

臓器特異的遺伝子発現制御を目的とした組織押圧核酸導入法の開発

向井 英史

Development of Tissue Pressure-mediated Transfection Method Aimed at Organ-specific Gene Expression Control

Hidefumi MUKAI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachicho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received June 18, 2010)

A mechanism-based logical approach is a mainstream of current novel drug therapy development in the context of these trends and, therefore, the elucidation of gene function and the molecular level mechanism analysis of diseases at an individual level in mammals are essential in addition to that in cultured cells. *In vivo* gene transfection techniques are also indispensable for these purposes as well as the evaluation of gene therapy and nucleic acid-based therapy approaches and clinical applications during the process of development of novel drug therapies. Various recombinant virus and synthetic carrier-mediated transfection methods have been reported, however, above all, naked plasmid DNA transfection without virus vectors, synthetic carriers and special physical devices has attracted much attention, because of its advantages including convenience of preparation and handling and lack of toxicity associated with the transfection agents. In this review, I collect the information of these naked plasmid DNA transfection methods involving tissue pressure-mediated transfection from the comprehensive view point including side effects. Additively, the key physiological phenomena affecting transgene expression, especially activation of transcriptional factors, are reviewed. Combined with conventional approach based with biodistribution control, regulation of physiological change in transfected cells will provide spatial- and temporal-controlled transgene expression at various organs, which leads us to elucidate mechanism of diseases and to develop novel drug therapy in near future.

Key words—transgene expression; tissue pressure-mediated transfection; naked plasmid DNA; transcriptional factor

1. はじめに

DNA マイクロアレイ技術や高分解能質量分析装置、バイオイメージングを利用した生体分子間相互作用解析・生体分子機能解析など、生体関連分野における解析技術はこの20年程の間に急速に進歩し、また汎用化された。その結果、ヒトゲノム配列解読に始まり、疾患状態における遺伝子発現の網羅的解析やプロテオーム解析が進み、膨大な量の遺伝子・分子レベルの情報が既に蓄積しつつある。これらの知見は、薬物治療法開発に対し大きな変革をも

たらし、今日では、遺伝子治療、核酸医薬品、分子標的治療を始めとする、論理的な新規薬物治療法開発が標準的な戦略として展開されている。こうした潮流の中で、培養細胞における遺伝子強制発現や発現抑制といった遺伝子発現制御を目的とした遺伝子、オリゴ核酸導入は汎用される基盤技術となっており、市販の多彩な導入試薬が疾患機構の解明や治療標的分子の同定等に利用されている。近年では、さらに、疾患状態における生体内の多様な細胞間相互作用の重要性が認識されており、非遺伝的な手法によるトランスジェニック実験動物や疾患モデル動物の構築などに基づく生体レベルでの遺伝子機能解析や疾患機構の検討、遺伝子治療及び核酸医薬品の治療戦略の評価や、研究成果の遺伝子治療・核酸医薬品への結実に向けて、*in vivo*における遺伝子発現制御を目的とした核酸導入技術の整備は急務となっている。しかし、多くの標的臓器において汎用的

京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

現所属：理化学研究所分子イメージング科学研究センター分子プローブ動態応用研究チーム (〒650-0047 神戸市中央区港島南町 6-7-3)

e-mail: hmukai@riken.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会近畿支部奨励賞(医療系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

に利用可能な核酸導入法はいまだ確立されておらず、新しい方法論の開発は最も重要な研究課題の1つである。

In vivo 核酸導入法としては、従来、ウイルスの持つ自然の感染力を利用した方法¹⁾や、*in vitro* 用の導入試薬を発展させたカチオン性リポソームやカチオン性ポリマーなどの合成キャリアを利用した方法²⁾が主流である。一方で、導入剤に依存した毒性の懸念がなく、調製や取り扱いの容易さの点で優れた、ウイルスベクターや合成キャリア、また特殊なデバイスを用いない、プラスミド DNA 水溶液の注入に基づくいくつかの方法論が提案されている。本稿では、これら *in vivo* での核酸導入における独自の方法論の発展について記述し、加えて筆者らが検討を進めている組織押圧核酸導入法について紹介する。また、適切な *in vitro* 実験系がないことから従来困難であった、それらの外来遺伝子発現機構に関する議論もなされるようになってきた。こうした知見は、今後の *in vivo* における遺伝子導入法の改良や発展に対し重要な示唆を与えるものと考えられ、併せて概説する。

2. プラスミド DNA 水溶液の注入による外来遺伝子発現の利点と問題点

当初、生体において外来遺伝子を発現させるには、特殊な細胞内移入機構や核移行機構が必要と考えられ、リコンビナントウイルスを利用した遺伝子導入を中心に研究が進められたが、1990年、マウスの筋組織に対してプラスミド DNA 水溶液を注入する、最も単純で簡便な戦略により外来遺伝子の発現が可能であることが報告された。³⁾ この方法は *Vascular endothelial growth factor* や *Erythropoietin* などの分泌性タンパク質をコードした遺伝子導入に基づいた遺伝子治療戦略に応用され、一部臨床試験も行われている。^{4,5)} また同様に、肝臓や腫瘍など多くの組織においてプラスミド DNA 溶液の直接注入により外来遺伝子発現が得られることが確かめられている。^{6,7)} しかし、組織へのプラスミド DNA 溶液の直接導入では遺伝子発現が注入部位局所に局限されてしまう。分泌性の一部のタンパク質を除き多くのタンパク質は産生された細胞内で機能するため、通常、遺伝子治療や非遺伝性のトランスジェニック動物作製においては、標的組織におけるより広範な細胞への遺伝子導入が要求され、経血管投与に基づ

く方法に利がある。通常のプラスミド DNA 溶液の静脈内投与による標的臓器での外来遺伝子発現は困難であるが、マウスに対して大容量のプラスミド DNA 水溶液を急速に尾静脈内へ注入するハイドロダイナミクス法により肝臓において高効率な遺伝子発現が得られることが、1999年 Liu らと Wolff らの2つのグループから報告された。^{8,9)} この方法はその簡便性と遺伝子発現の高さが最大の特徴であり、遺伝子治療戦略の検証や、プラスミド DNA ベクターの有効性評価などにおいて汎用されており、加えて、*small-interfering RNA* (siRNA) 導入による遺伝子発現抑制へも応用されている。¹⁰⁾ しかし適用が肝臓での遺伝子発現制御に局限され、しかも肝組織障害が引き起こされる点が問題である。¹¹⁾

3. 組織押圧核酸導入法による臓器特異的遺伝子発現制御

筆者らは、上記のような簡便性と高効率性に加え、組織障害性の低い核酸導入法の開発を目的に組織押圧核酸導入法と呼んでいる方法論について検討を進めている。^{12,13)} 本手法は、プラスミド DNA を静脈内投与した後、標的組織（腎臓、あるいは、肝臓、脾臓）に対し制御された弱い押圧を加える単純で簡便な方法であり、Liu らが先駆的な論文で報告したマウスに対しプラスミド DNA 溶液を尾静脈内注入後、腹部を圧迫すると顕著な肝障害なく肝臓において導入遺伝子の発現が得られる現象を発展させたものである。¹¹⁾

組織に対する押圧は、印加する圧力の定量並びに制御を目的に自作した Fig. 1 に示す圧力制御デバイスを用いている。バネの伸縮を利用して組織に印加する圧力を制御可能なシステムである。このデバイスを利用した種々の押圧条件の検討から、驚くべきことに、遺伝子発現レベルは1秒間、1回、0.59 N/cm² という極めて短時間かつ温和な条件で飽和し、その発現は臓器特異的かつ高効率なことが明らか



向井英史

理化学研究所分子イメージング科学研究センター分子プローブ動態応用研究チーム研究員。2009年3月京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、博士（薬学）取得。京都大学博士研究員を経て、2009年10月より現職。現在の研究テーマは、核酸プローブによる分子イメージング及びドッキングデリバリーシステム開発。

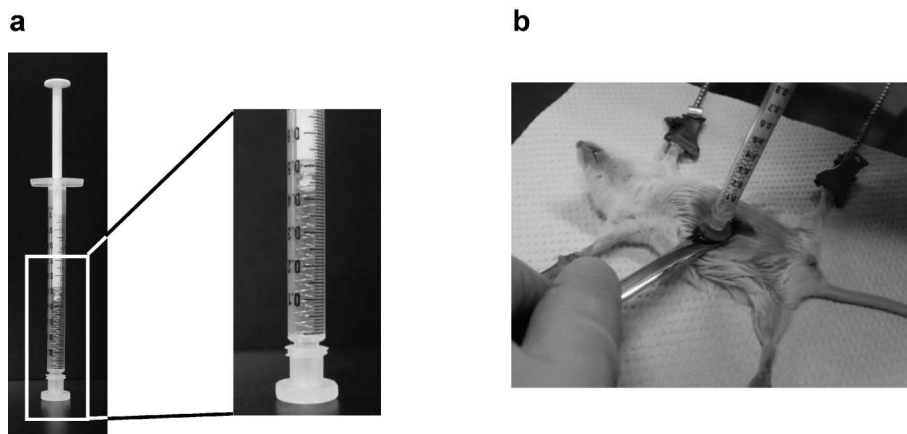


Fig. 1. Method of Controlling and Quantifying the Degree of Pressure

(a) The pressure control device and (b) directions for use of this device. The pressure control device was made by setting the spring in the barrel of the syringe and attaching a polypropylene cap with an area of 1 cm² at the tip of the syringe. When using this device, we held the tissue between the cap of the device and a spatula and then pushed the plunger against the spatula (b). The pressure value was estimated from the measured displacement of the spring and its force constant. Also, the device was calibrated, using an electronic balance, before experimentation. (Reprinted from Ref. 13).

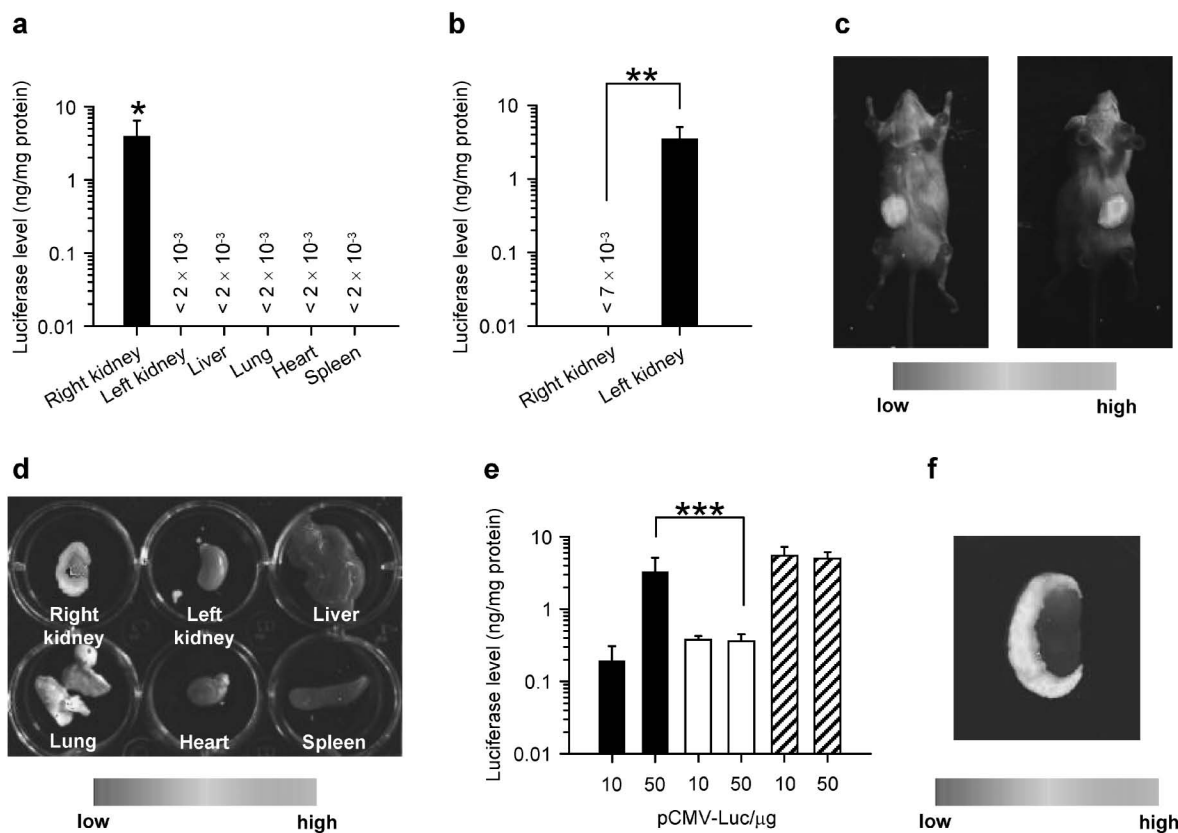


Fig. 2. Kidney-specific Plasmid DNA Transfection by Renal Pressure-mediated Transfection Method

Luciferase levels of various organs (a, b) and *in vivo* imaging (c) 12 h after 100 μg pCMV-Luc administration to the right (a, c right) or left (b, c left) kidney. **p*<0.01 vs. the other organs. ***p*<0.01. Each value represents the mean + S.D. (*n*=4 or 5). (d) Imaging of the isolated organs 12 h after 100 μg pCMV-Luc administration to the right kidney. (e) Luciferase levels obtained by the renal press-mediated transfection method (black) were compared with renal parenchymal injection (white) and electroporation (hatched). ****p*<0.01. Each value represents the mean + S.D. (*n*=4 or 5). (f) Imaging of the pressed right kidney 12 h after 100 μg pCMV-Luc administration to the right kidney. (Reprinted from Ref. 12 with permission of Elsevier).

かとなった。¹³⁾ 腎臓について例示すると [Figs. 2(a)–(d)], レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミド DNA (pCMV-Luc) 100 μg を

投与した 12 時間後の遺伝子発現は押圧した腎臓特異的であり, そのレベル (約 4 ng/mg protein)¹²⁾ は, 代表的な静脈内投与に基づく遺伝子導入である

リコンビナントアデノウイルス静脈内投与後の肝臓、脾臓における遺伝子発現 (1-30 ng/mg protein)¹⁴⁾ や、リポプレックスやポリプレックス投与による肺での遺伝子発現 (0.2-3.5 ng/mg protein)¹⁵⁻¹⁷⁾ に匹敵し、腎実質への直接注入を用いたエレクトロポレーション法 (5 ng/mg protein)¹²⁾ と比較しても同程度と高効率である [Fig. 2(e)]. 加えて、プラスミド DNA が経血管的に投与されるため、皮質、髄質外帯領域の広範囲から遺伝子発現が得られる [Fig. 2(f)].¹²⁾

また、DNA ワクチンやサイトカイン遺伝子治療における重要な標的の1つと考えられる脾臓や、多様な遺伝子疾患の原因臓器であり分泌性タンパク質産生臓器としても重要な肝臓においても、同様に、組織押圧導入法に基づく臓器特異的かつ高効率な外来遺伝子発現が可能であり、¹³⁾ 加えて、ルシフェラーゼを標的とした siRNA を pCMV-Luc と同時投与すると、siRNA 投与量依存的な遺伝子発現抑制がみられ、本方法はこれらの臓器における遺伝子発現抑制に対しても適用可能なことが示唆されている。^{12,13)} さらに、腎組織押圧核酸導入法の場合を例にとると、腎機能の指標である血中尿素窒素並びにクレアチニン値は非処置群と比較して変化せず、顕著な腎組織障害はみられない (エレクトロポレーション法では、一過性に両値とも増加する)。¹²⁾ このように組織押圧核酸導入法により、顕著な組織障害を引き起こすことなく、臓器特異的に高効率かつ、広範囲への核酸導入による遺伝子発現制御が可能である。

なお、炎症性サイトカイン産生は、導入遺伝子発現や治療効果に影響を及ぼす、*in vivo* での核酸導入における重要な副作用として認識されており、併せて的確な情報収集が求められている。特に、Kleinman らにより、最近、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF)-A や、その受容体 VEGFR1 を標的とした siRNA における血管新生抑制作用が非特異的なインターフェロン応答によるという重要な報告がなされた。¹⁸⁾ さらに、抗インフルエンザ siRNA における抗ウイルス作用に関しても類似の結果が報告されている。¹⁹⁾ これらの情報は、炎症性サイトカイン産生が的確な疾患の機構解明及び、遺伝子治療や核酸医薬品開発における戦略の評価を攪乱する要素であることを示唆して

いる。筆者らは、組織押圧核酸導入法に関し、顕著な炎症性サイトカイン産生の惹起がないことも明らかとしており、¹³⁾ 生物医学研究における汎用的な実験技術としても利があると期待される。

4. 組織押圧核酸導入法に基づく外来遺伝子発現の支配機構

In vivo 遺伝子導入に基づく外来遺伝子発現においては、克服を要する多くの生体内障壁が存在する。体内動態、細胞内移行、核移行、転写・翻訳等が、その遺伝子発現効率に影響を及ぼす重要な素過程であり、各遺伝子導入法ではこれらの段階を制御することによって遺伝子発現が達成されていると考えられる。通常、非ウイルス性の遺伝子導入法で投与するプラスミド DNA は高分子ポリアニオンであり、細胞膜との静電反発から細胞との相互作用が低く、²⁰⁾ また、静脈内投与後 Scavenger 受容体を介した機構により速やかに肝臓の細網内皮系に取り込まれるため、²¹⁾ 標的組織並びに、細胞への移行性の向上は遺伝子導入法開発において重要な要素であることから、動態制御の観点に基づく戦略が主流であった。しかし、培養細胞におけるリコンビナントアデノウイルスと代表的な *in vitro* 用導入試薬である LipofectAMINE に基づく外来遺伝子発現において、転写が両者の遺伝子発現レベルの差を決定付ける過程であるとの報告のように、²²⁾ 遺伝子導入された細胞内での生理現象にも焦点が向けられ始めている。特に、組織押圧核酸導入のような、*in vivo* 遺伝子導入における独自の的方法論に基づいた外来遺伝子発現に対して支配的な生理現象の解明は興味深い。

組織押圧核酸導入法に基づく投与後のプラスミド DNA の体内分布について、放射標識体を用いて評価すると、標的組織においてわずかに有意な分布の増加がみられるものの、速やかに肝臓に集積するなど、全身レベルでは、通常静脈内投与と比較して大きな差がない。²³⁾ 一方で、蛍光標識体を用いた組織レベルでの観察では標的組織において顕著な分布の増加がみられ、投与量全体からするとわずかではあるが、組織への押圧によって標的組織の細胞内へ移行したプラスミド DNA が遺伝子発現に関与していると考えられる。²³⁾ また、プラスミド DNA の細胞内移行の向上は一過性であり、その期間は、肝臓において 10 秒程度、肝臓の場合でも数分以内と短く、²³⁾ ハイドロダイナミクス法において移行性が向

上していると推察される期間 (15–30 分程度)²⁴⁾と比較すると、極めて短い。Liu らは、腹部の圧迫による血圧の上昇が肝臓における遺伝子発現と相関し、ハイドロダイナミクス法と類似の生理現象である可能性を示唆しているが、²⁵⁾ 組織押圧導入法において組織障害が誘発されないこととプラスミド DNA の細胞内移行向上が短時間であることとの関連が推察される。ハイドロダイナミクス法においてもプラスミド DNA 溶液の注入速度を制御するシステムの構築が行われているように、²⁶⁾ 効率的でかつ組織障害性の低い、圧力に基づいた遺伝子導入法には、制御された、適度な期間のプラスミド DNA 標的組織細胞内移行性の向上が求められる。

また、より重要な知見として、組織押圧導入法に基づく外来遺伝子発現に関し、特定の転写因子の関与を示すデータも得られている。Figure 3 に示すように、様々な転写因子結合部位をエンハンサー領域として有するルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を用い評価すると、activator protein-1 (AP-1) や nuclear factor κ B (NF- κ B) への結合部位を有する

プラスミド DNA において、高い遺伝子発現がみられた [Figs. 3(a) and (b)].²³⁾ 加えて、投与後初期に AP-1 の構成タンパクの遺伝子 *c-fos*, *c-jun* に関し mRNA 量の増加が認められた [Figs. 3(c) and (d)].²³⁾ *c-fos* や *c-jun* の遺伝子発現と AP-1 依存性遺伝子の発現にタイムラグがあること (inducible NO synthase の場合 6–12 時間)^{27,28)} を合わせて考察すると、遺伝子発現レベルの経時的な減弱との間に相関がみられ [Figs. 3(c)–(e)], 組織押圧導入法により転写因子の一過性の活性化が引き起こされて、高効率な遺伝子発現に関与している可能性が推察される。本現象は外来遺伝子高発現への転写因子活性化の寄与が最近報告されたハイドロダイナミクス法における結果²⁹⁾と酷似しており、導入細胞に対し類似の生理的变化を及ぼしている可能性を推察させる。プラスミド DNA 細胞内移行後の転写過程に関しては、一度低下した外来遺伝子発現が、ヒストン脱アセチル化酵素の投与³⁰⁾や物理刺激の再印加^{29,31)}によって再活性化される現象が報告されたことにより、遺伝子発現に影響を及ぼす重要な過程として認

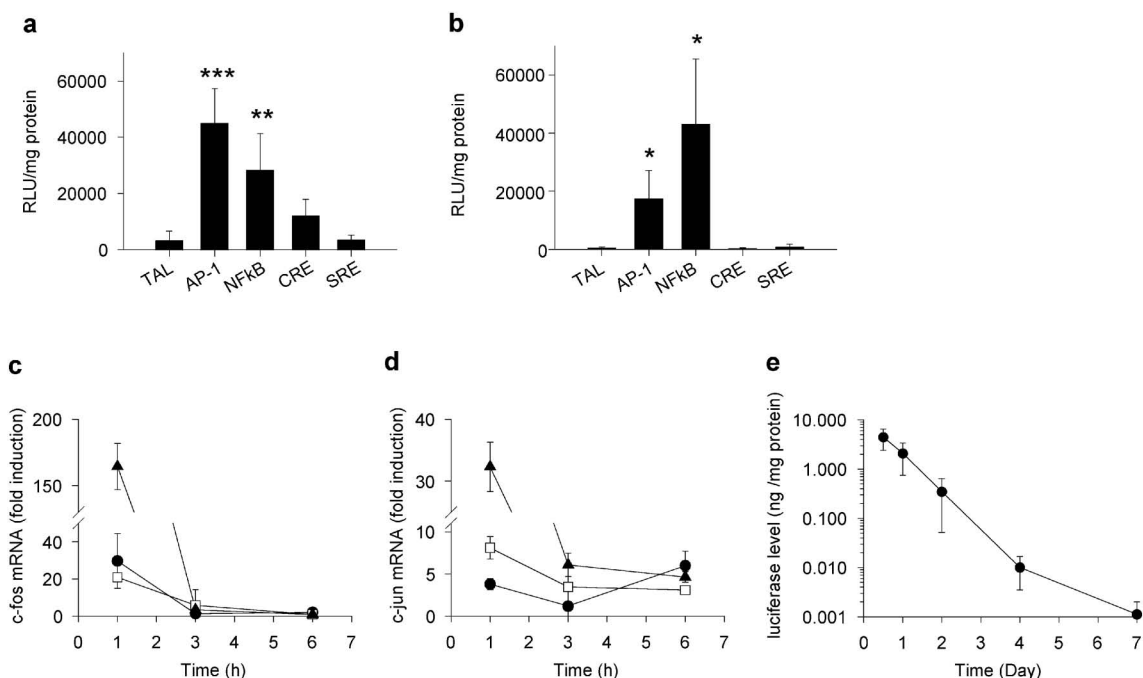


Fig. 3. Effect of the Transcription Factors on Transgene Expression Level of the Tissue Pressure-mediated Transfection

Luciferase levels of the right kidney (a) and left lobe of the liver (b) 12 h after administration of 100 μ g pTAL-Luc, pAP-1-Luc, pNF κ B-Luc, pCRE-Luc, and pSRE-Luc by renal (a) and hepatic (b) tissue pressure-mediated transfection. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3$ or 4). Key: TAL, pTAL-Luc; AP-1, pAP-1-Luc; NF κ B, pNF κ B-Luc; CRE, pCRE-Luc; and SRE, pSRE-Luc administration groups. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. pTAL-Luc injection group. *c-fos* (c) and *c-jun* (d) mRNA levels after 100 μ g pCMV-Luc administration by renal (closed circles) and hepatic (open squares) tissue pressure-mediated transfection and 5 μ g pCMV-Luc administration by the hydrodynamics-based transfection (closed triangles). The level was normalized using the mRNA level of *gapdh* in each sample. Then, the x-fold induction was calculated using the mRNA levels in untreated mice and those receiving the administration. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3$). (e) Time-course of luciferase gene expression after administration of 100 μ g pCMV-Luc by renal pressure-mediated transfection. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=4$ or 5). (Reprinted from Ref. 23 with permission of the Pharmaceutical Society of Japan).

識が高まりつつある。これらの知見は、遺伝子発現の高効率化並びに、持続化にとって、転写因子の活性化が制御されるべき重要な要素であることを示している。様々な内在性遺伝子の発現制御を担っているため注意が必要であるが、AP-1 や NF- κ B の適度な活性化の促進が、今後の生体における外来遺伝子発現手法の開発において重要な戦略となると考えられる。

最後に、今後詳細な議論が必要だが、組織押圧導入法やハイドロダイナミクス法による遺伝子導入後の細胞内での生理現象に類似していると想像させる細胞レベルの現象として、周期的伸張刺激 (cyclic stretch) に基づく外来遺伝子発現増強について記しておきたい。³²⁾ 培養細胞に対し、市販の導入試薬あるいは、エレクトロポレーションによる遺伝子導入の後、周期的伸張刺激を印加すると遺伝子発現が増強される。細胞骨格の再構成³³⁾ や転写因子 AP-1 や NF- κ B の関与³⁴⁾ が示唆されており、この *in vitro* における導入細胞に対する圧力と遺伝子発現の関連は、本稿で述べた *in vivo* 独自の遺伝子導入法との接点となる可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

5. おわりに

筆者らが検討を進めている組織押圧核酸導入法を含む、プラスミド DNA 水溶液の注入による外来遺伝子発現は、その簡便性、臓器特異性、高効率性など多くの利点から、*in vivo* 核酸導入技術の整備に対して有用な手法の 1 つになると考えられる。また、今後、外来遺伝子発現の高効率化並びに持続化を指向し、従来の体内動態制御的な戦略に加え、本稿で概説した導入細胞内での生理現象までを考慮することによって、多様な臓器において、時空間的に制御された遺伝子発現が可能になり、疾患機構の解明及び、新規薬物治療法開発につながるものと期待している。

謝辞 本研究は、京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野において、橋田 充教授、山下富義准教授、川上 茂講師の諸先生の御指導の下実施されたものであり、賜りました懇篤なる御指導、御鞭撻に対し、深甚なる謝意を表します。また、種々の貴重な御助言を頂き、実験の一部に御協力頂きました教室員の皆様に深謝します。実験の一部に共同

研究として参画頂き、御助言、御指導を賜りました京都大学大学院工学研究科小寺秀俊教授、寺尾京平博士に心から感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Kay M. A., Glorioso J. C., Naldini L., *Nat. Med.*, **7**, 33–40 (2001).
- 2) Brown M. D., Schatzlein A. G., Uchegbu I. F., *Int. J. Pharm.*, **229**, 1–21 (2001).
- 3) Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P. L., *Science*, **247**, 1465–1468 (1990).
- 4) Isner J. M., Baumgartner I., Rauh G., Schainfeld R., Blair R., Manor O., Razvi S., Symes J. F., *J. Vasc. Surg.*, **28**, 964–973 (1998).
- 5) Tripathy S. K., Svensson E. C., Black H. B., Goldwasser E., Margalith M., Hobart P. M., Leiden J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10876–10880 (1996).
- 6) Hickman M. A., Malone R. W., Lehmann-Bruinsma K., Sih T. R., Knoell D., Szoka F. C., Walzem R., Carlson D. M., Powell J. S., *Hum. Gene Ther.*, **5**, 1477–1483 (1994).
- 7) Stopeck A. T., Hersh E. M., Akporiaye E. T., Harris D. T., Grogan T., Unger E., Warneke J., Schluter S. F., Stahl S., *J. Clin. Oncol.*, **15**, 341–349 (1997).
- 8) Liu F., Song Y. K., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
- 9) Zhang G. F., Budker V., Wolff J. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1735–1737 (1999).
- 10) McCaffrey A. P., Meuse L., Pham T. T. T., Conklin D. S., Hannon G. J., Kay M. A., *Nature*, **418**, 38–39 (2002).
- 11) Liu F., Huang L., *Hepatology*, **35**, 1314–1319 (2002).
- 12) Mukai H., Kawakami S., Hashida M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**, 383–387 (2008).
- 13) Mukai H., Kawakami S., Kamiya Y., Ma F., Takahashi H., Satake K., Terao K., Kotera H., Yamashita F., Hashida M., *Hum. Gene Ther.*, **20**, 1157–1167 (2009).
- 14) Sakurai H., Sakurai F., Kawabata K., Sasaki T., Koizumi N., Huang H., Tashiro K., Kurachi S., Nakagawa S., Mizuguchi H., *J. Control. Release*, **117**, 430–437 (2007).
- 15) Dow S. W., Elmslie R. E., Fradkin L. G., Lig-

- gitt D. H., Heath T. D., Willson A. P., Potter T. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2961–2972 (1999).
- 16) Zou S. M., Erbacher P., Remy J. S., Behr J. P., *J. Gene Med.*, **2**, 128–134 (2000).
- 17) Goula D., Benoist C., Mantero S., Merlo G., Levi G., Demeneix B. A., *Gene Ther.*, **5**, 1291–1295 (1998).
- 18) Kleinman M. E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J. Z., Albuquerque R. J. C., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y. Z., Appukuttan B., Gibbs D., Yang Z. L., Kariko K., Ambati B. K., Wilgus T. A., DiPietro L. A., Zhang K., Smith J. R., Taylor E. W., Ambati J., *Nature*, **452**, 591–597 (2008).
- 19) Robbins M., Judge A., Ambegia E., Choi C., Yaworski E., Palmer L., McClintock K., MacLachlan I., *Hum. Gene Ther.*, **19**, 991–999 (2008).
- 20) Mahato R. I., Takakura Y., Hashida M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **14**, 133–172 (1997).
- 21) Kawabata K., Takakura Y., Hashida M., *Pharm. Res.*, **12**, 825–830 (1995).
- 22) Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Harashima H., *Mol. Ther.*, **13**, 786–794 (2006).
- 23) Mukai H., Kawakami S., Takahashi H., Satake K., Yamashita F., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1627–1632 (2010).
- 24) Kobayashi N., Nishikawa M., Hirata K., Takakura Y., *J. Gene Med.*, **6**, 584–592 (2004).
- 25) Liu F., Lei J., Vollmer R., Huang L., *Mol. Ther.*, **9**, 452–457 (2004).
- 26) Suda T., Suda K., Liu D. X., *Mol. Ther.*, **16**, 1098–1104 (2008).
- 27) Okada S., Obata S., Hatano M., Tokuhisa T., *Int. Immunol.*, **15**, 2275–1282 (2003).
- 28) Menegazzi M., CarcereriDePrati A., Suzuki H., Shinozuka H., Pibiri M., Piga R., Columbano A., LeddaColumbano G. M., *Hepatology*, **25**, 585–592 (1997).
- 29) Nishikawa M., Nakayama A., Takahashi Y., Fukuhara Y., Takakura Y., *Hum. Gene Ther.*, **19**, 1009–1020 (2008).
- 30) Fujii N., Isaka Y., Takabatake Y., Mizui M., Suzuki C., Takahara S., Ito T., Imai E., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 2745–2753 (2006).
- 31) Ochiai H., Fujimuro M., Yokosawa H., Harashima H., Kamiya H., *Gene Ther.*, **14**, 1152–1159 (2007).
- 32) Taylor W., Gokay K. E., Capaccio C., Davis E., Glucksberg M., Dean D. A., *Mol. Ther.*, **7**, 542–549 (2003).
- 33) Geiger R. C., Taylor W., Glucksberg M., Dean D. A., *Gene Ther.*, **7**, 725–731 (2006).
- 34) Lam A. P., Dean D. A., *J. Gene Med.*, **10**, 668–678 (2008).