

## マイクロ RNA による遺伝子発現制御システムを搭載した 遺伝子組換えアデノウイルスの開発

櫻井文教,<sup>\*,a,b</sup> 水口裕之<sup>a,b</sup>

### Development of Recombinant Adenovirus Carrying MicroRNA-regulated Gene Expression System

Fuminori SAKURAI<sup>\*,a,b</sup> and Hiroyuki MIZUGUCHI<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and <sup>b</sup>Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaragi, Osaka 567-0085, Japan

(Received July 20, 2010)

Target tissue-specific delivery and transcription of foreign genes are desirable for safe and effective gene therapy. Two approaches for this purpose, “Targeted Delivery” and “Targeted Expression”, have been mainly reported. Among “Targeted Expression” approaches, microRNA (miRNA)-mediated “post-transcriptional de-targeting” has been recently demonstrated, and much attention has been focused on this approach. MiRNAs are an approximately 22-nt length non-coding RNA, and bind to imperfectly complementary sequences in the 3′-untranslated region (UTR) of target mRNA, leading to suppression of gene expression via post-transcriptional regulation. First, in order to reduce the hepatic transduction by Ad vectors, complementary sequences of liver-specific miRNA, miR-122a, were inserted into the 3′-UTR of the transgene expression cassette. Intratumor injection of this Ad vector resulted in approximately 100-fold lower hepatic expression than that of the conventional Ad vector, without reducing gene expression in the tumor. Second, complementary sequences for miRNAs selectively down-regulated in tumor cells were inserted into the E1 gene expression cassette in oncolytic Ads, which exhibit tumor cell-specific replication and antitumor effects. Recent studies demonstrated that expression of several miRNAs is exclusively reduced in tumor cells. Oncolytic Ads containing the miRNA complementary sequences showed reduced replication in the normal cells, without altering the antitumor effects. MiRNA-regulated gene expression system mediates “post-transcriptional de-targeting”, in which translation of transgene is suppressed in a tissue-specific manner; however, tissue-specific transgene expression can be achieved by taking tropism of gene delivery vehicles into consideration and reducing the transgene expression in untargeted organs *via* miRNA-regulated gene expression system.

**Key words**—miRNA; recombinant adenovirus; transcriptional targeting; post-transcriptional de-targeting

#### 1. はじめに

治療上有効な生理活性を有するタンパク質をコードした遺伝子を細胞に導入することにより治療を達成する遺伝子治療は、がんを始めとする各種難治性疾患に対する革新的治療法として期待されている。しかしながら、1990年に米国において世界で最初の遺伝子治療が ADA (アデノシンデアミナーゼ)

欠損症の患者に対し実施されてから20年以上が経過したが、いまだ有効な治療効果が得られた例は少ないのが現状である。この原因としてはいくつか考えられるが、最も大きな要因としては、遺伝子導入用ベクターを含め、遺伝子を細胞に送達し発現させる技術が治療効果を得るレベルまで到達していないことが指摘されている。したがって、安全かつ治療効果の高い遺伝子治療の実現に向けては、治療遺伝子を標的細胞に高効率に導入・発現させる技術の開発が求められており、そのためには、Drug Delivery System (DDS) 技術の活用が必要不可欠であると考えられる。

DDS 技術を活用し、遺伝子導入用ベクターを含

<sup>a</sup>大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6), <sup>b</sup>独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8)

\*e-mail: sakurai@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

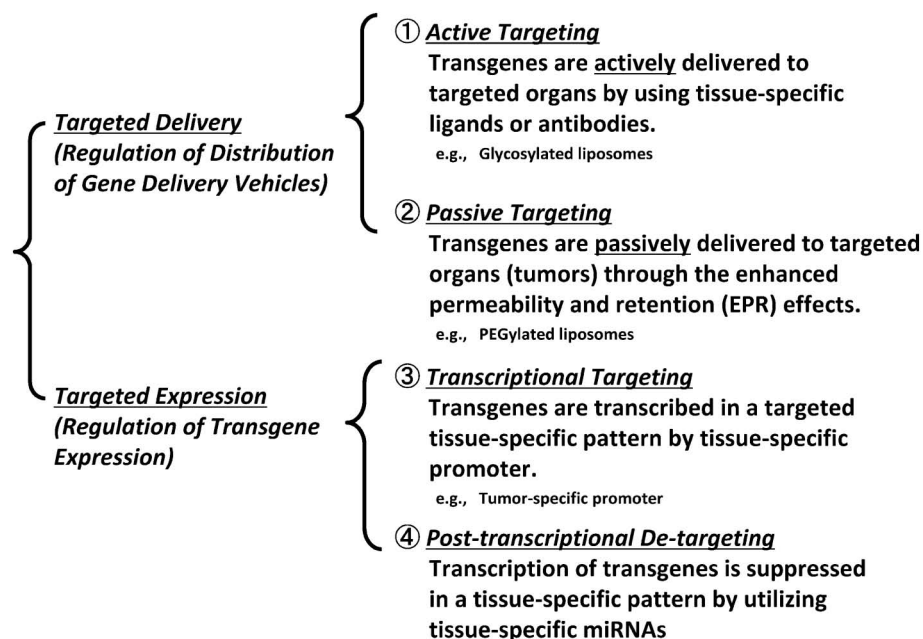


Fig. 1. Strategies for Targeted Organ-specific Transgene Expression for Safe and Effective Gene Therapy

め高性能な遺伝子導入・発現技術を開発するには、Fig. 1 に示すようなアプローチが考えられる。まず遺伝子医薬品の体内動態を制御する“Targeted Delivery”と、遺伝子発現を制御する“Targeted Expression”とに大別できる。さらに Targeted Delivery に関しては、標的細胞特異的なリガンドや抗体を利用することにより能動的に遺伝子を送達する“Active Targeting”と、<sup>1)</sup> PEG (Polyethylene Glycol) などで修飾することにより、EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により腫瘍などに遺伝子を送達する“Passive Targeting”とに分けられる。<sup>2)</sup> 一方で、Targeted Expression に関しては、これまで腫瘍特異的なプロモーターを始めとする組織特異的なプロモーターを用いて標的組織特異的に遺伝子発現 (転写) させる“Transcriptional Targeting”が盛んに研究されてきた。<sup>3,4)</sup> しかしながら近年、約 22 塩基の non-coding RNA である microRNA (miRNA) を利用することにより、標的臓器特異的に遺伝子発現 (翻訳) させない“Post-transcriptional De-targeting”の技術が開発され、大きな注目を集めている。<sup>5,6)</sup> そこで本稿においては、筆者らが近年精力的に研究を進めている miRNA による遺伝子発現制御システムを搭載した遺伝子組換えアデノウイルス (Ad) について紹介する。

## 2. microRNA による遺伝子発現制御機構

miRNA は、長さ 17-24 塩基の non-coding RNA (一本鎖 RNA) で、真核生物で広く発現しており、翻訳レベルにおいて標的遺伝子の発現を抑制する。miRNA はゲノムより主に pol II promoter によって前駆体 (pri-miRNA) として転写される (Fig. 2)。Pri-miRNA では、配列内部に存在する相補配列が二本鎖を形成することによりヘアピンループ構造をとる。Pri-miRNA は、核内において microprocessor 複合体を伴う Drosha によって Pre-miRNA へとプロセシングされたのち、Exportin-5 によって核外へと輸送される。Pre-miRNA は、60-90 塩基長のステムループ構造を有しており、細胞質の RNaseIII 酵素である Dicer によって切断されることにより、miRNA duplex となる。その後、Argonaute 2 を基本コンポーネントとする RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれたのち、一方の鎖が切断され放出されることにより、成熟した RISC となる。RISC は、miRNA と部分的相補配列を有する mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することにより、翻訳抑制若しくは mRNA の分解を誘導することにより遺伝子発現を抑制する (メカニズムとしては様々なモデルが報告されている)。1 種の miRNA は 100 以上の遺伝子を制御するとともに、全遺伝子の約 30% が miRNA の発現制御を受

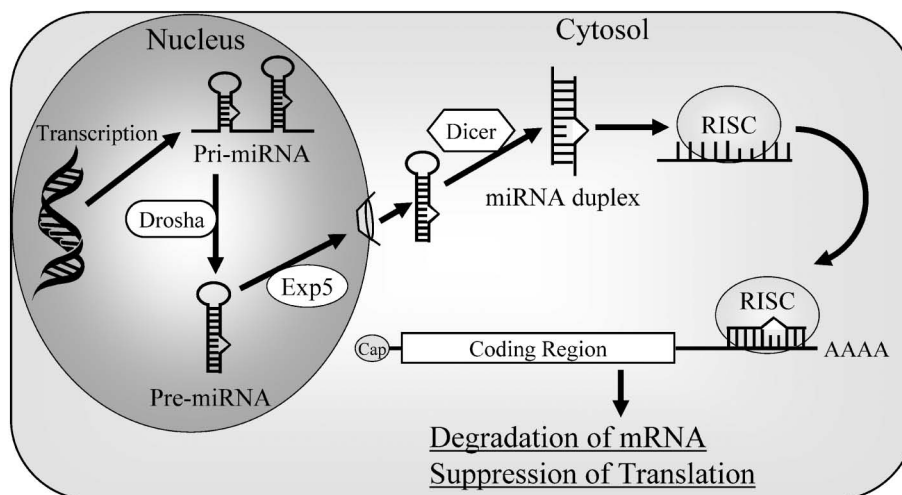


Fig. 2. Mechanisms of MiRNA-mediated Post-transcriptional Silencing in Mammalian Cells  
Exp5, Exportin-5; RISC, RNA-induced silencing complex.

けると考えられている。既に miRNA は、細胞増殖、アポトーシス、免疫応答など様々な細胞活動を制御することが報告されており、生命活動におけるその重要性はますます大きなものとなりつつある。miRNA を Post-transcriptional De-targeting に応用する上で重要な miRNA の特性は、その組織特異的な遺伝子発現プロファイルであろう。Table 1 には、組織特異的な発現プロファイルを示す代表的な miRNA を示した。このように miRNA の多くは組織（細胞）特異的な発現により遺伝子発現を精巧に制御し、それにより細胞の生命活動を維持していると考えられる。

上述のように、miRNA による遺伝子発現制御は、特定の遺伝子の発現を抑制するものである。これをいかにして部位特異的な遺伝子発現に向けて応用するか、ということであるが、例えば、ある遺伝子導入ベクターを *in vivo* 投与したところ、標的臓器である臓器 A だけでなく、臓器 B においても遺伝子発現が観察されたとする。そのような場合、臓器 B に特異的に発現する miRNA の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入することにより、臓器 A における遺伝子発現を妨げることなく、臓器 B における遺伝子発現を特異的に抑制することが可能であり、結果的に臓器 A 特異的な遺伝子発現を得ることができる (Fig. 3)。遺伝子導入ベクターの多くは、そのベクターが元来より有する物理学的・生物学的特性により、特定の臓器に移行し易いといった“臓器指向性”を有する。例えば、カチオン性リポ

Table 1. Tissue-specific MicroRNAs

Brain	miR-9, miR-124
Heart	miR-1, miR-133a, miR-206
Blood cells	miR-16, miR-142-5p, miR-142-3p, miR-223
Liver	miR-122a
Pancreas	miR-375
Spleen	miR-142-5p, miR-142-3p, miR-150
Skeletal Muscle	miR-1, miR-133a, miR-206
Ovary	miR-351, miR-542-5p
Testis	miR-204

ソームからなるリポプレックスは肺に高い移行量を示すし、後述のように Ad ベクターは肝臓に対し高い集積を示す。このように、その遺伝子導入ベクターが従来より高い指向性を示す臓器が標的である場合には何の問題もないが、その他の臓器が標的の場合には、そのベクターが高い移行性を示す標的以外の臓器における遺伝子発現を抑制する必要がある。そのような場合、この miRNA による Post-transcriptional De-targeting は極めて有効であると考えられる。

### 3. アデノウイルス (Ad) ベクターの遺伝子導入特性

これまでにウイルス・非ウイルスベクターともに、数多くの遺伝子導入ベクターが開発されてきた。その中でも Ad ベクターは、その優れた遺伝子導入特性から遺伝子治療臨床研究の約 24% で使用されるなど、最も汎用されているベクターである。

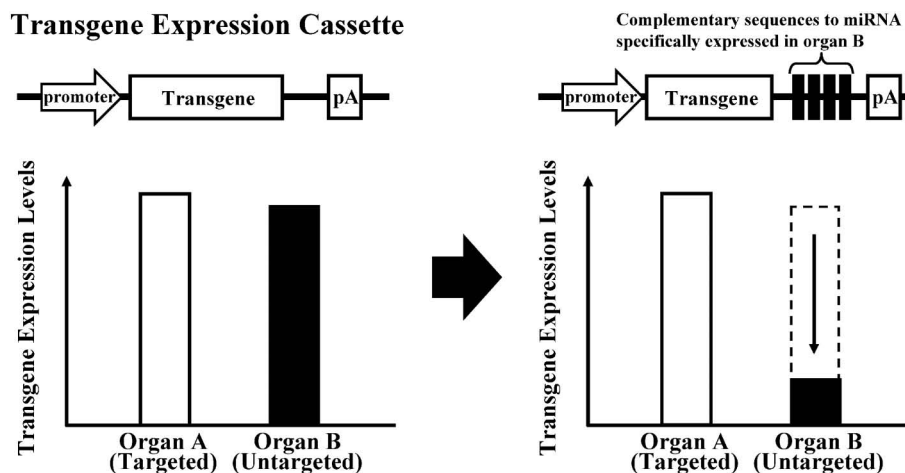


Fig. 3. MiRNA-mediated Post-transcriptional De-targeting of Transgene Expression for Targeted Organ-specific Gene Expression

一般に使用されている Ad ベクターは、ウイルス遺伝子の解析が進んでいる 5 型ヒト Ad を基本骨格としており、ウイルスの自己増殖に必須の E1 遺伝子を欠損させることにより、自己増殖を不能にしている。Ad ベクターは、遺伝子導入ベクターとして多くの長所を有しているが、問題点の 1 つとして、高い肝臓指向性が指摘されている。通常の Ad ベクターをマウスの尾静脈より全身投与すると、投与量の 90% 以上は肝臓に集積し、肝臓では他の臓器と比較し 1000 倍以上高い遺伝子発現量が観察される。<sup>7)</sup> Ad ベクターの肝臓指向性は極めて強く、Ad ベクターを腫瘍に局所投与した場合であっても、腫瘍で優れた遺伝子発現を示す一方で、投与部位より漏れ出た Ad ベクターが全身循環へと移行し、肝臓に集積するとともに、高い遺伝子発現を示すことが報告されている。<sup>8)</sup> したがって、がん治療などで自殺遺伝子など遺伝子発現細胞に対し毒性を示すような遺伝子を発現させた場合、がん細胞に対し高い抗腫瘍効果が得られるものの、肝臓においても高い毒性を示す危険性が指摘されている。<sup>9,10)</sup>

#### 4. microRNA による遺伝子発現制御システムを搭載したアデノウイルスベクターの開発

そこで筆者らは Ad ベクターによる肝臓での遺伝子発現を特異的に抑制することを目的に、肝臓特異的 miRNA である miR-122a に対する完全相補配列をホタルルシフェラーゼ発現カセットの 3' 非翻訳領域に 4 コピー挿入した (Ad-L-122aT) (Fig. 4).<sup>11)</sup> またホタルルシフェラーゼ発現量を補正することを目的にウミシイタケルシフェラーゼ発現カセ

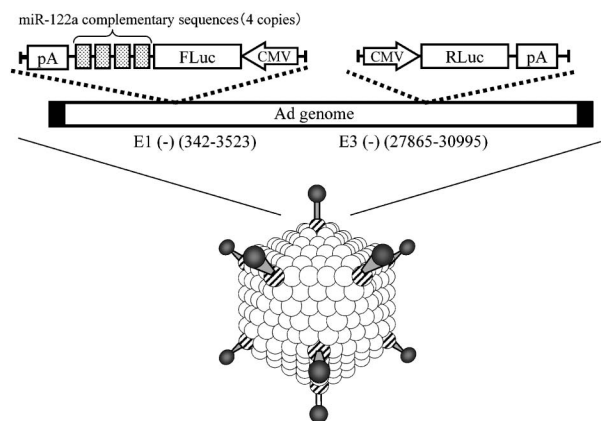


Fig. 4. Schematic Diagram of a Replication-incompetent Adenovirus Vectors Containing Four Copies of MiR-122a Fully Complementary Sequences in the 3'-untranslated Region of Firefly Luciferase Expression Cassette

FLuc, firefly luciferase; RLuc, renilla luciferase; pA, poly A signal; CMV, cytomegalovirus promoter.

ットを E3 欠損領域に挿入した。miR-122a は肝臓で最も高発現している miRNA であり、ヒト肝実質細胞で 1 細胞当たり 135000 コピー、マウス肝臓でも 1 細胞当たり 66000 コピー発現している (他の臓器では 50 コピー以下)。<sup>12)</sup> また本実験に先立ち、挿入する miRNA 標的配列のコピー数に関して検討したところ、4 コピー挿入することにより十分な遺伝子発現抑制効果が得られることを確認している (data not shown)。本 Ad ベクターをマウス B16 皮下腫瘍に局所投与し、腫瘍並びに肝臓における遺伝子発現を検討したところ、腫瘍での遺伝子発現は抑制されることなく、肝臓での遺伝子発現を従来の Ad ベクターによる遺伝子発現量の約 1% まで抑制

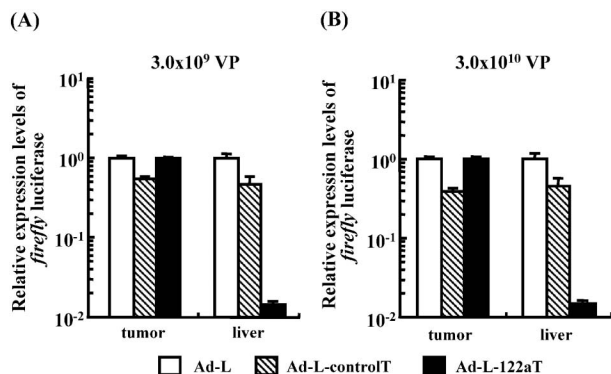


Fig. 5. *In Vivo* Transduction Efficiency of Ad Vectors Containing the MiR-122a Target Sequences Following Intratumoral Injection

B16 tumor-bearing mice were intratumorally injected with Ad vectors at  $3.0 \times 10^9$  VP (A) and  $3.0 \times 10^{10}$  VP (B), and the tumors and livers were recovered and subjected to luciferase expression analysis 48 h after injection. Firefly luciferase productions were normalized to *renilla* luciferase productions. Values are presented as the mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ ).

することに成功した (Fig. 5). 一方, 従来の Ad ベクター (Ad-L) 並びに miR-122a の標的配列を逆方向に挿入した Ad ベクター (Ad-L-controlT) では, 腫瘍のみならず肝臓でも高い遺伝子発現が観察された. なお, 腫瘍並びに肝臓に集積した Ad ベクターゲノム量については有意な差は認められなかったことから, 各 Ad ベクターの体内動態 (分布) に関しては各 Ad ベクター間に有意な差はなく, 腫瘍並びに肝臓における遺伝子発現の違いは転写後レベルでの遺伝子発現制御の違いによることが示唆された.

そこで次に, 上述の miR-122a による肝臓特異的な遺伝子発現抑制システムを Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) によるがん自殺遺伝子療法に応用した. HSV-TK は, 基質であるガンシクロピルをリン酸化することにより DNA 複製を阻害し, 優れた抗腫瘍効果を示す. したがって HSV-TK 発現 Ad ベクターをがんに局所投与した場合, 高い抗腫瘍効果を示す一方で, HSV-TK が肝臓で発現することにより強い肝毒性を示す. そこで筆者らは Ad ベクターに搭載した HSV-TK 発現カセットに miR-122a 標的配列を挿入することにより, 抗腫瘍効果を維持したまま, 肝臓における HSV-TK の発現を抑制し, HSV-TK による肝毒性を軽減することができるのではないかと考えた. HSV-TK 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-122a の標的配列を 4 コピー挿入した Ad ベクター (Ad-tk-

122aT) を作製し, B16 マウス皮下腫瘍に局所投与したところ, Ad-tk-122aT は, miRNA 標的配列を挿入していない HSV-TK 発現 Ad ベクター (Ad-tk-controlT) と同程度の優れた抗腫瘍効果を示した. 一方で, 投与 6 日後の肝臓を回収し肝障害を検討したところ, Ad-tk-controlT が顕著な肝障害を誘導したのに対し, Ad-tk-122aT 投与群では肝障害がほぼ PBS 投与群と同程度まで改善していた. さらに各 Ad ベクターを投与したマウスの体重変化についても検討したところ, Ad-tk-122aT 投与群では Ad-tk-controlT 投与群と比較し, 体重減少が有意に抑制されていた. 以上の結果より, 肝臓特異的 miRNA である miR-122a の標的配列を治療遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入することにより, その発現を肝臓特異的に抑制することに成功した. 本 Ad ベクターは HSV-TK のように発現細胞に対し毒性を示すような遺伝子を用いた場合において極めて有効であり, 抗腫瘍効果を維持したまま, 肝障害を大きく改善可能であることが示された.

##### 5. microRNA による遺伝子発現制御システムを搭載した制限増殖型アデノウイルスの開発

Ad ベクターに限らずすべての遺伝子導入ベクターにおいて, 投与後, がん組織を構成するすべてのがん細胞に遺伝子導入するのは困難であるため, 遺伝子導入されなかったがん細胞が残存し, がんの再発につながる危険性がある. これに対し, 腫瘍細胞のみで選択的に増殖し腫瘍細胞を死滅させる制限増殖型ウイルスは, 投与後, 最初に感染した腫瘍細胞で増殖したのち, 周辺細胞への新たな感染を繰り返すことにより腫瘍全体に感染可能であることから, 革新的ながん治療薬として期待を集めている. これまでに Ad,<sup>13,14</sup> ヘルペスウイルス,<sup>15,16</sup> はしかウイルス<sup>17,18</sup>などを基本骨格とした制限増殖型ウイルスが開発されている. そのうち, 制限増殖型 Ad では, ウイルスの増殖に必須の E1 遺伝子を腫瘍特異的プロモーター [ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase; hTERT) プロモーターや前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen; PSA) プロモーターなど] により転写させることにより, 腫瘍特異的な増殖・抗腫瘍効果を示すものが最も多く開発されている. 制限増殖型 Ad は培養細胞及び動物実験において優れた治療効果を示すとともに, 現在臨床研究が盛んに進められてお

り、優れた治療効果も報告されている.<sup>19,20)</sup> しながら問題点の1つとして、正常細胞においても低レベルながら E1 遺伝子が発現することにより、Ad が増殖する危険性が指摘されている。E1 タンパク質は少量であっても Ad の複製を十分にサポートする能力を有している。<sup>21)</sup> さらには、制限増殖型 Ad は腫瘍で増殖したのち全身循環に移行し、転移したがん細胞に感染・増殖することが報告されており、<sup>22,23)</sup> 制限増殖型 Ad を腫瘍に局所投与した場合であっても、全身の組織・細胞に制限増殖型 Ad が感染する可能性がある。したがって、正常細胞における制限増殖型 Ad の増殖を抑制するには、腫瘍特異的プロモーターに加えて、さらなる“安全装置”を搭載することが望ましい。そこで筆者らは正常細胞で高発現し、がん細胞にて発現が低下している miRNA の標的配列を E1 遺伝子発現カセット (E1A 遺伝子は Ad の自己増殖に必要不可欠であり、他のウイルス遺伝子の発現を誘導する) の 3' 非翻訳領域に挿入することにより、正常細胞での制限増殖型 Ad の複製をさらに抑制できるのではないかと考えた。これまでがん細胞で特異的に発現が低下している miRNA が数多く報告されている (Table 2)。筆者らは岡山大学・藤原俊義先生との共同研究の下、hTERT プロモーターによって転写される E1 遺伝子発現カセットの 3' 非翻訳領域に、がん細胞において特異的に発現が低下し、正常細胞で高発現していることが報告されている miR-143, -145, -199a, let-7a の標的配列を 4 コピー挿入した (Fig. 6)。まずこれらの制限増殖型 Ad を各種がん細胞に作用させたところ、miR-143, -145, -199a の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad は、miRNA 標的配列を挿入していない従来の制限増殖型 Ad と同様に効

率よく複製し、がん細胞を死滅させた。一方で、let-7a の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad による抗腫瘍効果は大きく抑制された。これは、let-7a が一部のがん細胞では正常細胞と比較しその発現量が減少しているものの、その発現量は他の miRNA と比較し 10 倍以上高いものであったためと推察された。次に、各種正常細胞に制限増殖型 Ad を感染させ、その増殖能について検討した。miR-143, -145, -199a の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad では、従来のものと比較し、感染 5 日後のウイルスゲノム量は最大 0.1% まで抑制されていた。特に miR-199a 標的配列を挿入した場合には、検討したすべての正常細胞において従来の制限増殖型 Ad と比較しその増殖が大きく抑制されていた。そこでさらに肝臓における制限増殖型 Ad の複製も同時に抑制することを目的に、miR-199a のみならず miR-122a の標的配列も合わせて挿入した制限増殖型 Ad を開発した。miR-199a 若しくは miR-122a 標的配列どちらか一方を挿入した場合には、用いたヒト初代正常細胞 (肺線維芽細胞、前立腺ストローマ細胞、肝実質細胞) のいずれかにおいて、十分な増殖抑制効果が認められなかったが、両者の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad では用いた正常細胞すべてにおいてその増殖が 1/10 以下に大きく抑制されていた。なお、両 miRNA の標的配列を 4 コピーずつ、計 8 コピー挿入しても制限増殖型 Ad による抗腫瘍効果に大きな影響は観察されなかった。以上の結果より、

Table 2. MicroRNAs Selectively Down-regulated in Tumor Cells

Breast Cancer	miR-125b, miR-145, miR-155
Brain Tumor	miR-128, miR-181
Lung Cancer	Let-7, miR-125a, miR-145
Liver Cancer	miR-101, miR-122a, miR-195
Bladder Cancer	miR-133a, miR-133b, miR-145
Prostate Cancer	miR-125b, miR-145, miR-221
Colorectal Cancer	miR-30c, miR-143, miR-145
Chronic Lymphatic Leukemia	miR-15, miR-16
Burkitt Lymphoma	miR-155

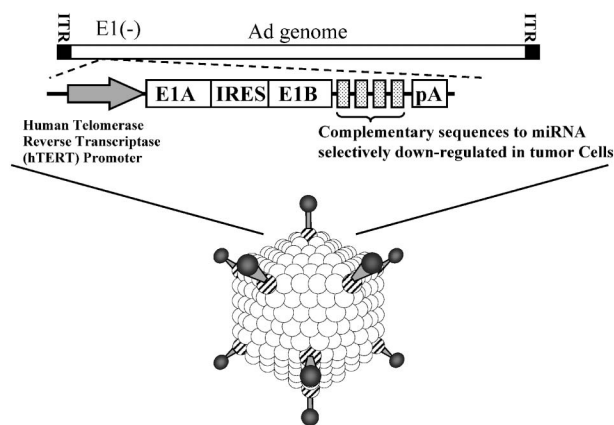


Fig. 6. Schematic Diagram of a Conditionally-replicating Adenovirus Containing the MiRNA-regulated E1 Gene Expression Cassette

Four copies of perfectly complementary sequences for miRNA selectively down-regulated in tumor cells were incorporated in the 3'-untranslated region of E1 gene expression cassette. IRES, internal ribosome entry site.

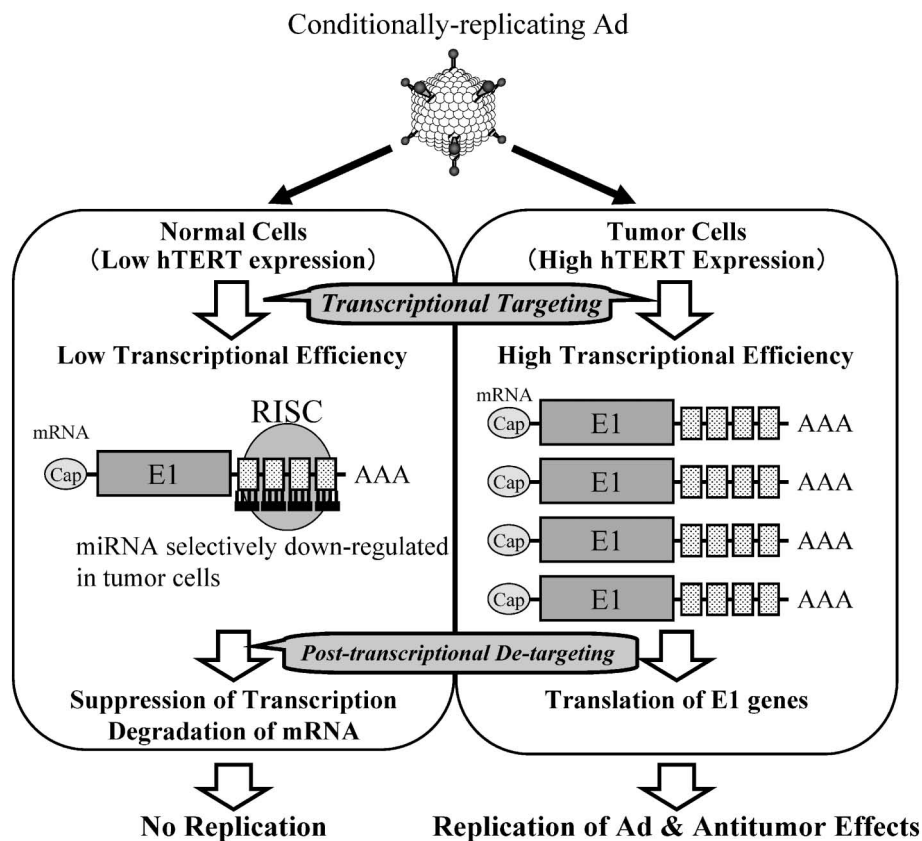


Fig. 7. Highly Tumor-specific Replication of Conditionally-replicating Adenovirus via Tumor-specific Promoter-mediated Transcriptional Targeting and miRNA-mediated Post-transcriptional De-targeting  
hTERT, human telomerase reverse transcriptase; RISC, RNA-induced silencing complex.

miRNA による Post-transcriptional De-targeting を利用することにより、正常細胞での制限増殖型 Ad の複製をさらに抑制可能であり、抗腫瘍効果を維持したまま、安全性を大きく向上させることに成功した。miRNA による遺伝子発現制御システムを搭載した制限増殖型 Ad では、まず腫瘍特異的プロモーターによる Transcriptional Targeting により E1 遺伝子の発現を転写レベルで制御するとともに、miRNA による Post-transcriptional De-targeting により転写後レベルにおいてもその発現を制御することにより、高い安全性を示すように設計されている (Fig. 7)。さらに今後は Ad の外殻タンパク質を改変することによる Targeted Delivery を組み合わせることにより、さらに高い安全性と有効性が得られるものと期待される。

## 6. おわりに

本稿では miRNA による Post-transcriptional De-targeting システムを搭載した遺伝子組換え Ad について紹介した。これまでにウイルス・非ウイルスベ

クターを問わず、数多くの遺伝子導入ベクターが開発されてきたが、安全かつ治療効果の高い遺伝子治療の実現に向けて、その要求すべてを十分に満たすベクターは依然として開発されていない。一方で、近年の目覚ましい分子生物学の進歩により様々な遺伝子発現制御機構が明らかになってきた。このように、明らかとなった種々の遺伝子発現制御機構を遺伝子導入ベクターに応用することにより、さらに高い安全性と有効性が確保できるものと期待される。わが国の遺伝子治療研究においては、遺伝子導入ベクターの開発・改良については比較的多くの研究者が従事しているものの、“遺伝子発現 (転写・翻訳) をいかに制御するか?” に関する研究は少ない印象を受ける。しかし本来、“Targeted Delivery” と “Targeted Expression” は、遺伝子導入・発現技術を構成するいわば両輪であり、両者の優れた技術を組み合わせることにより、遺伝子治療の成功につながるものと期待される。

**謝辞** 本稿で紹介した研究は、独立行政法人医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト（現幹細胞制御プロジェクト）、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野において行われたものであり、実験に協力して頂いた関係者の皆様に深く感謝いたします。また hTERT プロモーターを搭載した制限増殖型 Ad に関する実験試料を提供して下さいました岡山大学医学部・藤原俊義先生を始め関係者の皆様にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Hashida M., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 187–196 (2001).
- 2) Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K., *J. Control. Release.*, **65**, 271–284 (2000).
- 3) Lu B., Makhija S. K., Nettelbeck D. M., Rivera A. A., Wang M., Komarova S., Zhou F., Yamamoto M., Haisma H. J., Alvarez R. D., Curiel D. T., Zhu Z. B., *Gene Ther.*, **12**, 330–338 (2005).
- 4) Zhu Z. B., Makhija S. K., Lu B., Wang M., Kaliberova L., Liu B., Rivera A. A., Nettelbeck D. M., Mahasreshti P. J., Leath C. A., Barker S., Yamaoto M., Li F., Alvarez R. D., Curiel D. T., *Cancer Gene Ther.*, **11**, 256–262 (2004).
- 5) Brown B. D., Gentner B., Cantore A., Colleoni S., Amendola M., Zingale A., Baccarini A., Lazzari G., Galli C., Naldini L., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1457–1467 (2007).
- 6) Brown B. D., Venneri M. A., Zingale A., Sergi Sergi L., Naldini L., *Nat. Med.*, **12**, 585–591 (2006).
- 7) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.*, **8**, 813–821 (2003).
- 8) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Cancer Gene Ther.*, **9**, 236–242 (2002).
- 9) Toloza E. M., Hunt K., Swisher S., McBride W., Lau R., Pang S., Rhoades K., Drake T., Belldegrün A., Glaspy J., Economou J. S., *Cancer Gene Ther.*, **3**, 11–17 (1996).
- 10) Brand K., Loser P., Arnold W., Bartels T., Strauss M., *Gene Ther.*, **5**, 1363–1371 (1998).
- 11) Suzuki T., Sakurai F., Nakamura S., Kouyama E., Kawabata K., Kondoh M., Yagi K., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **16**, 1719–1726 (2008).
- 12) Chang J., Nicolas E., Marks D., Sander C., Lerro A., Buendia M. A., Xu C., Mason W. S., Moloshok T., Bort R., Zaret K. S., Taylor J. M., *RNA Biol.*, **1**, 106–113 (2004).
- 13) Kawashima T., Kagawa S., Kobayashi N., Shirakiya Y., Umeoka T., Teraishi F., Taki M., Kyo S., Tanaka N., Fujiwara T., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 285–292 (2004).
- 14) Yamamoto M., Davydova J., Wang M., Siegal G. P., Krasnykh V., Vickers S. M., Curiel D. T., *Gastroenterology*, **125**, 1203–1218 (2003).
- 15) Boviatsis E. J., Scharf J. M., Chase M., Harrington K., Kowall N. W., Breakefield X. O., Chiocca E. A., *Gene Ther.*, **1**, 323–331 (1994).
- 16) Andreansky S., Soroceanu L., Flotte E. R., Chou J., Markert J. M., Gillespie G. Y., Roizman B., Whitley R. J., *Cancer Res.*, **57**, 1502–1509 (1997).
- 17) Peng K. W., TenEyck C. J., Galanis E., Kalli K. R., Hartmann L. C., Russell S. J., *Cancer Res.*, **62**, 4656–4662 (2002).
- 18) Bucheit A. D., Kumar S., Grote D. M., Lin Y., von Messling V., Cattaneo R. B., Fielding A. K., *Mol. Ther.*, **7**, 62–72 (2003).
- 19) Nemunaitis J., Tong A. W., Nemunaitis M., Senzer N., Phadke A. P., Bedell C., Adams N., Zhang Y. A., Maples P. B., Chen S., Pappan B., Burke J., Ichimaru D., Urata Y., Fujiwara T., *Mol. Ther.*, **18**, 429–434 (2010).
- 20) Li J. L., Liu H. L., Zhang X. R., Xu J. P., Hu W. K., Liang M., Chen S. Y., Hu F., Chu D. T., *Gene Ther.*, **16**, 376–382 (2009).
- 21) Hitt M. M., Graham F. L., *Virology*, **179**, 667–678 (1990).
- 22) Taki M., Kagawa S., Nishizaki M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kyo S., Nagai K., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T., *Oncogene*, **24**, 3130–3140 (2005).
- 23) Kishimoto H., Kojima T., Watanabe Y., Kagawa S., Fujiwara T., Uno F., Teraishi F., Kyo S., Mizuguchi H., Hashimoto Y., Urata Y., Tanaka N., *Nat. Med.*, **12**, 1213–1219 (2006).