〔ウイルス　第57巻　第1号，pp.47-56，2007〕

特集　第54回日本ウイルス学会学術集会
シンポジウム「ウイルスを利用する」

4. AAVを利用した遺伝子治療

小澤　敬也
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

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，非分裂細胞に効率良く遺伝子導入でき，そのような標的細胞では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．パーキンソン病は黒質-線条体系ドパミンニューロンが選択的に障害される進行性の神経変性疾患である．遺伝子治療では，線条体でドパミン合成系酵素を発現させる方法が考えられている．臨床応用の第一段階では，芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC: L-DOPAをドパミンに変換する酵素）を発現するAAVベクターを線条体へ注入し，L-DOPA内服と組み合わせるストラテジーが採用されている．この方法では，ドパミン産生をL-DOPA投与量でコントロールできることから安全性が高い．次に，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やFabry病などが対象となる．癌に対する遺伝子治療については，腫瘍血管新生や転移・播種の抑制を狙った方法が検討されている．また，幹細胞レベルで長期の遺伝子発現が必要な場合は，治療遺伝子の組込みによる挿入変異を最小限に抑えなければならない．そこで，野生型AAVの組込み装置を利用し，第19番染色体長腕AAVS1領域（19q13.3-qter）に部位特異的に治療遺伝子を組み込ませるユニークな方法の開発が進められており，安全性の観点から注目される．

はじめに

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，AAVベクターは，非分裂細胞に効率よく遺伝子導入することができ，そのような細胞では遺伝子発現が長期間持続する．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，平成16年12月に臨床研究が米国でスタートし，平成19年5月には自治医大でも第1例目が実施された．

基礎研究面での最近の進歩としては，ヒト細胞に感染しうるAAVの血清型には様々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2型AAV（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，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ている．

連絡先
〒329-0498　栃木県下野市薬師寺3311-1
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
TEL ： 0285-58-7353
FAX ： 0285-44-5258
E-mail ： kozawa@ms2.jichi.ac.jp

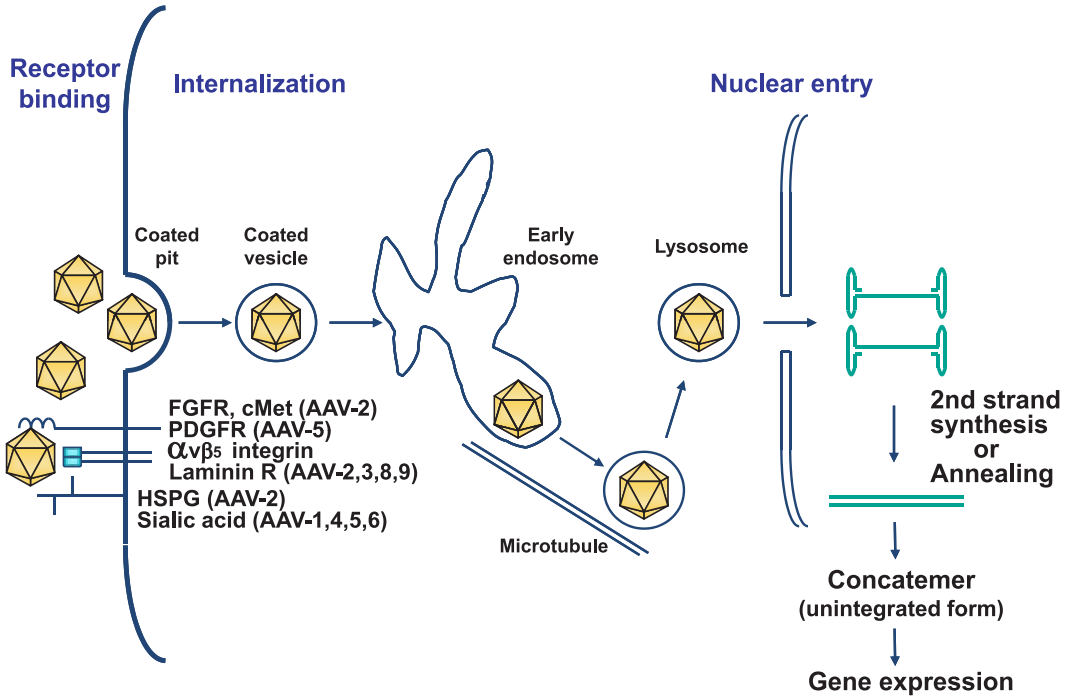

図1　AAVベクターによる遺伝子導入
標的細胞のレセプターへの結合から核内での遺伝子発現まで.

本稿では，AAVを利用し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，動物ウイルスの中で最も小型の線状一本鎖DNAウイルスであるパルボウイ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，例えば，AAV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20-26nmで，エンベロープはなく，物理化学的に極めて安定である．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ラン硫酸[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5 kb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）と呼ばれる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タンパク質の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）へ組み込まれるのが特徴的である．この組込みは非相同組換えによるものでありRepが関与している．実験的には，AAVS1領域とITRのRep結合領域の両者に共通して存在する塩基配列（GAGC繰返し配列）に，Rep78/Rep68が結合することが示されている．したがって，野生型AAVが標的細胞に感染した際には，RepがAAVのITRとAAVS1の両者に結合し，Repが介在することによりAAVゲノムの第19番染色体への部位特異的組込みが起こるものと想定されている．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）.

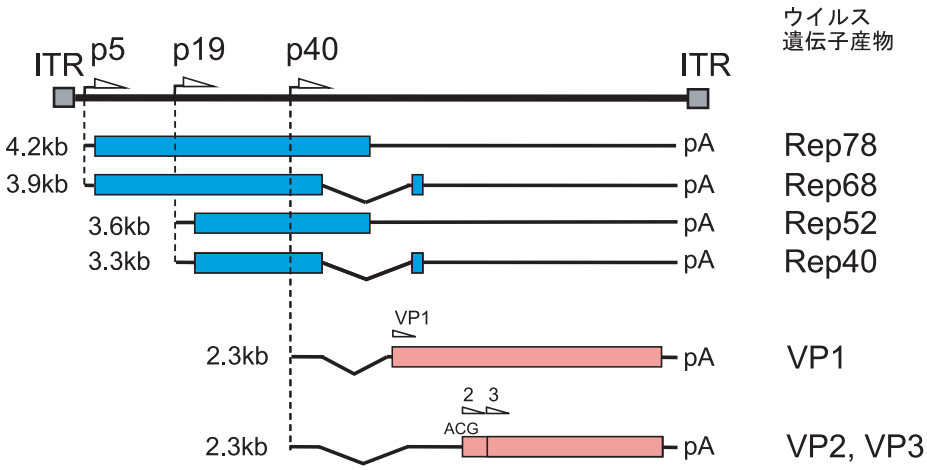

図 2　AAV のゲノム構造.

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．

AAV ベクターの開発と応用

1）AAV ベクター作製法（図 3）

基本的な方法では，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．この両者の間には共通の塩基配列が存在しないようにして，遺伝子組換えによる野生型ウイルスの出現をできる限り防止している．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）が元々持っている 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]．

2）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（ウイルスベクターの深刻な副作用が問題になっており，安全性が重視されるようになっている）．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程高くない．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**），その効率が必ずしも良くないことから，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．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．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．但し，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]．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]．但し，終末分化した非分裂細胞の場合は，挿入変異による癌化の問題をそれほど心

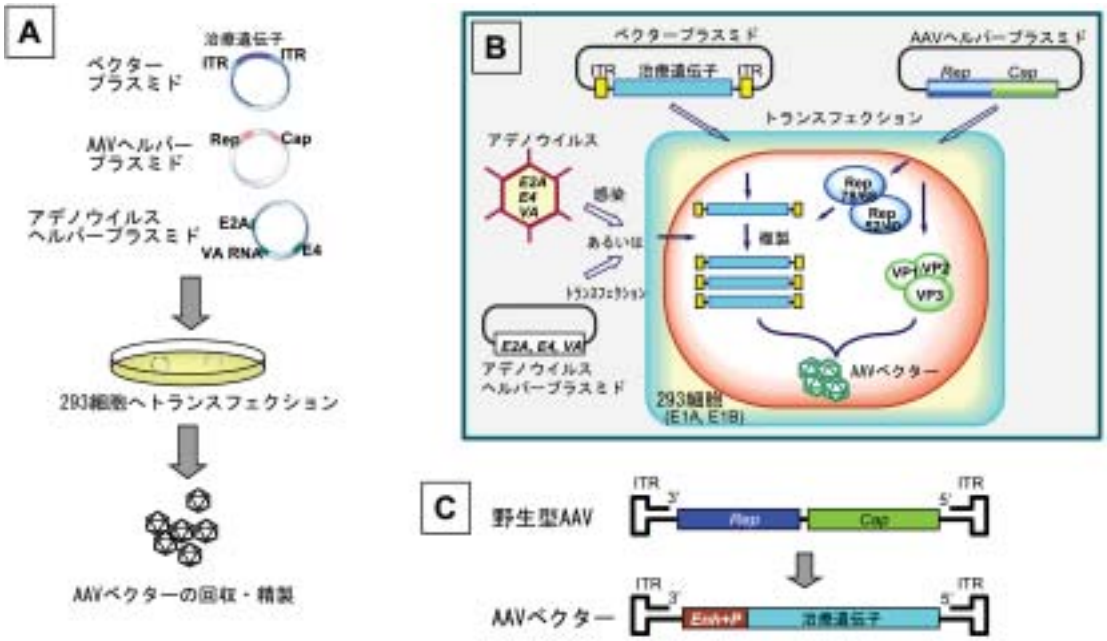

図3　AAVベクターの作製法.

（A）三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．）

表1　AAVベクターの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+）、脳室上衣細胞
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、標的組織毎に、AAV2ベクターを基準とした場合の大凡の目安である。

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，一回のベクターの投与で数年間に亘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ベクターが効率良く（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は異なっており，標

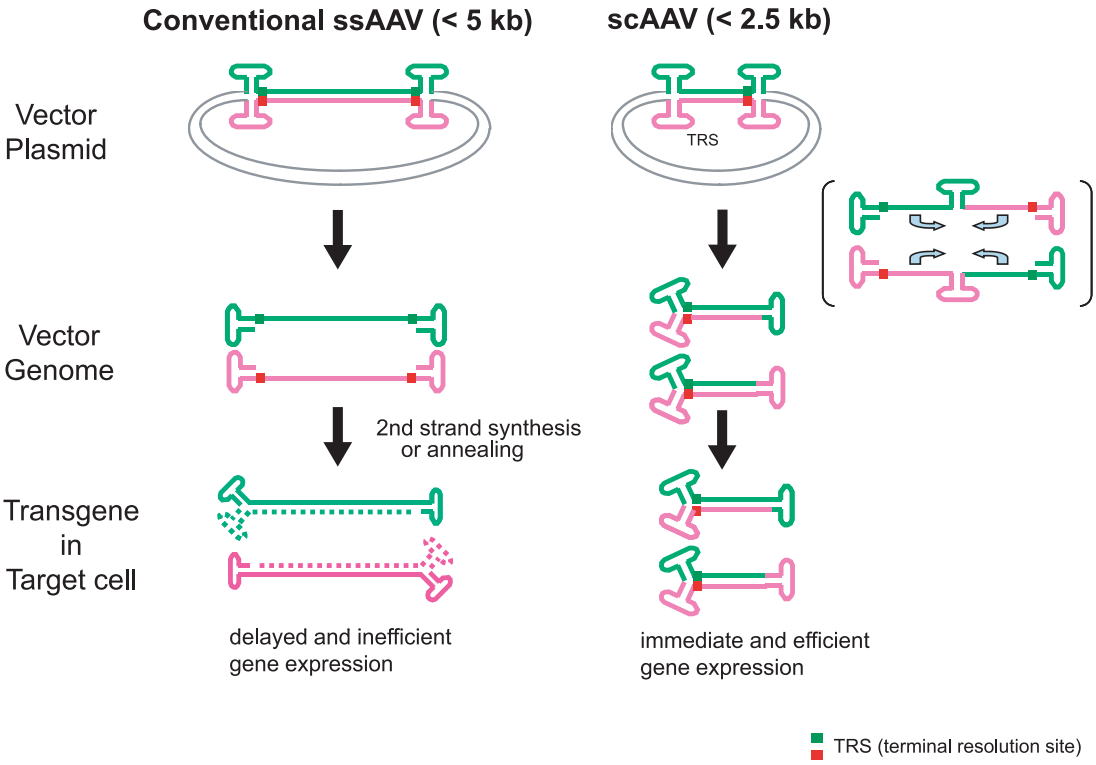

図 4　Self-complementary AAV (scAAV) vector
左図は，通常の一本鎖 AAV ベクターで，標的細胞内で二本鎖になる必要があり，遺伝子発現に時間がかかり，効率も悪い．右図は，scAAV ベクターの場合で，最初から二本鎖になっているために，直ぐ遺伝子発現し，発現効率も良い．但し，大きなサイズの遺伝子を搭載することはできない．

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，標的細胞内で直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）に比べて，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徴である．但し，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．

3）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．米国 UCSF で臨床研究が平成 16 年 12 月に開始されており，平成 19 年には，第 6 例目の遺伝子治療が実施されている．我が国でも自治医大からの申請（総括責任者：中野今治神経内科教授）が平成 18 年に厚生労働省の承認を得ており，平成 19 年 5 月に第 1 例目の遺伝子治療が実施された．

尚，上記の方法は不足するドパミンを補充する対症療法的アプローチであり，ド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できない．そこで，もう一つの治療ストラテジーとして，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

いた方法が米国で実施されている．

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 decaboxylase：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米国で行われている．

上述の臨床研究では，全て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始まっている．

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．例えば，血友病B（凝固第IX因子活性の低下）に対して，第IX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．また，筋細胞に適したAAV1ベクターを筋注する方法の臨床研究の実施も待たれている．

その他，癌を対象とする場合は，癌病巣を養う血管（腫瘍血管）をターゲットにした治療ストラテジー（癌に対する“兵糧攻め”）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，可溶型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．担癌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．また，Fabry病でみられる心筋症に対しても，このような蛋白質補充遺伝子療法のアプローチの有効性が動物実験で示されている[37]．一方，筋肉自体の修復を目指した遺伝子治療法の開発も，筋ジストロフィーを対象として進んでいる[38]．

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．また，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，特に大きな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．血友病患者では肝炎ウイルスに感染しているケースも多く，ウイルス性肝炎に対する影響も懸念されている．

また，遺伝子治療全般の問題でもあるが，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．AAVのウイルスカプシドに対する中和抗体をもともと有する患者では，肝臓を標的とする場合など，ベクターを血中に投与する方法では，十分な遺伝子導入効率が得られないことが霊長類のサルを用いた実験から示唆されている．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．例えば，血友病に対する遺伝子治療のモデル動物実験で，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．どのように抗原特異的な免疫寛容を誘導するかが，今後の大きな課題である．

その他，野生型AAVの部位特異的遺伝子組込みというユニークな性質を利用したTVI（targeted vector integration）法の開発も安全性の高い遺伝子導入法として興味深い．これは，AAVのITRとRepという二つのコンポーネントを利用することにより，治療用遺伝子を安全な第19番染色体長腕AAVS1領域に組み込ませるというストラテジーであり，ES細胞や種々の体性幹細胞（間葉系幹細胞など）への遺伝子導入への応用が期待される．

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, Srivastava A: 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: $\alpha V\beta_5$ 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, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H: 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, Kay MA: 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, Monks A, Chiorini JA: 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, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P: 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, Kume A, Okuda K, Ozawa K: 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 , Fujimoto K, Fan D, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano N, Ozawa K: 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) Schnepp 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, Kay MA: 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, Urabe M, Nishizawa M, Nakano I, Yoshida M, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Ozawa K: 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, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V: Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. Hum Gene Ther 2007 (in press).
16) Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kurtzman GJ, High KA: 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, Samulski RJ, Epperly M, Huard J: 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, Yang EY, Tai SJ, Iwaki Y, Kurtzman GJ, Fisher KJ, Colosi P, Couto LB, High KA: 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, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA: 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, Walsh CE: 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, Xiao X, Samulski RJ: 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, Wilson JM: 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, Zhou X, Wilson JM: 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, Waddington SN, Tuddenham EG, Kemball-Cook G, McIntosh J, Boon-Spijker M, Mertens K, Davidoff AM: 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, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, Ozawa K: 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, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K: 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: Sub-

thalamic 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, Oshinsky ML, During MJ: 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, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA: 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, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B: 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, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA: 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, Takayama T, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: 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, Shimpo M, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Sato I, Ozawa K: 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, Nakamura T, Sato I, Ozawa K: Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. Gene Ther 8: 1450-1455, 2001.
37) Takahashi H, Hirai Y, Migita M, Seino Y, Fukuda Y, Sakuraba H, Kase R, Kobayashi T, Hashimoto Y, Shimada T: Long-term systemic therapy of Fabry disease in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13777-13782, 2002.
38) Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. Mol Ther 10: 821-828, 2004.

Gene therapy using AAV

Keiya OZAWA, M.D., Ph.D.

Division of Hematology, Department of Medicine
Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine
Jichi Medical University
3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan
TEL: 0285-58-7353 FAX: 0285-44-5258
E-mail: kozawa@ms2.jichi.ac.jp

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 (PD) is one of the most promising candidates of gene therapy. PD is a progressive neurodegenerative disorder that predominantly affects dopaminergic neurons in the substantia nigra. One of the major approaches to gene therapy of PD is the intrastriatal expression of dopamine (DA)-synthesizing enzyme genes. As for the initial step of clinical application, AAV vector-mediated AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase; the enzyme converting L-DOPA to DA) gene transfer in combination with oral administration of L-DOPA would be appropriate, since DA production can be regulated by adjusting the dose of L-DOPA. Second, intramuscular injection of AAV vectors is appropriate to protein-supplement gene therapy. Monogenic diseases such as hemophilia and Fabry disease are suitable candidates. Regarding cancer gene therapy, AAV vectors may be utilized to inhibit tumor angiogenesis, metastasis, and invasion. When long-term transgene expression in stem cells is needed, a therapeutic gene should be introduced with a minimal risk of insertional mutagenesis. To this end, site-specific integration into the AAVS1 locus on the chromosome 19 (19q13.4) by using the integration machinery of AAV would be particularly valuable.

〔ウイルス　第57巻　第1号，pp.47-56，2007〕