能になれば、状況はまた変わることが予想される<sup>38)</sup>。

筋肉を標的とする場合は、このような蛋白質補充遺伝子療法への応用が有用と考えられている。例えば、癌を対象とする場合は、癌病巣を養う血管（腫瘍血管）をターゲットにした治療戦略（癌に対する“兵糧攻め”）が注目されている。すなわち、エンドスタチン、アンジオスタチン、可溶性 Flt-1 (sFlt-1)<sup>39)</sup>、インターロイキン-10 (IL-10)<sup>40)</sup>、NK4 (HGF アンタゴニスト)<sup>41)</sup>などを体内で長期間持続的に発現させ、腫瘍の増大や転移・播種を防ぐ

というものである。担癌ヌードマウスを用いたモデル実験で AAV ベクターの有用性が示されている。また、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) において、抗炎症性サイトカインの IL-10 を発現する AAV ベクターを筋肉注射すると、長期間に亘って高血圧を予防する効果が観察され、脳卒中発作も IL-10 遺伝子治療群で有意に減少した (Nomoto T, et al.; manuscript in preparation)。その他、Fabry 病で見られる心筋症に対しても、このような蛋白質補充遺伝子療法のアプローチの有効性が動物実験で示されている<sup>42)</sup>。一方、筋肉自体の修復を目指した遺伝子治療法の開発も、筋ジストロフィーを対象として進んでいる<sup>43)</sup>。さらに、骨格筋だけでなく、心筋への遺伝子導入にも AAV ベクターが適している。心筋症を発症するハムスターの疾患モデルを用いて、治療用遺伝子を搭載した AAV ベクターの心筋への直接注入により、心機能の改善が観察されている<sup>44)</sup>。尚、欠損する蛋白質を補う場合は、導入遺伝子産物に対する免疫反応の克服が課題となっている<sup>43)</sup>。

AAV ベクターの癌に対する遺伝子治療への応用では、自殺遺伝子などを AAV ベクターで癌細胞へ直接導入するアプローチがある。この場合、放射線療法や化学療法を併用すると相乗効果が期待できる<sup>45)</sup>。これは、AAV ベクターゲノムの二本鎖への変換が促進されるためと考えられている。

さて、AAV ベクターを利用した遺伝子治療法で、直ぐにでも臨床の有効性が期待されるものとしてはパーキンソン病が挙げられる。パーキンソン病は黒質-線条体系ドパミンニューロンの選択的変性により線条体におけるドパミン含量の低下を生ずる神経変性疾患である。この疾患では

脳全体に遺伝子を導入する必要はなく、ターゲットが線条体に限局されることから、技術的に取り組みやすい。サルやラットでモデル動物を作製し、ドパミン合成系酵素遺伝子を搭載した AAV ベクターを線条体に注入したところ、明瞭な治療効果が観察されている（自治医科大学神経内科学部門との共同研究）<sup>17,18,46)</sup>（図 2）。臨床応用の第一ステップでは、黒質-線条体系の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC：L-DOPA をドパミンに変換する酵素）の減少のために L-DOPA 療法が効きにくくなってきた患者を対象とし、L-DOPA 内服に AAV-AADC の線条体への注入を組み合わせた治療法を計画している（総括責任者：中野今治神経内科教授）。この方法では、線条体におけるドパミン産生を L-DOPA 内服量でコントロールできることから安全性が高い。現在、学内の審査委員会で審査中である。

尚、上記の方法は不足するドパミンを補充する対症療法的アプローチであり、ドパミンニューロンの選択的変性を阻止するものではなく、疾患自体の進行を防ぐことはできない。そこで、もう一つの治療戦略として、神経細胞保護作用を持つ神経栄養因子 [GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) など] の遺伝子を用いる方法が検討されており、動物モデル実験でその有効性が観察されている<sup>47)</sup>。将来的には、これらの方法を組み合わせて、より理想的な遺伝子治療法が生み出されるものと思われる。

パーキンソン病に対するもう一つの戦略として、視床下核の神経細胞の活動を抑えることを狙い、GAD [glutamic acid decarboxylase：抑制性神経伝達物質の GABA (ガンマアミノ酪酸  $\gamma$ -aminobutyric acid) の産生に必要な酵素] の遺伝子を AAV ベクターで導入するという方法が考案されている<sup>48)</sup>。ラットモデル系でこの戦略が有効であること（黒質ドパミンニューロンの変性を抑える効果も観察されている）が報告されており<sup>49)</sup>、最近、第 1 相臨床研究が米国でスタートした。

その他、神経系疾患の遺伝子治療研究としては、脳血管障害に対して、海馬の脳虚血モデルを使った研究が行われている<sup>50)</sup>。また、AAV ベクター筋注法の応用例として、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスの系で遺伝子治療のクリアな効果が認められている<sup>51)</sup>。すなわち、GDNF を骨格筋で発現させると、その GDNF は運動神経末端より取り込まれ、神経軸索を脊髄前角まで逆行輸送され、運動ニューロンの変性を防御する効果が観察されている。同様の遺伝子治療の効果は、IGF-1 遺伝子を用いても確認されている<sup>52)</sup>。その他、病態解析や生理学的研究に役立てるために AAV ベクターを活用することも可能である。例えば、アルギニンバゾプレシン (AVP) を先天的に欠損し、中枢性尿崩症を自然発症する Brattleboro ラットの両側視床下部視索上核に、AAV ベクターを用いて AVP 遺伝子の導入を試みた。その結果、尿量の減少と尿

浸透圧の正常化がみられた<sup>53)</sup>。さらに、高張食塩水負荷により血中 AVP が有意に上昇し、水負荷試験では水利尿がみられた。導入遺伝子には CMV プロモーターを用いており、遺伝子発現レベルでの制御ではないため、下垂体後葉におけるホルモン分泌のレベルで制御されているものと想定される。その制御メカニズムの研究には恰好のモデルになるとと思われる。最新の研究成果では、アルツハイマー病モデルマウス（アミロイド前駆体タンパク質トランスジェニックマウス）を用い、アミロイド  $\beta$  ペプチドを脳内で分解する酵素であるネプリライシンを発現する AAV ベクターを脳内に注入し、病理学的アミロイド  $\beta$  ペプチドの蓄積が抑制されることを理研グループが確認している<sup>54)</sup>。

### おわりに

遺伝子治療臨床研究において、ウイルスベクター自体による重篤な副作用の発生が問題になってきている今日、安全性の高い AAV ベクターへの期待が益々高まっている。最近では、新しい血清型の AAV ベクターが注目されるようになってきているが、2 型以外の AAV ベクターを臨床研究に用いるには、安全性評価に関わるデータを取り直す必要があり、またパテントの問題も大きな隘路となっている。既に膨大な基礎データが蓄積されている AAV 2 ベクターが適した遺伝子治療臨床研究という点では、パーキンソン病の遺伝子治療が当面クローズアップされてくるものと予想される。基礎研究では、標的細胞へのターゲティングを人為的に制御するため、カプシド蛋白質を修飾することが試みられている。この分野ではベクターの結晶構造解析の知見が活かされていくものと期待される<sup>55)</sup>。

### 文 献

- 1) Asano T, Hanazono Y, Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii K, Hasegawa M, Nakatsuji N, Ozawa K: Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol Ther* **6**: 162-168, 2002.
- 2) Summerford C, Samulski RJ: Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**: 1438-1445, 1998.
- 3) Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A: Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* **5**: 71-77, 1999.
- 4) Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ:  $\alpha$ V $\beta$ 5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**: 78-82, 1999.
- 5) Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA: Adeno-associated virus serotype 4 (AAV 4) and AAV 5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**: 6884-6893, 2001.

- 6) Pasquale GD, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, Chiorini JA : Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9** : 1306-1312, 2003.
- 7) Surosky RT, Urabe M, Godwin SG, McQuinston SA, Kurtzman GJ, Ozawa K, Natsoulis G : Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* **71** : 7951-7959, 1997.
- 8) Urabe M, Hasumi Y, Kume A, Surosky RT, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K : Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *J Virol* **73** : 2682-2693, 1999.
- 9) Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM : Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* **70** : 520-532, 1996.
- 10) Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P : Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* **5** : 938-945, 1998.
- 11) Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, Ozawa K, Kawai N : Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Methods Enzymol* **346** : 378-393, 2002.
- 12) 松下 卓, 岡田尚巳, 小澤敬也 : アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター. 必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール (仲嶋一範, 北村善浩編), 羊土社 2003, pp107-117.
- 13) Kaludov N, Handelman B, Chiorini JA : Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* **13** : 1235-1243, 2002.
- 14) Brument N, Morenweiser R, Blouin V, Toubanc E, Raimbaud I, Cherel Y, Folliot S, Gaden F, Boulanger P, Kroner-Lux G, Moullier P, Rolling F, Salvetti A : A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and-5. *Mol Ther* **6** : 678-686, 2002.
- 15) Urabe M, Ding C, Kotin RM : Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* **13** : 1935-1943, 2002.
- 16) Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Ozawa K : Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol Biotechnol* (in press)
- 17) Fan D, Ogawa M, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogasawara Y, Urabe M, Nishizawa M, Nakano I, Yoshida M, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Ozawa K : Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno associated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9** : 2527-2535, 1998.
- 18) Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano N, Ozawa K : Triple transduction with adeno associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* **11** : 1509-1519, 2000.
- 19) Pruchnic R, Cao B, Peterson ZQ, Xiao X, Li J, Samulski RJ, Epperly M, Huard J : The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Hum Gene Ther* **11** : 521-536, 2000.
- 20) Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA : Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* **5** : 64-70, 1999.
- 21) Davidoff AM, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC : Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* **102** : 480-488, 2003.
- 22) Russell DW, Kay MA : Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* **94** : 864-874, 1999.
- 23) Nakai H, Storm T, Kay MA : Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes *in vivo* by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nat Biotechnol* **18** : 527-532, 2000.
- 24) Duan D, Yue Y, Yan Z, Engelhardt JF : A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat Med* **6** : 595-598, 2000.
- 25) Sun L, Li J, Xiao X : Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med* **6** : 599-602, 2000.
- 26) Reich SJ, Auricchio A, Hildinger M, Glover E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J : Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* **14** : 37-44, 2003.
- 27) Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA : AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* **34** : 297-302, 2003.
- 28) Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA : Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors : transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 3428-3432, 2000.
- 29) Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA : Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* **74** : 3852-3858, 2000.
- 30) Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ : Cross-packaging of a single

- adeno associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* **76** : 791–801, 2002.
- 31) Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Cherel Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P, Rolling F : Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* **7** : 774–781, 2003.
  - 32) Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ, Walsh CE : Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* **2** : 619–623, 2000.
  - 33) Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM : Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 11854–11859, 2002.
  - 34) Muramatsu S, Mizukami H, Young NS, Brown KE : Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* **221** : 208–217, 1996.
  - 35) Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Katsura K, Katayama Y, Ozawa K : Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5. *Neurosci Lett* **340** : 153–157, 2003.
  - 36) Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA : Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24** : 257–261, 2000.
  - 37) Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B : AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101** : 2963–2972, 2003.
  - 38) Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, Nichols TC, Robinson N, Lotfi Y, Mingozzi F, Xiao W, Couto LB, High KA : Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* **103** : 85–92, 2004.
  - 39) Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, Kohno T, Takeuchi K, Kume A, Momoeda M, Yoshikawa H, Tsuruo T, Shibuya M, Taketani Y, Ozawa K : Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res* **62** : 2019–2023, 2002.
  - 40) Kohno T, Mizukami H, Suzuki M, Saga Y, Takei Y, Shimpo M, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Sato I, Ozawa K : Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res* **63** : 5091–5094, 2003.
  - 41) Saga Y, Mizukami H, Suzuki M, Urabe M, Kume A, Nakamura T, Sato I, Ozawa K : Expression of HGF/NK 4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. *Gene Ther* **8** : 1450–1455, 2001.
  - 42) Takahashi H, Hirai Y, Migita M, Seino Y, Fukuda Y, Sakuraba H, Kase R, Kobayashi T, Hashimoto Y, Shimada T : Long-term systemic therapy of Fabry disease in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 13777–13782, 2002.
  - 43) Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J, Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S : Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* **9** : 1576–1588, 2002.
  - 44) Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, Yamazaki K, Shimamoto R, Urabe M, Nakata J, Hemmi C, Masui F, Nakajima T, Suzuki J, Monahan J, Sato H, Masaki T, Ozawa K, Toyo-Oka T : Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy : amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 901–906, 2002.
  - 45) Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Nishino A, Takeuchi K, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K : Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther* **10** : 51–58, 2003.
  - 46) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume K, Matsumura M, Nagatsu N, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao T, Nakano I, Ozawa K : Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* **13** : 345–354, 2002.
  - 47) Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K : Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* **9** : 381–389, 2002.
  - 48) Doring MJ, Kaplitt MG, Stern MB, Eidelberg D : Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* **10** : 1589–1591, 2001.
  - 49) Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y, Oshinsky ML, Doring MJ : Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* **298** : 425–429, 2002.
  - 50) Shimazaki K, Urabe M, Monahan J, Ozawa K, Kawai N : Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2

- gene transfer into post-ischemic gerbil brain *in vivo* : prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther* **7** : 1244-1249, 2000.
- 51) Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I : Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **22** : 6920-6928, 2002.
- 52) Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH : Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301** : 839-842, 2003.
- 53) Ideno J, Mizukami H, Honda K, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Saito T, Ishibashi S, Ozawa K : Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. *Mol. Ther.* **8** : 895-902, 2003.
- 54) Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, C. Saido TC : Presynaptic expression of neprilysin efficiently reduces amyloid- $\beta$  peptide in the hippocampal formation of mice. *J Neurosci* (in press)
- 55) Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS : The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 10405-10410, 2002.