

3. アデノウイルスベクターの遺伝子工学

近藤 小貴, 寺島 美保, 福田 尋充, 斎藤 泉, 鐘ヶ江 裕美

東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設

アデノウイルスベクターは高い遺伝子導入効率, 簡便な濃縮法による高濃度ベクター調製が容易であること, 神経など静止期の細胞への遺伝子導入が可能であること等ベクターとして極めて優れた性質を有しており, 遺伝子治療や基礎研究など広範な研究に有用性を発揮している. またベクター作製法の改良には多くの日本人研究者が関与しており, 日本の研究者が最もこのベクターを活用しているとも言える. ベクター作製法は近年著しい進歩を示しており, 免疫原性や遺伝子導入可能な細胞種の拡大などこれまでのベクターの問題点を解決した多くのベクターも開発されている. 本稿では, 主に応用されている E1 置換型アデノウイルスベクター (第1世代ベクター) の最新の作製法とともに他のウイルスベクター作製法にも応用が可能な遺伝子置換反応(RMCE)を用いたベクター作製法も紹介し, これまでの「アデノウイルスベクターの作製は煩雑である」という誤解を払拭できればと考えている. またウイルスベクター作製法の開発にはウイルス固有の性質が反映しており, 最近応用され始めている完全長ウイルスゲノム導入法でのベクター生成機序についても解析を加えた. 更にはアデノウイルスベクターが一過性の発現ベクターである性質を活かしたスイッチベクターとしての当該ベクターの有用性についても言及する.

はじめに

アデノウイルスは約 36kb の二本鎖 DNA をウイルスゲノムとして持つ, 非エンベロープタイプのウイルスである³⁷⁾. 主に小児の風邪や腸管あるいは結膜炎の原因ウイルスとして知られている. 分子生物学的な研究の創始期には, アデノウイルス研究を通してスプライシング等の重要な発見が非常に多く発信されていたが, アデノウイルスそのものによる人に対する発ガン性が確認されなかったこともあり, 1980年代頃からウイルス自体の研究はあまり盛んとは言えない状況が続いていた. しかし 1993年に Nature Genetics で発表されたアデノウイルスベクターによる神経, 特に脳への *in vivo* での遺伝子導入の報告以降, 非分裂細胞を含

む多くの細胞への高効率なベクターとして特に遺伝子治療の分野で注目されている^{1,4,7,12)}.

主にベクターとして応用されているのは, 小児の風邪の原因ウイルスの一つであるアデノウイルス 2 型あるいは 5 型である. これらのウイルスはアデノウイルスの中でも際立った増殖性を示し, 最も良く用いられる 293 細胞では 10^9 plaque forming units (PFU) /ml レベルのウイルスの調製が可能である. また比較的ウイルス精製過程での力価の減少が少ないため, 我々の開発した二段階の塩化セシウム段差勾配遠心法などにより濃縮も可能であることから, *in vivo* への直接投与が可能なベクターとして遺伝子治療のみならず多くの基礎的な分野で応用されている¹⁵⁾.

しかしアデノウイルスベクター開発当初の実情は, ベクター作製法が非常に困難で世界的にも数グループしか作製ができず, 汎用されていたとは言えなかった. これは, 多くの他のベクターがウイルスゲノムの多くの領域を取り除いてプラスミドや細胞株でそれらをトランスに供給することでベクター作製が可能であるのと比べ, アデノウイルスはゲノム上に近接あるいは重複して多くの必須ウイルス蛋白質がコードされているというゲノムの構造上の複雑さに加え, これらの蛋白質の細胞毒性などの問題からトランス

連絡先

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
 東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設
 TEL : 03-5449-5556
 FAX : 03-5449-5432
 E-mail : kanegae@ims.u-tokyo.ac.jp

での供給が難しかったこと等に依っている。従って、目的遺伝子の挿入領域は293細胞からトランスに供給することが可能なE1領域あるいは培養細胞での増殖にはかならずしも必須でないことが知られているE3領域に限定されていた。またウイルス粒子へのパッケージングサイズとして最小限必要な約30kb以上のDNAを取り扱うためには高度な技術が必要であり、これもアデノウイルスベクターの汎用を妨げている一つの要因であった。これらの問題を解決し、効率的にベクターを作製する方法を開発するためには、ウイルスそのものの特徴を理解して応用する必要がある。我々はウイルスの研究を通してアデノウイルスベクターの作製法の開発を進めており、またベクター作製法を通してウイルスの研究を行っている。本稿では、一般的に用いられているアデノウイルスベクターの特徴と作製法の現状について述べるとともに、全く新しい作製法についても言及する。

アデノウイルスベクターの特徴

アデノウイルスベクターの特徴の多くは、アデノウイルスの特徴に起因している。アデノウイルス2型あるいは5型の感染は細胞表面のcoxackie-adenovirus receptor (CAR) にウイルスの蛋白質の殻(カプシド)から飛び出しているファイバーの先端のノブが吸着することにより始まり、細胞表面のインテグリンとファイバーの根本のペントンベースが結合して細胞内に侵入する。その後ライソゾームを酸性化してライソゾームから脱出し、ウイルスゲノムは核内に至り、ゲノムの複製が始まる。アデノウイルスは他のDNAウイルスと比較してウイルスゲノムの核内への移行効率が高く、その結果ベクターとしても遺伝子導入効率が高いと考えられている^{5,11)}。

ウイルス複製は、まずE1A蛋白質が発現し、他の全ての初期蛋白質であるE1B, E2, E3とE4の発現をトランスアクティベートすることにより始まる³⁷⁾。一般的に用いられているE1置換型ベクター(第1世代ベクター)はこのE1Aが欠失しているため、E1蛋白質が恒常的に発現している293細胞では野生型とほぼ同程度の複製が可能であるが、それ以外の細胞ではベクターゲノムを先の侵入方法に則って効率よく核内に移行するものの、それ以降の全てのウイルス由来の蛋白質の発現が起きないためウイルスとして複製することがない。そのため、同じく一過性の発現ベクターではあるが目的遺伝子の発現にウイルス複製を必要とするセンダイウイルスベクターとは異なり、非増殖型に分類されており遺伝子導入のためのツールとしては使いやすいベクターである。

しかし主に癌への遺伝子治療では、立体的に増殖する癌へのアプローチとしてアデノウイルスを腫瘍でのみ複製させて癌細胞を死滅させるという試みも行われている。今までも、p53欠損細胞でのみ増殖が可能なE1Bの変異ウイ

ルスやE1Aを癌細胞特異的プロモーターから発現させ癌細胞でのみ複製させる制限増殖型ベクターが開発されているものの、特に前者に関しては有用性が疑問視されている。今後の臨床知見の結果が待たれるところである^{6,30)}。

核内に導入されたウイルスゲノムの複製機構は非常にユニークである。E2から発現した末端蛋白質(TP)とデオキシシチジンが共有結合をし、更にポリメラーゼが結合した複合体が既存のゲノム末端に共有結合しているTPにガイドされゲノムの3'末端から3塩基上流のグアニンと水素結合して複製が始まる。その後ウイルスのポリメラーゼによってあたかもPCRの様に両鎖から複製する(図1)。ウイルスの構造蛋白質は細胞質で翻訳後核内に移行しウイルス粒子を構成し、ウイルスゲノムのパッケージングシグナル(ψ)を認識してゲノムをパッケージングする。最終的には成熟粒子は核内で結晶化し、細胞からの放出を待つというライフサイクルをたどる³⁷⁾。

アデノウイルス開発当初は、アデノウイルスの病原性との関連から気管支などへのベクターの投与が最適と思われていたが、実際にはベクターを尾静脈から*in vivo*で投与すると殆どのベクターが肝臓に集約されている^{8,24)}。また血球系の細胞よりも接着系の細胞の方が総じて遺伝子導入効率が高いという特徴もある。これらは、ウイルスレセプターが多い細胞にベクターが導入されやすいという特徴を反映している。比較的多くの細胞種に導入が可能であるとは言え、実際には遺伝子治療が期待されている多くの癌細胞ではアデノウイルスベクターのレセプター量が減少しているとの報告もあり、現在ではウイルスのファイバーに変異を加えたベクター等の開発も進んでいるが、ウイルス力価が低いなどの問題が残存している^{18,42)}。

またアデノウイルスは細胞の染色体への積極的なゲノムの組み込み機構を有していない。従ってレトロウイルスやレンチウイルスベクターが得意とする細胞での安定的な目的遺伝子の発現には不向きであり、一過性の発現ベクターである。イメージとしては100%の細胞へトランスフェクションが可能でベクターというものが近い。一般的なDNAのトランスフェクションは、遺伝子が導入された細胞とされていない細胞とが混在した状態での実験であり、また導入された細胞でもコピー数は大きく異なっている。しかしウイルスの感染を応用するアデノウイルスベクターでは、感染量の調節によりほぼ100%の細胞に均一にベクターを挿入することが可能であり、しかも一過性の発現に留まることから、特に目的遺伝子のスイッチベクターとしての有用性が高いと考えている^{14,16,27,28,32,39,41)}。

ベクター開発により明らかになった意外な面として、教科書的にはE1Aを欠失しているベクターではウイルスの複製、すなわちウイルス蛋白質の発現は殆ど無いと考えられていたにもかかわらず、アデノウイルスベクターが非常に高い免疫原性を有していた点があり、このベクターの最大

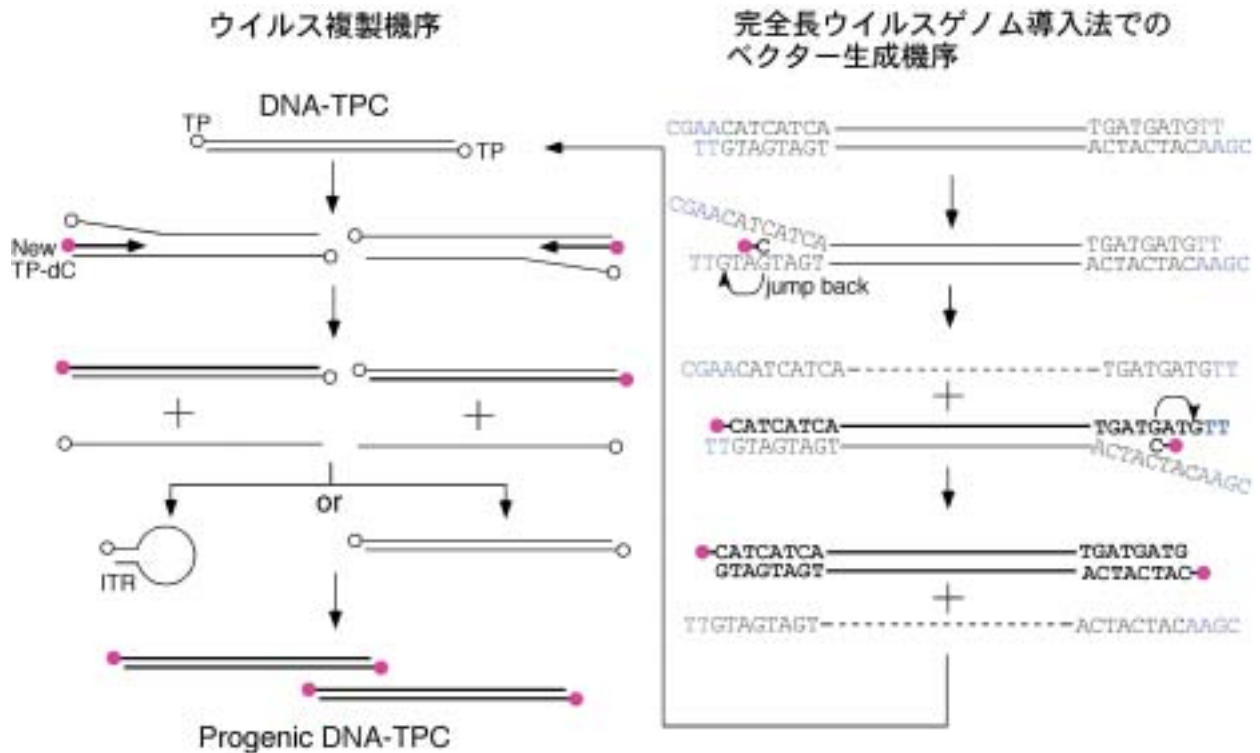


図1 アデノウイルスゲノムの複製と完全長ウイルスゲノム導入法によるベクター生成機序

アデノウイルスゲノムは二本鎖DNAであり、末端に末端蛋白質(TP)が共有結合したDNA複合体(DNA-TPC)を形成している。複製過程ではウイルスゲノムにコードされている新生末端蛋白質(pTP)とデオキシシチジンが共有結合し(TP-dC)ウイルスのポリメラーゼとともにDNA-TPCのTPにガイドされながら3'末端から3塩基目のグアニジンを認識し、その後3塩基合成してから、末端に戻る(jump back)というユニークな複製開始機構を持つ。両鎖のTPから始まった複製はゲノム末端まで終了すると、押し出されたもう一つの鎖が末端のITRの相同な配列で結合したパンハンドル構造をとるあるいは押し出された一本鎖同士が相補鎖を形成することで、先と同様の機構で複製を進行する。一方完全長ウイルスゲノム導入法ではTP-dCをガイドするTPがなく、末端には外来塩基(青い塩基)が存在しているため、末端が熱運動でゆらいで一本鎖状態が出来た分子のみをTP-dCがゲノム末端の複製開始点として認識し、複製を開始する。その操作を繰り返すことにより最終的に両末端とも本来のウイルスゲノムと同様の配列とTPを持ったものが生成し、本来のウイルスゲノムの複製機序に進行することが可能となると考えられる。

の問題点である。これまでもE2やE4蛋白質などがわずかにリーク発現しているという報告があり、これらの蛋白質の領域を欠失したベクターの開発も盛んに行われてきたが、現在ではこれらの蛋白質の関与は否定されている²³⁾。我々は目的遺伝子の挿入領域に近接して存在しているpIXに注目した。その結果、おそらく目的遺伝子を発現するために挿入した強力なCAGプロモーターからpIXがリーク発現している現象を突き止めた。このpIXの発現はEF1 α プロモーターにより減弱し、ベクターの免疫原性も減弱されることから、*in vivo*の投与にはEF1 α プロモーターを推奨している。

また究極のアデノウイルスベクターとしては、ヘルパーウイルス依存型ベクターがある。これはパッケージングシグナル(ψ)とウイルス複製起点であるゲノム末端の約100

塩基の逆向き末端配列(inverted terminal repeat: ITR)以外を全て外来遺伝子と置換したベクターである。ウイルス由来の蛋白質は全てヘルパーウイルスから供給し、作製後に塩化セシウム平衡遠心により単離する。このベクターは約30kbの外来遺伝子の挿入が可能であり、ウイルスに対する免疫原性も最小限に担保され、しかも理論的にはヘルパーウイルスの改変により種々のファイバーを有するベクターの調製も可能である。作製段階でヘルパーウイルスの混在を如何に最小限に留めるかと言う問題に関しては、現在は部位特異的組換え酵素Creの標的配列loxPを ψ の両側に配したヘルパーウイルスとCre発現293細胞を応用する方法が用いられている^{31, 36)}。Creに関しては細胞で高度に発現することが不可能であるとの報告もあり、Cre発現293細胞の組換え効率が充分ではないためか、臨床応

・ 発現単位挿入用

promoter-less: pAxcwit2

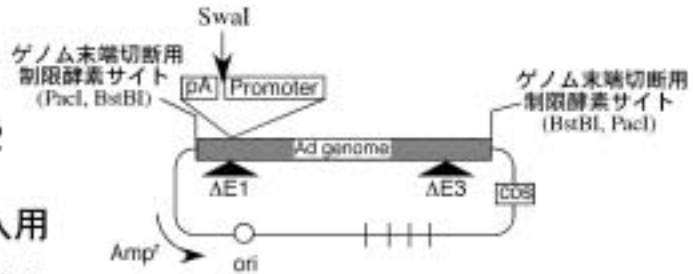
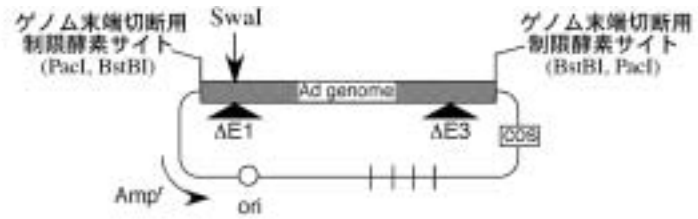
・ cDNA挿入用

CAG promoter: pAxCAwit2

EF1 α promoter: pAxEFwit2

・ ベクター作製困難なcDNA挿入用

Cre inducible: pAxCALNLwit2



カセット入手先：理化学研究所バイオリソース (<http://www.brc.riken.jp/lab/dna>)
 タカラバイオ社 (<http://bio.takara.co.jp>) DNA-TPC, Cre発現ウイルス
 ニッポンジーン社 (<http://nippongene.com>) 切断済みカセット

図2 コスミドカセットの概略と入手先

COS-TPC法にも完全長ウイルスゲノム導入法にも応用可能なコスミドカセットの種類と入手先

用レベルのベクター生成にはまだ技術開発が必要である^{2, 22, 33, 40}。

アデノウイルスベクター作製法

E1置換型ベクターの作製法として我々が開発したCOS-TPC法は、ウイルス複製に必須である末端蛋白質付きのウイルスゲノムを応用した方法であり、我々の検討では現在最も効率よくベクターを作製する方法である^{10, 25}。目的遺伝子を挿入したコスミドと末端蛋白質付きウイルスゲノムを293細胞に導入して相同組換えによりウイルスを作製する方法であるが、末端蛋白質付きゲノム(DNA-TPC)を予め7ヶ所切断しておくことがポイントである。この切断数が少ないと野生型ウイルスのみが複製してしまい、目的ベクターの生成効率が極めて減少する。現在ではタカラバイオ社より調製済みDNA-TPCが販売されており、調製の必要はない。この方法では相同組換えにより生成した目的ベクターはTPを有しているため、先の項で記載した通常のウイルス複製へと速やかに移行することが可能であり、高いベクター作製効率を示す要因の一つである(図1)。

しかし、現在トランスフェクション試薬などの進歩によりそれほど高いベクター生成効率がなくてもアデノウイルスベクターの作製が可能になってきた。そこで作製法の簡

便さから、完全長アデノウイルスゲノム導入法(in vitroライゲーション法)が注目されている^{9, 26}。アデノウイルス複製機構の研究の中で、主にin vitro法での解析からアデノウイルスの複製基点はゲノム末端にあること、このゲノム末端が露出された状態であるか一本鎖の状態であった場合に初めて末端タンパク複合体がエンターできることが知られていた。完全長ウイルスゲノム導入法では、目的遺伝子を挿入した完全長ウイルスゲノムを含むコスミドなどを先ず作製し、ウイルスゲノムの両末端に挿入した制限酵素切断によりゲノム末端を露出させてから293細胞に導入しベクター作製を行う。ゲノム末端を露出しなかった場合にはベクター生成は殆ど起きない。また導入されたゲノム末端にはTPが存在しないため、末端タンパク複合体の認識効率が極めて低く、COS-TPC法と比較するとベクター生成効率は約1/10に低下する。しかし、コスミドさえ作製すれば生成したベクターは殆どが目的ベクターであるため、作製法は簡略化が可能である。

一方でアデノウイルスゲノム上には市販されている殆どの制限酵素サイトが存在するため、この末端切断のために応用可能な制限酵素は4種類しか存在しないこと、ゲノム末端切断後に残存する制限酵素由来の外來塩基がベクター生成効率やベクターの構造にどのような影響を与えるかにつ

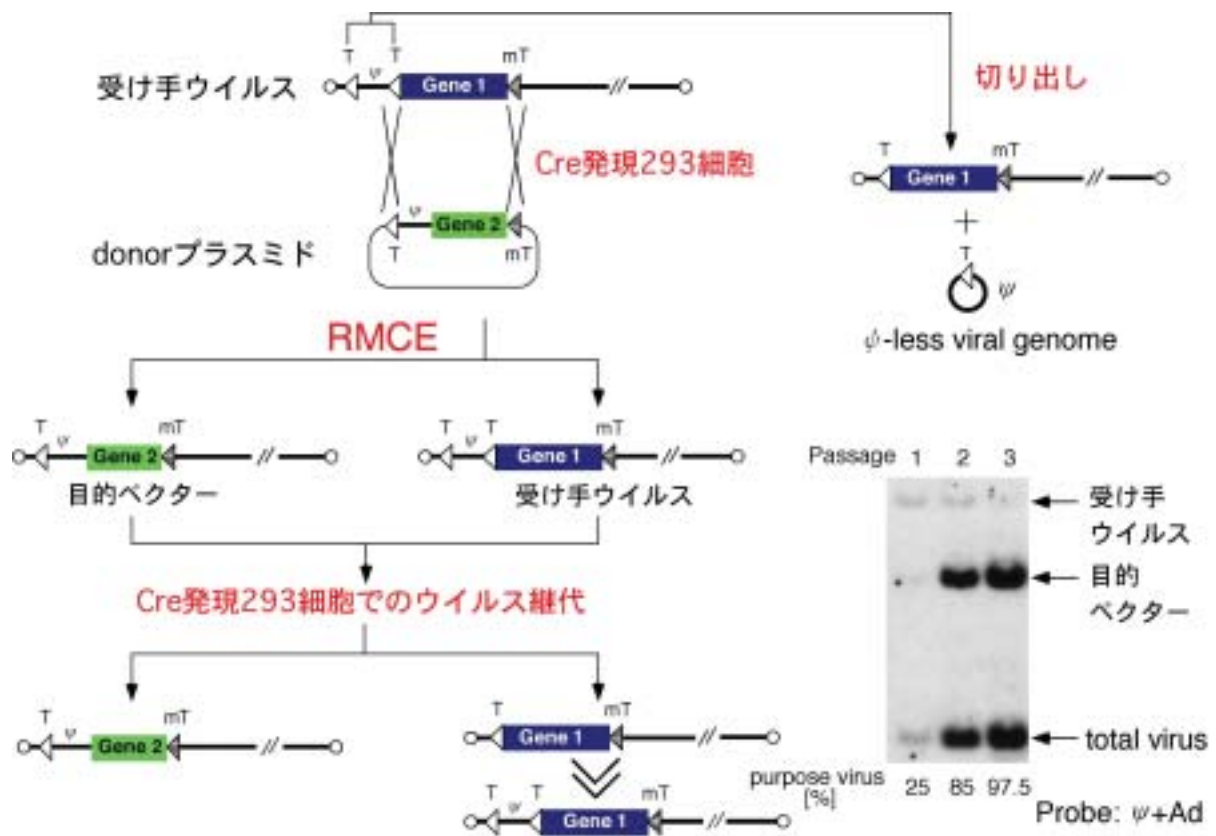


図3 遺伝子置換反応 (RMCE) によるベクター作製法

受け手ウイルスと donor プラスミドを Cre 発現 293 細胞に導入し、RMCE 反応を行うと、目的ベクターが生成する。受け手ウイルスの多くは Cre による切り出し反応の結果 ψ を失うためウイルス粒子にパッケージングされないよう工夫をしている。その結果 Cre 発現細胞での 3 回のウイルス継代により 98% が目的のベクターであった。

T : 本来の標的配列 mT : 変異型標的配列

いての詳細な解析が無かったこと等の理由から、ゲノム末端切断用に一つの制限酵素サイトを挿入したカセットしか存在せず、目的遺伝子の中にその制限酵素サイトが存在した場合には調製が煩雑であった。我々は挿入可能な 4 種類全ての制限酵素サイトを持つコスミドを構築しベクター生成効率及び生成したベクターのゲノム末端構造の解析を行った。その結果、挿入する外来塩基数が多いほどベクター生成効率は低下する傾向を示すものの、24 塩基挿入しても 50% 以上の効率を保っていること、ベクター生成の過程で末端の外来塩基は除去され野生型と同じ構造を有していることとその機序を明らかにした (図 1)。従って、本法を用いて作製したベクターを遺伝子治療に応用する場合にも、ベクター構造に関しては従来のもと同じであると結論づけられ、安全性の担保が図られたものと考えている⁹⁾。

これらの結果を受け、これまでのコスミドカセットを改変し、COS-TPC 法にも完全長ウイルスゲノム導入法にも応用可能なデュアルコスミドカセットを作製し、既にタカラバイオ社、ニッポンジーン社がキット化して販売している。コスミドの取り扱いに慣れていない方には、ニッポンジーン

社の切断済みカセットをお奨めしている。また全てのコスミドカセットは理化学研究所バイオリソースセンターに寄託している (図 2)。

新しいベクター作製

これまで述べた様に、大きなゲノムを持つウイルスのベクターへの応用には煩雑な操作を伴っている。我々はアデノウイルスベクターのみならず他の DNA ウイルスベクターの作製への応用も可能な方法として、部位特異的組換え酵素の二分子間の遺伝子置換反応 (recombinase-mediated cassette exchange: RMCE) を応用した全く新しいベクター作製法を開発した²⁹⁾。この方法には部位特異的組換え酵素により組換えを起こすものの本来の標的配列とは組換えを起こさない変異型標的配列を用いる。まず Cre の標的配列 loxP に関して変異型標的配列の検索を行い、精度、効率いずれにおいても優れている loxP2272 (V) を同定した²¹⁾。この方法の最大の特徴は、複製しているウイルスゲノム上で任意のウイルスゲノム領域と目的遺伝子を置換することであり、置換しなかったウイルスゲノムはパッケージング

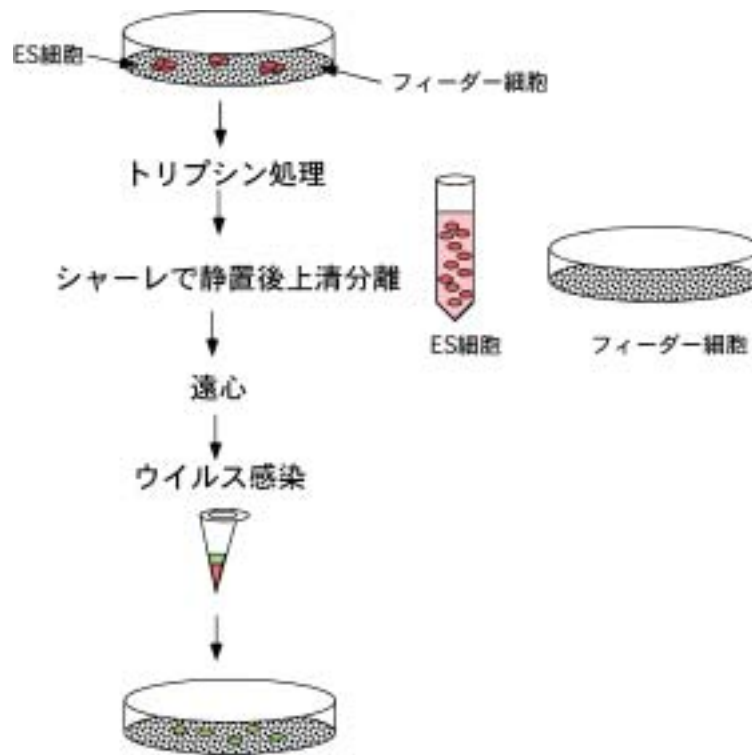


図4 ES細胞への高効率なベクター導入法

マウス ES 細胞はフィーダー細胞上で細胞塊として培養されているため、まずトリプシン処理によりフィーダー細胞から取り外すとともに細胞をバラバラにして、その後シャーレ上に静置することでフィーダー細胞を出来るだけ除去した後 ES 細胞にベクターを導入する。その後新たなフィーダー細胞上に ES 細胞を戻し培養を続ける。

シグナル (ψ) を失う等の工夫で混入を最小限に留めている。アデノウイルスベクターの場合には、受け手ウイルスの ψ の両側に loxP を挿入し、その下流に任意のマーカー遺伝子と V が挿入されている。この受け手ウイルスは一度作製すれば全てのアデノウイルスベクター作製に応用が可能である。目的遺伝子は loxP と ψ 、クロニングサイト及び V を有する donor プラスミドに挿入する。従って、これまで作製が困難であったコスミド操作は必要ない。受け手ウイルスとともに donor プラスミドを Cre 発現 293 細胞に導入し、目的ウイルスを生成する。その後 Cre 発現 293 細胞でわずか 3 回継代するだけで 90% 以上の目的ベクターが濃縮されることから、本法の効率は極めて高いと考えている (図 3)。この方法は既に Nakano らによって報告したが、現在行っている解析から、出芽酵母由来の部位特異的組換え酵素 FLP は組換え効率は Cre よりも劣るものの細胞への毒性が低いことが判明した。そのため FLP 発現効率の高い細胞株の樹立化が可能であり、3 回の継代でほぼ 100% まで目的ベクターの濃縮が可能であった。現在詳細を検討しているが、FLP による方法が確立すれば最終的にベクター単離は殆ど必要がなくなるとも考えられ、有用性が極めて高い方法であると言える。

アデノウイルスベクターの今後

我々はアデノウイルスベクターの本来の長所である一過性の高度発現ベクターという観点から活用範囲を広げている。また当該ベクターでは目的遺伝子を発現するプロモーターを任意で選択できるという利点も大きいと考える。当然のことながら、目的遺伝子の特異的発現を目指した細胞特異的プロモーターとの組み合わせが考えられるが、多くの細胞特異的プロモーターは活性が低く、汎用されているプロモーターの数百分の一しかない。そこで我々は Cre との組み合わせにより、細胞特異的プロモーターから Cre を発現するスイッチベクターと強力なプロモーターからの目的遺伝子の発現が Cre により OFF から ON へと誘導される標的ベクターを応用した二重発現法を開発した^{34, 35}。この様に目的遺伝子のスイッチとしてアデノウイルスを応用するという試みを発展し、Cre や FLP の標的配列が挿入されている細胞株に Cre あるいは FLP 発現組換えアデノウイルスを感染し、任意の時期に任意の細胞での連続的な目的遺伝子の発現制御が可能なシステムも開発している^{19, 20}。これらの技術はコンディショナルノックアウトマウスで問題であった残存する薬剤耐性遺伝子のプロモーターの影響

を除くための技術として応用されている。すなわち ES 細胞選定後コンディショナルノックアウトマウス作出前に薬剤耐性遺伝子発現単位を FLP 発現組換えアデノウイルスで除去する方法である。マウスの作出への影響を最小限にするため、ES 細胞への高効率のベクター導入法も開発したので、是非参考にして頂きたい (図 4)。

また部位特異的組換え酵素による発現制御に留まらず、例えばシグナル伝達に関与する遺伝子を導入する方法として再生・発生等の分野でも応用が可能である。筆者らの行った四肢の発生への NF- κ -B の関与を同定するために、I- κ -B の dominant negative 発現組換えアデノウイルスを用いた例や、高酸素状態による肺障害モデルへの Keratinocyte growth factor (KGF) の導入など、一過性に特定の遺伝子を活性化することにより再生や発生の方向へとスイッチをしたい場合には有用性が高いベクターである^{3, 13, 17)}。現在は RNA 干渉へのアデノウイルスベクターの有用性を高めるための研究なども行っている。

おわりに

先のシンポジウムでは遺伝子治療におけるアデノウイルスベクターの現状という題名を頂いたが、我々は他の著者の先生方とは異なり、ベクター開発に特化して研究を進めており、この稿でも主にベクター開発がこれまでのウイルス研究に立脚して行われていることを中心に述べた。これからはむしろベクター開発を通じて本来のウイルスの生態に迫っていきけるような研究を行っていきたいと考えている。

謝 辞

本稿をまとめるにあたって、高田由紀さん、斐嶺さん、藤森太一さんには貴重な御意見を頂きました。また越川道子さん、高橋ゆず香さんには多くの技術的協力を、近藤恵美子さんには秘書として多くの協力を頂きました。ここに深謝致します。

文 献

- 1) Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet LD, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A, and Peschanski MR.: Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* 3: 224-228, 1993.
- 2) Baba Y, Nakano M, Yamada Y, Saito I, and Kanegae Y.: Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 49: 559-570, 2005.
- 3) Baba Y, Yazawa T, Kanegae Y, Sakamoto S, Saito I, Morimura N, Goto T, Yamada Y, and Kurahashi K.: Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates acute lung injury and mortality in mice. *Hum Gene Ther* 18: 130-141, 2007.
- 4) Bajocchi G, Feldman SH, Crystal RG, and Mastrangeli A.: Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in

- the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nat Genet* 3: 229-234, 1993.
- 5) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, and Finberg RW.: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323, 1997.
- 6) Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, and McCormick F.: An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274: 373-376, 1996.
- 7) Davidson BL, Allen ED, Kozarsky KF, Wilson JM, and Roessler BJ.: A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* 3: 219-223, 1993.
- 8) Engelhardt JF, Yang Y, Stratford-Perricaudet LD, Allen ED, Kozarsky K, Perricaudet M, Yankaskas JR, and Wilson JM.: Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat Genet* 4: 27-34, 1993.
- 9) Fukuda H, Terashima M, Koshikawa M, Kanegae Y, and Saito I.: Possible mechanism of adenovirus generation from a cloned viral genome tagged with nucleotides at its ends. *Microbiol Immunol* 50: 643-654, 2006.
- 10) Graham FL, Prevec L.: Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3: 207-220, 1995.
- 11) Greber UF, Willetts M, Webster P, and Helenius A.: Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477-486, 1993.
- 12) Hashimoto M, Aruga J, Hosoya Y, Kanegae Y, Saito I, and Mikoshiba K.: A neural cell-type-specific expression system using recombinant adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 7: 149-158, 1996.
- 13) Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, and Kadin ME.: Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF- κ B activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 21: 2493-2503, 2002.
- 14) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, Sugano S, and Saito I.: Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 23: 3816-3821, 1995.
- 15) Kanegae Y, Makimura M, and Saito I.: A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol* 47: 157-166, 1994.
- 16) Kanegae Y, Takamori K, Sato Y, Lee G, Nakai M, and Saito I.: Efficient gene activation system on mammalian cell chromosomes using recombinant adenovirus producing Cre recombinase. *Gene* 181: 207-212, 1996.
- 17) Kanegae Y, Tavares AT, Izpisua Belmonte JC, and Verma IM.: Role of Rel/NF- κ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature* 392: 611-614, 1998.
- 18) Koizumi N, Mizuguchi H, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, and Hayakawa T.: Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral

- vectors containing RGD peptide. *Biochim Biophys Acta* 1568: 13-20, 2001.
- 19) Kondo S, Okuda A, Sato H, Tachikawa N, Terashima M, Kanegae Y, and Saito I.: Simultaneous on/off regulation of transgenes located on a mammalian chromosome with Cre-expressing adenovirus and a mutant loxP. *Nucleic Acids Res* 31: e76, 2003.
 - 20) Kondo S, Takahashi Y, Shiozawa S, Ichise H, Yoshida N, Kanegae Y, and Saito I.: Efficient sequential gene regulation via FLP and Cre-recombinase using adenovirus vector in mammalian cells including mouse ES cells. *Microbiol Immunol* 50: 831-843, 2006.
 - 21) Lee G, Saito I.: Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216: 55-65, 1998.
 - 22) Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, Berns A, and Jonkers J.: Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9209-9214, 2001.
 - 23) Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourot B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A, and Mehtali M.: In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* 72: 2022-2032, 1998.
 - 24) Mastrangeli A, Danel C, Rosenfeld MA, Stratford-Pericaudet L, Perricaudet M, Pavirani A, Lecocq JP, and Crystal RG.: Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J Clin Invest* 91: 225-234, 1993.
 - 25) Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C, and Saito I.: 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, 1996.
 - 26) Mizuguchi H, Kay MA.: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* 9: 2577-2583, 1998.
 - 27) Nakano M, Ishimura M, Chiba J, Kanegae Y, and Saito I.: DNA substrates influence the recombination efficiency mediated by FLP recombinase expressed in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 45: 657-665, 2001.
 - 28) Nakano M, Odaka K, Ishimura M, Kondo S, Tachikawa N, Chiba J, Kanegae Y, and Saito I.: Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP recombinase-expressing recombinant adenovirus. *Nucleic Acids Res* 29: E40, 2001.
 - 29) Nakano M, Odaka K, Takahashi Y, Ishimura M, Saito I, and Kanegae Y.: Production of viral vectors using recombinase-mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Res* 33: e76, 2005.
 - 30) Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, and Curiel DT.: Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 62: 4663-4670, 2002.
 - 31) Ng P, Parks RJ, and Graham FL.: Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Mol Med* 69: 371-388, 2002.
 - 32) Okuyama T, Fujino M, Li XK, Funeshima N, Kosuga M, Saito I, Suzuki S, and Yamada M.: 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, 1998.
 - 33) Pfeifer A, Brandon EP, Kootstra N, Gage FH, and Verma IM.: Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11450-11455, 2001.
 - 34) Sakai Y, Kaneko S, Sato Y, Kanegae Y, Tamaoki T, Saito I, and Kobayashi K.: Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/loxP system. *J Virol Methods* 92: 5-17, 2001.
 - 35) Sato Y, Tanaka K, Lee G, Kanegae Y, Sakai Y, Kaneko S, Nakabayashi H, Tamaoki T, and Saito I.: Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 455-462, 1998.
 - 36) Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, and Kochanek S.: Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18: 180-183, 1998.
 - 37) Shenk T.: Adenoviridae: the viruses and their replication. *In: D. M. K. a. P. M. H. B.N. Fields (ed.), Fundamental Virology, 3rd ed., pp. 979-1016. Philadelphia, N.Y.: Lippincott-Raven Publisher, 1996.*
 - 38) Shibata H, Toyama K, Shioya H, Ito M, Hirota M, Hasegawa S, Matsumoto H, Takano H, Akiyama T, Toyoshima K, Kanamaru R, Kanegae Y, Saito I, Nakamura Y, Shiba K, and Noda T.: Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278: 120-123, 1997.
 - 39) Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, and Koike K.: Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol* 80 (Pt 12): 3257-3265, 1999.
 - 40) Silver DP, Livingston DM.: Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* 8: 233-243, 2001.
 - 41) Wakita T, Taya C, Katsume A, Kato J, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, and Kohara M.: Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem* 273: 9001-9006, 1998.
 - 42) Yoshida Y, Sadata A, Zhang W, Saito K, Shinoura N, and Hamada H.: Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Hum Gene Ther* 9: 2503-2515, 1998.

Gene engineering of the adenovirus vector

**Saki KONDO, Miho TERASHIMA, Hiromitsu FUKUDA, Izumu SAITO and
Yumi KANEGAE**

Laboratory of Molecular Genetics
The Institute of Medical Science
The University of Tokyo
4-6-1, Shirokanedai Minato-ku Tokyo 108-8639, Japan

The adenovirus vector is very attractive tool not only for the gene therapy but also for the basic sciences. However, because a construction method of this vector had been complex, only limited scientists had constructed and enjoyed the benefits. Recently, various methods were developed and the researchers came to be able to choose an efficient method, which is the COS-TPC method, or a concise procedure, which is the intact-genome transfection method (in vitro ligation method). Here we described not only these methods but also new method to construct the various Ads simultaneously using the recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) by the site-specific recombinase. And also we want to refer the possibility to the worth of the vector, especially the vector of the expression-switch.

