5. レトロウイルスベクターによる遺伝子治療

塙 秀樹, 島田 隆

はじめに

レトロウイルスベクターはレトロウイルスに属するオンコウイルス、レンチウイルスなどを基に遺伝子組み換え技術により作られたベクターの総称である (図1)。アデノウイルスやアデノ随伴ウイルスを基にしたベクターでは導入遺伝子が染色体に組み込まれないか、もしくは組み込みの効率が悪いと細胞分裂とともに導入遺伝子が希釈されてしまう。従って血液細胞などの細胞分裂を繰り返す細胞で長期にわたり遺伝子を発現させる必要がある遺伝子治療には向かない。レトロウイルスベクターは導入遺伝子が染色体に組み込まれるためこのような遺伝子治療に向いているが、その反面、遺伝子導入部位がほぼ無作為に選択されるため白血病などの悪性新生物の原因となることが危惧されていた。2002年にフランスの Alain Fisher らのグループから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) の遺伝子治療で著明な治療効果を得られたことが報告され脚光を浴びた^{1,2)}。しかし、その直後に治療を受けた10症例中2症例で白血病を発症したことが衝撃と共に伝えられた^{3,4)}。本稿では最近のレトロウイルスベクターの進歩、臨床試験で治療効果の認められた重症複合免疫不全症の経過、報告された遺伝子治療関連白血病発症の機序、これからの研究の方向性などについて述べる。

I. レトロウイルスベクター

(1) オンコレトロウイルスベクター

一般的にレトロウイルスベクターという呼称はオンコウイルスである moloney murine leukemia virus (MoMLV) などのマウス白血病ウイルスから作られたベクターのこと

を指し、以下に述べるレンチウイルスベクターと区別するためにオンコレトロウイルスベクターと呼ばれることもある。

オンコウイルスはウイルスの構造タンパク、プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼなどになる前駆蛋白をコードする gag/pol 遺伝子、エンベロープ糖蛋白をコードする env 遺伝子を持ち、その両端をエンハンサー、プロモーター、ポリアデニレーションシグナルなどのエレメントが含まれる LTR (long terminal repeat) で挟まれている。この LTR から gag/pol 蛋白が翻訳される全長の mRNA と env 蛋白が翻訳されるスプライスされた mRNA が転写される。全長の mRNA は同時にウイルスの RNA ゲノムとしてウイルス粒子の中に取り込まれる。

遺伝子治療用のベクターでは感染力を保ちつつ自己複製を不可能にするために、これらのコンポーネントが2つもしくは3つに分割されている。すなわちウイルスベクターの gag/pol と env 遺伝子を発現する1つもしくは2つのパッケージング・プラスミドとベクターの RNA ゲノムを産生するためのトランスファーベクター・プラスミドである。トランスファーベクターはウイルスの RNA ゲノムから gag/pol 遺伝子の大部分と env 遺伝子が削除され、その代わりに遺伝子治療の目的遺伝子の cDNA が挿入されている。標的細胞内でこの cDNA は LTR のプロモーターにより転写されるが、第2の cDNA を転写するために内部にもう一つのプロモーターを挿入されることもある。

レトロウイルスベクターはこれらのプラスミドを293T細胞などにトランスフェクションした後この細胞の培養液を回収することにより作ることができるが、この方法では、(1) ベクターを含む培養液中にプラスミド DNA が混入するおそれがあること、(2) 大量の均一なベクターストックを作成することが困難なこと、(3) プラスミド DNA の再構成により野生型のウイルスが生成される可能性があることなどが懸念される。遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクターを作成する場合これらの問題を回避するため、これらのプラスミドを個別にパーマネント・トランスフェクションもしくはウイルスを用いたトランスダクションにより NIH-3T3 細胞や293細胞などに導入しプロデューサー細胞株を樹立する方法がとられる (図2)。

日本医科大学 第二生化学
(〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5)
Gene Therapy Using Retroviral Vectors
Hideki Hanawa, Takashi Shimada
Biochemistry and Molecular Biology Nippon Medical School
1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602
TEL: 03-3822-2131
FAX: 03-5814-8156

MLV (Moloney murine leukemic virus)

HIV (Human immunodeficiency virus)

図1 レトロウイルスの構造

図2 レトロウイルスベクターの作製

(2) トランスファーベクターの改良

レトロウイルスベクターは遺伝子導入後に染色体に組み込まれるために恒久的な遺伝子の発現が期待されるが、実際にはその遺伝子発現は不安定で、標的細胞内に導入遺伝子が存在するにもかかわらず発現が認められなくなることもある（サイレンシング）。これは、MoMLVのLTRに存在するエンハンサー・プロモーターはCpGメチレーションにより不活化される傾向があること、また、そのLTRにnegative control region (NCR)が存在すること、5'LTRの下流にrepressor binding site (RBS)が存在することが原因であると思われる。RBSは逆転写の開始部位となるprimer binding site (PBS)と重なっており、F9 embryonal carcinoma (EC)細胞やmouse embryonal stem (ES)細胞、ヒトの幼弱な造血細胞で遺伝子の発現を抑制する。こ

れらを克服すべく改良されたMSCVベクター⁵⁾、MNDベクター⁶⁾、MFG-S⁷⁾ベクターなどが作られ、広く使われるようになってきている。

(3) エンベロープの改良

古くから使われているオンコレトロウイルスベクターのエンベロープにはマウスだけに感染することができるecotropicエンベロープとマウスとヒトの両方に感染することができるamphotropicエンベロープがある。amphotropicエンベロープでシュドタイプされたレトロウイルスベクターは初期の大型動物モデルや臨床試験ではあまり思わしい成績が得られなかった。これは標的細胞にamphotropicエンベロープの受容体(Pit-2)が比較的少ないことが原因と考えられている^{8,9)}。現在いろいろなウイルスのエンベ

ロープが比較検討されており、必ずしも一致した結果は得られていないが Gibbon ape leukemia virus (GaLV) エンペロープ (受容体; Pit-1)¹⁰⁾, Feline endogenous retrovirus (RD114) envelope (受容体; sodium-dependent neutral-amino-acid transporter)¹¹⁾などが優れた遺伝子導入効率を示している¹²⁻¹⁴⁾。また、同じエンペロープを使った場合、マウス由来のプロデューサー細胞よりもヒト由来のプロデューサー細胞を使った方がヒトやヒトの細胞への遺伝子導入効率は高いようである¹²⁾。

(4) 遺伝子導入条件の改良

幼弱な造血細胞に遺伝子導入を行う場合プロデューサー細胞と共培養すると導入効率が上がることは報告されていた。しかし、レトロネクチン (CH-296) の出現によりプロデューサー細胞と共培養せずとも高い遺伝子導入効率が得られるようになった。レトロネクチンはウイルスベクターと細胞をそれぞれ結合する部位を持ち、これらを物理的に近づけることにより遺伝子導入を促進しているものと考えられている。また、造血細胞がレトロネクチンと結合することにより何らかの生存シグナルを伝えていることも考えられている。

また、最近のリコンビナント技術の進歩により幼弱な造血細胞を刺激するサイトカインが利用可能となった。IL-3, IL-6 に比べて SCF, Flt 3-L, TPO などのサイトカインは未分化な造血細胞を刺激すると考えられているが、これらのサイトカインの組み合わせにより比較的細胞分裂がゆっくりであると考えられている造血幹細胞の自己複製能を損なうことなく細胞分裂させることが可能になってきた。このことにより以前はオンコレトロウイルスベクターが苦手とされていた造血幹細胞への遺伝子導入が可能となってきた^{2, 15)}。

II. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), simian immunodeficiency virus (SIV) などのレンチウイルスから作られたベクターの総称である。オンコレトロウイルスベクターはレインテグレーション複合体が染色体 DNA にたどり着くために細胞分裂時の核膜消失が必要であるため細胞分裂していない細胞に遺伝子導入することができない。このためレトロウイルスベクターは細胞分裂しないか、していても非常にゆっくりであると思われる造血幹細胞、神経細胞、肝細胞、筋細胞に遺伝子導入するには不向きである。一方、レンチウイルスはブレインテグレーション複合体に積極的に核膜を通過する機能があるのでこういった標的細胞には潜在的に有利である。

レンチウイルスベクターの中でもっとも研究が進んでいるのは HIV-1 ベクターであるが、HIV-1 は AIDS の原

因ウイルスであるため、執拗なほど安全面での改良が行われてきた。第二世代 HIV-1 ベクターで行われた vif, vpr, vpu, nef 蛋白の削除¹⁶⁾, 第三世代 HIV-1 ベクターで行われたパッケージング・プラスミドの多分割, tat 蛋白の削除, SIN (self-inactivating) ベクター化がそれぞれである^{17, 18)}。一方で、HIV-1 ベクターの遺伝子導入能力を高める努力も行われ、cPPT/CTS (central polypurine tract/central termination sequence) のトランスファーベクターへの導入は HIV-1 本来の感染能力を回復させベクターの能力を飛躍的に向上させた。

遺伝子治療を行う場合プロデューサー細胞株を作成することが望ましいが、HIV-1 蛋白の細胞毒性のため高力価なプロデューサー細胞株を作成するのに困難を極めていた。最近オンコレトロウイルスベクターを用いて HIV-1 ベクターのパッケージング・コンポーネントを細胞株に導入することにより高力価なパッケージング細胞株が作られたことが報告された¹⁹⁾。しかしながら依然として SIN ベクターを用いて安定した高力価なプロデューサー細胞株を作成することは困難なようである。

論理的にオンコレトロウイルスベクターよりも遺伝子導入効率が優れているが、オンコレトロウイルスベクターの改良、遺伝子導入技術の進歩によりアドバンテージが見えにくくなっている。サルなどの大型動物の造血幹細胞の細胞分裂などの動態はヒトに近く、臨床試験を予測する上で有用なデータが得られると信じられているが、最近の HIV-1 ベクターによるサルの造血幹細胞へのマーキングスタディではあまり良好な結果が得られていないことも HIV-1 ベクターには逆風となっている^{20, 21)}。しかし、これはレンチウイルスと宿主動物の種異性に起因する結果であり、最近の我々の最近の研究では SIV ベクターを用いれば Rhesus Monkey モデルでかなり高い遺伝子導入効率と安定した遺伝子発現が得られることがわかってきた。今後、HIV-1 ベクターなどのレンチウイルスベクターは鎌状赤血球症の遺伝子治療のように複雑な遺伝子発現カセットを高効率に遺伝子導入することが必要な領域で進化を続けていくものと思われる。

III. レトロウイルスベクターによる先天性重症複合免疫不全症の遺伝子治療

(1) アデノシンデアミナーゼ欠損重症複合免疫不全症 (ADA-SCID)

ADA-SCID はアデノシンデアミナーゼ遺伝子異常による先天性重症免疫不全症である。標的細胞としては造血幹細胞が理想的であったが当時の技術としては十分な遺伝子導入が不可能であったため、1990年からアメリカの NIH のグループが成熟 T 細胞を標的細胞とした遺伝子治療を 2 人の患者を対象に開始した²²⁾。この疾患では本来なら末梢血液にリンパ球がほとんど存在しないが、このころから

図3 遺伝子治療後のX-SCID患者の末梢血T細胞数の経過

(Hacein-Bey-Abina S. et al. Science 302: 415-419, 2003より抜粋)

開始された酵素補充療法 (PEG-ADA) が奏功しT細胞を回収することが可能になっていた。これらの患者から回収したT細胞に生体外でADA遺伝子発現レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し患者の体に返還するという治療を2年間にわたり繰り返した。遺伝子治療中も酵素補充療法を続けていたため遺伝子治療単独の治療効果の評価は難しいが、治療開始後から現在までの10年以上の期間末梢血中に遺伝子導入されたT細胞が存在し続けており、また特に有害事象は発生していない。その後同様の遺伝子治療がイタリアおよび日本で行われほぼ同様の結果を得ている^{23,24)}。

骨髓造血幹細胞を標的としたADA-SCIDの遺伝子治療は1992年からイタリアのグループで開始され²³⁾、続いてフランス、イギリスでも開始された。1993年からはNIHのグループが臍帯血造血幹細胞を標的とした遺伝子治療を開始した²⁵⁾。現在まで有害事象は報告されていないが、いずれも遺伝子導入効率は低く長期にわたる治療効果を得るには至っていない。

2002年にイタリアのグループから最新技術を用いた遺伝子治療で治療効果を得たとの報告がなされた¹⁵⁾。彼らは骨髓から採取したCD34陽性細胞をSCF, FLT3-L, Thrombopoietin-m, IL-3で刺激し、レトロネクチンでコートされたフラスコ内で遺伝子導入を行った。免疫システムの完全なあるいは部分的な再構築を認め感染症もまた再発性の感染症も消失した。この臨床試験が成功した理由には改善された遺伝子導入技術に加え、骨髓移植に際してブスルファンによる非骨髓破壊的前処置を行ったこと、対象患者が事情により酵素補充療法を受けることができなかったため遺伝子導入された細胞が選択的に増殖できたことなどがあげられる。

(2) X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)

X-SCIDはIL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, およびIL-21に共通するγ鎖 (common γ chain; γc) の遺伝子異常により発症する。これらのレセプターからの刺激はT

細胞, B細胞, NK細胞などの分化増殖に重要である。そのため患者の末梢血にはT細胞, NK細胞は認められず、またB細胞は正常またはそれ以上に認めるもののγグロブリンは認めない。このため感染症を繰り返しその大部分は生後1年以内に死に至る。治療法は骨髓移植である。骨髓移植後の生存率はHLA適合ドナーが見つかった場合で90%, HLAハプロ適合の場合70%-78%といわれている。しかし、必ずしもドナーが見つかるわけではなく、またドナーが見つかり骨髓移植が成功してもGVHDの危険は常につきまとい、しかもB細胞の機能が回復することはまれで免疫グロブリン製剤の定期的輸注が必要である。

骨髓移植の有望な代替療法として遺伝子治療が考えられた。この疾患もADA-SCIDと同様に単一遺伝子の異常による疾患なので、γc遺伝子発現レトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞に遺伝子導入すればよいと考えられる。しかも、γcが関与しているサイトカインレセプターは直接リンパ球の増殖に関与しているので、たとえ遺伝子導入効率が悪くても遺伝子導入により修正されたリンパ球が選択的に増幅されていくと考えられ、遺伝子治療に好都合である。

ヒトでの臨床試験は1999年にフランスのAlain Fisherらのグループで開始された^{1,2)}。まず骨髓細胞を採取しCD34陽性細胞に純化した後にサイトカイン (SCF, FLT3-L, MGDF, IL-3) で造血幹細胞を刺激し、次にレトロネクチンでコートした滅菌バッグ中でベクターを含む培養液で培養し遺伝子導入した。ベクターを含む培養液は24時間おきに新鮮なものと交換され、CD34陽性細胞は計3回ベクターに暴露されている。その後、CD34陽性細胞を回収し患者に前処置なしで投与した。

総数で10人の患者に遺伝子治療を行い、うち9人で末梢血注にT細胞, NK細胞, γグロブリンなどの出現を認めた (図3)。残りの一人はB細胞, 単球の一部に導入された遺伝子を認めたが、T細胞は出現しなかった。この患者はこの後骨髓移植を受け、2002年の報告の時点ではT細胞の増加傾向を認めたとのことである。また、2002年の報

告の段階で治療効果を認めた4人中1人では低 γ グロブリン血漿が持続し、また別の1人では予防接種に対する免疫応答を認めなかったとのことである。最終的に治療効果のあった9人中、この免疫の再構築が不十分であった2人がT細胞性白血病を発症している⁴⁾。

Patient 4は遺伝子治療後約30ヶ月で $\gamma\delta$ T細胞の増加を認め、同時期に感染していた水痘によるものと考えられていたが、T細胞数はそのまま指数的に増加した。遺伝子治療後約34ヶ月の時点で脾腫、骨髓浸潤を認め、末梢血細胞の細胞膜表面抗原は成熟T細胞型、免疫スコop分析で $\gamma\delta$ TCRの単クローン(V γ 9 V δ 1)を示し、また染色体異常(der(13)t(6;13))も認めた。これらによりT細胞急性白血病と診断され化学療法を施行。遺伝子治療後40ヶ月に非血縁HLA適合ドナーから骨髓移植を受けている。微小残存病変は残っているが現在の状態は良好とのことである。

Patient 5は遺伝子治療後34ヶ月に貧血を伴う白血球数の急上昇、脾腫、縦隔の拡大を認めた。末梢血細胞の細胞膜表面抗原は同様に成熟T細胞型で、免疫スコop分析で $\alpha\beta$ TCRのオリゴクローン(V β 1, V β 2, V β 23)を示していた。また、SIL-TAL1転座、トリソミー10の染色体異常も認めた。T細胞急性白血病と診断し、化学療法を施行したところ臨床的に寛解に至っており現在のところ状態は良好とのことである。

遺伝子導入部位をLinear Amplification Mediated PCR (LAM-PCR)法で解析したところPatient 4では原癌遺伝子LMO2 (LIM domain only-2)の転写開始部位下流約2 kbに遺伝子の方向と逆向きに挿入されており、Patient 5では同じ遺伝子(LMO2)の転写開始部位上流約3 kbに遺伝子の方向と同じ向きに挿入されていた。さらに詳しく分析したところ、これらの腫瘍細胞ではどちらも正常細胞より明らかに高いレベルのLMO2遺伝子発現をみとめ、それも、2つあるLMO2のアレルのうちベクターが挿入されている方のみが活性化していることが証明された。ベクターの γ c遺伝子の異常高発現や、制御不可能で持続的な下流のシグナル伝達系の活性化、逆転写時の遺伝子変異によるシグナル伝達能の上昇(Gain-of-function mutations)なども白血病化の一因として危惧されたが、これらの腫瘍細胞でそういった異常はないことが報告されている⁴⁾。

総合的に判断すると、今回の遺伝子治療関連白血病にはベクターの挿入によるLMO2遺伝子の活性化が共通した根本的原因として存在し、元々ある発癌の先天的素因に加えウイルス感染、染色体異常の蓄積などが重なり発症したものである。今回の2症例ではどちらもLMO2遺伝子が原因で白血病を発症しているが、これはLMO2遺伝子が物理的にベクターの挿入しやすい“ホット・スポット”である可能性、もしくは遺伝子導入はランダムである

がLMO2遺伝子が活性化したクローンがほかのクローンに比べて増殖しやすいなどの可能性がある。

IV. 今後の研究の方向性

白血病の発症にはいろいろな因子が重なっているが、根本的には原癌遺伝子LMO2の活性化があり、当面はこれをいかに回避するかということになるであろう。

(1) オンコレトロウイルスベクターの改良

i) SINベクター

LOM2の活性化がベクターの挿入によるものであるから、まず考えられるのはベクターのエンハンサーを取り除き自己不活型(self-inactivating; SIN)ベクターにすることである。以前からオンコレトロウイルスベクターをSINベクターにすることは考えられているが、SINベクターの問題点は力価の高いプロデューサー細胞株ができないということにある。この理由はわかっていない。安定したプロデューサー細胞を作らずプラスミドのトランスフェクションによりベクターを作製する方法には前述した様ないろいろな問題があるのでそれを克服する必要がある。

ii) インシュレーター

オンコレトロウイルスのエンハンサーを取り除かないまでもエンハンサーの絶縁体(インシュレーター)を使う方法も考えられる。インシュレーターはいくつか報告されているがその中でよく研究されているのはChicken β -globin hypersensitivity site 4 (cHS4)である²⁶⁾。当初、このインシュレーターはベクターの発現を安定させるために開発された。レトロウイルスベクターからの遺伝子発現の強度はクローンによりまちまちであり、おそらくこれはベクターが挿入された周囲の遺伝子のエンハンサー・サイレンサーの影響によるものと考えられている。Emeryらはインシュレーターを用いて安定した遺伝子発現を得ようと考えた²⁷⁾。周囲からの影響を遮断するためには発現カセットの上流と下流にインシュレーターを挿入する必要があるが、レトロウイルスでは塩基配列の反復があると遺伝子再構成を起こしてしまうことが知られており、ベクター内部の上流と下流に同じエレメントを挿入するとベクターがうまく作れなくなってしまう。彼らはこれを回避するためインシュレーターを3'LTRに挿入することを考えた。こうするとベクターのRNAゲノム上にはインシュレーターは一つしか存在しないが、逆転写時にこれがもう一方のLTRにコピーされるため最終的に目的の形のプロウイルスが完成するわけである(double copy vector)。この方法の問題はベクターの力価が有意に下がってしまい感染力も低下してしまうこと、また、通常のオンコレトロウイルスベクターで使った場合3'LTRに存在するエンハンサーをブロックできないことにあると思われる。後者はSINベクターとすることで回避できるが、SINベクター自体にも問題は残

されている。

(2) 治療開始年齢の制限

今回白血病を発症した症例はそれぞれ生後1ヶ月、3ヶ月に遺伝子治療を受けているため、白血病の発症が何らかの理由で治療時の月例と関連している可能性がある。今後遺伝子治療を再開するに当たって考慮する必要があると思われる。

(3) レンチウイルスベクターの使用

オンコレトロウイルスベクターもレンチウイルスベクターも活性化している遺伝子に組み込まれる傾向があることが知られている。LMO2もおそらく遺伝子導入時に活性化していたものと思われる。オンコウイルスはレンチウイルスに比べ転写開始部位の近くに挿入されやすいことが報告されている²⁸⁾。したがってレンチウイルスベクターを使用することによりベクターのエンハンサーにより原癌遺伝子を活性化する確立を低くできる可能性がある。また、遺伝子導入時に幼弱な造血細胞を刺激するサイトカインを使用すれば、細胞を分裂増殖させる遺伝子を活性化すると思われるが、これは原癌遺伝子をレトロウイルスベクターにさらされやすくしている可能性を意味する。サイトカインの使用はオンコレトロウイルスベクターにとっては必須であるが、レンチウイルスベクターにとっては必ずしも必須ではない。したがって、サイトカインを用いずにレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入すれば原癌遺伝子を活性化する確立をさらに低くすることができるかもしれない。

(4) 安全性のアッセイ系の確立

これが何よりも重要で、かつ達成困難な点かもしれない。いろいろと改善すべき点、アイディアはあるが、再度臨床試験を行うためには十分納得するための高い品質のデータが必要である。どのように巧みに実験系を組んで証明していくかがこれからの課題である。

おわりに

X-SCIDの今回報告された遺伝子治療では10症例中2症例で白血病を発症しているが、10症例中9症例で明らかな治療効果を認めた点は遺伝子治療の潜在的有用性を実証したものとして評価すべきである。2003年12月に開催された第45回 American Society of Hematology (ASH) 学会で Cavazzana-Calvo らから、同遺伝子治療を骨髓移植に対するサルベージとして再開することが関係機関に了承されたことが報告された。レトロウイルスベクターは遺伝性疾患の治療用としては理論的にも実際的にも現時点では最も優れたベクターであることは間違いない。残念ながら我々は未だこのベクターを使いこなせていないが、今後の

基礎研究の積み重ねで、更に安全で有用なベクターとして改造していくことは可能であると確信している。

参考文献

- 1) Cavazzana-Calvo M et al: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X 1 Disease. *Science* **288**: 669-672, 2000
- 2) Hacein-Bey-Abina S et al: Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*. **346**: 1185-1193, 2002
- 3) Hacein-Bey-Abina S et al: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. **348**: 255-256, 2003
- 4) Hacein-Bey-Abina S et al: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X 1. *Science* **302**: 415-419, 2003
- 5) Hawley RG et al: Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* **1**: 136-138, 1994
- 6) Halene S et al: Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector. *Blood* **94**: 3349-3357, 1999
- 7) Riviere I et al: Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 6733-6737, 1995
- 8) Kavanaugh MP et al: Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**: 7071-7075, 1994
- 9) von Kalle C et al: Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended *in vitro* exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* **84**: 2890-2897, 1994
- 10) Miller AD et al: Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol*. **65**: 2220-2224, 1991
- 11) Cosset FL et al: High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol*. **69**: 7430-7436, 1995
- 12) Horn PA et al: Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood* **100**: 3960-3967, 2002
- 13) Brenner S et al: Concentrated RD114-pseudotyped MFGS-gp91phox vector achieves high levels of functional correction of the chronic granulomatous disease oxidase defect in NOD/SCID/beta-microglobulin-/- repopulating mobilized human peripheral blood CD34+ cells. *Blood* **102**: 2789-2797, 2003
- 14) Hu J et al: Direct comparison of RD114-pseudotyped versus amphotropic-pseudotyped retroviral vectors for transduction of rhesus macaque long-term repopulating cells. *Mol Ther.* **8**: 611-617, 2003
- 15) Aiuti A et al: Correction of ADA-SCID by stem cell

- gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* **296** : 2410–2413, 2002
- 16) Zufferey R et al : Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol.* **15** : 871–875, 1997
 - 17) Dull T et al : A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* **72** : 8463–8471, 1998
 - 18) Zufferey R et al : Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol.* **72** : 9873–9880, 1998
 - 19) Ikeda Y et al : Continuous high-titer HIV-1 vector production. *Nat Biotechnol.* **21** : 569–572, 2003
 - 20) An DS et al : Lentivirus vector-mediated hematopoietic stem cell gene transfer of common gamma-chain cytokine receptor in rhesus macaques. *J Virol.* **75** : 3547–3555, 2001
 - 21) Donahue RE et al : Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD 34+ cells. *Mol Ther.* **3** : 359–367, 2001
 - 22) Blaese RM et al : T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID : initial trial results after 4 years. *Science.* **270** : 475–480, 1995
 - 23) Bordignon C et al : Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science.* **270** : 470–475, 1995
 - 24) Onodera M et al : Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood.* **91** : 30–36, 1998
 - 25) Kohn DB : Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med.* **1** : 1017–1023, 1995
 - 26) Chung JH : A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell.* **74** : 505–514, 1993
 - 27) Emery DW : A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** : 9150–9155, 2000
 - 28) Wu X et al : Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300** : 1749–1751, 2003