

バブルリポソームと超音波技術を融合した骨格筋への遺伝子デリバリーシステムの開発

根岸洋一,^{*,a} 高橋(遠藤)葉子,^a 鈴木 亮,^b 丸山一雄,^b 新槇幸彦^a**Development of Gene Delivery System into Skeletal Muscles
by Bubble Liposomes and Ultrasound**Yoichi NEGISHI,^{*,a} Yoko ENDO-TAKAHASHI,^a Ryo SUZUKI,^bKazuo MARUYAMA,^b and Yukihiko ARAMAKI^a

^aDepartment of Drug and Gene Delivery Systems, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan, and ^bDepartment of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Midori-ku, Sagami-hara 252-5195, Japan

(Received July 20, 2010)

Skeletal muscle is a promising target tissue for the gene therapy of both muscle and non-muscle disorders. Gene transfer into muscle tissue can produce a variety of physiologically active proteins and may ultimately be applied to treatment of many diseases. A variety of methods have been studied to transfer genes into skeletal muscle, including viral and non-viral vectors. Recently, we have developed the polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes entrapping echo-contrast gas known as ultrasound (US) imaging gas. We have called the liposomes “Bubble liposomes” (BLs). We have further demonstrated that US-mediated eruption of BLs loaded with naked plasmid-DNA is a feasible and efficient technique for gene delivery. In this study, to assess the feasibility and the effectiveness of BLs for the gene therapy of disorders, we tried to deliver therapeutic genes (anti-inflammatory cytokine; IL-10 or anti-angiogenic factor; hK1-5) into skeletal muscles of arthritis or tumor model mice by the gene delivery system with BLs and US exposure. As a result, their disease symptom was efficiently improved by the systemic secretion of therapeutic proteins. Thus, this US-mediated BLs technique for muscle gene transfer may provide an effective noninvasive method for arthritis or cancer gene therapy in clinical use. In addition, it may be applicable for the gene therapy of other non-muscle and muscle disorders.

Key words—ultrasound; Bubble liposome; gene delivery system; gene therapy

1. はじめに

遺伝子治療は、候補となる治療用遺伝子を体内の標的組織へ、効率的に安全に導入する手法を用いて、遺伝病、がん、感染症などの疾患へ適用する治療法で臨床応用が期待されている。標的組織への遺伝子導入を担うベクターの開発は、遺伝子治療の技術開発の中でも重要であると考えられているが、毒性、抗原性などの臨床上の安全性に問題がなく、しかも遺伝子発現効率の高い非ウイルスベクター及びドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術・方法

論の研究開発が切望されている。^{1,2)}

そのような背景から、これまでにわれわれは、非ウイルスベクターの新規の遺伝子デリバリーツールとしての超音波造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム)³⁻⁷⁾と超音波照射を利用した遺伝子デリバリーシステムの開発を進めてきた。

本稿では、バブルリポソームを利用した骨格筋への超音波遺伝子デリバリー技術を紹介し、遺伝子治療に向けた応用展開について概説する。

2. 超音波造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム)

超音波は、組織ダメージが極めて低く安全性が高いことから、既に医療分野で非侵襲的な超音波診断・治療などに利用されている。近年では、超音波エネルギーの DDS への応用が考案され、実際に超音波造影剤であるマイクロバブルと導入遺伝子の共

^a東京薬科大学薬学部薬物送達学教室 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1), ^b帝京大学薬学部生物薬剤学教室 (〒252-5195 神奈川県相模原市緑区寸沢嵐 1091-1)

*e-mail: negishi@toyaku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

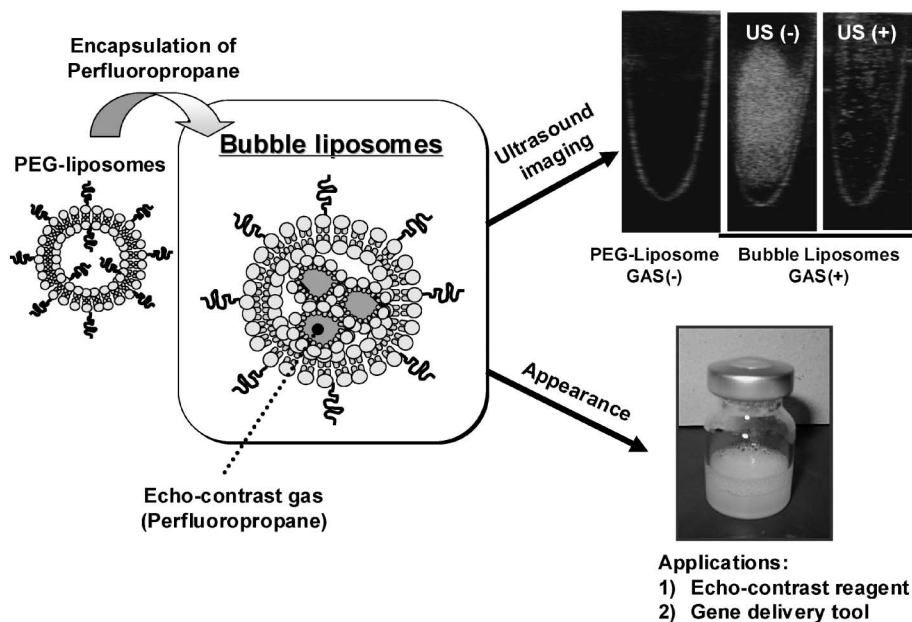


Fig. 1. Bubble Liposomes

存下に治療用超音波を照射することでバブルが崩壊し、同時にキャビテーション（衝撃波）が生じ、その駆動力を利用して薬物や遺伝子を細胞内へと導入する試みが、基礎研究で成功を収めている。^{8,9)} この方法は、超音波照射した部位にのみ効率よく導入可能であり、臓器・組織特異的に遺伝子導入する方法として期待されている。^{10,11)} しかし、これまで報告されているマイクロバブルは直径4-6 μm と粒子サイズが大きいため、組織深部への移行性が悪く、血管内投与に最適なサイズとは言えない。また、表面修飾ができないため、標的指向性が得られないなどの改善すべき課題が残されている。

そのような背景から、これまでに生体適合性・血中安定性・滞留性に優れ、深部組織にまで十分到達できることが報告されている粒子サイズ約100-200 nmのポリエチレングリコール修飾リポソーム(PEG-リポソーム)¹²⁾に注目し、PEG-リポソームに超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入したバブルリポソームを調製した (Fig. 1)。これは、超音波造影剤として機能するのみならず、治療用超音波(1-3 MHz)を併用する低侵襲的な薬物・遺伝子デリバリーツールとして期待される (Fig. 2)。^{3,4)} さらにリポソームは、様々な修飾をすることで標的指向性を付与できることが知られている。以上より、バブルリポソームはマイクロバブルの問題を解決し得る新規の遺伝子デリバリーツールとなる

と考えられる。

3. バブルリポソームを利用した超音波遺伝子デリバリーシステム

既存のマイクロバブルに超音波照射を行うとバブル崩壊に伴うキャビテーション誘導が生じ、それを駆動力とする薬物や遺伝子の細胞内導入法が報告されている。そこで、まず、バブルリポソームのキャビテーション誘導について検討した。試験管内で調製されたバブルリポソームに超音波照射(1-3 MHz)を行うと超音波造影シグナルの減弱が観察された。このことは、バブルリポソームの崩壊に伴うキャビテーション誘導が生じた可能性を示唆している (Fig. 1)。次にバブルリポソームと超音波照射の併用によるキャビテーションを利用した遺伝子導入が可能か否かをCOS7細胞に対して行った。方法としては、バブルリポソームとルシフェラーゼ発現プラスミドDNA (pDNA)を培地中に添加し、直ちに超音波照射(2 MHz, 2.5 W/cm², 10 s)を行った。



根岸洋一

東京薬科大学薬学部薬物送達学教室准教授。博士(薬学)。1965年東京生まれ。東京薬科大学卒業、北海道大学薬学研究科博士課程修了。榊SRL遺伝子解析研究センター勤務、1996年帝京大学薬学部助手、2004年東京薬科大学薬学部講師、2007年より現職。2001年米国ピッツバーグ大学に留学(Leaf Huang教授)。超音波技術を融合したDDS・GDSの研究開発に従事。

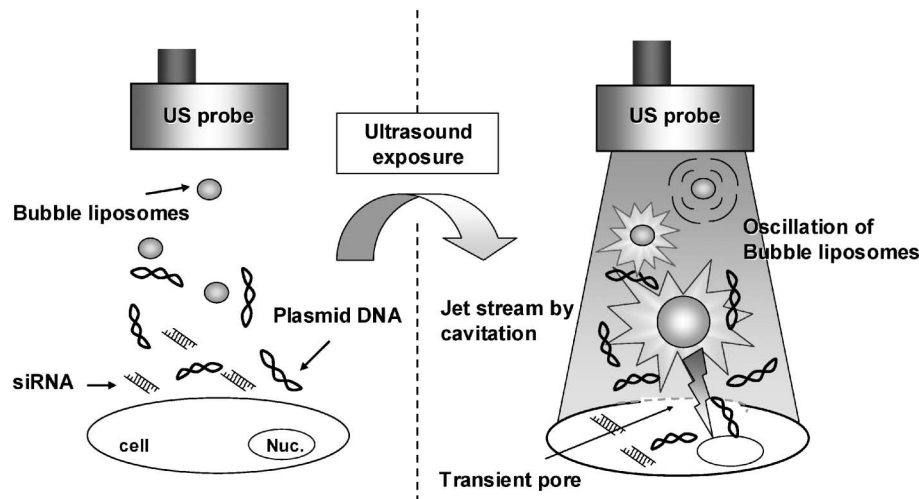


Fig. 2. Mechanism of Gene Delivery System by Bubble Liposomes and Ultrasound

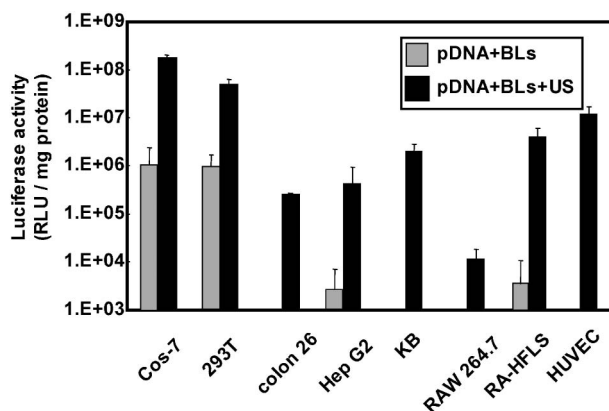


Fig. 3. Transfection with Bubble Liposomes and Ultrasound on Various Cell Lines

Solution of pDNA (pCMV-Luciferase) and Bubble liposomes were added into cells. Immediately, ultrasound (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2.5 W/cm², Time: 10 s) was exposed. Two days after transfection, luciferase expression was determined.

その結果、ルシフェラーゼ活性の上昇が認められ、細胞内への遺伝子導入は、わずか10秒という超音波照射時間で効率よく達成できることが判明した。³⁾ この効果はpDNAとバブルリポソームの混合液に超音波照射した場合に初めて高い遺伝子発現が認められた。ガス未封入りリポソームと超音波照射を併用した場合には、十分な導入効果は得られなかった。COS7細胞以外のがん細胞(HepG2, Colon26, KBなど)、関節滑膜細胞、マクロファージ様細胞においても導入効果が示され、バブルリポソームと超音波照射を併用することで種々の培養細胞株に対して遺伝子導入が可能であることが明らかとなった

(Fig. 3). また、本導入システムによって、pDNAのみならず、低分子核酸であるsiRNAも効率よく細胞内導入できることも明らかとしている。⁴⁾

4. 遺伝子治療における骨格筋への遺伝子デリバリーの有用性

遺伝子治療を成功させるには、生体に対して安全な方法で遺伝子を標的細胞に効率よく導入し、発現させることが重要である。^{1,2)}

体内の様々な細胞や組織が標的となり得るが、その中でも骨格筋は遺伝子治療の有望な標的組織と考えられている。なぜなら、骨格筋自身が遺伝性疾患(例：筋ジストロフィー)の発症部位で遺伝子治療の標的部位であり、その治療のために有用なタンパク質が骨格筋で発現可能であることが既に示されているからである。さらに、骨格筋には大量の血管が存在するため、局所で発現した生理活性タンパク質を全身へ送り出すことで他の全身性疾患(例：転移性がん、慢性関節リウマチ)の治療が可能となることも理由の1つである。また、筋細胞は非分裂細胞なので、細胞分裂に伴う導入遺伝子の消失が回避でき、持続的発現が期待できるという利点もある。これらの特長を生かし、治療効果を最大とするには、治療が必要な部位の筋組織全体若しくは十分な発現量や発現エリアを確保できる範囲に遺伝子導入することが必要である。Figure 4に示すように治療用遺伝子をバブルリポソームとともに筋組織内へと投与した後に、超音波照射することで、バブルリポソームが崩壊し、キャビテーション誘導に伴うマイクロジ

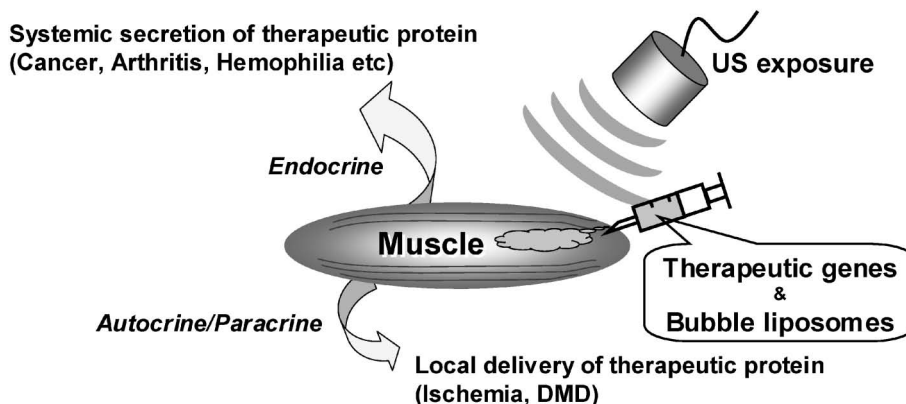


Fig. 4. Gene Delivery System into Muscle by Bubble Liposomes and Ultrasound

エト流を発生させることが可能と考えられる。これを駆動力とすることで、効率のよい筋細胞内への遺伝子デリバリーが可能となり、遺伝子治療に有用かつ安全性の高い遺伝子デリバリーシステムが構築できると考えられる。

5. バブルリポソームを利用した骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステム

超音波照射を併用したバブルリポソームの *in vivo* での機能評価をするために、骨格筋を標的にし、超音波遺伝子導入効率について検討した。方法としてマウスの脛部筋組織にバブルリポソームとルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA の混合溶液を局所筋肉内投与し、直ちに、体外から超音波照射 (1 MHz, 50% duty, 2 W/cm², 60 s) し、5日後の摘出組織をホモジネートしてルシフェラーゼ活性測定を行った。なお超音波照射装置は、NEPA GENE 社製の SONOPORE 3000, 又は, Sonitron 2000 を使用した。その結果、pDNA 単独、pDNA とバブルリポソーム混合液を添加した群、pDNA に超音波照射した群では、ほとんど遺伝子発現に顕著な差が認められなかったのに対し、pDNA とバブルリポソームを混合し、さらに超音波照射した群では、pDNA などの上述の群に比べ両組織ともに 10 倍以上の高い遺伝子発現が認められた (Fig. 5)。さらに遺伝子導入後の pDNA の体内動態並びに発現分布を解析するために、*in vivo* ルシフェラーゼイメージングシステム (IVIS 社) を用いた全身での発現分布を解析した。その結果、pDNA のみを導入した場合に比べ、pDNA とバブルリポソーム混合液を局所投与したマウス頸部筋組織において局在化したルシフェラーゼの遺伝子発現の増強が観察

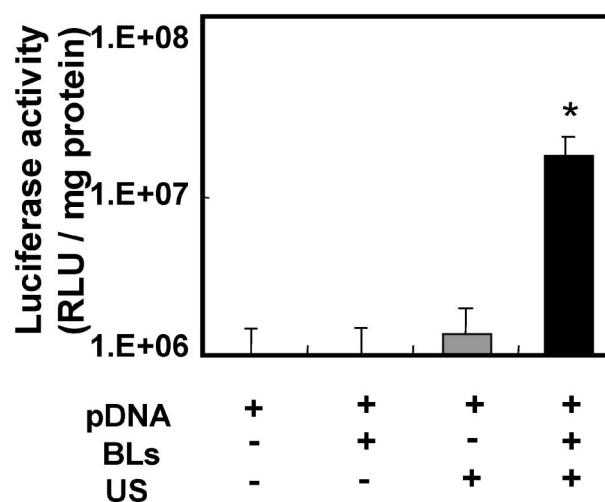


Fig. 5. Luciferase Expression in Muscle Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound

Mice were injected into tibialis muscle with pDNA (pCMV-Luciferase) 10 μ g and Bubble liposomes 30 μ g. Immediately, ultrasound (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2 W/cm², Time: 60 s) was exposed. Five days after transfection, luciferase expression was determined. * $p < 0.01$ vs. pDNA with US. The Data are shown as mean \pm S.D. ($n=4$).

された (Fig. 6)。その発現は、少なくとも 4 週間は持続していた。さらに EGFP をコードした発現プラスミドを筋組織内に同様の方法で導入後、組織学的な発現解析を蛍光顕微鏡にて行ったところ、超音波照射エリアに依存した顕著な EGFP 発現が確認できた (Fig. 7)。これらのことは、筋組織内に導入されたバブルリポソームが、超音波照射に反応して、効率よく崩壊し、それに伴うキャビテーション誘導を駆動力として遺伝子を細胞内へ送達させたものと考えられる。また、既存の遺伝子導入試薬として幅広く用いられている Lipofectamin 2000 (インビトロジェン社) では、ほとんど遺伝子導入活性が認められなかったことから、バブルリポソームの

in vivo での高い有用性が示された。

6. 動物モデルへの応用

次にわれわれは、バブルリポソームを利用した安全な超音波遺伝子デリバリーシステムの有用性を明らかにするために、疾患動物モデルへの応用を試みたので概説する。

6-1. 関節炎モデルマウスの遺伝子治療 Figure 5 及び 6 の結果に示されるようにバブルリポソームを利用する骨格筋への超音波遺伝子導入が効率よく達成されたことから、同様の導入条件（導入部位：

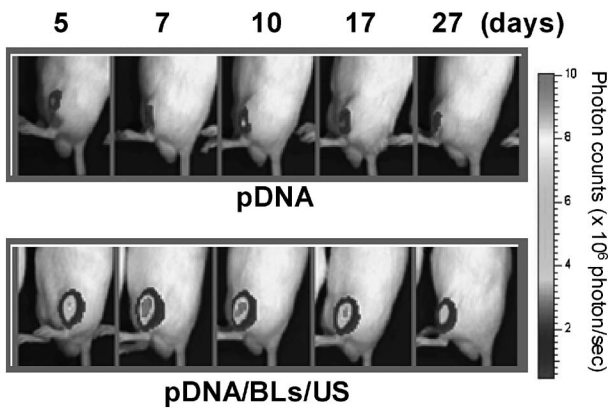


Fig. 6. *In vivo* Luciferase Imaging in Muscle Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound

Mice were treated with Bubble liposomes and ultrasound-mediated intramuscular luciferase gene transfer. After the transfection, *in vivo* luciferase expression was monitored at 0–27 days using an IVIS imaging system (Xenogen, CA, USA). pDNA (pCMV-Luciferase): 10 µg, Bubble liposomes: 30 µg, ultrasound exposure: (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2 W/cm², Time: 60 s).

脛部筋組織，超音波照射条件：1 MHz, 50% duty cycle, 60 s) にて，抗炎症性サイトカインとして知られている IL-10 遺伝子をコードしたプラスミド DNA をコラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに対して，遺伝子治療を試み，その有用性を評価した。その結果，血清中での IL-10 タンパク質の発現分泌の上昇が，およそ 1 週間目で認められ，それは，3 週間ほどの持続性を示していた。さらに関節炎所見を観察し，スコア化したところ，顕著な関節炎の抑制が認められた (Fig. 8)。また，組織学的解析によっても，関節炎の進行に伴う関節破壊や滑膜肥厚の抑制が認められた。このことは，バブルリポソームによって，超音波遺伝子導入された筋組織から産

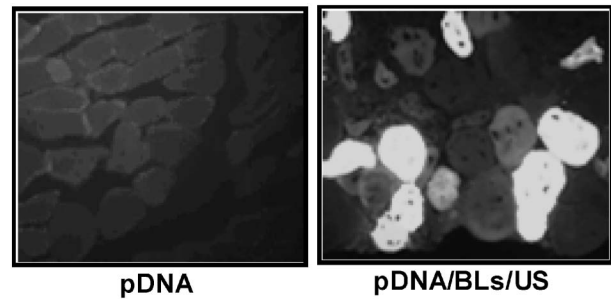


Fig. 7. EGFP Expression in Muscle Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound

Mice were treated with Bubble liposomes and ultrasound-mediated intramuscular EGFP gene transfer. After 5 days of transfection, the transfected muscle was sectioned and analyzed by fluorescent microscopy. pDNA (pEGFP-N3): 10 µg, Bubble liposomes: 30 µg, ultrasound exposure: (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2 W/cm², Time: 60 s).

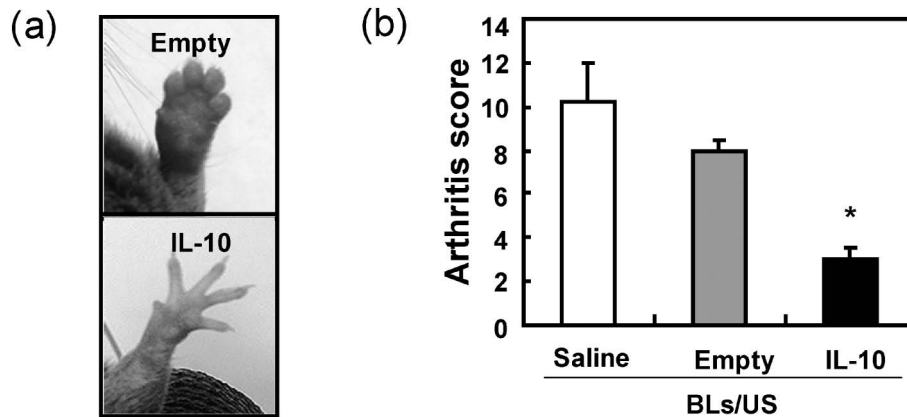


Fig. 8. Gene Transfer of IL-10 Plasmid into the Muscle of Collagen-induced Arthritis Model Mice by Bubble Liposomes and Ultrasound

Collagen-induced arthritis model mice were treated with Bubble liposomes and ultrasound-mediated intramuscular IL-10 gene transfer at days 21 after first immunization. (a) These photographs show the development of arthritis in fore paw at days 49 after first immunization. (b) The development of arthritis in fore and hind paws were counted. For example, score 1 or 2 indicates moderate symptom. In contrast, score 3 or 4 means severe arthritis. In the case of the treated group of IL-10 plasmid, the arthritis severity was significantly attenuated as compared with the treated group of saline or empty vector. **p* < 0.05 vs. saline or empty vector. The data are shown as mean ± S.D. (*n* = 10).

生分泌された IL-10 タンパク質の全身循環作用によって、遠隔部位に存在する関節部位の炎症反応を効率的に沈静化したものと考えられる。よって、バブルリポソームによる安全な超音波遺伝子デリバリーシステムが、関節疾患への遺伝子治療の一手段として有用であることが示された。同様の遺伝子導入法を用いて、下肢虚血モデルマウスに対する血管新生遺伝子治療を試みたところ、血管密度の増加や血流回復が観察されたことから、エンドクリン作用を期待するような局所筋組織の治療にも有用な遺伝子導入法となることも示している。

6-2. 腫瘍モデルマウスの遺伝子治療 骨格筋への遺伝子導入を利用したがん遺伝子治療を考える場合、効率よく骨格筋へ遺伝子導入し、タンパク質を産生させる必要がある。効率のよい遺伝子導入法として、骨格筋を支配する血管を介した遺伝子導入が、広範囲の遺伝子発現領域を確保できるため有効であると考えられる。しかし、血管と筋組織の間には、血管内皮細胞や筋内膜などの障壁が存在するため、これらの障壁を突破し、筋細胞内へと遺伝子導入する必要がある。これまでにわれわれは、血管を介した遺伝子デリバリーシステムとして、マウス下肢上部に止血帯を施し、大伏在静脈から pDNA とバブルリポソームの混合溶液を投与し、超音波照射を行うと組織透過性が増し、筋細胞内への遺伝子導入が可能となることを明らかにしてきた。⁵⁾そこで、バブルリポソームと超音波併用による骨格筋への経静脈的遺伝子デリバリーシステムのがん遺伝子治療への可能性を探るべく治療用遺伝子を用いて、その有用性を評価した。今回、治療用遺伝子とし

て、高い抗血管新生作用を持ち、臨床応用への可能性が期待されている plasminogen 断片の kringle1-5 をコードした pDNA を用いた。Kringle1-5¹³⁾ は、既に抗血管新生タンパク質として知られているアンジオスタチンに相同性の高い Kringle 構造を有するタンパク質で、アンジオスタチンよりも 50 倍近い内皮細胞の増殖抑制効果を示すことから臨床応用が期待されている。そこでマウスメラノーマ由来 B16 細胞株をマウスの皮下に移植し、1 週間後に骨格筋へ経静脈的に超音波遺伝子導入し、腫瘍増殖の抑制効果を観察した。その結果、バブルリポソームと超音波非照射群では腫瘍の増殖抑制効果が認められないのに対し、バブルリポソームと超音波照射併用群で、有意な腫瘍体積の抑制効果が認められた (Fig. 9)。また、同様の導入実験を簡便に新生血管を観察できる Dorsal Air Sac モデルマウスに対して行った場合においても、がん細胞が誘発する背部皮下の新生血管の顕著な抑制が観察できた。よって、抗血管新生遺伝子治療におけるバブルリポソームを利用した経静脈的な骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステムの有用性が明らかとなった。

7. バブルリポソームを利用した骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステムの課題

ここまでバブルリポソームを利用する骨格筋への超音波遺伝子導入デリバリーシステムとその有用性を紹介してきたが、全身性疾患に対する遺伝子治療で必須なのは、広範囲で治療用遺伝子が導入発現することと安全性が確保されることである。本導入法は、広範囲の骨格筋で十分な活性が得られており、骨格筋で、生理活性タンパク質を発現分泌させるこ

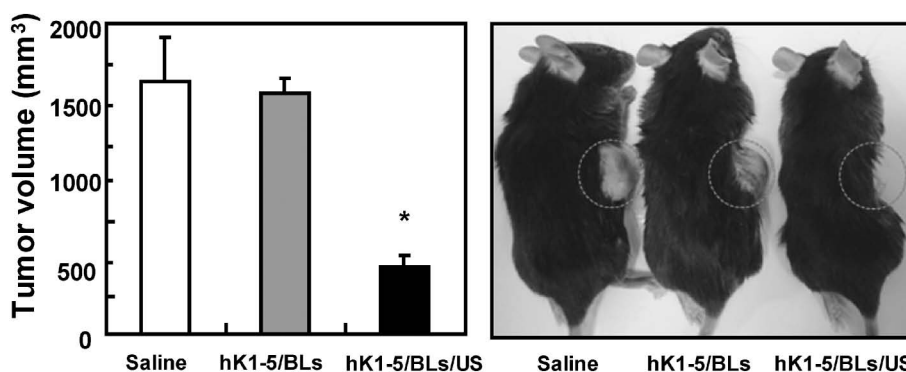


Fig. 9. Gene Transfer of hK1-5 Plasmid into the Muscle of Tumor Model Mice by Bubble Liposomes and Ultrasound

C57BL/6 mice were subcutaneously injected into right flank with B16. At 7 days after injection, when tumor volume become approximately 50 mm³, intravascular hK1-5 gene transfection into skeletal muscle by Bubble liposomes and ultrasound was performed. At 15 days, each tumor volume was measured. * $p < 0.05$ vs. saline or empty vector. The data are shown as mean \pm S.D. ($n=6$).

とで全身循環作用を期待する疾患治療戦略の1つとして、その有用性を発揮できたものと考えられる。しかしながら、骨格筋を治療用タンパク質の供給源とすることは、疾患によっては、望まれない臓器や組織においても全身循環した生理活性タンパク質が作用し、それが重篤な副作用を引き起こす恐れも考えられる。例えば、今回のような抗炎症性サイトカインや抗血管新生タンパク質を用いた疾患治療においては、長期の全身作用によって、免疫力の低下を引き起こし、それが日和見感染症につながる恐れや虚血性疾患を誘発させてしまうことなども危惧される。

それゆえ、今後は、治療用タンパク質用の遺伝子発現ベクターを工夫することで発現量や発現時間をコントロールすることや産生分泌させるタンパク質に標的細胞への指向性を付与することで、安全かつ効率的なピンポイント治療が可能となると期待される。

8. おわりに

遺伝子工学が発展し、疾患関連遺伝子の発見や遺伝子診断技術の進歩に伴い、その情報を利用して治療を行う遺伝子治療への期待が高まっている。疾患の原因となる遺伝子の変異に対して、補完する遺伝子を導入したり、発現を抑えるアンチセンスを導入したりする方法が模索されている。しかし、いずれの場合においても、最適な導入技術が存在して初めて治療効果を獲得できる。そのような点で、バブルリポソームによる骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステムは、有用な手段と考えられる。今回紹介した関節炎やがん治療以外にも、上述の課題を克服することが可能となれば、感染症や循環器疾患などの治療にも適用範囲を拡大できるものと思われる。臨床応用に際しては、さらなる安全性の確保が求められるが、本研究成果が、その足掛かりとなることを期待したい。

謝辞 本稿で紹介した研究成果は、主に東京薬科大学薬学部薬物送達学教室と帝京大学薬学部生物薬剤学教室・丸山一雄先生、鈴木 亮先生との共同研究の一環として行われたものである。研究遂行にご協力頂いた当教室の学生諸子（特に福山哲也修士、角田由佳修士、関根祥子修士、松尾慶子修士、西島信明修士）に深謝する。また、本研究遂行にご

協力頂いた昭和大学歯学部歯周病学教室・山本松男先生、東邦大学医療センター大森病院口腔外科・関谷秀樹先生、超音波照射に関する技術的なご指導を頂いた福岡大学医学部解剖学教室・立花克郎先生、ネッパジーン㈱・早川靖彦氏、鈴木孝尚氏に深謝する。さらに、本研究は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）（Industrial Technology Research Grant Program (04A05010)）、文科省科研費：萌芽研究（18650146）、基盤研究（B）（20300179）の研究助成により遂行されたものであり、ここに深甚なる誠意を表します。

REFERENCES

- 1) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861–870 (2001).
- 2) Niidome N., Huang L., *Gene Ther.*, **9**, 1647–1652 (2002).
- 3) Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Hagsawa K., Tanaka K., Sawamura K., Utoguchi N., Nishioka T., Maruyama K., *J. Control. Release*, **117**, 130–136 (2007).
- 4) Negishi Y., Endo Y., Fukuyama T., Suzuki R., Takizawa T., Omata D., Maruyama K., Aramaki Y., *J. Control. Release*, **132**, 124–130 (2008).
- 5) Negishi Y., Sekine S., Endo Y., Nishijima N., Suzuki R., Maruyama K., Aramaki Y., *AIP Conf. Proc.*, **1215**, 299–302 (2009).
- 6) Negishi Y., Omata D., Iijima H., Takabayashi Y., Suzuki K., Endo Y., Suzuki R., Maruyama K., Nomizu M., Aramaki Y., *Mol. Pharm.*, **7**, 217–226 (2010).
- 7) Suzuki R., Namai E., Oda Y., Nishiie N., Otake S., Koshima R., Hirata K., Taira Y., Utoguchi N., Negishi Y., *J. Control. Release*, **142**, 245–250 (2010).
- 8) Tachibana K., Tachibana S., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 3014–3019 (1999).
- 9) Mitragotri S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 255–259 (2005).
- 10) Lawrie A., Brisken A. F., Francis S. E., Cumberland D. C., Crossman D. C., Newman C. M., *Gene Ther.*, **7**, 2023–2027 (2000).
- 11) Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Namba T., Yamasaki K., Hashiya N., Aoki M., Ogihara T., Yasufumi K., Morishita R., *Circulation*, **105**, 1233–1239 (2002).

-
- 12) Maruyama K., Ishida O., Kasaoka S., Takizawa T., Utoguchi N., Shinohara A., Chiba M., Kobayashi H., Eriguchi M., Yanagie H., *J. Control. Release*, **98**, 195–207 (2004).
- 13) Cao R., Wu H. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5728–5733 (1999).