

遺伝子導入法としてのポリフェクション  
— $\alpha$ -シクロデキストリンを基本素材とする高機能性遺伝子導入用ベクターの  
構築を中心として—

有馬 英俊

Polyfection as Nonviral Gene Transfer Method  
—Design of Novel Nonviral Vector Using  $\alpha$ -Cyclodextrin—

Hidetoshi ARIMA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi,  
Kumamoto 862-0973, Japan

(Received March 25, 2004)

Due to the growing concerns over the toxicity and immunogenicity of viral DNA delivery systems, DNA delivery via nonviral routes has become more desirable and advantageous. In particular, polycation complexes with DNA (polyplex) are attractive nonviral vectors. To design novel polycationic vectors, we prepared polyamidoamine starburst dendrimer (dendrimer) conjugates with three cyclodextrins (CDE conjugates) and three generations (G2, G3, and G4) of dendrimers. Of seven CDE conjugates, an  $\alpha$ -CDE conjugate (G3) with an average degree of substitution (DS) of  $\alpha$ -CyD of 2.4 [ $\alpha$ -CDE conjugate (G3, DS 2.4)] showed greater gene transfer activity than dendrimers and other  $\alpha$ -CDE conjugates with less cytotoxicity. These results suggest the potential use of  $\alpha$ -CDE conjugate (G3, DS 2.4) as a polycationic vector *in vitro* and *in vivo*. Herein, I review a recent polyfection method, with special focus on  $\alpha$ -CDE conjugate (G3, DS 2.4).

**Key words**—nonviral vector; polyfection; cyclodextrin; dendrimer

## 1. はじめに

わが国では「遺伝子治療臨床研究に関する指針」が2002年4月より施行され、今後の遺伝子治療臨床研究はこの指針に従って実施されることとなった。これまで遺伝子治療臨床研究を行った機関は18施設にのぼり、アデノシンデアミナーゼ欠損症、がん（腎がん、肺がん、乳がん、食道がん、悪性グリオーマ、前立腺がん、再発性白血病、神経芽腫、進行性悪性黒色腫）、X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）、閉塞性動脈硬化症を対象に実施された。これらプロトコルで用いられた遺伝子導入法は、レトロウイルスベクター（6例）、アデノウイルスベクター（9例）、正電荷リポソーム（2例）、naked DNA（1例）であり、ウイルスベクターを用

いた例が圧倒的に多い。この傾向は世界レベルでも同様であり、これまで実施された400を超える遺伝子治療臨床研究プロトコルのうち、その約7割はウイルスベクターを用いたものであり、以下、naked DNA法（14.4%）、リポフェクション法（9.3%）と続く。しかしながら、これらの遺伝子治療の中には有効例も知られているが、それらの多くは十分な治療効果を上げることができず、いくつかの技術的問題に直面している。特に、遺伝子を細胞に効率よく、かつ安全に送達させるデリバリー技術の未熟さが指摘されている。

遺伝子を細胞及び組織に送り込む方法は *in vivo* 法及び *ex vivo* 法に分類され、<sup>1)</sup> 導入時にウイルスを用いるか否かによって、ウイルス法及び非ウイルス法に大別される。<sup>2)</sup> また最近、染色体ベクターやミトコンドリアを用いた遺伝子導入法が開発され注目されている。<sup>3)</sup> ウイルス法にはレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、パキテロウイルス、ヒト単純ヘルペスウイルス、レンチウイル

熊本大学大学院医学薬学研究部・総合医科学部門薬物治療設計学講座・製剤設計学分野（〒862-0973 熊本市大江本町5-1）

e-mail: arimah@gpo.kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成15年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ス,<sup>4)</sup> パルボウイルス,<sup>5)</sup> 泡沫状ウイルス,<sup>6)</sup> シンドビスウイルス,<sup>7)</sup> アルファウイルス<sup>8)</sup>などが知られるが、これらはウイルスに備わる細胞への高感染性によりその高い遺伝子導入効率が利点である。<sup>6)</sup>しかしながら、ウイルスベクターは、ウイルスタンパクに由来する免疫反応を惹起すること、ベクター中から増殖能力を有するウイルスを完全には除去する保証が得られないこと、さらに導入遺伝子を含むウイルスゲノムを染色体に組み込む際に他の遺伝子発現に影響を与える可能性があること、などの問題点が懸念されていた。<sup>9)</sup> 実際、1999年米国ペンシルバニア大学でアデノウイルスによる遺伝子治療を受けた患者がベクターの大量投与が原因で死亡する事故が起こった。<sup>10)</sup> また、フランスでは2002年、レトロウイルスベクターを用いて治療を受けた患者2名に、細胞のがん化・白血病の発症が疑われた。<sup>11)</sup> さらに、米国では患者の精子中に治療で使用されたウイルスベクターが検出され、導入された遺伝子が継承される可能性が危惧された。<sup>12)</sup> 最近、フランスで起こった副作用は極めて稀有の事例であるとの指摘もあるが、<sup>13)</sup> これらの副作用事例は、ウイルスベクターの安全性はかなり高いが、万全ではないことを示唆するものである。

非ウイルスベクター法はプラスミド DNA (pDNA) のみを用いた方法とキャリアを用いる方法に大別される。pDNA のみを用いた方法として、骨格筋注射法、カテーテル法、ハイドロダイナミック法、エレクトロポレーション法、ウルトラサウンド法、ジーンガン法、臓器表面投与方法などが知られている。一方、キャリアを用いる方法は、カチオン性脂質、リポソーム (カチオン性、膜融合、pH 感受性など)、カチオン性ポリマー、カチオン性ペプチド、イムノポーター、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、赤血球ゴーストなどを用いた方法が知られている。<sup>14)</sup> キャリアを用いた方法は、pDNA との複合体を容易に作成できること、感染性や病原性を有する物質を含まないこと、糖鎖やタンパク質などのリガンドの導入により特定部位へのターゲティングが可能になるなどの利点を有し、基礎研究分野では汎用されている。しかし、非ウイルスベクターは遺伝子発現効率が低く、発現も一過性であると言う欠点を有するため、これらの改善が望まれている。現在、非ウイルスベクター法として、

pDNA とカチオン性ポリマーとの複合体 (ポリプレックス) を用いるポリフェクション法<sup>15)</sup> と pDNA とカチオン性脂質との複合体 (リポプレックス) を用いるリポフェクション法、<sup>16)</sup> 並びにこれらを組み合わせたりポポリフェクション法<sup>17)</sup> などが知られている。ポリフェクション法はリポフェクション法より 10 年以上長い歴史を有するにも関わらず、<sup>18,19)</sup> 2004 年 1 月現在、リポフェクション法は遺伝子治療臨床プロトコル中の約 9.3% を占めているのに対して、ポリフェクション法の実施例は報告されていない。しかしながら、ポリフェクション法はリポプレックス法に比べて 1) 均一かつ安定な複合体を形成する、<sup>20)</sup> 2) 遺伝子導入効率に優れる、<sup>21,22)</sup> 3) 血清の影響を受けにくいことなどの利点を有し、<sup>15)</sup> 新規遺伝子用キャリアとしての期待が高まっている。

このような背景のもと、われわれは新規ポリフェクション用キャリアとして、ポリアミドアミン (PAMAM) スターバースト dendrimer<sup>23)</sup> と環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CyD)<sup>24)</sup> との結合体 (CDE 結合体) (Fig. 1) の構築を行い、遺伝子導入用キャリアとしての有用性評価に関する検討を行った。本総説では、筆者らの研究成果を中心に、ポリフェクション法の現状と最近の話題について紹介する。

## 2. ポリフェクション法の現状

これまで数多くのポリプレックスを形成するカチオン性ポリマーが報告されている。それらはヒストン、<sup>25)</sup> カチオン性アルブミン、<sup>26)</sup> キトサン<sup>27)</sup> といった天然素材からプロタミン、<sup>28)</sup> ポリ-L-リジン (PLL)、<sup>29)</sup> ポリ-L-オルニチン、<sup>30)</sup> ポリ (4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)<sup>31)</sup> などのペプチド、ポリエチレンイミン (PEI)、<sup>14)</sup> ポリプロピレンイミン、<sup>32)</sup> PAMAM スターバースト dendrimer、<sup>33)</sup> ポリエチレングリコール/ポリ-L-リジブロックポリマー、<sup>34)</sup> ポリ ( $\beta$ -アミノエステル)、<sup>35)</sup> ポリ乳酸/ポリグリコール酸、<sup>36)</sup> 2-ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド<sup>37)</sup> などの合成ポリマーなど多岐に渡る。特に、PEI については遺伝子導入能の改善、細胞障害性の軽減、標的指向性などを付与する研究が活発に行われている。<sup>38,39)</sup>

非ウイルスベクターによる遺伝子導入効率を決定付ける因子として、1) pDNA のコンパクション

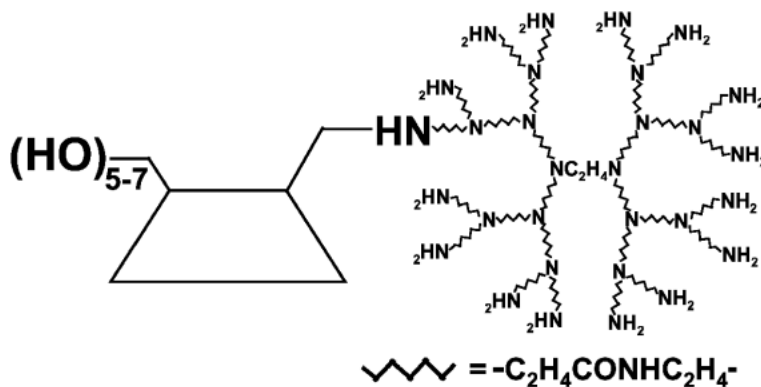


Fig. 1. Chemical Structure of CDE Conjugate (G2)

ン,<sup>40)</sup> 2) 細胞外における pDNA の酵素安定性 (血清の影響),<sup>41)</sup> 3) 細胞への pDNA 会合,<sup>42)</sup> 4) エンドソームからの pDNA の脱出,<sup>43)</sup> 5) 細胞内における pDNA の酵素安定性,<sup>44)</sup> 5) pDNA の細胞質から核への移行,<sup>45)</sup> 6) pDNA の核膜透過,<sup>46)</sup> 7) 核内における pDNA のベクターからの遊離,<sup>47)</sup> 8) pDNA のメチル化やヒストン脱アセチル化,<sup>48)</sup> 9) pDNA の核内分布,<sup>49)</sup> 10) キャリアや pDNA 複合体の転写・翻訳過程への影響,<sup>50)</sup> 11) 免疫反応<sup>51)</sup>などが考えられている。遺伝子導入に際してこれら因子のどれが律速段階になるかはキャリアの種類や細胞、実験条件によって異なると考えられる。最近、Bieberらはポリフェクション法による遺伝子発現を期待する場合、エンドソームからの pDNA の脱出が律速段階であると報告している。<sup>52)</sup> そこでわれわれはこのステップの改善を企図して以下の検討を行った。

### 3. $\alpha$ -CDE 結合体の構築

カチオン性ポリマーの中で、PAMAM スターバースト dendrimer ( dendrimer ) は、アンモニアあるいはエチレンジアミンをコア分子とし、そのアミノ基にマイケル付加反応でアクリル酸メチル及びエチレンジアミンを付加し、この反応を繰り返すことによって得られる高度に分枝した樹状構造を特徴とし、その末端に多数の一級アミノ基を有する新しいタイプの合成ポリマーである。<sup>53)</sup> これら dendrimer は負に帯電した核酸と静電的に相互作用し、遺伝子<sup>54)</sup>やアンチセンス核酸<sup>55,56)</sup>のキャリアとして注目を集めている。特に高い generation を有する dendrimer は末端アミノ基数が多いため、pDNA との相互作用が強く、かつプロトンスポンジ効果によりエンドソームから pDNA を効率よく

遊離させるため、<sup>57)</sup> 優れた遺伝子導入効果を有することが知られている。しかし、dendrimer は generation が増大するにつれて細胞毒性も強くなることから、<sup>32)</sup> 低い generation の dendrimer に化学修飾を施すことにより、高い遺伝子導入効果と低い細胞毒性の両者を併せ持つ dendrimer 誘導体の開発を試みた。

環状オリゴ糖である CyD は比較的高濃度において赤血球を溶血させ、<sup>58,59)</sup> また生体に適用後、生体膜構成成分との包接複合体形成により膜統合性の低下を惹起し、膜透過性の低い薬物の透過性を向上させる。<sup>60,61)</sup> さらに細胞生物学や免疫学的分野では、CyD のメチル化体であるメチル- $\beta$ -CyD が細胞膜状の脂質マイクロドメインからコレステロールを選択的に遊離させ、<sup>62,63)</sup> 脂質ラフトやカベオラの機能を阻害することが数多く報告されている。<sup>64)</sup> また、最近では親水性 CyD がアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率を改善し、<sup>65)</sup> アンチセンス核酸の細胞内導入を増大する<sup>66)</sup> という報告例もある。しかしながら、これら親水性 CyD 誘導体は pDNA との相互作用が極めて弱く、また遺伝子やアンチセンス核酸の細胞内導入能力も低いため、CyD を pDNA の効果的なキャリアとして用いるには CyD 自身に対して何らかの化学修飾が必要となる。

これらの背景から、われわれは遺伝子導入効率が高く、かつ細胞障害性の弱い非ウイルスベクターの構築を企図して、CyD と dendrimer との結合体 (CDE 結合体) を新規に合成した。この dendrimer と CyD に期待される役割はそれぞれ pDNA との複合体化・細胞表面との静電的相互作用及び細胞膜との相互作用である。なお最近、Davis らはカチ

オン性  $\beta$ -CyD ポリマー及び  $\gamma$ -CyD ポリマー及びガラクトースやトランスフェリン修飾 CyD 含有ポリマーを新規に合成し、それらが高い遺伝子導入能を有することを報告している。<sup>67-75)</sup>

まずわれわれは generation 2 (G2) のデンドリマーと  $\alpha$ -CyD,  $\beta$ -CyD 又は  $\gamma$ -CyD とのモル比 1:1 結合体を調製し、これらの遺伝子導入能をマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 及びマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞にトランスフェクション後のルシフェラーゼ活性を測定し評価した。その結果、特に  $\alpha$ -CyD との結合体 ( $\alpha$ -CDE 結合体) はデ

ンドリマー単独に比較し約 100 倍高い遺伝子導入能を示した (Fig. 2).<sup>76)</sup>

次に、デンドリマーの generation の影響を検討した結果、NIH3T3 細胞及び RAW264.7 細胞において、pDNA と  $\alpha$ -CDE 結合体 (G3) との複合体の遺伝子導入効率が最も高いことを明らかにした (Fig. 3(A)).<sup>77)</sup> さらに、 $\alpha$ -CDE 結合体 (G3) 中の  $\alpha$ -CyD の平均置換度 (DS) の影響について検討したところ、DS 1.1, 2.4, 5.4 体の中で、 $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) はチャージ比 200/1 及び 400/1 で他の  $\alpha$ -CDE 結合体及び TransFast™ よりも高い遺

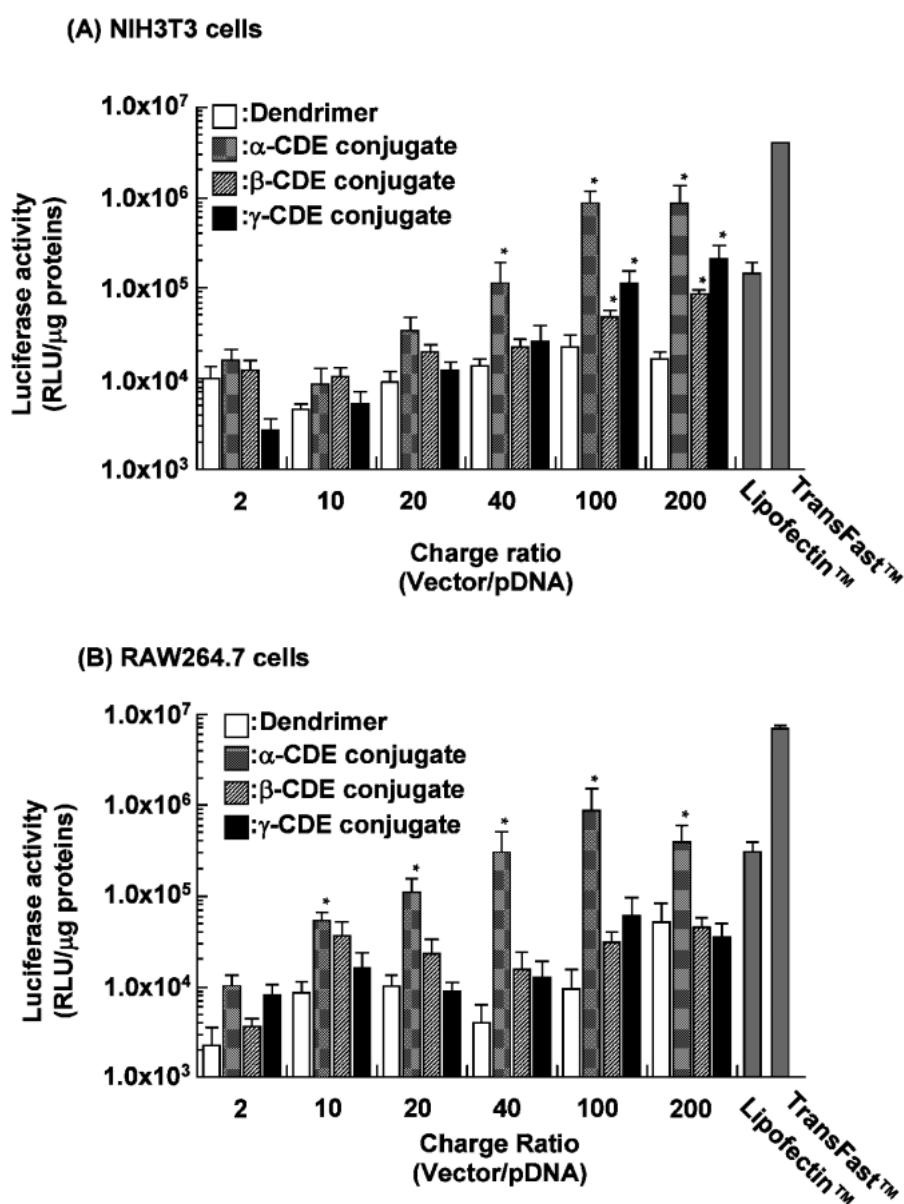


Fig. 2. Gene Transfer Activity of Dendrimer (G2), CDE Conjugates (G2), Lipofectin™ or TransFast™ at Various Charge Ratios in NIH3T3 Cells (A) and RAW264.7 Cells (B)

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 5-11 experiments. \* $p$ <0.05, compared with dendrimer alone.

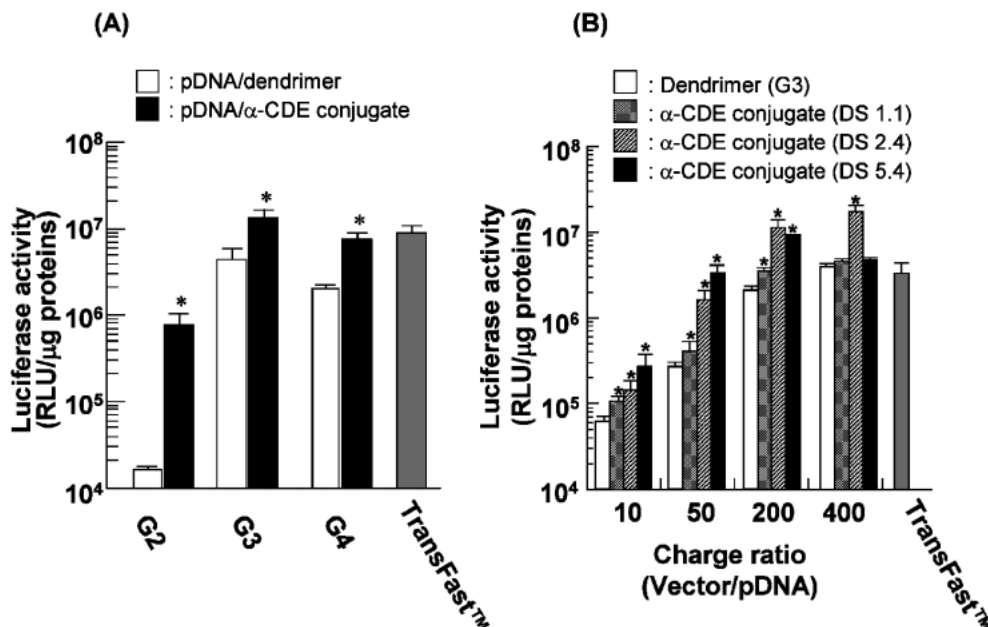


Fig. 3. (A) Gene Transfer Activity of Dendrimers (G2, G3 and G4) or  $\alpha$ -CDE Conjugates (G2, G3 and G4) at Charge Ratio of 200/1 (vector/pDNA) in NIH3T3 Cells and (B) Gene Transfer Activity of Dendrimer (G3) and  $\alpha$ -CDE Conjugates (G3, DS 1.1, 2.4 or 5.4) in NIH3T3 Cells

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 (A and B) experiments. \* $p < 0.05$ , compared with dendrimer alone.

伝子発現が得られることを確かめた (Fig. 3(B)).<sup>78)</sup> *In vivo* 実験において pDNA/ $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) 含有懸濁液をマウスの尾静脈から投与し 12 時間後の各臓器中における遺伝子発現は脾臓で著しく高く、続いて肝臓で高いことを明らかにした。また、投与 12 時間において、 $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) はデンドリマーや他の  $\alpha$ -CDE 結合体よりも脾臓において有意に高い遺伝子発現を示した。<sup>78)</sup> 以上のような CDE 結合体の構造最適化検討の流れを Fig. 4 に示す。

この  $\alpha$ -CDE 結合体の優れた遺伝子発現機構として、pDNA の細胞内トラフィック変化によるものと推定している。その理由として、CDE 結合体と pDNA との複合体の物理化学的性質 (粒子系、ゼータ電位、電気泳動度、pDNA コンパクション、酵素安定性) 並びに細胞会合性はいずれの CyD 結合体の場合も、デンドリマー系と差異は認められなかったこと、 $\alpha$ -CDE 結合体と pDNA との複合体をトランスフェクション後の細胞質中における pDNA 量がデンドリマー系に比べて高いことが挙げられる (Fig. 5)。一般に、CyD は空洞径依存的な包接特性を示し、生体膜成分に対して  $\alpha$ -CyD 及び  $\beta$ -CyD はそれぞれリン脂質及びコレステロー

ルと強く相互作用し、 $\gamma$ -CyD との相互作用は弱い。<sup>59)</sup> また、細胞膜コレステロール含量は細胞膜が最も高く細胞内部ほど低下する。<sup>79)</sup> これらのことを総合的に考えると、本研究において 7 種の CDE 結合体の中で、 $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) が最も優れた遺伝子導入効果を示したのは、 $\alpha$ -CDE 結合体が後期エンドソームに作用して pDNA のエンドソームから細胞質へのリリースを増大させたことに起因するものと推定される (Fig. 5)。今後、後期エンドソームにコレステロールが蓄積する Niemann-Pick Type C (NPC) 細胞<sup>80)</sup> などを用いて、CDE 結合体による遺伝子導入効果とエンドソーム膜との相互作用についてより詳細な検討を行う予定である。一方、 $\alpha$ -CDE 結合体と pDNA との複合体をマウスに静脈内投与後、脾臓において高い遺伝子発現を示した理由は明らかではない。現在のところ、複合体の粒子径 (約 600 nm) やゼータ電位 (約 20 mV) などの物理化学的性質、注入量 (500  $\mu$ l)、注入スピード (1 min) などが関与しているものと推察される。なお、本注入法は全血量と同量の DNA 含有溶液を数秒で投与するハイドロダイナミックインジェクション法<sup>81)</sup> とは異なることを付記したい。

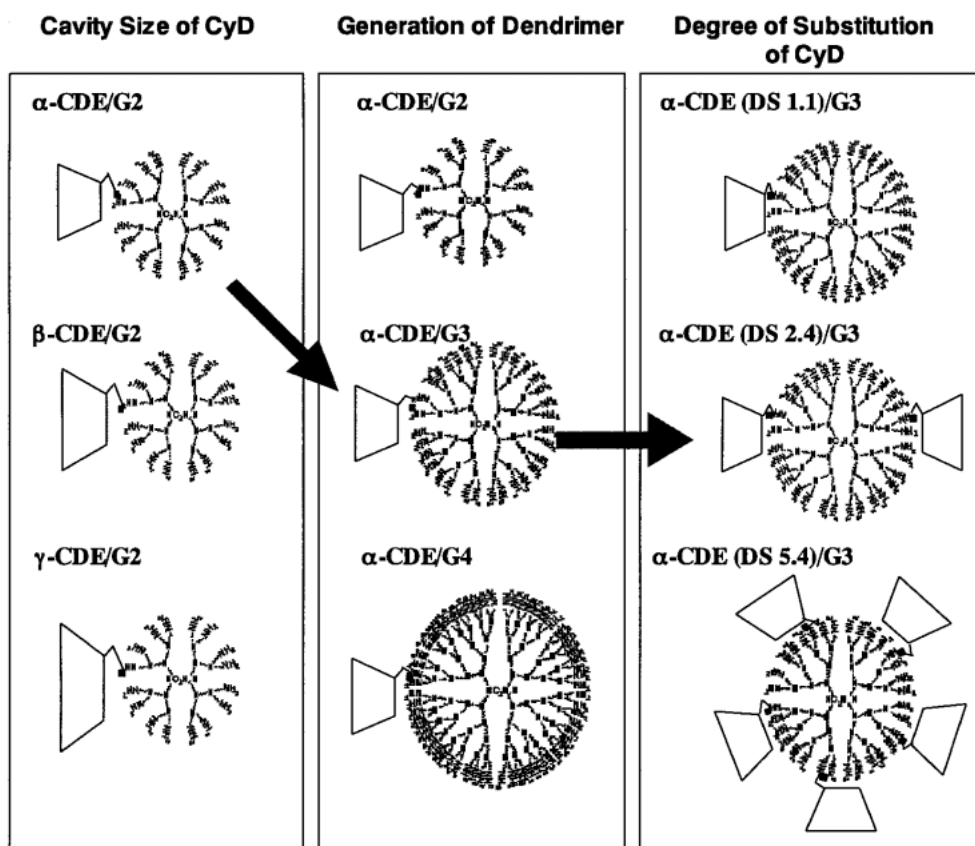


Fig. 4. Molecular Design of CDE Conjugates as a Gene Transfer Vector

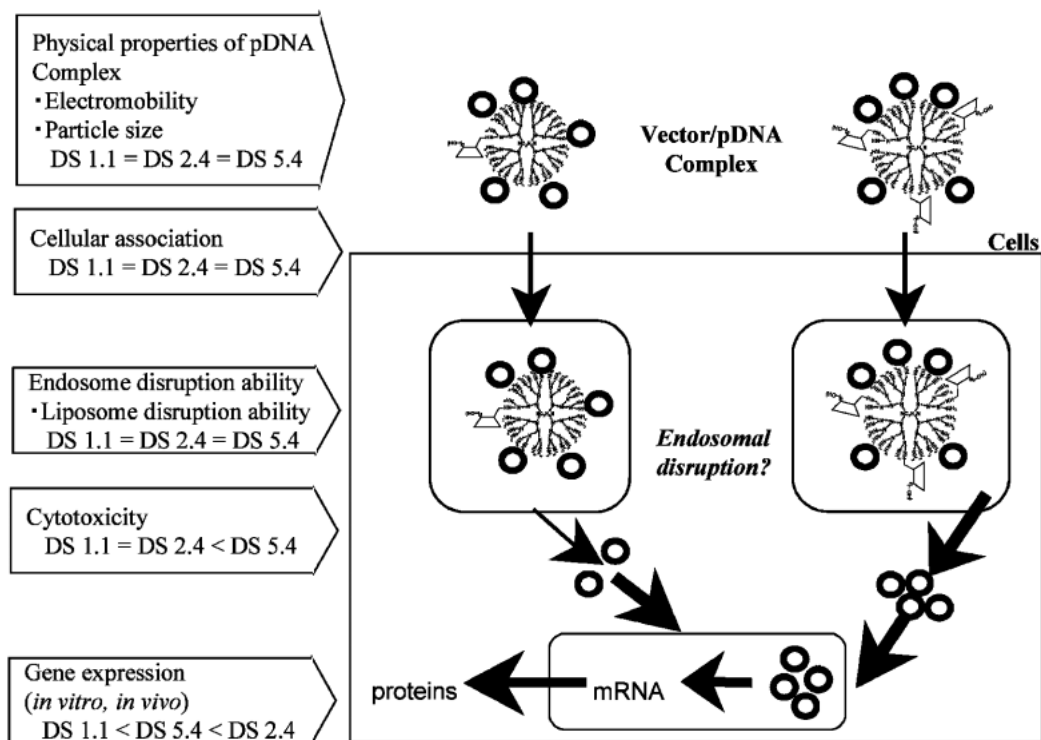


Fig. 5. Proposed Scheme of Gene Transfer Activity of  $\alpha$ -CDE Conjugates

ポリプレックスの細胞障害性は遺伝子発現効率に大きな影響を与える。<sup>82-84)</sup> カチオン性リポソームは B 細胞やマクロファージにアポトーシスを惹起するが、<sup>85,86)</sup> カチオン性ポリマーの詳細な細胞障害機構は明らかではない。一方、 $\alpha$ -CDE 結合体の細胞障害性は dendri-mer と同様に generation 及び  $\alpha$ -CyD の置換度が増大するにつれ上昇することが明らかとなった。<sup>78)</sup> このことは、分子中のカチオン及び  $\alpha$ -CyD が細胞成分と相互作用することを示唆している。 $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) の細胞障害性は遺伝子導入を行う条件では特に問題にならないが、今後、より安全性に優れたキャリアを構築するためには、生分解性の付与など、蓄積性の少ない、生体適合性に優れた分子設計が必要であろう。

以上の結果から、本研究で調製した 7 種の CDE 結合体の中で、 $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) の遺伝子導入能及び遺伝子導入できた細胞数は、特に高チャージ比領域にて他の CDE 結合体だけでなく、市販の遺伝子導入試薬である Lipofectin<sup>TM</sup> や TransFast<sup>TM</sup> よりも優れ、かつ細胞障害性も極めて弱いことを明らかにした。現在、われわれは small interfering RNA (siRNA) 用キャリアとしての  $\alpha$ -CDE 結合体 (G3, DS 2.4) の有用性を明らかにしつつある (投稿準備中)。

#### 4. ポリフェクション法の改良に関するトピック

先に述べたようにポリフェクション法による遺伝子発現には多くのステップが関与する。例えば、遺伝子導入効率はキャリアの種類、細胞の種類、pDNA 量、キャリアと pDNA 複合体の電荷比、血清の有無、細胞機能に対する阻害剤の存在など様々な因子によって影響を受ける。<sup>87)</sup> そこで、ポリフェクション法による遺伝子導入効率に影響を与える要因の中で最近のトピックについてわれわれの知見を交えながら紹介する。

**4-1. pDNA のコンパクション** 非ウイルスベクター/pDNA 複合体の大きさや形態は細胞表面分子との相互作用<sup>88)</sup> や細胞内取り込み<sup>89)</sup> に大きな影響を与える。リポフェクション法及びポリフェクション法による外来遺伝子の発現の増大に pDNA のコンパクションは正に作用するとの報告が多く、<sup>90)</sup> 後者の効果は前者に比して強い。<sup>91)</sup> しかしながら、われわれは糖鎖修飾  $\alpha$ -CDE 結合体が pDNA と複合体は形成するがコンパクションを全く惹起しない条件

で、pDNA のコンパクションを誘導する  $\alpha$ -CDE 結合体よりも著しく高い遺伝子発現を示すことを明らかにしている (投稿準備中)。同様に、Bergan らは pDNA のスーパーコイル形成の程度は *in vitro* や *in vivo* における遺伝子導入効率に大きな影響を与えないというわれわれの結果を支持する知見を報告した。<sup>92)</sup> また、カチオン性ポリマーと pDNA との強固な複合体形成は逆に遺伝子発現を抑制する。<sup>50)</sup> したがって、遺伝子発現に対して至適なコンパクションの程度が存在し、また、外来遺伝子の発現に対してキャリアと pDNA と複合体の形成は必須であるが、コンパクションは必ずしも必須でないことや遺伝子導入に関する律速段階はキャリアの種類によって異なるものと考えられる。

**4-2. 細胞内取り込み：ヘパラン硫酸の関与** 通常、外来遺伝子を細胞内で発現させるためには遺伝子を細胞内に取り込ませ、核まで移行させる必要がある。その最初のステップは細胞内取り込み過程であるが、pDNA を介した遺伝子導入の場合、少なくとも  $10^5$  コピーが取り込まれる必要がある。カチオン性ポリプレックスの細胞表面への吸着は硫酸基やカルボキシル基などのアニオン性分子との静電的相互作用によって生じ、グリコサミノグリカン (GAG) の関与が明らかにされている。<sup>93,94)</sup> 最近、GAG の中でヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の意外な役割に対して関心が集まっている。<sup>95)</sup> すなわち、HSPG であり、かつ GPI アンカー型タンパク質であるグリピカン、ポリプレックスと結合後、細胞膜表面でアセンブリーし、カベオラを介して細胞内に取り込まれ、グリピカン分子中に存在する核移行シグナル (KRRR [G/A]K) の働きによりポリプレックスとともに核内に移行すると報告された。<sup>96)</sup> また最近、HIV 由来の Tat タンパクが HSPG に結合すること、ラフト依存的マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが報告された。<sup>97)</sup> これらの知見は、ポリプレックスが HSPG (グリピカン) と結合後、脂質マクロドメインを介して取り込まれ、核内まで移行することを示しており、非常に興味深い。

**4-3. エンドサイトーシス経路** 最近、様々なエンドサイトーシス経路が明らかになってきた。<sup>98-100)</sup> 最も研究が進んでいる経路はクラスリン依存性エンドサイトーシスであるが、この経路はレ

クチンやレセプター依存的なエンドサイトーシスにおいて大きな役割を担っている。<sup>100)</sup> 最近, コレステロールやスフィンゴ糖脂質を豊富に含む脂質マイクロドメインが存在し, リピッドラフト依存的マクロピノサイトーシスやカベオラ依存的エンドサイトーシス (ポトサイトーシス) の存在が明らかとなった。<sup>101)</sup> さらに, 液性ピノサイトーシス,<sup>102)</sup> ファゴサイトーシス,<sup>103)</sup> マクロピノサイトーシス,<sup>104)</sup> 非クラスリン・非カベオラエンドサイトーシス (RhoA 依存性),<sup>105)</sup> GPI アンカー型タンパク質選択的エンドサイトーシス<sup>106)</sup> などが知られている。前述のように, エンドソームから細胞質への pDNA のリリースは遺伝子導入効率を考える上で非常に重要なステップであるが, クラスリン依存的エンドサイトーシス細胞内小胞とカベオラ・ラフト依存的エンドサイトーシス細胞内小胞の膜の脂質組成は細胞表面の場合と同様に異なることや両小胞の細胞内輸送も異なることが報告されている。<sup>107,108)</sup> 一方, ポリプレックスのエンドサイトーシス経路の選別は, 複合体のサイズや付与されたりガンドの種類・量に従うことが報告されている。例えば, サイズの小さなリポプレックス (200 nm 以下) はクラスリン依存的な経路で, 一方, サイズの大きなリポプレックス (500 nm) はクラスリン非依存的な経路でエンドサイトーシスされる。<sup>109)</sup> 細胞特異的な遺伝子導入に利用されるリガンドに関しては, EGF, トランスフェリン, アシアロ糖タンパク質はクラスリン依存性, コレラトキシン B サブユニット, 葉酸, SV40, AMF-R はラフト/カベオラ依存的, マンノースや抗体 (Fc 介在性) はファゴサイトーシスによってエンドサイトーシスされることが知られている。<sup>98,99,101)</sup> しかし, これらの振り分けは一義的に決定されるものではなく, 細胞の種類やリガンドの結合様式・結合量などによって微妙に変化する。また, TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  が細胞表面に結合後のシグナル伝達が, レセプターのラフト (カベオラ) 及び非ラフト画分への局在によって異なることが報告されている。<sup>110,111)</sup> いずれにせよ今後, 遺伝子デリバリーを考える際には, エンドサイトーシス機構 (エンドソームの膜組成, 小胞輸送経路) の違いについても十分考慮する必要がある。

**4-4. エンドソーム/リソソームの回避** エンドソーム/リソソームには DNase が存在し, 外来遺

伝子の分解に寄与するため, それら細胞内小胞・小器官から細胞質・核への pDNA の遊離に関してこれまで多くのストラテジーが提唱されてきた。<sup>112)</sup> 基本的にはエンドソームやライソソーム膜に対する破壊効果又は膜融合効果に大別されるが, これらの効果を与えるため, 膜融合性脂質 (ヘルパー脂質 DOPE),<sup>113)</sup> pH 感受性脂質,<sup>114)</sup> 膜融合性ペプチド (H2 ペプチド, GM225.1),<sup>115,116)</sup> カチオン性脂質,<sup>117)</sup> プロトンスポンジ効果誘発性ポリマー (PEI, デンドリマー),<sup>118,119)</sup> 小胞内 pH 調節剤 (クロロキン, ポリビニルピロリドン),<sup>120,121)</sup> アデノウイルス粒子,<sup>122)</sup> CyD<sup>76)</sup> などが利用されている。最近, 1) エンドソームは, リサイクリング経路, トランスサイトーシス経路, リソソーム経路, ゴルジ体経路, 小胞体経路などにより形質膜や様々な細胞内小器官に輸送されること,<sup>123)</sup> 2) 細胞内小器官である小胞体やリソソームが細胞形質膜と融合しファゴサイトーシスなどに関与すること,<sup>124)</sup> 3) 内因性物質だけでなく, ある種の細菌など外因性物質の分解にオートファジー経路が関与すること<sup>125)</sup> などが明らかにされた。このようにエンドサイトーシス経路やエンドソームの細胞内経路が多様であることに加えて, 病態時にはこれらの輸送経路が変化することなどを考え合わせると, エンドソーム/リソソーム経路は未知の部分も多く, その克服のためには, 今後より詳細な検討が必要である。

**4-5. 細胞質における pDNA の安定性と移動速度** エンドソーム/リソソームには DNase が存在し, 外来遺伝子の分解に寄与している。<sup>44)</sup> 実際, リソソームに存在する DNase II に対する阻害剤の添加により遺伝子発現が増大する。<sup>126)</sup> 一方, 最近 pDNA は細胞質に存在する DNase により分解を受けることが報告された。例えば, HeLa 細胞や COS-1 細胞では細胞質にマイクロインジェクションされた pDNA の半減期は約 50—90 分であること,<sup>127)</sup> C2C12 細胞では約 4 時間であることが報告されている。<sup>128)</sup> したがって, 細胞内における pDNA の酵素安定性も遺伝子導入効率に関与する重要な因子であろう。ポリプレックス及びリポプレックス形成は pDNA の細胞内での酵素安定性を顕著に増大することが知られている。<sup>129)</sup> また, リポプレックスに比べてポリプレックスが高い遺伝子発現を示すのは, 後者の場合, 安定な複合体を形成し



て大きな酵素耐性が得られたものと推定される。一方、巨大分子である pDNA (約 2000 kDa 以上) の細胞質における移動速度は非常に小さいことが報告されている。<sup>130)</sup> また、細胞質内における物質の移動が拡散によると仮定すると、ポリプレックス形成に伴う分子サイズの増大は移動速度をさらに低下させ、細胞質内への滞留時間の増大へとつながる。これらは酵素耐性・細胞質内移動速度の両者の兼ね合いにより遺伝子発現が規定されることを示し、今後のキャリアの開発に有益な示唆を与えるものである。

**4-6. 核移行性：グリコフェクション** pDNA の核内移行に対して核膜は非常に強固なバリアとして働き、細胞質から核内へ移行し転写に供される pDNA の割合は 0.1—0.001% と報告されている。<sup>131)</sup> pDNA の移行性改善のために、pDNA やキャリアに SV40 T 抗原や HIV Tat 由来の核移行シグナル (NLS) を付与した例が知られている。<sup>132,133)</sup> また、最近では転写因子との複合体形成による核へのデリバリー法も報告されている。<sup>134)</sup> このように NLS を利用した核膜透過は、温度、エネルギー、wheat germ agglutinin (WGA) 依存的であり、importin- $\alpha$  や importin- $\beta$  を介した能動輸送である。このような NLS を利用した方法は、非分裂細胞においても pDNA を核内に導入できる点で注目される。一方、糖鎖が核内移行シグナル (NLS) として作用する可能性が最近、報告された。<sup>135)</sup> すなわち、核膜には 2 つの C-type レクチン (CBP22, CBP70) が発現していること、HeLa 細胞において親 BSA は核膜を透過しないのに対して、グルコシル化、マンノシル化、フコシル化 BSA は核内に移行できること、さらにグリコフェクション法では、しばしば遺伝子発現と pDNA 複合体の取り込みが正の相関を示さないことが主な根拠となっている。実際、われわれは  $\alpha$ -CDE 結合体にマンノースやガラクトースを結合させた糖修飾体は細胞表面のガラクトース又はマンノースレセプターの発現の有無に依存せず、いずれの細胞においても高い遺伝子導入効果を示すことを明らかにした (投稿準備中)。今後、糖修飾ポリプレックスの核移行特性の程度などについての検証が必要であるが、核膜は非分裂細胞への遺伝子導入に対して強固なバリアとなるため、研究の進展が期待される。また、最近、核膜にエンドサイトーシスに参与する分子が存在すること、核内にイ

ンジェクションされた pDNA がスプライソソームに移行することなど、興味深い知見が学会レベルで報告されている。このように pDNA 又はポリプレックスの核膜透過や核内分布に関してはいまだ不明な点が多く、今後の研究の発展に期待したい。

**4-7. In vivo デリバリー** 非ウイルスベクターによる *in vivo* デリバリー法には、ポリプレックス法、リポプレックス法、naked DNA 法が知られている。<sup>136)</sup> また、投与方法 (全身、局所)、投与剤形 (溶液、懸濁液、乳剤、マイクロパーティクル、金コロイドなど) によっても分類される。これら非ウイルスベクターによる *in vivo* 遺伝子デリバリーはウイルスベクターに比べて遺伝子導入細胞数、遺伝子発現量、遺伝子発現の持続などが劣るものと考えられてきた。特に、神経細胞などの非分裂細胞、リンパ球 (T 細胞, B 細胞) への導入効率は低く、キャリアへの NLS 導入<sup>134)</sup> や T 細胞の場合、IL-2 持続刺激下でのトランスフェクション<sup>137)</sup> などの工夫が行われている。しかしながら、リコンビナントタンパク質製剤の過剰投与の場合と同様に遺伝子産物の種類によっては発現量が高すぎると副作用を惹起する可能性がある。また、サイトカインなど発現量が低くても有効な治療効果を発揮する場合もあり、<sup>138)</sup> 疾病原因遺伝子のタイプによって用いるベクターや投与方法並びに投与剤形について考慮する必要がある。リポプレックス及びポリプレックスを用いた *in vivo* 全身遺伝子導入に際して、プラス荷電の複合体を静脈内に投与すると血球成分との相互作用や非特異的な遺伝子発現が見られることから、アニオン性ポリエチレングリコールやアニオン性多糖をコートした中性荷電の複合体の *in vivo* 投与が期待されている。<sup>139—141)</sup>

組織・細胞特異的な遺伝子の送達は、導入の効率化や副作用の軽減につながることから多くの研究が行われている。<sup>142)</sup> 組織・細胞特異的な遺伝子送達法として、腫瘍細胞 (トランスフェリン, 葉酸, EGF), 肝実質細胞 (アシアロ糖タンパク, ガラクトース, ラクトース, 肝炎ウイルス表面タンパクなど), クッパー細胞・マクロファージ (マンノース) を利用する方法がよく知られている。<sup>142—146)</sup> また、標的臓器特異的な遺伝子発現のために、がん細胞や組織特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いる方法も知られているが、一般に発現量が低いのが欠

点である。<sup>147,148)</sup> 一方、遺伝子発現の持続には、pDNA の分解、プロモーターの失活（特にウイルス由来の SV40 や CMV プロモーターの場合）、DNA の低メチル化や高含量 CpG motif に起因する Th1 型免疫応答<sup>149,150)</sup>などが関与し、遺伝子発現を持続する際にこれらの制御が必要となる。pDNA の安定性を高める方法として、各種生分解性ポリマー（アテロコラーゲン、PLGA など）からの pDNA 持続放出法や前述した DNase 阻害剤の添加、ポリプレックス形成などが知られている。<sup>151,152)</sup> 血液・リンパ液などの体循環系の存在、組織間液・マトリックスの存在などに伴う体内動態変化や pDNA やキャリアに起因する免疫反応によって、外来遺伝子の発現量やパターンは大きく変化するため、*in vivo* での遺伝子発現は *in vitro* 実験の結果からの予測は困難であり、ファーマコキネティクス、ファーマコダイナミクス、トキシコキネティクス研究データの蓄積による総合的な評価が必要である。

### 5. おわりに

本総説では、非ウイルスベクターの中で特にポリフェクション法に関してわれわれの知見を加えて紹介した。ポリフェクションは *in vitro* 及び動物実験において、リポフェクション法より優れた特徴を有することが明らかになってきた。しかしながら、ポリプレックスの細胞障害機構を始め、細胞内小胞輸送、核内輸送、転写・翻訳に対する影響など、細胞内動態に関する詳細は不明な点も多い。さらに、この新規デリバリーシステムを臨床で使用するには、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」中の基準をクリアする必要がある。キャリア自身の体内動態、安全性、純度、安定性、GMP 適用施設での製造、価格などキャリアの品質に関する様々な検討に加えて精密な体内動態や遺伝子発現の制御法の開発も必要であろう。このように、ポリプレックスの臨床応用へのハードルは決して低くはない。しかしポリプレックス法で用いるポリマーは品質の企画化や管理が他のキャリアに比べて容易であり、抗原性や細胞障害性も低いことなど様々な利点を有するため、今後、基礎研究・開発研究の進展により、将来、患者に福音を持たらす新規遺伝子導入法になることを期待したい。

謝辞 本研究は、熊本大学大学院医学薬学研究

部・製剤設計学分野において行われたものであり、御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました上釜兼人教授に深甚なる謝意を表します。また、種々の有益なご助言とご指導を頂きました平山文俊助教授を始め、その遂行に多大なご協力を賜った木原史博博士、和田幸樹修士、堤 利仁修士他、多数の大学院生、卒論生の方々に深謝致します。また、各種 CyD を分与して頂きました日本食品化工(株)及び(株)横浜国際バイオ研究所に深謝致します。本研究の遂行に当たり、多大なるご支援を賜りました薬学奨励財団に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、日本学術振興財団科学研究費助成金、日本薬学振興財団助成金、東京生化学研究会研究助成金の支援によって実施したものであり、心より感謝申し上げます。

### REFERENCES

- 1) Van Tendeloo V. F., Van Broeckhoven C., Berneman Z. N., *Leukemia*, **15**, 545-558 (2001).
- 2) Felgner P. L., Barenholz Y., Behr J. P., Cheng S. H., Cullis P., Huang L., Jessee J. A., Seymour L., Szoka F., Thierry A. R., Wagner E., Wu G., *Hum. Gene Ther.*, **8**, 511-512 (1997).
- 3) Lipps H. J., Jenke A. C., Nehlsen K., Scinteie M. F., Stehle I. M., Bode J., *Gene*, **304**, 23-33 (2003).
- 4) Delenda C., *J. Gene Med.*, **6 Suppl 1**, S125-S138 (2004).
- 5) Zeicher M., Spegelaere P., Horth M., Gancberg D., Karim A., Dupont F., *Oncol. Res.*, **13**, 437-444 (2003).
- 6) Kootstra N. A., Verma I. M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 413-439 (2003).
- 7) Tseng J. C., Levin B., Hurtado A., Yee H., Perez de Castro I., Jimenez M., Shamamian P., Jin R., Novick R. P., Pellicer A., Meruelo D., *Natl. Biotechnol.*, **22**, 70-77 (2004).
- 8) Lundstrom K., *Curr. Gene Ther.*, **1**, 19-29 (2001).
- 9) Liu Q., Muruve D. A., *Gene Ther.*, **10**, 935-940 (2003).
- 10) Marshall E., *Science*, **286**, 2244-2245 (1999).
- 11) Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F., Bouneaud C., Hue C., De Villartay J. P.,

- Thrasher A. J., Wulfraat N., Sorensen R., Dupuis-Girod S., Fischer A., Davies E. G., Kuis W., Leiva L., Cavazzana-Calvo M., *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1185–1193 (2002).
- 12) Boyce N., *Nature*, **414**, 677 (2001).
- 13) Dave U. P., Jenkins N. A., Copeland N. G., *Science*, **303**, 333 (2004).
- 14) Abdallah B., Sachs L., Demeneix B. A., *Biol. Cell*, **85**, 1–7 (1995).
- 15) Gebhart C. L., Kabanov A. V., *J. Control. Release*, **73**, 401–416 (2001).
- 16) Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7413–7417 (1987).
- 17) Whitmore M., Li S., Huang L., *Gene Ther.*, **6**, 1867–1875 (1999).
- 18) Henner W. D., Kleber I., Benzinger R., *J. Virol.*, **12**, 741–747 (1973).
- 19) Ehrlich M., Sarafyan L. P., Myers D. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 397–409 (1976).
- 20) Matulis D., Rouzina I., Bloomfield V. A., *J. Mol. Biol.*, **296**, 1053–1063 (2000).
- 21) Pollard H., Remy J. S., Loussouarn G., Demolombe S., Behr J. P., Escande D., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7507–7511 (1998).
- 22) Zauner W., Brunner S., Buschle M., Ogris M., Wagner E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1428**, 57–67 (1999).
- 23) Tomalia D. A., Barker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., *Polym. J.*, **17**, 117–132 (1985).
- 24) Uekama K., Hirayama F., Irie T., *Chem. Rev.*, **98**, 2045–2076 (1998).
- 25) Fritz J. D., Herweijer H., Zhang G., Wolff J. A., *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1395–1404 (1996).
- 26) Fischer D., Bieber T., Brusselbach S., Elsasser H., Kissel T., *Int. J. Pharm.*, **225**, 97–111 (2001).
- 27) Erbacher P., Zou S., Bettinger T., Steffan A. M., Remy J. S., *Pharm. Res.*, **15**, 1332–1339 (1998).
- 28) Gao X., Huang L., *Biochemistry*, **35**, 1027–1036 (1996).
- 29) Wu G. Y., Wu C. H., *J. Biol. Chem.*, **262**, 4429–4432 (1987).
- 30) Pouton C. W., Lucas P., Thomas B. J., Uduehi A. N., Milroy D. A., Moss S. H., *J. Control. Release*, **53**, 289–299 (1998).
- 31) Lim Y. B., Choi Y. H., Park J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5633–5639 (1999).
- 32) Zinselmeyer B. H., Mackay S. P., Schatzlein A. G., Uchegbu I. F., *Pharm. Res.*, **19**, 960–967 (2002).
- 33) Kukowska-Latallo J. F., Bielinska A. U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D. A., Baker Jr. J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 4897–4902 (1996).
- 34) Bennis J. M., Kim S. W., *J. Drug Target*, **8**, 1–12 (2000).
- 35) Lynn D. M., Anderson D. G., Putnam D., Langer R., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8155–8156 (2001).
- 36) Perez C., Sanchez A., Putnam D., Ting D., Langer R., Alonso M. J., *J. Control. Release*, **75**, 211–224 (2001).
- 37) Wolfert M. A., Schacht E. H., Toncheva V., Ulbrich K., Nazarova O., Seymour L. W., *Hum. Gene Ther.*, **7**, 2123–2133 (1996).
- 38) Kircheis R., Wightman L., Wagner E., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 341–358 (2001).
- 39) Zaric V., Weltin D., Erbacher P., Remy J. S., Behr J. P., Stephan D., *J. Gene Med.*, **6**, 176–184 (2004).
- 40) Dunlap D. D., Maggi A., Soria M. R., Monaco L., *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3095–3101 (1997).
- 41) Escriou V., Ciolina C., Lacroix F., Byk G., Scherman D., Wils P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1368**, 276–288 (1998).
- 42) Thierry A. R., Rabinovich P., Peng B., Mahan L. C., Bryant J. L., Gallo R. C., *Gene Ther.*, **4**, 226–237 (1997).
- 43) El Ouahabi A., Thiry M., Pector V., Fuks R., Ruyschaert J. M., Vandenbranden M., *FEBS Lett.*, **414**, 187–192 (1997).
- 44) Howell D. P., Krieser R. J., Eastman A., Barry M. A., *Mol. Ther.*, **8**, 957–963 (2003).
- 45) Suh J., Wirtz D., Hanes J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3878–3882 (2003).
- 46) Brunner S., Furtbauer E., Sauer T., Kursa M., Wagner E., *Mol. Ther.*, **5**, 80–86 (2002).
- 47) van de Wetering P., Moret E. E., Schuurmans-Nieuwenbroek N. M., van Steenberg M. J., Hennink W. E., *Bioconjug. Chem.*, **10**, 589–597 (1999).
- 48) Hong K., Sherley J., Lauffenburger D. A., *Biomol. Eng.*, **18**, 185–192 (2001).

- 49) Bloch D. B., Chiche J. D., Orth D., de la Monte S. M., Rosenzweig A., Bloch K. D., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4423–4430 (1999).
- 50) Bielinska A. U., Kukowska-Latallo J. F., Baker Jr. J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1353**, 180–190 (1997).
- 51) Nabel E. G., Gordon D., Yang Z. Y., Xu L., San H., Plautz G. E., Wu B. Y., Gao X., Huang L., Nabel G. J., *Hum. Gene Ther.*, **3**, 649–656 (1992).
- 52) Bieber T., Meissner W., Kostin S., Niemann A., Elsasser H. P., *J. Control. Release*, **82**, 441–454 (2002).
- 53) Tomalia D. A., Naylor A., William A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **29**, 138–175 (1990).
- 54) Esfand R., Tomalia D. A., *Drug Discov. Today*, **6**, 427–436 (2001).
- 55) Bielinska A., Kukowska-Latallo J. F., Johnson J., Tomalia D. A., Baker Jr. J. R., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2176–2182 (1996).
- 56) Delong R., Stephenson K., Loftus T., Fisher M., Alahari S., Nolting A., Juliano R. L., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 762–764 (1997).
- 57) Funhoff A. M., van Nostrum C. F., Koning G. A., Schuurmans-Nieuwenbroek N. M., Crommelin D. J., Hennink W. E., *Biomacromolecules*, **5**, 32–39 (2004).
- 58) Irie T., Otagiri M., Sunada M., Uekama K., Ohtani Y., Yamada Y., Sugiyama Y., *J. Pharmacobiodyn.*, **5**, 741–744 (1982).
- 59) Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J., *Eur. J. Biochem.*, **186**, 17–22 (1989).
- 60) Szejtli J., *Med. Res. Rev.*, **14**, 353–386 (1994).
- 61) Matsubara K., Abe K., Irie T., Uekama K., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1295–1300 (1995).
- 62) Irie T., Fukunaga K., Pitha J., *J. Pharm. Sci.*, **81**, 521–523 (1992).
- 63) Kilsdonk E. P., Yancey P. G., Stoudt G. W., Bangerter F. W., Johnson W. J., Phillips M. C., Rothblat G. H., *J. Biol. Chem.*, **270**, 17250–17256 (1995).
- 64) Kabouridis P. S., Janzen J., Magee A. L., Ley S. C., *Eur. J. Immunol.*, **30**, 954–963 (2000).
- 65) Croyle M. A., Roessler B. J., Hsu C. P., Sun R., Amidon G. L., *Pharm. Res.*, **15**, 1348–1355 (1998).
- 66) Zhao Q., Temsamani J., Agrawal S., *An-tisense Res. Dev.*, **5**, 185–192 (1995).
- 67) Gonzalez H., Hwang S. J., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **10**, 1068–1074 (1999).
- 68) Hwang S. J., Bellocq N. C., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 280–290 (2001).
- 69) Pun S. H., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **13**, 630–639 (2002).
- 70) Bellocq N. C., Pun S. H., Jensen G. S., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1122–1132 (2003).
- 71) Cheng J., Khin K. T., Jensen G. S., Liu A., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1007–1017 (2003).
- 72) Popielarski S. R., Mishra S., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 672–678 (2003).
- 73) Reineke T. M., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 247–254 (2003).
- 74) Reineke T. M., Davis M. E., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 255–261 (2003).
- 75) Davis M. E., Pun S. H., Bellocq N. C., Reineke T. M., Popielarski S. R., Mishra S., Heidel J. D., *Curr. Med. Chem.*, **11**, 179–197 (2004).
- 76) Arima H., Kihara F., Hirayama F., Uekama K., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 476–484 (2001).
- 77) Kihara F., Arima H., Tsutsumi T., Hirayama F., Uekama K., *Bioconjug. Chem.*, **13**, 1211–1219 (2002).
- 78) Kihara F., Arima H., Tsutsumi T., Hirayama F., Uekama K., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 342–350 (2003).
- 79) Maxfield F. R., Wustner D., *J. Clin. Invest.*, **110**, 891–898 (2002).
- 80) Camargo F., Erickson R. P., Garver W. S., Hossain G. S., Carbone P. N., Heidenreich R. A., Blanchard J., *Life Sci.*, **70**, 131–142 (2001).
- 81) Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
- 82) Hill I. R., Garnett M. C., Bignotti F., Davis S. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1427**, 161–174 (1999).
- 83) Putnam D., Gentry C. A., Pack D. W., Langer R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 1200–1205 (2001).
- 84) Dass C. R., *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 593–601 (2002).
- 85) Aramaki Y., Takano S., Tsuchiya S., *FEBS Lett.*, **460**, 472–476 (1999).

- 86) Aramaki Y., Takano S., Arima H., Tsuchiya S., *Pharm. Res.*, **17**, 515–520 (2000).
- 87) Takakura Y., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Target*, **10**, 99–104 (2002).
- 88) Belting M., *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 145–151 (2003).
- 89) Kunath K., von Harpe A., Fischer D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T., *J. Control. Release*, **89**, 113–125 (2003).
- 90) Byk G., Dubertret C., Escriou V., Frederic M., Jaslin G., Rangara R., Pitard B., Crouzet J., Wils P., Schwartz B., Scherman D., *J. Med. Chem.*, **41**, 229–235 (1998).
- 91) Ruponen M., Honkakoski P., Ronkko S., Pelkonen J., Tammi M., Urtti A., *J. Control. Release*, **93**, 213–217 (2003).
- 92) Bergan D., Galbraith T., Sloane D. L., *Pharm. Res.*, **17**, 967–973 (2000).
- 93) Mislick K. A., Baldeschwieler J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 12349–12354 (1996).
- 94) Ruponen M., Ronkko S., Honkakoski P., Pelkonen J., Tammi M., Urtti A., *J. Biol. Chem.*, **276**, 33875–33880 (2001).
- 95) Wiethoff C. M., Smith J. G., Koe G. S., Midhaugh C. R., *J. Biol. Chem.*, **276**, 32806–32813 (2001).
- 96) Liang Y., Haring M., Roughley P. J., Margolis R. K., Margolis R. U., *J. Cell Biol.*, **139**, 851–864 (1997).
- 97) Wadia J. S., Stan R. V., Dowdy S. F., *Natl. Med.*, **10**, 310–315 (2004).
- 98) Mukherjee S., Ghosh R. N., Maxfield F. R., *Physiol. Rev.*, **77**, 759–803 (1997).
- 99) Nichols B. J., Lippincott-Schwartz J., *Trends Cell Biol.*, **11**, 406–412 (2001).
- 100) Johannes L., Lamaze C., *Traffic*, **3**, 443–451 (2002).
- 101) Nabi I. R., Le P. U., *J. Cell Biol.*, **161**, 673–677 (2003).
- 102) Sato S. B., Kiyosue K., Taguchi T., Kasai M., Toyama S., *J. Cell Physiol.*, **166**, 66–75 (1996).
- 103) Tse S. M., Furuya W., Gold E., Schreiber A. D., Sandvig K., Inman R. D., Grinstein S., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3331–3338 (2003).
- 104) Swanson J. A., Watts C., *Trends Cell Biol.*, **5**, 424–428 (1995).
- 105) Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C. G., Benmerah A., Dautry-Varsat A., *Mol. Cell*, **7**, 661–671 (2001).
- 106) Sabharanjak S., Sharma P., Parton R. G., Mayor S., *Dev. Cell*, **2**, 411–423 (2002).
- 107) Hewlett L. J., Prescott A. R., Watts C., *J. Cell Biol.*, **124**, 689–703 (1994).
- 108) Nichols B., *J. Cell Sci.*, **116**, 4707–4714 (2003).
- 109) Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S., Hoekstra D., *Biochem. J.*, **377**, 159–169 (2004).
- 110) Di Guglielmo G. M., Le Roy C., Goodfellow A. F., Wrana J. L., *Natl. Cell. Biol.*, **5**, 410–421 (2003).
- 111) Legler D. F., Micheau O., Doucey M. A., Tschopp J., Bron C., *Immunity*, **18**, 655–664 (2003).
- 112) Wattiaux R., Laurent N., Wattiaux-De Coninck S., Jadot M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 201–208 (2000).
- 113) Farhood H., Serbina N., Huang L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 289–295 (1995).
- 114) Legendre J. Y., Szoka Jr. F. C., *Pharm. Res.*, **9**, 1235–1242 (1992).
- 115) Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C., Wagner E., *J. Biol. Chem.*, **269**, 12918–12924 (1994).
- 116) Anwer K., Logan M., Tagliaferri F., Wadhwa M., Monera O., Tung C. H., Chen W., Leonard P., French M., Proctor B., Wilson E., Singhal A., Rolland A., *Pharm. Res.*, **17**, 451–459 (2000).
- 117) Wrobel I., Collins D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 296–304 (1995).
- 118) Godbey W. T., Barry M. A., Saggau P., Wu K. K., Mikos A. G., *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 321–328 (2000).
- 119) Sonawane N. D., Szoka Jr. F. C., Verkman A. S., *J. Biol. Chem.*, **278**, 44826–44831 (2003).
- 120) Erbacher P., Roche A. C., Monsigny M., Midoux P., *Exp. Cell Res.*, **225**, 186–194 (1996).
- 121) Ciftci K., Levy R. J., *Int. J. Pharm.*, **218**, 81–92 (2001).
- 122) Subramanian A., Ma H., Dahl K. N., Zhu J., Diamond S. L., *J. Gene Med.*, **4**, 75–83 (2002).
- 123) Bishop N. E., *Int. Rev. Cytol.*, **232**, 1–57 (2003).

- 124) Desjardins M., *Natl. Rev. Immunol.*, **3**, 280–291 (2003).
- 125) Yoshimori T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 453–458 (2004).
- 126) Ross G. F., Bruno M. D., Uyeda M., Suzuki K., Nagao K., Whitsett J. A., Korfhagen T. R., *Gene Ther.*, **5**, 1244–1250 (1998).
- 127) Lechardeur D., Sohn K. J., Haardt M., Joshi P. B., Monck M., Graham R. W., Beatty B., Squire J., O’Brodivich H., Lukacs G. L., *Gene Ther.*, **6**, 482–497 (1999).
- 128) Pampinella F., Lechardeur D., Zanetti E., MacLachlan I., Benharouga M., Lukacs G. L., Vitiello L., *Mol. Ther.*, **5**, 161–169 (2002).
- 129) Chiou H. C., Tangco M. V., Levine S. M., Robertson D., Kormis K., Wu C. H., Wu G. Y., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5439–5446 (1994).
- 130) Lukacs G. L., Haggie P., Seksek O., Lechardeur D., Freedman N., Verkman A. S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 1625–1629 (2000).
- 131) Capecchi M. R., *Cell*, **22**, 479–488 (1980).
- 132) Neves C., Escriou V., Byk G., Scherman D., Wils P., *Cell Biol. Toxicol.*, **15**, 193–202 (1999).
- 133) Zanta M. A., Belguise-Valladier P., Behr J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 91–96 (1999).
- 134) Vacik J., Dean B. S., Zimmer W. E., Dean D. A., *Gene Ther.*, **6**, 1006–1014 (1999).
- 135) Duverger E., Carpentier V., Roche A. C., Monsigny M., *Exp. Cell Res.*, **207**, 197–201 (1993).
- 136) Nishikawa M., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 275–283 (2002).
- 137) Wu A. G., Liu X., Mazumder A., Bellanti J. A., Meehan K. R., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 977–982 (1999).
- 138) Lee M., Ko K. S., Oh S., Kim S. W., *J. Control. Release*, **88**, 333–342 (2003).
- 139) Simoes S., Slepishkin V., Gaspar R., Pedroso de Lima M. C., Duzgunes N., *Biosci. Rep.*, **19**, 601–609 (1999).
- 140) Koyama Y., Ito T., Kimura T., Murakami A., Yamaoka T., *J. Control. Release*, **77**, 357–364 (2001).
- 141) Maruyama K., Iwasaki F., Takizawa T., Yanagie H., Niidome T., Yamada E., Ito T., Koyama Y., *Biomaterials*, **25**, 3267–3273 (2004).
- 142) Molas M., Gomez-Valades A. G., Vidal-Alabro A., Miguel-Turu M., Bermudez J., Bartrons R., Perales J. C., *Curr. Gene Ther.*, **3**, 468–485 (2003).
- 143) Wu G. Y., Wu C. H., *Biotherapy*, **3**, 87–95 (1991).
- 144) Liang T. J., Makdisi W. J., Sun S., Hasegawa K., Zhang Y., Wands J. R., Wu C. H., Wu G. Y., *J. Clin. Invest.*, **91**, 1241–1246 (1993).
- 145) Monsigny M., Roche A. C., Midoux P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **551**, 399–413 (1988).
- 146) Hashida M., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 187–196 (2001).
- 147) Walther W., Stein U., Fichtner I., Alexander M., Shoemaker R. H., Schlag P. M., *Cancer Gene Ther.*, **7**, 893–900 (2000).
- 148) Fukazawa T., Maeda Y., Sladek F. M., Owen-Schaub L. B., *Cancer Res.*, **64**, 363–369 (2004).
- 149) Reyes-Sandoval A., Ertl H.C.J., *Mol. Ther.*, **9**, 249–261 (2004).
- 150) Yew N. S., Zhao H., Przybylska M., Wu I. H., Tousignant J. D., Scheule R. K., Cheng S. H., *Mol. Ther.*, **5**, 731–738 (2002).
- 151) Ochiya T., Takahama Y., Nagahara S., Sumita Y., Hisada A., Itoh H., Nagai Y., Terada M., *Natl. Med.*, **5**, 707–710 (1999).
- 152) Luo D., Woodrow-Mumford K., Belcheva N., Saltzman W. M., *Pharm. Res.*, **16**, 1300–1308 (1999).