

心筋症における遺伝子治療の現況

白倉良太*

はじめに

生物のもつ機能や構造を解析し、それを人工的に再現して利用しようとする学問「生体工学」の進歩はめざましく、分子生物学の分野にさまざまな工学的手法が取り入れられてきた。遺伝子工学もそのひとつで、診断や治療に応用されるようになった。

心臓血管の領域でも、原因遺伝子がコードするタンパク質の機能が解明され、心不全や高血圧症、動脈硬化症に関連する病態の診断や治療に関する分子生物学的研究が盛んに行われている。最近、家族性肥大型心筋症の発症に7つの遺伝子が関与していることが明らかにされ、診断基準や病型分類に応用する提案があり、遺伝子治療の可能性も示唆されている。また、原因遺伝子が次々解明されている筋ジストロフィーの中に家族性拡張型心筋症として発症する例があることも報告されている。しかし、特発性拡張型心筋症 (DCM) については分子生物学的にはまだまだ不明な点が多い。

一方原因遺伝子の究明とは別に、心筋細胞を遺伝子操作で機能的増幅、修復したり、細胞置換して心不全を治そうとする *cardiomyocytolasty* という概念の治療法に関する研究が盛んになっている。これまでに臨床応用されている遺伝子治療には、体外に取り出した細胞に遺伝子を導入し体内に戻す方法と、生体内の組織や臓器に遺伝子を直接導入する *in vivo* 遺伝子導入がある。後者については現在、個々の臓器に適したベクターの選択、臓器特異的にしかも臓器全体に均一に遺伝子を導

入する方法などが精力的に研究されており、心不全や、閉塞血管の遺伝子治療に応用されようとしている。

原因遺伝子の解明

(1) 肥大型心筋症

家族性に発症する遺伝病はもちろん、高血圧症や動脈硬化症などおよそ遺伝病からほど遠い疾患まで原因遺伝子の解明がなされるようになり、病態が分子生物学的に把握されて診断、治療、予後判定が遺伝子レベルでなされるようになっていく。

常染色体性優性遺伝の様式をとることの多い家族性肥大型心筋症の発症が β ミオシン H 鎖遺伝子のミスセンス変異による¹⁻³⁾ことは以前から言われていたが、最近そのほかにトロポニン T⁴⁾、 α トロポミオシン⁴⁾、ミオシン結合 C 蛋白⁵⁻⁶⁾、必須および調節ミオシン L 鎖⁷⁾、トロポニン I⁸⁾をコードする遺伝子の突然変異による例が報告されている。これらの遺伝子は全てサルコメア蛋白の構築に関与しており、肥大型心筋症はサルコメアの異常による疾患と見なされ、これらの遺伝子の変異による診断基準や病型分類が提唱されている⁹⁾。

(2) ジストロフィン心筋症

筋ジストロフィーは巨大分子であるジストロフィンの遺伝子に広範な変異がみられ、病型も多岐にわたっていて、併発する心疾患もいろいろである。伴性劣性遺伝であるデュシャン型筋ジストロフィーの男児では80%が晩期に心不全を呈する。最近 X 染色体性拡張型心筋症が、ジストロフィン遺伝子のプロモーター領域の欠損によることが明らかにされた¹⁰⁾。しかし、DCM を調べても、ジストロフィン遺伝子の異常は全く認められ

*大阪大学大学院医学系研究科附属・バイオメディカル教育研究センター・臓器移植学

ていない¹¹⁾。

(3) ウイルス性心筋炎と DCM

DCM 患者35人の心筋生検標本を PCR 法で調べたところ、約半数に微量のエンテロウイルスの RNA を検出したが、健常者には全く検出できなかったと言う報告がある¹²⁾。しかも、陽性者の82%が1年以内に心不全に陥った。心筋組織をハイブリダイゼーション法にて調べた同様の報告もある^{13,14)}。

ウイルス性心筋炎の多くは自然治癒するし、しばしば診断されずに終わる。しかし、中に心機能障害が持続し、死亡するケースもある。ウイルス性心筋炎に対する過剰免疫反応が心筋症に至るという考えもある¹⁵⁾。また、心筋炎および DCM の心臓に浸潤する抗原特異的 T 細胞の活性化を重視する論文もある¹⁶⁾。心筋細胞に B7-1, B7-2, CD40が過剰発現していることから、心筋細胞が CTL や NK 細胞に対して APC の役割を果たし、心筋細胞破壊を持続させているという仮説を提唱している。

(4) Extracellular Matrix Dynamics in Heart Failure

虚血性心筋症や DCM による慢性心不全の病態は心筋細胞の支持組織である Extracellular Matrix (ECM) のリモデリング傷害状態といえる。正常の心筋においては ECM を解体する蛋白融解酵素 (matrix metalloproteinases, MMPs) とその抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) の均衡によって構築が維持されている¹⁷⁻¹⁹⁾。心筋症の心不全はこの均衡が崩れた状態、即ち MMPs の異常活性化、TIMPs の機能低下によってコラーゲン繊維の断裂や不連続が起こった状態といえる。この状態は MMPs をコードする遺伝子の過剰発現、TIMPs 遺伝子の低発現により引き起こされる。これらの不均衡は虚血性、拡張型、肥大型の心筋症でおのおの異なっている²⁰⁾。

遺伝子導入法の開発

以上のように心筋症の分子生物学的研究が盛んになり、遺伝子レベルでの病因、病態が解明されてくると、同時に治療戦略として関連遺伝子の遺伝子導入の研究がクローズアップされる。これまで多くの遺伝子治療プロトコールが期待したほどの成果を上げていない理由は、目的遺伝子が目的細胞の中に十分量入っていないためである。効率

よく、特異的に、必要期間、随伴障害を極力ないようにして導入する方法が必要になる。心臓血管領域、循環器領域でも数多くの検討がなされている。

(1) ベクター

心臓、心筋への遺伝子導入を目的とした遺伝子導入用ベクターとしては、ウイルス遺伝子を除いた (replication-defective) アデノウイルス²¹⁻³²⁾、アデノ随伴ウイルス (AAV)³³⁻³⁴⁾、の検討が目につくが、心臓全体に冠状動脈を介して導入できる HVJ リポソーム³⁵⁻⁴⁰⁾も目的によっては有効と言われている。いずれも遺伝子を細胞核内に導入できるが、染色体に組み込まれることはないので導入目的は制限される。心筋細胞は分裂しないのでレトロウイルス⁴¹⁻⁴²⁾のベクターは使にくいいため、ほとんど報告がない。

(2) プロモーター

発現効率や特異性を高めるために各種プロモーターが検討されている。転写調節を目的にラウス肉腫ウイルスプロモーター^{27,28,30,41)}を用いた報告が散見される。心筋に特異的に遺伝子を導入する目的ではミオシン L 鎖-2 (mlc-2 v)^{23,28)}や α ミオシン H 鎖^{23,43)}のプロモーターが使用されている。

(3) エンハンサー

虚血心の治療目的で遺伝子導入する場合、虚血部位に効率的に導入するため、hypoxia-responsive enhancer elements⁴³⁾を筋特異的プロモーターと組み合わせ用い、有効だったとする報告がある。

(4) デリバリーシステム

目的遺伝子を目的臓器に到達させる方法論が精力的に検討されている。心臓の場合、小切開・左前方開胸を行い直接心筋に注射する方法^{30,41,43,44)}から、単に遺伝子を組み込んだベクターや遺伝子そのものを静脈注射する方法²¹⁾まで種々ある。ホルモンやサイトカインなど各種血清因子を産生させたい場合は大腿筋等の骨格筋に注入する方法^{22,23)}もある。in vitro で遺伝子導入した培養細胞 (新生児心筋細胞、繊維芽細胞、血管平滑筋細胞等) を心筋内に移植する方法^{36,45,46)}も試みられている。冠状動脈に遺伝子を組み込んだベクターを注入して心臓全体に遺伝子を発現させる方法として、カテーテルを使う方法³³⁾と心臓手術時や移植の時に直接冠状動脈に注入する方法^{32,38,40,47-49)}が検討されている。変わった発想

としては縫合糸（クローミック・ガット糸）に遺伝子をコーティングして心臓切開部を縫合する試み⁵⁰⁾がある。

心筋症の遺伝子治療

遺伝子の欠損、変異遺伝子による機能喪失に対し、本来の遺伝子を過剰発現させたり、置換する方法が開発されているし、変異遺伝子が機能亢進している場合はこれを抑制するような遺伝子操作が考えられている。

(1) 遺伝子の置換

遺伝性疾患で原因遺伝子の突然変異によることが判明している疾患では、原因遺伝子の補填、置換療法が有効と考えられる。

・家族性肥大型心筋症：

前述したように、特発性肥大型心筋症のような家族性遺伝病でも、心筋ミオシンH鎖遺伝子の点突然変異が同定される頻度は約半数で、他に6種類もの原因遺伝子が同定されている。これらを置換する試みはまだ報告されていない。

・ジストロフィン心筋症：

最後には心筋症を併発するデュシャン型やベッカー型筋ジストロフィーがジストロフィン遺伝子の広範な突然変異によることが判明しているが、前述したようにこの遺伝子は巨大なため、これを核内に導入する方法がまだ見つかっていない。ジストロフィン遺伝子のプロモーター領域の欠損が示されたX染色体性拡張型心筋症に関しても未だ報告がないようである。

(2) 病態の改善のための遺伝子導入

・ポンペ病：

肥大型心筋症、骨格筋の筋力低下をきたし、2歳前後で心不全のため死亡するⅡ型糖原病(Pompe disease)は α -1, 4-グルコシダーゼ欠損による代謝性疾患だが、Paulyら²²⁾はこの遺伝子をクローニングし、アデノウイルスベクター(E1-deleted recombinant adenovirus)に組み込んで新生児ラットの心筋内または後肢筋肉内に注入した。筋肉内に正常の6~10倍の酵素活性を認め、ウェスタンブロット法にて酵素蛋白の過剰発現を検出しており、ポンペ病の遺伝子治療の可能性をしめした。

・心筋症の心不全：

Tyagi²²⁾は虚血性心筋症やDCMによる慢性心

不全の病態がMMPsをコードする遺伝子の過剰発現、TIMPs遺伝子の低発現により引き起こされるExtracellular Matrix (ECM)のリモデリング障害状態であることを報告していることは先にのべた。彼らはECM構築維持に関連する種々の遺伝子(MMPs, TIMPs, TGF- β , デコリン, コラーゲン等)量を調整することによって心筋症の心機能を改善することができるとしている。

(3) 心筋細胞への分化増殖、細胞移植

・myogenic determination gene (MyoD)

心筋組織中には幹細胞がないため、また成人の心筋細胞に分裂・増殖能がないために心筋細胞は障害を受けると減少し結合織に置き換わる。心筋に障害が加わった時の癒痕形成時に心筋組織内の繊維芽細胞を遺伝子操作で骨格筋細胞に分化させようと言う実験がある³⁰⁾。MyoD遺伝子をラウス肉腫ウイルスの転写調節下にアデノウイルスベクターに組み込んで、培養心繊維芽細胞に導入すると骨格筋に変換する(myogeninとskeletal myosin heavy chainsが発現することから、ラット心に上記遺伝子を直接注入した。凍結傷害を加えて1週間後に遺伝子を注入した場合、癒痕部にmyogeninとskeletal myosin heavy chainsが染色された。

・心筋細胞移植

心筋梗塞などで障害を受けた部位に心筋細胞を移植する発想がある。この場合、心筋細胞を収縮筋として補う目的と、遺伝子導入した心筋細胞を移植し長期間発現蛋白の効果をねらう(担体として使う)目的がある。in vitroで増殖因子を遺伝子導入した胎児心筋細胞または新生児心筋細胞を癒痕部位に移植し、心筋の再構築をねらう細胞移植^{45,46)}も考えられている。

(4) 虚血領域の血管新生(虚血性心筋症関連)

・vascular endothelial growth factor (VEGF)：

血管新生因子の一つであるVEGF遺伝子を虚血心筋に直接注入して血管新生をはかった臨床と動物実験の報告がある。

Losordoら⁴⁴⁾は治療抵抗性で有症状の慢性心筋虚血患者に第1相試験としてVEGF遺伝子をミニ開胸下に直接心筋に注入した成績を発表した。遺伝子はベクターを用いず、プラスミドDNAのまま虚血領域に注入。注入による血行動態の変化はなく、軽度の不整脈を認めたのみで安全に行わ

れた。5例に施行し、術後全例に明らかな狭心痛の軽減を認め、NTGの使用量は平均で1/5になった。ドブタミン負荷SPECT検査で全例に虚血領域の減少を認め、CAGにてRentropスコアの改善を認めたという。

Sayed-Shahら³⁹⁾はtransmyocardial CO₂-laser revascularizationを虚血領域に行う際に、同時にプラスミドDNAまたはHVJ-liposomeをベクターにVEGF遺伝子を心筋内に注入した場合の効果をブタを用いて検討した。処置後3日目にみた遺伝子の発現量はベクターの有無に関係なく高発現を得た。血管新生の効果を左室自由壁の動きで見たところ、CO₂-laser revascularizationと遺伝子導入を同時に行った群のみ有意差(p=0.004)をもって壁運動の改善を認め、効果は6週間後も持続していた。

• human basic fibroblast growthfactor (FGF-2) :

血管新生因子FGF-2遺伝子をin vitroで繊維芽細胞にtransfect(アデノウイルスベクターを使用)しておいて、基底膜蛋白のゲルに封入してマウスの皮下に注入した実験では、FDG-2の分泌と注入部位での平滑筋細胞の増殖と血管新生を認めたという²⁵⁾。

おわりに

心筋症に関連してベクターやプロモーターなど遺伝子導入法に関する研究と血管新生因子や酵素など治療目的で導入する遺伝子の研究の最近の文献をレビューしたが、虚血性心筋症に関連するものが大部分でDCMについての報告はほとんどなかった。

文 献

- 1) Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, et al : Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326 : 1108-1114, 1992
- 2) Horvath G, Rubin SA : The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. *Curr Opin Cardiol* 7 : 359-366, 1992
- 3) Carter LF, Rubin SA : The molecular and cellular biology of heart failure. *Curr Opin Cardiol* 8 : 361-368, 1993
- 4) Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, et al : α -tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77 : 701-712, 1994
- 5) Watkins H, Conner D, Thierfelder L, et al : Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genet* 11 : 434-437, 1995
- 6) Bonne G, Carrier L, Bercovici J, et al : Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genet* 11 : 438-440, 1995
- 7) Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, et al : Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nature Genet* 13 : 63-69, 1996
- 8) Kimura A : Mutations in seven different genes cause hypertrophic cardiomyopathy in Japanese patients. In *An Approach to Disease*, ed by Niho Y, p142, Kyushu Uni Press, 1995
- 9) MacRae CA, Watkins HC, Jarcho JA, et al : An evaluation of ribonuclease protection assays for the detection of β -cardiac myosin heavy chain gene mutations. *Circulation* 89 : 33-35, 1994
- 10) Muntoni F, Cau M, Ganau A, et al : Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoterregion associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 329 : 921-925, 1993
- 11) Michels VV, Pastores GM, Moll PP, et al : Dystrophin analysis in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Med Genet* 30 : 955-957, 1993
- 12) Satoh M, Tamura G, Segawa I, et al : Enteroviral RNA in dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J* 15 : 934-939, 1994
- 13) Why HJF, Meany BT, Richardson PJ, et al : Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 89 : 2592-2589, 1994
- 14) Martino TA, Liu P, Sole MJ : Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 74 : 182-188, 1994
- 15) Liu P, Martino T, Opavsky MA, et al : Viral myocarditis: balance between viral infection and immune response. *Can J Cardiol* 12(10) : 935-943, 1996
- 16) Seko Y, Takahashi N, Ishiyama S, et al : Expression of costimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD40 in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Circulation* 97(7) : 637-639, 1998
- 17) Tyagi SC, Simon SR : Hydrophobic binding sites of elastin-derived peptide on neutrophil elastase. *Biochem Cell Biol* 72 : 419-427, 1994
- 18) Tyagi SC, Ratajska A, Weber KT : Myocardial matrix metalloproteinase(s): Activation and localization. *Mol Cell Biochem* 126 : 49-59, 1993
- 19) Tyagi SC, Kumar SG, Banks J, et al : Co-expression of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase in myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 2177-2189, 1995

- 20) Tyage SC : Extracellular matrix dynamics in heart failure: a prospect for gene therapy. *J Cell Biochem* 68 : 403-410, 1998
- 21) Zinn KR, Douglas JT, Smyth CA, et al : Imaging and tissue biodistribution of 99mTc-labeled adenovirus knob (serotype 5). *Gene-Ther* 5(6) : 798-808, 1998
- 22) Pauly DF, Johns DC, Matelis LA, et al : Complete correction of acid alpha-glucosidase deficiency in Pompe disease fibroblasts in vitro, and lysosomally targeted expression in neonatal rat cardiac and skeletal muscle. *Gene Ther* 5(4) : 473-480, 1998
- 23) Franz WM, Rothmann T, Frey N, et al : Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovasc Res* 35(3) : 560-566, 1997
- 24) Bowles NE, Wang Q, Towbin JA : Prospects for adenovirus-mediated gene therapy of inherited diseases of the myocardium. *Cardiovasc Res* 35(3) : 422-430, 1997
- 25) Ueno H, Li JJ, Masuda S, et al : Adenovirus-mediated expression of the secreted form of basic fibroblast growth factor (FGF-2) induces cellular proliferation and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11) : 2453-2460, 1997
- 26) Donahue JK, Kikkawa K, Johns DC, et al : Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 29 ; 94(9) : 4664-4668, 1997
- 27) Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, et al : Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 95(2) : 423-429, 1997
- 28) Rothmann T, Katus HA, Hartong R, et al : Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther* 3(10) : 919-926, 1996
- 29) Nuss HB, Johns DC, Kaab S, et al : Reversal of potassium channel deficiency in cells from failing hearts by adenoviral gene transfer: a prototype for gene therapy for disorders of cardiac excitability and contractility. *Gene Ther* 3(10) : 900-912, 1996
- 30) Murry CE, Kay MA, Bartosek T, et al : Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* 98(10) : 2209-2217, 1996
- 31) Villarreal FJ, Lee AA, Dillmann WH, et al : Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 28(4) : 735-742, 1996
- 32) Wang J, Ma Y, Knechtle SJ : Adenovirus-mediated gene transfer into rat cardiac allografts. Comparison of direct injection and perfusion. *Transplantation* 61(12) : 1726-1729, 1996
- 33) Kaplitt MG, Xiao X, Samulski RJ, et al : Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg* 62(6) : 1669-1676, 1996
- 34) Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, et al : Efficient gene transfer into cardiac myocytes using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J Mol Cell Cardiol* 30(7) : 1341-1348, 1998
- 35) Aoki M, Morishita R, Higaki J, et al : In vivo transfer efficiency of antisense oligonucleotides into the myocardium using HVJ-liposome method. *Biochem Biophys Res Commun* 231(3) : 540-545, 1997
- 36) Aoki M, Morishita R, Higaki J, et al : Survival of grafts of genetically modified cardiac myocytes transfected with FITC-labeled oligodeoxy-nucleotides and the beta-galactosidase gene in the noninfarcted area, but not the myocardial infarcted area. *Gene Ther* 4(2) : 120-127, 1997
- 37) Aoki M, Morishita R, Muraishi A, et al : Efficient in vivo gene transfer into the heart in the rat myocardial infarction model using the HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan)-liposome method. *J Mol Cell Cardiol* 29(3) : 949-959, 1997
- 38) Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, et al : A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element 'decoy' against NFkappaB binding site: evidence for a role of NFkappaB in ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 96(9 Suppl) : II-280-4 ; discussion II-285, 1997
- 39) Sayeed Shah U, Mann MJ, Martin J, et al : Complete reversal of ischemic wall motion abnormalities by combined use of gene therapy with transmyocardial laser revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(5) : 763-769, 1998
- 40) Sawa Y, Kaneda Y, Bai HZ, et al : Efficient transfer of oligonucleotides and plasmid DNA into the whole heart through the coronary artery. *Gene Ther* 5(11) : 1472-1480, 1998
- 41) Prentice H, Kloner RA, Li Y, et al : Ischemic/reperfused myocardium can express recombinant protein following direct DNA or retroviral injection. *J Mol Cell Cardiol* 28(1) : 133-140, 1996
- 42) Martens JR, Reaves PY, Lu D, et al : Prevention of renovascular and cardiac pathophysiological changes in hypertension by angiotensin II type 1 receptor antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5) : 2664-2669, 1998
- 43) Prentice H, Bishopric NH, Hicks MN, et al : Regulated expression of a foreign gene targeted to the ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 35(3) : 567-574, 1997
- 44) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al : Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98(25) : 2800-2804, 1998

- 45) Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, et al : Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant* 7(3) : 239-246, 1998
- 46) Leor J, Patterson M, Quinones MJ, et al : Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 94(9 Suppl) : II332-336, 1996
- 47) Pellegrini C, O'Brien T, Yap J, et al : Systematic evaluation of distribution of transgene expression after adenovirus-mediated gene transfer to the transplanted heart. *Transplantation* 11(5) : 373-377, 1998
- 48) Wright MJ, Rosenthal E, Stewart L, et al : beta-Galactosidase staining following intracoronary infusion of cationic liposomes in the in vivo rabbit heart is produced by microinfarction rather than effective gene transfer: a cautionary tale. *Gene Ther* 5(3) : 301-308, 1998
- 49) Dalesandro J, Akimoto H, Gorman CM, et al : Gene therapy for donor hearts: ex vivo liposome-mediated transfection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111(2) : 416-421 ; discussion 421-422, 1996
- 50) Labhasetwar V, Bonadio J, Goldstein S, et al : A DNA controlled-release coating for gene transfer: transfection in skeletal and cardiac muscle. *J Pharm Sci* 87(11) : 1347-1350, 1998