

膜融合リポソームによる細胞内薬物動態制御法の確立とその応用

吉川友章,^a 岡田直貴,^{a,b} 中川晋作^{*,a,b}

Development of Intracellular Drug Delivery System Using Fusogenic Liposomes

Tomoaki YOSHIKAWA,^a Naoki OKADA,^{a,b} and Shinsaku NAKAGAWA^{*,a,b}

^aDepartment of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan, and ^bThe Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Hon-cho, Kawaguchi City 332-0012, Japan

(Received January 5, 2007)

Drug delivery system (DDS) research has contributed greatly toward improving chemotherapy efficacy and reducing its adverse effects through the development of approaches to optimize pharmacokinetics, such as controlled release and targeting. On the other hand, the remarkable progress of this latest life science research has altered the concept of what constitutes medical supplies. A change in this concept would allow for the consideration of medical materials that use not only conventional low molecular-weight organic compounds, but also biomacromolecules, including nucleic acids and proteins, that constitute living organisms. Although these biomacromolecular drugs are expected to demonstrate excellent efficacy based on their intrinsic bioactivity, they quickly degrade when administered *in vivo* and only a limited number have therefore been developed into medicines. In addition, most biomacromolecular drugs are ineffective until they are delivered to particular cells within a tissue or to particular organelles within a cell. To develop effective biomacromolecular medicines, it is necessary to introduce a DDS that is capable of ensuring internal stability as well as precise control of internal and intracellular dynamics, and to establish a new fundamental technology for DDS that can accommodate the material properties and mechanisms of action of the biomacromolecular drugs. In this context, this review introduces our approach to the design and creation of “Intracellular DDS” using fusogenic liposomes for application to gene therapy and tumor peptide vaccines. We suggest that this technology is very important for controlling the intracellular pharmacokinetics of biomacromolecular drugs.

Key words—drug delivery system; fusogenic liposome; nanoparticle; gene therapy; peptide vaccine

1. はじめに

Drug delivery system (DDS) は、必要な薬物を必要な時間に必要な部位で作用させるための工夫や技術であり、製剤からの薬物放出制御 (controlled release) や特定組織への薬物集積性の向上 (targeting) など、薬物の体内動態を最適化することによって化学療法の有効性改善と副作用低減を実現してきた。一方、20 世紀後半からのライフサイエンス研究の目覚ましい進展は、「薬」そのものの概念を大きく変革し、現代医療体系では従来の低分子有機化

合物のみならず生命体の機能発揮・恒常性維持を担う核酸や蛋白質をも薬物として捉えることが可能となった。しかし、これら生体高分子は本来の生理活性に基づく優れた薬効発現を期待できるものの、そのままの形状で「薬」として生体に投与しても速やかに分解されてしまう上、多彩な生理活性を示すことによる副作用発現のため、医薬品化に成功しているものは非常に限られている。さらに、多くの生体高分子は組織内の特定の細胞あるいは細胞内の特定のオルガネラへ送達されて始めて有効性を発揮することが明らかになりつつある。したがって、有効かつ安全な遺伝子治療及び蛋白質療法の確立に向けては、薬物の生体内動態を最適化することによってのみ薬効増大と副作用低減を図るのではなく、薬物となる遺伝子・蛋白質の細胞内動態をも時空間的に制御し得る DDS 技術の導入が望まれる。¹⁾ そこで筆

^a大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6), ^b科学技術振興機構 (JST) 戦略的基礎研究推進事業 (CREST) (〒332-0012 川口市本町 4-1-8)

*e-mail: nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S2 で発表したものを中心に記述したものである。

者らは、独自に開発した細胞質内薬物送達キャリアーである膜融合リポソーム (Fusogenic Liposome; FL) を駆使した“細胞内 DDS”ともいうべき新しい疾病治療戦略の開発を推進している。本稿では、われわれがこれまでに取り組んできた FL を用いた細胞内 DDS の一例として、核酸医薬品の細胞質内徐放システムと抗原ペプチドの小胞体ターゲティングシステムについて紹介する。

2. 膜融合リポソーム (FL) による細胞質内を起点とした細胞内 DDS

細胞内 DDS の確立に当たっては、第 1 に遺伝子や蛋白質などを細胞内へと送り込んだ上で、細胞内で薬物を徐放させる機能やオルガネラへと送達する機能を発揮させる必要がある。通常、遺伝子や蛋白質・ペプチドは、ヌクレアーゼやプロテアーゼなどの体内酵素によって薬効を発現する前に速やかに分解されてしまうため、微粒子状キャリアーなどに固定化・内包するといった DDS を適用する必要がある。しかしながら、こういった工夫を施したとしても、微粒子状物質の多くはエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれるために、投与した薬物の大部分はエンドソーム内酵素によって損傷を受けてしまう。^{2,3)} したがって、生体高分子を有効な医薬品として活用するための細胞内 DDS を開発するためには、1) エンドソーム経路を回避して生体高分子を細胞質内へと送達する機能、2) 細胞質内で薬物を徐放する、あるいは特定分子・部位へのターゲティング能、を兼ね備えたキャリアー設計が必要である。本観点からわれわれは、センダイウイルス (HVJ) の膜融合能をリポソームに付与した膜融合リポソーム (FL) を適用した。HVJ は、ウイルスエンベロップを構成する HN/F 蛋白質と細胞膜との融合によって標的細胞に感染するウイルスである。これまでに、われわれは HVJ が細胞膜だけでなく脂質を主成分とするリポソームとも融合できることを利用し、紫外線照射によって不活化した HVJ と薬物封入リポソームとを融合させたハイブリッド型リポソームとしての FL を開発することに成功している。この FL は、表面に存在する HVJ 由来の HN/F 蛋白質を介した膜融合によって、リポソーム内に封入できる物質であれば細胞質内に直接導入することが可能であり (Fig. 1)、遺伝子や蛋白質・ペプチドを封入した FL が遺伝子治療用ベ

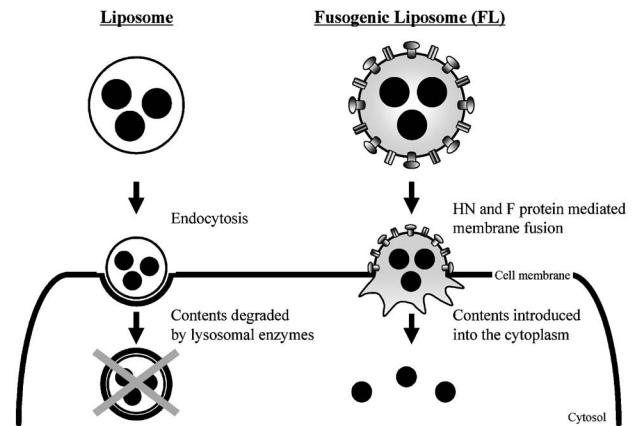


Fig. 1. Schematic Illustration of Intracellular DDS Using FL

クターあるいはワクチン療法における抗原送達キャリアーとして極めて有用であることを報告している。⁴⁻¹⁶⁾ そこで筆者らは、この膜融合能を有する FL を活用することで、エンドソームによる分解を回避した上で DDS 機能を付与した生体高分子を細胞質へと効率よく送達することが可能であり、細胞質内を起点とした薬物徐放やオルガネラターゲティングシステムを構築できるのではないかとこの着想に至った。

3. FL を用いた細胞質内遺伝子徐放システム

ヒトゲノムの解析が完了したことを受けて、疾病の発症機構が急速に解明されつつある今日、疾病の原因となる遺伝子の同定とそれらを標的とした遺伝子医薬品、さらにはサイトカイン・抗体医薬といったバイオ医薬品の開発が世界的に注目されている。中でも、標的遺伝子の mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (AODN) によって、当該遺伝子の翻訳を特異的に抑制するアンチセンス法や、21~23mer の二本鎖 RNA (siRNA) の細胞内



中川晋作

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授。1959 年生まれ。1984 年、神戸学院大学大学院薬学研究科修士課程修了。参天製薬株式会社中央研究所勤務、神戸学院大学薬学部実験助手、大阪大学薬学部助手、講師、助教授などを経て 2005 年から現職。受賞：1994 年 Zoological Science Award (日本動物学会)、

1996 年日本薬学会近畿支部奨励賞 (日本薬学会近畿支部)、2004 年第 4 回日本 DDS 学会永井賞 (日本 DDS 学会) など。研究内容：遺伝子や蛋白質、細胞などを用いた DDS 研究に従事し、細胞の機能を利用した究極の薬物療法の開発を目指している。

導入によって細胞内における RNA 分解機構を促し、siRNA と相同な標的 mRNA を直接的に分解する RNAi 法は、特定遺伝子の過剰発現が原因となる疾病に対して画期的な治療法を提供できる可能性を秘めている。これら核酸医薬は、抗体医薬品などと比べると抗原性が低く、薬品としての大量合成が容易であることなどから、次世代のバイオ医薬品として脚光を浴びているが、¹⁷⁾ 実用化するためには核酸医薬の有効性増強を目的として「生体内安定性の向上」や「標的組織・細胞特異的デリバリー法の開発」が必須とされている。

siRNA や AODN といった核酸医薬は、細胞質内に存在する mRNA を標的としていることから、細胞質内へと送達されなければ薬効を発現することはない。また、低分子有機化合物と比較すると核酸は、体内のヌクレアーゼによって容易に分解される上、細胞膜を透過するのは困難であり、これらの欠点を克服できるデリバリー法の開発が必須である。現在、リポソームやカチオン性物質とのコンプレックスを調製することによって、AODN や siRNA の細胞内導入効率を向上させようとする試みが広くなされているが、こういったアプローチを用いても十分な治療効果を得ることは非常に難しい。¹⁸⁻²⁰⁾ その要因として、核酸分子はカチオン性脂質と複合体を形成させることで細胞“外”酵素による分解を免れたとしても、エンドソーム小胞内での分解は不可避であることや、細胞質内での薬効持続性に乏しいといった点が挙げられる。以上の課題を考慮する

と、siRNA や AODN といった核酸医薬の治療効果を最大限に発揮させるための DDS として、核酸医薬を担持させた微粒子キャリアーを細胞質へ送達し、さらに細胞質内で徐放化させるアプローチが有効であろう。その点において、FL はリポソームに封入可能な物質であれば如何なるものでも細胞質内へ直接送達できるキャリアーであることから、ナノ粒子 (NP) を封入した FL を作製することができれば、核酸医薬の細胞質内徐放システムを確立できるのではないかと考えた。⁸⁾

まず、モデルナノ粒子として緑色蛍光を発する直径 500 nm のナノ粒子を封入した FL (FL/NP) を作製し、細胞質内への粒子導入について検討した。粒子径 500 nm のナノ粒子を封入したリポソーム (Lipo/NP) を作製し、そのリポソームを不活化 HVJ と融合させることにより FL/NP を作製した。この FL/NP を透過型電子顕微鏡で観察したところ、リポソーム及び FL の内水相にナノ粒子が封入されており、さらに FL の表面には HVJ と同様に細胞膜との融合に係わるスパイク状の膜蛋白が存在していることが確認された (Fig. 2)。この FL/NP による細胞内へのナノ粒子導入活性を Flow cytometry 法により検討したところ、ナノ粒子のみあるいは Lipo/NP を作用させた細胞においてはナノ粒子の取り込みはほとんど確認されなかったのに対して、FL/NP 作用群では、90%以上の細胞にナノ粒子の導入が認められた。さらに蛍光強度から細胞内に導入されたナノ粒子を算出したところ、細胞

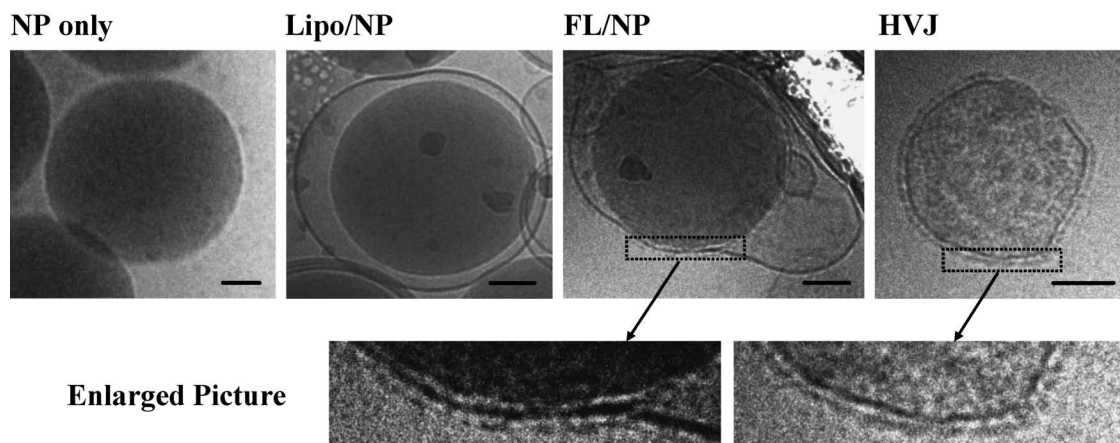


Fig. 2. TEM Observation of Nanoparticle Encapsulating FL

NP-encapsulating liposomes (Lipo/NP) were purified by stepwise fractionation through sucrose-density centrifugation. NP-encapsulating FL (FL/NP) was prepared by fusing ultraviolet-inactivated Sendai virus with purified Lipo/NP. The resultant was purified by stepwise sucrose-density centrifugation, and visualized by Cryo-TEM. Bar is identical to 100 nm.

当たりの平均ナノ粒子導入数は約 10 個であり、驚くべきことに 26 個以上導入された細胞群が 5% 程度認められた。FL/NP を作用させた培養細胞を電子顕微鏡像によって観察したところ、ナノ粒子が確かに細胞質内に送達されていることが確認された (Fig. 3)。以上の結果より、FL は内封したナノ粒子を細胞内に効率よく導入できることが実証された。

次に、本システムを用いて細胞内における遺伝子徐放効果を検討した。蛍光標識 AODN を吸着させたカチオン性ポリビニルアミンナノ粒子 (NP-AODN) を封入した FL (FL/NP-AODN) を作製し、それを作用させたサル腎上皮細胞株 (LLCMK2) 内における AODN の局在を共焦点レーザー顕微鏡により経日的に観察した。FL/NP-AODN 作用直後 (day 0) では AODN 由来の蛍光がドット状に観察され、導入したナノ粒子の表面に AODN が吸着した状態で細胞質内に導入していることが示唆された。さらに、days 2 では AODN 由来の蛍光が細胞質全体に拡散した像が得られた。以上の結果は、薬物徐放性ナノ粒子を細胞質内に直接導入することで細胞内における薬物の放出制御を達成可能であることを示すものである。今後、ナノテクノロジーの発展に伴って、温度・熱などの刺激、あるいは細胞内環境変化に応答するような、機能性ナノ粒子が続々と開発されることが予測される。FL によるナノ粒子の細胞質内直接導入法はこれら新規ナノ粒子にも適用可能な汎用性の高い方法論であり、各種ナノ粒子と組み合わせることでより有効性の高い薬物治療が達成できるものと期待される。さらにわれわれのこれらの成果は、FL を応用した細胞質内ナノ粒子デリバリーが細胞質内薬物徐放システムとして有用

であることを示すとともに、今後、徐放させる遺伝子・蛋白質の細胞内分布制御 (オルガネラターゲティング) をも可能とするアプローチと組み合わせることで、FL が遺伝子治療や蛋白質療法の最適化を充たす重要な基盤技術となり得ることを示唆している。

4. 小胞体ターゲティングによるがんペプチドワクチン療法の最適化

近年、外科療法・化学療法・放射線療法に続く第 4 のがん治療法として、免疫療法が注目されている。これまでのがんに対する免疫応答を分子レベルで解析する腫瘍免疫学の進展は、遺伝子変異を蓄積したがん細胞が質的・量的に正常細胞とは異なる分子を発現しており、これら腫瘍関連抗原 (TAA) と呼ばれる分子に対する免疫機構ががん細胞の排除に重要な役割を果たしていることを明らかとした。^{21,22)} しかし、がん細胞は本来的には自己の細胞であり、細菌やウイルスのような外界から侵入してくる異物と比べると免疫原性が非常に微弱であることから、免疫機構を潜り抜けて増殖したがん細胞は生体機能を蝕むこととなる。また、がん細胞は種々の変異を蓄積することによって免疫系から巧妙に逃れる術を身につけており、腫瘍として発見された疾患状態を生来の免疫力のみで回復させることは困難である。したがって、がんに対するワクチン療法研究においては、患者の免疫系にがん細胞の特徴 (正常細胞との差異=TAA 発現の有無) を増幅して効率よく認識させるための TAA 送達システムが必要である。²³⁻²⁸⁾

近年、免疫系を構成する細胞の機能解明が進展したことにより、樹状細胞 (dendritic cell; DC) と呼

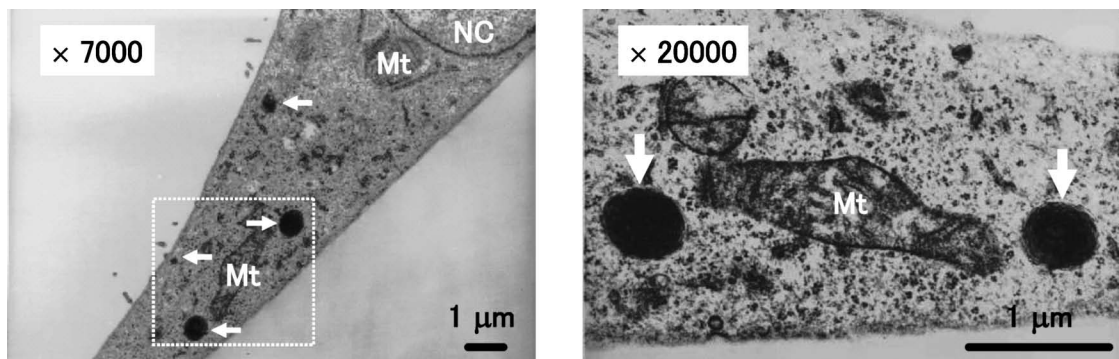


Fig. 3. LLCMK2 Cells Were Cultured with FL/FITC-PS-NP for 30 min and Observed by Cryo-TEM

Mitochondrion and nucleus are marked with 'Mt' and 'NC', respectively, and arrowheads indicate introduced NPs. Bars are 1 μm at $\times 20000$ magnification.

ばれるプロフェッショナル抗原提示細胞が、T細胞依存性の獲得免疫応答の始動・増幅、さらに自然免疫応答のコントロールも含めて、免疫機構を統御する免疫系の司令塔として機能していることが明らかとなり、がんや感染症を対象とした免疫療法開発における標的細胞として注目されている。²⁹⁻³²⁾特に、がん細胞排除の実質的な担い手である細胞傷害性T細胞(CTL)をTAA特異的に活性化するためには、MHC class I分子を介した抗原提示が必須であることが知られており、がん免疫療法の開発においてはTAAをいかに効率よくAPC表面上のMHC class I分子を介して抗原提示させるかが重要である。^{33,34)}このようなDCの性質を踏まえて、がん患者に固有のTAA蛋白質の発現及びMHCの型を診断し、その型に合うTAAペプチドを合成して、それをがん抗原としてがん患者に接種するがんペプチドワクチン療法が現在多くの施設で行われている。³⁵⁻³⁷⁾しかし、残念ながら臨床研究の結果からは、がんワクチンペプチド療法は当初期待したほどの成果が得られておらず、現在ではペプチドワクチンの腫瘍免疫誘導能や機序の詳細な見直しと、それらの知見を活用したより有効な免疫方法の開発が進められている。ペプチドワクチンにおいては、体内に投与されたペプチドがDCを始めとする抗原提示細胞の表面に発現する空のMHC class I分子にはまり込むことでMHC class I/TAAペプチド複合体を形成し、この複合体を認識したCTLが活性化されることによって腫瘍免疫が誘導される。また、MHC分子複合体は比較的短期間で役目を終るとともに細胞外にシェディングされ、それを補充するように小胞体内においてエピトープペプチドと複合体化した新たなMHC分子複合体が細胞表面に移行・提示される。つまり、現行のペプチドワクチン療法においては、免疫原として投与したペプチドの体内安定性の乏しさと、MHC class I分子複合体の不安定性が一因となり、CTLの誘導効率が著しく制限されている。

以上の点を踏まえて筆者らは、FLを用いてMHC class I/エピトープペプチド複合体形成の場である小胞体へとエピトープペプチドを積極的に送達するシステム(小胞体ターゲティングシステム)を構築できれば、エピトープペプチドの小胞体移行が促進されることによって、MHC class I分子を介

した抗原提示の延長と抗腫瘍効果の増強を達成できるものと考えた。⁴⁾まず、ニワトリ卵白アルブミン(OVA)由来エピトープペプチド(SL8)のN末端側に、アデノウイルスのE3/19K糖蛋白質由来の小胞体移行配列(ER insertion signal sequence; Eriss)^{38,39)}を付加したペプチド(ML26)、コントロールペプチドとしてC末端側にErissを付加したSL8(AL26)をそれぞれ封入したFLを作製し(Table 1)、MHC class I/SL8複合体を認識する細胞株を用いてMHC class I分子を介したSL8の提示期間を検討した。ML26(未封入体)を作用させたマクロファージでは実験期間(40-140h)を通してMHC class I分子を介した抗原提示はほとんど認められなかったのに対して、SL8(未封入体)、SL8封入FL(FL-SL8)、ML26封入FL(FL-ML26)を作用させたいずれの群においても、ペプチド作用直後(40h)の抗原提示は極めて高かった(Fig. 4)。しかしながら、SL8(未封入体)並びにFL-SL8を作用させた群では、ペプチド作用40-60時間後から急激な抗原提示の低下が認められた。その一方で、FL-ML26を作用させたマクロファージでは140時間もの間、高い抗原提示レベルが維持されていた。これらの結果は、FLを用いてEriss付加エピトープペプチドを抗原提示細胞の細胞質内に送達することによって、MHC class I/エピトープペプチド複合体の提示期間を劇的に延長できることを示すものである。さらに、FL-ML26による抗原提示期間の延長がワクチン効果に反映されるか否かを検討するために、各免疫マウスに対して攻撃接種したOVA発現腫瘍(E.G7-OVA腫瘍細胞)の増殖抑制効果を検討した(Fig. 5)。最強のCTL誘導アジュバントであるフロイント完全アジュバント(CFA)によってエマルジョン化したML26、空のFLとML26あるいはSL8の混合溶液をペプチド量とし

Table 1. Synthetic Peptide Constructs

| Designation | Peptide sequence |
|--|---|
| OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (SL8) ^{a)} | <u>SIINFEKL</u> |
| Eriss ^{b)} -SL8 (ML26) | MR <u>Y</u> MILGLLALAAVC S AAS <u>IINFEKL</u> |
| SL8-Eriss (AL26) | AS <u>IINFEKL</u> MR Y <u>MILGLLALAAVCS</u> |

a) The immunodominant H-2K^b-restricted CTL-epitope of OVA,

b) The endoplasmic reticulum insertion signal sequences: underlined: SL8 antigenic peptide, **bold**: Eriss.

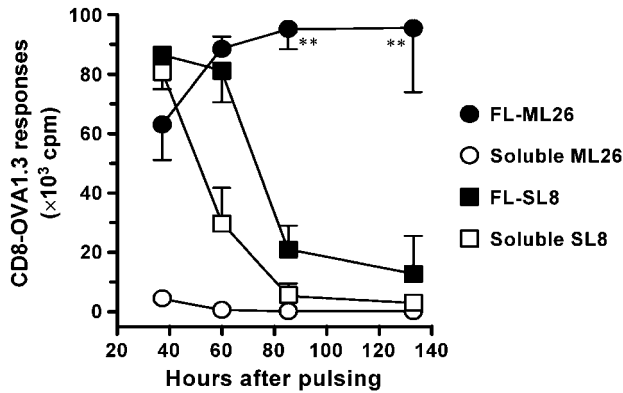


Fig. 4. Combination of Eriss Attached to the N Terminus of CTL Epitope Peptides and Delivery of the Fusion Peptide Using FLs Prolongs MHC Class I Presentation of the CTL Epitope

Thioglycollate-induced peritoneal macrophages were pulsed with 10 μ g peptide/ml of FL-ML26, soluble ML26 peptides, FL-SL8, or soluble SL8 peptides for 15 min. After washing, cells were cultured in fresh media for the indicated time. These cells were washed and subsequently cultured at 37°C for 35 to 135 h after antigen pulse. The cells were fixed with 0.05% glutaraldehyde and washed three times, and 10^5 CD8-OVA1.3 cells were added to each well. The response of stimulated CD8-OVA1.3 cells, i.e., their IL-2 secretion levels, was determined using a CTLL-2 proliferation assay. Each point represents the mean \pm S.D. of three independent cultures. Significant differences between FL-ML26 and soluble SL8 peptides at the indicated point $**p < 0.001$.

て 25 μ g 免疫したマウスでは腫瘍増殖抑制効果は全く認められなかった。また、CFAを適用して 25 μ g の SL8 を免疫したマウスにおいても 8 例の内 2 匹において腫瘍の完全拒絶が認められた程度であった。それに対して、SL8 を FL に封入して適応した場合、2.5 μ g 投与で 10 例中 6 例において、25 μ g 投与では 10 例中全例において腫瘍の生着が完全に拒絶された。その一方で、わずか 2.5 μ g の ML26 を FL に封入して免疫した群では全例で腫瘍の生着が拒絶されており、小胞体ターゲティングシステムが、がんペプチドワクチン療法の有効性増強につながる優れたシステムであることが明らかとなった。以上、外来性高分子を細胞質内へ直接送達可能な FL と、小胞体への移行を促進する Eriss を組み合わせた本システムによって、極めて効率的な MHC class I 提示と、*in vivo* における強力な抗腫瘍効果の誘導が可能になることを実証した。筆者らはこのシステムを応用することによって、抗原性の低い抗原を用いた場合であっても効果的なワクチン開発が可能になるものと期待している。

5. おわりに

筆者らが推進する細胞内 DDS に関する研究は、薬物として投与した遺伝子や蛋白質の薬理作用（有

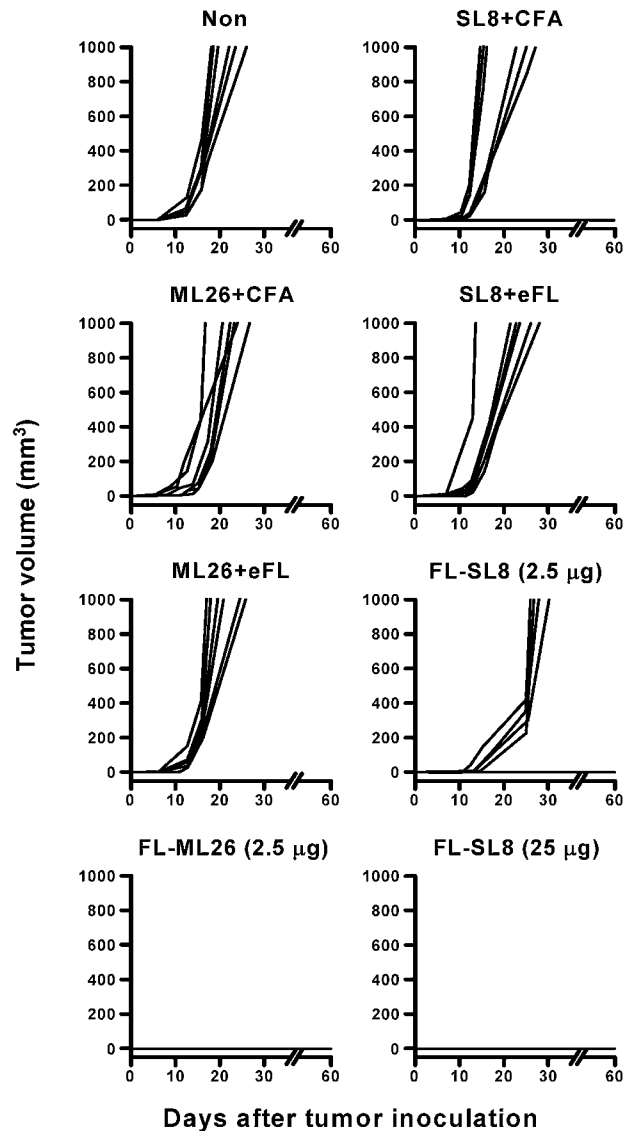


Fig. 5. *In vivo* Immunization with FL-ML26 Elicits Protective Immunity against OVA-expressing Tumors

C57BL/6 ($n=6-13$ per group) mice were subcutaneously immunized with or without (non) ML26+CFA, ML26+empty FL, FL-ML26, SL8+CFA, SL8+empty FL, or FL-SL8 at 2.5 or 25 μ g peptide/mouse. Seven days after the immunization, 2×10^5 OVA-expressing E.G7-OVA cells were intradermally injected into the abdomen. Six to 13 mice were used for each experimental group and tumor growth was monitored by calculating the tumor volume and individually plotted. The tumor volume was calculated as follows: (tumor volume; mm^3) = (major axis; mm) \times (minor axis; mm) $^2 \times 0.5$. Tumor volumes were determined until they exceeded 1000 mm^3 and the individual tumor volume was graphed. All 13 mice immunized with 2.5 μ g FL-ML26, 10 of 10 mice with 25 μ g FL-SL8, 6 of 10 mice with 2.5 μ g FL-SL8, and 2 of 8 mice with 25 μ g SL8+CFA rejected the E.G7-OVA tumor within 60 d and survived afterwards.

効性)の増強と副作用の低減を目指して、従来より盛んに行われてきた生体レベルでの DDS をさらに発展・進化させ、細胞内というよりミクロな視点で実現しようとするものである。ポストゲノム時代を迎えた今日では、ゲノミクス・プロテオミクス研究

によって生命現象や疾患発症メカニズムの解明が劇的に進展し、サイトカインや受容体、転写因子、核内受容体などのように、細胞の内・外を問わず疾病治療の標的となる分子が次々と同定されるであろう。したがって、これらの知見を基盤としたバイオ医薬（遺伝子・蛋白質医薬品）の開発が今後のポストゲノミクス研究領域において期待されている。しかしながら、現在のところ市場に出回っているバイオ医薬品は、エリスロポエチンやインターフェロン、抗体といった細胞表面上に発現する受容体やサイトカインを標的としたものばかりであり、細胞内蛋白質を標的とする、あるいは細胞内を作用点とするバイオ医薬の実用化は困難を極めている。われわれが進めている細胞質内送達を可能とするキャリアーの設計と、細胞内での薬物動態を制御し得る細胞内 DDS の開発は、これまで焦点が当てられてこなかった細胞内蛋白質を標的とするのみではなく、核酸医薬のように作用点が細胞内であるバイオ医薬の有効性向上に非常に有用である。現在、われわれはわが国が世界にリードする分野であるナノテクノロジーを基盤とした遺伝子・蛋白質送達キャリアーの創製を進めており、将来的にはこれらの技術を組み合わせることによって、いまだ治療法の確立されていない難治性疾患に対する画期的な治療薬の開発へと展開していきたいと考えている。

謝辞 本稿における筆者らの研究は、科学技術振興事業団（JST）戦略的基礎研究推進事業（CREST）、「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」領域の支援の下に推進されたものであり、研究にご協力いただいた関係者の皆様に深く感謝いたします。また、薬学会シンポジウムに参加する機会を与えていただきました薬学会関係者の皆様方に改めて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Panyam J., Labhasetwar V., *Curr. Drug Deliv.*, **1**, 235–247 (2004).
- 2) Riezman H., Woodman P. G., van Meer G., Marsh M., *Cell*, **91**, 731–738 (1997).
- 3) Wattiaux R., Laurent N., Wattiaux-De Coninck S., Jadot M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 201–208 (2000).
- 4) Hayashi A., Wakita H., Yoshikawa T., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Mukai Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S., *J. Control. Release.*, **117**, 11–19 (2007).
- 5) Kondoh M., Matsuyama T., Suzuki R., Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Nakanishi M., Sato M., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1011–1013 (2000).
- 6) Kunisawa J., Nakagawa S., Mayumi T., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 177–186 (2001).
- 7) Kunisawa J., Nakanishi T., Takahashi I., Okudaira A., Tsutsumi Y., Katayama K., Nakagawa S., Kiyono H., Mayumi T., *J. Immunol.*, **167**, 1406–1412 (2001).
- 8) Kunisawa J., Masuda T., Katayama K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S., *J. Control. Release*, **105**, 344–353 (2005).
- 9) Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakanishi M., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **100**, 63–69 (1996).
- 10) Mizuguchi H., Nakanishi M., Nakanishi T., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **73**, 472–476 (1996).
- 11) Mizuguchi H., Nakagawa T., Nakanishi M., Imazu S., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 402–407 (1996).
- 12) Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 5725–5730 (1998).
- 13) Yoshikawa T., Imazu S., Gao J. Q., Hayashi K., Tsuda Y., Shimokawa M., Sugita T., Niwa T., Oda A., Akashi M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 500–505 (2004).
- 14) Yoshikawa T., Imazu S., Gao J. Q., Hayashi K., Tsuda Y., Okada N., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 105–109 (2006).
- 15) Yoshikawa T., Okada N., Tsujino M., Gao J. Q., Hayashi A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Yamamoto A., Nakagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 100–104 (2006).
- 16) Sugita T., Yoshikawa T., Gao J. Q., Shimokawa M., Oda A., Niwa T., Akashi M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biol.*

- Pharm. Bull.*, **28**, 192–193 (2005).
- 17) O'Connor T. P., Crystal R. G., *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 261–276 (2006).
- 18) Karmali P. P., Chaudhuri A., *Med. Res. Rev.*, (in press).
- 19) Templeton N. S., Lasic D. D., Frederik P. M., Strey H. H., Roberts D. D., Pavlakis G. N., *Nat. Biotechnol.*, **15**, 647–652 (1997).
- 20) Khan A., Benboubetra M., Sayyed P. Z., Ng K. W., Fox S., Beck G., Benter I. F., Akhtar S., *J. Drug Target*, **12**, 393–404 (2004).
- 21) van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A., Boon T., *Science*, **254**, 1643–1647 (1991).
- 22) Boon T., Cerottini J. C., Van den Eynde B., van der Bruggen P., Van Pel A., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 337–365 (1994).
- 23) Urban J. L., Schreiber H., *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 617–644 (1992).
- 24) Pfeifer J. D., Wick M. J., Roberts R. L., Findlay K., Normark S. J., Harding C. V., *Nature*, **361**, 359–362 (1993).
- 25) Harding C. V., Song R., *J. Immunol.*, **153**, 4925–4933 (1994).
- 26) Li Y., Ke Y., Gottlieb P. D., Kapp J. A., *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 616–624 (1994).
- 27) Huang A. Y., Golumbek P., Ahmadzadeh M., Jaffee E., Pardoll D., Levitsky H., *Science*, **264**, 961–965 (1994).
- 28) Zhou F., Huang L., *J. Drug Target*, **3**, 91–109 (1995).
- 29) Banchereau J., Steinman R. M., *Nature*, **392**, 245–252 (1998).
- 30) Machy P., Serre K., Leserman L., *Eur. J. Immunol.*, **30**, 848–857 (2000).
- 31) Kwon Y. J., James E., Shastri N., Frechet J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 18264–18268 (2005).
- 32) Mellman I., Steinman R. M., *Cell*, **106**, 255–258 (2001).
- 33) Buchsel P. C., DeMeyer E. S., *Clin. J. Oncol. Nurs.*, **10**, 629–640 (2006).
- 34) Hart D. N., *Pathology*, **33**, 479–492 (2001).
- 35) Oka Y., Tsuboi A., Taguchi T., Osaki T., Kyo T., Nakajima H., Elisseeva O. A., Oji Y., Kawakami M., Ikegame K., Hosen N., Yoshihara S., Wu F., Fujiki F., Murakami M., Masuda T., Nishida S., Shirakata T., Nakatsuka S., Sasaki A., Udaka K., Dohy H., Aozaasa K., Noguchi S., Kawase I., Sugiyama H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 13885–13890 (2004).
- 36) Weber J. S., Hua F. L., Spears L., Marty V., Kuniyoshi C., Celis E., *J. Immunother.*, **22**, 431–440 (1999).
- 37) Wang F., Bade E., Kuniyoshi C., Spears L., Jeffery G., Marty V., Groshen S., Weber J., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2756–2765 (1999).
- 38) Wei M. L., Cresswell P., *Nature*, **356**, 443–446 (1992).
- 39) Anderson K., Cresswell P., Gammon M., Hermes J., Williamson A., Zweerink H., *J. Exp. Med.*, **174**, 489–492 (1991).