

ゲティングリガンドを同定するかが課題となっている。

## 5. おわりに

本稿では、遺伝子工学的にカプシドタンパク質を改変するアプローチによる改良型アデノウイルスベクターの開発について解説した。感染域を変更するためのアプローチとしては、抗体やタンパク質、高分子でベクター表面を修飾することによる生化学的・化学的方法もあり、さらに組織特異的プロモーターと組み合わせることで、より厳密な細胞特異的遺伝子発現の制御が可能となる。感染域を目的に応じて変更し、有効性・安全性を高めたベクターの開発は、遺伝子治療の進展につながるだけでなく、遺伝子の機能を解析するための必須の基盤技術にもなり、今後の研究の更なる発展が期待される。

## 文 献

- 1) Okegawa T., Pong R. C., Li Y., Bergelson J. M., Sagalowsky A. I., Hsieh J. T., *Cancer Res.*, **61**, 6592-6600 (2001)
- 2) Rauen K. A., Sudilovsky D., Le J. L., Chew K. L., Hann B., Weinberg V., Schmitt L. D., McCormick F., *Cancer Res.*, **62**, 3812-3818 (2002)
- 3) 水口裕之, 早川堯夫, *BIO INDUSTRY*, **18** (7), 5-14 (2001)
- 4) 水口裕之, 早川堯夫, *Mebio*, **21** (4), 8-16 (2004)
- 5) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M.A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **8**, 730-735 (2001)
- 6) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2003)
- 7) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene*, **285**, 69-77 (2002)
- 8) Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003)
- 9) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.*, **8**, 813-821 (2003)
- 10) Mercier G. T., Campbell J. A., Chappell J. D., Stehle T., Dermody T. S., Barry M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 6188-6193 (2004)
- 11) Okada N., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Saito T., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173-179 (2001)
- 12) Okada N., Saito T., Masunaga Y., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Okada Y., Fujita T., Hayakawa T., Mayumi T., Yamamoto A., *Cancer Res.*, **61**, 7913-7919 (2001)
- 13) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Koizumi N., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Watanabe Y., Mayumi T., Hayakawa T., *Gene*, in press.
- 14) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Cancer Gene Ther.*, **9**, 236-242 (2002)
- 15) Roelvink P. W., Mi Lee G., Einfeld D. A., Kovesdi I., Wickham, T., *Science*, **286**, 1568-1571 (1999)
- 16) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **9**, 769-776 (2002)
- 17) Smith T. A. G., Idamakanti N., Rollence M. L., Marshall-Neff J., Kim J., Mulgrew K., Nemerow G. R., Kaleko M., Stevenson S. C., *Hum. Gene Ther.* **14**, 777-787 (2003)
- 18) Koizumi N., Mizuguchi H., Sakurai F., Yamaguchi T., Watanabe Y., Hayakawa T., *J. Virol.*, **77**, 13062-13072 (2003)

☆

☆

☆

特集

# ウイルスの“平和利用”と 遺伝子治療

企画構成：増田道明（獨協医科大学微生物学教授）

## アデノウイルスベクター

水口裕之（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部主任研究官）

早川堯夫（国立医薬品食品衛生研究所副所長）

### *P o i n t*

- アデノウイルスベクターは既存の遺伝子治療用ベクターの中では、最も遺伝子導入効率の優れたベクターのひとつである。
- アデノウイルスベクターは、癌や血管新生の誘導を要する後天性疾患（末梢性血管疾患、虚血性心疾患など）に対する遺伝子治療臨床研究で汎用されている。
- アデノウイルスベクターによる遺伝子導入のためには、標的細胞がアデノウイルス受容体（coxsackievirus-adenovirus receptor；CAR）を発現していることが必要であるが、近年CAR非依存的な遺伝子導入が可能なファイバー改変アデノウイルスベクターが開発されている。
- 低抗原性のアデノウイルスベクターとして、すべてのウイルス蛋白質コード遺伝子を欠損させたguttedアデノウイルスベクターが開発されている。

アデノウイルスベクターは、これまでの全遺伝子治療臨床研究のプロトコール数あたりで約27%、患者数あたりで約18% (2003年10月現在) に用いられ、レトロウイルスベクターについて汎用されているベクターである。1999年には、アデノウイルスベクターを用いたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究で死亡事故 (高用量のベクター投与に伴うウイルス血症が関与) が起こり、ベクターや遺伝子治療プロトコールなどの安全面での一層の強化が課題となった。

本稿では、アデノウイルスベクターの特徴と問題点、および課題点を克服した改良型ベクターの開発などの現状について解説する。

## アデノウイルスの性質と構造

ヒトアデノウイルスは、1953年、小児の扁桃腺やアデノイド組織培養液中から分離され、これまでに51種の血清型<sup>\*1</sup>が発見されている。遺伝子治療のベクターとして用いられているアデノウイルスベクターは、sub-group Cに属する5型 (あるいは2型) のアデノウイルスを基盤としている。臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを起こすことが知られている。

アデノウイルスは、直径約80nmの正20面体構造をしており、その頂点には12個の突起構造をもったペントン (ペントンベースとファイバーからなる) が存在する。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバー<sup>\*2</sup>がアデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) ; 2型や5型アデノウイルスにおける受容体) に結合し<sup>1,2)</sup>、その後ペントンベースのRGD (Arg-Gly-Asp) モチーフ

と細胞表面上のインテグリン ( $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$  など) との相互作用でインターナリゼーションを受けることによって起こる<sup>3)</sup>。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。細胞質内に導入されたウイルスゲノムの核への移行は効率良く起こり、細胞に感染したウイルスの50~80%は60分以内に核に到達する (図1)<sup>4,5)</sup>。

ヒトアデノウイルスは約36kbの線状二本鎖DNAをゲノムとしてもち、その遺伝子構造は初期遺伝子のE1~E4と、後期遺伝子のL1~L5に大別される。初期遺伝子は主にウイルスDNAの複製に、後期遺伝子は主にカプシドなどの構造蛋白質の合成に関与する。遺伝子治療のベクターとして用いられているアデノウイルスベクターは、70以上にも及ぶウイルス蛋白質の合成を誘導する初期遺伝子であるE1領域 (E1領域はE1AとE1Bに分けられ、E1Aによりすべてのアデノウイルスのプロモーターが活性化される) を外来遺伝子に置き換え、E1蛋白質を恒常的に発現している細胞株である293細胞などで増殖させる。したがって、E1領域を欠損したアデノウイルスベクターは、E1

### \*1…血清型と受容体

ヒトアデノウイルスはAからFのsub-groupに大別される。sub-group Cに属するアデノウイルスをはじめ、多くのアデノウイルスはCARを認識して感染する (例外も存在する)。一方、sub-group Bに属するアデノウイルス (3・11・35型など) の受容体は永らく不明であったが、最近CD46が受容体であることが報告された。

### \*2…ファイバー

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子のL5領域に位置し、その構造はテール、シャフト、ノブの領域に分けられる。CARと結合するのはC末端のノブ領域である。RGDペプチドやポリリジンペプチドは、外来ペプチドの挿入部位として適したノブのHIループやC末端領域に遺伝子工学的に付与される。

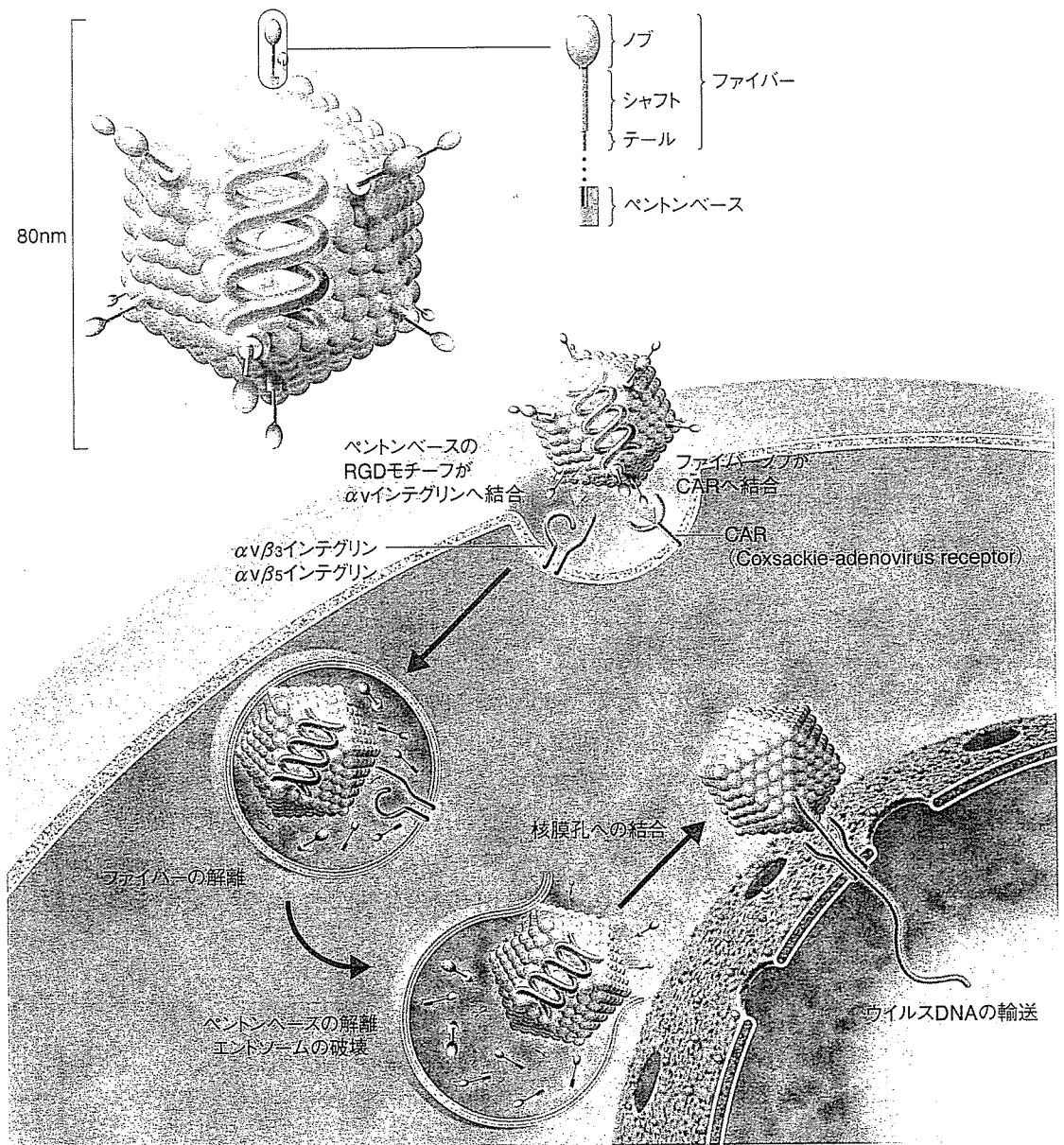


図1 アデノウイルスの構造と細胞への感染様式

アデノウイルスは252個のカプソメアよりなる正20面体構造をしている。そのうち頂点にある12個は突起構造をもったペントン(ペントンベースとファイバーからなる)とよばれ、他の240個はヘキサソンとよばれる。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーがアデノウイルス受容体(CAR)に結合し、その後ペントンベースのRGDモチーフと細胞表面上のインテグリン( $\alpha\beta 3$ 、 $\alpha\beta 5$

など)との相互作用でインターナリゼーションを受けることによって起こる。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。その後、カプシドが核膜孔に結合し、ウイルスゲノムを核内に放出する。

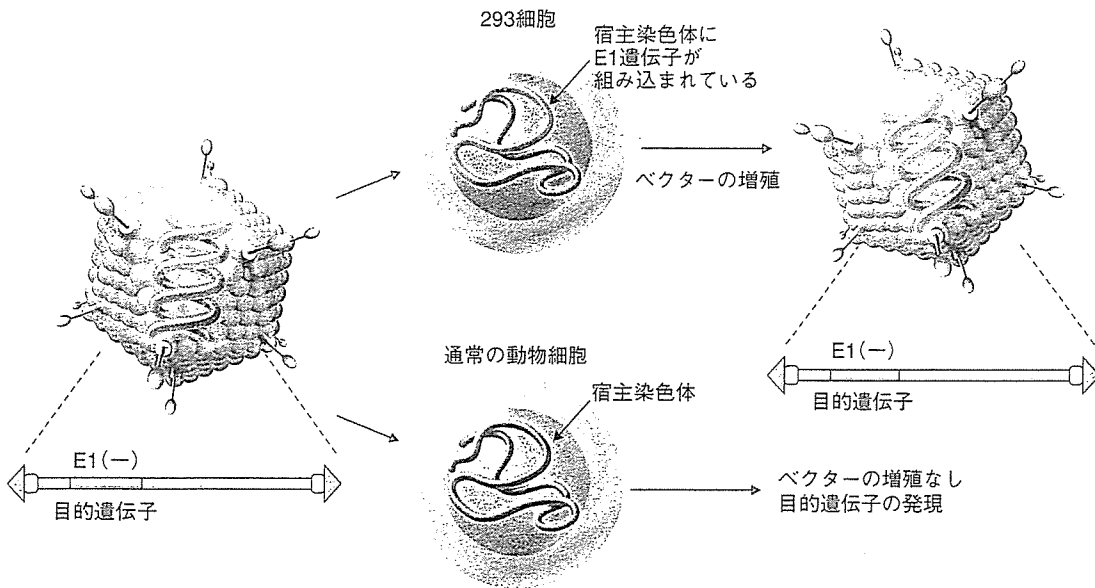


図2 アデノウイルスベクターの原理

E1領域を欠損し、目的遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターは、E1蛋白質を発現した293細胞などではウイルスが複製す

るが、E1蛋白質を発現しない通常の細胞では、ウイルスの複製は起こらず、目的遺伝子を発現する。

蛋白質を発現していない通常の細胞では増殖できず、増殖不能ウイルスとなる(図2)。

### アデノウイルスベクターの特徴

アデノウイルスベクターは以下に示すような特徴を有している。①種を問わず多くの種類の細胞に遺伝子導入でき、現存するベクターの中では最も遺伝子導入効率の良いものの一つである。②増殖停止期の細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる。③*in vivo*への直接の遺伝子導入にも適している。④高タイターのウイルスが比較的容易

に得られる。⑤物理化学的に安定であり遠心により濃縮が可能である。⑥比較的大きな外来遺伝子(最大約8.1kb<sup>6,7)</sup>、ファイバー改変型で最大約8.9kbまで<sup>8)</sup>。後述するguttiedアデノウイルスベクターでは30kbを超える遺伝子も可能)を搭載できる。⑦ウイルスゲノムは核内では染色体外DNAとして存在し、宿主の染色体に組み込まれる頻度は低いため、遺伝子毒性(外来遺伝子が宿主染色体に組み込まれることによる細胞の癌化など)を引き起こす可能性がきわめて低い。

一方、欠点としては、血球系の細胞などCARの発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率が低いこと、免疫反応を引き起こすことなどがあげられる。

## アデノウイルスベクターの 作製法

アデノウイルスベクターを作製する方法は、現在では種々報告されているが、結局はどのようにしてE1領域を外来遺伝子に置き換えるかということに集約される。以前は、パッケージング細胞である293細胞内での相同組換えを利用して、E1領域を外来遺伝子に置き換える方法が主に用いられてきたが、煩雑で効率が良くないことが問題であった。現在では、E1領域を外来遺伝子に置き換えたウイルスゲノム全長を含んだプラスミドやコスミドをあらかじめ作製し、これを293細胞にトランスフェクションすることで簡単にベクターが作製できるようになっている<sup>9)</sup>。例えば著者らは、簡便な*in vitro*ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用したアデノウイルスベクター作製法を開発しており(キット化済み)(図3)<sup>6,7,9)</sup>、現在では広く利用されている。本法は原理的にも手技的にも容易であり、分子生物学の基本的な知識・技術を取得していれば、誰でも簡単にアデノウイルスベクターを作製できるようになったといえる。

## アデノウイルスベクターの 遺伝子治療への適用

アデノウイルスベクターは、ゲノムが染色体外DNAとして核内に存在し、宿主染色体には組み込まれないため、基本的には数週間から数ヵ月程度の一過性の遺伝子発現しか示さない。そのため、一生涯にわたって治療用遺伝子の発現が期待される単一の遺伝性疾患に対する遺伝子治療への

適用例は少ない。むしろ、一過性の遺伝子発現が好ましい癌や血管新生の誘導を要する後天性疾患(末梢性血管疾患、虚血性心疾患など)に対するベクターとして汎用されている。アデノウイルスベクターは炎症を惹起する副作用を伴うが、癌に対する適用では、この性質は癌に対する免疫を活性化するという意味で、かえって長所にもなりうる。癌に対する遺伝子治療では、p53遺伝子(癌抑制遺伝子)や、サイトカイン遺伝子、自殺遺伝子(herpes simplex virus thymidine kinase 遺伝子など)などを、末梢性血管疾患、虚血性心疾患などに対する遺伝子治療では、血管新生作用のあるVEGF(vascular endothelial growth factor)遺伝子などを発現するアデノウイルスベクターを直接体内に投与する*in vivo*遺伝子治療が広く行われている。

## 改良型アデノウイルスベクター の開発

前述のように、アデノウイルスベクターの問題点として、①CARの発現が乏しい細胞へは効率良く遺伝子導入できないこと、②免疫反応を引き起こすこと、があげられる。このような問題点を克服した改良型アデノウイルスベクターの開発が進んでいる。

CARの発現が乏しい細胞種は意外と多く、造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞などが知られている。また、癌細胞は悪性度の進行とともに、CARの発現レベルが低下することが報告されており<sup>10,11)</sup>、アデノウイルスベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進めるう

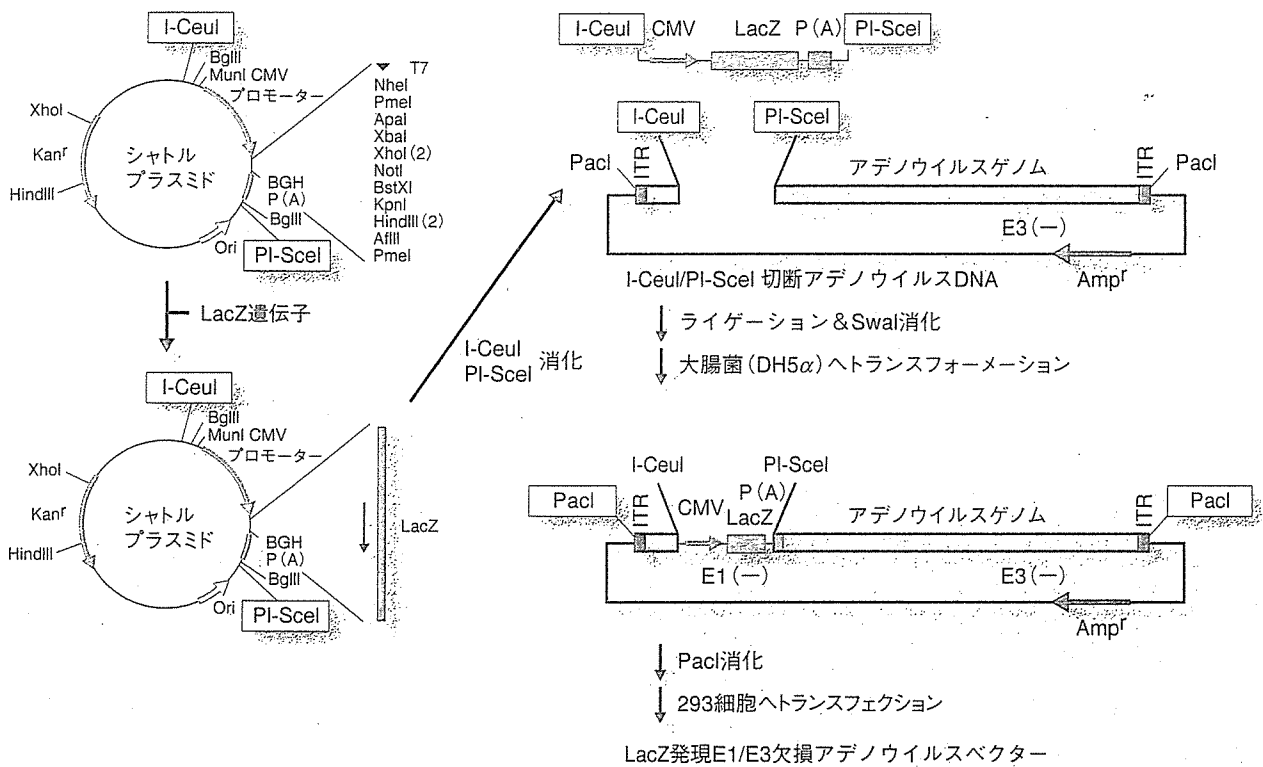


図3 *In vitro*ライゲーションに基づいた簡便なアデノウイルスベクターの作製

シャトルプラスミドに目的遺伝子(ここではβガラクトシダーゼ(LacZ)を用いた)を組み込み、I-CeuIとP1-SceIで切断する。これをI-CeuIとP1-SceIで切断したアデノウイルスDNAとライゲシ

ョンする。作製した組換えプラスミドをアデノウイルスゲノム両末端に存在する制限酵素部位PacIで切断し、293細胞にトランスフェクションするとアデノウイルスベクターができる。

えで考慮すべき問題と考えられる。このような問題を克服するために、著者らをはじめとするグループは、アデノウイルスのファイバー部分にRGDペプチドやポリリジンペプチドを遺伝子工学的に付与させることで、多くの細胞で発現しているαvインテグリンやヘパラン硫酸を認識して感染できるベクターや<sup>12,13)</sup>、ファイバー領域だけをCAR以外の分子(CD46など)をレセプターとしている5型

アデノウイルスとは異なった血清型のアデノウイルス(3・11・35型などsub-group Bに属するアデノウイルス)のファイバーに置換したベクター<sup>8,14-16)</sup>を開発している(図4)。このようなファイバー改変アデノウイルスベクターは、CARの発現が乏しい標的細胞への遺伝子導入効率を改善できるだけでなく、標的細胞から漏れ出たベクターが他組織に移行することによって起こる副作用も

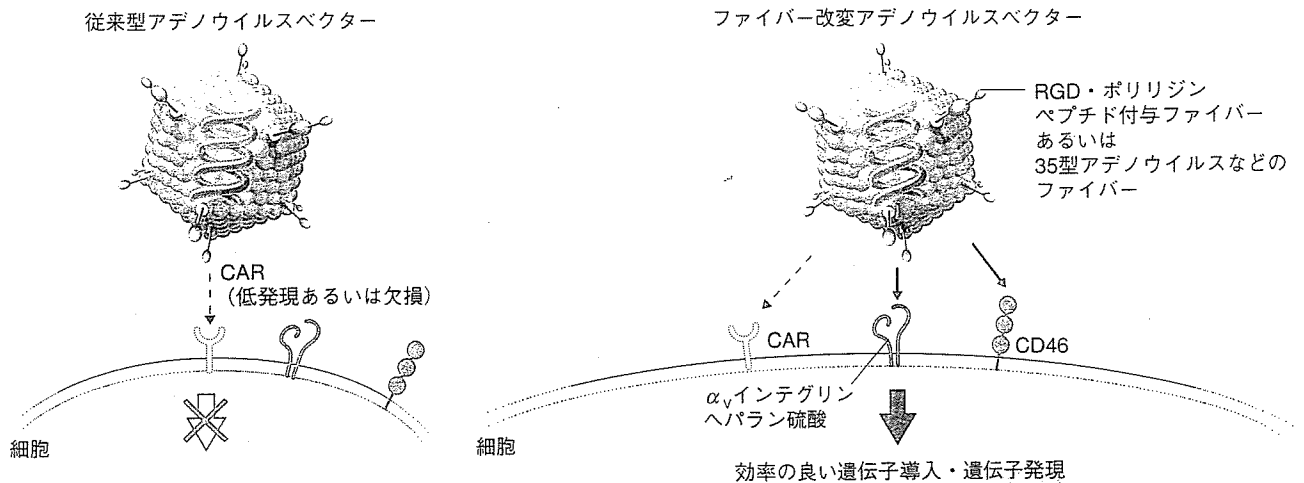


図4 ファイバー改変アデノウイルスベクター

野生型のファイバーをもった従来のアデノウイルスベクターは、CARを認識して感染する。そのため、CARの発現が乏しい細胞へは感染できない。RGDペプチドやポリリジンペプチドをファイバーに有した改変アデノウイルスベクターはCARだけでなく $\alpha_v$ インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できるため、CAR

に依存せず、効率良く遺伝子導入できる。また、ファイバー部分だけを35型アデノウイルス(sub-group B)などのファイバーに置き換えたベクターは、多くの細胞種で発現しているCD46を認識して細胞に感染し、遺伝子導入できる。

軽減することが期待できる。さらに、アデノウイルスベクター投与直後に起こる自然免疫(innate免疫\*3)による副作用も、免疫担当細胞へのベクター感染(ベクター取り込み)を回避することにより克服できることから、標的細胞指向性を制御できるベクターは、有効性だけでなく安全性の向上にも寄与できる<sup>17-19)</sup>。

また、免疫反応を引き起こしにくいアデノウイルスベクターとしては、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域(左端約0.4kb、右端約0.2kb)以外のすべてのウイルス遺伝子を欠損させたアデノウイルスベクター(guttedあるいはgutlessベクターとよばれることが多い\*4)が開発されている。従来のアデノウイルスベクターは増殖に必須のE1領域(とウイルスゲノムの複製に無

関係のE3領域)を除いただけであり、多くのウイルス遺伝子を含んでいる。そのため、ベクターに残されたウイルス蛋白質コード遺伝子から非特異的転写などによりウイルス蛋白質が産生されることによって起こる免疫反応が問題となっている。guttedアデノウイルスベクターでは、このような問題を解決することができ、炎症の軽減およびそれに伴って長期間にわたる目的遺伝子の発現が認められることが動物実験で報告されている<sup>20-23)</sup>。

現在、癌に対してRGDペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクターの臨床研究が米国で始まっている。また、guttedアデノウイルスベクターに関しては、1例ではあるが、血友病に対する臨床研究が行われた。今後これらの改良



型アデノウイルスベクターを用いた臨床研究の展開が期待されるとともに、さらなるベクターの改良が必要となるであろう。ベクター開発をはじめとする遺伝子導入・発現技術開発は、遺伝子治

療の実用化と一層の進展に向けての最大の鍵であり、地道な基礎研究が、遺伝子治療臨床研究の成功および遺伝子治療の普及という成果となって現れることを期待している。

\* 3…自然免疫 (innate 免疫)

アデノウイルスベクター投与後、ベクターがクッパー細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞に取り込まれることによって TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) や IL-6 (interleukin-6) などサイトカインの産生が起こり、免疫系が活性化される。ペンシルバニア大学でのアデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故は、このような免疫反応が一因と考えられている (ほかに臨床プロトコールの不備などの複合的な要素が死亡事故の原因と考えられている)。

\* 4…guttated アデノウイルスベクター

guttated アデノウイルスベクターは通常、すべてのウイルス蛋白質の供給をヘルパーウイルス (E1 欠損型アデノウイルスベクターなど) に依存して外来遺伝子だけを搭載した guttated ベクターを増殖させ、目的のベクターウイルスとヘルパーウイルスを塩化セシウムの密度勾配遠心で物理化学的に分離することで作製する。そのため、ヘルパーウイルス依存性アデノウイルスベクターともよばれる。同時に、30kb を超える外来遺伝子を搭載できる長所も併せている。

文献

- 1) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275: 1320-3.
- 2) Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3352-6.
- 3) Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR. Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; 73: 309-19.
- 4) Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 1993; 75: 477-86.
- 5) Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 367-78.
- 6) Mizuguchi H, Kay MA. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2577-83.
- 7) Mizuguchi H, Kay MA. A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2013-7.
- 8) Mizuguchi H, Hayakawa T. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 2002; 289: 69-77.
- 9) Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 165-76.
- 10) Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh JT. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 2001; 61: 6592-600.
- 11) Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, Chew KL, Hann B, Weinberg V, et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res*

- 2002; 62: 3812-8.
- 12) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 2001; 8: 730-5.
  - 13) Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T. Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 2003; 5: 267-76.
  - 14) Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A, et al. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 2000; 74: 2567-83.
  - 15) Rea D, Havenga MJ, van Den Assem M, Suttmuller RP, Lemckert A, Hoeben RC, et al. Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells. *J Immunol* 2001; 166: 5236-44.
  - 16) Knaan-Shanzer S, Van Der Velde I, Havenga MJ, Lemckert AA, De Vries AA, Valerio D. Highly efficient targeted transduction of undifferentiated human hematopoietic cells by adenoviral vectors displaying fiber knobs of subgroup B. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1989-2005.
  - 17) Okada N, Saito T, Masunaga Y, Tsukada Y, Nakagawa S, Mizuguchi H, et al. Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7913-9.
  - 18) Mizuguchi H, Hayakawa T. Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 236-42.
  - 19) Okada Y, Okada N, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mayumi T, Mizuno N. An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF $\alpha$ -expressing adenovirus vector into established murine melanoma. *Gene Ther* 2003; 10: 700-5.
  - 20) Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, et al. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998; 18: 180-3.
  - 21) Maione D, Della Rocca C, Giannetti P, D'Arrigo R, Liberatoscioli L, Franlin LL, et al. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5986-91.
  - 22) Kim IH, Jozkowicz A, Piedra PA, Oka K, Chan L. Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13282-7.
  - 23) Chuah MKL, Schiedner G, Thorrez L, Brown B, Johnston M, Gillijns V, et al. Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 2003; 101: 1734-43.