

## 総 説

# アメリカ合衆国における遺伝子治療の動向

古谷田裕久, 平賀 紘一  
富山医科薬科大学学生化学第1教室

### はじめに

約20年前にレトロウイルスの逆転写酵素が発見され, 多くの制限酵素とともに研究用試薬としての使用が可能になると, mRNA, cDNA, 染色体DNAを対象とする研究技術は急速に向上した。その結果, 5万から7万という膨大な数と推定されるヒトの遺伝子の中のかなりの数について, 構造や発現機構の解析が驚くほどの速さで進み, 並行して, 種々の疾患の病因遺伝子の異常構造が明らかにされた。多くの細胞機能の調節因子の同定やその作用の機構解明も容易となり, 個体や細胞レベルの現象を分子レベルで理解することが可能となった。

疾病そのもの, 或いは物質代謝, 腫瘍, ヒトの個体における免疫現象, 及び, レトロウイルスの生活環などが分子レベルで理解されると, これらの科学的事実を基にした治療法の応用開発が当然模索される。その結果, 機能欠損を持つ患者細胞へ適当な方法でヒトの正常遺伝子を導入し, この形質転換により疾病を治療するヒトの遺伝子治療が種々の疾患について研究され始めた。この概念は, 1960年代後半から1970年代初頭には既に提唱されており<sup>1)</sup>, 最近特に現実的になったと考えられる。

ウイルスベクターを使った哺乳動物細胞への遺伝子導入は, 基礎的研究においても重要な研究手段である。新しい研究法に習熟することも目的の一つとして, 著者らは楓糖尿症を例として調べたところ, この疾患が幾つかの条件を整えれば遺伝子治療の対象となり得ることを実験系で明らかにできた<sup>2)</sup>。この過程で, 遺伝子治療の先進国であるアメリカ合衆国での現状に接することができたので, その概要を紹介することが本学でのこの分野の研究の発展の一助となる事を期待し, 小文を寄稿した。

### ヒトへの遺伝子導入までの過程

ヒトへの遺伝子導入を実施するまでに, アメリカ合衆国では概ね次の手順で計画の審査が行われる。各研究機関に設けられた委員会が計画の是非を判定する。更に, 使用するベクターの安全性, 遺伝子導入の必然性など計画全体の吟味が, NIHに設置されているThe Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)とFood and Drug Administration (FDA)で, それぞれ別個に審査され承認される。ヒトへの遺伝子導入として最初にgene marker studyが1989年に承認された。これは, ネオマイシン耐性遺伝子を染色体に組み込み標識したtumor infiltrating lymphocytes (TIL)を悪性黒色腫患者に導入後, その腫瘍内分布や寿命を調べ, 遺伝子導入TILによる腫瘍の免疫療法の可能性を探ることを目的としている<sup>1,3-5)</sup>。1993年9月迄に, AIDSに伴う腫瘍患者への同義の試行や急性白血病患者への標識自家骨髄細胞導入など23件のGene markingプロトコールがRACで承認されている<sup>6,7)</sup>。

1990年に, Blaeseらのグループにより, adenosine deaminase欠損による重症複合免疫機能不全患者に, このタンパクの正常遺伝子を導入する最初の遺伝子治療が行われた<sup>4,8)</sup>。この成功を機に, 多くの遺伝性疾患, 腫瘍に対する遺伝子治療の提案がなされ, 遺伝子治療を目標とした研究も急速に進展しつつある。RACにより承認されている計画を表1に示した。ヒトの生殖細胞への遺伝子導入については基本的に禁じられている。

### ウイルスベクター

表1 ヒト遺伝子治療プロトコール  
(University Lecture Series at UT Southwestern Medical Center および文献57より)

主たる研究者	病名	遺伝子治療の方法
1. R. M. Blaese	重症複合免疫不全	アデノシンデアミナーゼ遺伝子導入自家リンパ球による遺伝子治療
2. S. A. Rosenberg	進行癌	腫瘍壊死因子導入腫瘍浸潤リンパ球による進行癌患者の遺伝子治療
3. S. A. Rosenberg	進行癌	腫瘍壊死因子導入自家癌細胞を使った癌患者の免疫療法
4. S. A. Rosenberg	進行癌	インターロイキン-2 遺伝子導入自家癌細胞による癌患者の免疫療法
5. J. M. Wilson	家族性高コレステロール血症	家族性高コレステロール血症の <i>ex vivo</i> 遺伝子療法
6. G. J. Nabel	悪性腫瘍	腫瘍への <i>in vivo</i> 遺伝子導入による癌免疫療法
7. S. M. Freeman	癌	癌細胞への Toxin 遺伝子の導入
8. M. K. Brenner	神経芽細胞腫	サイトカイン遺伝子修飾自家癌細胞による再発神経芽細胞腫の治療
9. E. Oldfield	脳腫瘍	チミジンキナーゼ遺伝子の腫瘍内導入と ganciclovir 静脈内投与による遺伝子治療
10. B. Gansbacher	悪性黒色腫	HLA-A2 の一致する同種 IL-2 分泌悪性黒色腫による免疫療法
11. J. A. Roth	非小細胞肺癌	非小細胞肺癌のオンコジーンと腫瘍抑制遺伝子発現の修飾
12. M. T. Lotze	癌	IL-4 遺伝子で修飾された抗腫瘍ワクチン
13. R. G. Crystal	嚢胞線維症	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene を持つアデノウイルスベクターによる遺伝子治療
14. J. M. Wilson	嚢胞線維症	E1 欠損アデノウイルスベクターによる遺伝子治療
15. K. W. Culver	脳腫瘍	単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子/ganciclovir システムの <i>in vivo</i> 腫瘍内導入による脳腫瘍治療
16. J. Simons	転移性腎細胞癌	GM-CSF を導入した非増殖腫瘍細胞の自家注入
17. R. W. Wilmott & J. Whitsett	嚢胞線維症	アデノウイルスベクターを使用した上気道細胞へのヒト CFTR cDNA の導入
18. R. C. Boucher & M. R. Knowles	嚢胞線維症	アデノウイルスベクターによる鼻腔への遺伝子治療
19. H. F. Seigler	播種性悪性黒色腫	腫瘍細胞へのインターフェロン導入による腫瘍免疫療法
20. A. B. Deisseroth	卵巣癌	化学療法耐性遺伝子のレトロウイルスによる正常骨髄細胞への導入
21. G. J. Nabel	癌	直接腫瘍内遺伝子導入による免疫療法
22. J. A. Barranger	Gaucher 病	<i>ex vivo</i> での CD34+ 細胞への遺伝子導入と自家骨髄移植
23. S. Karlsson & D. B. Kohn	Gaucher 病	骨髄幹細胞へのレトロウイルスによるヒト glucocerebrosidase 遺伝子の導入
24. J. E. Calpin & D. A. Casciato	HIV-1 の無症候患者	HIV-1 遺伝子をコードするマウスレトロウイルス
25. G. J. Nabel	AIDS	Rev (mutant) の大量発現によるウイルス産生の阻害
26. C. Raffel & K. Culver	再発性小児悪性星細胞腫	腫瘍細胞への単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子の <i>in vivo</i> での導入
27. C. Hesdorffer	進行癌	ヒト multiple-drug resistant (MDR) 遺伝子の導入
28. J. Ilan	ヒト脳腫瘍	insuline-like growth factor 1 の染色体外に存在するアンチセンス cDNA の発現
29. Cassileth & Podack	小細胞肺癌	腫瘍細胞において IL-2 を発現
30. J. O'Shaughnessy	化学療法後の乳癌	骨髄幹細胞への MDR 遺伝子のレトロウイルスによる導入
31. P. D. Greenberg	HIV 血清反応陽性者	CD8+ HIV-specific T cell への遺伝子導入
32. E. Oldfield	再発性小児脳腫瘍	腫瘍内へのチミジンキナーゼ遺伝子導入と ganciclovir の静脈内投与
33. T. D. Gupta	切除不可の悪性黒色腫	ヒト悪性黒色腫への IL-2 遺伝子導入による免疫療法
34. J. Economou	転移性悪性黒色腫	腫瘍への IL-2 遺伝子導入による免疫療法
35. F. Wong-Staal	HIV 感染	リボザイムによる HIV の療法

人工的に形質転換を起こすための細胞への遺伝子導入法には多くの方法が考案されている。しかし、原核細胞、真核細胞のいずれを例にしても、遺伝子の導入の効率だけを考えると、ウイルスゲノムを改変したベクターへ必要な cDNA を組み込み作製した変異ウイルスの感染による導入方法が最も優れている。ヒトの遺伝子治療には、レトロウイルスとアデノウイルスのゲノムを改造したベクターが既に用いられているので<sup>4,8,9)</sup>、それらの使用法について述べる。

### 1) レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターは、ヒトへの使用が最初に承認されたウイルスベクターである<sup>5)</sup>。レトロウイルスの生活環、遺伝子構造、産生するタンパク質について、1980年代初頭までにおおむね解明された。これらの研究成果を背景に、ベクター自身と、感染はするが宿主細胞内で自律増殖せず、外来遺伝子を含むベクター由来のゲノムを持つ replication-defective recombinant virus を産生するために必要なパッケージング細胞から成る遺伝子導入システムが早期に開発された<sup>5)</sup>。

使用可能なレトロウイルスベクターは、Moloney murine leukemia virus ゲノムを基本とする<sup>5)</sup>。まず、ウイルスゲノムからウイルス複製に必要なタンパクをコードする遺伝子領域 *gag*, *pol*, *env* を除き、ベクターとした<sup>10,11)</sup>。一方、これらのタンパクを発現する NIH 3T3 細胞由来のパッケージング細胞を外来遺伝子を欠失部位に組み込んだレトロウイルスベクターでトランスフォームすると、ベクターの転写物をゲノムとし、パッケージング細胞から供給されるウイルスタンパクを使い、感染はするが複製しないウイルス粒子 (Replication-defective virus) が作られる。このウイルスは分裂増殖する細胞に感染し、ウイルスベクターと共に宿主染色体へ組み込まれた外来遺伝子を持続的に発現する。しかし、自己複製は起きないので、感染細胞を導入した個体内でウイルスの再感染は理論的には起きない<sup>3)</sup>。

上記のレトロウイルスベクターの使用による副作用は観察されていない<sup>3)</sup>が、これは十分な追跡調査が可能に程に汎用されていないからかもしれない。事実、本ベクター・システムには2つの問題が潜在

する<sup>3,11)</sup>。第一に、レトロウイルスベクターの染色体組み込みの際に、腫瘍抑制遺伝子の破壊や、ベクターの LTR によるプロトオンコジーンの活性化による insertional mutagenesis で宿主細胞自身がトランスフォームされたり、第二に、パッケージング細胞が持つレトロウイルス関連遺伝子とベクター間での組み換えによる先祖返りで、自律増殖するヘルパーウイルスが産生される可能性を共に完全に否定できないことである。ヘルパーウイルスによりマウスばかりでなく霊長類である rhesus monkey にも T 細胞腫瘍が発生することが報告された<sup>12)</sup>。現在使用されている L-シリーズ・レトロウイルスベクター<sup>13)</sup>と PA317 パッケージング細胞<sup>14)</sup>の組み合わせではヘルパーウイルス産生には2回の組み換えが必要である<sup>9)</sup>。これは非常に稀なことではあるが、レトロウイルスベクターの使用に際してヘルパーウイルスの有無を確かめることは重要である。<sup>3)</sup>

レトロウイルスは分裂細胞に感染する<sup>3)</sup>ので、血液細胞、肝細胞をはじめ多種の細胞に遺伝子導入が可能である<sup>10)</sup>。しかし、レトロウイルスは、ヒト血液中補体成分により不活性化される<sup>15,16)</sup>ので、体細胞への遺伝子導入は、穿刺や外科手術で患者細胞を採取後培養し、感染による遺伝子導入を体外で行ってから感染細胞を再び患者体内へ戻すという *ex vivo* の方法が採られる。肝細胞への遺伝子導入は肝切除により採取した細胞に対し行われる事になるが、手術に伴う危険もあるので、これも場合によっては不利な一面である。患者組織への直接感染が可能なウイルスベクターの開発が望まれる。

### 2) アデノウイルスベクター

呼吸器感染症の原因となるヒトアデノウイルス (5型など) DNA を改変して作ったアデノウイルスベクター使い、嚢胞線維症患者上気道粘膜細胞への遺伝子導入は既に行われている。この系では、ウイルス増殖防止のため、ゲノムの E1a 領域全部と E1b 領域の一部がベクターから除かれており<sup>17,18)</sup>、この欠損 E1 領域へ治療に使われる遺伝子が相対的組み換えを利用して組み込まれる<sup>19)</sup>。上述したレトロウイルス系と同様、複製しないウイルス粒子を得るため、E1 領域にコードされるタンパクは human embryonic kidney cell line の 293 細胞<sup>20)</sup>をヘルパ

一細胞として供給される。アデノウイルスベクターを使えば、非分裂細胞への遺伝子導入も可能である。また、 $10^{11}$  plaque-forming unit/ml と高力価のウイルスが得られること<sup>3)</sup>、呼吸器細胞ばかりでなく種々の細胞に遺伝子導入可能であるなどの特徴を持つ<sup>19)</sup>。染色体へのベクター組み込みは起こらないため、安定した長期の遺伝子発現は望めない点がレトロウイルスベクターと異なる。一方、ベクター上のアデノウイルス遺伝子から産生されるタンパクは免疫応答を惹起し<sup>3)</sup>、アデノウイルス感染による遺伝子導入を繰り返せない場合もある。temperature sensitive E2 mutant により E2 遺伝子からのタンパク質の産生を抑制することで、長期に渡る遺伝子の発現を可能にするための改良も進められている (J. W. Wilson, UT Southwestern Medical Center Seminar)。

### 3) 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターには、アデノ関連ウイルスベクター<sup>21)</sup> やヘルペスウイルスベクター<sup>22)</sup> がある。アデノ関連ウイルスは、染色体への遺伝子組み込みが起こるため<sup>23)</sup>、遺伝子の長期発現が期待されている。ヘルペスウイルスベクターは、脳細胞への遺伝子導入に適しているが、ヘルペス脳症など障害が起こる可能性を皆無にする必要がある。

### 物理的方法による遺伝子導入

物理的遺伝子導入法には、リン酸カルシウム-DNA 沈殿法<sup>24)</sup>、エレクトロポレーション<sup>24)</sup>、リポゾーム-DNA 法<sup>24, 25)</sup>、遺伝子銃<sup>26)</sup>、DNA 直接注入法<sup>27, 28)</sup> などがあるが、一般に、遺伝子の導入効率が低く、また、安定した長期発現が難しい<sup>1, 7, 29)</sup>。しかし、物理的遺伝子導入法には、ウイルス由来の DNA 配列を持たないからヘルパーウイルス産生の心配が無く、ウイルスベクターを使うときに起こる導入遺伝子の長さの制限も無いという利点がある。DNA と細胞膜との親和性や遺伝子導入効率を、cationic lipid を構成脂質として使って高めたりポゾーム<sup>30, 31, 32)</sup> や、DNA に asialoglycoprotein receptor のリガンドの asialoorosomuroid を poly-L-lysine を介して結合し、肝細胞へ特異的に遺伝子を導入する

方法<sup>33, 34)</sup> も考案されている。

### 外来遺伝子の発現調節因子

どのような遺伝子導入法を用いても、治療に使用する遺伝子と共にその遺伝子の転写を調節するためのプロモーター、エンハンサーが組み込まれる。多くの場合、SV40 early promotor, サイトメガロウイルス immediate-early gene promotor, レトロウイルス LTR などのウイルスのプロモーターが使用されるが、ヒトの体内といった *in vivo* の条件では dihydrofolate reductase gene promoter などの housekeeping gene promoter の方が遺伝子の長期発現に適しているとの報告もある<sup>35)</sup>。また、臓器特異的タンパクの遺伝子のプロモーター (肝臓のアルブミン遺伝子のプロモーターなど) を使えば、遺伝子の臓器特異的発現も可能となるので、遺伝子の安定な発現や発現させる組織を考慮したプロモーターの選択が必要である。

### 遺伝子治療の対象疾患

#### 1) 導入遺伝子がコードするタンパク質の直接作用が期待される疾患

アデノシンデアミナーゼ欠損<sup>7)</sup>、家族性高コレステロール血症<sup>36)</sup>、嚢胞線維症への遺伝子治療は既に行われ、また、表 1 に示した多くの疾患に対する遺伝子治療も既に RAC により承認されている。一方、培養細胞を使った *in vitro* の新規の実験段階にある研究や、既に行われた遺伝子治療の改良など、まだ承認されるに至っていない対象疾患を表 2 に示した。筆者らは、先天性有機酸代謝異常症の楓糖尿症 (maple syrup urine disease, MSUD) を例として、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の可能性について検討を行った<sup>2)</sup>。

楓糖尿症は、ペンシルバニア州に住み、同一宗派内の血族結婚により集団を維持している Mennonite<sup>37)</sup> では、176 件の出生に 1 件の頻度で発見され、ミトコンドリアに局在する分枝鎖ケト酸脱水素酵素の活性欠損により起こる<sup>38, 39)</sup>。本酵素は、E1 $\alpha$  および E1 $\beta$  の 2 種のサブユニットからなる脱炭酸酵素の E1、アシル基転移酵素の E2、ジヒドロリポアミド脱水

素酵素のE3の3つの触媒成分で構成される複合酵素系である<sup>38,39)</sup>。正常者リンパ芽球に本酵素活性が検出されるので、筆者らは、E1 $\alpha$ タンパクの異常による本疾患患者のリンパ球をEBウイルスで株化し、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入の受容細胞とした。ほとんど検出できなかった患者リンパ芽球の酵素活性は、正常ヒトE1 $\alpha$ をコードするcDNAの導入により、正常リンパ芽球が示す酵素活性の84—120%の活性を示した。臨床応用のためには、最適な遺伝子導入臓器やプロモーターの選択、さらに、疾患モデル動物を使った遺伝子導入後の発現の安定性や副作用の*in vivo*での検討などが必要であるが、<sup>2)</sup>楓糖尿症の遺伝子治療の可能性が示された。

このように、単一遺伝子の異常が原因で既存の方法では十分な治療効果の得られない多くの遺伝性疾患は、正常遺伝子の導入により機能の正常化が期待できるため、対象となる疾患は今後更に増加すると

思われる。

2) 導入遺伝子がコードするタンパク質の間接作用が期待される疾患

他方、表1に示したように、癌やエイズなどの感染症も遺伝子治療の対象疾患として研究されている。癌の発症には癌抑制遺伝子、プロトオンコジーン、サイトカイン遺伝子など複数の遺伝子が関与するため、治療に利用される遺伝子も多様である。

Natural killer cellやT cytotoxic lymphocyteをIL-2と共にヒトや齧歯類個体へ戻すと、様々な癌の退縮を起こす<sup>40,41,42)</sup>。この性質は、癌の免疫療法へ応用されているが、IL-2全身投与による強い副作用が現れる<sup>40)</sup>。これを軽減するため、IL-2を癌組織で産生させ、癌局所の濃度を高める事を目的として遺伝子治療が考案された<sup>42-47)</sup>。IL-2, IL-4<sup>48)</sup>, IL-6<sup>49,50)</sup>, INF- $\gamma$ <sup>46)</sup>, Granulocyte-macrophage colo-

表2 遺伝子治療の対象として研究されている遺伝性疾患

疾 患 名	導 入 遺 伝 子
1. 免疫機能不全	アデノシンデアミナーゼ
2. 免疫機能不全	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ
3. Leukocyte adhesion deficiency	CD-18
4. 血友病A	VIII因子
5. 血友病B	IX因子
6. von Willebrand 病	von Willebrand 因子
7. 鎌状赤血球症	$\beta$ -グロビン
8. サラセミア	$\beta$ -グロビン
9. Lesh-Nyhan 症候群	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ
10. ムコ多糖症	L-イズロニダーゼ
11. ムコ多糖症	$\beta$ -グルクロニダーゼ
12. Gaucher 病	グルコセラブロシダーゼ
13. Niemann-Pick 病	スフィンゴミエリナーゼ
14. フコシドーシス	$\alpha$ -フコシダーゼ
15. オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症	オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ
16. フェニルケトン尿症	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ
17. シトルリン尿症	アルギノコハク酸シンテターゼ
18. 楓糖尿症	分枝鎖ケト酸脱水素酵素
19. メチルマロン酸血症	メチルマロニル CoA ムターゼ
20. $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠損症	$\alpha$ 1-アンチトリプシン
21. 嚢胞線維症	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
22. 家族性高コレステロール血症	低密度リポタンパク質(LDL)レセプター
23. 筋ジストロフィー	ジストロフィン
24. パーキンソン病	チロシンヒドロキシラーゼ

ny-stimulating factor (GM-CSF)<sup>51)</sup>, TNF<sup>52,53)</sup> などのサイトカイン遺伝子も同様の目的で利用される。これらの遺伝子は癌細胞や癌浸潤リンパ球へ導入され、癌細胞は紫外線照射により増殖しない細胞に変えられてから患者体内へ戻される。これにより、癌に対する免疫機構が賦活化され、癌細胞が排除されるという方法である。

抗腫瘍剤が表す副作用として造血機能の抑制があるが、血液幹細胞へ導入した Multi-drug resistance gene の産物タンパクにより、この副作用を防止し、多量の抗腫瘍薬の使用を可能にする試み<sup>54)</sup>や、細胞の癌化に働いていると想定される腫瘍遺伝子の antisense gene を腫瘍細胞に導入し、癌細胞の増殖を抑制する試みもある<sup>55)</sup>。グリオーマを持つラットの脳へ、ヘルペスシンプレックスウイルスのチミジinkinナーゼを発現するレトロウイルスを産生するパッケージング細胞を移植すると、産生されたレトロウイルスは分裂増殖しているグリオーマに優先的に感染する。この動物に投与された化学療法剤でグアノシンの類似物質である ganciclovir は、レトロウイルスが感染したグリオーマのチミジinkinナーゼでリン酸化され、核酸代謝を阻害し、グリオーマの増殖だけを抑止する方法<sup>56)</sup>も研究されている。

### 今後の動向

ヒト細胞への遺伝子導入を基本的手段とした種々の疾患の治療法について、概要の説明を試みた。最近、遺伝子治療に関する総説が出版されている。本稿では特に詳述しなかった gene marking protocol と gene therapy clinical protocol については、Morgan と Anderson の総説<sup>7)</sup>等を参照されたい。今後、遺伝子治療の研究分野では、(1)既存のベクターに挿入する遺伝子の変更による、遺伝子治療の多疾患への適用拡大、(2)患者への直接感染や、導入遺伝子の長期安定発現が可能なウイルスベクターの開発や改良、(3)癌やエイズの治療に使える遺伝子もしくは遺伝子と薬の組み合わせなどの応用的開発、が試みられると思われる。

学内においては、ウイルスベクターやヘルパー細胞の作製や、それを使った基礎研究が行える環境整備が必要である。そのために、遺伝子実験施設や、

研究計画の迅速な審査を行える学内審議機関を設置すべき時期になっている。また、遺伝子治療がエイズなど特殊な感染症や腫瘍に対しての有効な一般的治療手段になるのも、それほど時間はかからないと思える。そのための準備についても、特に臨床講座で、十分考慮されるべきであろう。

### 文 献

- 1) Friedmann T. : A brief history of gene therapy. *Nature Genet.* **2** : 93—98, 1992.
- 2) Koyata H., Cox R. P. and Chuang D. T. : Stable correction of maple syrup urine disease in cells from a Mennonite patient by retroviral-mediated gene transfer. *Biochem. J.* **295** : 635—639, 1993.
- 3) Miller A. D. : Human gene therapy comes of age. *Nature* **357** : 455—460, 1992.
- 4) Anderson W. F. : Human gene therapy. *Science* **256** : 808—813, 1992.
- 5) Tolstoshev P. : Gene therapy, concepts, current trials and future directions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32** : 573—596, 1993.
- 6) 石井弘之 : 米国における遺伝子治療の現状. *実験医学* **12** : 345—349, 1993.
- 7) Morgan R. A. and Anderson W. F. : Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **62** : 191—217, 1993.
- 8) Blaese R. M. : Development of gene therapy for immunodeficiency : adenosine deaminase deficiency. *Pediat. Res.* **33** (Suppl) : S49—S55, 1993.
- 9) Zabner J., Couture L. A., Gregory R. 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.
- 10) Miller A. D. : Retroviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158** : 1—24, 1992.
- 11) Salmons B. and Günzburg W. H. : Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **4** : 129—141, 1993.

- 12) Donahue R. E., Kessler S. W., Bodine D. et al. : Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* **176** : 1125—1135, 1992.
- 13) Miller A. D. and Rosman G. J. : Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* **7** : 980—990, 1989.
- 14) Miller A. D. and Buttimore C. : Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 2895—2902, 1986.
- 15) Welsh R. M. Jr., Cooper N. R., Jensen F. C. and Oldstone M. B. A. : Human serum lyses RNA tumor viruses. *Nature* **257** : 612—614, 1975.
- 16) Welsh R. M. Jr., Jensen F. C., Cooper N. R. : and Oldstone M. B. A. : Inactivation and lysis of oncornaviruses by human serum. *Virology* **74** : 432—440, 1976.
- 17) Berkner K. L. : Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158** : 39—66, 1992.
- 18) Gluzman Y., Reichl H. and Solnick D. : Helper-free adenovirus type-5 vectors. In *Eukaryotic viral vectors* (Gluzman Y. ed.) : 187—192. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor N. Y., 1982.
- 19) Kozarsky K. F. and Wilson J. M. : Gene therapy : adenovirus vectors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3** : 499—503, 1993.
- 20) Graham F. L., Smiley J., Russell W. C. and Nairn R. : Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36** : 59—72, 1977.
- 21) Muzyczka N. : Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158** : 97—129, 1992.
- 22) Geller A. I. : Herpesviruses : expression of genes in postmitotic brain cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3** : 81—85, 1993.
- 23) Samulski R. J., Zhu X., Xiao X. et al. : Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* **10** : 3941—3950, 1991.
- 24) Keown W. A., Campbell C. R. and Kucherlapati R. S. : Methods for introducing DNA into mammalian cells. *Methods Enzymol.* **185** : 527—537, 1990.
- 25) Hug P. and Sleight R. G. : Liposomes for the transformation of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1097** : 1—17, 1991.
- 26) Williams R. S., Johnston S. A., Riedy M. et al. : Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88** : 2726—2730, 1991.
- 27) Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., et al. : Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247** : 1465—1468, 1990.
- 28) Acsadi G., Dickson G., Love D. R. et al. : Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* **352** : 815—818, 1991.
- 29) Mulligan R. C. : The basic science of gene therapy. *Science* **260** : 926—932, 1993.
- 30) Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M. et al. : Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84** : 7413—7417, 1987.
- 31) Brigham K. L., Meyrick B., Christman B. et al. : In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am. J. Med. Sci.* **298** : 278—281, 1989.
- 32) Zhu N., Liggitt D., Liu Y. and Debs R. : Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **261** : 209—211, 1993.
- 33) Wu G. Y. and Wu C. H. : Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.* **263** : 14621—14624, 1988.

- 34) Wilson J. M., Grossman M., Wu C. H. et al. : Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J. Biol. Chem.* **267** 963—967, 1992.
- 35) Scharfmann R., Axelrod J. H. and Verma I. M. : Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 4626—4630, 1991.
- 36) Randall T. : First gene therapy for inherited hypercholesterolemia a partial success. *JAMA* **269** : 837—838, 1993.
- 37) Marshall L. and DiGeorge A. : Maple syrup urine disease in the old order Mennonites. *Am. J. Hum. Genet.* **33** (Suppl.) : 139A, 1981.
- 38) Pettit F. H., Yeaman S. J. and Reed L. J. : Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75** : 4881—4885, 1978.
- 39) Heffelfinger S. C., Sewell E. T. and Danner D. J. : Identification of specific subunits of highly purified bovine liver branched-chain ketoacid dehydrogenase. *Biochemistry* **22** : 5519—5522, 1983.
- 40) Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M. et al. : A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *New Engl. J. Med.* **316** 889—897, 1987.
- 41) Forni G., Fujiwara H., Martino F. et al. : Helper strategy in tumor immunology : expansion of helper lymphocytes and utilization of helper lymphokines for experimental and clinical immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* **7** : 289—309, 1988.
- 42) Rosenberg S. A. : Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res.* **51** (Suppl.) : 5074s—5079s, 1991.
- 43) Fearon E. R., Pardoll D. M., Itaya T. et al. : Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* **60** : 397—403, 1990.
- 44) Gansbacher B., Zier K., Daniels B. et al. : Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J. Exp. Med.* **172** : 1217—1224, 1990.
- 45) Foa R., Guarini A. and Gansbacher B. : IL2 treatment for cancer : from biology to gene therapy. *Br. J. Cancer* **66** : 992—998, 1992.
- 46) Gastl G., Finstad C. L., Guarini A. et al. : Retroviral vector-mediated lymphokine gene transfer into human renal cancer cells. *Cancer Res.* **52** : 6229—6236, 1992.
- 47) Russell S. J., Eccles S. A., Flemming C. L. et al. : Decreased tumorigenicity of a transplantable rat sarcoma following transfer and expression of an IL-2 cDNA. *Int. J. Cancer* **47** : 244—251, 1991.
- 48) Tepper R. I., Pattengale P. K. and Leder P. : Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* **57** : 503—512, 1989.
- 49) Porgador A., Tzehoval E., Katz A. et al. : Interleukin 6 gene transfection into Lewis lung carcinoma tumor cells suppresses the malignant phenotype and confers immunotherapeutic competence against parental metastatic cells. *Cancer Res.* **52** : 3679—3686, 1992.
- 50) Mullen C. A., Coale M. M., Levy A. T. et al. : Fibrosarcoma cells transduced with the IL-6 gene exhibit reduced tumorigenicity, increased immunogenicity, and decreased metastatic potential. *Cancer Res.* **52** : 6020—6024, 1992.
- 51) Jaffee E. M., Dranoff G., Cohen L. K. et al. : High efficiency gene transfer into primary human tumor explants without cell selection.

- Cancer Res. **53** : 2221—2226, 1993.
- 52) Blankenstein T., Qin Z., Überla K. et al. : Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor  $\alpha$  gene transfer. J. Exp. Med. **173** 1047—1052, 1991.
- 53) Asher A. L., Mule J. J., Kasid A. et al. : Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor- $\alpha$ . J. Immunol. **146** : 3227—3234, 1991.
- 54) Mickisch G. H., Aksentijevich I., Schoenlein P. V. et al. : Transplantation of bone marrow cells from transgenic mice expressing the human MDR1 gene results in long-term protection against the myelosuppressive effect of chemotherapy in mice. Blood **79** : 1087—1093, 1992.
- 55) Zhang Y., Mukhopadhyay T., Donehower L. A. et al. : Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. Hum. Gene Ther. **4** : 451—460, 1993.
- 56) Culver K. W., Ram Z., Wallbridge S. et al. : In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. Science **256** : 1550—1552, 1992.
- 57) 大橋十也：骨髓幹細胞への遺伝子導入による遺伝病の遺伝子治療。実験医学 **12** : 333—339, 1993.