AAVベクターを用いた遺伝子治療

特集 臨床応用が迫る遺伝子治療の動向と国産技術の開発

小澤 敬也*

Gene therapy using AAV vectors

AAV (adeno-associated virus) vectors are considered to be promising gene-delivery vehicles for gene therapy, because they are derived from non-pathogenic virus, efficiently transduce non-dividing cells, and cause long-term gene expression. Appropriate AAV serotypes are utilized depending on the type of target cells. Among various neurological disorders, Parkinson's disease is one of the most promising candidates of gene therapy. On the other hand, intramuscular injection of AAV vectors is appropriate to protein-supplement gene therapy. Monogenic diseases such as hemophilia are suitable candidates.

アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターは、非病原性ウイルスに由来し、非分裂細胞に効率よく遺伝子導入でき、遺伝子発現が長期間持続することから遺伝子治療用ベクターとして期待されている。また、適切な血清型の AAV ベクターが標的細胞の種類に応じて用いられる。神経細胞を標的とした遺伝子治療については、パーキンソン病が最も有効性を期待できる対象疾患であると考えられている。筋細胞を標的とする場合は、蛋白質補充遺伝子療法への応用が考えられ、単一遺伝子病の血友病などが対象となる。

Keiya Ozawa*

key words : gene therapy, AAV vector, serotype, Parkinson's disease, hemophilia

遺伝子治療への応用が期待される遺伝子導入用ベクターの一つとして、アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) に由来するベクターが注目されている。AAV は、病原性を持たないことからウイルス学的には大きな研究対象とはならなかったが、遺伝子治療用ベクターへの応用を考えると、非病原性で安全であることが逆に大きな利点となっている。

また、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療では、レトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) のケースで問題になったように、挿入変異を引き金にした白血病発症は未解決の難問として立ちはだかっている。幹細胞レベルを標的とする遺伝子治療では、当面はゲノム操作の安全性確保に関する基礎研究に力を一層入れていく必要がある。

一方で、神経細胞や筋細胞などの終末分化細胞を

標的とする遺伝子操作は、比較的安全性が高いと考えられ、そのようなタイプの遺伝子治療は実用化が早く進むと思われる。AAV ベクターは、終末分化した非分裂細胞では、効率よく遺伝子導入することができ、遺伝子発現が長期間持続することから、臨床応用に向けた開発研究が一段と活発になっている。

このような AAV ベクターの特徴を活かした遺伝子治療の対象疾患としては、神経細胞を標的とする場合はパーキンソン病が第 1 候補であり、筋細胞の場合は蛋白質補充遺伝子療法 (血友病など) への応用が考えられる。特に前者のパーキンソン病については、2004 年 12 月に臨床研究がアメリカでスタートし、2007 年 5 月には自治医科大学でも第 1 例目が実施された。

基礎研究面での進歩としては、ヒト細胞に感染しうる AAV の血清型にはさまざまな種類があることが知られるようになり、現在、1 型から 11 型まで報告されている。以前は AAV2 ベクターが主に研究されてきたが、標的細胞の種類に応じて、

* Division of Hematology, Department of Medicine, and Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University 自治医科大学内科学講座血液学部門, 分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

図1 AAVベクターによる遺伝子導入
標的細胞のレセプターへの結合から核内での遺伝子発現まで

異なった血清型の AAV ベクターを使い分けるようになっている。その他、発現効率の高い self-complementary AAV ベクターの開発も注目されるようになっている。

本稿では、AAV ベクターを用いた遺伝子治療について、現状を簡単に紹介する。

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 1960 年代に発見され、動物ウイルスのなかで最も小型の線状一本鎖 DNA ウィルスであるパルボウィルスの仲間に属する。

AAV はごくありふれたウイルスであり、たとえば、2 型 AAV (AAV2) に対しては、成人の約 85% が抗体を有している。ウイルス粒子は直径 20~26 nm で、エンベロープはなく、物理化学的にきわめて安定である。すなわち、加熱 (56℃, 60 分)、広範囲の pH、プロテアーゼ、界面活性剤などに対して抵抗性を示す。AAV は宿主域が広く、種々の細胞に感染するが、血清型により組織特異性に違いがみられる (後述)。AAV2 のレセプターはヘパ

ン硫酸¹⁾で、FGF レセプター²⁾、 $\alpha V\beta 5$ インテグリン³⁾、HGF レセプター (c-Met)⁴⁾などがコレセプターとして働くとされている。その他、シアル酸^{5,6)}やラミニンレセプター⁷⁾が種々の AAV のレセプターとなり、また PDGF レセプターが AAV5 のコレセプターになっていること⁸⁾が報告されている (図 1)。

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 ITR (inverted terminal repeat) とよばれる 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。ゲノムの左半分が非構造蛋白質、すなわち複製や転写を司る調節蛋白質の Rep をコードし、ゲノムの右半分が構造蛋白質である VP1, VP2, VP3 の三つのカプシド蛋白質をコードしている (図 2)。

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

図 2

AAV のゲノム構造

AAV のゲノムは、両端に T 字型ヘアピン構造の ITR を持ち、その間の直線状一本鎖ゲノムの左半分は Rep 蛋白質を、右半分はカプシド蛋白質 (VP1, VP2, VP3) をコードしている。非構造蛋白質の Rep はウイルスゲノムの複製、転写調節、第 19 番染色体 AAVS1 領域への組込みを司り、large Rep (Rep78, Rep68) と small Rep (Rep52, Rep40) が存在する。VP2 と VP3 は同じ転写産物から翻訳されるが、VP2 の翻訳開始コドンとしては ACG が使われる。ITR はウイルスゲノム複製時のセルフプライマーとなり、また染色体への組込み、ウイルス粒子へのパッケージングに必要な構造である。

組み込まれるのが特徴的である。この組込みは非同組換えによるものであり Rep が関与している。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、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)。

AAV ベクター作製法

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) (図 3) 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は、別の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 (E1A, E1B, E2A, VA, E4orf6) のうち、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) がもともと持っている 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⁹⁾。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し、塩化セシウムを用いた密度勾配超遠心法やカラム法などにより分離・精製を行う¹⁰⁾。

遺伝子導入用ベクターとしての特徴

AAV ベクターは、野生型 AAV が非病原性ウイルスであることから安全性が高い。この点が AAV ベクターの最大のメリットである。さらに、非分裂細胞への遺伝子導入が可能であり、体内法 (*in vivo* 法、特に *in situ* 法) に適したベクターである。一方、弱点としては、遺伝子発現効率がそれほど高くない。

すなわち、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り (図 1)、その効率は必ずしもよくないと考えられている。遺伝子発現がピークに達するのに 1, 2 週間以上かかることも、そのような事情による。二本鎖になる経路としては、プラス鎖とマイナス鎖のアニーリングによるものと、セカンド鎖の合成によるものが考えられているが、非分裂細胞では前者が主体のようである。なお、投与した AAV ベクターの大半は細胞内で破壊されてしまうため、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。

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。ただし、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は可能である¹¹⁾。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

図3 AAVベクターの作製法

- a : 3種類のプラスミドベクターを293細胞へトランスフェクションすることにより、AAVベクターを作製する。
- b : 293細胞の核内でベクターゲノムが複製し、カプシドに包まれることを示している。古典的な方法ではアデノウイルスを共感染させたが、アデノウイルスのヘルパー作用を担う遺伝子が明らかにされており、現在はその遺伝子を搭載したアデノウイルスヘルパープラスミドが代わりに用いられる(アデノウイルスフリーシステム)。
- c : 野生型AAVと遺伝子組換え型AAV(AAVベクター)のゲノム構造を比較して示している(Enh+Pは、エンハンサーとプロモーターのことである)。

伝子を取り除いてあるのが原因と考えられており、染色体DNAへの組込み自体がほとんど起こらない¹²⁾。導入遺伝子のほとんどは核内でコンカテマーの状態安定して存在する。したがって、増殖細胞の場合は導入遺伝子が早期に失われやすいため、標的細胞としては不向きである。なお、導入遺伝子が低頻度であるが標的細胞の染色体DNAに組み込まれた場合、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肝細胞の場合に示されている¹³⁾。ただし、終末分化した非分裂細胞の場合は、挿入変異によるがん化の問題をそれほど心配する必要はないものと思われる。

AAVベクターの標的細胞としては、神経細胞^{14,15)}、筋細胞^{16,17)}(特に、ヘパラン硫酸に富む遅

筋に効率よく遺伝子導入されると報告されている¹⁸⁾、肝細胞^{19,20)}などの非分裂細胞が適していると考えられる。このような細胞では遺伝子発現の持続期間もかなり長期に及ぶ。遺伝子産物に免疫原性や細胞毒性がなければ、1回のベクターの投与で数年間にわたり遺伝子発現が持続する。

ここ数年のトピックスとしては、AAVベクターの血清型と組織特異性に関する知見が大きく蓄積された(表1)^{21~25)}。以前は、AAV2をベースとしたベクターが主に用いられてきたが、神経系にはAAV5ベクターが効率よく(神経細胞への特異的遺伝子導入にはAAV2ベクターが適している)、筋細胞を標的とする場合にはAAV1ベクター、肝細胞への遺伝子導入にはAAV8ベクターが適している。各臓器・組織によってAAVベクターの至適血清型

表1 AAVベクターの主な血清型と組織特異性

血清型	由来	主な標的組織
AAV1	サル	筋肉(3+), 肝臓(1+), 気道, 神経細胞
AAV2	ヒト	筋肉(1+), 肝臓(1+), 神経細胞
AAV3	ヒト	(AAV-2に類似?)
AAV4	サル	筋肉(1+), 脳室上皮細胞
AAV5	ヒト	筋肉(2+), 肝臓(2+), 神経細胞, グリア細胞, 気道
AAV6	1型+2型	(AAV-1とほぼ同一)
AAV7	サル	筋肉(2+), 肝臓(2+)
AAV8	サル	筋肉(2+), 肝臓(3+)
AAV9	ヒト	筋肉(2+), 肝臓(2+), 気道

注) 括弧内は遺伝子発現レベルを示す。数値は、標的組織ごとに、AAV2ベクターを基準とした場合のおおよその目安である。

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。

最近、脚光を浴びているものとして、self-complementary AAV(scAAV)ベクターというユニークな方法がある(図4)²⁶⁾。これはプラス鎖とマイナス鎖が繋がった状態でカプシドに包まれたベクターで、標的細胞内ですぐに二本鎖の状態になることから、遺伝子発現が効率よく起こる。すなわち、遺伝子発現が素早くピークに達するだけでなく、従来の一本鎖AAVベクター(ssAAV vector)にくらべて、少ないベクター量でより高い発現レベルが得られるのが特長である。ただし、ベクターに搭載されるゲノムサイズが従来法の半分になることから、かなり小さな遺伝子でないと応用することはできない。

遺伝子治療臨床研究への応用

神経細胞を標的とした遺伝子治療については、パーキンソン病を対象とした臨床研究が相次いでスタートしている。パーキンソン病は、黒質-線条体系ドー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ー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²⁷⁾。

臨床応用の第一段階では、黒質-線条体系の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC:L-DOPAをドー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重症患者を対象とし、L-DOPA内服にAAV-AADCの線条体への注入(定位脳手術)を組み合わせる治療法が検討されている。この方法では、線条体におけるドーパミン産生を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。アメリカUCSFで臨床研究が2004年12月に開始されており、これまで(2007年)に第9例の遺伝子治療が実施されている。わが国でも自治医科大学からの申請(総括責任者:中野今治神経内科教授)が、2006年に厚生労働省の承認を得ており、2007年5月に遺伝子治療臨床研究がスタートした。

なお、上記の方法は、不足するドーパミンを補充する対症療法的アプローチであり、ドー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出来ない。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²⁸⁾。臨床研究としては、neurturin遺伝子を用いた方法がアメリカで実施され、現在は第2相臨床研究に移行している。

パーキンソン病に対する異なったアプローチとしては、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γ-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^{29,30)}、第1相臨床研究がやはりアメリカで行われている。

上述の臨床研究では、すべて2型のAAVベクターが用いられてきたが、1型のAAVベクターを用いた臨床研究も網膜疾患を対象としてすでにはじまっている。

筋細胞を標的とした遺伝子治療では、蛋白質補充遺伝子療法への応用が検討されている。たとえば、血友病B(凝固第IX因子活性の低下)に対して、第IX

図4 Self-complementary AAV(scAAV) vector

左図は、通常の本鎖 AAV ベクターで、標的細胞内で二本鎖になる必要があり、遺伝子発現に時間がかかり、効率もわるい。右図は、scAAV ベクターの場合で、最初から二本鎖になっているために、すぐ遺伝子発現し、発現効率もよい。ただし、大きなサイズの遺伝子を搭載することは出来ない。

因子遺伝子を搭載した AAV ベクターを筋注する臨床研究が実施され、当初は血中凝固因子レベルの上昇と臨床的効果が軽度認められたと報告された³¹⁾。しかしながら、その後、ベクター量を増やした段階で明瞭な効果が観察されず、結局、臨床研究は中止となった³²⁾。

そこで、本来の第Ⅸ因子の産生部位である肝臓に遺伝子導入する方針に変更され、肝動脈へ AAV ベクターを注入する遺伝子治療臨床研究が実施された。この方法は、血友病犬では良好な結果が得られていたが、血友病患者ではウイルスカプシドに対する免疫反応から肝細胞障害が惹起され、導入遺伝子の発現が長期間持続しなかったことが報告されている³³⁾。現在は、免疫抑制をかけながら遺伝子治療を行う臨床研究の準備が進められている。ただし、一部の組織での遺伝子発現で治療効果が得られるパーキンソン病の場合と異なり、蛋白質補充遺伝子療法では導入遺伝子産物の血中濃度をあるレベルまで高める必要があり、身体の大きなヒトでそれを実現させるのはきわめて困難である。マウスやラットなど

の小動物では容易に治療効果が得られるのに対し、臨床研究が順調に進まないのは、このようなサイズの問題も大きいと思われる。一つの対策としては、発現効率のよい scAAV ベクターを用いる臨床研究の実施が待たれている。

その他、がんを対象とする場合は、がん病巣を養う血管(腫瘍血管)をターゲットにした治療ストラテジーが注目されている。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)³⁴⁾、インターロイキン-10(IL-10)³⁵⁾、NK4(HGF アンタゴニスト)³⁶⁾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。担がん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。最近はさらに、sFlt-4 を発現させ、リンパ行性転移を防ぐ治療ストラテジーの研究も行われている。

おわりに — 安全性について

AAV ベクターを使って遺伝子導入する場合に

は、必ずしも野生型 AAV の感染ルートを利用するわけではないため、慎重に安全性を見極めていく必要がある。これまでの臨床研究における AAV ベクターの筋注法では、筋肉の障害や炎症性細胞の浸潤などは認められず、安全性の点で問題は生じていない。脳内へのベクターの注入の場合も、パーキンソン病患者で実施された臨床研究では、AAV ベクターによる問題は生じていない。一方、肝臓に投与した場合は、前述のように、一過性の肝障害が惹起され、ウイルスカプシドに対する免疫反応が原因と考えられている。

遺伝子治療全般の問題でもあるが、このような免疫反応の問題を克服することが、遺伝子治療実用化に向けて重要課題の一つであると認識されるようになっている。導入遺伝子産物に対する免疫反応も、遺伝性疾患を対象とする場合には大きな問題となる。たとえば、血友病に対する遺伝子治療のモデル動物実験では、免疫抑制をかけないと、凝固因子の血中レベルを高く維持できないことが示されている。抗原特異的な免疫寛容の誘導に関する研究の進歩が待たれる。

その他、関節リウマチに対する遺伝子治療臨床研究(可溶性 TNF- α 受容体を発現する AAV ベクターを関節腔内に投与する遺伝子治療)で、2007 年 7 月に死亡例が報告され、マスコミで採り上げられ、問題となった。しかし、その後の調査で、死因は全身性ヒストプラスマ症で、その患者は遺伝子治療実施日にすでに微熱があり、直前の血液サンプルからヒストプラスマがわずかに検出されたことが明らかにされた。したがって、それまでの治療で患者が強い免疫抑制状態にあったために感染症で亡くなったものであり、AAV ベクター自体による副作用ではないことが判明した。

文 献

- 1) 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.
- 2) Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V et al. : Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5 : 71-77, 1999.
- 3) Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ : SVV5 integrin : a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection.

- Nat Med* 5 : 78-82, 1999.
- 4) Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T et al. : Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79 : 609-614, 2005.
- 5) Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA : Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 75 : 6884-6893, 2001.
- 6) Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ : α 2,3 and α 2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol* 80 : 9093-9103, 2006.
- 7) Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H et al. : The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* 80 : 9831-9836, 2006.
- 8) Pasquale GD, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D et al. : Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* 9 : 1306-1312, 2003.
- 9) Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L et al. : Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5 : 938-945, 1998.
- 10) Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H et al. : Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* 13 : 823-828, 2006.
- 11) Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D et al. : 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.
- 12) Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR : Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77 : 3495-3504, 2003.
- 13) Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M et al. : AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34 : 297-302, 2003.
- 14) Fan D, Ogawa M, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogasawara Y et al. : 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.
- 15) Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM et al. : Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther* 18 : 195-206, 2007.
- 16) Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D et al. : Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 5 : 56-63, 1999.
- 17) Riviere C, Danos O, Douar AM : Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* 13 : 1300-1308, 2006.
- 18) Pruchnic R, Cao B, Peterson ZQ, Xiao X, Li J et al. : The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Hum Gene Ther* 11 : 521-536, 2000.
- 19) Nakai H, Herzog RW, Hagstrom JN, Walter J, Kung SH et al. : Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer

- of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood* 91 : 4600-4607, 1998.
- 20) Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA et al. : Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 5 : 64-70, 1999.
 - 21) Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ et al. : Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* 2 : 619-623, 2000.
 - 22) Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W et al. : 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.
 - 23) Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J et al. : Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 11854-11859, 2002.
 - 24) Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R et al. : Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78 : 6381-6388, 2004.
 - 25) Wu Z, Asokan A, Samulski RJ : Adeno-associated virus serotypes : vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14 : 316-327, 2006.
 - 26) Nathwani AC, Gray JT, Ng CY, Zhou J, Spence Y et al. : Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107 : 2653-2661, 2006.
 - 27) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K et al. : 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.
 - 28) Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K et al. : 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.
 - 29) During 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.
 - 30) Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y et al. : Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298 : 425-429, 2002.
 - 31) Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB et al. : Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24 : 257-261, 2000.
 - 32) Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW et al. : AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101 : 2963-2972, 2003.
 - 33) Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M et al. : Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12 : 342-347, 2006.
 - 34) Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y et al. : Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 120 : 278-284, 2007.
 - 35) Kohno T, Mizukami H, Suzuki M, Saga Y, Takei Y et al. : Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res* 63 : 5091-5094, 2003.
 - 36) Saga Y, Mizukami H, Suzuki M, Urabe M, Kume A et al. : Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. *Gene Ther* 8 : 1450-1455, 2001.