

腫瘍特異的に分解される PEG 脂質誘導体を用いた全身投与型腫瘍遺伝子 デリバリーシステムの開発

畠山浩人,^{*,a,b} 秋田英万,^{a,b} 小暮健太郎,^{a,b} 原島秀吉^{a,b}

Development of a Novel Systemic Gene Delivery System for Cancer Therapy with a Tumor-specific Cleavable PEG-lipid

Hiroto HATAKEYAMA,^{*,a,b} Hidetaka AKITA,^{a,b} Kentaro KOGURE,^{a,b} and Hideyoshi HARASHIMA

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12 Nishi 6, Kita-ku, Sapporo
060-0812, Japan, and ^bThe Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST),
Kawaguchi Center Building, 4-1-8 Honmachi, Kawaguchi City 332-0012, Japan

(Received June 14, 2007)

For successful cancer gene therapy via intravenous administration, it is essential to optimize the stability of carriers in the systemic circulation and the cellular association after the accumulation of the carrier in tumor tissue. However, a dilemma exists regarding the use of poly (ethylene glycol) (PEG), which is useful for conferring stability in the systemic circulation, but is undesirable for the cellular uptake and subsequent processes. We report the development of a PEG-peptide-lipid ternary conjugate (PPD). In this strategy, PEG is removed from the carriers *via* cleavage by a matrix metalloproteinase (MMP), which is specifically expressed in tumor tissues. An *in vitro* study revealed that the PPD-modified gene carrier (multifunctional envelope-type nano device, MEND) exhibited pDNA expression activity that was dependent on the MMP expression level in the host cells. *In vivo* studies further revealed that the PPD was potent in stabilizing MEND in the systemic circulation and facilitating tumor accumulation. Moreover, the intravenous administration of PPD or PEG/PPD dually modified MEND resulted in the stimulation of pDNA expression in tumor tissue, as compared with a conventional PEG-modified MEND. Thus MEND modified with PPD is a promising device with the potential to make *in vivo* cancer gene therapy achievable.

Key words—systemic gene delivery; cleavable PEG system; cancer gene therapy; multifunctional envelope-type nano device (MEND); matrix metalloproteinase

1. はじめに

遺伝子治療は、様々な疾患に対してその原因となる異常を遺伝子レベルで修復・正常化することにより根本的な疾患の治療が期待できる医学療法であり、今後必要不可欠な治療法になると期待されている。当初は先天的な遺伝子欠損や異常による疾患が対象であったが、現在ではがんやアルツハイマー、エイズなどの後天的な難治性疾患の治療の1つとして遺伝子治療の研究が進められており、臨床応用された遺伝子治療の66%はがん治療である¹⁾ことから、がん治療への実用化に大きな期待が寄せられて

いる。

遺伝子はそのままの形で投与しても、ヌクレアーゼなどによりすぐに分解を受け、生体内では不安定である。したがって、臨床応用例の約80%は、遺伝子導入システム(ベクター)を用いて行われている。¹⁾従来用いられてきたウイルスベクターは、遺伝子導入効率が高いものの、臨床試験において死亡例が報告され、^{2,3)}免疫原性や毒性の問題がクローズアップされている。つまり、遺伝子治療の臨床応用、特に全身性の投与の成否を握るのは安全性に優れた遺伝子導入効率の高い非ウイルスベクターの開発にあると言っても過言ではない。

そこで、本稿ではがんを標的とした全身投与型人工ベクターの研究開発について、「PEGのジレンマ」(後述)を解決するためのわれわれの戦略や現在までの取り組みについて紹介する。

^a北海道大学大学院薬学研究院(〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目)、^b科学技術振興機構(〒332-0012 川口市本町4-1-8 川口センタービル)

*e-mail: hiroto@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムSD1で発表したものを中心に記述したものである。

2. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)

遺伝子を薬として用いて薬効を発揮させるには、核酸をベクターに搭載し、それを投与部位から標的臓器や組織に送達させるだけでは十分とは言えない。これは核酸のような水溶性高分子は、細胞膜を透過することができないためである。したがって、核酸が機能を発揮する場所である標的細胞の中に取り込ませ、さらには核にまで送達させる必要がある。つまり、人工ベクター開発では、投与部位から標的組織までの体内動態や、その後の標的細胞の核への送達という細胞内動態の両者に係わる様々なバリアを突破させることが重要となる。このように、ベクター開発の前に存在するいくつかのバリアを突破するために多くの機能性素子が開発されており、それらを組み込んだ機能性ベクターの構築が試みられている。しかしながら、いくつかの機能素子を1つのベクターに搭載し、かつそれらが必要な場所や時間に効率よく機能を発揮できるようなベクターの構築技術は確立されていない。

そこでわれわれは理想的な多機能性ベクターを構築することを目的として、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (multifunctional envelope-type nano device; MEND) の開発を行っている (Fig. 1)。⁴⁾ MEND はプラスミド DNA など核酸とポリカチオン複合体をコアが脂質エンベロープ膜によって内封された構造を有している。コアとエンベロープには特異的リガンドや、血中滞留性素子、また細胞内動態制御素子など多種類の機能性素子を、トポロジー

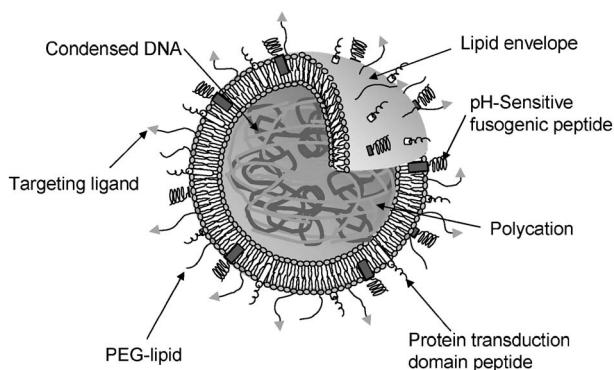


Fig. 1. Schematic Representation of MEND

MEND particles consist of condensed DNA and a lipid envelope containing functional devices including a protein transduction domain peptide that increases intracellular availability, and fusogenic lipids that enhance endosomal escape and facilitate delivery of DNA to the nucleus, and PEG-lipids that improve stability in the systemic circulation.

を考慮して配置することが可能である。HIV の Tat ペプチドに由来した膜融合性ペプチドであるアルギニン 8 重合体 (R8)⁵⁾ を MEND の表面に修飾することにより、R8-MEND は *in vitro* 培養細胞で高い遺伝子発現を有している。^{4,6)} これは、R8-MEND がマクロピノサイトーシス経路で細胞へ導入されるためエンドソーム/リソソームによる分解を受け難く、また細胞質への脱出も容易なためと考えられる。⁶⁾ ベクターが細胞内へ取り込まれる経路はいくつかある⁷⁾が、細胞内動態の制御による取り込み経路の選択も遺伝子発現効率の向上には重要な要素である。

3. MEND のがんへのデリバリーと「PEG のジレンマ」

リポソームの表面を水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) で覆った PEG 化リポソームは、表面に水和層が形成され細網内皮系 (reticuloendothelial system, RES) に取り込まれ難く、血中に長時間循環滞留する特性を有している。⁸⁾ このようなりポソームは貪食細胞のレーダーから逃れることから、ステルスリポソーム (STEALTH[®] liposome) と呼ばれている。またステルスリポソームのサイズを 100 nm 前後に制御すると、EPR 効果 (Enhanced permeability and retention effect)⁹⁾により腫瘍組織に集積することが知られている。したがって、全身投与による腫瘍組織へのベクターの送達には PEG の修飾が有用である。

PEG を修飾した MEND (PEG-MEND) においても、サイズを 100–200 nm に制御し静脈から投与すると、PEG 修飾濃度依存的に滞留性の向上が確認された (Fig. 2)。一方、PEG-MEND を *in vitro* 培養細胞に遺伝子導入したところ、PEG 未修飾 MEND と比較して、遺伝子発現活性が著しく低下することが明らかとなった (Fig. 2)。これは PEG による水和層の形成が、MEND と細胞膜との相互作用が低下し、細胞への取り込みやエンドソーム脱出といった細胞内動態が阻害された結果であると考えられる。つまり、PEG の修飾は体内動態を考えた場合には必要であるが、細胞内動態制御の観点からはむしろ邪魔であり、「PEG のジレンマ」とも言うべき問題が生じてしまう。この問題も、体内動態と細胞内動態の両方を制御しなければならない遺伝子ベクター開発の高いハードルの1つと言える。

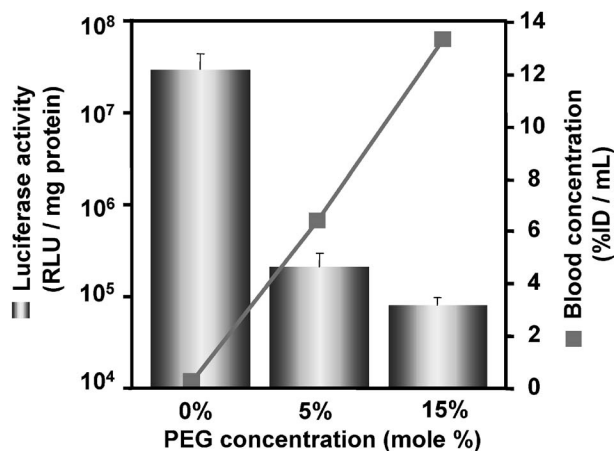


Fig. 2. PEG Dilemma

The surface modification of gene carriers with PEG enhances stability in systemic circulation and accumulation in tumor tissue *via* EPR effect. In contrast, once the carriers are taken up by the tumor tissue, the PEG inhibits interactions between the carriers and the tumor cells, which results in a significant loss in transfection activity.

そこで、がんを標的としたベクター開発においてこのような問題を解決するためにわれわれがこれまでに取り組んできた研究成果について紹介する。

4. PEGのジレンマの解決の戦略

PEGのジレンマを、PEGの切断によって克服しようとする研究が行われている。ポリカチオンやカチオン性脂質を用いた遺伝子ベクターは、一般にエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれている。¹⁰⁾したがって、PEG切断の戦略の多くは、pHの変化や還元環境、特異的酵素といった、細胞内の環境変化をPEGの切断の引き金として利用する研究が多く見受けられる。

Thompsonらは脂質の間にビニル結合を挿入したPEG脂質誘導体を合成することにより、エンドソーム内のpHの変化を利用したPEGの切断を報告している。¹¹⁾Szokaらは、ジオルトエステル結合を挿入することによりpH応答性PEG脂質を構築している。¹²⁾Wagnerらは、ポリエチレンジアミンとPEGの間にヒドラゾン結合を挿入し、また上皮成長因子を標的としたリガンド修飾リポプレックスにより、*in vivo*腫瘍組織における遺伝子発現活性の向上に成功している。¹³⁾また、Zalipskyらは細胞内の還元環境を利用したPEG切断のために、PEGと脂質の間にジスルフィド結合を挿入したPEG脂質誘導体を構築している。¹⁴⁾Allenらのグループは、細胞内に存在するタンパク分解酵素であるカテプシ

ンBにより特異的に切断されるペプチドスペーサーを有するPEG脂質誘導体によって、細胞内でPEGの切断を報告している。¹⁵⁾

われわれは、PEGジレンマ解決の手段として腫瘍特異的に発現が亢進しているマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に着目した。MMPは活性中心にZn²⁺を持つ金属酵素群であり、コラーゲンやフィブロネクチンといった細胞外マトリックス(extracellular matrix; ECM)構成成分に対して分解活性を有する。がんの浸潤や転移には、がん組織のECM分解や血管新生などが不可欠であるが、それらの過程にMMPが関与していることが明らかとなっている。¹⁶⁾このように、がん病態と深く係わるMMPの分解活性を利用して、われわれは腫瘍組織に到達したMENDからPEGを酵素的に切り離してしまおうと考えた(Fig. 3)。¹⁷⁾通常、PEGは脂質誘導体として、脂質部分がリポソームの脂質膜表面に埋め込まれる形で修飾される。MMPにより分解されるペプチド配列が同定されており、¹⁸⁾この配列をPEGと脂質の間にリンカーとして挿入したPEG脂質誘導体(PPD)を開発した。本素子をMENDに修飾することにより(PPD-MEND)、全身投与されたPPD-MENDはEPR効果で腫瘍組織に蓄積したのち、MMPによってPEGが切断され、MENDが活性化されるという戦略を立てた。この戦略は先に紹介した環境応答的なPEGの切断に分類されるが、遺伝子ベクターにおけるPEG切断の場所が“細胞の外”であるという点では、世界初の試みである。

5. PPDの合成とMMPによる切断

このような戦略を実現するために、始めにPEG脂質誘導体PPDの合成を行った。PPDの合成はFig. 4(a)に示すスキームに従い、PEG末端の活性エステル基とMMP基質ペプチドのN末端を結合させたのち、ペプチドのC末端と1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(DOPE)の一級アミンとを結合させることにより行った。MMPの基質となるペプチドは、主にMMP-2やMMP-9で切断を受けるものを用いた。¹⁸⁾MALDI-TOF MSによる分子量分析では、ペプチドやDOPEの結合により、PEG由来の分子量分布が理論値とほぼ同等に増加することが確認された((1) $M_n=3268$, $M_w/M_n=1.01$, (2) $M_n=3955$, $M_w/M_n=1.01$)。また¹H

NMR による構造解析によって、PEG やペプチド、DOPE 由来のシグナル強度から算出されたモル比が同等であったことから、PPD 合成の確認を行っ

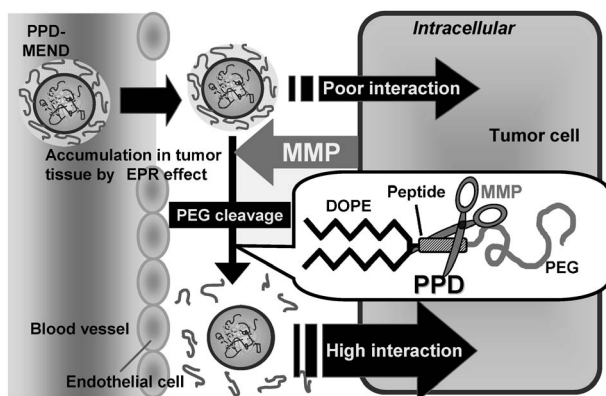


Fig. 3. A Schematic Diagram Illustrating the Strategy Used to Resolve the Dilemma Associated with the Use of PEG

i) By modifying the gene carrier with PPD, the systemic circulation is prolonged, and the accumulation in tumor is increased by the EPR effect. ii) After extravasation from capillaries in the tumor tissue, the PPD is cleaved by an extracellular MMP secreted from tumor cells. iii) PEG dissociates from the gene carrier, and the naked carrier can then associate efficiently with the tumor cell surface.

た (Fig. 4(b)).

この PPD を MMP-2 によって処理すると PEG 由来の分子量が減少することを確認した (MMP-2 処理前: $M_n=3953$, MMP-2 処理後: $M_n=1980$). また構成脂質として DOPE を用いたりポソームによる PPD の切断評価を行った. 両親媒性脂質である DOPE は疎水部が親水部よりも大きいという構造から, 水中では逆ヘキサゴナル構造を取り凝集する (>1000 nm). この DOPE に PEG を修飾すると, 安定なラメラ構造を構成しリポソームとなることが知られている.¹⁹⁾ DOPE と PPD を用いた場合にも, 150 nm 程度の分散安定なりポソームを形成するが, この PPD 修飾リポソームを MMP-2 で処理すると, MMP-2 濃度依存的な粒子径の増大, 凝集 (>2000 nm) が観察された (Fig. 4(c)). 一方, PEG 修飾リポソームでは粒子径の増大はみられなかった (Fig. 4(d)). このことは, PPD 修飾リポソームにおいて, MMP-2 によるペプチドの分解と PEG の切断が起こった結果, 安定にリポソームが形成できなくなり逆ヘキサゴナル構造となり, 粒子

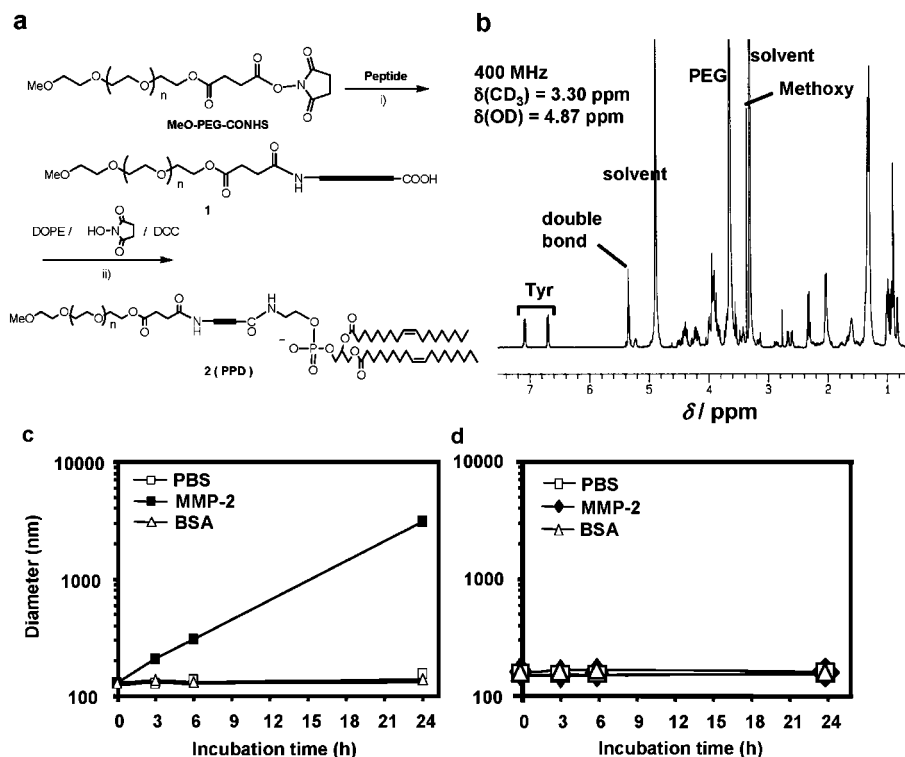


Fig. 4. PPD Synthesis and Cleavage Assay

(a) Synthetic route to PPD i) Et_3N (2 eq.), DMSO, 3 h, Y. 95%; ii) NHS (2 eq.), DCC (2 eq.), Et_3N (2 eq.), CHCl_3 , 24 h, Y. 40%. (b) ^1H NMR spectrum of the purified PPD. The liposomes were modified with 10 mol% PPD (c) and conventional PEG-lipid (d). PPD-liposomes and PEG-liposomes were treated with MMP-2 or BSA (56 nm) at 37°C , and the diameters were measured at 3, 6 and 24 h by dynamic light scattering (DLS) measurement.

径が増大したものと考えられる。

以上のことから、PPD はそれ自体、またリポソームのようなキャリアに修飾された状態で、MMP を介して PEG が切断されることが示唆された。

6. *In vitro* における PPD-MEND の機能評価

MEND のコアは、ルシフェラーゼをコードする plasmid DNA をプロタミンにより凝縮化させることにより 100 nm 以下で負電荷のものを調整した。また脂質膜はカチオン性脂質である 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) と DOPE, Cholesterol (モル比 3 : 4 : 3) から構成し、PEG-DSPE 若しくは PPD を 5 mol% 修飾した。MEND は PEG や PPD を修飾することによって、粒子径が 100–200 nm となり (Table 1), また電子顕微鏡により球形のパーティクルとなることが確認された (Fig. 5 (a)).¹⁷⁾ MMP 産生の盛んなヒト線維芽肉腫由来 HT1080 細胞へ PPD-MEND を遺伝子導入すると、従来の PEG-MEND に比べるとルシフェ

ラーゼの発現活性が約 40 倍上昇した (Fig. 5 (b)).

一方、MMP 産生の少ないヒト腎臓内皮様由来 HEK293 細胞では発現の上昇はほとんどみられなかった。しかし、培地中に MMP-2 を添加すると HEK293 においても発現活性の上昇がみられた (Fig. 5 (b)). このことから、PPD-MEND は *in vitro* 培養細胞で MMP を介した PEG の切断により、遺伝子発現活性を上昇させることを明らかとした。

7. *In vivo* における PPD-MEND の機能評価

脂質膜を ³H によりラベル化した PPD-MEND をマウス尾静脈より投与したのち、血中濃度を測定した (Fig. 6 (a)). PPD-MEND の血中濃度推移は PEG-MEND には劣るものの、PEG 未修飾 MEND と比較すると有意に高いことから、PPD 修飾 MEND は血中滞留性を有することが明らかとなった。HT1080 を背部皮下に移植した担がんマウスへ PPD-MEND を投与後 24 時間における腫瘍への移行量を評価したところ、血中滞留性依存的な移行が観察されたことから、PPD-MEND は EPR 効果によって腫瘍へ移行していることが示唆された (Fig. 6 (b)).

また、担がんマウスへ PPD-MEND を投与し、48 時間後の腫瘍組織におけるルシフェラーゼ発現量を評価した。5% 修飾 PEG-MEND と 15% 修飾 PPD-MEND では、腫瘍への移行量がほぼ同程度であったにも関わらず、PPD-MEND の遺伝子発現量

Table 1. Physical Properties of MEND, PEG-MEND, PPD-MEND

	MEND	PEG-MEND		PPD-MEND	
		5%	15%	5%	15%
Diameter (nm)	281	156	137	162	141
ζ-Poteintioal (mV)	48	13	7.6	19	12
Polydispersity index	0.27	0.16	0.14	0.20	0.17

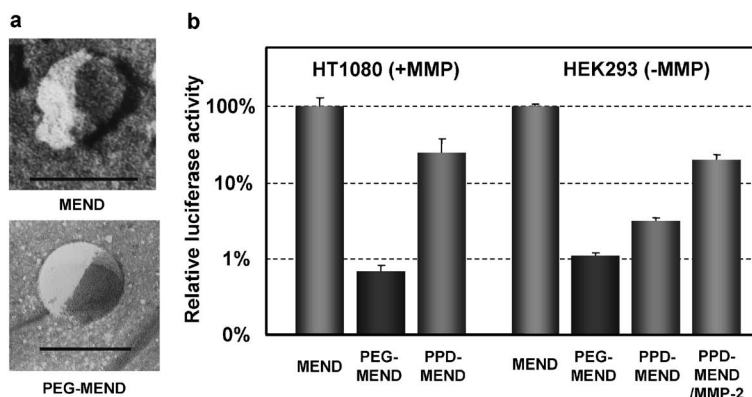


Fig. 5. The Freeze-fracture Electron Micrographs and the *In vitro* Transfection Activities of PPD- or a Conventional PEG-lipid Modified MEND

(a) The MEND and PEG-MEND were separated from the empty vesicles by discontinuous sucrose density gradient, and then was visualized by freeze-fracture electron microscopy. The bars indicate 200 nm. (b) Luciferase activities of MEND, PEG-MEND and PPD-MEND in HT1080 cells and in HEK293 cells were evaluated at 48 h after transfection. Transgene expression in HEK293 cells was evaluated after addition of MMP-2 protein in the culture medium at an equal concentration to HT1080, represented as PPD-MEND/MMP-2. Relative luciferase activities are expressed as % relative light units (RLU) per mg of protein compared to MEND. Each bar represents the mean \pm S.D., $n=3$.

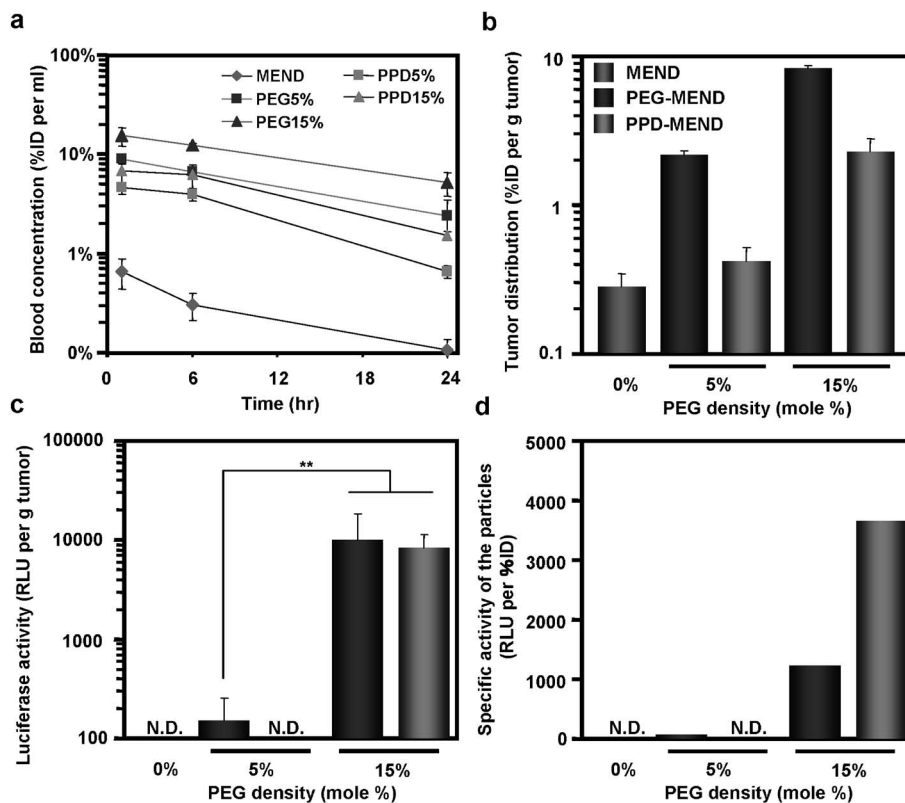


Fig. 6. Stability in Systemic Circulation, the Tumor Distribution and Transfection Activities of MEND *In vivo*

(a) Blood concentrations of [³H]CHE-labeled MEND were evaluated at 1, 6 and 24 h after i.v. injection. Data represent as the %ID per ml of blood. (b) Tumor distribution of MEND at 24 h in tumor-bearing mice, expressed as the %ID per g tumor. (c) Luciferase activity of MEND at 48 h after i.v. administration of MEND at a dose of 25 μ g pDNA/mouse, expressed as RLU per g tumor. (d) Specific activity of the MEND in the tumor. Each bar represents the mean \pm S.D., $n=3$. ** $p<0.01$. N.D. represents "not detected".

は PEG-MEND と比較して約 55 倍上昇していた (Fig. 6(c)). また遺伝子発現量を移行量で除した, 移行量当たりの発現活性を評価すると, 15% PPD-MEND は 15%PEG-MEND よりも高い値を示した (Fig. 6(d)). 以上のことから, PPD-MEND は腫瘍到達後に, MMP により PEG が切断された結果, 遺伝子発現活性が上昇することが示唆された.

8. 更なる発現活性の向上

以上の結果から, PPD を修飾した MEND は静脈内投与後に腫瘍組織に到達し, MMP を介した PEG の切断と発現活性の向上に成功した. しかし, PEG と比較すると, PPD の血中滞留性や腫瘍への移行量が劣ることは否めない. このことは, キャリアの腫瘍へのデリバリーが前提となる血中投与によるがん遺伝子治療において, 改善しなければならない課題と言える. われわれはこれまでに, MEND に修飾する PEG のすべてを PPD に置き換えて評価を行ってきた. そこで, 血中滞留性のよい PEG と, 遺伝子発現活性に有利な PPD を混合すること

により, 体内動態と到達後の遺伝子発現活性の最適化を試みた. すなわち, 総 PEG 修飾密度を 5, 15, 20 mol% とし, PEG と PPD を 1:1 で MEND に修飾した PEG/PPD-MEND の遺伝子発現活性を評価した. PEG-MEND では腫瘍移行量, 遺伝子発現量はともに 15% で最大であったのに対して, PEG/PPD-MEND では 20% で最大であった (Fig. 7(a)). ほぼ同等な腫瘍移行量を示した修飾量 20% では, 遺伝子発現量は 60 倍と大きく上昇することが示された (Fig. 7(b)). このことは, 体内動態と細胞への取り込みの両方が改善された結果であると考えられる.

以上のことより, *in vivo* 腫瘍を標的とした血中投与型遺伝子キャリアの設計には, 血中滞留性や腫瘍への移行といった体内動態だけでなく, 腫瘍送達後の細胞内動態の両方を精密に制御する必要があることを示唆している.

9. 終わりに

われわれは腫瘍で過剰発現している MMP によ

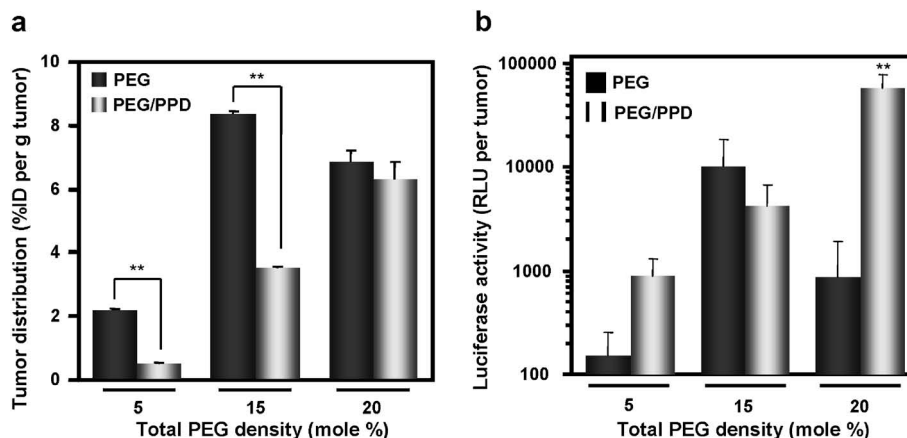


Fig. 7. Further Evaluation of the Transfection Activities of MENDs in the *In vivo* Tumor

The MEND was modified with PEG and PPD (1 : 1 mole ratio) at 5, 15 and 20% total PEG densities. (a) Tumor distribution of MENDs at 24 h in tumor-bearing mice, represented as the %ID per g tumor. (b) Luciferase activity of MENDs at 48 h, expressed as RLU per g tumor. Each bar represents the mean \pm S.D., $n = 3$. ** $p < 0.01$.

る PEG の切断により遺伝子ベクターの発現活性を向上させることに成功した。しかし、実際の臨床に応用するためには、更なる発現効率の上昇が求められる。今後、発現活性の向上を目指した研究を行っていく際には、遺伝子 1 コピー当たりの発現効率を更に上昇させることが必要である。われわれは細胞内動態制御、その中でも特に核膜の突破の観点から開発を進め、安全かつウイルスベクターに匹敵する人工ベクターを創製し、遺伝子治療の基盤技術の確立、がん治療に貢献したい。

謝辞 PEG 脂質誘導体の合成に当たり、有益なご助言と多大なご指導を頂きました筑波大学学際物質科学研究センター・長崎幸夫先生（筑波大学学際物質科学研究センター教授）、大石 基先生（同助教）に深く御礼申し上げます。また電子顕微鏡写真の取得に関し、ご協力頂いた上野雅晴先生（富山大学薬学部薬剤設計学教授）、木平孝高先生（同助教）に、感謝申し上げます。

REFERENCES

- The Journal of Gene Medicine, Clinical Trial sites (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>)
- Lehrman S., *Nature*, **401**, 517–518 (1999).
- Marshall E., *Science*, **299**, 320 (2003).
- Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **98**, 317–323 (2004).
- Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugiura Y., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 1005–1011 (2001).
- Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
- Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32–45 (2006).
- Klibanov A. L., Maruyama K., Torchilin V. P., Huang L., *FEBS Lett.*, **268**, 235–237 (1990).
- Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- Lv H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J., *J. Control. Release*, **114**, 100–109 (2006).
- Shin J., Shum P., Thompson D. H., *J. Control. Release*, **91**, 187–200 (2003).
- Guo X., Szoka F. C., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 291–300 (2001).
- Walker C. F., Fella C., Pelisek J., Fahrmeir J., Boeckle S., Ogris M., Wagner E., *Mol. Ther.*, **11**, 418–425 (2005).
- Zalipsky S., Qazen M., Walker II J. A., Mullah N., Quinn M. Y., Huang S. K., *Bioconjug. Chem.*, **10**, 703–707 (1999).
- Zhang J. X., Zalipsky S., Mullah N., Pechar M., Allen T. M., *Pharmacol. Res.*, **49**, 185–198 (2004).
- Coussens L. M., Fingleton B., Matrisian L. M., *Science*, **295**, 2387–2392 (2002).
- Hatakeyama H., Akita H., Kogure K., Oishi

-
- M., Nagasaki Y., Kihira Y., Ueno M., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H., *Gene Ther.*, **14**, 68–77 (2007).
- 18) Turk B. E., Huang L. L., Piro P. B., Cantley L. C., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 661–667 (2001).
- 19) Holland J. W., Cullis P. R., Madden T. D., *Biochemistry*, **35**, 2610–2617 (1996).