

2. センダイウイルスベクター： ベクター開発と医療・バイオ分野への応用

飯田 章博

ダイナベック株式会社

センダイウイルスベクターは、分裂、非分裂細胞を問わず、哺乳類の多くの細胞種、組織に遺伝子を導入可能であり、高い外来遺伝子の発現能を有する。また、一本鎖のマイナス鎖 RNA よりなるベクターゲノムは細胞質に留まるため、宿主染色体に影響を与えず、挿入変異や染色体の構造変化の危険性もない等、機能性、安全性の両面で生体へのベクターの利用において有利な特徴を有している。そのため、「細胞質型 RNA ベクター」という新たな概念の遺伝子導入と発現システムを有する遺伝子治療、組換えワクチン用ベクターとなることが期待される。現在、組換えセンダイウイルスベクターによる各種バイオ分野での高発現ベクターとしての利用に加え、がん、循環器疾患、感染症、神経系疾患等の治療へ向けて、医療分野での応用研究・開発が進められている。

はじめに

ウイルスはこれまで人類に脅威を及ぼす感染症として、その原因となるウイルスの単離、病原性機構の解析をはじめとする基礎研究や、制圧に関する応用研究が多く行われてきた。また、スプライシングの解明や腫瘍ウイルスによる発がん機構の解明等、生命科学の分野での重要な発見に際しての研究材料として貢献してきた。さらに、ウイルスゲノムの解析、遺伝子操作技術の進展により細胞、生体への遺伝子導入のためのベクターとしての開発によるバイオ分野での利用や、疾病の予防、治療という医療分野への応用が可能となった。

これまでウイルスベクターをとしてレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス等を由来としたベクターが作製され、発現ベクターとして各種研究分野で利用されてきたが、さらに遺伝子治療用ベクター、ワクチン用ベクター等の臨床応用にも利用され、ヒ

トでの臨床試験により、ベクターとしての有効性が試されている³¹⁾。しかしながら、これまで一部を除き、臨床的に満足すべき結果は得られていない。また、遺伝子治療臨床試験において、アデノウイルスベクターにおける死亡事故¹⁷⁾やレトロウイルスベクターにおける染色体への挿入に伴う白血病の発症の報告⁴⁾があり、より安全なベクターや治療プロトコルの開発が必要とされている。現在、既存ベクターの改良により、課題の解決を図ろうと精力的な研究が行なわれているが、一方で新たなベクターの開発も行なわれている。

本稿では2006年よりヒトでの臨床応用が開始されたセンダイウイルスベクターの開発状況と医療、バイオ分野での応用について概説する。

1. センダイウイルスの構造と性質

センダイウイルス (SeV) は Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)、マウスパラインフルエンザ1型とも呼ばれるパラミクソウイルス科、レスピロウイルス属に分類されているウイルスで、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、ボルナウイルス科とともにモノネガウイルススーパーファミリーを形成している^{2,15,20)}。直径は約150-250 nmの楕円形のエンベロープウイルスであり、ゲノムは15,384塩基よりなる非分節型、マイナス鎖RNAより構成されている。1950年代前半に日本で初めて分離された後、1957年には細胞融合活性が発見され、センダイウイルスは膜融合

連絡先

〒305-0856 茨城県つくば市観音台1-25-11
 ダイナベック株式会社
 TEL : 029-838-0540
 FAX : 029-839-1123
 E-mail : iida@dnavec-corp.com

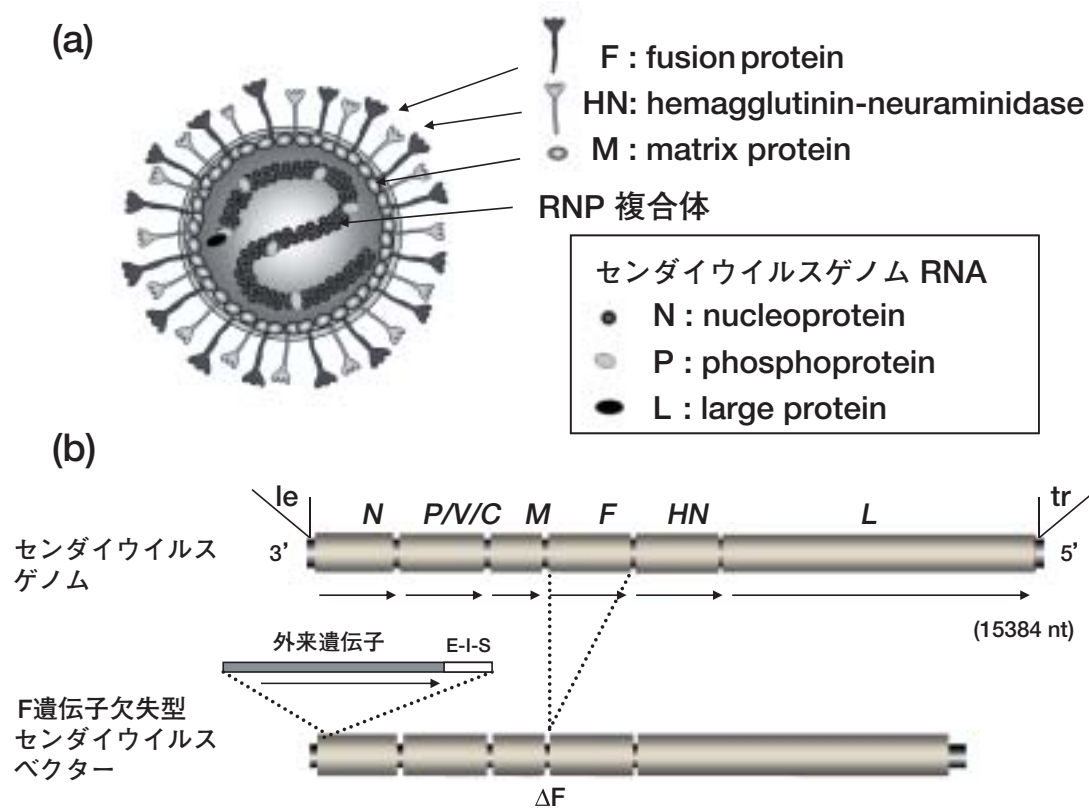


図1 センダイウイルス粒子とゲノムの構造

(a) センダイウイルスの構造 (模式図). (b) センダイウイルスと F 欠失型センダイウイルスベクターのゲノム構造. F 欠失型センダイウイルスベクターでの外来遺伝子は N 遺伝子上流に挿入されたものを代表として示す.

機構の解析, プロテアーゼ活性化による感染性の発現の解明等ウイルス学や分子生物学に大きく寄与してきた⁹⁾. また, 本ウイルスはマウスを宿主とする呼吸器病ウイルスであるが, ヒトへの病原性の報告もなく, 発育鶏卵や培養細胞での増殖性もよい. そのため, 研究材料としての利用にも都合がよく, 細胞融合のためのツールとしての体細胞遺伝学における雑種細胞の作製⁵⁾, 発生工学における卵細胞同士との融合²⁷⁾, さらに HVJ-リボソームとよばれる遺伝子をはじめとする高分子の導入のための担体の作製¹¹⁾ の際などにも利用されてきた実績がある.

センダイウイルスのゲノム RNA はヌクレオカプシドタンパク質 (N) と強く結合しており, この状態でのみ RNA の鋳型活性を有する. 遺伝子は, 6つの主要な遺伝子がコードされ, 3' 端から順に N タンパク質, RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質 (P), ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリクスタンパク質 (M), 宿主細胞への侵入にかかわる膜融合タンパク質 (F), 結合にかかわる赤血球凝集素/ノイラミナーゼ (HN), RNA ポリメラーゼの大サブユニットである巨大 (ラージ) タンパク質 (L) の順に並んでいる (図 1). それぞれの遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し, 単独の mRNA とし

て転写され, それぞれ一個のタンパク質が翻訳される. なお, 例外的に P 遺伝子の領域では P 以外に C と V と呼ばれるアクセサリタンパク質も翻訳される.

センダイウイルスは, 細胞へ感染してから新たなウイルスが出芽, 生成するまでの全生活環を通して, そのゲノムが細胞質で RNA の状態で存在する. そのため, 本ウイルスを骨格とする遺伝子治療や組換えワクチン用のベクター化に際しては, 「細胞質型 RNA ベクター」として, 特に, 染色体へのゲノムの組み込みによる挿入変異や染色体の構造変化を惹起するおそれが原理的になく, 遺伝的毒性から解放されることが, 核内で DNA として存在する既存のプラスミド, アデノウイルス, レトロウイルス, アデノ随伴ウイルス等のベクターとは異なる特徴として挙げられる. また, 1) 哺乳動物細胞膜上のほとんどに存在するシアル酸と HN タンパク質を介して結合し, 細胞内にゲノムが導入されるため, 多くの細胞種, 組織に遺伝子が導入されることが期待できる, 2) 細胞への進入が早く, 短時間のウイルス感染により十分な発現が可能である 3) 導入細胞内ではゲノムの自律複製がおき, 転写産物量の高発現が期待される, 4) センダイウイルス自体, ヒトへの病原性の報告がない, 5) 自然界でのウイルス遺伝子の組換えは報告されてお

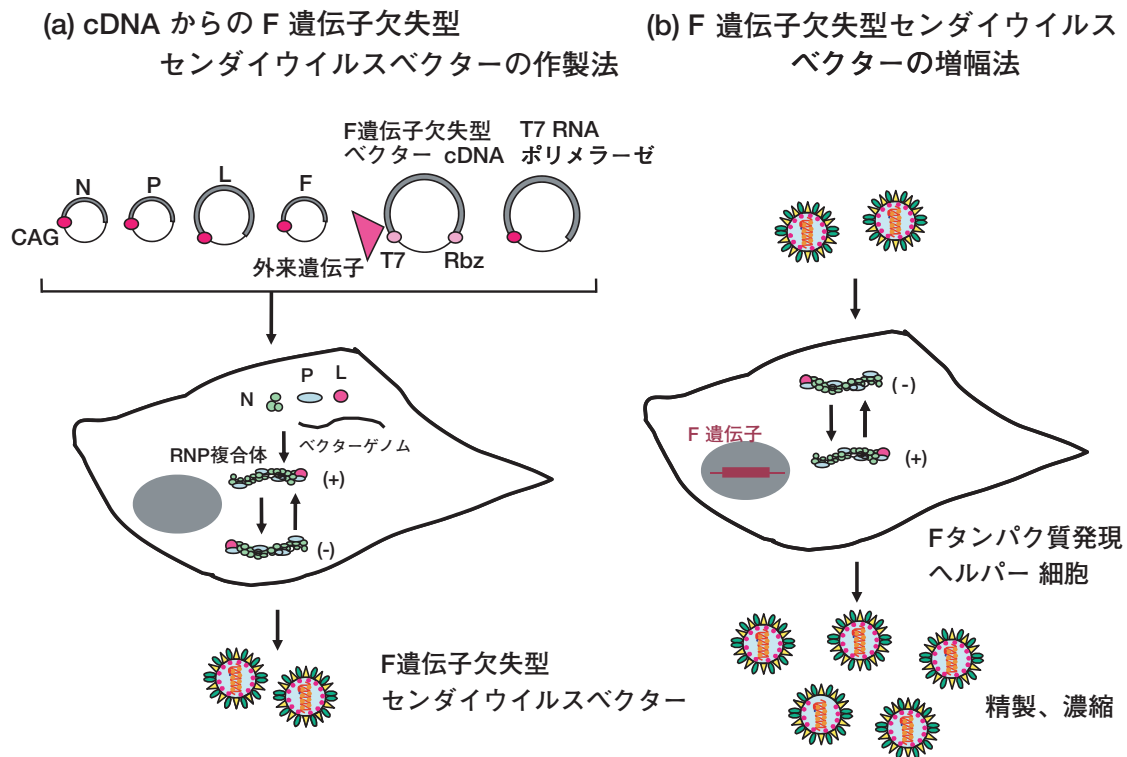


図 2 F 欠失型センダイウイルスベクターの作製法

(a) 6 種のプラスミドを細胞に導入することにより、F 欠失型センダイウイルスベクターが培養上清に回収される。(b) F タンパク質を発現するヘルパー細胞株に F 欠失型センダイウイルスベクターを感染することによりベクターがさらに増幅される。

らず、交雑による新規ウイルス誕生の心配がないという点もベクター化とヒトへの臨床応用へむけての機能面、安全面からの有利な特徴として挙げられる。

2. センダイウイルスベクターの作製

cDNA からセンダイウイルスを回収するリバーシジェネティクス技術が 1995～96 年に開発され、遺伝子操作によるウイルスゲノムの改変と改変したゲノムを保持するウイルス粒子の回収が可能となった^{3,12)}。本技術により、ウイルス遺伝子への変異の導入によるウイルス遺伝子自身の機能解析が容易となったのに加え、外来遺伝子のゲノムへの搭載やウイルス遺伝子の欠損や変異導入等、遺伝子導入用組換えベクターの開発という観点からのベクター構造の改良が可能となった。

ベクター開発においては、弱毒株である Z 株を基本骨格としているが、ヒトへの医療分野への応用可能性を考慮し、より安全性を高めるデザインが考案された^{8,16)}。具体的には、本来のウイルス遺伝子を全て含む組換えベクターでは体内での伝播が生ずるのに対し、導入細胞内でのベクターの自律複製に必要な N, P, L 遺伝子以外の F, HN, M 遺伝子の一つもしくは複数欠損させ、非伝播性とするデザインである。初めに作出された非伝播性ベクターの例として、F 遺伝子欠失型ベクターを示す (図 1)。F 遺伝子欠失

型ベクターは、従来、バクテリオファージ T7 由来 RNA ポリメラーゼにより認識される T7 プロモーター下流に組換えベクター cDNA を挿入したプラスミド、T7 プロモーター支配下での N, P, F, L 発現プラスミド、さらに T7 RNA ポリメラーゼ発現組換えワクチニアウイルスを用い、サル腎由来 LLC-MK₂ 細胞に導入することにより作製されたが⁶⁾、最近では、6 種のプラスミド (T7 プロモーター下流に組換えベクター cDNA を挿入したプラスミド、CAG プロモーター支配下での N, P, L, F, T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子発現プラスミド) のトランスフェクションのみによる簡便な作製法も可能となっている。回収されたベクターは、ベクターゲノムより欠損した F 遺伝子を発現するヘルパー細胞で F タンパク質を供給することにより、さらに増やすことができる (図 2)。この方法により、一度は感染可能であるが、伝播が起きないベクターが $10^7 \sim 10^8$ 感染粒子/ml レベルのタイターで培養上清より回収が可能であり、さらに精製することにより、濃縮が可能である。なお、ベクターに外来遺伝子を組み込む際には、センダイウイルスの転写には自らの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼに対する独自の制御配列 (転写開始 (S), 転写終結 (E), 介在配列 (I)) を必要とするため、外来遺伝子下流に E-I-S の順に計 22 塩基の配列を接続し、1 つの転写制御ユニットとしてベクター cDNA に組み込む。その際、ゲノ

ムの効率的な複製を行わせるために、導入する断片の塩基数が6の倍数である必要がある¹⁴⁾。また、外来遺伝子はどのウイルス遺伝子間に配置してもよいが、センダイウイルスの遺伝子発現の極性効果という性質のため⁷⁾、挿入位置がN遺伝子に近いほど(すなわちマイナス鎖ゲノム上では、3'末端に近いほど)その導入細胞における発現量は高く、より下流になるに従って低下し、発現量で20倍以上の違いがある³⁰⁾。従って最も高く遺伝子を発現させるためには、最も3'端にあるN遺伝子の翻訳領域の直前に挿入し、逆に少量の発現にとどめたい場合にはより下流に挿入すればよい。

3. センダイウイルスベクターの特徴

これまで緑色蛍光タンパク質(EGFP)、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子をはじめとして、酵素、サイトカイン、インターロイキン、神経栄養因子、転写因子等、各種の分泌タンパク質、膜タンパク質、細胞内タンパク質の遺伝子搭載組換えセンダイウイルスベクターが作製されている。挿入可能な遺伝子の大きさは今までのところ5 kb程度であり、複数の外来遺伝子を同時に搭載したベクターの作製も可能となっている。*in vitro*での遺伝子導入、発現能をEGFP遺伝子の発現により調べた際には、肝細胞、肺毛細管内皮細胞、平滑筋細胞等のヒト由来の初代培養細胞や、ヒトCD34陽性造血幹細胞、ラット大脳皮質由来初代神経細胞、後根神経節初代神経細胞に高効率で遺伝子導入し、EGFPの強い発現が認められている。また、EGFP遺伝子を導入したサル由来胚性幹細胞では、胚様体、神経、血球系細胞等、正常に分化しうることを示されている²³⁾。組織や生体においては、マウスやヒツジの気道上皮組織、鼻粘膜上皮細胞、ウサギやサルの骨格筋、ヒトの血管上皮細胞、平滑筋、ラットの滑膜細胞、眼球網膜、角膜、脳実質の神経細胞および脳室上衣細胞等への遺伝子導入と発現が認められ、組換えセンダイウイルスベクターは分裂、非分裂性いずれの細胞にも高い遺伝子導入、発現能を持ち、広い組織適応範囲を持つ優秀なベクターであることが示された¹⁾。なお、生体組織ではベクター投与2~4日目に外来遺伝子の発現量が最大となり、数週間までの発現となる。この原因の一つには、ベクターに対する免疫反応が惹起されるためということが挙げられる。現在、より持続もしくは反復投与可能なベクターの開発が行なわれていると同時に、本ベクターによる治療用遺伝子の一過的な高発現により治療が期待される疾患や、一部のがん治療への適応のように、免疫反応が治療に効果的な疾患への応用が図られている。

4. センダイウイルスベクターのバイオ分野での応用

センダイウイルスベクターは外来遺伝子を搭載し、試験管内、動物個体レベルでの高い遺伝子導入能と発現能を示

すため、各種バイオ分野での応用が可能である。例として、組換えタンパク質の調製によるタンパク質の構造、機能の解析、各種培養細胞を用いたの遺伝子導入実験、機能未知遺伝子の動物モデルを用いたの機能解析、動物への組換えベクター投与による抗体の調製等がある。本ベクターを使用する利点としては、高発現量に加え、哺乳動物細胞を宿主として本来の構造、修飾を有する活性のあるタンパク質が発現、調製できるということがある。また、抗体の調製においては、組換えベクターにより抗原タンパク質を動物個体で直接発現させるため、免疫のための抗原タンパク質やペプチドの準備が不要となる。ヒトをはじめとして多くの生物でゲノム配列が決定されたポストゲノムシーケンス時代となった現在、多くの機能未知の遺伝子や疾患に関連する一塩基多型変異(SNPs)の存在が明らかとなってきたが、本ベクターは、基礎研究での新たな解析ツールの提供をはじめとして、ゲノム創薬、抗体医薬、遺伝子医療などの医療分野での応用開発をさらに加速することが期待される。

5. センダイウイルスベクターの医療分野での応用

センダイウイルスベクターの医療分野での応用においては、遺伝子治療用ベクター、ワクチンベクターとしての開発が進められている。以下、その例を紹介するが、開発が最も進んでいる重症虚血肢遺伝子治療では、現在既に臨床研究が開始されており、ヒトでの安全性、有効性の確認が行なわれている。その他の疾患では動物モデルでの治療効果という有効性の面からの検討が行なわれている。

5.1. 遺伝子治療用ベクター

5.1.1. 循環器疾患(重症虚血肢)に対する遺伝子治療

慢性動脈硬化症や糖尿病による下肢の血行障害は激しい疼痛、歩行困難、下肢壊死をもたらし、やがて下肢切断を余儀なくさせ、その予後も多くの場合不良である。特に重症虚血肢と呼ばれる重度の症状においては、有効な治療方法がないため、血行の再開を目的とした遺伝子治療に期待が集まっている。塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF/FGF-2)遺伝子搭載ベクターはマウス、ウサギでの虚血肢モデルに有効性が示唆された。また、FGF-2が投与局部において、他の血管新生因子を誘導して真に機能的な血管の新生を促すものであることが判明した^{18,23,24)}。安全性試験においては、マウスを用いた炎症性サイトカイン誘導に関する検討やカニクイサルを用いた急性毒性試験も実施されたが、ベクターの過剰量の投与によっても特筆すべき副作用は見いだされなかった。これらの知見に基づいて、九州大学病院ではF欠失型組換えセンダイウイルスベクターを用いた慢性重症虚血肢(閉塞性動脈硬化症、バージャー病)を対象疾患とした臨床研究を計画し、2006年1月、厚生労働大臣より実施許可があり、7月より安全性と臨床効果を示

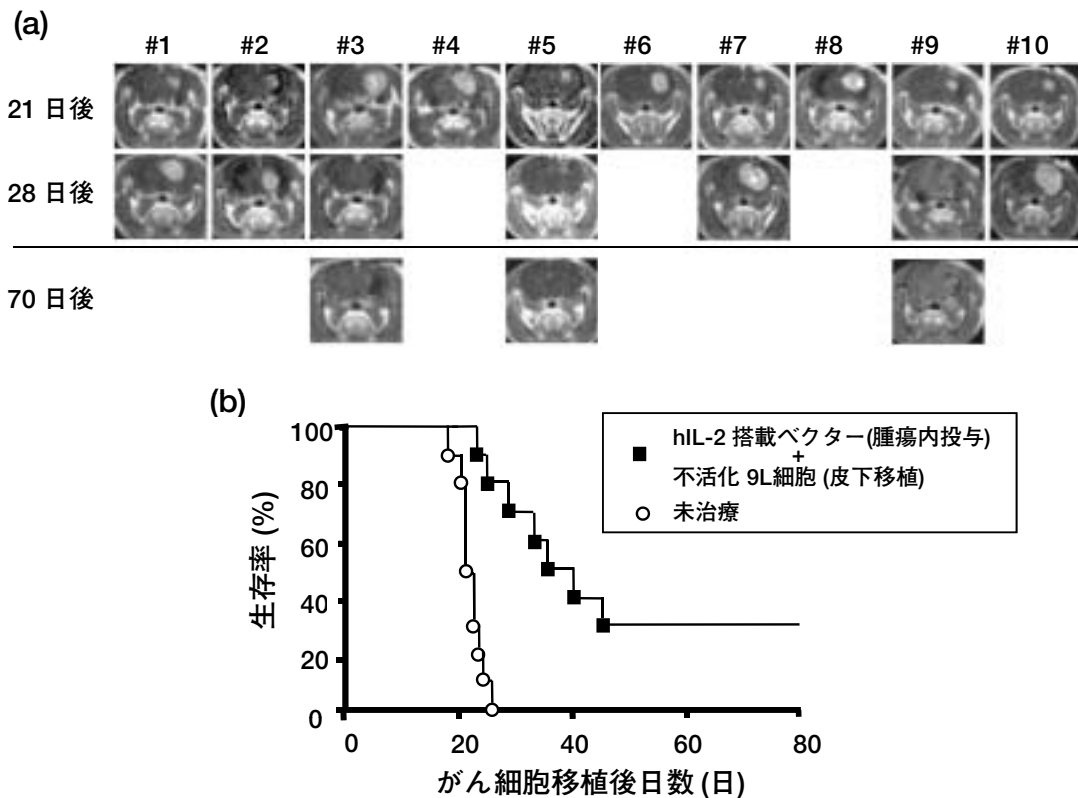


図3 ラット脳腫瘍モデルにおける IL-2 搭載センダイウイルスベクターの治療効果

(a) 神経膠肉腫細胞株 9L を脳に移植後、IL-2 搭載センダイウイルスベクター投与と不活化がん細胞を移植したラット脳の MRI 画像。投与 28 日後に 3 例で腫瘍の完全な消失が認められる。(b) モデルの生存曲線。IL-2 搭載センダイウイルスベクター投与と不活化がん細胞を移植した群で有意に高い生存率を示した。(文献 10) を改変)

すと考えられる投与量の決定を目的とした臨床研究が開始されている。国産技術による世界で初めてのセンダイウイルスベクターによる遺伝子治療が現在実施中である。なお、ベクターは国際的な Good Manufacturing Practice (GMP) に準拠して製造されており、その純度等が保証されているものが用いられている。

5.1.2. がん（脳腫瘍）に対する遺伝子治療

神経膠肉腫（グリオブラストーマ）は悪性脳腫瘍で最も頻繁に生ずる疾患であり、外科手術、放射線治療、化学療法の治療においても治癒困難で、新たな治療法が求められている。ラットの神経膠肉腫モデルは 9L 細胞を脳に移植後 4 週以内に 100% 死亡に至るモデルであるが、インターロイキン 2 (IL-2) 遺伝子搭載 F-M 欠失型センダイウイルスベクターの腫瘍内投与と放射線不活化した 9L 細胞の皮下移植（ワクチン）の併用により、がんの退縮と生存期間の延長が認められ、10 例中 3 例でがんの完全な消失が認められた (図 3)¹⁰⁾。

5.1.3. がん（メラノーマ：悪性黒色腫）に対する免疫療法

センダイウイルスベクターは樹状細胞への高い遺伝子導入能と、未熟樹状細胞の活性化が示され、本ベクターを用いての樹状細胞によるがん免疫治療の応用が図られている。マウスメラノーマモデル (B16F1 細胞移植系) において、インターフェロン β 遺伝子搭載センダイウイルスベクター導入樹状細胞をがん領域へ直接投与することにより、がんの退縮と生存期間の延長といった有効性が認められた (図 4)²⁶⁾。また、より悪性化した B16F10 移植モデル系においても同様の結果が得られている。治療用遺伝子を搭載していないセンダイウイルスベクターで活性化した樹状細胞を用いても抗腫瘍効果が示され、センダイウイルスを細胞治療と組み合わせるのががん治療への展開も考えられている。

5.2. ワクチンベクター

センダイウイルスの感染においては粘液の影響を受けにくく、気道や鼻腔上皮への感染が容易である。この性質を利用すれば、経鼻投与という簡便な方法によりセンダイウイルスベクターを組換えワクチンベクターとして抗原遺伝子の発現に応用できる可能性がある。その際には、抗原が鼻腔内で高発現することが期待でき、結果として、粘膜免

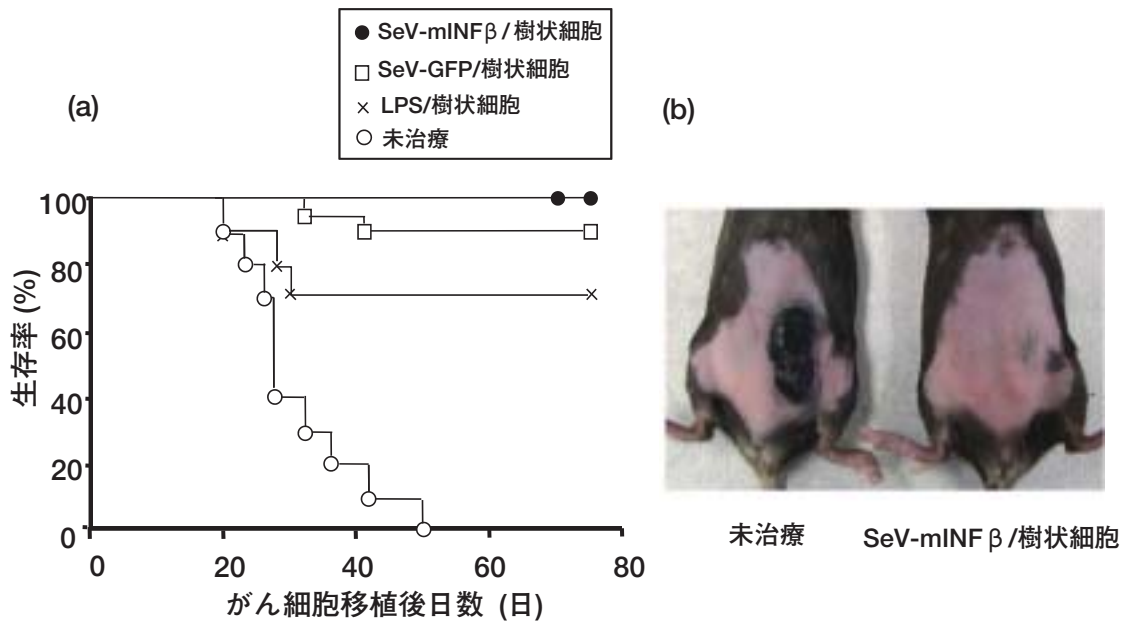


図4 マウスメラノーマモデルにおけるセンダイウイルスベクター導入樹状細胞投与による治療効果

(a) 各モデルにおける生存曲線。インターフェロン β 搭載もしくはレポーター遺伝子搭載センダイウイルスベクターを導入した樹状細胞を腫瘍内に投与した群で有意に高い生存率を示した。なお、樹状細胞はいずれもがん細胞溶解液で前処理を行っている。細菌のリポ多糖(LPS)は強い樹状細胞成熟能を持つことが知られている。(b) インターフェロン β 搭載センダイウイルスベクターを導入した樹状細胞を投与後26日目の治療効果例。移植B16F1メラノーマの完全な退縮が認められる。(文献25)を改変)

疫、細胞性免疫、液性免疫が誘導され、ワクチン効果が発揮されることになる。現在その有効性に関し動物モデルでの検討が行なわれている。なお、安全性の検討に関しては、米国では野生型のセンダイウイルスをヒトパラインフルエンザ1型に対するワクチンとして成人の健常人に経鼻接種された例があるが、その際には特に深刻な副作用は生じていない²⁶⁾。

5.2.1. HIV ワクチン

感染症であるエイズはヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染による免疫不全を主要因とする致死的な疾患で、治療薬開発が進められている。センダイウイルスベクターによるHIVワクチンの開発研究においては、アカゲサルによるサル免疫不全ウイルス(SIV)感染モデルでの細胞傷害性Tリンパ球誘導によるワクチン効果の検討が行なわれている。本検討においては、SIVの構成タンパク質であるgag遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターがDNAワクチン初回免疫後の追加免疫として有効であることがキメラSIV(SHIV89.6PD)急性感染モデルやSIVmac239感染モデルで示されている^{19,29)}。

5.2.2. アルツハイマー病ワクチン

神経系疾患であるアルツハイマー病は認知機能の低下、

人格の変化を主症状とする痴呆性疾患の一種であり、老年期における痴呆の病因のうちで最も多い疾患である。脳の神経細胞の変性、脱落および脳の萎縮を生じる本疾患の原因に関する仮説として、大脳でのアミロイド β と呼ばれるタンパク質の凝集、沈着による老人斑の形成による「アミロイドカスケード仮説」が有力である。これまでもアミロイド β ペプチドとアジュバンドをワクチンとして投与し、抗体産生を誘導することによるアミロイド β の集積を消失させる試みが海外の製薬企業の臨床試験により実施されたが、ある程度の有効性は示唆されたものの、6%の患者に髄膜脳炎の副作用が生じ、中止となった経緯がある。センダイウイルスベクターによるアルツハイマー病ワクチンの開発研究においては、変異型アミロイド前駆体タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを用いたモデルにおいて、アミロイド β ペプチド遺伝子をはじめとする組換えセンダイウイルスベクターでの経鼻投与による治療効果の検討が進んでいる²⁸⁾。

おわりに

遺伝子治療薬、遺伝子ワクチン等の遺伝子医薬品は、今世紀における新たな医薬品として、その実現が大いに期待されている。センダイウイルスはベクター開発を経て、現在各種対象疾患に対する動物モデルでの前臨床試験、ヒト

での臨床試験が進展しており、臨床応用のためのベクターとしての性能が試される段階にある²¹⁾。本ベクターは「細胞質型 RNA ベクター」という従来とは異なる概念のベクターであり、今後既存の方法では治療困難な様々な疾患に対し、有効に、安全に用いられ、"Unmet medical needs"を満たすベクターとして、これからの医療に大いに役立つことを期待したい。ただし、今後さらに広く本ベクターを医療分野に応用するためには、他のウイルスベクターと同様、ベクターの免疫原性の軽減や特異性の付与といった改良研究も重要な課題である。現在も、F, HN, M の3 遺伝子を欠失したベクターの作出³²⁾や、M 遺伝子欠失と F 遺伝子改変の組み合わせによる腫瘍崩壊性ベクターの作出³³⁾が行なわれ、その性能が検討されている。今後のベクターの改良に際しても、これまで日本の研究者をはじめとする多くの研究者により蓄積され、また、これから新たに解明されるであろうセンダイウイルスやパラミクソウイルスに関するウイルス学における基礎的な知見が大いに貢献するものと考えている。

謝 辞

本総説に紹介した研究は、これまでの多くの共同研究者によるものであり、研究に携わった皆様と、原著論文からの図の転載を快諾していただきました、千葉大学医学部の岩立康男先生ならびに千葉大学大学院医学研究院の米満吉和先生に心より感謝致します。

引用論文

- Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, Neubert WJ.: Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* 5: 543-553, 2003.
- Conzelmann, K.-K.: Nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Annu. Rev. Genet.* 32, 123-162, 1998.
- Garcin D, Pelet T, Calain P, Roux L, Curran J, Kolakofsky D.: A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J.* 14, 6087-94, 1995.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M.: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419, 2003
- Harris, H., Watkins, J.F.: Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 205, 640-646, 1965.
- Hirata T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kitazato K, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M.: An improved method for recovery of F-defective Sendai virus expressing foreign genes from cloned cDNA. *J. Virol. Methods.* 104,125-133, 2002.
- Homann HE, Hofschneider PH, Neubert WJ.: Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* 177, 131-140, 1990.
- 飯田章博, 長谷川護: センダイウイルスのリバースジェネティクスを活用した新規遺伝子治療用 RNA ベクター. *蛋白質 核酸 酵素* 48, 1371-1377, 2003.
- Ishida, N., Homma M.: Sendai virus. *Adv. Virus Res.* 23, 349-383, 1978
- Iwadate Y, Inoue M, Saegusa T, Tokusumi Y, Kinoh H, Hasegawa M, Tagawa M, Yamaura A, Shimada H.: Recombinant Sendai virus vector induces complete remission of established brain tumors through efficient interleukin-2 gene transfer in vaccinated rats. *Clin. Cancer Res.* 11, 3821-3827, 2005.
- Kato K, Nakanishi M, Kaneda Y, Uchida T, Okada Y.: Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. Co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method. *J. Biol. Chem.* 266, 3361-3364, 1991.
- Kato A, Sakai Y, Shioda T, Kondo T, Nakanishi M, Nagai Y: Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* 1, 569-579, 1996.
- Kinoh H, Inoue M, Washizawa K, Yamamoto T, Fujikawa S, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M.: Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases. *Gene Ther.* 11, 1137-45, 2004.
- Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L.: Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72, 891-899, 1998.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D.: *Paramyxoviridae: the viruses and their replication.* Fields virology fourth edition, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1305-1340, 2001.
- Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M.: A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J. Virol.* 74, 6564-6569, 2000.
- Marshall, E.: Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244-2245, 1999.
- Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K.: Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ. Res.* 90, 966-973, 2002.
- Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI,

- Nagai Y.: Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a pre-clinical AIDS vaccine trial. *J. Exp. Med.* 199, 1709-18, 2004.
- 20) Nagai, Y., Kato, A.: Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol. Immunol.* 43, 613-624, 1999.
- 21) 永井美之, 加藤篤, 井上誠: センダイウイルス工学の展開. *蛋白質核酸酵素* 51, 27-37, 2006.
- 22) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K.: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ. Res.* 91, 923-30, 2002.
- 23) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu SI, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y.: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther.* 12, 203-210, 2005.
- 24) Shoji T, Yonemitsu Y, Komori K, Tanii M, Itoh H, Sata S, Shimokawa H, Hasegawa M, Sueishi K, Maehara Y.: Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates endothelial dysfunction and inhibits intimal hyperplasia of vein grafts in poor-runoff limbs of rabbit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H173-82, 2003
- 25) Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, Onimaru M, Sata S, Nagata-Takeshita H, Inoue M, Zhu T, Hasegawa M, Moroi Y, Furue M, Sueishi K.: Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant Sendai virus and its modulation by exogenous IFN-beta gene. *J. Immunol.* 177, 3564-3576, 2006.
- 26) Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, Allison K, Brown B, Scroggs RA, Portner A, Coleclough C, Hurwitz JL.: Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine* 22, 3182-3186, 2004.
- 27) Surani, M.A., Barton, S.C.: Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222, 1034-1036, 1983.
- 28) 田平武: 治療戦略-免疫療法を中心として-. *最新医学* 61, 80-85, 2006.
- 29) Takeda A, Igarashi H, Nakamura H, Kano M, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T.: Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA priming followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector, in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 77, 9710-9715, 2003.
- 30) Tokusumi T, Iida A, Hirata T, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M.: Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res.* 86, 33-38, 2002.
- 31) Verma, I., Weitzman, M.: Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 711-738, 2005.
- 32) Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, Inoue M. Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J. Gene Med.* 8, 1151-1159, 2006.

Sendai virus vector: vector development and its application to health care and biotechnology.

Akihiro IIDA

DNAVEC Corporation, 1-25-11 Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-0856, Japan
E-mail: iida@dnavec-corp.com

Sendai virus (SeV) is an enveloped virus with a nonsegmented negative-strand RNA genome and a member of the paramyxovirus family. We have developed SeV vector which has shown a high efficiency of gene transfer and expression of foreign genes to a wide range of dividing and non-dividing mammalian cells and tissues. One of the characteristics of the vector is that the genome is located exclusively in the cytoplasm of infected cells and does not go through a DNA phase; thus there is no concern about unwanted integration of foreign sequences into chromosomal DNA. Therefore, this new class of "cytoplasmic RNA vector", an RNA vector with cytoplasmic expression, is expected to be a safer and more efficient viral vector than existing vectors for application to human therapy in various fields including gene therapy and vaccination. In this review, I describe development of Sendai virus vector, its application in the field of biotechnology and clinical application aiming to treat for a large number of diseases including cancer, cardiovascular disease, infectious diseases and neurologic disorders.