

番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.  
分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

添付7

題名	<b>Sustained Transgene Expression Using MAR Elements</b>
雑誌	Current Gene Therapy, 2008, 8, 353-366
著者	Niamh Harraghy, Armelle Gaussin and Nicolas Mermod*
機関	Institute of Biotechnology, University of Lausanne, Switzerland
要旨	<p>MAR (Matrix attachment regions)はDNA/クロマチンを核基質に接着・係留させるDNA配列で、これまで哺乳動物と植物種に関して記載されてきた。MARは、真正クロマチンの生成・維持を促進する多くの特性を持っている。ウイルス性あるいは非ウイルス性ベクターに取り込んだ場合、導入遺伝子の発現亢進や位置効果の制限などの作用を示す。MARは、これまで主に導入遺伝子の発現量の向上や組換えたんぱく質の産生に用いられて来たが、最近、哺乳動物の遺伝子治療におけるMARの効用を示す幾つかの有望な研究が現れた。これらの結果は、治療用遺伝子の持続的あるいは高い導入遺伝子発現を達成し、そして/あるいは、持続的発現の達成に必要なとされるウイルスベクターのMOIを減じるために、どのようにMARを用いたかを説明している。さらに、つい最近では、新規のMARの発見と導入遺伝子デリバリのための改良ベクター、とりわけ非ウイルス性エピソームベクターの開発により、治療用遺伝子の発現でのMARの活用に関して大きな関心を持たれている。</p> <p>本稿では、本分野における研究の進捗状況を概観するとともに、当該技術の将来の方向性と対処すべき課題について論ずる。</p>

## 1. INTRODUCTION

導入遺伝子の染色体への組込みが持続可能な発現を担保するものであるかという問いは、現行のほとんどの遺伝子治療プロトコールに関連した主な課題のひとつである。宿主染色体への組込みは、ほとんどの事例で偶発事象のまま、導入遺伝子の発現は、「位置効果」、すなわち導入遺伝子が位置するクロマチン環境に左右されている。この効果は、往々にして二つの重大な悪影響を与えることが多い：1) 導入遺伝子抑制が時間経過と共に起こる、そして/または2) 導入遺伝子が細胞遺伝子部位の途中か近傍に組み込まれる。後者では、遺伝子発現が調節異常に陥るか、あるいは細胞自体に悪影響を与えかねない遺伝子の不活性化を引き起こす。広範に発現しているハウスキーパー遺伝子のプロモータ領域やウイルス末端繰り返し配列に見られる許容性 (permissive) クロマチン構造を形成・維持する DNA 配列により導入遺伝子抑制を防止することが可能である。しかしながら、これらエレメントは、挿入位置における一般的效果として、発ガン遺伝子などの細胞遺伝子の誤った活性化を引き起こす可能性を持つ。このため、導入遺伝子を位置効果から保護し、そして/またはその近傍の遺伝子に干渉を行わない DNA エレメントの探索に大きな関心がもたれている。これまで、少なくとも 5 種類のそのようなエレメントが報告されている。表 1 に掲げたこれらのエレメントは、境界/インシュレータエレメントとして働き、すなわち、導入遺伝子を、ヘテロクロマチンの伝播や、あるいは近位/遠位のエンハンサーやプロモータの影響から遮断する。(インシュレータ活性は [1-3]に概説)。幾つかの研究は、これらのエレメントが導入遺伝子をクロマチン環境から遮断するという有望な結果を提示している。ここでは、生体内における持続可能な遺伝子発現に関する、MAR の使用可能性について論じる。

Table 1. DNA Elements that may be Used to Prevent Transgene Silencing or Increase Transgene Expression

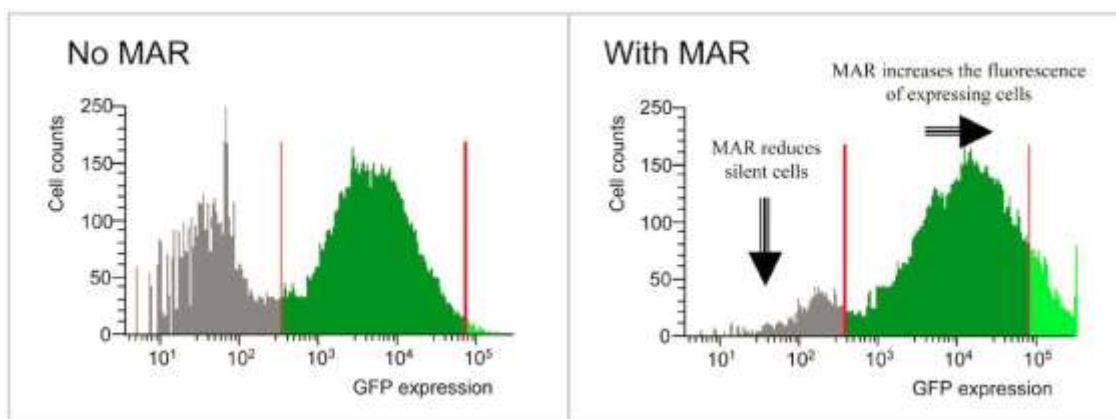
Activity/Element *	MAR (Matrix Attachment Region)	Insulator (Barrier or Enhancer-Blocking, e.g. cHS4)	LCR (Locus Control Region)	STAR	UCOE (Ubiquitously acting Chromatin Opening Elements)
Binds to nuclear matrix	Yes	No specific association	Only if it contains a MAR	No	No
Chromatin loop formation	Yes	Yes (enhancer-blocking elements)	Yes	Unknown	No
Insulator activity	Yes (but not all)	Yes	No, but may be exceptions	Yes	No
Transcription activation	Yes	No	Yes	No	Yes
Enhancer	Generally only after integration, but some reports of increased expression in transient assays	No	Yes	No	No
Replication	Yes (pEPI)	Unknown	Unknown	Unknown	No
TF binding site	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Histone binding site	Yes	Yes	Yes	Unknown	Yes
Orientation-dependent effect on transgene	Depends on MAR	Position relative to transgene important	Yes	Unknown	Yes
Position-independent transgene expression	Majority yes	Majority yes	Yes if powerful enough	Yes	Yes
Copy number-dependent transgene expression	Majority no	No	Yes	Yes	Unknown
Tissue-specific	Tissue specificity observed for some	No/unknown	Yes	No	No

\* see text for details and references

## 2. MATRIX ATTACHMENT REGIONS (MARs)

クロマチンが一連のループに隔離されてという仮説は、1970年代にLaemmliと共同研究者によって提案された[4,5]。このモデルでは、ループは、クロマチンがDNA配列の特異的な部位で核内の骨格たんぱく質に付着することにより形成される[6-10]。キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*) のhsp70遺伝子上流にある二つのそのような付着部位(Xelements)の研究から、それらの部位がA+Tリッチであること、そしてクロマチンを核内骨格に固着することに関わる領域と関連していること、その結果クロマチンループを形成することを明らかにした[11]。これらのエレメントは、従ってscaffold or matrix attachment regions (SAR, MAR or S/MAR)と命名された。混乱を避けるため、出典での用いた用語にかかわらず、これらエレメントをここではMARエレメント(MARと略す)とした。真核細胞のクロマチンが独立した一連のループ群で形成されているという見解は、現在では広く受け入れられている[12,13]。MARが境界/インシュレータエレメントとして働くかもしれないという着想は、MARをフランキングしたレポータ遺伝子を安定的導入した細胞株においては発現増強が認められるが一過性発現系では見られないという一連の研究結果[14-17]並びに複数コピーのMAR含有レポータ遺伝子を持つトランスジェニックマウスはコピー数に比例した遺伝子発現を示すという研究結果[18, 19]から導き出された。

“1遺伝子-1MAR”仮説は、MARの分布と遺伝子密度の平均と似ていること[20-22]、そしてMARと核基質の相互作用は、遺伝子/細胞タイプ特異的であるという知見から浮上した[23]。境界/インシュレータ活性とMARと真性クロマチンの関連性などから、ヘテロクロマチンの伝播から導入遺伝子を遮断・保護することが出来る独立したクロマチン領域をMARが生成するという可能性がこれまで検討されてきた。実際、作用機構は十分には把握されてないが[23]、MARの導入遺伝子抑制阻害効果とその結果としての導入遺伝子発現細胞の出現頻度の上昇が報告されている[24, 25] (Fig. 1)。



**Fig. (1).** Representative FACS profile of CHO DG44 cells that were co-transfected with a GFP reporter vector (with or without a MAR element) and a puromycin selection plasmid followed by 2 weeks culture with the antibiotic. A grey color illustrates the fluorescence of cells that express at low levels, probably as a result from transgene integration in a non-favourable chromosomal environment, while a dark or light green color shows the fluorescence of cells expressing the transgene at moderate or high levels. Modified from Girod *et al.* [47].

MARが多く共通した特徴を持っており、そしてその進化的保存性はひとつの種のMARが他の種でも機能を発揮できるという事実から示唆された[17]。しかしながら、DNA配列の相同性は、種内、種間双方においてで限定的である[16]。従って、ヒトゲノム中に数万の推定MARがあるにも拘らず、極めて少数のMARのみが詳細な機能解析に供せられている(**Table 2**)ということは当然と言える。

Table 2

MAR	Features	Reference
E $\mu$ MAR from the Immunoglobulin heavy chain locus	B-cell specific; increases gene expression and confers copy number and position- independent gene expression. Intronic.	[26-28] and references in text
hulFN- $\beta$ MAR from the human interferon- $\beta$ locus	Some tissue specificity observed; induces high levels of gene expression; does not always confer position-independent or copy number dependent gene expression. MAR located 5' and 3' of gene	[29, 30] and references in text
apoB MAR from the human apolipoprotein B locus	Tissue-specific (hepatic, intestinal, placenta, macrophage); increases gene expression and confers position-independent gene expression. MAR located 5' and 3' of gene.	[31, 32]
Ch-LysMAR from the chicken lysozyme locus	Tissue specific expression, enhances gene expression and confers position-independent and copy number dependent gene expression. MAR located 5' and 3' to gene	[18, 33]
MAR $\beta$ from the T cell beta receptor locus.	Located 5' to gene	[34, 35]
MAR 1-68; X-29	In silico-identified human MARs that potently increase and stabilize transgene expression. Suppressor of variegation and silencing	[16]

MARは発生的に制御された遺伝子群の発現を次のように増強する；最初に、エンハンサーと相互作用し、そして/またはDNAを核基質に接着させ、そこで活性クロマチン領域を生成する。また、MARは遺伝子を隣接あるいは遠位のエンハンサーから遮断し、そしてクロマチン再構成たんぱく質群を動員して、遺伝子発現の活性化、抑制あるいは微調整等々の機能を発揮する。MARの大きさは300-5000bpの範囲に分布する。A+T リッチドメインを保有し[11, 36-38]、これら領域は、DNA二重らせんのまき戻し、不安定化[39, 40]そしてDNAの湾曲構造の形成[41]に寄与する。さらに、MARは、SATB1やBrightそしてARBPなどの転写因子の結合部位として働く[42-44]。おそらく、バイオ工学あるいは遺伝子治療の観点から見たMARの最大の特徴は、長期間にわたる導入遺伝子の発現増強性とその維持能力である。

Evans [45] と Girod [16] らは、幾つかの既存のMAR同定アルゴリズム[21, 46]を用い発現継続性を備えたMARの探索を試みたが不調に終わった。一方、Girod らは、興味深いことにヌクレオソーム位置特定の幾つかのアルゴリズムが高い遺伝子発現に関係するMARをより正確に予測できることを見出した。これにより、顕著な湾曲構造、深い主溝、広い副溝、低いTmそして潜在的転写因子結合部位の出現頻度等のパラメータに基づく新しいアルゴリズムの設計に到った[16]。ヒトゲノムの分析の結果、50,400 のMARs候補から、さらに厳しい条件の探索により1566の配列を同定した。これらのエレメントのうち7つを解析したところ6つが有意に安定的遺伝子導入の系でレポータ遺伝子の発現亢進を示した[16]。これらの新規MARは、またcLysMARと比較して有意にレポータ遺伝子の発現を増大させ、ひとつはマウスに導入の非ウイルス性ベクターから治療たんぱく質の発現亢進を引き起こした[16]。MARの導入遺伝子発現に対する効果は遺伝子の長さには関係なく、生体内電気穿孔法による非ウイルス性ベクターのマウス筋肉細胞への導入では、ヒトMARは真核細胞遺伝子の中でも長いことで知られるユートロフィン遺伝子の発現誘導に成功している(S. Puttini and N. Mermoud, 未発表)。

In vitro試験では、MARは組換えたんぱく質産生に多大な利便性をもたらすことが示されてきた。導入遺伝子の発現増強と長期間の発現維持に加え、MARはポリクローナル細胞集団における発現レベルの変動を減じることが示されている[47]。このようにMAR配列は、遺伝子治療が直面している、適度なあるいは増強した遺伝子調節、そして遺伝子抑制と誤挿入効果の減少などの課題克服に役立つ可能性が高い。以下の数節では、MARがこれら有害事象の克服を如何に行なうかを考察する。

### 3. 遺伝子治療における今日的課題とMARによる課題克服

#### 3-1 遺伝子抑制

遺伝子抑制は生理的過程であり発生的に制御された遺伝子調節にとって肝要である。しかしながら、この現象は、哺乳動物細胞への遺伝子導入後しばしば起こる現象で、特に非ウイルス性ベクターの場合の失敗要因のひとつとなっている。遺伝子抑制は、連動して起こるDNAメチル化状態とヒストンや他の蛋白質の修飾変化から最終的にはヘテロクロマチン形成に到る変化の結果である。DNAメチル化は、ひとつの可逆過程であり、発生過程においてDNAのメチル化状態を変化させることで遺伝子発現を一時的に調節している[48-51]。DNAメチル化は安定的遺伝子抑制に重要であることはいくつかの研究で確認されている[52]。系統的研究はなされていないが、細胞および組織は、細胞の特徴を決定している特異的DNAメチル化パターンを示す[53]。とりわけ、幹細胞あるいは前駆細胞は、低頻度のDNAメチルを示すためかその分化細胞より低い抑制効果を示す傾向にある。しかしながら、これらの細胞は分化に際して染色体の多くの部分を常にメチル化し、組み込まれた導入遺伝子も内在性遺伝子と共にこのように抑制するのかもしれない。分化の過程に起こるDNAメチル化と遺伝子抑制に拮抗する遺伝子配列の利用は、とくに前駆細胞あるいは幹細胞ベースの治療法にとって特に有用であると思われる。分化細胞や組織での導入遺伝子の抑制に細胞DNAのメチル化のプロフィールが、染色体挿入型あるいはエピソーム型のベクターにとってどの程度影響するか議論の余地がある。

免疫グロブリン (Ig) 遺伝子は、脱メチル化がある役割を担う発生学的に制御された遺伝子発現として精力的に研究された例である。ほとんどのプレB細胞では、 $\kappa$ 鎖は再構成されず、メチル化され、そして転写的に不活性である一方、B細胞と形質細胞では $\kappa$ 鎖は再構成され、低メチル化状態で転写が活発に行われている[54,55]。Ig $\kappa$ 遺伝子は、エンハンサーに隣接しているそのイントロン領域に二つのMARを内包し、それらはエンハンサー作用に必須であることが報告されている[56]。メチル化されたIg $\kappa$ 遺伝子でトランスフェクトされたB細胞および導入Ig $\kappa$ 遺伝子は、MARが存在する時のみ脱メチル化されることを示した研究からMARの脱メチル化における役割が示唆された[57, 58]。Jenuweinらは、Ig $\kappa$  MARがIg $\kappa$ 遺伝子の1kb上流に位置する遠位のプロモータの活性化に必要であることを示した[59]。Forrester et al. [58] は Lichtenstein et al. [57] と Kirillovらの仕事[60]を発展させ、遠位プロモータの活性はDNAメチル化に感受性があり、そしてMARが脱メチル化に必要であることを示した。

Kirillovらは、IgMARが本質的には必要ではなく、hulFN $\beta$ -MARや*Drosophila*ヒストン1遺伝子由来MARで置換できることを示した [60]。しかしながら、核基質への接着能力が乏しいMARとの置換はB細胞株における脱メチル化を誘起出来ず、核基質へのMARの接着が脱メチル化の必須要件であることを示唆した。Dangらは、hulFN $\beta$ -MARがメチル化により誘起される導入遺伝子抑制をどの程度防止・克服することが出来るか検討した [61]。メチル化プロウイルスDNAの293細胞への一過性導入は、MAR存在下でも低い発現に終始した。対照的に、安定発現系ではメチル化対照ベクターは検出可能レベルの発現は見られなかったが、MAR含有メチル化ベクターは非メチル化ベクターに比べ低い検出し得るレベルの発現を認めた[61]。

Dangらは、MARがメチル化誘導のレトロウイルスLTRの抑制に十分には対抗できないが、低レベルの遺伝子発現を可能にするオープンクロマチン構造を維持するのに役立っているであろうという仮説を立てた[61]。この研究は、また、対照ベクターの33%がメチル化されるのに対しMAR含有ベクターのどれもがメチル化を示さず、MARがレトロウイルスLTRの新たな(*de novo*)メチル化を防止出来ることを示した。さらに、MAR-ベクターは18週間の試験期間にわたり導入遺伝子の安定した発現を維持し、NGFRマーカー導入遺伝子の蛍光強度は常に対照ベクター上回っていた。このように本研究は、MARが導入遺伝子発現を増強と維持し、新たなメチル化誘起の導入遺伝子抑制を防止することを示した。

DNAメチル化は遺伝子抑制に関するひとつの重要な側面であるが、本質的なものではない。Kay

と共同研究者たちは、DNAのメチル化状態を導入前に変えることやベクターからCpGジヌクレオチドを欠失させることがメチル化誘起遺伝子抑制に対してほとんど影響を及ぼさないことを示した[62]。しかしながら、彼らはその後、ヒストンの修飾が導入遺伝子発現の抑制とその維持に関わっていることを見出している[63]。細菌由来のエピソームベクターを用いた試験で、H3K9me2, HDAC2 およびHP1 $\alpha$ のようなヘテロクロマチンマーカが2.5倍増加すること、そして、ミニサークルプラスミッド(細菌由来DNA配列を欠失させたプラスミッド。導入後真正クロマチンマーカと導入遺伝子の持続的発現を示す。)に比べ低調な遺伝子発現に終始することを見出した。彼らは、抑制が、ある特異的配列ではなく、むしろ細菌性DNAの採用したクロマチン構造により決定付けられていると考えている[62]。このように、あるDNA領域の転写因子として/あるいは転写に有利なクロマチン再構築複合体を動因する能力は真正クロマチンを維持するために必須である。このような配列/インシュレータがない場合、ヘテロクロマチン構造は伝播していく。

MARがヒストンアセチル化の拡張ドメインの生成を促進することが報告されてきた[64]。ChIP法は、Ig $\kappa$  遺伝子座のVDJ領域がMAR非存在の場合に比べ、約16倍のアセチル化H4と64倍のアセチル化H3を含むことを明らかにした。この研究はまた、H4のアセチル化が内在性RNAポリメラーゼによる転写とは無関係であることを示している。著者らはMARが導入遺伝子の特異的な核内領域に誘導して、核内基質に係留することで遺伝子座の可逆的アセチル化を亢進させるという、MARの脱メチル化での作用と類似した機序を推測している[60]。その他のMARの遺伝子発現への影響の与え方は、結合する多くの転写因子とクロマチン再構築因子を通じてのものがある。これらのたんぱく質群は、隣接する遺伝子をクロマチンの再構築を経て活性化あるいは抑制する[23]。例えば、MARに結合することが知られているSATB1転写因子群は、遺伝子発現に正負のいずれかの効果を示す[44, 65]。SATB1は、核基質へのMARの周期的な係留によってクロマチンを独立した多くのループに組織化することが知られている[66]。そのようなループ形成はBリンパ球における転写活性化ドメインの生成に必須であることが報告されている[65]。他の調節たんぱく質との相互作用により、SATB1はクロマチン再構築たんぱく質を動員し、その結果クロマチン構造の変更を加え遺伝子発現を調節する。例えば、SATB1とMARに結合するPML (promyelocytic leukaemia) bodyの会合が、MHCクラスIの遺伝子座において一部の遺伝子群の発現を調節していることが知られている[67]。

### 3-2 組込み効果 (Integration Effects)

導入遺伝子の宿主ゲノムへの組込みは、一般的に持続性のある遺伝子発現の要件であった。しかしながら、これが遺伝子治療の効果を二つの理由で限定的にしている。

- 一つは、導入遺伝子の発現が組込み部位によって影響されること；増加あるいは通常に起こる減少あるいは発現の可変性 (Variegation) などの否定的結果に終わる場合、より強いプロモータとエンハンサーの使用、そして/あるいは複数個の導入遺伝子コピー数の導入等の開発方針変更につながる。
- この他、より深刻な結果は、挿入による突然変異生成で、導入遺伝子とその調節配列の組み込みにより宿主のいくつかの遺伝子の発現に影響が出る場合である。この一例は、詳細な報告がなされているX-SCIDの遺伝子治療臨床研究が挙げられる。プロトオンコジーンに組み込まれたウイルスベクターと導入遺伝子の組み合わせが選択に有利な形質を細胞に伝達し、白血病の発症に至ったものと考えられる[68, 69]。

遺伝的に同一な細胞集団において高発現から低発現状態間の散発的・可逆的な移行現象を指す発現可変性 (Variegation) はもうひとつの組込み部位に関連した問題である。導入遺伝子の複数コピーは広範なゲノムの位置に組み込まれるため、個々の導入遺伝子は異なる制約に晒され、その発現は細胞ごとに相当にバラツクであろう。一方、非ウイルス性ベクターの複数コピー導入は、同じ部位にタンデムに共に組み込まれ、導入遺伝子の不安定性と組換え現象を引き起こす可

番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.

分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

能性がある。これは、コピー数依存の遺伝子発現亢進が必ずしも認められる訳ではなく、場合によっては複数のベクターが遺伝子抑制に働く場合があることを意味している。

MARが独立したクロマチンドメインを形成し、発現変動性や遺伝子抑制などの“組込み効果”から導入遺伝子を遮断・保護することを位置効果に非常に感受性のある乳清酸性たんぱく質 (WAP) 遺伝子由来の極小のプロモータを使った試験で検証した[70]。MAR(-)の場合、17のトランスジェニックマウス系統のうち、1系統のみが遺伝子発現したが、cLysMAR含有ベクターを用いた場合、9系統中7系統で発現を認めた。他の類似報告は以下の通り；

- Boniferらは、同様にcLysMARが、ニワトリリゾチームの組織特異的で位置非依存の発現をトランスジェニックマウスに賦与出来ることを示した[18]。
- Ig $\mu$  遺伝子座由来のE $\mu$  MARがBリンパ球において位置非依存の発現をもたらすことが示された。このMARは他の細胞では効果を示さず、細胞系統特異的であった[28]。
- また、apoB MAR は同様に、位置非依存の $\beta$ -galの発現をFao-1細胞で誘起した[32]。
- これらの結果と対照的に、huIFN $\beta$ -MARに関する研究は、当該MARは発現増強活性を示すものの、位置効果から導入遺伝子を完全には保護できないことを報告している[71-75]。

如何に正確にMARが遺伝子発現を亢進させるかの全ては明らかになっていない。ひとつの可能性として、転写に有利なドメイン構造を維持しながらの導入遺伝子の複数コピーの組込みを促進する能力が挙げられる。いくつかの研究が、MARは導入遺伝子数を増加させ、その結果、発現増強をもたらすことを示している。例えば；

- ParkとKayは、Ig $\kappa$  MARがcLysMARとは異なり、約2.5倍の組み込みウイルスゲノム量を示すこと、そして、Ig $\kappa$  MAR含有ベクターがcLysMAR含有ベクターに比べ導入遺伝子発現を亢進させることを報告している[76]。
- Dang [61]とThompson [71]、そしてPhi-Van [17]らは、同様に導入遺伝子発現が組み込みコピー数と正の相関関係にあることを報告している。
- 強い活性のMARによって仲介される高い発現活性は、多数のコピーがひとつの染色体遺伝子座に共導入されていることと深く関わっているが、検出可能な挿入好発部位や染色体再構成が存在するわけではない[16]。
- 対照的に、Kalos とFournier は同一部位に多数コピーの導入遺伝子を組込んだクローンがapoB MARの有無に関わらず極めて低い発現性を示すことを報告している [32]。しかしながら、彼らは同時に、シングルコピーMAR含有ベクターを複数別の部位に組み込まれたクローンではMAR非含有ベクターに比べ優位に発現亢進をすることも報告している。
- 1多数コピーの導入遺伝子がヘテロクロマチン形成とその結果の遺伝子抑制を引き起こすことはDrosophilaで知られている[77, 78]。これは、二方向性と重なった転写の不具合のためと思われる。

MARは、遺伝子抑制の幾つかのモードに対して拮抗して作用する、そしてMARはそれぞれ、遺伝子抑制のタイプによって異なる能力を持っている。

### 3-3 デリバリシステム

#### 3-3-1 ウイルス性ベクターによる遺伝子デリバリ

ウイルスベクターは、長い間、外来遺伝子を真核細胞に導入するための最も良い方法であった。ウイルスによる形質導入は、プラスミッドベクターなど非ウイルス法に比べ効率が良く高く、持続性のある遺伝子発現が達成できるため魅力的な方法である。例えば、HeLa細胞におけるプラスミッドベクターの導入効率はアデノウイルスの場合の1/7,000である[79]。

もう1つの利点は、小さなMOI (multiplicity of infection)での導入が可能で、1あるいは2~3コピー



一の導入遺伝子組込み細胞の作成が可能となる。

しかしながら、ウイルスベクターの利用は、注意を払って行わねばならない(総説参照、[80])。ウイルスベクターに関連した主要課題のひとつは、導入遺伝子発現維持に有利な宿主ゲノム部位への組込みが必要なことが挙げられる。これは挿入変異のリスクを高め、そして次に考察するように宿主細胞の遺伝子発現に影響する。他の関連する関心事は、ウイルス性ベクターは分裂が活発な細胞のみに形質導入すること、免疫原性があること、そして/または遺伝子抑制に敏感であることなどがある[81-83]。

【ウイルスベクターの組込み効果】 Hargroveらは、導入遺伝子の組込み位置から300kbの範囲にある造血幹細胞の内在性遺伝子に対するレンチウイルスの組込み効果を調べた[84]。一例として、約300kb離れたある遺伝子が13倍の発現亢進を示した。他の例では、175~240kbに位置する遺伝子の抑制が観察され、それより近位の幾つかの遺伝子は何ら影響を受けなかった。これらの観察結果は、遺伝子発現調節エレメントの特徴である遺伝子特異的、遠距離の遺伝子発現に影響といった特徴と一致している。クロマチンの構造が直線距離では近いエレメント同士の接触を可能にしており[85]、組込まれたウイルスベクターは、こうして、かなり遠位の遺伝子に対して多様な影響を及ぼすのであろう。

【ウイルスベクターの組込み部位近傍のMAR】 幾つかの研究は、ウイルスベクターがMAR近傍に組込まれやすいことを示唆している[86-88]。例えば、JohnsonとLevy [88]、Mielkeら[89]、そしてRampalli ら、[87]は、MAR近傍がレトロウイルスベクターの組込み好発部位であることを報告している。JohnsonとLevyは250のレトロウイルスの組込み部位を調べたところ、SL3-3、MLV、HIV-1、HTLV-1の約50%がMARの2kb以内に組み込まれることを見出した。これらの研究者たちは、同時に、主なMLVとHIVの組込みがあるMARの1-2kb下流に起こること、そしてHTLV-1は位置の優先性は示さないことを報告している。Kulkarniらは、524のHIV-1組込み部位の上流下流5kbの範囲の分析を行い、93%の組込み部位にMARが隣接していることを見出した[87]。MAR SATB1結合たんぱく質が、B細胞におけるHIV-1の組込み好発部位に関与しており、当該たんぱく質発現のノックダウン細胞株ではランダムな場所に組み込まれる[90]。しかしながら、MARそれ自体が標的となっているかは明らかでなく、ウイルス組込みはATリッチ[91]で転写が活発な部位[92]に関連しており、これは通常MARに関連した特長である。

【組込みによる有害事象】 Sheraらは、小さなウイルスの組込みの結果起こる腫瘍形成は二つ経路で生じることを提示している：最初の例では、ウイルス組込みが細胞増殖調節遺伝子の発現を妨害あるいは活性化する。二番目は、ウイルスがMAR近傍に組込まれて、ウイルス遺伝子そして/あるいは細胞遺伝子の差次的発現を行う[86]。

Rampalli らはレトロウイルスベクターのMAR近傍への組込みはウイルスLTRプロモータによる転写亢進を起こすことを提示している[35]。Goetze らは、MAR近傍への導入遺伝子の組込みはレトロウイルス感染による遺伝子導入では起こるが、同じベクターを電気穿孔で導入した場合は起こらないことを報告している[93]。

これらの知見を総合すると、真核細胞における遺伝子発現に関して、何故、ウイルス感染が非ウイルス性ベクターに比べ効率的であるかを説明している。さらに新規なウイルスベクターは、1)より低い免疫原性、2)エンハンサーエレメントの除去などで向上した安全性そして/あるいは3) 導入遺伝子抑制を防止あるいは細胞遺伝子の異常な活性化を阻害するためMARや他のインシュレーター様エレメントの取り込みなど各種改良が図られているが[61,94]、プラスミッドあるいはエピソームベクターなどの遺伝子治療のための非ウイルス性デリバリシステムへの要望も依然強い。次の2つの節でそれらを概観する。



### 3-3-2 非ウイルス性ベクター

殆どの遺伝的欠陥の修復には導入遺伝子の持続的な維持と発現が必要となる。しかしながら、特定の環境下では持続的な遺伝子発現は望ましくない。例えば、骨再生の目的で間葉系幹細胞への骨形成導入遺伝子の形質移入は、骨形成たんぱく質が細胞を移植領域に動員するので5~7日間という短期間の発現で十分である[95]。さらに骨修復にかかわる他の非致死性の治療法があるため現行のウイルスベクターの使用は正当化されない。このような背景の中では、導入細胞内で一時的に維持され、複製しないプラスミッドベクターは理想的である。

MARの定義された評価基準として一過性発現系での発現亢進能力の欠如があるが、少数の実験例で、いくつかのMARが遺伝子導入後、少しの間は発現亢進を行うことを示唆している。

一過性発現系で、Kulkarniらは[87] IgH MARとp53プロモータ領域にある推定上のMARがレポータ遺伝子の発現を対照に比べて9~12倍上昇させることを見出した。

hulFN $\beta$ -MAR含有プラスミッドベクターを用いて、Chanchamらは、MAR含有コンストラクトはCHO細胞においてルシフェラーゼ発現を増強したが、SKnSHのような神経芽細胞腫、初代神経細胞あるいはミクログリアにおいては効果を示さなかった[96]。

我々はまた、あるヒトおよびマウスのMARが導入遺伝子発現および一過性導入系からのウイルスベクターの産生を増強することを観察した。

さらに、幾つかのMARが環状プラスミッドからの導入遺伝子発現を持続することを示した[16, 97]。このように、導入遺伝子の一過性発現が特に望まれる時、MAR含有プラスミッドベクターの利用は注意して行われるべきである。ウイルスと同様に、プラスミッドはゲノムに組込まれ得るが、ランダムな組込みで、ヘテロクロマチン形成に非常に感受性があるため、挿入変異リスクに関してはウイルスより低い。

### 3-3-3 エピソームベクター

pEPIベクターの開発は、真核細胞への導入遺伝子の非ウイルス性移入に向けて重要なステップである。これが遺伝子治療用の最初のエピソームベクターではないが、維持にウイルス由来たんぱく質を必要としない最初のエピソームベクターである。pEPIベクターはプロモータ下流に配置されたhulFN $\beta$ -MARの含有が基礎となっている。その理由の詳細は不明であるが、MARの転写がエピソームの維持に必要な要件となっている[98]。CHO細胞に移入された時、当該ベクターはエピソームとして100代以上保持される。これが、維持のためゲノムへのランダムな組込みが必要なMAR非含有ベクターとの際立った相違点である。詳細な研究により、MARは、細胞内装置を使ってベクターの複製を可能にしていること、分裂期にベクターを核基質に付着させることが示唆された[99, 100]。遺伝子移入後、エピソームの維持に関して唯一の必須要件は、MARが絶えず転写されることである[99]。プラスミッドの基本骨格をなす細菌由来配列は導入遺伝子抑制を誘導することが知られているため、pEPIベクターは改良され、1つのアクティブな転写ユニットと1つのMARからなるミニサークルが創出された[101]。MAR(-)のみにサークルは細胞周期の間に失われる[102]、一方、MAR(+)ミニサークルは、複製時に染色体DNAに付着し、それによってミニサークルは複製し細胞分裂後、娘細胞に移行する。このようにして、MAR含有ミニサークルは、分裂細胞における持続可能なエピソーム型導入遺伝子発現系として理想的に仕上がっている。

要約すると、組込み型あるいは非組込み型のベクターであろうが、持続的発現増強に関するMARのプラス効果を示す豊富なデータがある。実際、遺伝子治療目的にMARを用いた膨大な主要な試験が、一年に及ぶ持続的な遺伝子発現を示すなど、明快なMARの効用を明らかにしている。遺伝子治療モデルにおけるMARとエピソーム pEPI ベクターの活用に関して以下に続く数節で考察する。

#### 4. 各遺伝子治療モデルにおけるMARの活用

##### 4-1 造血幹細胞

造血幹細胞(HSC)は血液細胞系統の基礎をなすもので、その細胞系統における遺伝子異常の固定修正のためのHSCを標的とした治療に関心がもたれている[68]。しかしながら、HSCのほとんどが休止状態にあるため遺伝子導入が難しく、また首尾よく生着させるためには多数のHSCが必要となる[68, 69]。このため、遺伝子導入にはレトロウイルスベクターが好まれて使われている。しかしながら、複数位置での組込み現象および悪性新生物形成という副作用リスクのある高MOIがたびたび必要とされる。Ex vivoでの生着用HSCの数を増やす試みが行われてきた。しかし、この操作では特定の組込み部位をもった細胞群を選択的に増やしており、その結果、生着率の減少に終わる事例が見受けられた[103, 104]。

最初のHSCに基づく遺伝子治療の成功事例は、X-linked SCIDの治験であった。しかしながら、この治験と他の治療研究において、隣接遺伝子への干渉の排除というこのベクター設計に関して改良すべき点が明らかになった。この点に関して、MARは、発現亢進能、低MOI化、そして隣接クロマチン環境からの遮断能からその効用が期待される。

幾つかの報告が、MAR利用によりHSCにおける導入遺伝子の安定的発現の達成を示唆している。Murrayらはレトロウイルスベクターを用い(huIFN $\beta$ -MAR含有のMoMLVとMSCV) HSCに形質導入後、SCID-hu boneあるいはNOD/SCIDマウスへの生着を試みた。そのMARの主な効果は、NGFRレポータ遺伝子の平均発現量を増加させることであった。MSCV骨格のベクターを用いた時NGFRを発現している細胞数は約二倍に達した[105]。

Agarwalらは、huIFN $\beta$ -MAR(+) MoMLVベクターで形質導入したHSCとMAR(-)レトロウイルスベクターによる形質導入HSCを、SCID-hu thymus liver mouse modelの再構成能力について比較した[74]。二つのベクター間で、導入遺伝子発現を示す初期細胞数とHSCの生着率においても差が認められなかった。しかし、MARが、マウスに移植後のHSCにおいて導入遺伝子発現の増強を見出した。類似効果は、大型動物でも認められており、ヒトへのHSC細胞移植試験によると、リンパ球、顆粒球そして赤血球の細胞系統で12ヶ月間の実験期間にわたってMARは導入遺伝子の発現を2-9倍増強させた[103]。

Taherらは[106]、CD19プロモータと併せてE $\mu$  MARを含有するレンチウイルスベクターを用いてB細胞特異的なEGFP導入遺伝子発現を骨髄HSCで行い、次に、形質導入HSCを放射線曝露後のマウスに移植した、その結果、新に生成した細胞集団でのBリンパ球の再増殖後でもEGFPの発現は試験期間の終わりまで一定であった。E $\mu$  MARの主な効果は、導入遺伝子の平均発現量の亢進である。

非ウイルス性遺伝子デリバリと維持に関する評価試験が造血細胞系で始まっている。

PapapetrouらはHSCに対するpEPIベクターの利用を検討している[72]。当該試験では、被験ベクターの効率の良い遺伝子導入のため、ウイルスベクターによる形質導入試験で予め行う細胞増殖刺激が必要なかった。この研究は、pEPIベクターが、ヒト初代培養細胞において選択圧力が無くともベクターの安定維持を数週間続けられることを確証した。しかしながら、マウス赤白血病細胞株では、エピソームベクターが維持されているにも拘らず、当該導入遺伝子は抑制された。これはヒストンの脱アセチル化から生じたものと推測された。

##### 4-2 初代T細胞

将来性のあるがん免疫治療の一つとして、がん関連抗原を特異的に認識するTCRを発現したT細胞の養子移植法が挙げられる [107, 108]。ここでも、導入遺伝子の安定性と発現レベルが律速となっている[109]。T細胞は生理的に活性期と休止期の期間を繰り返している。生体内においては、大多数のT細胞は休止状態にあり、この状態は低調な転写活性を伴っている。これが、休止期の導入遺伝子発現の喪失は、標的抗原提示細胞による形質導入T細胞の活性化を困難にするため、特にTCRを基礎におく療法の問題点となっている[109]。このTCR療法の二つ目の課題と

番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.

分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

して、導入遺伝子発現が極めて乏しいことが挙げられる。そのような条件下では、ハイブリッド TCRと内在性TCRが、TCRの細胞表面での提示に必要なCD3への結合に関して導入遺伝子由来 TCRと競合し、凌駕するため、本方法の全体の効率を押し下げることになってしまう。それ故、休止期、活動期を問わず、導入遺伝子発現の維持を可能とする手順はT細胞療法にとって多大な効用をもたらす。上記問題と関連課題を克服するためのhulFN  $\beta$ -MARの活用が、CD4+とCD8+の初代培養細胞を使った試験で検討された。当該MARは活性化CD4+T細胞では導入遺伝子の発現を有意に増やすことはなかったが[25, 74]、Lyt2+マーカー遺伝子の発現細胞の出現頻度並びにCD4+休止期細胞におけるLyt2+の平均発現量を有意に増加させた[74]。より顕著なhulFN  $\beta$ -MARの効果はCD8+ T細胞でみられた[25, 110]、そこではMARはLyt2陽性の活性化CD8+ T細胞の数が2倍に増加し、Lyt2陽性の休止細胞は10倍にまで達した。

MAR非含有のベクターで形質導入された遺伝子の発現は、休止期CD8+細胞ではほとんど認められず、活動期に比べ10分の1の低い発現レベルであった[25, 110]、一方、MAR含有ベクターはこの活動期、休止期の差を2分の1まで縮める効果を示した[25]。

hulFN  $\beta$ -MARが、CD8+細胞にGFPの少なくとも一ヶ月間の持続的発現を賦与することが示されている[110]。TCR発現と免疫療法でのT細胞の使用に加え、HIV1の複製を制限するためのT細胞の修飾に興味を持たれている。RevM10導入遺伝子は、抗HIV活性を示すには非常に高い発現が必要であるが、初代培養T細胞でHIV-1の複製を阻害することが知られている[111]。hulFN  $\beta$ -MARがこのRevM10介在抗HIV-1効果を増強することが示され、また、標準的なレトロウイルスベクターではHIV-1複製阻害が不可能な条件下、すなわち活動期から休止期への移行期においても、この効果を維持した[74]。

#### 4-3 神経細胞

アルツハイマーやパーキンソン病などの多くの神経性疾患は遺伝的原因を持つことが知られており、遺伝子治療の対象となる可能性を秘めている。神経細胞への遺伝子導入は、その非分裂的性質や細胞分裂の遅さのため通常のレトロウイルスベクターでの不調な結果で示されるように難題となっている。しかしながら、HSV-1アンプリコンを基礎においたベクターが開発され神経疾患の遺伝子治療への適用が有望視されている[112]。免疫原性は低いHSV-1は、神経細胞へのトロピズムを持ち、その大きなゲノムのかかなりの部分が外来遺伝子で置き換えることが可能など、極めて理想的な遺伝子治療ベクターになり得る立場にある[113]。HSV-1アンプリコンベクターの限界はそのライフサイクルにある。宿主細胞での複製の後、ウイルスは潜伏期に入り、ここでは全ての遺伝子(外来遺伝子も含めて)は、潜伏期関連転写物(latency-associated transcripts)を除き抑制されている。この課題を緩和するため、維持に必要なDNA配列を挿入することによりエピソーム型HSV-1誘導体の構築が試みられている。ヘルペス関連ウイルスであるEpstein-Barr virus (EBV)はB細胞にエピソームとして持続感染することが知られている。この能力はEBVゲノムに存在するMARエレメントによるものであり、EBVエピトームを宿主の核基質に接着させるのに役立っている[114]。しかしながら、HSV-1ゲノムには、MAR配列は存在しない[115]。HSV-1ゲノムに挿入されたMARが潜伏期誘導の導入遺伝子抑制に対抗しえるかについて二つの研究グループが検討した。

Makarova らは[115]  $\beta$ -galactosidase レポーター遺伝子5'端にcLysMARそして3'端にhu  $\beta$ -globin MARを隣接させ、またHIV-LTRのコントロールされる構築物を作成した。この発現カセットをHSV-1ゲノムに挿入し家兎脳に接種した。 $\beta$ -galactosidase 活性は接種後2日間発現されたが、14日までには検出できなくなり、当該MARが潜伏期誘起遺伝子抑制から導入遺伝子を保護できないことが明らかとなった。これらの知見に対する解釈としては、神経細胞が、当該MARの作用、すなわち核基質への結合などに必要となる転写あるいは細胞性因子群を欠いていたことが考えられる。これは、多くの神経細胞でMAR誘起のレポーター遺伝子の発現増強が認められなかったというChanham[96]らによる報告でも示唆されている。

番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.

分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

最新の研究では、エピソーム型MARベクターであるpEPI [98]をHSV-1アンプリコンベクター作成に利用する試みがなされている[116]。初期段階のほとんどのクローンは長期培養で死滅するが、生き残った10クローンのうち3クローンでは当該ベクターがエピソームとして維持されていることが見出された。1から4コピーのエピソームがそれらのクローンに存在すると推定され、生理的レベル相当の導入遺伝子発現が可能であることが示唆された。選択圧がない状態で11週間維持されている。

#### 4-4 トランスジェニックアニマル

MARが細胞培養系で素晴らしい効果を発揮しているが、生体内でのMARの働きに関する研究はほとんど無い。トランスジェニックマウスでの研究は、幾つかのMAR (全てではない) が位置効果とエピジェネティックな遺伝子抑制に対抗できることを示している[18, 70, 71, 117]。幾つかのMARが発現過程における遺伝子発現の調節にかかわることが示唆されているので、今のところ限定された数のMARと実験条件でのみ試験が行われていることを考えれば、この観察結果は驚くに値しない。しかしながら、プロモータおよび/あるいはベクターの骨格が、これらの研究において遺伝子抑制に関わる可能性が排除できない。ウイルスベクターの安全性問題とプラスミッドベクターの短期間発現性の観点から、エピソーム状態で維持可能なプラスミッドの開発は大型動物への遺伝子導入あるいはヒトの遺伝子治療にとって最大の関心事である。Manziniらは[118] エピソーム型MAR pEPIベクターによる大型トランスジェニック動物 (ブタ) の創出に関して最初に報告した。pEPI-EGFP DNAが18匹中13匹の胎仔の43の組織に確認された。当該ベクターの染色体への組込みは認められず、細胞あたりのベクターコピー数は10以下と推定された。これらの組織細胞の約79%が導入遺伝子発現陽性を示した。

### 5. 将来の方向性

Table 3に本文で考察した臨床的に意義のある試験で得られた特筆すべきデータをまとめた。これまでの研究から、導入遺伝子の安定した高発現を誘起すること、すなわち形質導入 (組込み型) あるいは遺伝子移入 (非組込み型) に係わらず細胞の大部分に発現増強が確認され、MARをベクターに組込むことの明らかな効用が認められた。

遺伝子治療にとっての関心事である位置非依存性の賦与やコピー数比例の発現増強などのMARの他の特質の効用があるか否かは未だ不明瞭である。これは、異なるMAR、プロモータ、ベクター骨格、そして細胞株が使われ、各研究室の研究結果を一般化出来ないことが原因となっている。これらの諸因子すべてが導入遺伝子発現に影響を与えることが知られている[28, 30, 97, 110]。さらに、臨床応用を想定する前に対処すべき幾つかの課題が残っている。主要な課題は、染色体の組込み部位周辺で許容性クロマチン構造を伝播するMARの潜在的な能力である (Fig. 2)。例えば、最近、あるMARが遺伝子導入した培養細胞において以前の遺伝子抑制を覆す能力があることを観察した (Galbeteら, 投稿中)。

MARは、ウイルスRNAのコード配列の外側に導入された時レトロウイルスベクターの安定的産生と産生量拡大に使える一方、ウイルスLTRの間への内包は、そのサイズと安全性への配慮から制限される。

特定遺伝子と制御配列に対するレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターの指向性があると仮定するならば、非活動的部位へのウイルスベクターの組込みが隣接する内在性の遺伝子のクロマチン構造を再構築し、それにより当該遺伝子を活性化する可能性を排除するためにも、この現象の程度を詳細にその特性を明らかにする必要がある。その点、エピソームベクターは導入遺伝子の発現が安定的に維持されている事例では好ましい、しかし、一方、ベクターと染色体の組換えの可能性は、長期的に見た場合十分には排除できないため、そのような事象の潜在的影響について評価をしておくべきである。

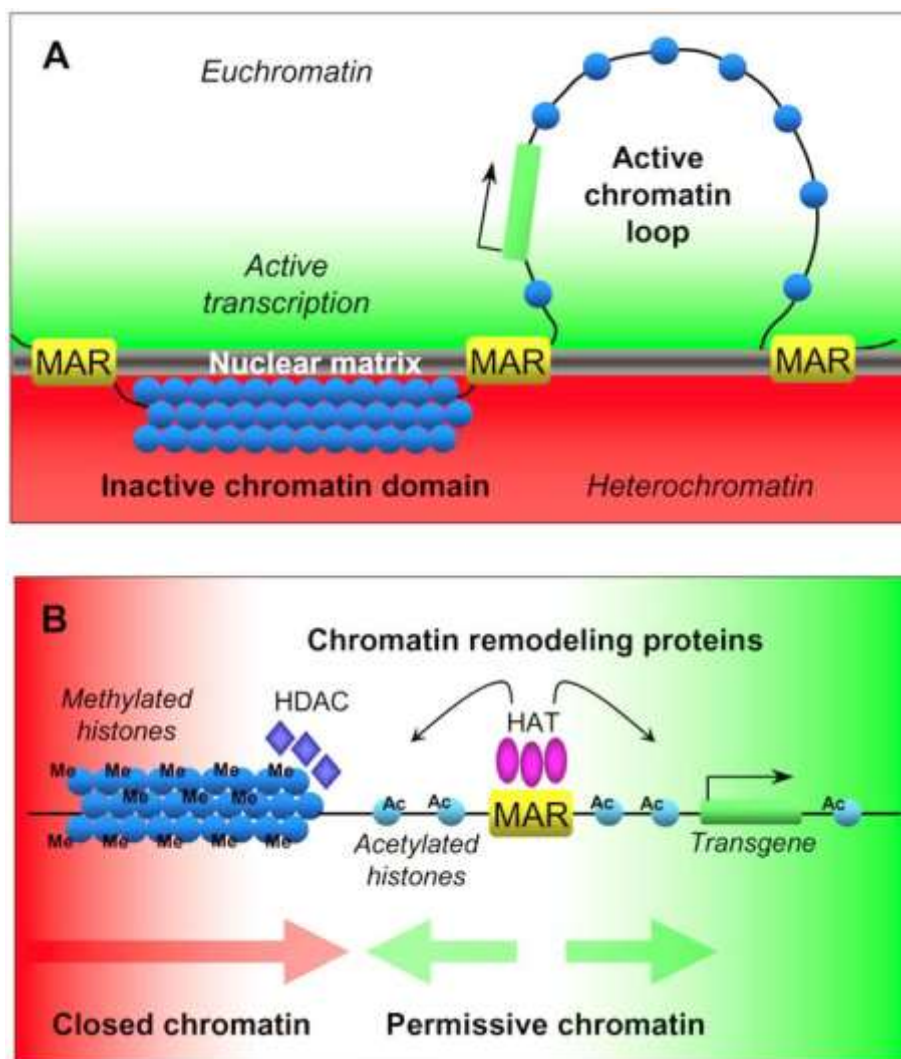
これに関して、境界エレメントとして、導入遺伝子を抑制から護る配列並びにインシュレータとして近傍細胞遺伝子の活性化を抑える配列、それぞれを特定することは大きな関心事である。MARのエンハンサー遮断インシュレータの潜在的作用は、検討されるべきである。そのようなインシュレータ作用は遺伝子抑制シグナルの伝播を防ぐ活動から分離できることが見出される一方、この二つのタイプの作用は幾つかのエピゲネティック調節配列に共局在化かもしれない。そのため、ヘテロクロマチン領域に組込まれた治療用遺伝子の抑制を防ぎ、同時に近傍の細胞遺伝子の活性化を防ぐエレメントを特定することは報奨に値する研究目的である。それは、挿入による細胞のプロトオンコジーンの活性化するリスクを減じ、また低MOI感染での染色体への組込み事象を可能とするため、より安全なウイルスベクター構築に寄与できる。

遺伝子治療用の多くのウイルスベクターが遺伝子あるいはMARのような調節配列の近傍に組込まれる易いことが知られており[86-88]、そしてそれらは近傍MARに対して、配向性と位置嗜好性 (position preference) を示す[88]。これまでのところ、このようなベクターの組込み嗜好性が内包したMARによって影響されるかはほとんど判っていない。今のところ、ベクターの組込み部位の同定を行っているMARを用いた研究はほとんどない。(LAM)-PCR法と高度な処理能力の配列決定法の出現により、現在ではベクターの組込み好発部位の特定は可能となった。組込み部位と導入遺伝子の発現レベルの相関関係は、MARの活性と発現量に与える位置効果について情報を与えるであろう。MAR活性の真の比較評価のために、異なるMARを同じ部位に、出来れば1コピーだけ挿入することが必要となる。つい最近まで、これらは非常に難しい課題であったが、 $\sqrt{C31}$ インテグラーゼとRMCE (recombinase-mediated cassette exchange)のようなシステムが開発され、上記実験は可能となりそして信頼性が向上した[75, 119]。新世代の遺伝子治療用MAR含有ベクターは、これらとさらに付加的なパラメータを考慮に入れるべきである。例えば、幾つかのMARは同種のプロモータと特に相互作用し[35, 97]、幾つかのMARの作用は細胞タイプ特異的である[19, 96]。導入遺伝子に対するMARの相対的位置はこれらの作用機序と相対効力に影響する[30, 74, 76, 97]。もし、1遺伝子1MAR仮説が正しいとするなら、特定の導入遺伝子と用途に合わせて、時間的、細胞特異的なMARを選択することが可能である。MARは必要とされる特徴の全ては保有してないため、ひとつの有望なアプローチとしてMARを表1に示したようなエレメント、例えばニワトリcHS4インシュレータなどと組み合わせる使用である[83]。cHS4インシュレータは位置効果から防御でき、エンハンサー遮断機能を持つが、マウス胚性幹細胞において、レトロウイルスベクターの抑制を防ぐことが出来なかった[120]ことから、MARのような抗遺伝子抑制エレメントとの併用が望まれた。このアプローチは、Ramezaniらによって実践され、huIFN $\beta$ -MARとcHS4インシュレータを含むレンチウイルスベクターを構築し、造血系細胞と初代CD34<sup>+</sup>臍帯血細胞の形質導入に用いた[121]。cHS4インシュレータ単独は遺伝子発現を増強できなかったが、huIFN $\beta$ -MAR単独あるいは両エレメント含有ベクターは遺伝子発現の亢進を誘起した。huIFN $\beta$ -MARの存在は、細胞集団の発現の均質性を向上させ、特にcHS4と共存した時、強い効果を発揮した。

インシュレータが、導入遺伝子だけにMAR効果を限定させられるか、すなわち位置効果から保護されかつ組込み部位近傍遺伝子を活性化しない真の独立したクロマチンドメインを形成できるのかという評価は興味深い、

結論として、MARは、遺伝子抑制や組込み効果に関連した遺伝子治療が直面している今日的課題を克服するために必要となる調節的特性を保有する。また、その活用を、*ex vivo*遺伝子移入と細胞移植などのアプローチにも検討すべきである。MARと他のインシュレータ/境界エレメントとの併用は、現行の遺伝子治療用ベクターの安全性および機能向上に大きな可能性を持つ。しかし、導入遺伝子を促進する様々な調節エレメントの機能および相互作用など更なる詳細検討が必要である。ともかく、“one-MAR-for all”ソリューションがあると仮定すべきでなく、調節機能に関するMARの諸性質などMARの詳細特性を明らかにし、そして、如何に遺伝治療用ベクターの改良に役立てるか、更なる研究が必要である。

番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.  
 分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)



**Fig. (2). Schematic models for possible mechanisms of MAR-mediated transgene insulation.**

**A. Topological model.** The nuclear matrix may provide a structural framework of proteins involved in chromatin organization, transcription and RNA processing and thus facilitate gene expression in its nearby environment (green area). MAR elements may anchor the chromatin to the nuclear matrix, contributing to its partitioning in independent heterochromatic (red area) or euchromatic topological area (green/white area). Random integration of a MAR-insulated vector in non-expressed chromatin may allow its relocation to the transcriptionally active environment at the nuclear matrix. Alternatively, preferential targeting of the vector to transcriptionally active areas by association of the MARs to the nuclear matrix prior to integration cannot be excluded. Note that the various models are not mutually exclusive, and that these models are simplified, as chromatin can organize in more than just two states.

**B. Processive model.** MAR elements have the ability to constitutively recruit transcription factors and chromatin remodeling proteins able to locally modify the chromatin state. Heterochromatin may propagate along the chromosomal DNA, as it recruits silencing proteins such as histone deacetylases (HDAC) or DNA methyl-transferases. Acetylation of nearby nucleosomes by histone acetyltransferases (HAT) associating with the MAR would inhibit the deposition of various histones modifications required for the propagation of silent chromatin. MAR-mediated transgene insulation would be a dynamic process of chromatin remodeling involving the competition between the HATs and HDACs.



番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.

分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

Table 3

MAR Element	Promoter	Vector	Cells/Animal Model	Main MAR Effects	Copy Number Dependent Expression?	Reference
huIFN $\beta$	hsp70.1		transgenic mice	Only enhances expression during implantation. No effect in differentiated cells. Expression enhanced for MAR constructs in fibroblasts from mouse tail and ear. MARs may result in sustained transgene expression.	None in differentiated tissue	[71]
huIFN $\beta$		MESV MoMLV	Primary T cells CD34+ peripheral blood cells Thymocytes from transplanted mice	Improved gene expression especially in quiescent cells. No position-independent expression.	ND	[74]
huIFN $\beta$	LTR	MoMLV HIV	Primary CD4+ and CD8+ T cells monocyte-macrophage	Enhances expression of transgene	ND	[25]
huIFN $\beta$	LTR	MoMLV	CEMSS (T cell line) 293 (methylation assay) PG4+	Enhanced and maintained expression of transgene for 4 months	Yes	[61]
huIFN $\beta$		MoMLV MSCV	CD34+ HEL (human erythroleukemia cell line) Bone marrow and peripheral blood cells from transduced mice	MARs increased MFI regardless of backbone but MSCV+MAR results in increased number of NGFR+ cells and increased number of transgenic + donor cells	ND	[103]
huIFN $\beta$	MU3 EF1 $\alpha$ CAG	Lentivirus	KG1a (human CD34+ hematopoietic progenitor line) CD34+ mononuclear cells from human umbilical cord	Expression increased in all cell lines and with all promoters. MAR-cHS4 construct best at enhancing and maintaining transgene expression.	No	[119]
huIFN $\beta$	pgk $\beta$ -actin ubiquitin LTR 5V40 CMV	MoMLV	Primary CD8+ cells	MAR increased transgene expression in activated and resting T cells. MAR worked best with viral LTR.	ND	[107]
huIFN $\beta$	CMV	HSV-1	CHO <i>ldlr</i> <sup>-/-</sup>	Facilitated and maintained complementation of the cell line	ND	[113]
Ch-LysMAR $\beta$ -globin	HIV LTR	HSV-1	Rat brain	MARs failed to prevent silencing following induction of latency	ND	[112]
Ch-LysMAR	AAT RSV	pHMS (minimal bacterial DNA) pBluescript (pBS)	murine liver	Constructs with MAR: sustained expression for over 1 year with AAT-pHMS; for 2 weeks with RSV-pHMS; for 6 days with pBS backbone	ND	[96]
Ch-LysMAR IgxMAR	CMV	Lentivirus	HeLa Huh7 Mouse	Ch-Lys MAR decreased expression whereas Igx MAR enhanced expression and enhanced the number of vector genomes	Yes	[76]



番号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.  
 分野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

Table 3(続き)

MAR Element	Promoter	Vector	Cells/Animal Model	Main MAR Effects	Copy Number Dependent Expression?	Reference
E $\mu$ MAR	CMV pglk	Lentivirus	B- and T-lymphoid and myeloid cell lines CD34+ mononuclear cells from human umbilical cord	Enhanced expression compared to control in B cell lines only, for up to 8 months	No	[28]
E $\mu$ MAR	CD19	Lentivirus	Bone marrow hematopoietic stem cells	Enhanced, sustained and B cell-specific transgene expression in transduced and transplanted HSC	ND	[106]
MAR $\beta$ IgH	SV40 V $\beta$ 13 MoMLV-LTR HIV-LTR	pGL3 (luciferase reporter gene)	293 and CHO	Both MARs increased expression by HIV-LTR promoters by 4 fold. MAR $\beta$ decreased expression when in proximity to SV40 or V $\beta$ 13 promoters.	ND	[35]

## 6. REFERENCE

- [1] Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol* 2006; 34: 337-54.
- [2] Recillas-Targa F, Valadez-Graham V, Farrell CM. Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *Bioessays* 2004; 26: 796-807.
- [3] Kwaks TH, Otte AP. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 137-42.
- [4] Laemmli UK. Levels of organization of the DNA in eukaryotic chromosomes. *Pharmacol Rev* 1978; 30: 469-76.
- [5] Marsden MP, Laemmli UK. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 1979; 17: 849-58.
- [6] Adolphs KW, Cheng SM, Paulson JR, Laemmli UK. Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 4937-41.
- [7] Earnshaw WC, Laemmli UK. Silver staining the chromosome scaffold. *Chromosoma* 1984; 89: 186-92.
- [8] Earnshaw WC, Laemmli UK. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 1983; 96: 84-93.
- [9] Gasser SM, Laemmli UK. The organisation of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J* 1986; 5: 511-18.
- [10] Mirkovitch J, Gasser SM, Laemmli UK. Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J Mol Biol* 1988; 200: 101-09.
- [11] Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 1984; 39: 223-32.
- [12] Heng HH, Krawetz SA, Lu W, Bremer S, Liu G, Ye CJ. Redefining the chromatin loop domain. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 155-61.
- [13] Heng HH, Goetze S, Ye CJ, *et al.* Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci* 2004; 117: 999-1008.
- [14] Klehr D, Maass K, Bode J. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 1991; 30: 1264-70.
- [15] Stief A, Winter DM, Stratling WH, Sippel AE. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 1989; 341: 343-45.
- [16] Girod PA, Nguyen DQ, Calabrese D, *et al.* Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. *Nat Methods* 2007; 4: 747-53.
- [17] Phi-van L, von Kries JP, Ostertag W, Stratling WH. The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2302-07.
- [18] Bonifer C, Vidal M, Grosveld F, Sippel AE. Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. *EMBO J* 1990; 9: 2843-48.
- [19] Bonifer C, Yannoutsos N, Kruger G, Grosveld F, Sippel AE. Dissection of the locus control function located on the chicken lysozyme gene domain in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4202-10.
- [20] van Drunen CM, Sewalt RG, Oosterling RW, Weisbeek PJ, Smeekens SC, van Driel R. A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2924-30.
- [21] Frisch M, Frech K, Klingenhoff A, Cartharius K, Liebich I, Werner T. In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences. *Genome Res* 2002; 12: 349-54.
- [22] Chernov IP, Akopov SB, Nikolaev LG, Sverdlov ED. Identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in a one megabase locus of human chromosome 19q13.12: long-range correlation of S/MARs and gene positions. *J Cell Biochem* 2002; 84: 590-600.
- [23] Girod PA, Mermod N. Use of scaffold/matrix attachment regions for protein production. In *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Edited by Makrides SC. Elsevier Science B.V.; 2003:359-79.
- [24] Zahn-Zabal M, Kobr M, Girod PA, *et al.* Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *J Biotechnol* 2001; 87: 29-42.
- [25] Auten J, Agarwal M, Chen J, Sutton R, Plavec I. Effect of scaffold attachment region on transgene expression in retrovirus vector transduced primary T cells and macrophages. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1389-99.
- [26] Cockerill PN, Garrard WT. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 1986; 44: 273-82.
- [27] Forrester WC, van Genderen C, Jenuwein T, Grosschedl R. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* 1994; 265: 1221-25.
- [28] Lutzko C, Senadheera D, Skelton D, Petersen D, Kohn DB. Lentivirus vectors incorporating the immunoglobulin heavy chain enhancer and matrix attachment regions provide position-independent expression in B lymphocytes. *J Virol* 2003; 77: 7341-51.
- [29] Bode J, Maass K. Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 1988; 27: 4706-11.
- [30] Schubeler D, Mielke C, Maass K, Bode J. Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* 1996; 35: 11160-9.
- [31] Levy-Wilson B, Fortier C, Blackhart BD, McCarthy BJ. DNase I and micrococcal nuclease-hypersensitive sites in the human apolipoprotein B gene are tissue specific. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3248-56.
- [32] 7K1a-l8o0s . M, Fournier RE. Position-independent transgene expression mediated by boundary elements from the apolipoprotein B chromatin domain. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 198-207.
- [33] Loc PV, Stratling WH. The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J* 1988; 7: 655-64.
- [34] Chattopadhyay S, Whitehurst CE, Chen J. A nuclear matrix attachment region upstream of the T cell receptor beta gene enhancer binds Cux/CDP and SATB1 and modulates enhancer-dependent reporter gene expression but not endogenous gene expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 29838-846.
- [35] Rampalli S, Kulkarni A, Kumar P, Mogare D, Galande S, Mitra D *et al.* Stimulation of Tat-independent transcriptional processivity from the HIV-1 LTR promoter by matrix attachment regions. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3248-56.
- [36] Benham C, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol* 1997; 274: 181-96.
- [37] Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C.

- Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000; 10: 73-90.
- [38] Liebich I, Bode J, Reuter I, Wingender E. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3433-42.
- [39] Bode J, Winkelmann S, Gotze S, *et al.* Correlations between scaffold/ matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J Mol Biol* 2006; 358: 597-613.
- [40] Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, *et al.* Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 1992; 255: 195-97.
- [41] von Kries JP, Phi-van L, Diekmann S, Stratling WH. A non-curved chicken lysozyme 5' matrix attachment site is 3' followed by a strongly curved DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3881-5.
- [42] von Kries JP, Buhmester H, Stratling WH. A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* 1991; 64: 123-35.
- [43] Galande S, Purbey PK, Notani D, Kumar PP. The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 408-14.
- [44] Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. A tissuespecific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 1992; 70: 631-45.
- [45] Evans K, Ott S, Hansen A, Koentges G, Wernisch L. A comparative study of S/MAR prediction tools. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 71.
- [46] Liebich I, Bode J, Frisch M, Wingender E: S/MAR DB. a database on scaffold/matrix attached regions. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 372-74.
- [47] Girod PA, Zahn-Zabal M, Mermoud N. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91: 1-11.
- [48] Razin A, Webb C, Szyf M, *et al.* Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 2275-79.
- [49] Yisraeli J, Adelstein RS, Melloul D, Nudel U, Yaffe D, Cedar H. Muscle-specific activation of a methylated chimeric actin gene. *Cell* 1986; 46: 409-416.
- [50] Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988; 53: 3-4. [51] Hashimshony T, Zhang J, Keshet I, Bustin M, Cedar H. The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet* 2003; 34: 187-92.
- [52] Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 1998; 12: 2852-62.
- [53] Ohgane, J, Yagi S, Shiota K. Epigenetics: The DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta* 2008; 22: S29-S35.
- [54] Calame KL. Mechanisms that regulate immunoglobulin gene expression. *Annu Rev Immunol* 1985; 3: 159-95.
- [55] Blackwell TK, Alt FW. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annu Rev Genet* 1989; 23: 605-36.
- [56] Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT. The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* 1987; 262: 5394-97.
- [57] Lichtenstein M, Keini G, Cedar H, Bergman Y. B cell-specific demethylation: a novel role for the intronic kappa chain enhancer sequence. *Cell* 1994; 76: 913-23.
- [58] Forrester WC, Fernandez LA, Grosschedl R. Nuclear matrix attachment regions antagonize methylation-dependent repression of long-range enhancer-promoter interactions. *Genes Dev* 1999; 13: 3003-14.
- [59] Jenuwein T, Forrester WC, Fernandez-Herrero LA, Laible G, Dull M, Grosschedl R. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* 1997; 385: 269-72.
- [60] Kirillov A, Kistler B, Mostoslavsky R, Cedar H, Wirth T, Bergman Y. A role for nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the Igh locus. *Nat Genet* 1996; 13: 435-41.
- [61] Dang Q, Auten J, Plavec I. Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J Virol* 2000; 74: 2671-78.
- [62] Chen ZY, Riu E, He CY, Xu H, Kay MA. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther* 2008; 16: 548-56.
- [63] Riu E, Chen ZY, Xu H, He CY, Kay MA. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression *in vivo*. *Mol Ther* 2007; 15: 1348-55.
- [64] Fernandez LA, Winkler M, Grosschedl R. Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 196-208.
- [65] Cai S, Lee CC, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet* 2006; 38: 1278-88.
- [66] Cai S, Han HJ, Kohwi-Shigematsu T. Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat Genet* 2003; 34: 42-51.
- [67] Kumar PP, Bischof O, Purbey PK, *et al.* Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 45-56.
- [68] Ferguson C, Larochelle A, Dunbar CE. Hematopoietic stem cell gene therapy: dead or alive? *Trends Biotechnol* 2005; 23: 589-97.
- [69] Neschadim A, McCart JA, Keating A, Medin JA. A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1407-16.
- [70] McKnight RA, Spencer M, Wall RJ, Hennighausen L. Severe position effects imposed on a 1 kb mouse whey acidic protein gene promoter are overcome by heterologous matrix attachment regions. *Mol Reprod Dev* 1996; 44: 179-84.
- [71] Thompson EM, Christians E, Stinnakre MG, Renard JP. Scaffold attachment regions stimulate HSP70.1 expression in mouse preimplantation embryos but not in differentiated tissues. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4694-703.
- [72] Papapetrou EP, Ziros PG, Micheva ID, Zoumbos NC, Athanassiadou A. Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther* 2006; 13: 40-51.
- [73] Conese M, Auriche C, Ascenzioni F. Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther* 2004; 11: 1735-41.
- [74] Agarwal M, Austin TW, Morel F, Chen J, Bohnlein E, Plavec I. Scaffold attachment region-mediated enhancement of retroviral vector expression in primary T cells. *J Virol* 1998; 72: 3720-28.
- [75] Goetze S, Baer A, Winkelmann S, *et al.* Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2260-72.
- [76] Park F, Kay MA. Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 2001; 4: 164-73.

- [77] Dorer DR, Henikoff S. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 1994; 77: 993-1002.
- [78] Dorer DR, Henikoff S. Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing in cis and trans. *Genetics* 1997; 147: 1181-90.
- [79] Hama S, Akita H, Ito R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Harashima H. Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Mol Ther* 2006; 13: 786-94.
- [80] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 346-58.
- [81] Suzuki M, Kasai K, Saeki Y. Plasmid DNA sequences present in conventional herpes simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin. *J Virol* 2006; 80: 3293-300.
- [82] Pannell D, Ellis J. Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. *Rev Med Virol* 2001; 11: 205-17.
- [83] Ellis J, Yao S. Retrovirus silencing and vector design: relevance to normal and cancer stem cells? *Curr Gene Ther* 2005; 5: 367-73.
- [84] Hargrove PW, Kepes S, Hanawa H, *et al*. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in betathalassemic hematopoietic cells. *Mol Ther* 2008; 16: 525-33.
- [85] Dean A. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet* 2006; 22: 38-45.
- [86] Shera KA, Shera CA, McDougall JK. Small tumor virus genomes are integrated near nuclear matrix attachment regions in transformed cells. *J Virol* 2001; 75: 12339-346.
- [87] Kulkarni A, Pavithra L, Rampalli S, *et al*. HIV-1 integration sites are flanked by potential MARs that alone can act as promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 672-77.
- [88] Johnson CN, Levy LS. Matrix attachment regions as targets for retroviral integration. *Virol J* 2005; 2: 68.
- [89] Mielke C, Maass K, Tummler M, Bode J. Anatomy of highly expressing chromosomal sites targeted by retroviral vectors. *Biochemistry* 1996; 35: 2239-52.
- [90] Kumar PP, Mehta S, Purbey PK, *et al*. SATB1-binding sequences and Alu-like motifs define a unique chromatin context in the vicinity of human immunodeficiency virus type 1 integration sites. *J Virol* 2007; 81: 5617-27.
- [91] Chou KS, Okayama A, Su IJ, Lee TH, Essex M. Preferred nucleotide sequence at the integration target site of human T-cell leukemia virus type I from patients with adult T-cell leukemia. *Int J Cancer* 1996; 65: 20-24.
- [92] Choo KB, Chen CM, Han CP, Cheng WT, Au LC. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. *J Med Virol* 1996; 49: 15-22.
- [93] Goetze S, Huesemann Y, Baer A, Bode J. Functional characterization of transgene integration patterns by halo fluorescence in situ hybridization: electroporation versus retroviral infection. *Biochemistry* 2003; 42: 7035-43.
- [94] Yao S, Osborne CS, Bharadwaj RR, *et al*. Retrovirus silencer blocking by the cHS4 insulator is CTCF independent. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5317-23.
- [95] Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng* 2007; 13: 1135-50.
- [96] Chancham P, van Ijperen T, McDoom I, Hughes JA. Nucleic acid matrix attachment recognition regions--as facilitators in plasmid transfer. *J Drug Target* 2003; 11: 205-13.
- [97] Ehrhardt A, Peng PD, Xu H, Meuse L, Kay MA: Optimization of cis-acting elements for gene expression from nonviral vectors *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 215-25.
- [98] Piechaczek C, Fetzer C, Baiker A, Bode J, Lipps HJ. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 426-28.
- [99] Jenke AC, Stehle IM, Herrmann F, *et al*. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11322-27.
- [100] Jenke BH, Fetzer CP, Stehle IM, *et al*. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A *in vivo*. *EMBO Rep* 2002; 3: 349-54.
- [101] Nehlsen K, Broll S, Bode J. Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells. *Gene Ther Mol Biol* 2006; 10: 233-44.
- [102] Chen ZY, Yant SR, He CY, Meuse L, Shen S, Kay MA. Linear DNAs concatemize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol Ther* 2001; 3: 403-10.
- [103] Kurre P, Morris J, Thomasson B, Kohn DB, Kiem HP. Scaffold attachment region-containing retrovirus vectors improve long-term proviral expression after transplantation of GFP-modified CD34+ baboon repopulating cells. *Blood* 2003; 102: 3117-19.
- [104] Modlich U, Bohne J, Schmidt M, *et al*. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 2006; 108: 2545-53.
- [105] Murray L, Travis M, Luens-Abitorabi K, *et al*. Addition of the human interferon beta scaffold attachment region to retroviral vector backbones increases the level of *in vivo* transgene expression among progeny of engrafted human hematopoietic stem cells. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 2039-50.
- [106] Taher TE, Tulone C, Fatah R, D'Acquisto F, Gould DJ, Mageed RA. Repopulation of B-lymphocytes with restricted gene expression using haematopoietic stem cells engineered with lentiviral vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 998-1006.
- [107] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, *et al*. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314: 126-29.
- [108] Pardoll D, Allison J. Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med* 2004; 10: 887-92.
- [109] Bobisse S, Zanovello P, Rosato A. T-cell receptor gene transfer by lentiviral vectors in adoptive cell therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 893-906.
- [110] Cooper LJ, Topp MS, Pinzon C, *et al*. Enhanced transgene expression in quiescent and activated human CD8+ T cells. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 648-58.
- [111] Plavec I, Agarwal M, Ho KE, *et al*. High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS. *Gene Ther* 1997; 4: 128-39.
- [112] Frenkel N. The history of the HSV amplicon: from naturally occurring defective genomes to engineered amplicon vectors. *Curr Gene Ther* 2006; 6: 277-301.
- [113] Hibbitt OC, Wade-Martins R. Delivery of large genomic DNA inserts >100 kb using HSV-1 amplicons. *Curr Gene Ther* 2006; 6: 325-36.
- [114] Jankelevich S, Kolman JL, Bodnar JW, Miller G. A nuclear matrix attachment region organizes the Epstein-Barr viral plasmid in Raji cells into a single DNA domain. *EMBO J* 1992; 11: 1165-76.
- [115] Makarova O, Gorneva G, Wu F, *et al*. Incorporation of nuclear matrix attachment regions into the herpes simplex virus type 1 genome does not induce long-term expression of a foreign gene during latency. *Gene Ther*

番 号: Selexis\_2008\_Aug\_Curr. Gene Ther.

分 野: MARs (総説: 治療用 MAR 含有遺伝子導入ベクター)

1996; 3: 829-833.

[116] Lufino MM, Manservigi R, Wade-Martins R. An S/MAR-based infectious episomal genomic DNA expression vector provides long-term regulated functional complementation of LDLR deficiency. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e98.

[117] McKnight RA, Shamay A, Sankaran L, Wall RJ, Hennighausen L. Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6943-47.

[118] Manzini S, Vargiolu A, Stehle IM, *et al.* Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17672-677.

[119] Calos MP. The phiC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006; 6: 633-45.

[120] Rivella S, Callegari JA, May C, Tan CW, Sadelain M. The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol* 2000; 74: 4679-87.

[121] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood* 2003; 101: 4717-24.