第 35 回総会ポスター賞受賞記念論文

総 説 (推薦論文)

推薦者：日本臨床免疫学会理事，第 35 回総会長 吉崎和幸

リウマチ滑膜に対する遺伝子導入システムの現状と展望

中 里 款，野々村美紀，宮 坂 信之，上 阪 等

The gene delivery system for rheumatoid synovium

Makoto NAKASATO, Yoshinori NONOMURA, Nobuyuki MIYASAKA and Hitoshi KOHSAKA

Department of Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

(Received January 15, 2008)

summary

A gene therapy of synovial tissue is potentially a novel therapeutic method in rheumatoid arthritis (RA). The method induces expression of anti-arthritic molecules in target cells, and is also useful for the investigation of novel therapeutic targets in vitro. Previous studies showed that viral vectors, which can infect non-proliferative cells well, *i.e.* adenovirus-based vector, were effective in gene transfer to synovial tissue. In this review, we discuss the properties and effectiveness of these methods and our investigations in forcing expression in synovial tissue or cells. The methods of gene transfer are classified into two categories: virus vectors and virus-free vectors. The virus vectors seem to be more applicable to clinical approaches since clinical trials of adeno-associated virus mediated gene therapy were performed in 2007. At the same time, many effective novel virus-free vectors have been developed.

Although these gene transfer technologies still have to be improved more to warrant their safety, the gene therapy is an ideal technique in performing “Bench to Clinic and Clinic to Bench” research studies. We hope that it will be applied to RA therapy in near future.

Key words—gene therapy; fibroblast-like synoviocyte; virus vector; PTD

抄 録

関節リウマチ (RA) に対する新たな治療法として，罹患関節の滑膜に直接的に抗リウマチ分子を発現させる遺伝子治療が検討されている．また一方で，滑膜細胞に対する遺伝子導入は治療標的分子の解明においても有用なツールであることは言を待たない．これまでアデノウイルスベクターなど増殖性の低い細胞にも導入可能な感染性ベクターを中心に病変滑膜に対して有用な導入系が構築されているが，本稿では関節滑膜における各種の遺伝子導入法について特性と現状を総括し，その有用性について我々の研究結果を絡めて論ずる．

現時点における遺伝子導入系はウイルスベクターと非感染性ベクターの二種に大別されるが，2007 年にはアデノ随伴ウイルスベクターを用いた関節リウマチの治療が行われており，ウイルスベクターの実用化に向けた強いアプローチとなっている．一方で非感染性ベクターについても有用性の高い新規担体が開発されつつある．いずれの導入系も臨床レベルの実用化には今後も検討を必要とするが，遺伝子治療は “Bench to Clinic and Clinic to Bench” を理想的に体现しうる技術であり，今後の応用が期待される．

はじめに

遺伝子治療とは，元来遺伝子変異に対する機能補完を目的として正常型遺伝子を対象組織の細胞内に挿入し，標的分子の発現を誘導する治療行為として提唱された．現在では標的細胞に対する遺伝子導入

により機能性分子を発現誘導する治療行為を広く指し，その手法は核酸技術の発展と共に進化している．

RA は関節滑膜を病変の主座とする炎症性疾患であり，病変部は滑膜自身によって包摂された閉鎖性の高い領域に局限する．従って他の臓器を標的とする場合とは異なり，抗 RA 遺伝子治療においては全身への遺伝子導入は必ずしも要しない．そのため，病変滑膜のみを標的として遺伝子を導入すれば，抗リウマチ分子を患部集約的に発現することができ

る。関節滑膜を主標的とすることで、全身性の免疫抑制およびそれに伴う日和見感染症などの副作用を低減しうる。そのうえ、標的組織が全身投与に比べ小さくなるため投薬量もまた抑制できるという、コスト面でのアドバンテージをも有することが予想されるなど、多くのメリットが生じる¹⁾。

RA に対する遺伝子治療の検討が開始されたのは 1994 年の Hung ら²⁾の実験からであり、この実験では家兎関節より滑膜細胞を採取して *ex vivo* でインターロイキン 1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) 遺伝子を導入し、これらの細胞が関節に戻した後も IL-1Ra を産生し続けて炎症を抑制する事を示した。1996 年、Evans ら³⁾は同様の *ex vivo* 遺伝子治療系を用いた臨床試験について検討を行った。その後、被験者の負担を低減するより実用的な手法として治療用ベクターを関節内へ注射することで直接病変滑膜に対する遺伝子導入を行う治療系が提唱され、2007 年には関節リウマチの *in vivo* 遺伝子治療による臨床試験が行われた^{4,5)}。

このように RA に対する遺伝子治療はこの十余年で臨床応用に向けた整備が進みつつあるが、現状では未だ滑膜に対し有効かつ安全な遺伝子導入法の確立はなされておらず、技術的な蓄積と改良を必要としている。本稿では滑膜細胞および病変滑膜に対する遺伝子導入の試みについてその概要を述べ、我々の研究結果と合わせてその展望を俯瞰する。

1. 感染性ベクター

実際の遺伝子導入に用いられる担体は、大別してウイルスベクターと非感染性ベクターの二種がある。

ウイルスベクターの利点として、適切なベクターを選択すれば高い導入効率を実現できることが挙げられる。一方で、ウイルス由来のベクターは組み換えによる増殖性の再獲得などの恐れもあり、安全性が完全に担保されているとは言えない。しかし現状で最も RA に対する臨床応用検討が進んでいる遺伝子導入法がウイルスベクターであることは確かであり、その重要性はきわめて高い。

なお RA モデル動物の関節腔にアデノウイルスベクターを局所投与した場合でも、遺伝子導入によるタンパク産物の一部は関節内から全身へとリークしうることが示唆されている³⁾。アデノウイルス以外のベクターについてはこのような事例について報告がないものの、同様の問題が発生しうるとは十分に予想される。すなわち、ベクターの単純な局所投

与だけでは非病変組織に対する安全性が担保されないことに留意すべきである。

1. アデノウイルスベクター

アデノウイルスは二本鎖 DNA を遺伝子とする球状のウイルスである。エピソーム導入型ウイルスであるため、導入後の細胞分裂に伴いエピソームの含有比率が希釈され、発現が一過性となる。一方で、導入効率が高く非分裂細胞への導入も可能であるという特性を有する。

RA における遺伝子治療の標的組織は、先に述べたように病変滑膜である。RA 滑膜は健常滑膜と異なり異常増殖を示すが、その増殖速度は腫瘍などと比較すると著しく低い。実際、RA 関節から初代培養により得た滑膜線維芽細胞は、10%血清含有培地における doubling time が 5~7 日程度である。このため増殖性の低い細胞に高効率で感染できるアデノウイルスベクターは滑膜細胞への遺伝子導入に適した特性を有している。実際の遺伝子治療には増殖に必要な E1 遺伝子や、これに加え E2a, E3, E4 遺伝子を欠損させた非増殖性ウイルスが用いられる。

アデノウイルスベクターを用いた RA モデル動物滑膜の遺伝子治療は RA 治療標的分子の探索に適した実験系であり、1997 年には Zhang ら⁶⁾がコラーゲン誘導関節炎マウス滑膜に CD95 (Fas) リガンドを発現させると、炎症性細胞の死滅を誘導して関節炎を抑制したと報告した。翌年には Parks ら⁷⁾がインターロイキン 12 の発現誘導による炎症性メディエータ抑制を報告し、1999 年に Taniguchi ら⁸⁾がサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16^{INK4a} の発現によって関節炎が顕著に抑制されることを報告した。以後、アデノウイルスベクターを用いて多様な抗リウマチ候補分子の関節内強制発現が検討され、それぞれの治療効果が明らかにされている。残念ながらアデノウイルスベクターはウイルス本来の構成遺伝子が多く残存しているため、ベクター自体が免疫原性・炎症惹起性を有する⁹⁾。このためアデノウイルスベクターの大量投与は重篤な副作用を引き起こす。実際、米国ペンシルバニア大学における臨床試験では 18 歳の少年がアデノウイルス治療薬の(過剰な)全身投与に起因するとみられる多臓器不全で亡くなっている^{10,11)}。この死亡事故以来、アデノウイルスによる遺伝子治療の臨床応用は困難視されているが、ベクターの増幅と精製が簡便である事もあり、研究用ベクターとしての有用性は特筆すべ

きである。また、旧来の 5 型アデノウイルスベクターのファイバー部分を置換して滑膜細胞への導入効率を高めた改良型アデノウイルスも報告されており¹²⁾、このようなウイルスベクターを用いることで投与ウイルス量の抑制と、それに伴う副作用の低減が期待される。

2. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

上述したアデノウイルスベクターによる治験中の死亡事故以降、ウイルスベクターの臨床応用については強い忌避感が醸成されていた。しかし抗 RA 療法としての遺伝子治療のコンセプトそのものに瑕疵はなく、安全性の高いウイルスベクターとして AAV 由来ベクターが注目されている。

AAV は一本鎖 DNA を遺伝情報とするパルボウイルス科の小型ウイルスであり、免疫原性は低いとされる。また滑膜細胞及び組織への遺伝子導入能を有することが報告されている¹³⁾。AAV ベクターはサブタイプに依存して感染する細胞種が異なるが、一部のサブタイプは導入した遺伝子をエピソード化するばかりではなくホストゲノムの特定部位に組み込むことが報告されており¹⁴⁾、ランダムなゲノム改変を行うレトロウイルスよりも安全性および利便性が高いと予想される。

2007 年には米ワシントン州シアトルの医薬ベンチャー「Targeted Genetics Corporation」が開発した組み替え AAV 治験薬を用いて関節リウマチ患者に対する遺伝子治療試験が行われた。この治験は腫瘍壊死因子 (TNF) をブロックする抗 TNF 阻害因子を組み込んだ AAV ベクターを被験者の関節内に局所投与するものであったが、36 歳の女性患者が治験薬の投与後に死亡し、アメリカ医薬品局 (FDA) が同種の AAV ウイルスベクター全てに対して臨床試験の中止を命じるという事態に至った。しかし、後の検討で事故と投薬の因果関係には否定的な見解が強まり⁴⁾、これを受けて AAV ベクターによる臨床試験も再開される方向であることが報じられている⁵⁾。AAV ベクターの欠点はいまだ高価なウイルスの作製が困難なことにあるが、過去のさまざまなウイルスベクターと同じく、今後データ蓄積により系の最適化が進めば解消されうる問題であると予想される。

3. レトロウイルスベクター

遺伝子をエピソードとして細胞に導入すると、挿

入遺伝子は細胞増殖時に複製されないため、分裂を経るごとに含有頻度が半減してしまい、導入遺伝子の発現が低下する。よって恒久的な抗リウマチ分子の発現にはホストゲノムへの遺伝子組み込みが必要である。レトロウイルスは RNA を遺伝物質として持ち、逆転写酵素により宿主ゲノムへの遺伝子組み込みを行うため、この目的に適したベクターである。レトロウイルス科は三つの亜科から構成されるが、レンチウイルス亜科に属するレンチウイルスは核膜透過能を有しており非分裂細胞にも遺伝子導入できるため、関節滑膜を標的とするベクターに利用できる¹⁵⁾。遺伝子治療に用いられるレンチウイルスベクターは HIV ウイルスを改変したものであるが、野生株の遺伝配列の多くを欠失させ安全性を高めている。

しかしレトロウイルスは染色体のランダムな領域に遺伝子挿入を起こすため、他遺伝子の発現への影響が大きい。実際にフランスにおいて行われたレトロウイルスによる遺伝子治療の臨床試験では副作用として白血病の発症が報告されており¹⁶⁾、レンチウイルスベクターにも同様のリスクが存在すると予想される。

4. センダイウイルスベクター

センダイウイルス (マウスパラインフルエンザ 1 型ウイルス) は細胞融合能を有することで知られる一方で低細胞毒性のベクターとしても広く利用されている。

センダイウイルスベクターを用いた滑膜組織への遺伝子導入については動物モデルを用いて検討され、山下ら¹⁷⁾はアジュバント関節炎を誘導したラットの関節内に線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を組み込んだセンダイウイルスベクターを注射すると、FGF-2 の発現を誘導して炎症増悪を示すことを報告した。現状ではセンダイウイルスを用いた RA 治療についての検討は行われていないが、将来的には治療目的で利用可能なウイルスベクターであると考えられる。

5. 単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクター

HSV は 150kb の二本鎖 DNA を遺伝情報とする直径 100~150 nm の大型球形ウイルスである。ゲノムサイズが大きいため、長い導入遺伝子を多数組み込めるという利点を持つ。滑膜細胞には in vitro および in vivo で導入報告がある^{18,19)}。抗腫瘍治療

では HSV ベクターの臨床試験も行われており²⁰⁾、今後 RA 治療への応用が期待される。

II. 非感染系ベクター

非感染性の遺伝子導入法はリスクコントロールの面で優れるが、滑膜細胞に対しては一般的に導入効率が低い。また既存の非感染系導入担体は *in vitro* での使用を前提としており、RA 治療を含めた臨床応用には技術的ハードルが高い。このため、*in vivo* 投与を前提とした新規ウイルスフリーベクターの開発が進みつつあり、今後の発展が待たれる。

1. リポフェクション

最も一般的な遺伝子導入法であるカチオン性リポソーム試薬は、ヒト線維芽細胞に対するプラスミド導入効率が概して低い。我々の検討ではヒト初代培養滑膜線維芽細胞に対して Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた場合、10%前後の細胞に対するプラスミド導入を確認した。しかし現状の効率では十分とは言えず、技術的課題が残る。また Lipofectamine など無血清環境下での導入が推奨される試薬は滑膜線維芽細胞が血清飢餓に弱いため長時間の導入が困難であったり、血清の存在が避け得ない *in vivo* 環境では導入効率が大幅に低下するなどの欠点を有する。

我々は血清存在下での導入が可能なりポソーム試薬についても検討を進めているが、現状では 10% 血清中で滑膜細胞にプラスミド導入可能な試薬および条件は同定されていない。

一方、リポフェクションでは核酸のサイズに応じて導入効率及び細胞傷害性が大きく異なる。20 塩基対前後の核酸で構成される siRNA については Lipofectamine 系の試薬を用いた導入例が報告されており、*in vitro* では著明な効果が得られることを示している^{21,22)}。また我々は Eugene HD (Roche, Indianapolis, IN) を用いた条件検討を行い、*in vitro* においてはほぼ 100% の滑膜線維芽細胞に対し siRNA, miRNA などの短鎖オリゴ RNA が導入可能であることを見出し、現在この系を用いて *in vitro* で miRNA 機能解析を進めている。これまでの検討から、滑膜細胞に対するリポフェクションの導入効率は導入核酸サイズが大きくなると共に低下し、逆に細胞傷害性は向上していくと推定される。この原因は調製したリポソームの粒子径が包摂核酸サイズと共に拡大するためであろう。

2. 電気穿孔法

電気穿孔法は広範な細胞種に遺伝子導入が可能であり、滑膜線維芽細胞にも同様に有効である²³⁾。また電気穿孔法を併用したリポフェクションは *in vitro* において ~75% という高い導入効率を示す (Amata 社 Basic nucleofactor kit : 和光純薬 Amata データベースに記載)。しかし電気穿孔法は導入する細胞を選択できず、導入核酸との接触部位が大きい組織に強く導入されると考えられる。コラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスを用いた *in vivo* 検討では主に筋肉組織への導入を評価しており²⁴⁾、滑膜組織に対する遺伝子導入については検討されていない。また人体への電気穿孔法施術には倫理的問題もあり、現状では本法の臨床への応用は困難とみられる。

3. 微小導入法 (マイクロインジェクション)

微小導入法 (マイクロインジェクション) は原理的にいかなる細胞に対しても適用が可能であり、滑膜細胞に対してはプラスミド導入²⁵⁾および組換えタンパクの導入報告がある²⁶⁾。しかし本法は操作が煩雑なため処理細胞数が少なく、また *in vivo* 投与への利用は事実上不可能である。一方で汎用性が高いことから、細胞レベルのアッセイにおける有用性は評価されるべきであろう。

4. 新規ナノ粒子

従来のリポフェクションはリポソームを担体としてきた。しかしこれにより形成される DNA 複合体ナノ粒子は粒子径が不均一などの理由で導入効率が低い。現在では細胞導入に最適な粒子径のナノ粒子を均質に形成するため、多くの高分子化合物が開発されている。また表面部位の官能基修飾により導入細胞に特異性を付与することも試みられている。

このうち滑膜細胞への透過性が報告されているものが PEG-DET である。PEG-DET はカチオン性ポリマーとポリエチレングリコールの共重合体であり、DNA と会合するとナノミセルを形成して各種の細胞に対して高い導入効率を示す²⁷⁾。片岡ら²⁸⁾は PEG-DET がヒト滑膜初代培養細胞に対しても高い導入効率を示したことから、そして変形性関節炎 (OA) 治療の検討を目的として関節炎モデルマウス滑膜に PEG-DET を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、一ヶ月にわたり発現が持続したと報告している。今後も同様のナノデリバリーシステムが開発さ

れると思われ、RA 治療への利用検討が待たれる。

5. タンパク導入ドメイン (PTD)

細胞膜の主構成成分である脂質二重層は一般に 1000 ダルトンを超える高分子に対して難透過性を示す。ところが 1970 年代に一部のタンパクが細胞膜に対する透過性を示す事が明らかになり、これらの分子の解析を経て 1990 年代にはタンパク導入ドメインと呼称される一群の機能ペプチド配列が同定されるに到った。PTD の詳細な細胞膜透過メカニズムは配列により異なるが、いずれも結合した物質を伴ったまま細胞内部に高効率で導入される。Mi ら^{29,30)}は PTD のヒト滑膜由来細胞株に対する導入を検討し、TAT-PTD 及び PTD-5 が高い効率を示すほか、HAP-1 PTD は細胞内導入強度でやや劣るがヒト滑膜線維芽細胞に対し特異的に導入できることを報告した。これらの PTD はアジュバント誘導性関節炎を発症した家兎の関節にも導入できた。また、我々は CIA マウスに対し組換え TAT-PTD 融合サイクリン依存性キナーゼ阻害分子タンパクを関節内投与し、関節炎の有意な抑制を認めた(論文作成中)。我々の検討でも TAT-PTD は滑膜細胞に対し 100% の導入効率を示すが、近年 TAT-PTD とリポソームの複合体 (DPL) を用いて各種の細胞に高効率のプラスミド導入を行う系が相次いで報告されており³¹⁾、今後、DPL による遺伝子導入が RA 治療にも応用されるであろう。

結 語

遺伝子導入システムには多様な選択肢があり、それぞれが明確な特色を有していることから用途に応じた導入系のプランニングが重要である。現時点では、臨床応用に対しては低抗原性の AAV ベクター、動物実験や *in vitro* の系では簡便で導入効率の高いアデノウイルスベクターの有用性が高いと思われる。一方、PEG-DET や DPL など次々と新しい非感染系ベクターが選択肢に加わりつつあることから、より広い導入系に対し臨床を見据えた検討が必要になるであろう。

導入する遺伝子についても今後は抗リウマチ分子を発現させるばかりでなく、近年の *in vitro* 研究で作用が明らかになりつつある siRNA や miRNA を用いて炎症性シグナル伝達分子を発現抑制する手法など、新たな選択肢について検討の余地がある。

遺伝子治療とは現在もなお発展途上の技術であ

り、安全性と導入効率の両立的改善をマーカーとしながらダイナミックに進歩してゆくと予想される。実際に遺伝子治療における投与方式も *ex vivo* から *in vivo* へと着実に発展を遂げており³²⁾、10 年前と比較すれば明らかな実用化への歩みが実感できる。

滑膜細胞に対する遺伝子導入は“Bench to Clinic and Clinic to Bench”を理想的に体现しうる技術であり、今後はより広範な領域への応用が期待される。

文 献

- 1) Evans C. H., et al. : Gene therapy for autoimmune disorders. *J. Clin. Immunol.* **20** : 334–346, 2000.
- 2) Hung G. L., et al. : Suppression of intra-articular responses to interleukin-1 by transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium. *Gene Ther.* **1** : 64–69, 1994.
- 3) Evans C. H., Robbins P. D. : The promise of a new clinical trial—intra-articular IL-1 receptor antagonist. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **108** : 1–5, 1996.
- 4) Kaiser J. : Clinical trials. Gene transfer an unlikely contributor to patient's death. *Science* **318** : 1535, 2007.
- 5) Tanne J. H. : US gene therapy trial is to restart, despite patient's death. *B.M.J.* **335** : 1172–1173, 2007.
- 6) Zhang H., et al. : Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer. *J. Clin. Invest.* **100** : 1951–1957, 1997.
- 7) Parks E., et al. : Transient gene transfer of IL-12 regulates chemokine expression and disease severity in experimental arthritis. *J. Immunol.* **160** : 4615–4619, 1998.
- 8) Taniguchi K., et al. : Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **5** : 760–767, 1999.
- 9) Hartman Z. C., et al. : Adenovirus vector induced innate immune responses : Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res.* [Epub ahead of print].
- 10) Batshaw M. L., et al. : Recombinant adenovirus gene transfer in adults with partial ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD). *Hum. Gene Ther.* **10** : 2419–2437, 1999.
- 11) Raper S. E., et al. : Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcar-

- bamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80** : 148–158, 2003.
- 12) Toh M. L., et al. : Enhancement of adenovirus-mediated gene delivery to rheumatoid arthritis synoviocytes and synovium by fiber modifications : role of arginine-glycine-aspartic acid (RGD)- and non-RGD-binding integrins. *J. Immunol.* **175** : 7687–7698, 2005.
- 13) Jennings K., et al. : Proteasome inhibition enhances AAV-mediated transgene expression in human synoviocytes in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **11** : 600–607, 2005.
- 14) Surosky R. T., et al. : Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* **71** : 7951–7959, 1997.
- 15) Gouze E., et al. : Transgene persistence and cell turnover in the diarthrodial joint : implications for gene therapy of chronic joint diseases. *Mol. Ther.* **15** : 1114–1120, 2007.
- 16) Kaiser J. : Gene therapy. RAC hears a plea for resuming trials, despite cancer risk. *Science*. **299** : 991, 2003.
- 17) Yamashita A., et al. : Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Immunol.* **168** : 450–457, 2002.
- 18) Nita I., et al. : Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* **39** : 820–828, 1996.
- 19) Oligino T., et al. : Intra-articular delivery of a herpes simplex virus IL-1Ra gene vector reduces inflammation in a rabbit model of arthritis. *Gene Ther.* **6** : 1713–1720, 1999.
- 20) Kubo H., et al. : Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Hum. Gene Ther.* **14** : 227–41, 2003.
- 21) Scott B. B., et al. : TNF-alpha modulates angiopoietin-1 expression in rheumatoid synovial fibroblasts via the NF-kappa B signalling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328** : 409–414, 2005.
- 22) Hayashi S., et al. : Decoy receptor 3 expressed in rheumatoid synovial fibroblasts protects the cells against Fas-induced apoptosis. *Arthritis Rheum.* **56** : 1067–1075, 2007.
- 23) Abe M., et al. : Regulation of interleukin (IL)-1beta gene transcription induced by IL-1beta in rheumatoid synovial fibroblast-like cells, E11, transformed with simian virus 40 large T antigen. *J. Rheumatol.* **24** : 420–429, 1997.
- 24) Ho S. H., et al. : Protection against collagen-induced arthritis by electrotransfer of an expression plasmid for the interleukin-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321** : 759–766, 2004.
- 25) Goto M., et al. : Functional characterization of SV40-transformed adherent synovial cells from rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **86** : 387–392, 1991.
- 26) Tolboom T. C., et al. : Fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis are more sensitive to apoptosis induced by the viral protein, apoptin, than fibroblast-like synoviocytes from trauma patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **24** : 142–147, 2006.
- 27) Miyata K., et al. : PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release.* **122** : 252–260, 2007.
- 28) 平成 13 年度 CREST 研究課題「遺伝子ベクターとして機能するナノ構造デバイスの創製」研究終了報告書.
- 29) Mi Z., et al. : Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo. *Mol Ther* **2** : 339–347, 2000.
- 30) Mi Z., et al. : Identification of a synovial fibroblast-specific protein transduction domain for delivery of apoptotic agents to hyperplastic synovium. *Mol Ther* **8** : 295–305, 2003.
- 31) Moon I. J., et al. : Marked transfection enhancement by the DPL (DNA/peptide/lipid) complex. *Int. J. Mol. Med.* **20** : 429–437, 2007.
- 32) Adriaansen J., et al. : Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis : innovative vectors and therapeutic genes. *Rheumatology* **45** : 656–668, 2006.