

### 3. アデノウイルスベクターの最近の進展： VA 欠失ベクターを中心に

近藤 小貴, 前川 文, 斎藤 泉, 鐘ヶ江 裕美

東京大学 医科学研究所 遺伝子解析施設

非増殖型アデノウイルスベクター (FG-AdV) は, 各種細胞への高い遺伝子導入効率を示し有用性が高いベクターである。これまで問題であったベクターに対する免疫反応による肝臓の炎症については, 原因ウイルスタンパク質の同定に成功し, この問題を解決した「低炎症型ベクター」を報告した。しかし, 究極の FG-AdV を考えた時, 残存しているアデノウイルスゲノム領域から Pol III により発現している 2 種類のウイルス随伴 RNA (VA RNA) の欠失が必要である。VA RNA はウイルス増殖に必須では無いものの, ウイルス増殖に適した環境を整備する役割を担っており, 特に感染後期に大量に発現しているため, VA RNA をトランスに供給する 293 細胞では VA 欠失 AdV 作製は困難であった。我々は, 新規 VA 欠失 AdV 作製法を開発し, 高力価の VA 欠失 AdV の回収に成功した。そこで, C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する shRNA を発現する VA 欠失 AdV を作製し, 従来の FG-AdV と HCV 複製抑制効果を比較したところ, VA 欠失 AdV が高い抑制効果を示したことから, VA RNA が shRNA の成熟過程で競合拮抗していたことを明らかにした。本ベクターは今後 FG-AdV のスタンダードになると考えている。

#### はじめに

アデノウイルスベクターは, 1993 年 *in vivo* 投与による脳神経細胞への遺伝子導入<sup>1-3)</sup> が報告され, 非分裂細胞への高効率な遺伝子治療用ベクターとして注目されてきた<sup>4,5)</sup>。それ以前は, 各種細胞への遺伝子導入用ベクターとして期待されていたものの, 作製法が煩雑で普及には至っていなかった。しかし, 遺伝子治療用ベクターとして注目されると, 作製法の改良が急速に進み, 我々の開発した COS-TPC 法<sup>6)</sup> も, 「完全長ウイルスゲノム導入法」<sup>7)</sup> へと進展を遂げ, cDNA をコスミドカセットに挿入後, ウイルスゲノムの両末端を制限酵素で切断し, ベクター作製細胞である 293 細胞<sup>8)</sup> にトランスフェクションするだけで目的

ベクターの調製が可能となった。

我々は, ウイルス複製に必須である E1 を恒常的に発現する 293 細胞でのみベクターが複製し, それ以外の目的細胞では目的遺伝子のみを発現する非増殖型 (第 1 世代) アデノウイルスベクター (FG-AdV) に特化して研究を進めてきた<sup>9-12)</sup>。FG-AdV の最大の利点は, 高い遺伝子発現効率であり, 多くの細胞への効率的な遺伝子導入が可能である<sup>13-15)</sup>。また, 任意のプロモーターの応用が可能であり, 我々も一般的に活性が弱い細胞特異的プロモーターから部位特異的組換え酵素 Cre を発現する「スイッチユニット」と Cre 依存的に高発現プロモーターから目的遺伝子を発現する「標的ユニット」を併用した細胞特異的高度発現 FG-AdV の開発に成功し, 報告した<sup>16)</sup>。

しかし FG-AdV では, E1 領域を欠失したため教科書的には発現しないと言われていたウイルスタンパク質が僅かにリーク発現しており, そのウイルスタンパク質に対する免疫原性により, *in vivo* 投与では肝臓で強い炎症反応が認められていた。原因ウイルスタンパク質の解析は多くの研究室で行われてきたが, 我々は, 目的遺伝子挿入領域に近接している pIX タンパク質が目的遺伝子発現用プロモーターにより僅かにリーク発現していたこと, この pIX のリーク発現により強い炎症反応が誘起されることを見いだ

#### 連絡先

〒108-8639

東京都港区白金台 4-6-1

東京大学 医科学研究所 遺伝子解析施設

TEL: 03-5449-5556

FAX: 03-5449-5432

E-mail: kanegae@ims.u-tokyo.ac.jp

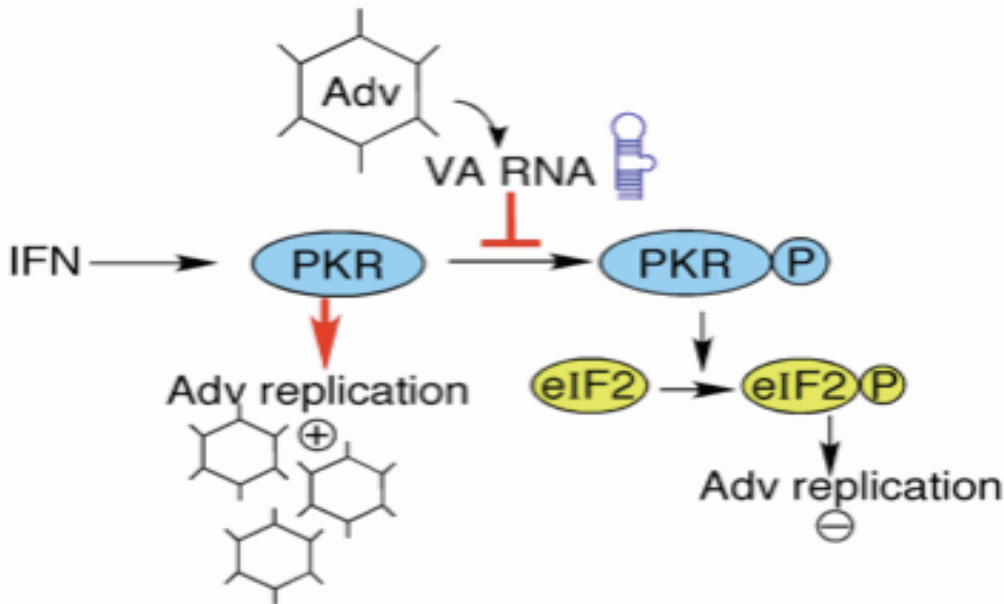


図1 VA RNAによるPKR活性化阻害機構

インターフェロン (IFN) により活性化される Protein kinase R (PKR) に VA I が直接結合し、PKR の活性化を阻害することにより、宿主のウイルスに対する防御機能を抑制する。

した。興味深いことに、pIX のリーク発現は CAG プロモーターでは誘起されるが EF1  $\alpha$  プロモーターでは殆ど認められなかった。また、EF1  $\alpha$  プロモーターから目的遺伝子を発現した FG-AdV では肝臓での炎症反応は最小限に抑えられており (低炎症)、目的遺伝子の発現は6ヶ月間持続した。このことから我々は EF1  $\alpha$  プロモーターを用いる FG-AdV を「低炎症ベクター」として報告した<sup>17)</sup>。

この様に、FG-AdV はこの20年間で改良の結果大きな発展を遂げ、有用性の高いベクターとなってきた。しかし、実はあまり問題視されていなかったが、FG-AdV は Pol III プロモーターから発現する2種類のウイルス随伴 RNA (VA RNA I あるいは VA RNA II) が発現していた。VA RNA は約160塩基の non-coding RNA であり、最も有名な機能は、インターフェロン (IFN) により活性化される Protein kinase R (PKR) に VA I が直接結合し、PKR の活性化を阻害することにより、宿主のウイルスに対する防御機能を抑制し、ウイルスが増殖しやすい環境を整えることである<sup>18)</sup> (図1)。また、VA RNA は、感染後期に大量に発現し、Exportin 5, RISK, Dicerなどを飽和することにより細胞内の RNA 干渉機構を攪乱することも報告されていた<sup>19-23)</sup> (図2)。更に2010年 Aparicioらにより、VA RNA が細胞内でプロセスされた結果 miRNA として働き、複数の宿主タンパク質の発現を低下していたことも報告された<sup>24)</sup> (表1)、VA 欠失 AdV の必要性が高まっていた。

本稿では、FG-AdV で残存していたウイルス由来の VA RNA 領域を欠失したベクター作製法を確立したこと、VA

RNA が short-hairpin RNA (shRNA) の成熟化に競合拮抗する可能性について、C型肝炎ウイルスに対する shRNA を用いて解析したので報告する。

#### VA RNA 欠失 AdV 作製法

VA RNA はアデノウイルスの複製に必須ではないため、VA RNA を欠失したアデノウイルスの力価は野生型の1/60位に低下することが報告されていたが<sup>18)</sup>、VA 欠失 AdV の作製は比較的容易であると考えられてきた。しかし、VA RNA 領域を完全欠失した FG-AdV の作製は我々には不可能であった。その原因として、VA RNA コード領域の近傍の遺伝子配列が FG-AdV の増殖に影響を与えていた可能性が示唆された。そこで、VA RNA のプロモーター領域のみを欠失した FG-AdV 作製を試みたが、通常の293細胞ではベクター増殖による細胞変性は認められるものの、使用レベルのベクターは調製不可能であった。そこで、VA RNA を高度に発現する293細胞の作製を試み、得られた複数の VA 発現293細胞を用いて VA 欠失 AdV の作製を試みた。いくつかの VA 欠失 AdV の作製は出来たものの、cDNA によっては全く作製が出来ないため、このままでは VA 欠失 AdV 作製法としては汎用されないと考えた。また、Machitani らもテトラサイクリン系により VA RNA を高度に発現する293細胞を用いてベクター作製を行ったことを報告したが、その力価は通常の1/1000以下と非常に低いものであった<sup>25)</sup> (図3a)。我々は、293細胞での VA RNA を保持している FG-AdV の増殖時の VA RNA 発現量と VA

表1 VA RNA 発現プラスミドを用いた microarray 解析により同定された標的遺伝子

signalling	cell growth	proapoptotic	transcription	DNA repair	RNA metabolism
ADCY9	TGFBR3	BNIP3L	ETS1	POLS	TIA-1
ARHGEF7	LY6K	BNIP3	CDK8	EXO1	DAZAP2
MAK3K	CCND1	etc.	RBPSUH	UBE2N	MDN1
DUSP3	etc.		PHF20	etc.	etc.
PPP1R3C		TH1L			
PTP4A1		etc.			
etc.					

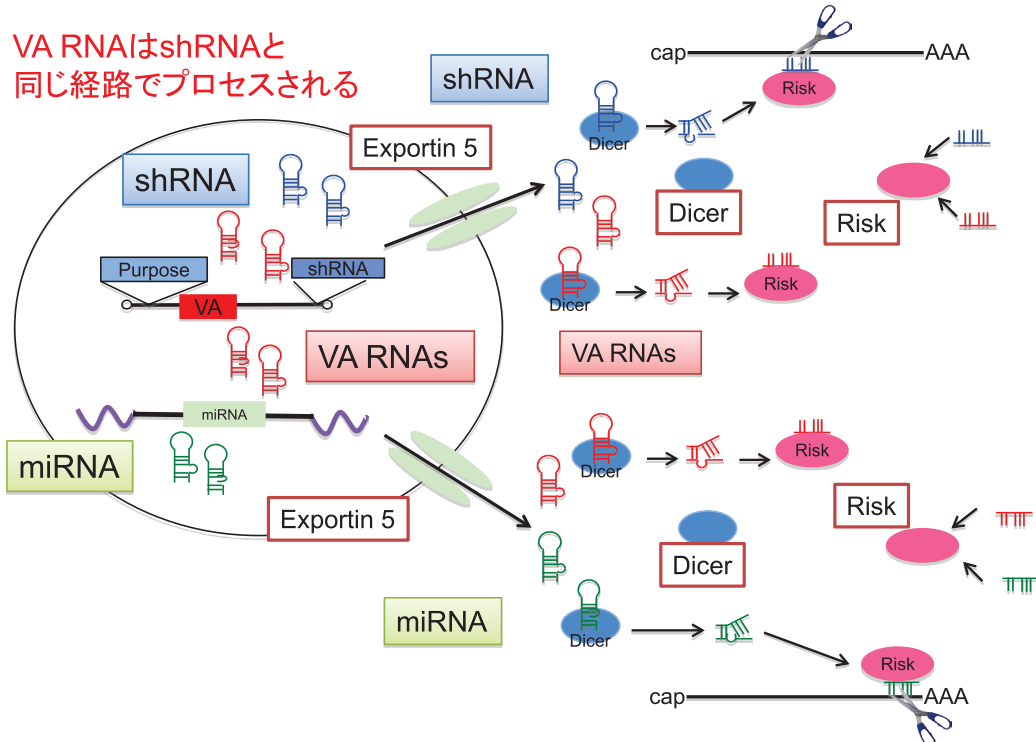
Aparicio et al., *Nucleic Acids Res.*, 2010

図2 VA RNA による細胞内 RNA 干渉機構の阻害

Exportin 5, RISK, Dicerなどを飽和することにより細胞内のRNA干渉機構を攪乱することが報告されている。

発現293細胞でのVA RNAの発現量を比較した。その結果、VA発現293細胞におけるVA RNA発現量はFG-AdVの1/700以下であり、VA RNA量の不足によりベクターが十分に増殖できないのではないかと考えた(図3b)。

我々は、全く新しい発想でVA欠失AdV作製法の開発を行うことにした<sup>26)</sup>。VA発現293細胞を用いて作製可能であったVA欠失AdVを用いた検討により、作製されたVA欠失AdVを大量に感染すれば僅かではあるが通常の293細胞においても増殖が可能であるという知見を得ていた。そこで、VA RNAコード領域の両側に部位特異的組換え酵素FLPの標的配列であるFRT配列を挿入したVA欠失AdV作製のプレベクターを通常の293細胞を用いて作製した(図4)。この段階ではVA RNAは十分に供給されるため、通常力価のベクター作製が可能である。部位特

異的組換え酵素FLPを高度に発現する293細胞に、高力価になったプレベクターを高い感染価で感染すれば、上記の知見により、FLPによりFRTで挟まれたVA RNAが環状に切り出されても僅かなベクター力価の低下でベクター回収が可能になるはずである。しかし、この方法の成否は293細胞内で1万コピーまで増幅するAdVゲノム上のFRTで挟まれたVA RNAを如何に高効率に切り出すことが可能にかかっていた。

我々はCreと比べて組換え効率が劣るFLPの温度安定型として報告されたFLPe<sup>27)</sup>のcodon usageをヒト型化したhFLPe<sup>28)</sup>を開発し、このhFLPe発現293細胞では複製中のAdVゲノム上のFRT間を90%以上の効率で切り出すことが可能であることを報告していた<sup>29)</sup>。そこで、このhFLPe発現293細胞にプレベクターを感染し、回収し

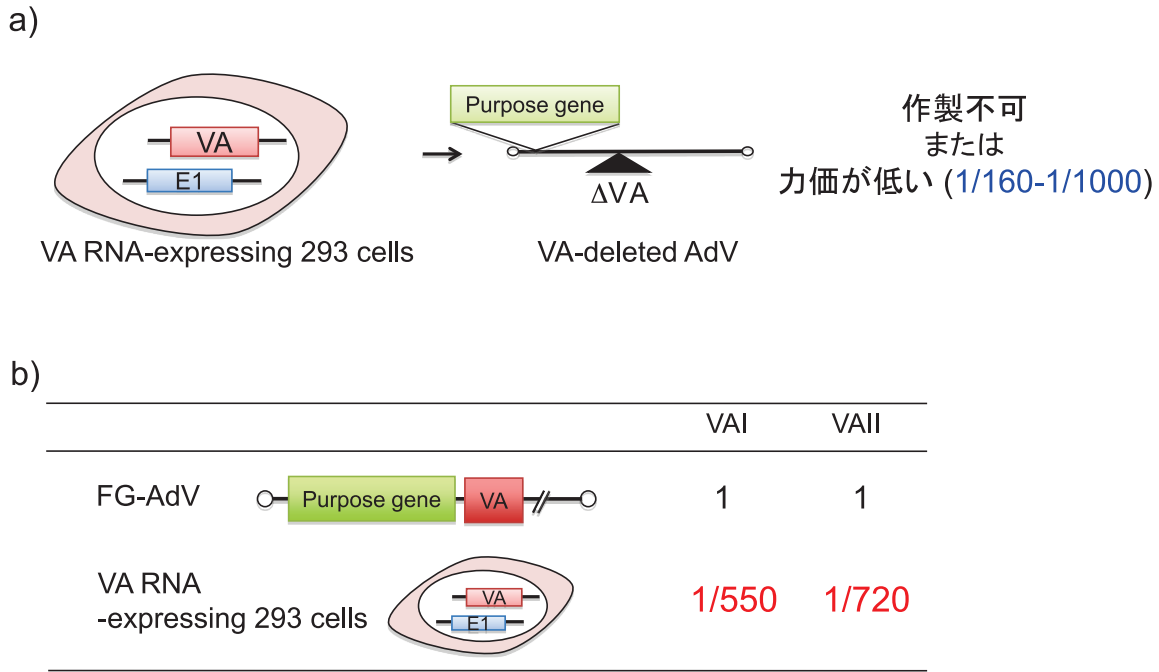


図3 従来の VA RNA 欠失 AdV 作製法と問題点

a) VA RNA を高度に発現する 293 細胞を作製し、VA 欠失 AdV の作製を試みた。いくつかの VA 欠失 AdV の作製は出来たものの力価が低く、cDNA によっては全く作製が出来なかった。  
 b) 293 細胞での VA RNA を保持している FG-AdV の増殖時の VA RNA 発現量と VA 発現 293 細胞での VA RNA の発現量を比較。

1st step : Pre-vector ( VA-保持 AdV ) →FG-AdVとして高力価に調製

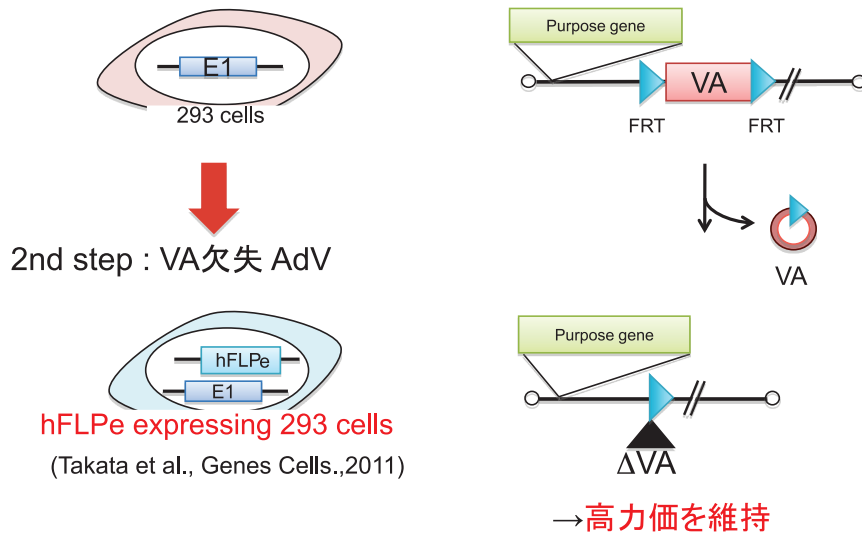


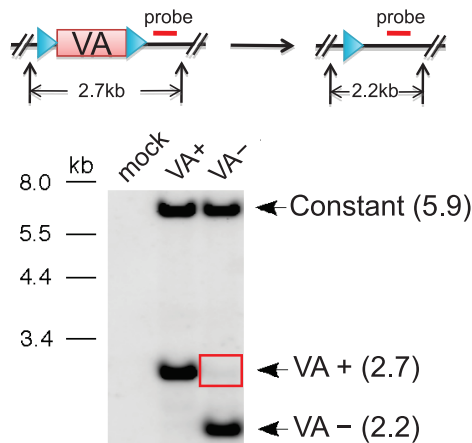
図4 新規 VA 欠失 AdV 作製法

VA RNA コード領域の両側に部位特異的組換え酵素 FLP の標的配列である FRT 配列を挿入した VA 欠失 AdV 作製のプレベクターを FLP 高度発現 293 細胞に感染すれば FLP により FRT で挟まれた VA RNA が環状に切り出され、VA 欠失 AdV が作製可能となる。

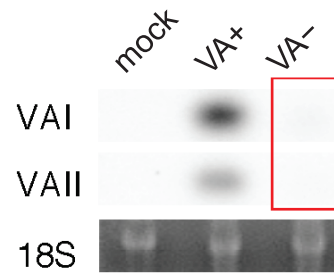
た AdV の DNA 構造を解析した結果、VA RNA 領域が切り出されていたことが明らかになった (図 5a)。VA RNA は small RNA であるため、この領域を認識するプライマー

設計は困難であるが、複数のプライマーを作製し検討した結果、VA RNA I と VA RNA II を特異的に認識し区別することが可能であるプライマー設計に成功した。このプライ

## a) DNA 構造 (Southern)



## b) VA RNAの検出 (northern)



## c) VAI および VAII の定量 (qPCR)

VA	VAI		VAII	
	Copies ( $\times 10^8$ )	%	Copies ( $\times 10^8$ )	%
+	1.81 $\pm$ 0.06	100	1.83 $\pm$ 0.32	100
-	0.05 $\pm$ 0.00	2.9	0.03 $\pm$ 0.00	1.4

## 図5 hFLPe 発現 293 細胞を用いた VA 領域欠失効率

- 得られた VA 欠失 AdV を Huh-7 細胞に感染し、総 DNA を抽出、上記に示した probe を用いて DNA 構造を Southern 法により解析
- 同様に総 RNA を抽出、Northern 法により VA を検出。18 S, 18S ribosomal RNA.
- リアルタイム PCR を用いた VA RNA の定量。

マーを用いたリアルタイム PCR (図 5c) 及び Northern 法 (図 5b) による RNA 解析からも VA RNA は 2 種類とも発現していない (3% 以下) ことが確認された。hFLPe 発現 293 細胞内で切り出された VA RNA は塩化セシウムの平衡遠心により分離可能であった<sup>30)</sup>。また、得られた VA 欠失 AdV の力価は、通常の FG-AdV よりも 1/10 ほど低下していたが、それでも  $10^{10}$  レベルのベクター調製が可能であった。

VA 欠失 AdV の力価測定は、通常の 293 細胞での細胞変性やウイルスタンパク質に対する免疫染色を用いた方法では不可能であるが、我々はリアルタイム PCR を用いた新規 AdV 力価測定法の開発にも成功しており、この方法を用いて VA 欠失 AdV と FG-AdV を同じコピー数で目的細胞へ導入することも可能となったため、VA RNA による shRNA 活性への影響を複数のベクターを用いて検討することが可能となった<sup>31)</sup>。

## HCV に対する shRNA の効果に対する VA RNA の影響

HCV 感染者は世界人口の 2~3% を占め、慢性肝炎、

肝硬変、肝細胞癌の主要原因の一つになっている<sup>32-34)</sup>。IFN とリバビリンによる標準的な治療法に加え、HCV プロテアーゼ阻害剤のような抗ウイルスに直接作用する薬剤の登場により格段に HCV の治療法は進歩しているが<sup>35, 36)</sup>、薬剤耐性ウイルスの出現と薬剤間の副作用<sup>37)</sup>を考慮すると、依然として HCV 治療法の探索は必須である。HCV はプラス鎖一本鎖 RNA をゲノムとし、ウイルス複製に関わる全ての工程が細胞質で完結するため、shRNA による遺伝子治療に相応しいターゲットと考えられる。

既に FG-AdV を用いた HCV に対して有用な siRNA や shRNA について報告されてきた<sup>38, 39)</sup>。我々は VA 欠失 AdV を用いることにより、shRNA の有効性が上昇するのではないかと考えた。HCV は RNA ウイルスであるため複製に伴うゲノム変異が生じるが、5' 側の非翻訳領域は比較的安定にゲノム配列が保持されていることが知られており、既報でも shRNA はこの 5' 非翻訳領域に設計されていた<sup>40)</sup>。我々は、その中で最も HCV のゲノム複製抑制効率が高いと報告されていた 5' 端 322 塩基から 344 塩基目までを標的とする shRNA331 (本稿では sh331 と省略) に加



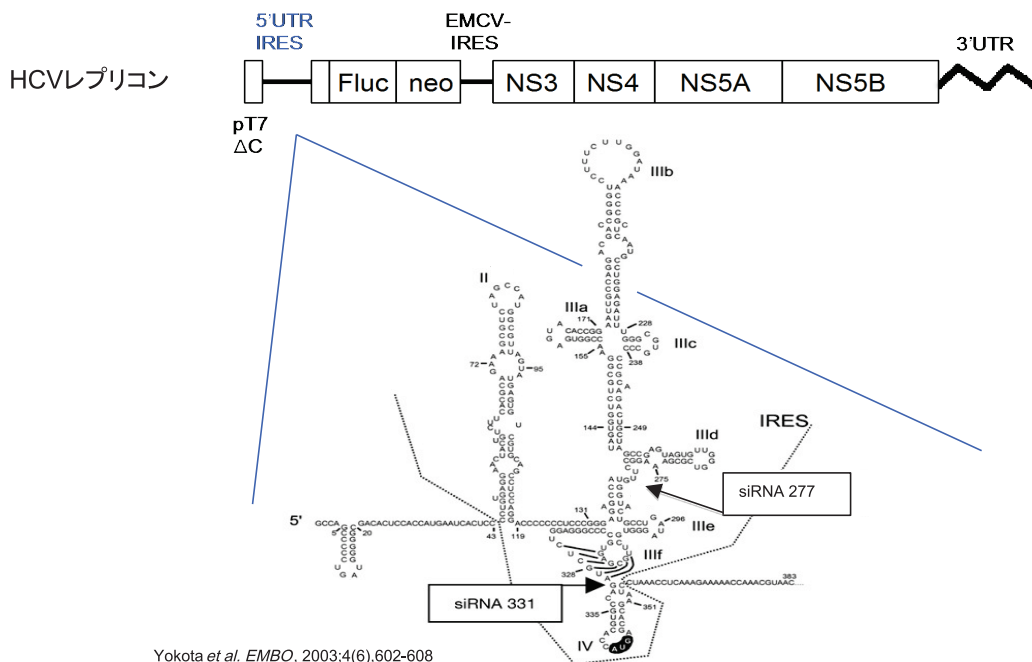


図6 HCV に対する shRNA の設定領域  
Fluc, Firefly luciferase; neo, neomycin

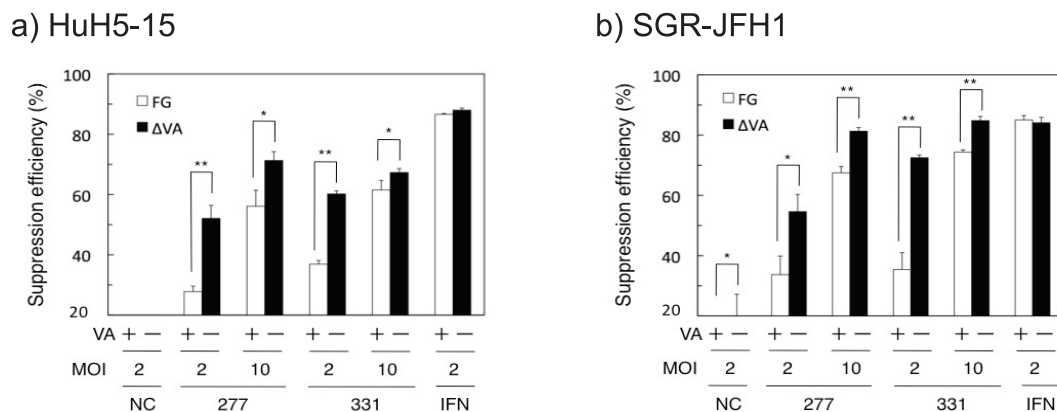


図7 遺伝子型 1b の HuH5-15 細胞及び遺伝子型 2a の SGR-JFH1 細胞における shRNA の HCV 複製抑制効率  
\* P < 0.05  
\*\* P < 0.01

え、新たに 279 塩基から 297 塩基目までを標的とする shRNA277 (sh277 と省略) を設計し (図 6), ヒト U6 プロモーターから発現する VA 欠失 AdV あるいは VA を保持している FG-AdV を作製した. 陽性コントロールとしては, 新たにクローニングした α 2 IFN 遺伝子を EF1 α プロモーターから発現する VA 欠失 AdV あるいは FG-AdV を, また陰性コントロールとしてはタカラバイオ社より市販され

ているコントロール shRNA (shNC) を用いた. 実験に用いた HCV の遺伝子型は日本に多い遺伝子型であり, 比較的 IFN 抵抗性である遺伝子型 1 の亜型 1b と, IFN に感受性の高い遺伝子型 2 の亜型 2a を用いた. 具体的には 1b の HCV レプリコン RNA を恒常的に発現する HuH-7 細胞株由来の HuH5-15 と 2a のレプリコン細胞である SGR-JFG1/LucNeo (本稿では SGR-JFH1 細胞) を用い

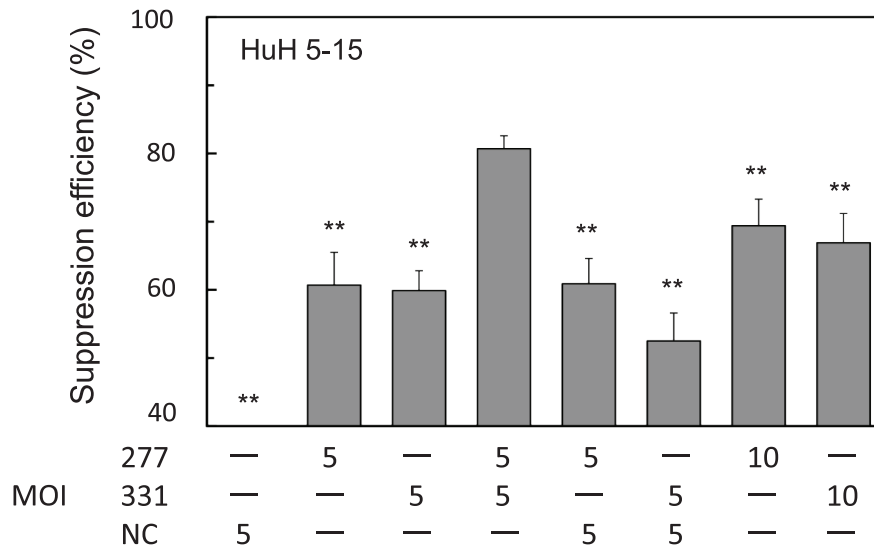


図8 HuH5-15細胞におけるsh277とsh331の共感染によるHCV複製抑制効率の検討

\*  $P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$

たが、これらの研究は浜松医科大学の鈴木哲朗教授との共同研究である。

レプリコン発現細胞株にVA欠失AdVあるいはFG-AdVを新規ベクター力価測定法により算出したベクター力価を用いて同じコピー数が細胞に導入されるように希釈してMultiplicity of infection (MOI) 2あるいはMOI 10で導入し、72時間後に細胞をハーベストし、RNAを抽出後細胞内のHCV RNAコピー数を5'非翻訳領域に対するプライマー/プローブを用いてqPCRにより定量した。

遺伝子型1bのHuH5-15細胞及び遺伝子型2aのSGR-JFH1細胞におけるshRNAのHCV複製抑制効率を図7に示した。いずれのレプリコン細胞においても、VA欠失AdVのHCV複製抑制効率がFG-AdVの複製抑制効率よりも優れていた。特にMOIの低い所での差は顕著であった。遺伝子型1bに対してはsh277で高い複製抑制効果が認められ、遺伝子型2aに対してはsh331が高い抑制効果を示していた。これらの結果から、FG-AdVから発現していたVA RNAがshRNAと競合拮抗した結果、shRNAのHCV複製抑制効果を減弱していた可能性が強く示唆された。

また、sh277とsh331は標的配列が重なっていないため、共感染の効果についても検討を行った。各々のVA欠失AdVをMOI 5で単独あるいは共感染を行い、単独感染に関してはMOI 10でも検討を行った(図8)。その結果、HuH5-15、SGR-JFH1のいずれの遺伝子型のレプリコン細胞においても共感染AdVのHCV複製抑制効果は、単独感染よりも高かった。また、陰性コントロールとして用いたshNCとの共感染で、sh331の活性は低下するがsh277では変わらなかったことから、sh331とshNCがshRNA

のプロセシングのどこかの過程で競合していた可能性が示唆された。これらの仕事はScientific Report誌(2013)に発表した。

## まとめ

FG-AdVは、遺伝子治療だけでなくウイルス研究を含め多くの基礎研究においても有用性の高いベクター系の1つである。特に、細胞間の導入効率の大きな違いを考慮する必要があるプラスミドのトランスフェクションと比べ、同じ様に一過性の発現ベクターであり、ウイルス由来であることから細胞間にはほぼ均一の遺伝子導入が可能である。FG-AdVは、遺伝子機能解析には最適なベクターである。一方で、FG-AdVは強い肝臓での炎症反応が起きるため、*in vivo*では応用が不可能であった。本稿で記述したように、この炎症反応は我々の開発した「低炎症型ベクター」を用いることでほぼ解決しており、「低炎症型ベクター」作製用キットは既にタカラバイオ社やニッポンジーン社から発売されている(タカラバイオ(株)(6170,, 6174)や(株)ニッポンジーン(319-06681, 312-06551, 319-06561)から入手可能)。

本稿で紹介したVA欠失AdVは、細胞への感染条件など汎用するにはまだ改良を加える必要があり、共同研究ベースでの供給となっている。しかし、我々はFG-AdVで発現している量のVA RNAでも、いくつかの細胞遺伝子の発現を低下していることを突き止めていることから、VA欠失AdVの有用性は更に高まっており、今後はVA欠失AdVの作製法を更に改良していく。また、HCVに対する遺伝子治療用ベクターとして、今回紹介したVA欠失

AdVの有用性は極めて高い。我々は、このshRNA発現VA欠失AdVに更にIFN発現単位を搭載したデュアルベクターも構築しており、更に解析を進めていく。

この様に、低炎症型でしかもVA欠失が可能となったアデノウイルスベクターは、ウイルス由来の影響を最小限に留めることが出来たという点から、非増殖型アデノウイルスベクターとしてはほぼ完成系であると考えている。依然として作製が煩雑と感じられているが現在は大変簡便になっており、一度試していただければ有用性を実感して頂けるものと確信している。

#### 参考文献

- 1) Akli, S. et al. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* **3**, 224-228 (1993).
- 2) Bajocchi, G., Feldman, S.H., Crystal, R.G. & Mstrangeli, A. Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nat Genet* **3**, 229-234 (1993).
- 3) Davidson, B.L., Allen, E.D., Kozarsky, K.F., Wilson, J.M. & Roessler, B.J. A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* **3**, 219-223 (1993).
- 4) Zabner, J. et al. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* **75**, 207-216 (1993).
- 5) Crystal, R.G. et al. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* **8**, 42-51 (1994).
- 6) Miyake, S. et al. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1320-1324 (1996).
- 7) Fukuda, H., Terashima, M., Koshikawa, M., Kanegae, Y. & Saito, I. Possible mechanism of adenovirus generation from a cloned viral genome tagged with nucleotides at its ends. *Microbiol Immunol* **50**, 643-654 (2006).
- 8) Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74 (1977).
- 9) Kanegae, Y. et al. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* **23**, 3816-3821 (1995).
- 10) Kanegae, Y., Nakai, M. & Saito, I. [Progress of adenovirus vector development]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* **45**, 549-558 (2000).
- 11) Nakano, M., Ishimura, M., Chiba, J., Kanegae, Y. & Saito, I. DNA substrates influence the recombination efficiency mediated by FLP recombinase expressed in mammalian cells. *Microbiol Immunol* **45**, 657-665 (2001).
- 12) Kondo, S. et al. Simultaneous on/off regulation of transgenes located on a mammalian chromosome with Cre-expressing adenovirus and a mutant loxP. *Nucleic Acids Res* **31**, e76 (2003).
- 13) Tsukui, T., Kanegae, Y., Saito, I. & Toyoda, Y. Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. *Nat Biotechnol* **14**, 982-985 (1996).
- 14) Shibata, H. et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* **278**, 120-123 (1997).
- 15) Takashima, Y. et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* **129**, 1377-1388 (2007).
- 16) Kanegae, Y. et al. High-level expression by tissue/cancer-specific promoter with strict specificity using a single-adenoviral vector. *Nucleic Acids Res* **39**, e7 (2011).
- 17) Nakai, M. et al. Expression of pIX gene induced by transgene promoter: possible cause of host immune response in first-generation adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **18**, 925-936 (2007).
- 18) Bhat, R.A., Domer, P.H. & Thimmappaya, B. Structural requirements of adenovirus VAI RNA for its translation enhancement function. *Mol Cell Biol* **5**, 187-196 (1985).
- 19) Andersson, M.G. et al. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* **79**, 9556-9565 (2005).
- 20) Aparicio, O., Razquin, N., Zaratiegui, M., Narvaiza, I. & Fortes, P. Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J Virol* **80**, 1376-1384 (2006).
- 21) Xu, N., Segerman, B., Zhou, X. & Akusjarvi, G. Adenovirus virus-associated RNAII-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes. *J Virol* **81**, 10540-10549 (2007).
- 22) Wahid, A.M., Coventry, V.K. & Conn, G.L. Systematic deletion of the adenovirus-associated RNAI terminal stem reveals a surprisingly active RNA inhibitor of double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* **283**, 17485-17493 (2008).
- 23) Lu, S. & Cullen, B.R. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol* **78**, 12868-12876 (2004).
- 24) Aparicio, O. et al. Adenovirus VA RNA-derived miRNAs target cellular genes involved in cell growth, gene expression and DNA repair. *Nucleic Acids Res* **38**, 750-763 (2010).
- 25) Machitani, M. et al. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release* **154**, 285-289 (2011).
- 26) Maekawa, A. et al. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Sci Rep* **3**, 1136 (2013).
- 27) Buchholz, F., Angrand, P.O. & Stewart, A.F. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling



- mutagenesis. *Nat Biotechnol* **16**, 657-662 (1998).
- 28) Kondo, S., Takata, Y., Nakano, M., Saito, I. & Kanegae, Y. Activities of various FLP recombinases expressed by adenovirus vectors in mammalian cells. *J Mol Biol* **390**, 221-230 (2009).
- 29) Takata, Y., Kondo, S., Goda, N., Kanegae, Y. & Saito, I. Comparison of efficiency between FLPe and Cre for recombinase-mediated cassette exchange in vitro and in adenovirus vector production. *Genes Cells* **16**, 765-777 (2011).
- 30) Kanegae, Y., Makimura, M. & Saito, I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol* **47**, 157-166 (1994).
- 31) Pei, Z., Kondo, S., Kanegae, Y. & Saito, I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: application to vector titration. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 945-950 (2012).
- 32) Bartenschlager, R. & Sparacio, S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* **127**, 195-207 (2007).
- 33) Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H. & Wakita, T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced drug delivery reviews* **59**, 1200-1212 (2007).
- 34) Pezacki, J.P., Singaravelu, R. & Lyn, R.K. Host-virus interactions during hepatitis C virus infection: a complex and dynamic molecular biosystem. *Molecular bioSystems* **6**, 1131-1142 (2010).
- 35) Jacobson, I.M. et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* **364**, 2405-2416 (2011).
- 36) Poordad, F. et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine* **364**, 1195-1206 (2011).
- 37) Sarrazin, C., Hezode, C., Zeuzem, S. & Pawlotsky, J.M. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **56** Suppl 1, S88-100 (2012).
- 38) Zhang, J. et al. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology* **320**, 135-143 (2004).
- 39) Sakamoto, N. et al. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *Journal of gastroenterology and hepatology* **23**, 1437-1447 (2008).
- 40) Yokota, T. et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO reports* **4**, 602-608 (2003).

## Recent progress in adenovirus vectors : focusing on VA-deleted AdV

**Saki KONDO, Aya MAEKAWA, Izumu SAITO and Yumi KANEGAE**

Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Medical Science, University of Tokyo

First-generation adenovirus vectors (FG-AdVs) are widely used because transduction efficiency of the vectors is very high. However, severe immune responses especially to the liver have been a serious problem of this vector. We succeeded to identify a viral protein that cause the immune responses and reported “low-inflammatory AdVs” that mostly solve this problem. However, to develop the ultimate form of this vector, it is necessary to remove virus-associated RNA (VA RNA) genes from the AdV vector genome. VA RNAs are transcribed by polymerase III; they are not essential for viral growth but have important roles to make appropriate circumstances for this virus. Large amount of VA RNAs are required in the late phase to support viral growth. Hence it is difficult to establish 293 cell lines that can support replication of AdVs lacking VA RNA genes (VA-deleted AdVs) supplying sufficient amount of VA RNA *in trans*. Recently we have developed a method for efficient production of VA-deleted AdVs and succeeded to obtain a high titer of VA-deleted AdVs. Then we construct VA-deleted AdVs expressing shRNA that knockdown the replication of hepatitis C virus (HCV). In fact, VA-deleted AdVs expressing these shRNAs suppressed HCV replication more effectively than conventional FG-AdV. Therefore, we showed that VA RNAs expressed from FG-AdVs probably compete with shRNA in the maturation pathway and reduce the effect of shRNAs. We think that VA-deleted AdV may substitute for current FG-AdVs and become a standard AdV.