

新規血清型に由来する AAV ベクターの有用性

水上浩明,* 小澤敬也

Utility of AAV Vectors Derived from Novel Serotypes

Hiroaki MIZUKAMI,* and Keiya OZAWA

Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

(Received July 3, 2006)

AAV vector is derived from nonpathogenic virus and has a number of attractive features as a vector for human gene transfer including safety, broad tissue specificity, and low immunogenicity following gene transfer. Moreover, persistent transgene expression (for years) was demonstrated in multiple animal experiments. For these reasons, applications to a wide spectrum of diseases are expected, and several clinical trials have been conducted. Although it is too early to conclude the outcome, the efficacy of treatment was not sufficiently substantiated in most of the trials despite confirming the safety of the vector. These results are primarily due to low levels of transgene expression. One of the approaches to improve this situation is the use of alternative serotypes of AAV. Traditionally, serotype 2 was considered to be a prototype of AAV, and the majority of studies including human clinical trials have been conducted using this serotype. On the other hand, there are five “classical” serotypes, and several have been additionally discovered from tissues of primates including humans. These serotypes are considered to be valuable resources for vector development to overcome the shortcomings of serotype 2. This review focuses on the difference in expression levels and tissue specificity of various serotype-derived vectors and summarizes current status in the treatment of candidate diseases.

Key words—AAV vector; serotype; gene expression; tissue specificity

1. はじめに

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは非病原性ウイルスに由来し、広範な組織特異性、低い免疫原性など遺伝子導入に好都合な性質を備えていることから、理想に近いベクターシステムと考えられる。近年世界中で活発な研究が行われているが、既に米国においては数多くの疾患を対象としてヒトに対する臨床研究が行われており、その成果の一部は既に報告されている。上記の臨床研究を含め、従来 AAV の研究は 2 型を標準として進められてきた。しかしながら、よりよいベクターの開発を目指して、2 型以外の血清型に関しても目が向けられるようになり、ベクターとしての有用性が示唆されている。本稿では各血清型のベクターに関する研究の動向に

つき、自験データを踏まえつつ述べることとする。

2. AAV 研究の流れ

AAV は 1960 年代にアデノウイルスの電子顕微鏡写真から偶然発見され、アデノウイルスに依存して増殖することからその名が付けられた。当初は新しいユニークなウイルスとして多くの研究がなされたものの、1970 年代になって非病原性であると認識されるに至ったことからウイルス学の研究対象ではなくなり、その後は数少ないグループによって研究が行われていた。ところが 1990 年代に入ると、第 19 番染色体の特定の部位に遺伝子が組み込まれるという性質が発表されたこともあって、有望なウイルスベクターと考えられるようになり、再び幅広い研究が行われるようになった。1990 年代の後半になり、様々な血清型の有用性が認められるようになり、さらに活発な研究が行われるようになっている。

3. AAV の基本的な性質

3-1. ウイルス学的性質 エンベロープを持たず直径 20 ないし 30 nm の正二十面体構造のキャプ

自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 (〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1)

*e-mail: miz@jichi.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S7 で発表したものを中心に記述したものである。

シドを有している。ウイルス学的にはパルボウイルス科デベンドウイルス属に分類され、アデノウイルスとは無関係である。デベンドウイルスの名称が示す通り自立性の増殖能を欠き、複製はアデノウイルス、ヘルペスウイルスなどのヘルパー機能に依存する。アデノウイルスのヘルパー機能については詳細な検討がなされており、E1A, E1B, E2A, E4, VA 遺伝子が必要であることが知られている。ヘルパーウイルス非存在下では AAV のゲノムは第 19 番染色体長腕の特定の部位 (AAVS1 と呼ばれている) に組み込まれ、そのままその位置に留まり安定して存在する。この性質は部位特異的組み込み (site-specific integration) と呼ばれ、安全な遺伝子導入に好都合な性質であるが、現段階のベクターには備わっていない。

AAV のゲノム構造を Fig. 1 に示す。ウイルスゲノムは一本鎖であり全長が約 4.7 kb で、5'側の約半分は rep と呼ばれ、ウイルスの複製に関与する Rep 蛋白質をコードする部分であり、3'側の約半分が cap と呼ばれる構造蛋白質をコードする領域に相当する。構造蛋白質は cap 遺伝子の異なる開始部位から生じた VP1, VP2, VP3 の 3 種類からなる。ゲノムの両端に Inverted Terminal Repeat (ITR) と呼ばれるヘアピン構造を有しており、この ITR 領域は宿主細胞染色体への組み込みに際して重要と考えられている。

ヒトに対する AAV の病原性は知られていない。AAV に対する抗体は健康成人の過半数に見出されており、ほとんどが中和抗体である。¹⁾ 抗体獲得は

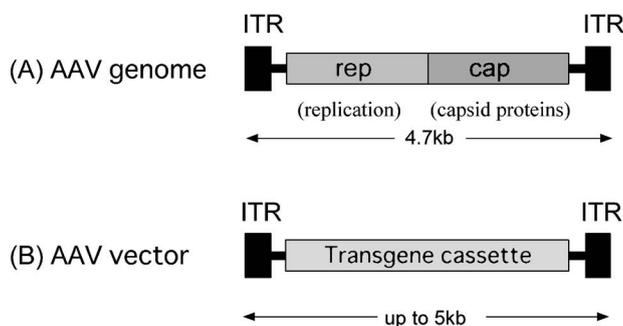


Fig. 1. AAV Vector Structure

Structure of the AAV genome and vector. (A): Wild type AAV genome is a single-stranded DNA with the length of 4.7 kb. Two viral genes, rep and cap, were flanked with inverted terminal repeats at both ends. (B): To make an AAV vector, rep and cap genes were replaced by a transgene cassette. Total length of the vector needs to be similar to wild type for efficient vector production.

主に幼児期に起こり、抗体価の上昇と何らかの疾患との因果関係は多くの研究によって否定されている。

AAV は幅広い臓器・組織特異性を有することが知られており、その根拠となるレセプターに関しても様々な解析が行われている。2型に関しては細胞表面のヘパラン硫酸に結合すること、²⁾ インテグリン $\alpha\beta_5$, ³⁾ FGF レセプター、⁴⁾ c-Met (HGF レセプター)⁵⁾ などの細胞表面分子が感染の仲介をしていることが報告されている。他の血清型については報告された知見は限られており、5型に関して PDGF レセプターが、⁶⁾ またいくつかの型についてシアル酸が感染に必要なことが報告されているが、今のところ全体像の解明にはほど遠い。

3-2. AAV ベクターの特徴 AAV ベクターの特徴を Table に挙げた。長所としては安全性のほか幅広い臓器・組織特異性ととも分裂細胞にも非分裂細胞にも導入可能であること、免疫原性が低く導入遺伝子産物に対する免疫反応が起こり難いことから長期に渡る発現が期待できること、ウイルス粒子が物理化学的に安定で精製・濃縮・界面活性剤処理等の操作が容易であること、などが挙げられる。一方短所としてはウイルスゲノム自体のサイズが小さいため、組み込める遺伝子のサイズに制約があること (合計約 5 kb まで) が挙げられる。また、健康人の過半数が自然感染の結果として中和抗体を持っていることから、血液を介する注入法による *in vivo* の投与法を行う際には対象が限られる可能性がある。

3-3. AAV ベクターの作製法 最も広く行われているのはリン酸カルシウム法に基づき 293 細胞へのトランスフェクションを行う方法である。ベクター作製に必要なプラスミドは 1) ベクター配列を有するプラスミド、2) AAV の配列を有するプラスミド、3) アデノウイルスのヘルパー機能に相当する遺伝子を搭載したプラスミド、の 3 種類である。これらのプラスミド並びに 293 細胞は STRATAGENE 社から市販されている (AAV helper-free system)。



水上浩明

自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部講師。1960 年北海道生まれ。防衛医科大学校卒。1993-1995 年米国 NIH/NHLBI/Hematology Branch (Visiting Associate)。1998 年自治医大助手、2004 年より現職。

トランスフェクションの2ないし3日後に細胞を回収し、凍結融解などで破壊して、ベクター粒子を放出させる。この溶液を塩化セシウム溶液を用いた超遠心法に基づく密度勾配に従って分離し、ベクターを精製する。その後透析によって塩化セシウムを取り除き、必要に応じて濃縮する。定量法としてはドットプロット法又はリアルタイムPCR法が広く用いられている。以上の流れを大まかに Fig. 2 に示した。精製に際してイオン交換カラムなどを用いることも多く検討されている。ベクターの作製・精製法に関しても多くのアプローチがなされており、現在もなお発展段階である。⁷⁾ 今後臨床研究が広がっていくにつれて、十分な質を保ちながら効率よくベクターが供給できる系に集約されていくものと思われる。

3-4. AAV ベクターの有用性 上記のような特徴に基づき、様々な疾患に対する効果が期待されている。標的組織としては中枢神経系、骨格筋・心筋、呼吸器、肝臓などが主なものであり、1990年代半ば頃から米国において臨床応用が開始された。現在までに行われた臨床研究を Table 1 に示す。現時点で結論が出ているものは少ないが、いくつかのプロトコールでは第 I 相試験の結果、安全性が確認されている。

3-5. 中枢神経系に対する効果 中枢神経系疾患は AAV ベクターによる遺伝子治療が最も期待される領域である。原理的に有利な点として、1) 一度の注入で非常に長期（年余）に渡る効果の持続が期待できる、2) 脳実質内への注入においては治療に伴う免疫反応などが生じがたい、3) 極めて少量

のベクターで効果が期待できる、などが挙げられる。

パーキンソン病においてはドパミン産生細胞の機能低下が基本的な病態であり、不足している TH (Tyrosine Hydroxylase) ないしは AADC (Aro-

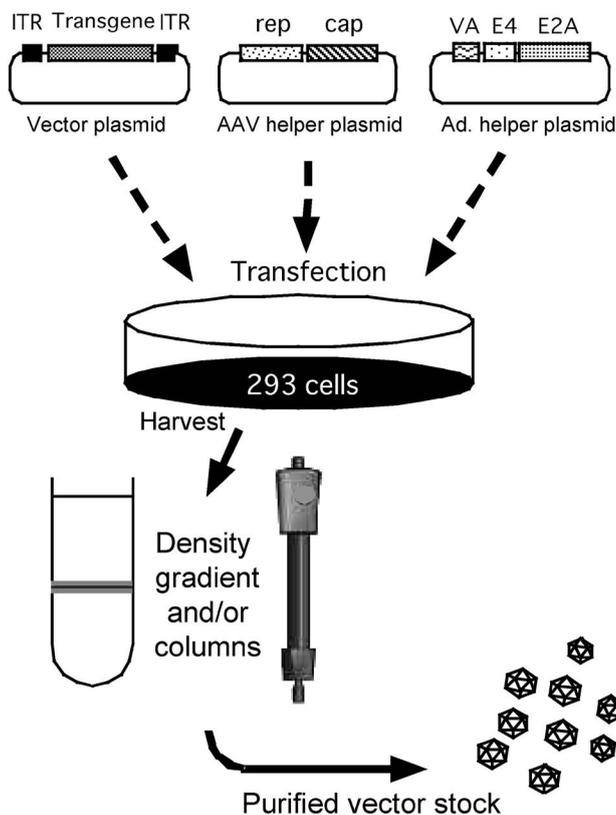


Fig. 2. AAV Vector Production and Purification Strategies
The most popular method for AAV vector production has been plasmid transfection using Calcium-phosphate. HEK293 cells are preferred because of the high efficiency of transfection which leads to outstanding vector production. After 2–3 days, the cells are harvested and destroyed for efficient vector release. Then the vectors are purified through density gradient and/or columns.

Table 1. Clinical Trials Using AAV Vectors

	Disease	Transgene
Central nervous system	Leukodystrophy (Canavan disease)	Aspartoacylase
	Alzheimer's disease	NGF
	Parkinson's disease	GAD, AADC
	Lipofuscinosis	CLN2
	Temporal lobe epilepsy	NPY
Muscle	Muscular dystrophy	Sarcoglycan
	Cardiomyopathy	SERCA2a
Respiratory	Cystic fibrosis	CFTR
	Alpha-1 anti-trypsin deficiency	hAAT
Congenital	Hemophilia B	Factor IX
Others	Prostate cancer	GM-CSF

(Modified from OBA home page)

matic Amino acid DeCarboxylase) をコードするベクターを線条体に注入し、機能を回復させることが原理的に有望である。実際にこの方法でラットやサルなどのモデル動物において長期に渡る症状の改善がみられており、安全に遂行可能であることからヒトへの臨床応用が進められている。⁸⁾ また、異なる機序として GDNF などの神経保護作用を有する因子を供給し、ドパミン神経細胞の変性を抑制するアプローチもあるが、この場合にも同様の効果が認められている。⁹⁾

また、バソプレシン欠乏に基づく中枢性尿崩症モデル動物 (Brattleboro rat) において、バソプレシン遺伝子を搭載する AAV ベクターの視床下部 (視索上核) への注入による効果を検討したところ、注入直後から尿量及び尿浸透圧は正常化し、効果は観察期間を通して持続した (Fig. 3)。注入を行った個体の視床下部ではバソプレシンが産生されており、種々の機能試験に対する反応はほぼ正常であっ

た。¹⁰⁾ この治療実験は単に治療効果を検討するのみならず、バソプレシンの生理作用に関して未知の部分に光を当てる上でも有望なモデル系であると考えられ、解析が進められている。

ほかにアルツハイマー病の原因物質と考えられる A β の分解酵素であるネプリライシン遺伝子を搭載したベクターを海馬に注入することでマウスにおける治療効果を確認している。¹¹⁾

また、網膜についても AAV ベクターによる遺伝子導入の効率が良好であることが知られており、様々な動物モデルで効果が認められている。われわれは糖尿病性網膜症のモデル動物 (SDT ラット) において血管新生抑制因子を搭載するベクターを網膜内に投与することで網膜症の進展が抑制できることを見出している。

3-6. 血友病に対する遺伝子治療臨床研究の展開
血友病は血液凝固第 VIII 因子 (血友病 A) 又は第 IX 因子 (血友病 B) が先天的に欠乏するために起こる

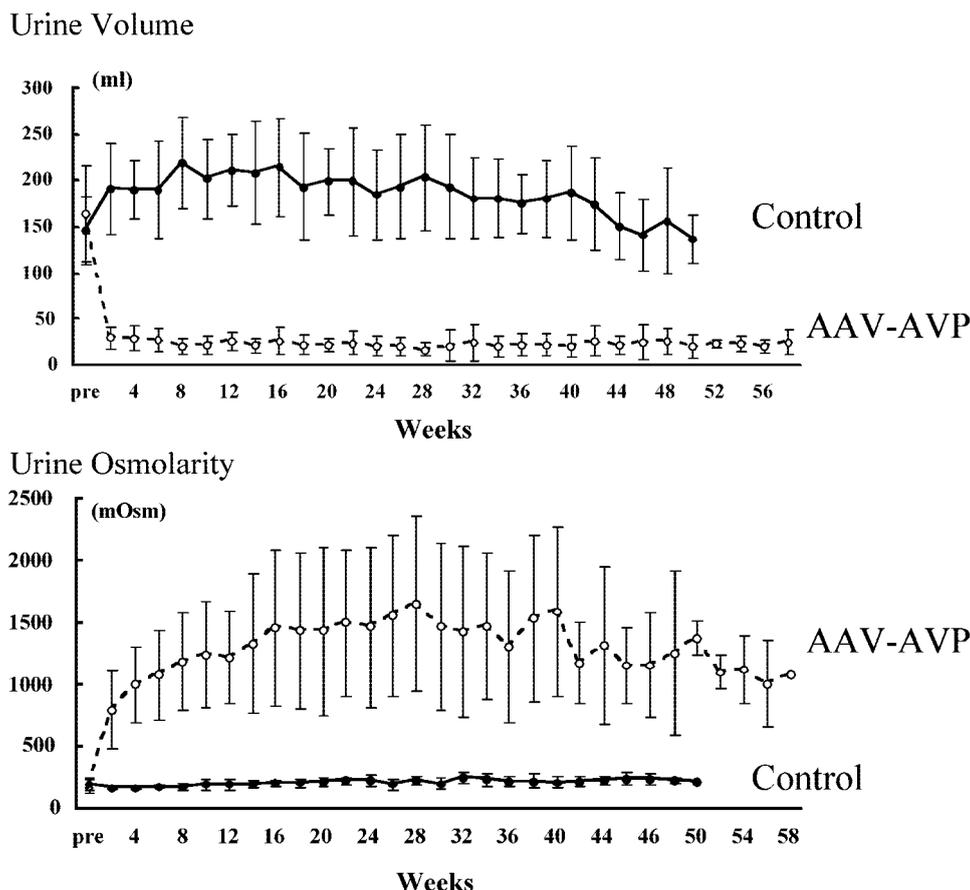


Fig. 3. Phenotypic Correction of Central Diabetes Insipidus Following Vector Injection

An AAV vector encoding arginine vasopressin was injected into supraoptic nucleus of hypothalamus stereotactically (3×10^{10} vector genomes). Rats were raised in individual cages and urine volume and osmolarity were followed up. Modified from Ref. 10).

伴性劣性遺伝性疾患であり、該当する凝固因子濃縮製剤を必要に応じて投与する格好で補充療法が行われているが、様々な問題を抱えており新規治療法の開発が期待されている。実際には正常レベルの数%程度の血中濃度でも十分な予防効果が期待でき、しかも例えば高濃度となっても安全であるために発現レベルを調節する必要がないなどの利点から現在の技術でも十分に対応可能なものと考えられる。対象となる患者数も少なくないことから、先天性疾患の代表格として研究開発が行われている。これまでに行われた血友病遺伝子治療の臨床研究のまとめを Table 2 に示す。AAV ベクターを用いる場合には、遺伝子サイズが小さくベクター開発が容易な血友病 B の研究が先行している。標的組織としては骨格筋及び肝臓が考えられ、いずれについても米国において臨床研究が行われた。この臨床研究は全例で副作用なく遂行されたが、ベクター投与量を増加しても十分な効果を得ることができなかつたためともに第 II 相試験には至らなかった。¹²⁻¹⁴⁾

4. AAV の血清型について

4-1. ウイルスからのベクター化 (第 1 世代)

最初に見出された AAV が 1 型と名付けられたものの、AAV の標準型とはならなかった。これは 1 型がサルのアデノウイルス (SV15) に由来するものであったこと、¹⁵⁾ また、ヒトからは分離されたことがなかったため、ヒト由来のウイルスであるかどうかについて疑念があったこと、などによるものと考えられる。このため 2 型が主に研究の対象となってきた。1980 年代に見出された 5 型を含め 1990 年代になってから自然界に存在する 2 型以外の血清型をベクターとして用いる検討がなされるようになり、既知の血清型のすべてにおいて全塩基配列の決定とベクター化に向けた検討がなされた。¹⁶⁻²⁰⁾ その結果、様々な点で従来標準としてきた 2 型を用いた場

合に比べて高い効果が得られたとする成果が多数得られている。Figure 4 は CMV プロモーター下に LacZ を搭載した各血清型由来のベクターをマウス前脛骨筋に注入して、2 週間後に筋肉摘出後 X-Gal 染色を行って切片を作製し、最も強く青染している部分を標本としたものである。²⁰⁾ 2 型に比べて 1 型・5 型などを用いる場合に強い発現が得られている。また、酵素活性として定量した場合にも同様の結果が得られている (F)。血液中に分泌される蛋白質としてマウスエリスロポエチン遺伝子を搭載したベクターを用いて同様の検討を行ったところ、同様の結果が得られ長期に渡る発現が確認できた。総合すると骨格筋には 1 型を用いることが最も効果的と考えられた。肝臓を標的としてベクターの門脈内注入を行った結果を Fig. 5 に示す。²¹⁾ この場合には 5 型を用いた場合に最も高い効果がみられた。以上の 5 種類に加えて 6 型という血清型が 1998 年に報告されているが、のちに 1 型と 2 型の組換えによって生じたものと判明しており、¹⁶⁾ キャプシドは 3 つのアミノ酸が異なるのみで 1 型との相同性が極めて高い。

各血清型の特徴を Table 3 に示した。いずれもほぼ同じ長さ (約 4.7 kb) のウイルスゲノムを有し、ゲノム構造もおおよそ共通であると考えられる。異なった血清型として認識されるのは、キャプシドの構造の相違があるため、宿主の免疫応答に違いが生ずることによる。キャプシド領域に関して 2 型を中心にアミノ酸配列のホモロジーを検討すると、3 型が最も近く、1 型がそれにつき、4 型及び 5 型がそれぞれ離れていると言える。1 型及び 4 型についてはヒトでの抗体陽性率は低く、サルでは高いことが知られており、ヒトからのウイルスの分離に成功しないことと相まってこれらの野生株ウイルスはサル由来であると考えられている。2, 3, 5 型について

Table 2. A History of Clinical Trials of Hemophilia

Type	Target	Vector	Start	Stop	Phase
A	Fibroblast	Plasmid	1998	2004	I
B	Muscle	AAV (type 2)	1999	2005	I
A	Liver	Retrovirus (MLV)	1999	2002	I
B	Liver	AAV (type 2)	2000	2005	I
A	Liver	Adenovirus (helper-dependent)	2000	2003	I

(Modified from OBA home page)

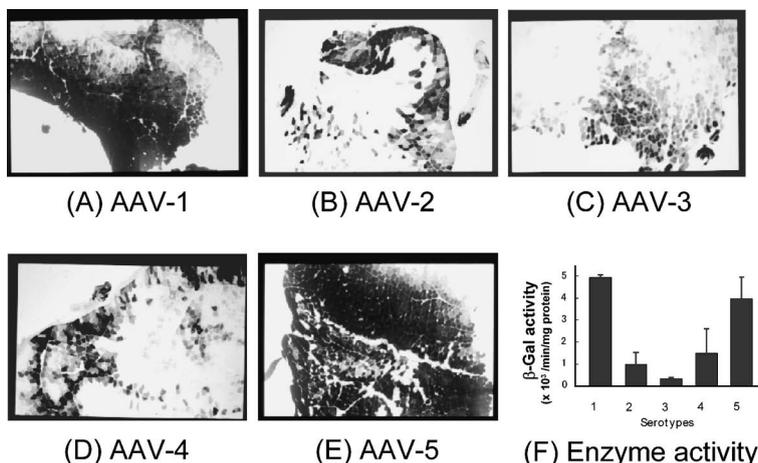


Fig. 4. Muscle-mediated LacZ Expression by Serotypes

Expression of LacZ following intramuscular injection of the serotype-derived vectors. Each serotype-derived vector with the CMV promoter (3×10^{10} vector genomes per muscle) was injected into the tibialis anterior muscle of mice. Two weeks following vector injection, the muscles were histologically analyzed and X-Gal staining was performed (A–E). (F): β -Galactosidase activity in muscles measured by the ONPG assay was shown. The protein contents were also determined by the BCA method to adjust the enzyme activity. Modified from Ref. 21).

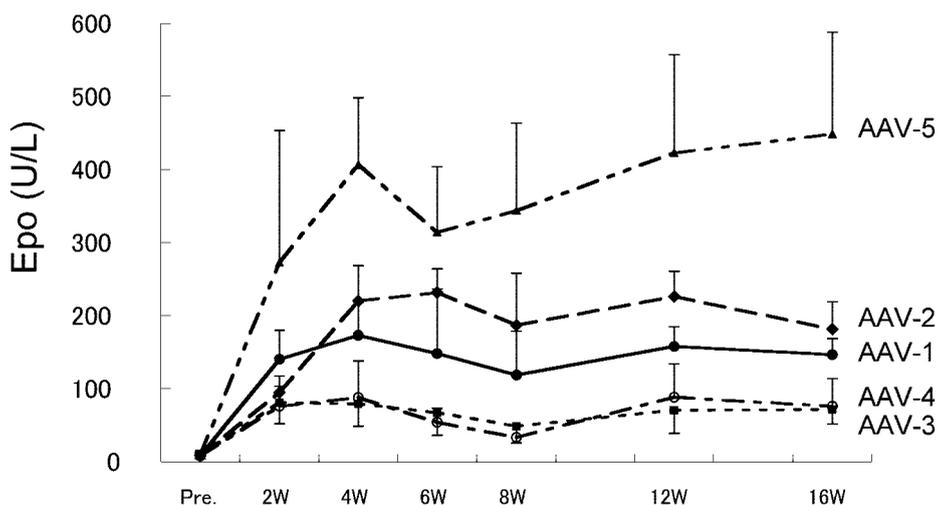


Fig. 5. Plasma Epo Concentration Following PV Injection of Serotype-derived Vectors

Vectors encoding murine Epo driven by the CAG promoter were injected intraportally (1×10^{11} vector genomes), and plasma Epo concentration was followed up. Modified from Ref. 21).

はヒト由来のウイルスと考えられ、いずれについても健常人の約半数又はそれ以上に抗体の存在が知られている。なお、いずれの血清型に関しても病原性は知られていない。

4-2. 新規血清型の探索 (第2世代) さらに最近になって、全く新しいアプローチで新規血清型の探索が行われるようになった。すなわち、サルの組織DNAなどから AAV に共通の配列を検出し、陽性であれば全長を回収するという手法で検討したところ、数多くの AAV 様の配列が見つかったとのことである。これらを分類し、ベクター化してマウ

スに注入し、有効性をみて有用なものを選び出すという大掛かりなプロジェクトが行われ、その結果7型から9型という血清型が提唱された。^{22,23)} 同様の手法で10, 11型というものも提唱されている。²⁴⁾ 膨大な数のクローンが見出されており、従来の血清型という分類と整合性が取れなくなりつつある。²⁵⁾ 有用性に関しては、現在のところ、8型を用いた場合に肝臓において非常に高い効果が認められることがコンセンサスとなっているようである。

4-3. 新規血清型の効果 原理的には2型以外の血清型由来のベクターを用いることによって、次

Table 3. Serotypes of AAV

	Discovery	Vector development	Homology to AAV2	Origin	Receptor	Preferred target
1	1965	1999	High	Monkey	Unknown	Muscle
2	1966	1982	—	Human	HSPG, Integrin $\alpha v \beta 5$ FGFr, c-Met	CNS
3	1966	1996	Very high	Human	Unknown	CNS
4	1966	1997	Low	Monkey	Sialic acid $\alpha 2-3$ (O)	Ependyme
5	1984	1999	Low	Human	PDGFr	Airway
6	1998	1999	High	$\approx 1+2$	Unknown	\approx AAV-1
7	2002	2002	Intermediate	Monkey	Unknown	Muscle
8	2002	2002	Intermediate	Monkey	Unknown	Liver
9	2004	2004	Intermediate	Human	Unknown	Versatile?
10	2004	2004	Intermediate	Monkey	Unknown	Unknown
11	2004	2004	Low	Monkey	Unknown	Unknown

のような利点が予想される。1) 2型由来のベクターでは導入が困難な標的組織に対して、異なる血清型由来のベクターにより遺伝子導入が可能になる場合がある。2) ある型のキャプシドに対して中和抗体が存在しても、異なる血清型由来のベクターを用いることで阻害作用を回避でき効果が期待できる。さらには以前の治療で中和抗体が生じていても、異なる血清型を用いることで繰り返し投与が可能となる。3) 異なる血清型を用いることで標的組織における発現の増強が期待できる。実際にこれまで2型のベクターを用いて不成功であった実験が、新規血清型を用いて成功することがみられるようになってきた。代表的な例としてフェニールケトン尿症のモデルマウスに対する遺伝子治療を紹介する。このモデルはヒトと同様にフェニールアラニン水酸化酵素 (phenylalanine hydroxylase, PAH) を欠損しており、高フェニールアラニン血症及び体毛の色素低下など表現型もヒトに類似している。このマウスの治療を目指して門脈内に PAH を搭載する2型の AAV ベクターを注入した結果では、全く反応がみられなかった。しかしながら5型のベクターを用いて同様の検討を行ったところ、顕著な効果が認められ、血中フェニールアラニン濃度は長期に渡り正常化した。また、治療効果の持続に伴い、体毛の色素沈着のみならず、行動学的な問題に関して正常化するに至った。²⁶⁾さらには、より強力と考えられる8型のベクターを用いた検討の結果、同等の効果がより少量のベクターで得られることを確認している。

5. 今後の課題と展望

各血清型由来のベクターの有用性が明らかになるにつれ、これまで効果が不十分であったモデルにおいてよりよい成果がみられるようになってきた。これがそのままヒトにも応用可能であれば AAV ベクターを用いた遺伝子治療は新たな展開をみせるようになると考えられ、先に挙げた血友病遺伝子治療に関して、認可されれば速やかに進められていくように思われる。遂行する上で技術的には大きな困難はなさそうであるが、いくつかの解決されるべき点がある。第一に、血清型による標的組織・発現程度の違いに関するデータは培養細胞やマウス等の小動物レベルで得られたものが主であり、ヒトでも同様に応用可能かどうかはいまだ不明である。このためにはより大型の動物モデルなどを用いて、そして最終的にはヒトで効果を調べていく必要がある。また、新規血清型のベクターの感染経路や *in vivo* 投与時の組織特異性などはまだ十分に明らかとは言えない。用いる血清型による免疫原性の違いなどについてもまだ検討の余地がある。また、最終的に実用化されるかどうかは遺伝子治療法同士の比較ではなくほかの薬物療法に比して有益であるかどうかによっており、成功へのハードルは高い。しかしながら新規血清型由来のベクターは多くの疾患に対して実用化が可能なポテンシャルを十分に有しているものと思われ、今後一層の研究の進展が期待される。

謝辞 各血清型由来のベクター作製システムは開発者から直接供与を受けたものであり、供与頂いた方々に感謝致します。また、自験例の成果は主に

自治医科大学分子病態研究センター遺伝子治療研究部において行われたものであり、関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Blacklow N. R., Hoggan M. D., Sereno M. S., Brandt C. D., Kim H. W., Parrott R. H., Chanoock R. M., *Am. J. Epidemiol.*, **94**, 359–366 (1971).
- 2) Summerford C., Samulski R. J., *J. Virol.*, **72**, 1438–1445 (1998).
- 3) Summerford C., Bartlett J. S., Samulski R. J., *Nat. Med.*, **5**, 78–82 (1999).
- 4) Qing K., Mah C., Hansen J., Zhou S., Dwarki V., Srivastava A., *Nat. Med.*, **5**, 71–77 (1999).
- 5) Kashiwakura Y., Tamayose K., Iwabuchi K., Hirai Y., Shimada T., Matsumoto K., Nakamura T., Watanabe M., Oshimi K., Daida H., *J. Virol.*, **79**, 609–614 (2005).
- 6) Di Pasquale G., Davidson B. L., Stein C. S., Martins I., Scudiero D., Monks A., Chiorini J. A., *Nat. Med.*, **9**, 1306–1312 (2003).
- 7) Merten O. W., Geny-Fiamma C., Douar A. M., *Gene Ther.*, **12**, S51–S61 (2005).
- 8) Muramatsu S., Tsukada H., Nakano I., Ozawa K., *Expert Opin. Biol. Ther.*, **5**, 663–671 (2005).
- 9) 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., *Gene Ther.*, **9**, 381–389 (2002).
- 10) Ideno J., Mizukami H., Honda K., Okada T., Hanazono Y., Kume A., Saito T., Ishibashi S., Ozawa K., *Mol. Ther.*, **8**, 895–902 (2003).
- 11) Iwata N., Mizukami H., Shirotani K., Takaki Y., Muramatsu S., Lu B., Gerard N. P., Gerard C., Ozawa K., Saido T. C., *J. Neurosci.*, **24**, 991–998 (2004).
- 12) Kay M. A., Manno C. S., Ragni M. V., Larson P. J., Couto L. B., McClelland A., Glader B., Chew A. J., Tai S. J., Herzog R. W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W., High K. A., *Nat. Genet.*, **24**, 257–261 (2000).
- 13) Manno C. S., Arruda V. R., Pierce G. F., Glader B., Ragni M., Rasko J., Ozelo M. C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J. F., Lessard R. R., Sommer J. M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H. C., High K. A., Kay M. A., *Nat. Med.*, **12**, 342–347 (2006).
- 14) Manno C. S., Chew A. J., Hutchison S., Larson P. J., Herzog R. W., Arruda V. R., Tai S. J., Ragni M. V., Thompson A., Ozelo M., Couto L. B., Leonard D. G., Johnson F. A., McClelland A., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W., Kay M. A., High K. A., Glader B., *Blood*, **101**, 2963–2972 (2003).
- 15) Atchison R. W., Casto B. C., Hammon W. M., *Science*, **149**, 754–756 (1965).
- 16) Xiao W., Chirmule N., Berta S. C., McCullough B., Gao G., Wilson J. M., *J. Virol.*, **73**, 3994–4003 (1999).
- 17) Muramatsu S., Mizukami H., Young N. S., Brown K. E., *Virology*, **221**, 208–217 (1996).
- 18) Chiorini J. A., Yang L., Liu Y., Safer B., Kotin R. M., *J. Virol.*, **71**, 6823–6833 (1997).
- 19) Chiorini J. A., Kim F., Yang L., Kotin R. M., *J. Virol.*, **73**, 1309–1319 (1999).
- 20) Bantel-Schaal U., Delius H., Schmidt R., zur Hausen H., *J. Virol.*, **73**, 939–947 (1999).
- 21) Mochizuki S., Mizukami H., Kume A., Muramatsu S., Takeuchi K., Matsushita T., Okada T., Kobayashi E., Hoshika A., Ozawa K., *Gene Ther. Mol. Biol.*, **8**, 9–18 (2004).
- 22) Gao G., Alvira M. R., Somanathan S., Lu Y., Vandenberghe L. H., Rux J. J., Calcedo R., Sanmiguel J., Abbas Z., Wilson J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 6081–6086 (2003).
- 23) Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., Wilson J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11854–11859 (2002).
- 24) Mori S., Wang L., Takeuchi T., Kanda T., *Virology*, **330**, 375–383 (2004).
- 25) Gao G., Vandenberghe L. H., Alvira M. R., Lu Y., Calcedo R., Zhou X., Wilson J. M., *J. Virol.*, **78**, 6381–6388 (2004).
- 26) Mochizuki S., Mizukami H., Ogura T., Kure S., Ichinohe A., Kojima K., Matsubara Y., Kobayashi E., Okada T., Hoshika A., Ozawa K., Kume A., *Gene Ther.*, **11**, 1081–1086 (2004).