

核酸医薬品の細胞選択的ターゲティングを目的とした糖修飾リポソームの開発と治療への展開

川上 茂

Development and Application of Glycosylated Particulate Carriers for Delivery of Nucleic Acid Medicine

Shigeru KAWAKAMI

Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida Shimoadachi-cho Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received May 31, 2008)

Recently several systems including viral and non-viral carriers that can be used to transfer foreign genetic material into cells have been developed with the aim of enhancing gene transfer *in vivo*. Non-viral vectors are relatively easy to produce in clinically relevant quantities, and associated with fewer safety concerns. Furthermore, synthetic non-viral vectors provide flexibility in formulation design and can be tailored to interact efficiently with DNA cargo and the specific route of vector injection, and can enhance delivery to specific tissues or cells through incorporation of a targeting ligand. Applying cell-specific targeting technology to liposomes would improve *in vivo* gene transfection efficacy and reduce any unexpected side-effects. Among the various receptors, asialoglycoprotein receptors and mannose receptors are the most promising for gene targeting since they exhibit high affinity and are rapidly internalized. Receptor-mediated delivery systems are able to introduce foreign DNA into specific cell types *in vivo*. Our group succeeded in the development of glycosylated cationic liposomes for cell-selective targeting of plasmid DNA, siRNA, and NFκB decoy based on the optimization of physicochemical properties of glycosylated liposome complex.

Key words—gene delivery; gene therapy; siRNA; drug delivery system; liposomes

1. はじめに

遺伝子治療は、将来の医療の主要な技術として、先天的に遺伝的に欠損のある細胞に正常な遺伝子を導入する治療法のみならず、後天的な難治性の疾患に対する有効な治療法となることが期待されている。遺伝子治療疾患でみると、臨床試験の大部分（約 66.5%）は、がんを対象として実施されている。¹⁾ また、臨床での遺伝子治療における遺伝子導入ベクターにおいて、約 2/3 は、依然としてウイルス性ベクターであるが、最近では非ウイルスベクターが一般的に使用されるようになってきている。¹⁾ 最も単純な非ウイルスベクターによる核酸導入システムは、naked DNA の組織への直接注入²⁾

や組織への圧力を利用する^{3,4)} 方法であり、臨床試験の全体の約 18% を占めるに至っている。また、臨床試験が行われた非ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法としては、カチオン性リポソームの局所投与が報告されている。しかしながら、naked DNA やカチオン性リポソームによる核酸導入法では、標的の細胞への導入を制御することは難しい。したがって、広範囲な難治性疾患に対する遺伝子治療法構築に向けては、核酸医薬品のドラッグデリバリーシステム（DDS）中でも、細胞選択的ターゲティングシステムの構築が必要不可欠である。低分子物質は生体内を自由に拡散し、全身に様に分布するのに対し、高分子物質の各部位間の移行は種々の生体バリアで妨げられる。したがって、最適な物理化学的性質を持つ DDS キャリアを用い、生体内の特定細胞に高い親和性を有する物質を導入することで細胞レベルでの精密な核酸ターゲティングが可能となる。^{2,3)} 糖鎖認識機構は、特定の細胞に発現

京都大学大学院薬学研究科（〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29）

e-mail: kawakami@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して論述したものである。

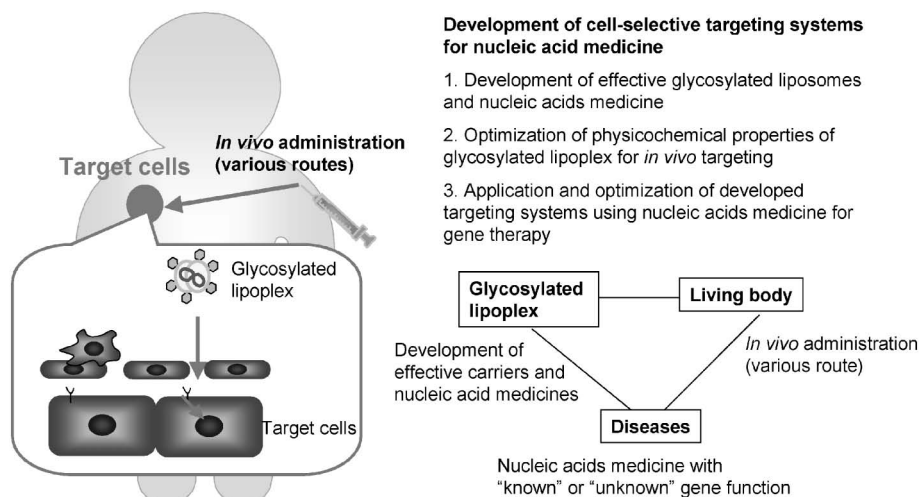


Fig. 1. Concept of Development and Application of Glycosylated Particulate Carriers for Delivery of Nucleic Acid Medicine

し、また厳密な基質認識性を有することから、細胞選択的核酸ターゲティングへの利用が期待できる。しかしながら、精密な標的細胞内への送達に必要な核酸医薬品を遺伝子治療へと展開して薬として幅広く展開していくためには、生体内で有効に機能する糖修飾リポソームの開発、様々な投与経路における核酸医薬品のターゲティング効率の評価、病態動物を用いた治療効果との関連性に関する情報が必要不可欠である (Fig. 1)。そこで本稿では、我々が開発した核酸医薬品の細胞選択的ターゲティングを目的とした糖修飾リポソームの開発と治療への展開について論述する。

2. 糖修飾リポソームの開発

糖鎖認識機構を利用した *in vivo* 細胞選択的核酸ターゲティングでは、生体内で有効に機能する糖修飾リポソームの開発と最適化が重要である。そこで、糖修飾リポソームとして、糖脂質の安定なリポソーム膜への保持、レセプターとの認識に重要な高密度な糖鎖の導入を可能とする新規ガラクトース、マンノース、及びフコース修飾コレステロール誘導体 Gal-C4-Chol, Man-C4-Chol, Fuc-C4-Chol を合成し、本物質により表面修飾した糖修飾リポソームの体内動態に関する評価を行った。^{4,5)} Gal-C4-Chol, Man-C4-Chol の機能に関して、L- α -distearoyl phosphatidylcholine と cholesterol から構成される中性リポソームに Gal-C4-Chol, Man-C4-Chol, Fuc-C4-Chol を用いて糖修飾を施した。マウスへ静脈内投与後、10分間で約80%もの肝臓への集積があり、

レセプターが存在する細胞での結合が認められた。また、糖修飾牛血清アルブミンを同時投与したところ、有意な結合阻害効果が認められ、レセプター介在性エンドサイトーシスを介した機構で標的細胞に取り込まれている可能性が示された。また、細胞選択的ターゲティングに及ぼす糖修飾リポソームを構成する脂質組成の影響に関して、リポソーム膜上の糖密度⁶⁾やリポソーム構成脂質中のコレステロール含量⁷⁾がターゲティング効率に大きな影響を及ぼすことが示された。さらに、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質を糖修飾リポソームへ導入することで PEG の分子量や導入量に応じてターゲティング効率が変化することを体内動態解析により明らかにした。⁸⁾ 同じ現象は、リガンドを basic fibroblast growth factor 結合リポソーム⁹⁾に PEG 脂質を導入した際にも認められた。¹⁰⁾ また、投与経路の影響に関して、マンノース修飾リポソームの気道内投与は、マンノースレセプター介在性エンドサイトーシスによる結合に基づく高い肺胞マクロファージへのターゲティングが可能であった。¹¹⁾ さらに本物質による修



川上 茂

京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野助教。博士(薬学)。1999年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程中退後、長崎大学薬学部助手、京都大学大学院薬学研究科助手を経て、2007年4月より現職。日本薬物動態学会奨励賞、万有薬剤学奨励賞など受賞。研究領域はターゲティング法の開発。好きなものは芋焼酎、海、南国。

飾は、O/W エマルションの糖修飾に基づく細胞選択的ターゲティングにも有効であることが示された。¹²⁻¹⁴⁾ 以上、レセプター介在性エンドサイトーシスを利用して生体内で細胞選択的に取り込まれる糖修飾微粒子キャリアの開発に成功した。

ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA は、発光により簡便かつ高感度な導入効率の評価が動物において可能である。また、糖修飾カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体（糖修飾リポプレックス）の導入効率と体内動態の関連から得られた情報は、物理化学的性質を基に一般化することで、オリゴヌクレオチドへと応用することができる。そこで次に、糖修飾リポプレックスを用い、物理化学的性質の最適化による細胞選択的遺伝子ターゲティングシステムの開発を行った。

3. ガラクトース修飾リポプレックスの物理化学的性質の最適化による細胞選択的ターゲティング

高分子医薬品の体内動態を規定する因子として、高倉、橋田らは、電荷や粒子径といった物理化学的性質の制御が重要であることを明らかにしている。²⁾ したがって、正電荷を有する糖修飾カチオン性リポソームと負電荷を有するプラスミド DNA から形成される複合体（糖修飾リポプレックス）はその混合比により物理化学的性質が変化し、その結果、体内分布や遺伝子発現に影響が出る考えられる。

肝臓は、生体における物質代謝の中樞を担う臓器であり、数多くの酵素が存在している。先天的にこれらのいずれかの酵素に異常が生じた場合、重大な代謝障害が生じて疾患が引き起こされる。したがって、肝臓実質細胞への効率的な核酸導入法の開発は遺伝子治療を実施するために重要である。ガラクトース修飾リポプレックスの肝臓実質細胞選択的遺伝子導入は、門脈内投与により可能であったが、物理化学的性質の変化に大きな影響を受けることを明らかにした。電荷の影響に関しては糖修飾リポプレックスの電荷比（- : +）が 1.0 : 2.3-1.0-3.1 の範囲^{15,16)} 粒子径の影響に関しては、141 nm > 179 nm > 235 nm の順で、¹⁷⁾ 肝臓実質細胞選択的遺伝子導入が可能であった。また、ガラクトース修飾リポプレックスにヒスチジンを導入することでプラスミド DNA のエンドソームからの脱出が促進され遺伝子導入能が改善できることが示唆されている。¹⁸⁾

ガラクトース修飾リポプレックスは、生体内に投

与後、血清タンパク、赤血球などの生体成分と静電的に相互作用すると考えられる。そこで、複合体と血液成分との相互作用に関して詳細な検討を行った。¹⁹⁾ Carboxyfluorescein 標識プラスミド DNA と rhodamine 標識リポソームとの複合体を血液とインキュベーションしたところ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の解消が観察されたのに対し、先に血清と混合後、赤血球とインキュベーションした際には顕著な FRET の解消が認められなかった。また、複合体を血液とインキュベーションした場合には、血清とプレインキュベーションした場合に比べ、顕著なプラスミド DNA の分解が観察された。以上、複合体と血清タンパクとの相互作用は極めて強固である一方、複合体が赤血球と相互作用する際には複合体からプラスミド DNA が放出されることが示唆された。さらに、複合体をマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、血清とのプレインキュベーションにより遺伝子発現の顕著な増大が認められた。これは、赤血球との相互作用による複合体からのプラスミド DNA の放出並びに分解が抑制された為と考えられる。一方、直鎖型ポリエチレンイミンとプラスミド DNA 複合体は、赤血球とインキュベーションした際に凝集を起し難い。そこで、直鎖型ポリエチレンイミンのこのような性質を利用して肝臓実質細胞選択的ターゲティングを行うため、負電荷を有するガラクトース修飾牛血清アルブミンと正電荷を有する直鎖型ポリエチレンイミン/プラスミド DNA 複合体を混合することでガラクトース修飾牛血清アルブミン/直鎖型ポリエチレンイミン/プラスミド DNA 複合体を調製したところ、静脈内投与において、肝臓での遺伝子導入の改善が認められた。²⁰⁾

一方、複合体形成時における分散溶媒のイオン濃度は、カチオン性リポソーム及びプラスミド DNA の表面電荷ひいては複合体の凝集に影響を与えると考えられる。²¹⁾ そこで、溶媒中イオン濃度を精密に設定することによって複合体の物理化学的性質の制御を試み、体内動態及び遺伝子発現への影響について検討した。²²⁾ グルコースと塩化ナトリウムからなる等張溶液中における各種ガラクトース修飾リポプレックスの粒子径を測定した結果、低濃度（5 mM）の塩化ナトリウム存在下複合体の粒子径は最小となり、そのときの平均粒子径は 120 nm であった。ま

た、5 mM 塩化ナトリウム存在下調製したガラクトース修飾リポプレックスの場合には、通常のグルコースのみからなる溶媒で調製した場合に比べ、生理食塩水で希釈した際の凝集速度が小さくなることが示された。肝灌流実験系において両複合体の肝局所動態を評価したところ、5 mM 塩化ナトリウム存在下調製したガラクトース修飾リポプレックスでは組織結合性が高くなり、肝実質細胞への移行性が増大する傾向にあった¹⁶⁾。そこで両複合体をマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、5 mM 塩化ナトリウム存在下調製したガラクトース修飾リポプレックスでは、遺伝子発現が顕著に増大し、標的の肝実質細胞で高い値を示した。以上、溶媒中のイオン濃度によりガラクトース修飾リポプレックスの物理化学的性質を制御することで、組織移行性及び細胞内動態を改善し、遺伝子導入効率を改善できることが示された。

RNAi (RNA interference) は、細胞内において短鎖の二本鎖 RNA (short interference RNA; siRNA) が、目的とするタンパクの遺伝子発現を特異的に抑制するため、アンチセンス DNA に変わる実験手法や治療薬候補として期待されている。しかしながら *in vivo* における siRNA の利用は、ヌクレアーゼによる分解や、低い細胞膜透過性が問題となっており、そのデリバリー法の確立が重要である。²³⁾ 最近我々は、siRNA とガラクトース修飾カチオン性リポソームの複合体では、平均粒子径約 75 nm の複合体を調製可能であり、静脈内投与において、肝臓実質細胞への選択的ターゲティングに基づく遺伝子ノックダウンが可能であることを明らかにした。²⁴⁾ これは、siRNA 複合体とプラスミド DNA 複合体のそれぞれの粒子径の違いにより、静脈内投与での siRNA/ガラクトース修飾リポソームによる適用が可能になったためと考えられる。

4. マンノース修飾リポプレックスの物理化学的性質の最適化による細胞選択的ターゲティング

マンノース修飾リポプレックスを用いると静脈内投与においてマンノースレセプターが発現する Kupffer 細胞や類洞血管内皮細胞が存在する肝非実質細胞選択的に遺伝子導入が可能であった。²⁵⁾ ガラクトース修飾リポプレックスでは、肝臓実質細胞へ到達するためには類洞を通過する必要があり、一方で、Kupffer 細胞や類洞血管内皮細胞は、類洞を通

過する必要がない。このため、リガンドの違いで同じ物理化学的性質 [平均粒子径約 120–150 nm, 電荷比 (− : +) 1.0 : 2.3] を持つキャリアであっても、マンノース修飾リポプレックスが肝臓の非実質細胞に選択的な遺伝子キャリアとして働き静脈内投与でも有効であることが示唆された。マンノース修飾リポプレックスの肝臓実質細胞選択的遺伝子導入における電荷の影響に関してはガラクトース修飾リポプレックスの場合と同様に電荷比 (− : +) が 1.0 : 2.3–1.0 : 3.1 の範囲で有効であった。²⁶⁾ また、マンノース修飾リポプレックスの静脈内投与による細胞選択的遺伝子導入においては、マンノース修飾カチオン性リポソームを構成する脂質組成中、中性脂質の選択によって影響されることが明らかとなった。²⁷⁾

マンノース修飾リポプレックスの遺伝子発現効率は、抗原提示細胞 (APC) への取り込みと安定性、そして非標的細胞への移行性など複数の因子のバランスにより決定される。腹腔内投与は、血管内投与に比べ投与後の滞留性と安定性の改善が期待できるとともに、腹腔内及びリンパ節内に存在する多数の APC への遺伝子導入が可能と考えられる。そこで、遺伝子発現を定量的かつ簡便に評価できるホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミド DNA (pCMV-Luc) を用い、マンノース修飾リポプレックスの腹腔内投与による APC に対する遺伝子導入効果を評価した。²⁸⁾ 腹腔内投与後、APC が多数存在する肝臓、脾臓、リンパ節などの組織及び腹腔滲出細胞 (PECs) においてマンノース修飾リポプレックスは未修飾リポプレックスに比べ、2–10 倍高い遺伝子発現を示した。また、脾臓や肝臓など APC が多数存在する臓器における遺伝子発現レベルは、静脈内投与よりいずれの臓器においても 10 倍以上高く発現期間も 2 倍以上持続できることが明らかとなった。さらに、腹腔内投与後に脾臓及び PECs より単離精製した APC における遺伝子発現活性を測定した結果、マンノース修飾リポプレックスは、未修飾リポプレックス及び naked プラスミド DNA に比べ、有意に高い遺伝子発現を示した。以上、マンノース修飾リポプレックスの腹腔内投与は、腹腔内組織及び細胞中に存在する APC に対して効率的かつ持続的に遺伝子発現が得られることから、DNA ワクチン製剤の投与方法として有効であ

ることが示された。

次に、pCMV-OVA を用い腹腔内投与後の免疫誘導効果に関して検討を行った。まず、非ウイルスベクターでも代表的なカチオン性リポソームとポリエチレンイミン (PEI) 複合体の免疫活性化を調べたところ、リポプレックスでは PEI ポリプレックスに比べ、高い自然免疫系の活性化を示した。²⁹⁾したがって、リポプレックスを基盤とした遺伝子導入法は、DNA ワクチン療法においては有利であると考えられる。マンノース修飾リポプレックスを腹腔内投与後、脾臓及び PECs より APC を単離し、OVA の遺伝子の発現レベルを細胞レベルで評価した結果、マンノース修飾リポプレックスは naked プラスミド DNA 及び未修飾リポプレックスと比べ、顕著に高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。³⁰⁾ また、複合体投与後の OVA 特異的 CTL 活性を評価した結果、naked プラスミド DNA 及び未修飾リポプレックスの腹腔内投与や従来の感作法である naked プラスミド DNA の筋肉内投与と比べて、強力な CTL 活性を誘導できることが示された。さらに、がん治療における有用性を評価することを目的に、免疫感作後に OVA 発現がん細胞 E.G7-OVA 細胞あるいはその親株 EL4 細胞を皮下へ移植し、がん細胞移植後の生存日数を評価した結果、マンノース修飾リポプレックス投与群では、naked プラスミド DNA 及び未修飾リポプレックス腹腔内投与群や naked プラスミド DNA 筋肉内投与群と比べ、OVA 発現がん細胞 E.G7-OVA 細胞特異的に生存日数が大きく延長するとともに、一部ではがんの完全拒絶が認められた。また、本方法は、メラノマ関連抗原発現プラスミドを用いたメラノマに対する DNA ワクチン³¹⁾や免疫活性化能を有する CpG DNA を用いた腹膜播種治療³²⁾においても有効であった。以上、マンノース修飾リポプレックスの腹腔内投与により、リンパ管内の免疫担当細胞への遺伝子・核酸ターゲティングが可能であり、がん免疫療法への展開が期待できることが示された。

一方、配列依存的に標的タンパク質発現の抑制可能なデコイ型核酸は、炎症の治療に対して臨床応用が開始されている。しかしながら、標的細胞への集積の低さから単独投与では治療効果が得られず、その使用は局所投与に限られている。³³⁾ 簡便で汎用性のある静脈内投与による治療法の確立には細胞選択

的送達法の開発が必要である。炎症治療において NF κ B 活性化抑制による炎症性サイトカインやケモカインなど炎症関連分子産生抑制の標的細胞となる、マクロファージや Kupffer 細胞への NF κ B の転写活性抑制可能な核酸医薬品 NF κ B デコイの細胞選択的送達法の開発を行った。まず、マクロファージへの選択的送達を目的にマンノース修飾リポソーム/NF κ B デコイ複合体を調製したところ、平均粒子径は約 70 nm であり上述した siRNA の場合とほぼ同程度であった。NF κ B デコイ/マンノース修飾リポプレックスをマウスの静脈内より投与したところ、速やかに高い肝臓、脾臓への高い集積が認められた。³⁴⁾ 高い肝臓への集積は NF κ B デコイ/非修飾リポプレックスとの複合体を投与した場合と比較し有意に高かった。³⁵⁾ 次に治療効果の評価を目的に LPS 誘発性の急性肝炎モデルマウスを用いて、治療効果の評価したところ、血清中サイトカイン濃度並びに ALT/AST 活性の有意な抑制効果及び肝臓の細胞内 NF κ B 活性化の有意な抑制効果が認められた。³⁴⁾ 肝疾患においては、Kupffer 細胞からの炎症関連分子の発現が炎症の悪化に関連することが知られている。そこで、Kupffer 細胞に特異的に発現しているフコースレセプターによるエンドサイトーシスを利用した Kupffer 細胞選択的ターゲティングシステムの開発を行った。NF κ B デコイ/マンノース修飾リポプレックスと比較し NF κ B デコイ/フコース修飾リポプレックス投与では、肝非実質細胞への高い取り込みが確認された。³⁶⁾ よって、NF κ B デコイ/フコース修飾リポプレックスによる Kupffer 細胞選択的ターゲティングが可能であり、NF κ B 活性化に起因する肝炎治療へ応用可能であることが示唆された。

5. おわりに

生体内で有効に機能する新規糖修飾リポソームの開発及び糖修飾リポプレックスの物理化学的性質の最適化を通じて遺伝子・核酸医薬品の細胞選択的ターゲティングに成功した。また、がん免疫療法や炎症治療へと応用可能であることが示唆された。今後、得られた知見を基に、細胞選択的ターゲティングシステムの効率化や持続導入化を通じて遺伝子治療可能な疾患の拡大に努めたいと考えている。最近、筆者らは、腎臓へプレスを加えることで naked プラスミド DNA や naked siRNA を効率的に導入

することに成功している。³⁷⁾ そこでこれら生体での様々なターゲティング技術を駆使して、既知のみならず未知の遺伝子を標的・対象とした遺伝子・核酸医薬品やその組み合わせによる革新的な遺伝子機能解析・治療法の開拓も進める予定である。本研究で得られた知見が難治性疾患に対する新規治療法開発の一助となれば幸いである。

謝辞 本稿で紹介した研究は、すべて京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野で行われたものであり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました橋田 充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、研究に御助言を戴いた山下富義准教授、西川元也准教授に謹んで深く感謝の意を表します。最後に、研究に御協力頂きました薬品動態制御学分野、麓伸太郎博士、樋口ゆり子博士、服部芳幸博士をはじめとした大学院生、学部学生の皆様に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Edelstein M.-K., Abedi M.-R., Wixon J., *J. Gene Med.*, **9**, 833–842 (2007).
- 2) Takakura Y., Hashida M., *Pharm. Res.*, **13**, 820–831 (1996).
- 3) Hashida M., Kawakami S., Yamashita F., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 871–880 (2005).
- 4) Kawakami S., Wong J., Sato A., Hattori Y., Yamashita F., Hashida M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1524**, 258–265 (2000).
- 5) Kawakami S., Munakata C., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 105–113 (2001).
- 6) Managit C., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **94**, 2266–2275 (2005).
- 7) Murao A., Nishikawa M., Managit C., Wong J., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **19**, 1808–1814 (2002).
- 8) Ishida E., Managit C., Kawakami S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **21**, 932–939 (2004).
- 9) Terada T., Mizobata M., Kawakami S., Yabe Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Target.*, **14**, 536–545 (2006).
- 10) Terada T., Mizobata M., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **119**, 262–270 (2007).
- 11) Wijagkanalan W., Kawakami S., Takenaga M., Igarashi R., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **125**, 121–130 (2008).
- 12) Managit C., Kawakami S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Int. J. Pharm.*, **266**, 77–84 (2003).
- 13) Yeeprae W., Kawakami S., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Target.*, **13**, 1–9 (2005).
- 14) Yeeprae W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **114**, 193–201 (2006).
- 15) Kawakami S., Fumoto S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **17**, 306–313 (2000).
- 16) Fumoto S., Nakadori F., Kawakami S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **20**, 1452–1459 (2003).
- 17) Higuchi Y., Kawakami S., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1521–1523 (2006).
- 18) Shigeta K., Kawakami S., Higuchi Y., Okuda T., Yagi H., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **118**, 262–270 (2007).
- 19) Fumoto S., Kawakami S., Shigeta S., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 484–493 (2005).
- 20) Hohokabe M., Higuchi Y., Mukai H., Kawakami S., Hashida M., *J. Biomed. Nanotech.*, **3**, 277–284 (2007).
- 21) Kawakami S., Ito Y., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **7**, 1526–1533 (2005).
- 22) Fumoto S., Kawakami S., Ito Y., Shigeta K., Yamashita F., Hashida M., *Mol. Ther.*, **10**, 719–729 (2004).
- 23) Kawakami S., Hashida M., *Drug Metabol. Pharmacokinet.*, **22**, 142–151 (2007).
- 24) Sato A., Takagi M., Shimamoto A., Kawakami S., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 1434–1442 (2007).
- 25) Kawakami S., Sato A., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Gene Ther.*, **7**, 292–299 (2000).
- 26) Kawakami S., Hattori Y., Lu Y., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *Pharmazie*, **59**, 405–408 (2004).
- 27) Hattori Y., Suzuki S., Kawakami S.,

- Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **108**, 484–495 (2005).
- 28) Hattori Y., Kawakami S., Nakamura K., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 828–834 (2006).
- 29) Kawakami S., Ito Y., Charoensit P., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 1382–1390 (2006).
- 30) Hattori Y., Kawakami S., Lu Y., Nakamura K., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **8**, 824–834 (2006).
- 31) Lu Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 3255–3262 (2007).
- 32) Kuramoto Y., Kawakami S., Zou S., Fukuda K., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **10**, 392–399 (2008).
- 33) Kawakami S., Higuchi Y., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 726–745 (2008).
- 34) Higuchi Y., Kawakami S., Oka M., Yabe Y., Yamashita F., Hashida M., *FEBS Lett.*, **580**, 3707–3714 (2006).
- 35) Higuchi Y., Kawakami S., Oka M., Yamashita F., Hashida M., *Pharmazie*, **61**, 144–147 (2006).
- 36) Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 532–539 (2007).
- 37) Mukai H., Kawakami S., Hashida M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**, 383–387 (2008).