

Helios gene gun を用いた家兎角膜内皮細胞への遺伝子導入

魯 文男¹⁾, 海老原伸行¹⁾, 藤木 慶子¹⁾, 佐久間 仁¹⁾
中村 真二²⁾, 渡部 保男¹⁾, 金井 淳¹⁾

¹⁾順天堂大学医学部眼科学教室, ²⁾順天堂大学医学部共同病理学教室

要 約

目 的：Helios gene gun システムを用いて、家兎角膜内皮に金粒子に付着させた DNA を直接打ち込み、遺伝子導入の効果を観察することを目的とした。

対象と方法：金粒子に付着させた蛍光蛋白(GFP)遺伝子を家兎の培養角膜内皮細胞へ Helios gene gun システムを用いて導入した。Ex vivo では角膜片の内皮面から GFP 遺伝子を導入後、直ちに移植に供した。GFP 遺伝子の発現は蛍光顕微鏡を用いて観察した。さらに、光学顕微鏡、走査電子顕微鏡による組織学的観察を行った。

結 果：培養内皮細胞では、最適なヘリウム圧 120 psi で細胞障害なく、約 7% の導入効率があった。移植片ではヘリウム圧 140 psi で、内皮細胞のみに GFP の

発現が観察された。組織学的観察では組織的傷害がなく、打ち込んだ金粒子が角膜内皮のみに入っていることが確認された。

結 論：Gene gun は一度の打ち込み操作で、同時に多数の細胞に遺伝子を導入することができ、外来遺伝子を発現させることができることから、角膜内皮細胞の修復、疾患の治療の改善を目指したが、応用に至るまでにはなお、技術的な問題の改善を必要とする。(日眼会誌 107: 189—195, 2003)

キーワード：角膜内皮細胞, Gene gun, 遺伝子導入, Green fluorescent protein, 角膜移植

Gene Transfer into Corneal Endothelial Cells by Helios Gene Gun

Wen Nan Lu¹⁾, Nobuyuki Ebihara¹⁾, Keiko Fujiki¹⁾, Hitoshi Sakuma¹⁾
Shinji Nakamura²⁾, Yasuo Watanabe¹⁾ and Atsushi Kanai¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

²⁾Division of Pathology, Central Laboratory of Medical Sciences, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose : To examine the efficiency of particle-mediated gene transfer into rabbit corneal endothelium with a Helios gene gun system.

Methods : Using gene gun, plasmid DNA coding for green fluorescent protein(GFP) was transferred into cultured rabbit endothelial cells and rabbit corneal grafts from their endothelial site. Then the transferred corneas were transplanted as autografts. The GFP expression was detected by fluorescence microscopy. Histological examination of corneas was performed by light microscope and scanning electron microscope.

Results : In cultured rabbit endothelial cells, the transfection efficiency without damage to cells was about 7% under optimized helium pressure of 120 psi. In ex vivo, the GFP expression was limited to endothelial cells of the grafts at 140 psi. The his-

tological findings from light and scanning electron microscopy of the grafts showed no severe mechanical damage in endothelial cells penetrated by gold particles.

Conclusions : The helios gene gun system successfully transferred genes into corneal endothelial cells. However, further studies will be required to obtain the stable results of the particle mediated gene transfer into the endothelial cells of corneal grafts for clinical practice.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107: 189—195, 2003)

Key words : Corneal endothelium, Gene gun, Gene transfer, Green fluorescent protein, Keratoplasty

別刷請求先：113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部眼科学教室 魯 文男
(平成 14 年 2 月 13 日受付, 平成 14 年 8 月 5 日改訂受理)

Reprint requests to : Wen Nan Lu, M. D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine.
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

(Received February 13, 2002 and accepted in revised form August 5, 2002)

I 緒 言

角膜内皮細胞は正常なバリア機能によって維持される水和作用、厚さ、透明性の維持に対する基本となる一層の細胞として存在する¹⁾。ヒトを含む多くの哺乳類の角膜内皮細胞はほとんど増殖能を持たず、加齢とともに細胞数が減少する²⁾。したがって、加齢や角膜疾患、眼内手術操作による内皮細胞の減少は現状では防ぐことができず、現在の臨床では角膜移植が不可逆性の角膜混濁に対する唯一の治療法であり、角膜移植片(ドナー角膜)の内皮細胞をできるだけ長く保持すること、移植後の拒絶反応などの治療はなお重要な課題である。

最近の分子生物学の進歩によって、様々な疾患に対する遺伝子治療の研究が進み、遺伝子導入に関しても種々な方法が試みられている。移植前に、ドナー角膜の修復および免疫抑制操作が可能になれば、角膜内皮細胞の機能不全による水疱性角膜症の予防に、また、拒絶反応の制御が期待できる。角膜および角膜内皮への遺伝子導入の試みはアデノウイルスベクターを用いる試みがなされている^{3)~7)}。しかし、癌化や感染の心配から、リポソームのような非ウイルス性のベクターによる遺伝子導入の試みがなされ、これらは安全で毒性も低いが、遺伝子導入の効率が低い^{8)~12)}。これを避ける試みとして、電気パルスによって遺伝子を導入する試みもなされ¹³⁾¹⁴⁾、実際に遺伝子を導入して角膜の混濁を減少させることに成功している¹⁴⁾。

Gene gun システムは、DNA をコーティングした金粒子を高圧ヘリウムガスによって、ショットガンのように細胞内に撃ち込む方法で、核内に DNA を直接導入することが可能であり、分裂しない細胞でも外来遺伝子を発現させることができる。今まで、皮膚、肝臓、筋肉、神経細胞など様々な臓器への遺伝子導入が報告^{15)~18)}されている。

本研究は Helios gene gun システムを用いて、家兎角膜内皮培養細胞に遺伝子の導入を行い、green fluorescent protein(GFP)遺伝子の発現を調べた。さらに、家兎角膜移植片を作製し、内皮側から gene gun によって遺伝子を導入後、直ちに角膜移植に供し、移植後の遺伝子発現および障害の程度を調べ、*ex vivo* での遺伝子導入の可能性を検討した。

II 対象と方法

1. Gene gun システム

遺伝子導入はプラスミド DNA を付着させた金粒子を、直接細胞核内に高圧ヘリウムガス(100~1,000 psi)によってショットガンのように導入する Helios gene gun システム(日本 Bio-Rad 社)を用いた。導入する DNA を含む gene gun 用カートリッジの作製は Helios gene gun の操作マニュアルに従った。0.6 μ m 金粒子 25 mg

に 0.05 M spermidine 50 μ l を加えてボルテックスミキサーで振盪し、3~5 秒超音波洗浄機で洗浄する。5 μ g のベクターを加えて、再び 5 秒間ボルテックスミキサーで振盪する。振盪しながら 1 M CaCl₂ を 50 μ l 加えて 10 分間放置する。沈殿した金粒子をエタノール(99.5%)で 3 回洗浄後、完全に脱水する。最後に 0.001 M polyvinylpyrrolidone(PVP)溶液で調整した金粒子を金粒子コート用チューブに入れ、乾燥させる。1 個のカートリッジ当たり約 0.5 mg の金粒子、0.1 μ g のベクターを含むように作製した。

2. *In vitro* での培養細胞への遺伝子導入

日本家兎の角膜から内皮細胞のみを取り出し、10% ウシ血清(FCS)を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)により培養を行い、実験には継代 1 代目の細胞を使用した。遺伝子導入の発現を検討するために、GFP をコードする pEGFP-C1 ベクター(CLONTECH Lab. Inc., CA, 米国)をリポーター遺伝子として用いた。35 mm の培養シャーレに内皮細胞が 80% に達する状態の時、培養シャーレの培養液を取り除き、銃口から細胞までの距離を 1.5 cm に保ち、ヘリウムガスを 100~200 psi まで 20 psi ずつ変化させて、培養内皮細胞へ撃ち込み、直ちに培養液を加えて 24 時間以上培養後、細胞に対するダメージおよび GFP の発現量を検討した。細胞に対するダメージは倒立位相差顕微鏡検査で細胞の形態を観察し、細胞生体染色法(0.2% トリパンブルー)で死細胞数を数えた。

3. *Ex vivo* での角膜内皮細胞への遺伝子導入

日本家兎を塩酸ケタミン(ケタラル®)およびキシラジン塩酸塩(セラクタール®)筋肉内注射で麻酔し、7.5 mm トレパンで角膜移植片を作製した。移植片の内皮面を上側になるようにシャーレに移し、ヘリウムガスの物理的影響を考慮して、ヘリウム圧の衝撃防止用に内眼手術保護剤として用いられている粘弾性物質ヒアルロン酸ナトリウム溶液 Healon®(平均分子量 190~390 万)3 滴を内皮面にのせて、1.5 cm 距離で 120, 140, 160 psi のヘリウム圧で撃ち込み、直ちに角膜片を 180 度回転して、10-0 ナイロン糸で 16 針端々縫合後、飼育した。

4. 蛍光顕微鏡による GFP 遺伝子発現の観察

撃ち込みから 1, 3 日間培養した内皮細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、蛍光顕微鏡を用いて内皮細胞での GFP の発現を観察した。一方、移植した角膜片は移植 72 時間後に取り出し、同じく 4% パラホルムアルデヒドで固定後、蛍光顕微鏡により GFP の発現を観察した。遺伝子導入の効率は蛍光顕微鏡を用い、200 倍率で中央部直径約 6 mm 範囲の 3 か所の異なる部位で全体細胞および蛍光が光る細胞を数え、導入率を算出した。

5. *Ex vivo* の実験における組織学的観察

移植 72 時間後の家兎を過剰ペントバルビタールナト

リウム(ネンブタール®)で処理後、眼球を摘出、角膜片を 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した。切片をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、光学顕微鏡で観察し、ヘリウム圧の変化により角膜内に入る金粒子の深さ、角膜組織の物理的傷害の程度を検査した。さらに、固定した角膜片をアルコールで脱水後、臨界点乾燥、金蒸着し、走査顕微鏡(SEM)で観察を行い、内皮細胞の傷害の度合いを調べた。

III 結 果

1. *In vitro* の実験におけるヘリウムガス圧による細胞への障害度と遺伝子導入効率

ヘリウムガス圧を 100~200 psi まで 20 psi ずつ調節して培養細胞に撃ち込み、細胞への障害の程度と遺伝子導入効率をみた結果、撃ち込みのガス圧を上昇させるにつれて、細胞に対する障害は増大した(図 1)。生体染色による細胞の観察では、100, 120 psi ではほぼ正常と同様にトリパンブルーに染まった死細胞はみられなかった(図 1, 2 A)が、140 psi では約 4 % の死細胞が観察された(図 1, 2 B)。160 psi では中央部の細胞が散乱し始め、70 % を超える死細胞が観察された。さらに 180 psi を超えると、ほぼ 100 % に達する物理的悪影響がみられた

(図 1, 2 C)。

遺伝子導入の対照群として GFP を付着してない金粒子を 100, 120, 140 psi で導入した細胞では、蛍光が光る細胞はみられなかった(データは示さず)。GFP を導入した細胞の観察では、培養 1 日後、3 日後ともに、

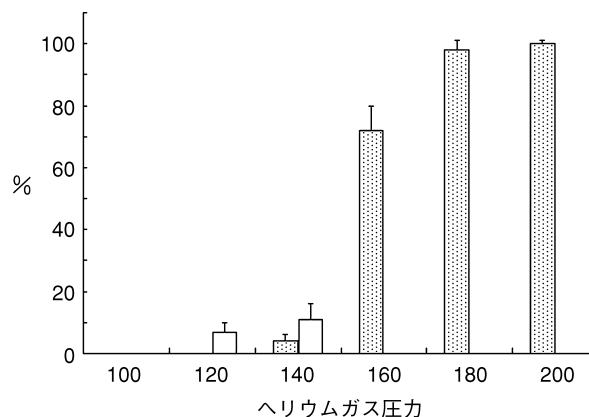


図 1 ヘリウムガス圧と細胞へ障害および遺伝子導入効率。

横軸はヘリウムガス圧 (psi), 縦軸は生体染色による死細胞の率と蛍光蛋白 (GFP) 発現細胞の率を示す。

■: 死細胞 □: 導入された細胞

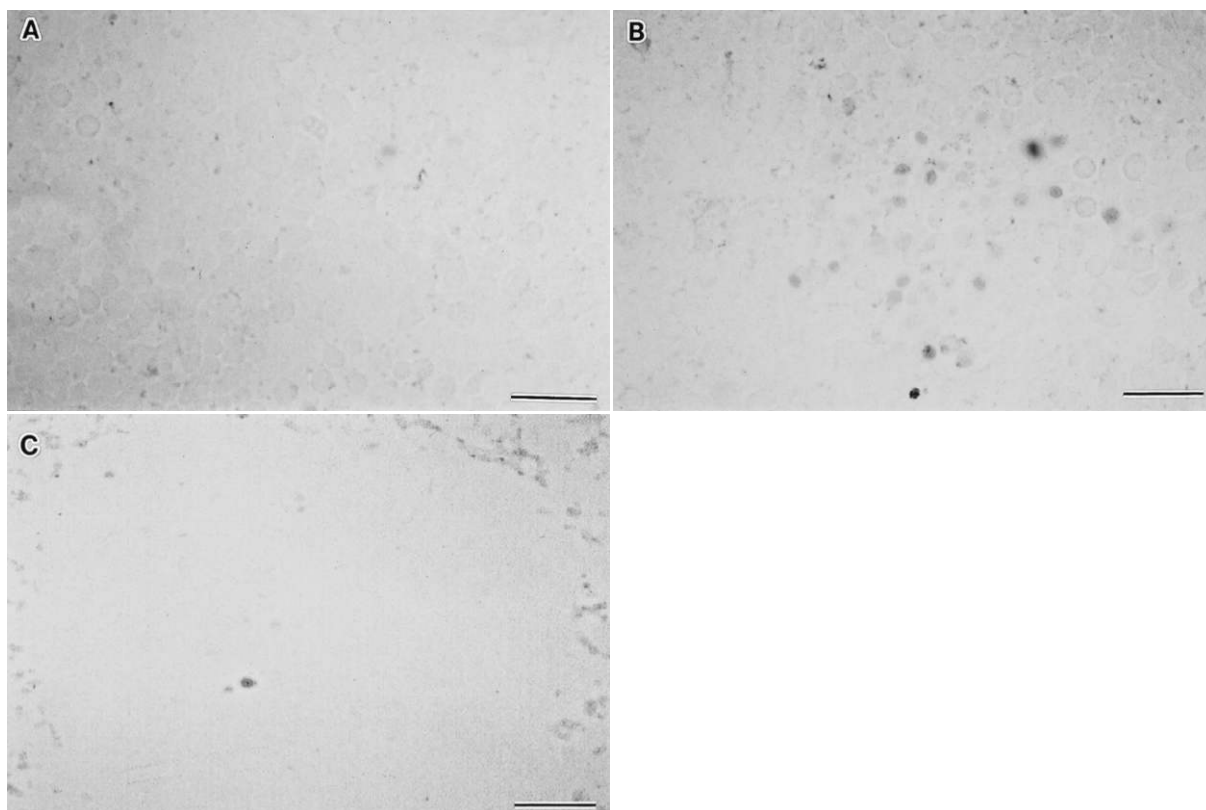


図 2 *In vitro* で角膜内皮培養細胞におけるヘリウムガス圧に対するトリパンブルー生体染色による死細胞の観察。

A: 100 psi, 細胞の障害はほとんどみられない。B: 140 psi, 細胞の障害がみられる。C: 180 psi, 中央部の細胞はほとんど破壊される。バーは 100 μ m

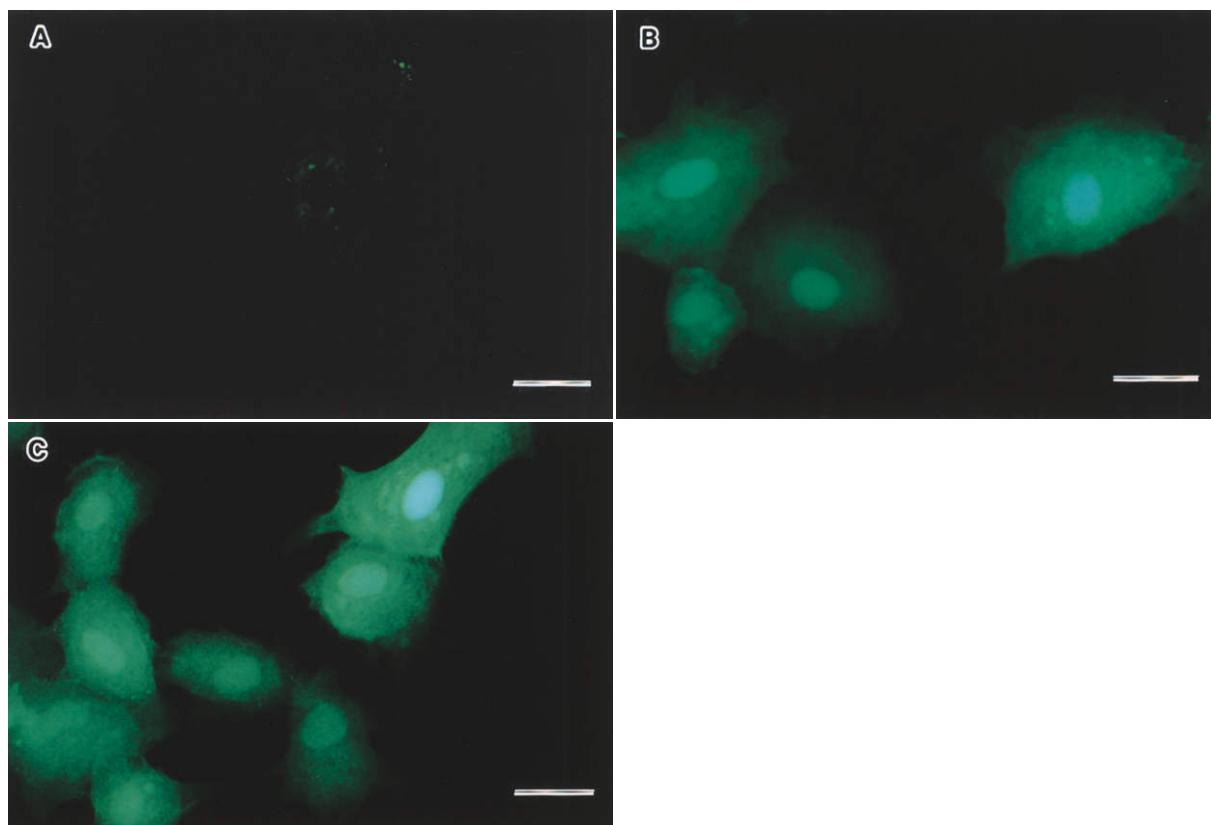


図 3 角膜内皮培養細胞における GFP 遺伝子発現.

A : 100 psi, 導入 3 日後, 細胞への GFP の発現はみられない. B : 120 psi, C : 140 psi : ともに細胞内に蛍光が核内を含めて細胞全体に広がる GFP の発現がみられる. バーは 25 μm

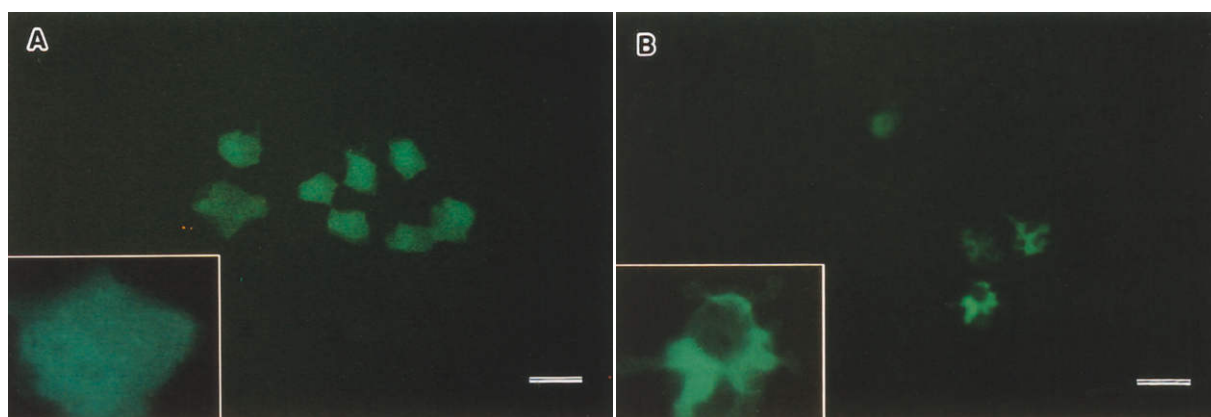


図 4 *Ex vivo* での遺伝子発現.

Healon[®]をのせた家兎角膜内皮に遺伝子を撃ち込み, 移植後 72 時間経過後の角膜内皮での GFP の発現.

A : 140 psi, 左下は拡大したもの. B : 160 psi. バーは 50 μm

100 psi では GFP の発現がみられなかった(図 3 A)が, 120, 140 psi では中央部 6 mm 範囲の細胞内で蛍光が鮮やかに核内を含めた細胞全体に広がる細胞がみられた(図 3 B, C). 120 psi では約 7 %, 140 psi では約 11 % の導入効率であった(図 1). 160 psi 以後は細胞に対する物理的悪影響が大きいため, 導入効率を算出することができなかった.

2. *Ex vivo* での遺伝子発現

遺伝子撃ち込み後に移植した角膜片は 72 時間後にはほとんど透明になった. 手持ち細隙灯顕微鏡検査では顕著な傷害や感染症はみられなかった. 取り出した強角膜片には, 培養細胞と同様な蛍光パターンを示す内皮細胞が観察された. Healon[®]をのせた角膜内皮にヘリウム圧 140 psi で撃ちこんだ角膜片中央部では最高 4 % の細胞への遺伝子導入がみられた(図 4 A). 角膜内での内皮

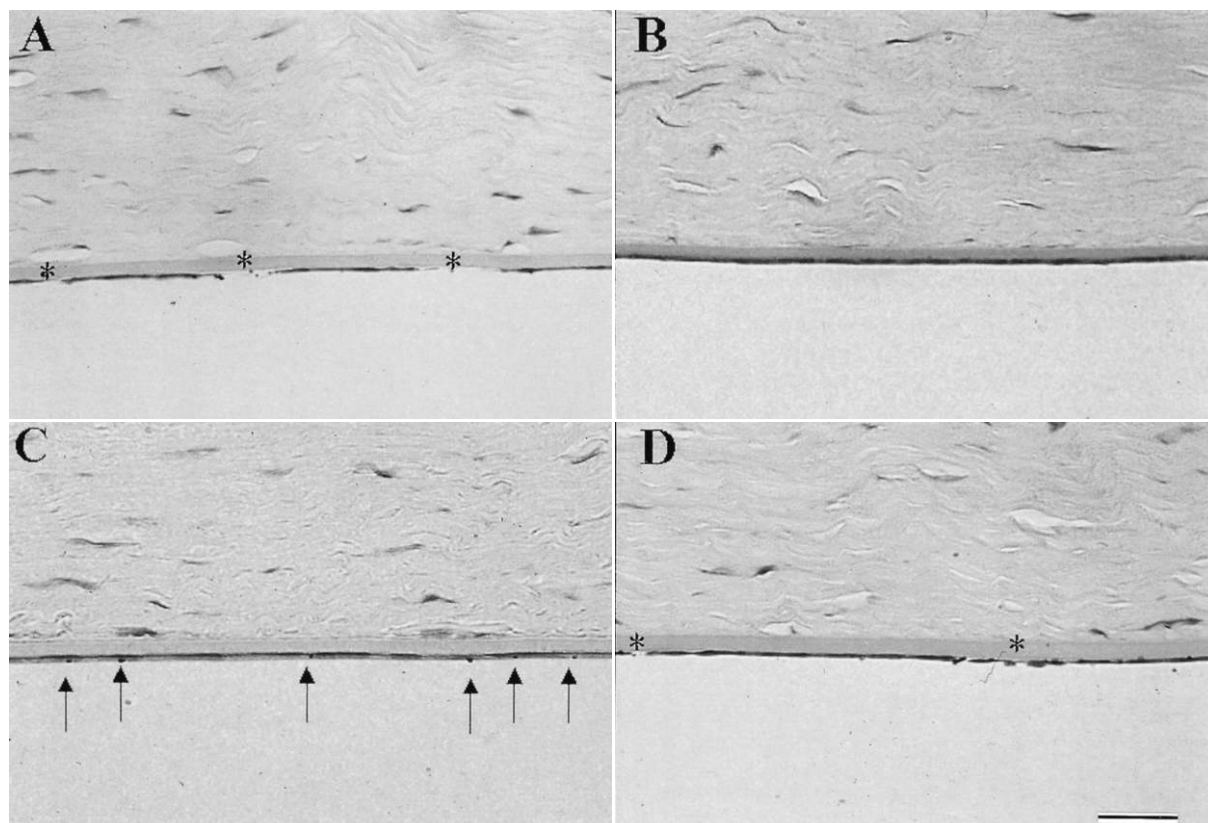


図 5 光学顕微鏡での組織学的観察。

角膜の組織切片によるガスの圧力と金粒子の有無，金粒子の深さの観察．A：120 psi (Healon[®] なし)．B：120 psi (Healon[®] あり)．A，Bともに金粒子は観察されない．C：140 psi (Healon[®] あり)，内皮細胞の傷害がみられず，金粒子(矢印)が内皮に局在している．D：160 psi (Healon[®] あり)．内皮の障害がみられる．(*)は不適応なガス圧力で内皮細胞を破壊され，露出した Descemet 膜を示す．バーは 50 μ m

細胞が完全な平面でないこと，安全性のために内皮面にのせた Healon[®] の定量ができないことから，その再現性は低かった．160 psi で撃ちこんだ角膜片でも GFP の導入がみられたが，細胞への障害が考えられる異常な細胞内の蛍光蛋白の局在が観察された(図 4 B)．

ヘリウムガスの圧力の変化による角膜内に入る金粒子の深さを検討するために行った光学顕微鏡での組織学的観察では，Healon[®] なしのヘリウム圧 120 psi では角膜内皮傷害がみられた(図 5 A)．ヘリウム圧 120 psi で，Healon[®] をのせた角膜内皮には金粒子が入っていなかった(図 5 B)．ヘリウム圧 140 psi では，金粒子が内皮に局在して入った(図 5 C)．しかし，ヘリウム圧 160 psi を超える場合，内皮細胞の傷害がみられ(図 5 D)，蛍光顕微鏡で観察した細胞内での異常な GFP の局在を示す内皮細胞への障害を確かめた．走査電子顕微鏡による観察では角膜内皮細胞に入っていると思われる金粒子，細胞膜を貫通せずに膜に付いている金粒子がみられた(図 6)．また，細胞に障害を与えられと考えられる凝集した金粒子もみられた．

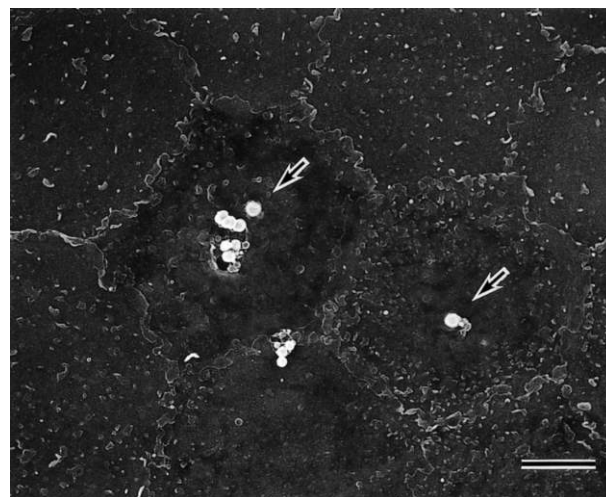


図 6 走査電子顕微鏡による観察。

角膜内皮細胞層を走査電子顕微鏡で観察したもの．矢印は金粒子．バーは 5 μ m

IV 考 按

我々は gene gun システムを用いて内皮細胞への遺伝子導入を試みた．Gene gun システムは細胞や組織に直

接金粒子を撃ち込んで、遺伝子を導入することから、導入操作が簡単かつ迅速である。また、細胞の種類を問わず、*in vivo*, *in vitro* での導入が可能である。さらに、必要とする DNA サイズ、量を問わず一度にたくさんの細胞に撃ち込める。Gene gun を用いての研究は、皮膚¹⁶⁾、肝臓¹⁷⁾、脳、神経細胞¹⁸⁾、口腔粘膜¹⁹⁾など多数の細胞、臓器に遺伝子を導入した報告がある。さらに、Tanelian ら²⁰⁾は角膜上皮にリポーター遺伝子を導入して発現し、Shiraishi ら²¹⁾は keratin 12 のプロモーターを角膜、結膜、皮膚などに導入して角膜のみに効果的に遺伝子を導入できたことを報告している。

遺伝子導入法は簡便で、かつその発現が目的とする臓器もしくは細胞に限定できるものが理想的である。角膜内皮細胞においても今までに様々な方法での遺伝子導入が試みられている。アデノウイルスなどウイルスベクターを用いての実験では *ex vivo* での角膜内皮への遺伝子導入、発現に成功したが⁵⁾、上皮細胞、実質細胞への導入もみられ、目的の内皮のみに限られなかった。*In vivo* での導入も内皮以外に、虹彩や強膜など、他の組織にも僅かだが導入遺伝子の発現がみられた³⁾。安全性の高いリポソームなどは導入効果があり期待できず、相対的に遺伝子発現レベルが低い¹²⁾などの問題がある。我々は gene gun 導入法で短時間、1 回のショットで家兎の培養角膜内皮細胞、角膜片の内皮細胞に直接遺伝子を導入できた。角膜片は *ex vivo* の実験においては、内皮細胞が外界に十分に暴露されるため、遺伝子導入操作が容易であり、観察しながら遺伝子を直接撃ち込むことができる利点もある。もし、これが安全かつ一定の結果を得ることができれば、先天角膜内皮疾患もしくは傷害を受けた角膜内皮を修復する auto-graft 遺伝子導入実験モデル作製の可能性を秘めるものであるが、いかなる方法であれ、一層の内皮細胞への遺伝子導入は極めて困難であり、実用にはかなりの改良が必要と思われる。

Gene gun は金粒子を高圧ヘリウムガスによってショットガン的に細胞内へ撃ち込む方法をとるため、目的の組織によってガス圧を決めることが重要である。アガロースゲルおよび組織での撃ち込みの圧力と金粒子の貫通の深さは対数曲線を示す関係があり¹⁹⁾、角膜上皮では低いガス圧では遺伝子導入はみられず、逆に 250 psi を超えるガス圧では組織の障害が生じた²¹⁾。同様に、本研究では培養内皮細胞への遺伝子導入は 1.5 cm 距離で、120 psi 以下のガス圧では細胞障害がみられなかったが、140 psi からは細胞に傷害が生じるのが確認された(図 1)。遺伝子導入した角膜移植片の組織学的観察においてもガス圧が 120 psi を超えると細胞に傷害が生じ、その物理的影響に対する対策が必要であった。この点の改良として、細胞に直接撃つのではなく、間にクッションになるものをおいて撃ち込むと障害を防ぐことができる。Tanelian ら²⁰⁾は parafilm を使用し、角膜上皮を保護し

た結果、傷害なく角膜上皮への遺伝子導入ができることを報告している。Lo ら²²⁾は nylon mesh を利用して弱い神経細胞への導入に成功している。我々は内眼手術に使う粘弾性物質 Healon[®] をのせて内皮細胞を保護して撃ち込んだ結果、光学顕微鏡検査で示したように安全に細胞内に入った金粒子が確認できた(図 5 C)。走査顕微鏡では金粒子が細胞表面に残っていると思われるもの、半分貫通したものや、1 つの細胞に幾つもの金粒子が固まって入った部分も観察され、細胞に何らかの傷害が生じた所見がみられた。これは、遺伝子銃用の弾の作製が難しく金粒子を金粒子コート用チューブに均一に付着できなかったことなどが原因であると思われる。角膜上皮導入において 0.6 μm 金粒子は目的の圧力で角膜上皮のみに発現されたが、1.0, 1.6 μm の金粒子は Bowman 膜または実質前層まで入っていた²¹⁾。このことから金粒子の大きさが貫通力や障害と関係があると考えられる。今回の実験では直径 0.6 μm 金粒子を用いたが、ガス圧による高い貫通力と凝集した金粒子と一緒に 1 つの細胞に入った場合、一層である内皮細胞への障害は大きいと考えられた。細胞や組織への障害を小さくするためには現在市販されている最小の 0.6 μm 金粒子より、さらに小さい金粒子を使うことにより、障害を減少させることができると考えられた。

本研究はヒト生体内では増殖能を持たない角膜内皮細胞に修復性を持たせるように遺伝子を導入することを目的に挑戦したもので、障害なく、かつ安全に導入できる条件を重要目的として導入効率を検討した。ヘリウムガス圧 100 psi では細胞障害がなかったが、細胞への遺伝子導入がみられず、140 psi では 11% の導入率を得たが、細胞への障害がみられた。120 psi は細胞障害がほとんどなく、培養細胞への遺伝子導入ができる最適ガス圧であった。培養細胞では 7% の導入効率があり、Shillitoe ら¹⁹⁾の口腔癌細胞での 7% の遺伝子導入効果と同様な結果を示した。また、Healon[®] をのせた角膜片にヘリウムガス圧 140 psi で撃ち込んだ *ex vivo* での遺伝子導入は最大 4% の導入結果が得られ、脳組織での 2% の結果¹⁸⁾より高かったが、その再現性は低かった。これは角膜片が湾曲であり、内皮面にのせた Healon[®] が中央部に流れること、移植手術操作が何らかの内皮細胞に障害を与え、導入効果が落ちる可能性、また 1 個のカートリッジに均一に金粒子をつけることが困難で、金粒子が細胞内に多量に入っているにもかかわらず、角膜移植後の GFP の発現が、それほどでもないのは金粒子に遺伝子が上手くコーティングされていないなどの技術的な問題が考えられる。

眼科領域での遺伝子治療はまだ歴史が浅く、実験的要素を含んでいる。遺伝子導入効率と遺伝子発現レベルが低いなどにより、有効性が確認されたものはまだほとんどない。本研究の gene gun を用いた内皮細胞への遺伝

子導入は新しい角度からの治療法を開拓することを目指す点で、将来的には画期的な医療技術になるものと予想されるが、臨床の応用までは今後の研究が望まれる。

文 献

- 1) Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR : The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 89 : 531—590, 1982.
- 2) Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C : Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol* 96 : 2031—2035, 1978.
- 3) Budenz DL, Bennett J, Alonso L, Maguire A : *In vivo* gene transfer into murine corneal endothelial and trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 2211—2215, 1995.
- 4) Larkin DF, Oral HB, Ring CJ, Lemoine NR, George AJ : Adenovirus-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplantation* 61 : 363—370, 1996.
- 5) Fehervari Z, Rayner SA, Oral HB, George AJT, Larkin DFP : Gene transfer to *ex vivo* stored corneas. *Cornea* 16 : 459—464, 1997.
- 6) Ritter T, Voget K, Rieck P, Schilling-Schon A, Kolls J, Hartmann C, et al : Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 to corneal endothelial cells and organ cultured corneas leads to high IL-4 expression. *Exp Eye Res* 69 : 563—568, 1999.
- 7) Hudde T, Rayner SA, De Alwis M, Thrasher AJ, Smith J, Coffin RS, et al : Adeno-associated and herpes simplex viruses as vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Cornea* 19 : 369—373, 2000.
- 8) Masuda I, Matsuo T, Yasuda T, Matsuo N : Gene transfer with liposomes to the intraocular tissues by different routes of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1914—1920, 1996.
- 9) Shewring L, Collins L, Lightman SL, Hart S, Gustafsson K, Fabre JW : A nonviral vector system for efficient gene transfer to corneal endothelial cells via membrane integrins. *Transplantation* 64 : 763—769, 1997.
- 10) Hart SL, Aranocibia-Carcamo CV, Wolfert MA, Mailhos C, O'Reilly NJ, Ali RR, et al : Lipid-mediated enhancement of transfection by a non-viral integrin-targeting vector. *Hum Gene Ther* 9 : 575—585, 1998.
- 11) Hudde T, Rayner SA, Comer RM, Weber M, Isaacs JD, Waldmann H, et al : Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Therapy* 6 : 939—943, 1999.
- 12) Ha NT, Murakami A, Fujiki K, Kanai A : Transferrin-polyethylenimine conjugate, FuGENE6 (Novel lipid), and TransIT (Liposome of low toxicity) as non-viral vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 46 : 140—146, 2002.
- 13) Oshima Y, Sakamoto T, Yamanaka I, Nishi T, Ishibashi T, Inomata H : Targeted gene transfer to corneal endothelium *in vivo* by electric pulse. *Gene Therapy* 5 : 1347—1354, 1998.
- 14) Sakamoto T, Oshima Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K : Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Ther* 10 : 2251—2257, 1999.
- 15) Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D : *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 9568—9572, 1990.
- 16) Tan J, Yang NS, Turner JG, Niu GL, Maassab HF, Sun J, et al : Interleukin-12 cDNA skin transfection potentiates human papillomavirus E6 DNA vaccine-induced antitumor immune response. *Cancer Gene Ther* 6 : 331—339, 1999.
- 17) Yoshida Y, Kobayashi E, Endo H, Hamamoto T, Yamanaka T, Fujimura A, et al : Introduction of DNA into rat liver with a hand-held gene gun : Distribution of the expressed enzyme, [³²P]DNA, and Ca²⁺ flux. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 695—700, 1997.
- 18) Wellmann H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C : Optimized protocol for biolistic transfection of brain slices and dissociated cultured neurons with a hand-held gene gun. *J Neurosci Methods* 92 : 55—64, 1999.
- 19) Shillito EJ, Noonan S, Hinkle CC, Marini III FC, Kellman PM : Transduction of normal and malignant oral epithelium by particle bombardment. *Cancer Gene Ther* 5 : 176—182, 1998.
- 20) Tanelian DL, Barry MA, Johnston SA, Le T, Smith G : Controlled gene gun delivery and expression of DNA within the cornea. *BioTechniques* 23 : 484—488, 1997.
- 21) Shiraishi A, Converse RL, Liu CY, Zhou F, Kao CWC, Kao WWY : Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by *in vivo* particle-mediated gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 2554—2561, 1998.
- 22) Lo DC, McAllister AK, Katz LC : Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer. *Neuron* 13 : 1263—1268, 1994.