

新しいアセンブリー技術による多様な多機能性エンベロープ型 ナノ構造体 MEND の構築

小暮健太郎,^{*,a} 秋田英万,^b 原島秀吉^b

Development of Various Multifunctional Envelope-type Nano Device MEND Based on Novel Assembly Technologies

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

^aKyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414,
Japan, and ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,
Kita12, Nishi6, Kita-ku Sapporo 062-0812, Japan

(Received September 18, 2007)

Non-viral vectors need to overcome several barriers such as the plasma membrane, the endosomal membrane and the nuclear membrane for efficient gene delivery to the nucleus of target cells. To overcome these obstacles, the delivery system must be equipped with various functional devices. However, it is difficult to package all these needed devices into a single system to exert each of their functions at the appropriate time and at the correct location. Thus, our group proposed a new packaging concept, “Programmed Packaging”. A multifunctional envelope-type nano device (MEND) was developed for use as an efficient non-viral system for the delivery of plasmid DNA (pDNA), oligodeoxynucleotide (ODN) and siRNA. Various types of MEND were developed as to strategy and situations. For example, the octaarginine (R8)-modified MEND (R8-MEND) encapsulating pDNA showed significantly high transfection activity comparable to adenovirus, and the up-take pathway of the R8-MEND was macropinocytosis, which can avoid lysosomal degradation. The R8-MEND successfully delivered a gene to hair follicles of mouse skin by *in vivo* topical application. Consequently, our group succeeded in the development of the MEND based on the Programmed Packaging, and found this to be a promising new delivery system of pDNA and functional nucleic acids.

Key words—gene delivery; non-viral; gene therapy

1. はじめに

これまでも多数の人工遺伝子デリバリーシステムが開発されてきたが、ウイルスを凌駕するような画期的なシステムが開発されるまでには至っていない。その理由は、ウイルスのような高次な構造を有する構造体を構築する技術が開発されていなかったことが一因であると考えられる。われわれは、ウイルスに近付ける高次な構造を有するものを作り出すために、新しいコンセプトを提唱し、それを実現可能な新しいアセンブリー技術の開発を行ってきた。いまだ開発途上ではあるが、これまでにない新しいアセンブリー技術を駆使することで高い機能性を有

する人工遺伝子デリバリーシステムを構築することに成功している。本稿では、われわれが開発した新しいアセンブリー技術とそれを駆使して構築した新規なデリバリーシステムについて紹介させて頂く。

2. 人工遺伝子デリバリーシステム構築のための新しいコンセプト Programmed Packaging

外来の遺伝子を、人工遺伝子デリバリーシステムにより目的の臓器・組織まで送達し、標的となる細胞の核内にまで移行させるには、多くの障壁を突破する必要がある。例えば、静脈内にデリバリーシステムを投与した場合には、細網内皮系による捕捉を回避しながら組織に到達したのち、血管壁を乗り越えて組織内に侵入し、標的細胞に結合しなければならない。さらに、標的細胞においてエンドサイトーシスなどの取り込みメカニズムによって細胞内に取り込まれた場合には、エンドソームなどの細胞内小胞から脱出したのち、最終的には2枚の核膜を突破

^a京都薬科大学 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5), ^b北海道大学大学院薬学研究院 (〒062-0812 札幌市北区北12条西6丁目)

*e-mail: kogure@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS6で発表したものを中心に記述したものである。

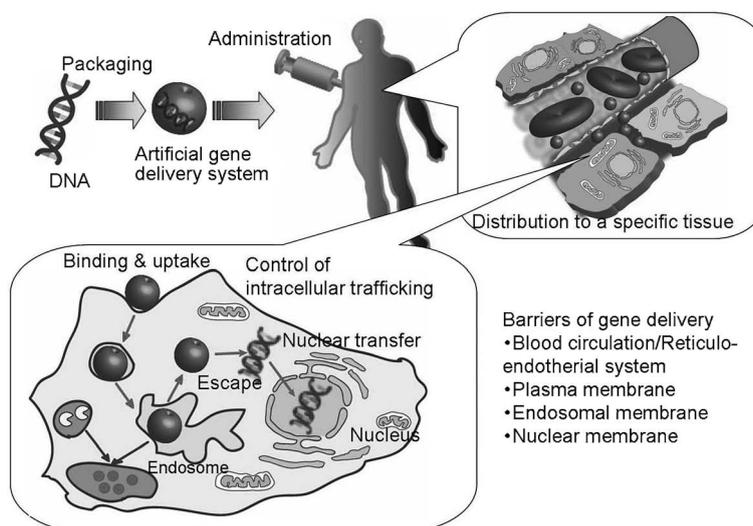


Fig. 1. Various Barriers of Efficient Gene Delivery by Artificial Delivery System

する必要がある (Fig. 1).¹⁾ このように、体内及び細胞内における多くの障壁を突破し、効率よく外来遺伝子を送達するためには、体内動態及び細胞内動態を積極的に制御する必要がある。そのために、多くの機能性素子がこれまで開発されてきた。²⁾ 例えば、親水性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) は、リポソームなどのナノ粒子表面に修飾することによって、粒子表面に水和水の層を形成することで、細網内皮系による認識を回避しナノ粒子の血中滞留性を向上させることが可能である。^{3,4)} また、特定の細胞表面に発現しているレセプターに認識されるリガンドや抗体を用いることにより、標的細胞への特異的な送達が可能になる。^{4,5)} さらに、細胞に取り込まれたのちのエンドソーム脱出を促進するために、エンドソーム内の環境変化 (酸性化) に応答してエンドソーム膜との膜融合を促進する pH 感受性膜融合性ペプチド (インフルエンザ HA タンパク質由来のペプチドや合成ペプチドなど) や、²⁾ 流入するプロトンを吸収する効果 (プロトンスポンジ効果) によってエンドソーム膜を破壊するポリエチレンジアミンなどの合成高分子化合物などが開発されている。⁶⁾ また、細胞内物質が核移行する際にインポーチンなど核内輸送因子により認識されるシグナル配列を基にして、積極的な核移行を促進するための多種類の核移行シグナルペプチドが開発されている。^{2,7)} これらの多彩な機能性素子は高い機能を有しており、各素子が適切なタイミングと場所において各々の機能を十分に発揮することによって、人工

遺伝子デリバリーシステムの体内動態と細胞内動態の制御が可能になる。

従来の人工遺伝子デリバリーシステムは、2種類に大別できるであろう。1つは、カチオン性高分子とプラスミド DNA との複合体である polyplex である。^{8,9)} 代表的なものとしては、ポリ-L-リジン (PLL) やポリエチレンジアミン (PEI) とプラスミド DNA からなる複合体が知られている。PLL は最も古くから用いられている合成高分子であり、⁸⁾ PEI はプロトンスポンジ能を有する点で優れており現在においても広く用いられている。⁶⁾ また、スペルミンやプロタミンなどの生体由来ポリカチオンも古くから用いられており、特に硫酸プロタミンは PLL に比べて非常に高いトランスフェクション活性を示すことが報告されている。¹⁰⁾ 現在でも、様々な機能性を有する合成高分子や生体由来高分子が開発されており、マテリアルサイエンス領域における人工遺伝子デリバリーシステム開発研究の中核を成している。^{8,9)} もう1つは、カチオン性脂質を含むリポソームとプラスミド DNA との複合体である



小暮健太郎

京都薬科大学薬品物理化学分野教授。博士 (薬学) 1994 年徳島大学大学院薬学研究科修了後、富山医科薬科大学 (現富山大学) 薬学部助手、徳島大学薬学部助手、CREST 博士研究員、北海道大学薬学部特任講師を経て、2007 年 4 月より現職。研究領域は生体膜と遺伝子デリバリー。好きなものは、STAR TREK、ホークス、酒。

lipoplex である。Felgner らによって *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA) による細胞への遺伝子導入が報告されて以来,¹¹⁾ 様々な合成カチオン性脂質が開発されている。⁹⁾ 現在市販されている遺伝子導入試薬の大半が、カチオン性脂質をベースとしたものであることから、その有用性を伺うことができる。

先に述べたように、これらの人工遺伝子デリバリーシステムは、体内動態や細胞内動態を制御することによって遺伝子送達効率を向上させる必要があるが、前述の機能性素子を単独若しくは複数組み合わせることで組み込んだデリバリーシステムが開発されている。例えば、PEI にがん細胞への標的化のためのリガンドとしてトランスフェリン (Tf) を付与するとともに、polyplex の血中滞留性を向上させるために PEG を修飾したものが開発されている。¹²⁾ また、カチオン性リポソームにインフルエンザウイルス由来の pH 応答性膜融合タンパク質ヘマグルチンを組み込むことで、エンドソーム脱出を促進した lipoplex も報告されている。¹³⁾ しかしながら、従来の人工遺伝子デリバリーシステムは、ほとんどが DNA/ポリカチオンと機能性素子の「単純な混合」によって調製されたものであり、機能性素子とその機能を十分に発揮できるような「トポロジー」を保持できているか否かは定かではない。

人工遺伝子デリバリーシステムに搭載した多くの機能性素子を適切なタイミングと場所において機能させるためには、それらが機能を発揮可能な最適なトポロジーを制御した形で、ナノサイズのデリバリーシステム上に搭載することが重要になる。しかし、従来の人工デリバリーシステムは、デリバリーシステム調製時に機能性素子のトポロジーを制御し適切な時間と場所で機能させることは不可能であった。なぜなら、上述のように「単純な混合」では、1 種類の機能性素子ですらその配置を意図的に制御することは困難であるため、複数種の機能性素子をウイルスのように緻密に組み込むためには画期的な構築方法が必要である。

ウイルスを考えたとき、例えばアデノウイルスは、細胞表面に存在するレセプター coxsackie and adenovirus receptor (CAR) とインテグリンに結合するためのリガンド (fiber) がウイルス粒子表面に装備されており、それらが細胞表面に結合すること

でエンドサイトーシスが誘起され、細胞内に取り込まれる。¹⁴⁾ さらに細胞内に取り込まれたのち、ウイルスの部分的崩壊によって遊離したカプシドタンパク質 VI とエンドソーム膜との相互作用によって効率よくエンドソーム脱出を行う。エンドソーム脱出を果たしたアデノウイルスは、細胞内の微小管を利用して核膜孔まで到達し、カプシドを崩壊させることにより、ウイルスゲノムを核内に導入することができる。¹⁴⁾ このように、ウイルスは核の中まで遺伝子を送達する戦略 (感染メカニズム) を実現し易いように、高次の構造を有するとともに機能性素子が緻密に配置されている。そのため、われわれはウイルスに学び、デリバリーの戦略の詳細を明確にすることによって、各素子が機能を発揮すべき時間と場所が明らかとなり、それを実現するための機能性素子の配置とトポロジーが精密に設計され、その設計に基づいた確実な構築 (パッケージング) がなされるべきであると考え、人工遺伝子デリバリーシステムの新しいパッケージングコンセプトとして Programmed Packaging を提唱している。¹⁵⁾

われわれの提唱する Programmed Packaging は、3 つの要素から構成されている。すなわち、1) デリバリーシステムの体内動態及び細胞内動態の詳細な解析に基づいた様々な障壁を突破するための戦略の立案 (Programming)、2) 戦略の達成に必要な新規な機能性素子の創製、並びに機能性素子の十分な機能発揮に必要な 3 次元的配置を考慮したデリバリーシステムの設計 (Molecular design)、3) 高度な設計を具現化するために新規技術を駆使したデリバリーシステムの構築 (Packaging) である。一見当たり前のように感じるかもしれないが、従来は戦略・設計を具現化できるだけの構築技術が確立されていなかったため、実際に順序立てて開発された高次の構造を有する「ウイルスのような」デリバリーシステムは皆無である。

3. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体 MEND

われわれは、Programmed Packaging を実現するためには、デリバリーシステムの基本構造が重要であると考えた。多種類の機能性素子のトポロジー制御が容易であり、送達されるべき積荷とキャリアーが独立した構造が有利であると考えた。このような観点からわれわれは、エンベロープ型ウイルスに着目した。例えば、知名度の高いエンベロープ型ウイ

ルスであるインフルエンザウイルスは、積荷であるウイルスゲノムとデリバリー（感染）に必要な機能（細胞への取り込みと細胞質への脱出）が独立している。インフルエンザウイルスは、エンベロープ表面に提示されているヘマグルチニン（HA）によって細胞表面のシアル酸含有糖タンパク質等に結合し、クラスリン介在性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたのち、エンドソーム内 pH の低下に伴いウイルスエンベロープとエンドソーム膜との融合が誘起され、内部のリボヌクレオタンパク質複合体（RNP）が細胞質に放出される。¹⁴⁾ 放出された RNP は、細胞内の核移送タンパク質であるインポーチンに認識され、核内に送達される。このように、エンベロープ型ウイルスであるインフルエンザウイルスは、細胞への取り込みとエンドソーム脱出までをエンベロープが、核移行を内部キャプシドが担っており、きちんと役割分担がされているため、高度で緻密な細胞内動態が可能になっていると思われる。そのため、われわれは Programmed Packaging の実現には、インフルエンザウイルスに代表されるエンベロープ型ウイルスの構造が最適であると考えた。

このエンベロープ/コア構造を基本に、Fig. 2 に示すような、ナノ粒子化された機能性核酸コア（プラスミド DNA、アンチセンスオリゴ DNA、及び siRNA など）を、脂質エンベロープ膜（リボソーム膜）によって包み込んだ人工のデリバリーシステムを設計した。中心のナノ粒子コアは、その表面でエンベロープ膜と相互作用しているが、強固な化学結合を形成している訳ではなく、互いに独立している。さらにエンベロープ膜は、種々の機能性素子（例えば血中滞留性向上を目的とした PEG、標的化を可能にする特異的リガンド分子、細胞への取り込み促進を期待した細胞膜透過性ペプチド、エンドソームからの脱出促進を目的とした膜融合性素子など）によって修飾されており、それらは送達戦略に添った形で配置されている。また、ナノ粒子化コアにも種々の機能性素子を修飾可能である。例えば、核移行を促進するための核局在化シグナルペプチド NLS や、細胞内・核内環境に応答してナノ粒子を崩壊させるための環境応答性高分子などである。われわれは、Programmed Packaging に基づいて設計したこのデリバリーシステムを、多機能性を有して

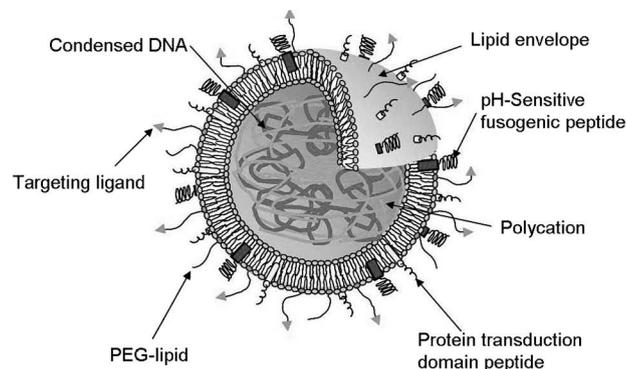


Fig. 2. Schematic Representation of Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND)

The MEND consists of condensed nucleotides core, coated with a lipid envelope equipped with functional devices, such as polyethylene glycol (PEG) for long blood circulation, pH-sensitive fusogenic peptide for endosomal escape and protein transduction domain peptide for cellular entry.

おりエンベロープ構造からなるナノメートルサイズの人工構造体という意味を込めて「多機能性エンベロープ型ナノ構造体：Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND)」と命名した。¹⁶⁾

Programmed Packaging において、まず送達戦略の立案 (Programming) を行う訳であるが、Programming において、細胞内導入経路の選択は、遺伝子デリバリーシステムの細胞内運命を左右するため重要である。われわれは従来の遺伝子デリバリーシステムと同様の経路であるレセプター介在性エンドサイトーシス経路と、通常のエンドサイトーシスとは異なる経路（非エンドサイトーシス経路）を介して遺伝子を送達する経路に基づいた戦略を立案した。

4. レセプター介在性エンドサイトーシス経路を選択する MEND

レセプター介在性エンドサイトーシス経路は、アデノウイルスのようにデリバリーシステムの表面に提示したリガンドを細胞表面のレセプターに結合させることでエンドサイトーシスを誘起して細胞に取り込ませたのち、なんらかの工夫（例えばエンドソーム破壊や膜融合）によってエンドソームから核酸ナノ粒子コアを細胞質に放出させ、最終的に核まで送り込むことで遺伝子発現を誘導するものである。

われわれは、がん細胞表面に豊富に存在するトランスフェリン (Tf) レセプターに着目した。さらに、Tf レセプターを介してエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたのちのナノ粒子化コア

のエンドソームからの脱出を、インフルエンザウイルスのメカニズムを参考にエンドソーム膜とエンベロープ膜との膜融合によって行うことを考えた。膜融合によるエンドソーム脱出を可能にするために、エンドソーム内の pH 低下にตอบสนองして膜融合性を発揮できる pH 応答性膜融合ペプチド GALA (WE-AALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA) を機能性素子として採用した。GALA は、人工ペプチドであり、中性条件下ではランダムコイル状の立体構造を有しているが、酸性条件下では配列中に豊富に含まれるグルタミン酸がプロトン化されることで疎水性の高い α ヘリックス構造を取るようになる。¹⁷⁾ そのため、酸性条件下では脂質膜への親和性が増大し、2つの膜間の融合を促進すると考えられる。最後にエンドソームから細胞内に放出されたナノ粒子化コアは、細胞分裂時の核膜消失・再構築に伴って核内に取り込まれることで遺伝子発現が誘起される。

この戦略を実現するために、Tf と GALA ペプチドを搭載すること、さらに血中滞留性も付与するために PEG を表面に修飾することを考慮して、PEG 先端に Tf を結合させ、さらにエンベロープ膜上と PEG 先端に GALA を修飾した Tf/GALA-PEG-MEND を設計した。これまでの検討から、GALA ペプチドはコレステロール化によって脂質膜表面に固定した状態でなければ、エンドソーム膜との効率よい膜融合が誘起できないことを明らかにしているため、コレステロール化 GALA (Chol-GALA) をエンベロープ膜に組み込んでいる。¹⁷⁾ さらにエンベロープ表面にある PEG の立体障害によって GALA の機能発現が阻害される可能性を考慮して、Tf と同様に PEG 先端に GALA を結合させている。

このような設計を実現するために、われわれは当初、従来報告されていた構築方法を試みた。まずコアとなる核酸ナノ粒子であるが、リジンなどカチオン性のアミノ酸を多く含む高分子が静電的相互作用によって DNA をコンパクトに凝縮できる性質を利用して、PLL などのポリカチオンを用いてプラスミド DNA を凝縮化することで調製した。このとき、カチオン性を示すアミノ基とアニオン性のリン酸基の量比 (N/P 比) を目安として混合し、その粒子径と表面荷電状態 (ゼータ電位) を評価することで最適な条件を検討した。その結果、同じ N/P 比であっても、添加の順番によって生じる粒子の粒子径が大きく異なることが明らかになり、正電荷の小さい (100 nm 以下) 粒子を得るためには、2.4 付近の N/P 比においてカチオン (PLL) 溶液にボルテックス条件下でアニオン (プラスミド DNA) を滴下しなければならないことを見出した (Fig. 3)。¹⁶⁾ ちなみに、逆の順番 (アニオンにカチオンを滴下) では、ゼータ電位は同じであるが非常に大きい粒子径を有する粒子が得られる。このようにして調製したナノ粒子を用い、エンベロープ膜への封入を検討した。Cullis らは、界面活性剤で可溶化した脂質ミセルから透析により界面活性剤を除去することで、PEG 修飾したカチオン性脂質からなるリポソームにプラスミド DNA を封入する方法 (界面活性剤透析除去法) を確立していた。¹⁸⁾ われわれは、この方法を用いて、ナノ粒子化コアをリポソーム中に封入することを試みたが、ナノ粒子化コアは全く封入されなかった。恐らく、界面活性剤透析除去法は、完全に可溶化した界面活性剤/脂質混合ミセル (直径 10 nm 以下) を用いるため、柔軟性のあるフリーのプラスミド DNA を封入する方法としては適

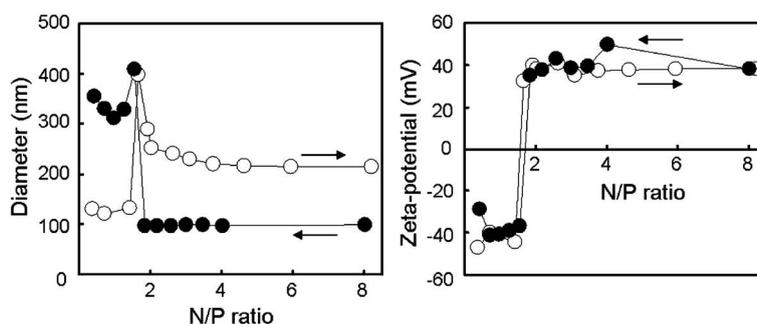


Fig. 3. Effect of N/P Ratio on Particle Size and Zeta Potential

Titration of PLL with DNA (closed circle); titration of DNA with PLL (open circle).

しているのかもしれないが、50–100 nm もの粒子を封入するには不適であると思われた。そこで、ナノ粒子のサイズに近い大きさを有し、界面活性剤を豊富に含む膜融合性の高い小さいリポソームである SUV*¹⁹⁾に着目し、この SUV*を意図的にナノ粒子化コア表面に集合させたのちに近接した SUV*同士の膜融合を誘起すれば、MEND を構築可能なのではないかと考えた (Fig. 4)。そこで、臨界ミセル濃度 CMC 以下の界面活性剤 (オクチルグルコシド) を含む負電荷脂質と PEG 脂質からなる SUV*と、正電荷を有するナノ粒子を混合し、透析若しくは多孔性ビーズによって界面活性剤を除去することで SUV*の膜融合を誘起し MEND を調製した。²⁰⁾ 得られた MEND をショ糖密度勾配超遠心分画法によって分析したところ、軽い画分に脂質を多く含むピークがあり最も重い画分に DNA のみのピークが観察され、25%と40%の境界に脂質と DNA のピークが共存することが確認された (Fig. 5)。さらに25%と40%の境界画分のサンプルの粒子径とゼータ電位を測定したところ、155 nm で負電荷を帯びており、さらに電子顕微鏡観察によって球状の形態が確認されたことから、この画分に存在するものが正電荷のナノ粒子化コアが負電荷脂質膜で封入された

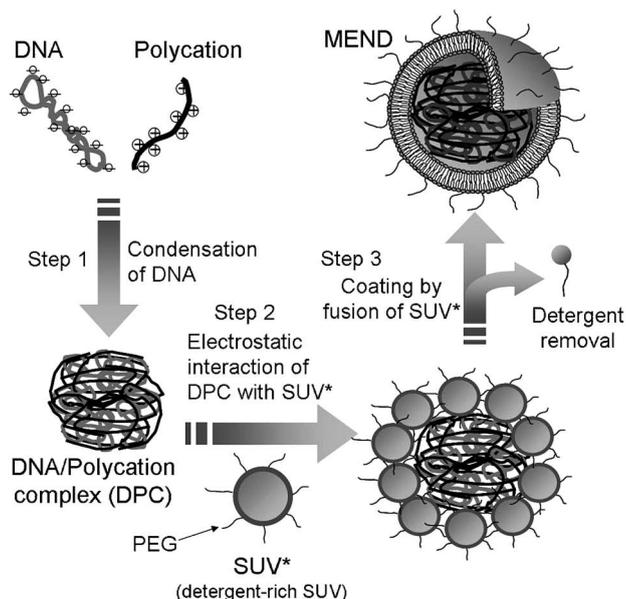


Fig. 4. Three Steps Involved in Constructing MEND by the SUV*-fusion Method

(1) DNA condensation with a polycation, (2) electrostatic interaction of the charge SUV* with a DNA/polycation complex (DPC) and (3) lipid coating of the DPC due to fusion of the SUV* by detergent removal.

目的の MEND であることが示唆された。²⁰⁾ この画分に存在する DNA 量から、MEND への DNA の封入率を換算したところ、およそ 30%であった。恐らく、軽い画分の脂質は空のリポソームであり、重いピークの DNA は封入されなかったナノ粒子であろうと思われる。このように、従来の界面活性剤透析除去法では不可能であったが、新しい構築技術を開発することで MEND の構築に成功した。われわれは、この構築方法を SUV*-fusion 法と命名した。²⁰⁾

この方法によって構築した MEND に、Tf 及び GALA を導入することで Tf/GALA-PEG-MEND を完成させた。完成した MEND による遺伝子送達能力を、ラベル化した DNA を用い共焦点レーザー顕微鏡観察によって評価したところ、GALA を導入していない場合にはすべてエンドソームに局在しており、細胞質へのナノ粒子化コアの放出は観察されなかった。そこで、Chol-GALA を導入したところ、エンドソームから細胞質へのナノ粒子の放出が観察されたが、MEND が取り込まれている細胞の約半数程度であり十分なものではなかった。PEG

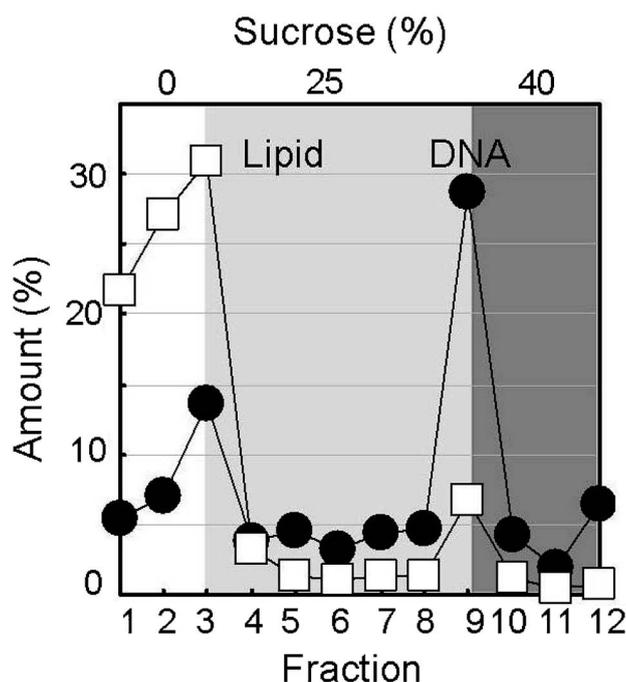


Fig. 5. Distribution of DNA and Lipids after Discontinuous Sucrose Density Gradient Ultra-centrifugation of MEND Prepared by SUV*-fusion Method

Amounts of DNA (closed circle) and lipids (open square) were estimated by measuring the fluorescence intensities of FITC and rhodamine in each fraction, respectively.

による立体障害を考慮して GALA を先端に接合した PEG (PEG-GALA) を用いて構築した MEND について同様の検討を行ったが、やはり半数程度しかナノ粒子のエンドソーム脱出は観察されなかった。そこで、両 GALA 誘導体を組み合わせて MEND を構築し、エンドソーム脱出を検討したところ、取り込まれているすべての細胞において DNA ナノ粒子のエンドソームからの脱出が確認された。さらに、遺伝子発現活性を比較したところ、GALA を導入していない MEND ではほとんど遺伝子発現活性が観察されず、Chol-GALA 若しくは PEG-GALA のみを導入した MEND では約 10 倍の活性が観察された。興味深いことに、両 GALA を導入した MEND の遺伝子発現活性は、GALA なしの MEND の 100 倍の活性を示した。これらの結果は、異なる構造的特徴を有する GALA 誘導体が MEND 表面におけるトポロジーコントロールによって協同的に機能を発揮したためであることが示唆された。

5. 通常のエンドサイトーシスとは異なる経路を選択する MEND

われわれは、先に述べたように、Tf/GALA-PEG-MEND のようにレセプター介在性エンドサイトーシス経路を介して DNA を核に送達するのではなく、通常のエンドサイトーシスとは異なる経路、すなわち非エンドサイトーシス経路を送達戦略とする MEND の構築にも取り組んだ。

通常のエンドサイトーシスとは異なる経路を選択するための機能性素子として、われわれは細胞膜透過性ペプチド (CPP) であるオクタアルギニン R8 に着目した。CPP は HIV 由来の TAT ペプチド (48-60) や Antinapedia などが有名であるが、京都大学の二木らは TAT ペプチドがアルギニンに富む構造をしている点に着目して合成したポリアルギニンペプチドも CPP として機能することを見出した。²¹⁾ 二木らは種々の検討の結果、オクタアルギニン (R8) が CPP として最も高い活性を有していることを見出している。²¹⁾ これら CPP の細胞への取り込みメカニズムに関して近年活発な議論がなされ、非エンドサイトーシス経路であるという説と通常のエンドサイトーシスであるという説に分かれていた。しかし、最近 Wadia らや中瀬らによって CPP の取り込みメカニズムは主にマクロピノサイ

トーシスであることが見い出された。^{22,23)} マクロピノサイトーシスは、通常のエンドサイトーシスと異なり、ライソゾームによる分解を回避できる可能性が高い。そこで、われわれは R8 ペプチドに着目し、静電的な相互作用による細胞への高い親和性と通常のエンドサイトーシスとは異なる取り込み経路を期待して、R8 ペプチドを MEND の機能性素子として採用した。これまでにカチオン性である R8 ペプチド及びビステアリル化 R8 は、プラスミド DNA と静電的相互作用によって複合体 (ナノ粒子) を形成すること、さらにそのナノ粒子は高い遺伝子発現活性を有していることが明らかにされていた。²⁴⁾ この高い遺伝子発現活性は、R8 による非エンドサイトーシス経路で取り込まれるためではないかと考え、R8/DNA ナノ粒子の細胞内取り込みメカニズムを検討したところ、意外にもクラスリン介在性エンドサイトーシスであった。²⁵⁾ しかしながら、R8 ペプチド単独では非エンドサイトーシス経路で取り込まれることから、R8 ペプチドの存在状態が取り込み経路を決定するのではないかと考え、MEND への修飾を想定して R8 を表面に修飾したリポソームを用いて、細胞への取り込み経路について検討を行った。上述のように、フリーのペプチドについては詳細に細胞取り込みメカニズムが解析されていたが、数百 nm もあるナノ粒子 (リポソーム) 表面に配置された R8 による取り込みメカニズムがフリーのペプチドと同じであるか否かは不明であった。検討の結果、R8 修飾リポソームの取り込みは、クラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤であるショ糖では阻害されず、マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロライドによってのみ阻害された。²⁶⁾ この結果から、R8/DNA 複合体とは異なり、R8 修飾リポソームは通常のエンドサイトーシス経路ではないマクロピノサイトーシスによって取り込まれることが明らかになった。このことから、R8 を表面に提示したナノ粒子の取り込みメカニズムがフリーのペプチドと同じであることが明らかになり、CPP ペプチドの自由度が細胞取り込みメカニズムの選択に重要であることが見い出された。

さらに興味深いことに、リポソームに修飾する R8 の密度を 5% から 0.8% に下げると、R8 修飾リポソームの取り込み経路がマクロピノサイトーシスからクラスリン介在性エンドサイトーシスに変わる

ことが明らかになった.²⁶⁾ この結果は、従来議論が分かれていた CPP ペプチドの取り込みメカニズムに関する仮説に一石を投じるものである。すなわち、用いるペプチドの濃度（特に細胞表面における局所濃度）の違いによって、通常のエンドサイトーシスが誘起される場合もあれば、マクロピノサイトーシスが誘起される場合もあった可能性が示唆され、そのために議論が分かれたことが推察される。今後、厳密に条件を揃えた実験を行うことで、従来の議論に結論が得られるだろう。

これらのことから、R8のような機能性素子は、単にキャリアーに付与するだけではなく、そのトポロジー（存在形態や密度など）をコントロールすることが重要であり、Programmed Packaging に欠くことのできない要素であることが明らかになった。これらの結果に基づき、R8 を 5% 以上表面に提示した R8 修飾 MEND (R8-MEND) を設計した。R8-MEND の構築は、上述の SUV*-fusion 法とは異なる構築方法を用いることにした。なぜなら SUV*-fusion 法の DNA 封入効率は 30% 程度であり、マクロピノサイトーシスで取り込まれるためサイズを小さくする必要がなく、標的化などを考慮する必要もない R8-MEND においては、より封入効率の高い構築方法が適しているためである。そこで、われわれはナノ粒子コアと脂質膜との静電的相互作用をベースにした脂質膜水和法を考案した。¹⁶⁾

脂質膜水和法は、大きく分けて 2 つのステップから構成されている (Fig. 6)。最初のステップでは、プラスミド DNA などの核酸をポリカチオンとの静電的相互作用によって荷電を有するナノ粒子 (100 nm 以下) とする。上述のように小さくて正電荷を有するナノ粒子を調製する場合には、N/P 比 2.4 付近において PLL などポリカチオンにプラスミド DNA を添加する。次のステップでは、調製したナノ粒子の懸濁液を脂質乾燥薄膜に添加し、脂質膜を十分に水和させるとともに、負電荷脂質を含む脂質膜と正電荷ナノ粒子の静電的な結合を促す。その後、水槽型超音波照射装置によって穏やかな超音波処理を施す。この超音波処理によって、脂質薄膜に結合しているナノ粒子が脂質膜でコートされ目的の MEND が得られると考えている。上述の SUV*-fusion 法は、透析操作などを経るため調製に手間と時間を要するが、脂質膜水和法では超音波処理も 30 秒程度で十分であるため、短時間で非常に簡便に調製することが可能である。得られた MEND 懸濁液に機能性素子であるステアリル化 R8 (STR-R8) を全脂質量の 5 mol% 相当量を添加することで、STR-R8 の疎水性側鎖 (ステアリル基) が MEND の脂質エンベロープに挿入され、膜表面に R8 ペプチドが提示された R8-MEND が得られる。

脂質膜水和法によって得られた MEND が、はたしてプラスミド DNA を高効率で封入できているか

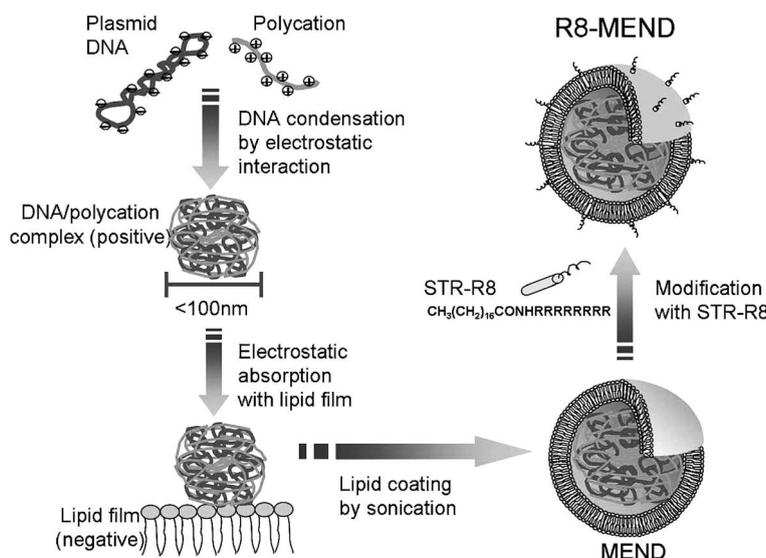


Fig. 6. Construction of MEND by a Lipid Film Hydration Method

In this method, a condensed DNA core particle electrostatically adsorb to surface of lipid film, then the core particle is coated with lipid membrane by gentle sonication. After lipid coating, the MEND can be modified with functional devices, such as STR-R8.

否かを確認するために、ショ糖密度勾配超遠心分画法によって分析したところ、ヘテロではあるものの、画分 5, 8, 10 に DNA と脂質の共存が観察され、またこれらの画分において FITC 蛍光ラベル化 DNA とローダミン蛍光ラベル化脂質との間で蛍光エネルギー移動 (FRET) が観察された (Fig. 7)。また得られた MEND の粒子径は 300 nm 前後でありゼータ電位は負であった。さらに、位相差凍結電子顕微鏡によって観察したところ、球状の形態を有しており、さらにコア/シェル構造を有していることが確認された。電子顕微鏡写真からシェル (脂質エンベロープ) は複数枚重なって存在していることが確認された。これらのことから、脂質膜水和法によって目的とする MEND が構築できていることが明らかとなった。このときの DNA の封入率を計算した結果、70% 超える高い値であることが明らかになり、SUV*-fusion 法で問題となった封入率を改善することができた。¹⁶⁾ また、脂質膜水和法では超音波処理を施すため、DNA が損傷してしまう可能性が懸念されたが、得られた MEND をアガロースゲル電気泳動によって評価した結果、ほとんど損傷していないことが明らかになった。¹⁶⁾ 恐らく、ポリカチオンによってナノ粒子化していることと、脂質膜によるコーティングが非常に早く起こるために、超音波による損傷から保護されているのではないかと

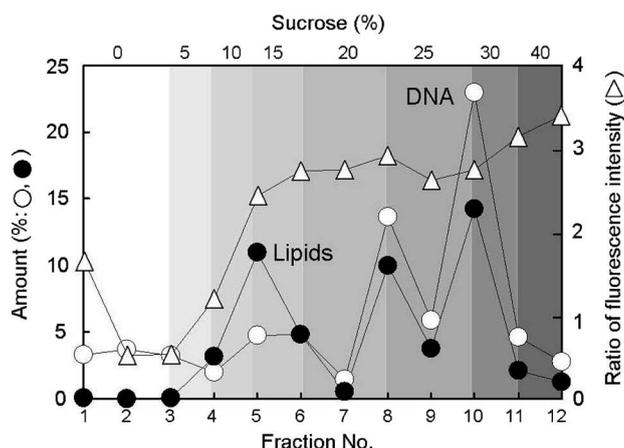


Fig. 7. Distributions of DNA and Lipids after Discontinuous Sucrose Density Gradient Ultra-centrifugation of MEND Prepared by Lipid Film Hydration Method, and Increment in Fluorescence Intensities of FITC after Solubilization of Each Fraction

Amounts of DNA (open circle) and lipids (closed circle) were estimated by measuring the fluorescence intensities of FITC and rhodamine in each fraction, respectively. The increment in fluorescent intensity of FITC is shown as a ratio before/after the solubilization.

考えている。

R8-MEND によるトランスフェクション活性を、最強のウイルスベクターであるアデノウイルスと比較した。その結果、Fig. 8 に示すようにアデノウイルスは高い投与量 (1×10^5 particles/cell) において非常に高い遺伝子発現活性を示した。一方、R8-MEND の遺伝子発現活性も非常に高く、アデノウイルスとほぼ同等のものであることが明らかになった。また、このときには全く細胞毒性を示さなかった。¹⁵⁾

このように、R8-MEND は培養細胞系において高い遺伝子発現活性を示したことから、生体への遺伝子送達能を有することが期待されたため、*in vivo* への応用として皮膚毛包への局所投与による機能性遺伝子の導入を試みた。実際に R8-MEND によって皮膚毛包に遺伝子を送達することが可能であるか否かを確認するため、レポーター遺伝子である LacZ プラスミド DNA を封入した R8-MEND を調製し、毛を刈ったマウスの背中に塗布することで投与した。R8-MEND を皮膚に投与 2 週間後に毛幹を顕微鏡観察した結果、 β -gal の陽性像が毛幹に観察された。¹⁵⁾ また、蛍光タンパク質 GFP プラスミド DNA を R8-MEND に封入し、同様にマウス皮膚に投与したところ、2 週間後の毛幹に GFP の蛍光が

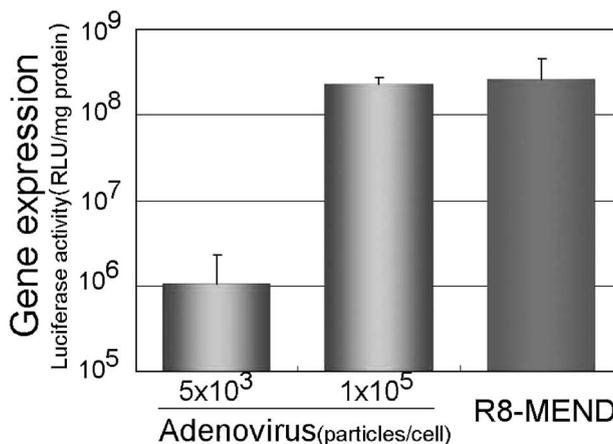


Fig. 8. Comparison of Transfection Activity of R8-MEND with Adenovirus

The transfection efficiencies of R8-MEND and Adenovirus were compared using HeLa cell lines that express receptors for adenovirus serotype 5 (*i.e.*, CAR and the integrin receptor). Increasing the dose of Adenovirus up to 1×10^5 particles/cell resulted in higher transfection efficiency; however, toxicity increased and transfection efficiency decreased at doses higher than 1×10^5 particles/cell. Transfection efficiency with R8-MEND equaled the highest transfection efficiency with Adenovirus, however, R8-MEND produced no detectable cytotoxicity (data not shown).

観察された。¹⁵⁾ 恐らく、毛孔上部に存在する幹細胞に R8-MEND が取り込まれ、その幹細胞が毛包内奥に移動したのち、毛包細胞及び毛幹へと分化することによって、R8-MEND に封入された遺伝子の産物 (β -gal 及び GFP) が毛幹中に観察されたのではないかと推察している。さらに、このときの遺伝子導入効率を、LacZ プラスミド DNA を用いて市販の遺伝子導入試薬である Lipofectamine (LFN) と比較したところ、LFN の遺伝子導入効率はほぼゼロであったのに対して、R8-MEND の遺伝子導入効率は約 25% を示し、LFN と比較して高い遺伝子導入能を有することが明らかとなった。¹⁵⁾ これらのことから、R8-MEND を皮膚に局所投与することで、皮膚毛包細胞に効率よい遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。

次に、レポーター遺伝子ではなく生理的な機能性を有する遺伝子の導入を試みた。ノックアウトマウスの作成実験から、Born morphogenetic protein (BMP) の受容体 (type-1 a) をコードする遺伝子 (*Bmpr1a*) が毛成長と毛孔の形成に重要な役割を果たしていることが見い出されており、²⁷⁾ われわれはこの *Bmpr1a* 遺伝子を皮膚毛包に送達することによって、毛成長に影響を及ぼす生理作用を発現できるのではないかと考え、*Bmpr1a* プラスミド DNA を R8-MEND に封入しマウスの皮膚に投与した。投与 2 週間後に観察したところ、増毛効果は得られなかったが、皮膚組織切片を解析した結果、GFP プラスミド DNA 封入 R8-MEND (コントロール) を投与した皮膚では通常の皮膚と同様に毛包が皮膚上部に移動しており毛周期が退行期後期から休止期にあるが、*Bmpr1a* プラスミド DNA 封入 R8-MEND を投与した皮膚では投与前の皮膚のように皮膚深部に毛包が留まっていることが認められ、毛周期は成長期後期から退行期初期であることが示唆された。¹⁵⁾ すなわち、毛包細胞への R8-MEND による *Bmpr1a* プラスミド DNA の送達によって毛周期が遅延したことが明らかになった。このことから、R8-MEND によって生体に導入された機能性遺伝子が、その生理活性を発揮できることが明らかになった。したがって、R8-MEND は局所投与による遺伝子治療のツールとして高い可能性を有していることが明らかになった。

6. 機能性核酸キャリアーとしての R8-MEND

高い機能性を発揮できる R8-MEND は、遺伝子の発現だけでなく、特異的遺伝子の抑制ツールであるアンチセンスオリゴ DNA (ODN) 及び siRNA のキャリアーとしても期待される。しかし、ODN は一本鎖で短く (20 b 前後)、siRNA も 20 bp 程度の短い二本鎖 RNA であるため、プラスミド DNA と同様に効率よく MEND にパッケージ可能であるかどうか不明であった。そこで、3 種のポリカチオン (PLL, STR-R8 及びプロタミン) を用い、まずは ODN のナノ粒子化を検討した。その結果、3 種のポリカチオンすべてによって 100 nm 以下のナノ粒子を調製することに成功した。さらに ODN ナノ粒子を MEND にパッケージするために lipid film hydration 法を行ったところ、3 種のナノ粒子をすべて R8-MEND に封入することに成功した。²⁸⁾ 封入効率は、80% 以上であり非常に高いものであった。

一方 siRNA では、100 nm 以下 (約 60 nm) のナノ粒子化が可能であったのは STR-R8 のみであり、PLL 及びプロタミンでは 200 nm 以上の大きな粒子しか得られなかった。siRNA ナノ粒子をコアとして MEND への封入を試み、ショ糖密度勾配分画により評価した結果、STR-R8/siRNA 複合体の場合においてのみ従来の MEND と同様の比重を有したものが得られたが、PLL 及びプロタミンの場合には空のリポソームと同様の画分に siRNA が確認されたことから、STR-R8 によって調製したナノ粒子のみが MEND に封入可能であることが明らかとなった。²⁹⁾ ポリカチオンに依存したナノ粒子化の成否を左右する構造的因子として、STR-R8 の疎水基 (ステアリル基) 及び他のポリカチオンよりも短いカチオン鎖が考えられ、siRNA ナノ粒子化の過程において有利に働いている可能性がある。また、プラスミド DNA や ODN のナノ粒子化と大きく異なる理由としては、DNA が A 型、B 型、Z 型などいくつかの立体構造を取り得るのに対して、RNA 二本鎖は A 型に偏っている (構造の自由度が低い) ことが可能性として考えられ、siRNA のナノ粒子化は DNA とは異なり、いくつかの条件を満たす必要があることが示唆された。

3 種のポリカチオンによって調製した R8-MEND による特異的遺伝子抑制効果を比較した結果、ODN-R8-MEND の場合、PLL/ODN 複合体及び

STR-R8/ODN 複合体を用いて調製した R8-MEND は、ほとんどアンチセンス効果を示さなかった。一方、プロタミン/ODN 複合体を含む R8-MEND は、非常に高いアンチセンス効果を示した。市販のトランスフェクション試薬である LFN2000 と比較した結果、LFN2000 によるアンチセンス効果は、時間とともに減弱していくのに対して、ODN-R8-MEND に (プロタミン) によるアンチセンス効果は 48 時間まで持続するものであった。²⁸⁾

一方、siRNA-R8-MEND (STR-R8) の特異的抑制効果をルシフェラーゼ安定発現細胞株を用いて検討した結果、投与量と時間に依存して高い抑制効果を示した (Fig. 9).²⁹⁾ LFN 2000 と抑制効果を比較した結果、本来のルシフェラーゼの活性を 100 としたとき、抗ルシフェラーゼ siRNA 封入 R8-MEND は強力な抑制効果を示したが、LFN 2000/抗ルシフェラーゼ siRNA 複合体による有意な抑制効果は認められなかった。対照となる抗 GFPsiRNA の場合において LFN2000 処理細胞では、本来のルシフェラーゼ活性が 5 倍以上に増大していることが明らかとなった。そのため、LFN2000/抗 GFPsiRNA 複合体処理群と比較すると、LFN2000/抗ルシフェラーゼ siRNA 複合体処理群は有意にルシフェラーゼ遺伝子を抑制していると言える。恐らく、LFN2000 はなんらかの作用によって非特異的に遺伝子の発現を増強しているのではないかと推察され

た。一方、抗 GFPsiRNA 封入 R8-MEND 処理細胞においての活性の有意な増大は認められなかった。細胞毒性を比較した結果、LFN2000 は有意な毒性を示したのに対して、R8-MEND は全く毒性を示さなかった。²⁹⁾ したがって R8-MEND は、非特異的な遺伝子発現増強や毒性などの副作用を示すことなく強力に遺伝子抑制効果を発揮できることから、特異的遺伝子抑制のための有用なツールとして期待される。

7. 非分裂細胞の核膜を突破可能な MEND

上述のように R8-MEND は高い遺伝子送達能を有することが明らかになったので、遺伝子導入が困難であると言われている樹状細胞に対して R8-MEND による遺伝子導入を試みた。その結果、得られた遺伝子発現活性は予想以上に低く、バックグラウンドレベルとほぼ同程度であった。この原因を明らかにするために、蛍光ラベル化した DNA を封入した R8-MEND を用いて、樹状細胞内における MEND の細胞内動態を検討したところ、細胞内には非常に多くの DNA が取り込まれていることが確認された。しかしながら、核内には全く DNA の蛍光シグナルは観察されず、このことから R8-MEND は細胞内には非常に効率よく取り込まれるが、核内には遺伝子を送達できないため遺伝子発現の誘導が困難であることが明らかになった。これまでに示してきたデータは、すべて分裂細胞を用いた実験であ

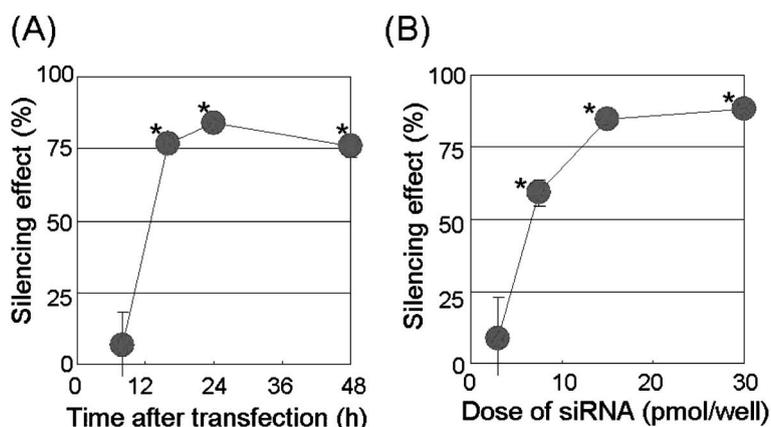


Fig. 9. Silencing Effect of R8-MEND Encapsulating Anti-luciferase siRNA on the Luciferase activity of HeLa Cells Stably Expressing Luciferase

A) Time-dependent silencing effect of R8-MEND. R8-MEND (30 pmol/well siRNA) was transfected to HeLa cells (4×10^4 cells), and the luciferase activities were measured at 8 h, 16 h, 24 h and 48 h after transfection. B) Dose-dependent silencing effect of the R8-MEND. Various amounts of R8-MEND were transfected to HeLa cells (4×10^4 cells) and the luciferase activity was measured 24 h after transfection. Relative gene silencing was calculated by normalizing to cells treated with non-specific (anti-GFP) siRNA. The values are the mean \pm S.D. ($n=3$). *The values of time- and dose-dependent silencing effects were statistically significant against the values at 8 h and 3.75 pmol/well, respectively ($p < 0.05$). In addition, statistical significance was also recognized between the value at 7.5 pmol/well and the values at 15 and 30 pmol/well ($p < 0.05$).

ったため、細胞分裂時に核膜が消失することでプラスミド DNA を核内に送達できていたが、樹状細胞は非分裂細胞であり核膜が消失しないため、R8-MEND は核膜を突破できなかったことが推察された。そこで、非分裂細胞の核内にも外来遺伝子を送達可能な MEND を開発することを試みた。核膜を積極的に突破するためには、核膜孔複合体 (nuclear pore complex: NPC) を介する送達戦略しかないと考え、アデノウイルスの感染メカニズムを参考にした戦略を立案した。アデノウイルスは、エンドソームから脱出したのち、核表面の NPC に結合し、キャプシド構造を崩壊させ内部に封入してあるウイルスゲノムのみを核内に送り込む。¹⁴⁾ そのため、ウイルスの大きさが NPC の直径 (約 40 nm) より大きくても、核内に遺伝子を送達することができる。MEND は NPC と比較してアデノウイルス以上に大きいため、そのまま NPC を透過することが不可能であるので、われわれはアデノウイルスを参考に MEND 内部の核酸ナノ粒子のみを NPC 透過によって核内に送り込む戦略を立案した。しかしながら、従来の PLL を用いたナノ粒子は 100 nm 程度の大きさを有しており非常に硬い構造をしているため、NPC を透過することができないことが容易に予想された。そこで、柔軟性の高いプロタミン/核酸複合体であれば、NPC を透過できようと考え、プロタミンを用いたナノ粒子をコアとして用いることとした。³⁰⁾ さらに MEND が NPC に特異的に結合できるために、SV40 由来の核局在化シグナル (NLS) ペプチドを機能性素子として用い、細胞質において表面に提示できるような構造の MEND をデザインした。すなわち、2 枚の膜構造を有し、膜融合などによって外側の一枚を脱ぎ捨てたのち、残った 1 枚の脂質膜表面上に提示された NLS によりインポーチンと相互作用し、インポーチンとの複合体として NPC に辿り着く。その後、インポーチン/NLS 複合体が NPC を通って核内に移動することに伴い、MEND の脂質膜が崩壊し、柔軟性の高い核酸ナノ粒子が NPC を通って核内に移行する戦略である (Fig. 10)。この戦略とデザインを実現するために、新たな構築技術を開発した。すなわち、小さい一枚膜リポソーム SUV をナノ粒子表面に静電的相互作用によって集積させ、酸性化などによって刺激を与えることで隣接する SUV 同

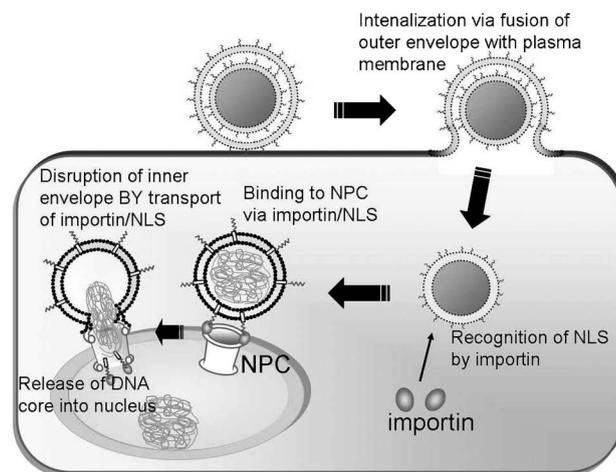


Fig. 10. Schematic Image of Artificial Nuclear Transfer by NLS-DMEND

After internalization of NLS-DMEND, NLS on the surface of the MEND should be recognized by importin in the cytoplasm. NLS-DMEND then binds to the NPC via the NLS/importin complex. Finally, the lipid membrane of NLS-DMEND is disrupted, and the condensed DNA particle is drawn into the nucleus.

士の膜融合を誘起し、2 枚膜構造の MEND を構築するのである。このとき、SUV に NLS をあらかじめ組み込んでおくことにより、最終的な MEND の 1 枚目及び 2 枚目の脂質エンベロップ表面に NLS を提示することができる。このようにして構築した NLS 修飾 2 枚膜 MEND (NLS-DMEND) を樹状細胞に投与したところ、R8-MEND では全く核内に遺伝子を送達できなかったのに対して、NLS-DMEND を投与した細胞では、核内に蛍光ラベル化 DNA の大きなシグナルが観察された。³¹⁾ このことから、NLS-DMEND によって核内に遺伝子が送達可能であることが明らかになった。この NLS-DMEND による DNA の核移行は細胞のエネルギー代謝阻害剤によって完全に抑制されたことから、NLS-DMEND による DNA の核内移行がエネルギーに依存したものであることが明らかになり、インポーチンなどの細胞内システムを利用したものであることが示唆された。³¹⁾ さらに、NLS-DMEND 投与した樹状細胞における外来遺伝子 (ルシフェラーゼ) 発現活性を検討したところ、R8-MEND 投与細胞の 100 倍もの高い活性を示すことが明らかになり、このことから樹状細胞の核内に NLS-DMEND によって外来遺伝子が送達されたことが強く示唆された。³¹⁾ このようにわれわれは、Programmed Packaging に基づき、アデノウイルス

の感染メカニズムを参考にした戦略を立案し、NLSを表面に配置したNLS-DMENDを設計し、設計に基づいた新しい構築方法によって非分裂細胞において核内に外来遺伝子を送達可能なNLS-DMENDを構築することに成功した。

8. おわりに

以上紹介したように、われわれは非常に高い機能性を有している様々なMENDの開発に成功した。しかしながら、例えばR8-MENDはプロトタイプであり、第7項で述べたように非分裂細胞に対しては遺伝子送達能を発揮できない。そのためアデノウイルスの感染メカニズムを参考にして、非分裂細胞の核内に遺伝子送達可能なNLS-DMENDが生まれたのである。このように、現在のMENDは完璧なものではなく、機能性を発揮することが困難な条件は今後も明らかになると思われる。重要なのは、問題が明らかになったとき、いかにしてその問題を解決するかである。そのため、MENDの細胞内動態解析とそれを反映したProgrammed Packagingを行うことによって、様々な場面で高い能力を発揮できるMENDを開発できると考えている。また、実用化のためには、製剤化（均一で安定したMENDの開発）を行わなければならない。今後、実用化をも視野に入れてMENDの機能性向上と新たな構築方法の開発に取り組んでいきたい。

REFERENCES

- 1) Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32–45 (2006).
- 2) Kamiya H., Akita H., Harashima H., *Drug Discov. Today*, **8**, 990–996 (2003).
- 3) Romberg B., Hennink W. E., Storm G., *Pharm. Res.* (in press).
- 4) Torchilin V. P. Adv., *Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1532–1555 (2006).
- 5) Allen T. M., Cullis P. R., *Science*, **303**, 1818–1822 (2004).
- 6) Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.-P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7297–7301 (1995).
- 7) Akuta T., Eguchi A., Okuyama H., Senda T., Inokuchi H., Suzuki Y., Nagoshi E., Mizuguchi H., Hayakawa T., Takeda K., Hasegawa M., Nakanishi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 779–786 (2002).
- 8) Dinçer S., Türk M., Pişkin E., *Gene Ther.*, **Suppl 1**, S139–145 (2005).
- 9) Gao X., Kim K. S., Liu D., *AAPS J.*, **9**, E92–E104 (2007).
- 10) Sorgi F. L., Bhattacharya S., Huang L., *Gene Ther.*, **4**, 961–968 (1997).
- 10) Li S. D., Huang L., *Gene Ther.*, **13**, 1313–1319 (2006).
- 11) 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).
- 12) Ogris M., Brunner S., Schüller S., Kircheis R., Wagner E., *Gene Ther.*, **6**, 595–605 (1999).
- 13) Schoen P., Chonn A., Cullis P. R., Wilschut J., Scherrer P., *Gene Ther.*, **6**, 823–832 (1999).
- 14) Smith A. E., Helenius A., *Science*, **304**, 237–242 (2004).
- 15) Khalil I. A., Kogure K., Futaki K., Hama S., Akita H., Ueno M., Kishida H., Kudoh M., Mishina Y., Kataoka K., Yamada M., Harashima H., *Gene Ther.*, **14**, 682–689 (2007).
- 16) Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **98**, 317–323 (2004).
- 17) Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K., Kamiya H., Harashima H., *Biochemistry*, **43**, 5618–5628 (2004).
- 18) Wheeler J. J., Palmer L., Ossanlou M., Maclachlan I., Graham R. W., Zhang Y. P., Hope M. J., Scherrer P., Cullis P. R., *Gene Ther.*, **6**, 271–281 (1999).
- 19) Ueno M., Kashiwagi H., Hirota N., *Chem. Lett.*, **26**, 217–218 (1997).
- 20) Sasaki K., Kogure K., Chaki S., Kihira Y., Ueno M., Harashima H., *Int. J. Pharm.*, **296**, 142–150 (2005).
- 21) Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y. J., *Biol. Chem.*, **276**, 5836–5840 (2001).
- 22) Wadia J. S., Stan R.V., Dowdy S. F., *Nat. Med.*, **10**, 310–315 (2004).
- 23) Nakase I., Niwa M., Takeuchi T., Sonomura K., Kawabata N., Koike Y., Takehashi M., Tanaka S., Ueda K., Simpson J. C., Jones A. T., Sugiura Y., Futaki S., *Mol. Ther.*, **10**,

- 1011–1022 (2004).
- 24) Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugiura Y., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 1005–1011 (2001).
- 25) Khalil I. A., Futaki S., Niwa M., Baba Y., Kaji N., Kamiya H., Harashima H., *Gene Ther.*, **11**, 636–644 (2004).
- 26) Khalil A. I., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
- 27) Yuhki M., Yamada M., Kawano M., Iwasato T., Itohara S., Yoshida H., Ogawa M., Mishina Y., *Development*, **131**, 1825–1833 (2004).
- 28) Nakamura Y., Kogure K., Yamada Y., Futaki S., Harashima H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**, 431–437 (2006).
- 29) Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **119**, 360–367 (2007).
- 30) Moriguchi R., Kogure K., Akita H., Futaki S., Miyagishi M., Taira K., Harashima H., *Int. J. Pharm.*, **301**, 277–285 (2005).
- 31) Nakamura T., Moriguchi R., Kogure K., Minoura A., Masuda T., Akita H., Kato K., Hamada H., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1290–1293 (2006).