

がん遺伝子治療のための非ウイルスベクターの開発

服部 喜之

Development of Non-viral Vector for Cancer Gene Therapy

Yoshiyuki HATTORI

Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received March 17, 2010)

Cancer gene therapy has been intensively developed using non-viral vectors, among which cationic liposomes and nanoparticles are the most investigated. Optimal gene therapy for tumors must deliver plasmid DNA (pDNA) or synthetic small interfering RNA (siRNA) to tumor cells with high efficiency and minimal toxicity. We developed new cationic nanoparticles (NP) composed of cholesteryl-3 β -carboxyamidoethylene-*N*-hydroxyethylamine (OH-Chol) and Tween 80, and evaluated the transfection efficiencies of pDNA and siRNA into human prostate tumor PC-3 xenografts. NP showed effective transfection of pDNA and siRNA when directly injected into the xenografts. For targeted delivery to tumors, vitamin folic acid has been utilized for folate receptor (FR)-mediated drug delivery since FR is frequently overexpressed on many types of human tumors. We developed folate-linked nanoparticles (NP-F) composed of OH-Chol, Tween 80 and folate-poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine conjugate. Tumor growth of FR-positive human nasopharyngeal tumor KB xenografts was significantly inhibited when a complex of NP-F and a therapeutic gene was intratumorally injected. These findings suggested that cationic cholesterol-based nanoparticles are potential non-viral pDNA and siRNA vectors for local tumor treatment.

Key words—gene delivery; gene therapy; nanoparticles; folic acid; folate receptor; cationic cholesterol

1. はじめに

近年、分子生物学の進歩が目覚ましく、遺伝子操作・導入が飛躍的に進歩し、がん治療においても遺伝子治療の臨床応用が期待されている。なかでも、抗がん剤により治療効果を示さない難治性のがんに対する新たな治療法として遺伝子治療が期待されている。がん遺伝子導入用の遺伝子ベクターには、レトロウイルスやアデノウイルスなどのウイルスベクターと、リポソームやポリマーなどの非ウイルスベクターが用いられている。ウイルスベクターは遺伝子導入効率が高いが、その抗原性や変異ウイルスの出現などの問題がある。フランスではX連鎖重症複合免疫不全症における遺伝子治療の臨床応用において、染色体に挿入されたレトロウイルスベクターによりがん遺伝子であるLMO2遺伝子を活性化さ

せT細胞性白血病を発症させた報告や、¹⁾アデノウイルスベクターによりオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子治療を受けた患者が、アデノウイルスベクターの肝動脈内投与後、呼吸困難と多臓器不全により死亡した報告がされている。²⁾一方、リポソームやエマルション等の脂質ナノ粒子製剤は、生体膜の構成成分であるリン脂質等を主成分としているため、毒性や抗原性が低いという利点を持っており、遺伝子治療における遺伝子送達用ベクターとしての有用性が期待されている。^{3,4)}しかし、脂質ナノ粒子製剤の問題点は、血清存在下において遺伝子導入率が低下することや、*in vivo*での遺伝子発現効率が低いことなどである。そこで筆者らは、安全性が高く、導入効率の高い、脂質から構成される遺伝子導入用ナノ粒子製剤の開発を行った。

2. プラスミドDNA導入用正電荷脂質ナノ粒子製剤の開発

リポソームなどの遺伝子導入用の脂質ナノ粒子製剤は、負電荷のDNAと静電的に結合させるために、製剤組成に正電荷脂質を用いる。⁵⁾筆者らは、

星薬科大学医薬品化学研究所創剤構築研究室 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)

e-mail: yhattori@hoshi.ac.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

正電荷脂質として正電荷コレステロール誘導体に着目し、正電荷コレステロール誘導体を主成分とした正電荷ナノ粒子製剤の開発を試みた。正電荷コレステロール誘導体は、コレステロール骨格、正電荷官能基、これらをつなぐリンカー部で構成される。遺伝子導入用の正電荷コレステロール誘導体は、3級アミンでカルバミド結合のリンカー部を有する3β-[N-(N',N'-Dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol (DC-Chol) が第一世代の正電荷コレステロール誘導体として開発されている (Fig. 1)。⁶⁾ 遺伝子導入効率は正電荷官能基やリンカー部により大きく影響を受けることが知られており、⁵⁾ ヒドロキシエチル基で修飾されたアミンを有する正電荷脂質ががん細胞に対して高い遺伝子発現を誘導できることも報告されていた。⁷⁻¹¹⁾ そこで著者らは、ヒドロキシエチル基で修飾されたアミン基を有する正電荷コレステロール誘導体に着目し、生分解性のリンカー部を有する様々な正電荷コレステロール誘導体を合成した。^{12,13)} そして、合成した正電荷コレステロール誘導体を用いて脂質ナノ粒子製剤を調製し、高い遺伝子発現を誘導できる正電荷コレステロール誘導体の探索を行った。

脂質ナノ粒子製剤の組成は、各正電荷コレステロール誘導体に界面活性剤である Tween 80 を安定剤として添加し、修正エタノール注入法により粒子径約 100 nm の脂質ナノ粒子製剤を調製した。¹³⁾ そして、脂質ナノ粒子製剤を用いてルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド DNA (pCMV-luc) をヒト前立腺がん PC-3 細胞に対して遺伝子導入を行っ

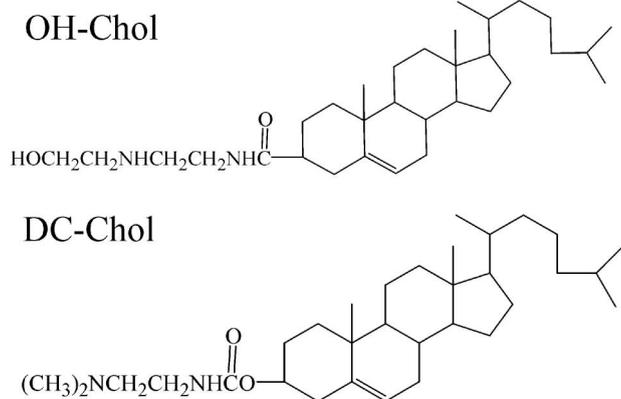


Fig. 1. Structure of Cationic Derivatives of Cholesterol
OH-Chol; cholesteryl-3β-carboxyamidoethylene-N-hydroxyethylamine,
DC-Chol; 3-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol.

たところ、様々な正電荷コレステロール誘導体の中でも cholesteryl-3β-carboxyamidoethylene-N-hydroxyethylamine (OH-Chol) (Fig. 1) を主成分とする脂質ナノ粒子製剤 (NP) が最も高い遺伝子発現を誘導できることがわかった。¹³⁾ また、NP による遺伝子発現効率は、NP とプラスミド DNA (pDNA) の荷電比 (+/-) の上昇とともに上昇し、正電荷を有する脂質ナノ粒子/pDNA 複合体 (脂質ナノ粒子複合体) を調製した時に最も高い遺伝子導入効率を示し、市販の遺伝子導入試薬と同等であった [Fig. 2(A)].¹³⁾ また、一般的に正電荷リポソームを調製する場合、リポソーム組成に中性脂質として膜融合活性を有する dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) が使用される場合が多いが、OH-Chol と DOPE の組成で調製された正電荷リポソームよりも OH-Chol と Tween 80 の組成で調製された NP の方が高い遺伝子導入活性を示すことも明らかにしている。¹³⁾

さらに、PC-3 細胞をヌードマウス皮下に移植した担がんマウスに、NP を用いて腫瘍に直接遺伝子導入を行ったところ、*in vivo* においては荷電比 (+/-) を 1/1 で調製した負電荷を有する脂質ナノ粒子複合体が正電荷のものよりも腫瘍内で高い遺伝子発現を誘導することができた [Fig. 2(B)].¹³⁾ さらに、この負電荷の脂質ナノ粒子複合体は、市販の *in vivo* 遺伝子導入試薬である *in vivo* jetPEI (Poly-Plus-transfection 社) よりも高い遺伝子発現を示すことも明らかにしている。¹³⁾ 負電荷の脂質ナノ粒子複合体が正電荷の脂質ナノ粒子複合体よりも高い遺伝子発現を示した理由は、腫瘍組織中を脂質ナノ粒子複合体が拡散する際に、正電荷のものよりも負電荷の方が組織への吸着が少なく、広く腫瘍内を拡散できたからではないかと考えている。そのため、培養細胞で得られた最適な遺伝子導入条件が、かならずしも *in vivo* においても同じではないということ



服部喜之

星薬科大学医薬品化学研究所・准教授。平成 11 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) 取得後、平成 11 年 4 月より東ソー株式会社勤務。平成 14 年 4 月より星薬科大学医薬品化学研究所・助手として赴任。平成 17 年 7 月より講師、平成 21 年 5 月より現職。研究領域は薬物送達システムの開発。

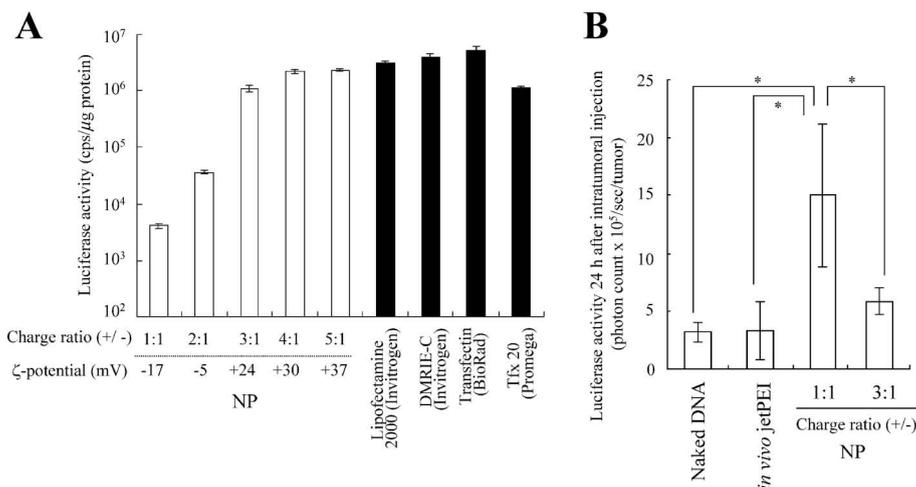


Fig. 2. Effect of Charge Ratio (+/-) in Forming Nanoplex of pCMV-luc on Transfection in PC-3 cells (A) and Tumor Xenografts (B)

(A) The luciferase assay was carried out 24 h after incubation of the nanoplexes. (B) PC-3 tumor xenografts were directly injected with nanoplex formed with 10 μ g pDNA; *in vivo* jetPEI according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after i.t. injections, mice were imaged by an NightOWL LB981 NC100 system (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and bioluminescence was quantified. Each column represents the mean \pm S.D. ($n=3$). Statistical significance was evaluated by Student's *t* test. * $p<0.05$.

が示唆された。以上の結果から、NPは *in vitro* 並びに *in vivo* において pDNA を高効率に導入できる製剤であることがわかった。

3. 正電荷脂質ナノ粒子による短鎖 2 本鎖 RNA の導入

RNA 干渉は、二本鎖 RNA と相補的な塩基配列を持つ mRNA が分解される現象で、この現象を利用して人工的に合成した二本鎖 RNA を細胞内に導入することにより、任意の遺伝子の発現を抑制させることができる。¹⁴⁾ そのため、短鎖 2 本鎖 RNA (small interfering RNA, siRNA) を、最小限の副作用で最大限の薬理効果を発揮する次世代の核酸医薬として期待が高まっている。siRNA に用いられる核酸は、19–27 塩基から構成される合成短鎖 2 本鎖 RNA である。RNA 干渉は細胞質で起こる現象のため、細胞質に siRNA を高効率に導入することができればその効果を発揮できると考えられている。

筆者らは、様々な正電荷コレステロール誘導体を用いて調製した脂質ナノ粒子製剤を用いて、siRNA による遺伝子発現抑制効率を比較検討した。ルシフェラーゼ安定発現株 PC-3 細胞に対して、脂質ナノ粒子製剤を用いてルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA (luciferase siRNA) を導入したところ、上記の OH-Chol を用いて調製した NP において、最も高い遺伝子発現抑制効果を誘導することができるこ

とがわかった。^{15,16)} また、NP による PC-3 培養細胞に対する遺伝子発現抑制効率は、NP と siRNA の荷電比 (+/-) の上昇とともに上昇し、正電荷を有する脂質ナノ粒子複合体を調製した際に最も高い遺伝子発現抑制効果を示した [Fig. 3(A)].¹⁶⁾ 一方、ヒト大腸がん HT-29 細胞をヌードマウス皮下に移植した担がんマウスの腫瘍に、NP を用いて直接 siRNA 導入を行った場合は、pDNA と同様に負電荷を有する脂質ナノ粒子複合体を調製した時に高い遺伝子発現抑制効果を誘導できることもわかった [Fig. 3(B)]. この結果から、NP は pDNA のみならず siRNA も *in vitro* 並びに *in vivo* において高効率に導入できる製剤であることが明らかとなった。

4. 葉酸受容体標的脂質ナノ粒子製剤の開発

葉酸は、すべての細胞が DNA 合成に必要とするビタミンである。とりわけがん細胞は、平均的な量より多くのビタミンを必要とする。多くのがん細胞においては、葉酸受容体が過剰発現し、葉酸の取り込みが高いことが報告されていることから、葉酸修飾した脂質ナノ粒子製剤は、がん標的製剤として望ましいと考えられる。¹⁷⁾ 葉酸をがん標的リガンドとして使用することのその他の利点として、1) 葉酸の分子量が小さい、2) 安価である、3) 葉酸修飾脂質の合成が容易である、4) 葉酸と葉酸受容体の複合体がエンドサイトーシスにて取り込まれる、ことなどが挙げられる。最近までに、葉酸受容体を標的

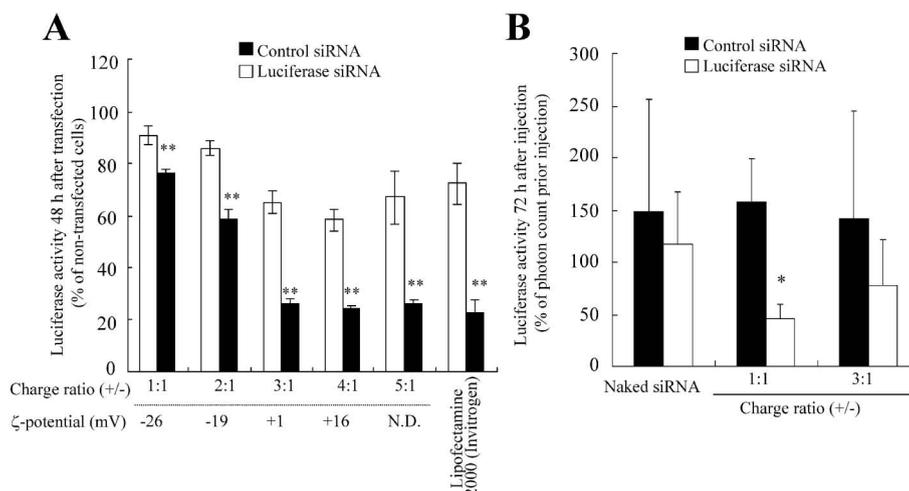


Fig. 3. Effect of Charge Ratio (+/-) in Forming Nanoplex of siRNA on Transfection in Luciferase Stably Expressing PC-3 Cells (A) and Luciferase Stably Expressing HT-29 Tumor Xenografts (B)

(A) The luciferase assay was carried out 48 h after incubation of the nanoplexes. (B) HT-29 tumor xenografts were directly injected with nanoplex formed with 10 μ g siRNA. Seventy-two hours after i.t. injections, mice were imaged by an NightOWL LB981 NC100 system and bioluminescence was quantified. Each column represents the mean \pm S.D. ($n=3$). N.D., not done. Statistical significance was evaluated by Student's t test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

とした製剤として抗がん剤を封入した葉酸修飾リポソーム等は報告されていたが、¹⁸⁻²²⁾ 遺伝子送達用ベクターとしての報告、特に *in vivo* での報告が少なかったことから、筆者らは葉酸修飾脂質ナノ粒子製剤 (NP-F) を開発し、がん細胞に高効率に遺伝子導入が可能かどうか検討した。

まず、NP-F の調製のために葉酸とポリエチレングリコール (PEG, 分子量 2000) 脂質とを結合させた葉酸修飾 PEG 脂質を合成し、NP の組成に葉酸修飾 PEG 脂質を加えて NP-F を調製した (Fig. 4).^{23,24)} そして、NP あるいは NP-F を用いて葉酸受容体を過剰発現している扁平上皮がん KB 細胞に遺伝子導入を行ったところ、NP による遺伝子導入と同時に葉酸を添加した場合は遺伝子の細胞内取り込み量に変化は観察されなかったが、NP-F による遺伝子導入と同時に葉酸を添加した場合は細胞内取り込み量の低下が観察された [Figs. 5 (A) and (B)].^{25,26)} この結果は、NP-F が葉酸受容体を介して選択的にがん細胞内に遺伝子導入されていることを示唆している。さらに、KB 細胞担がんマウスに対し NP-F を用いて負電荷の脂質ナノ粒子複合体を調製し腫瘍内投与したところ、高い遺伝子発現を誘導できた。^{24,27)} 以上の結果より、筆者らが開発した NP-F はがん細胞に発現する葉酸受容体を介して選択的に遺伝子導入できる製剤であることがわかった。

5. 脂質ナノ粒子製剤を用いたがん遺伝子治療

筆者らが開発した脂質ナノ粒子ががん遺伝子治療において有効な製剤であることを確認するには、*in vivo* で治療用遺伝子を腫瘍内に導入し、腫瘍増殖抑制効果を誘導できるかどうか検討する必要がある。HER-2 は乳がん等多くのがん細胞にて過剰発現が観察されており、腫瘍の分化、増殖に関与している。現在、HER-2 を過剰発現している乳がんに対して HER-2 を標的としたヒト化モノクローナル抗体であるハーセプチン (一般名: トラスツズマブ) が適用されている。そこで筆者らは、HER-2 陽性 KB 細胞に対し、NP-F を用いて HER-2 を標的とした siRNA (HER-2 siRNA) を投与することで、HER-2 の発現を抑制し、腫瘍増殖を抑制することができるか検討した。また、NP-F の葉酸受容体への選択性を調べるために、葉酸未修飾の PEG 脂質を用いて NP-P も調製した。KB 細胞担がんマウスに NP-P を用いて HER-2 siRNA を腫瘍内投与したところ、コントロール siRNA 投与群と比較し有意な抗腫瘍効果は観察されなかったが [Fig. 6(A)], NP-F を用いて HER-2 siRNA を腫瘍内投与した場合は、コントロール siRNA 投与群と比較し有意な抗腫瘍効果が観察された [Fig. 6(B)].²⁶⁾ この結果より、NP-F は葉酸受容体を介して HER-2 siRNA を腫瘍細胞内に導入し、HER-2 発現を抑制することで腫瘍増殖抑制効果を誘導したものと考えられ

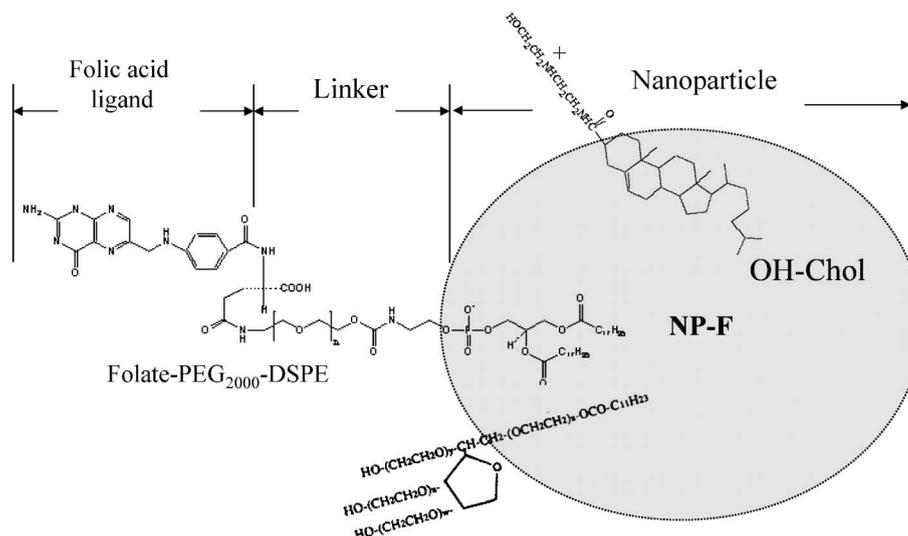


Fig. 4. Schematic Structure of Folate-linked Nanoparticles (NP-F) Composed of Folate-PEG₂₀₀₀-Phosphatidylethanolamine (DSPE), OH-Chol and Tween 80

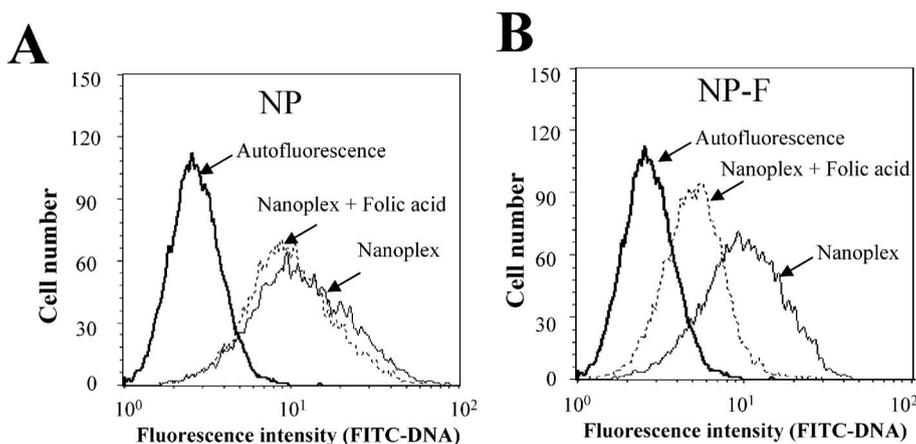


Fig. 5. Association of FITC-labeled NP (A) or NP-F (B) Nanoplex with KB Cells 3 h after Transfection in the Absence or Presence of Free Folic Acid

The association was determined based on FITC-fluorescence by flow cytometry. Flow cytometry of cells exposed to the nanoplex (continuous line). Dotted line, plus 1 mM folic acid; Bold line, autofluorescence of the cells.

た。さらに、HER-2 siRNA を KB 細胞担がんマウスの腫瘍内に NP を用いて投与後、パクリタキセルを静脈内投与することで抗腫瘍効果がパクリタキセル単独よりも高くなることも見出ししている。²⁸⁾

しかしながら現在、遺伝子治療のみで完全に腫瘍を退縮させることには成功していない。その理由は、*in vivo* におけるナノ粒子製剤による遺伝子導入効率がまだ不十分であり、腫瘍全体に治療用遺伝子を導入できないからである。そのため、現在までに筆者らは、がん遺伝子治療と化学療法の併用療法により、相乗・相加的な治療方法の開発も行っている。治療用遺伝子を使ってがん細胞を直接殺傷する方法

の1つとして、ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) を使った自殺遺伝子療法があり、これは標的がん細胞に HSV-tk 遺伝子を導入後、プロドラッグであるガンシクロビル (GCV) を投与して HSV-tk 遺伝子を発現したがん細胞を殺す方法である。筆者らは、NP-F を用いて KB 担がんマウスの腫瘍内に HSV-tk 遺伝子を導入後に GCV を投与することにより、腫瘍体積の縮小を誘導することに成功している。^{17,24)} また、コネキシン 43 (Cx43) はギャップ結合を構成するタンパク質の1つであるが、がん細胞での Cx43 の強制発現はがん細胞の増殖を抑制することから、Cx43 はが

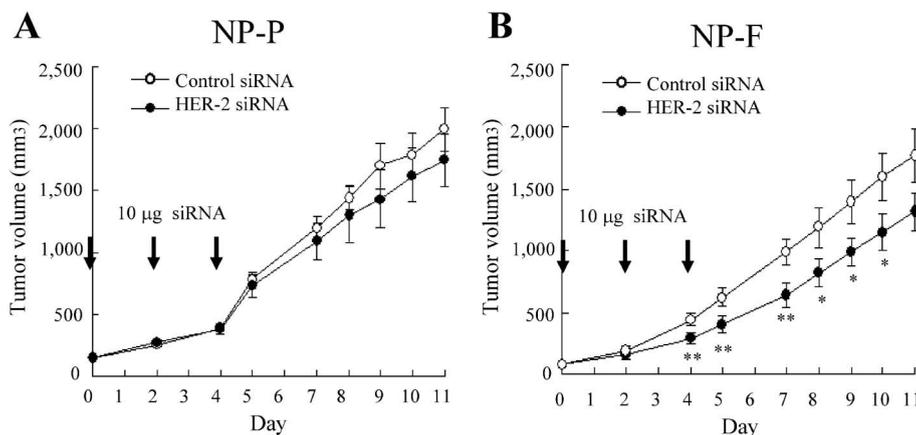


Fig. 6. *In Vivo* Gene Therapy of KB Tumor Xenografts with HER-2 siRNA in Mice

Mice were divided into two groups: group I, control siRNA (10 µg) as a control; group II, HER-2 siRNA (10 µg). NP-P (A) or NP-F nanoplexes (B) of siRNAs were injected directly into the tumor three times (day 0, 2 and 4). The results indicate the mean ± S.E. ($n=4-6$). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, compared with control siRNA by Student's *t*-test.

増殖抑制タンパク質であることが報告されている。²⁹⁾ Cx43 を発現する pDNA を NP あるいは NP-F により KB 細胞担がんマウスの腫瘍内に導入することにより、パクリタキセルやヒストン脱アセチル化阻害薬などの抗がん薬の感受性を高め、高い抗腫瘍効果を得ることに成功している。^{27,30)} さらに近年、内分泌腫瘍の 1 つである甲状腺髄様がんの原因遺伝子である *Rearranged during transfection* (RET) というチロシンキナーゼ型受容体に対する siRNA (RET siRNA) を用いて甲状腺髄様がんに対する抗腫瘍効果の評価も行っている。甲状腺髄様がん TT 担がんマウスに対して NP を用いて RET siRNA を腫瘍内に直接投与しても、RET siRNA 単独投与では高い抗腫瘍効果は観察されなかったが、抗がん剤のイリノテカン (CPT-11) と併用することにより高い抗腫瘍効果を誘導できることも明らかにしている。³¹⁾ 以上の結果より、NP を用いた遺伝子治療と化学療法の併用療法も今後の有用ながん治療法の 1 つではないかと考えている。

6. おわりに

筆者らは、正電荷コレステロール誘導体から構成される遺伝子導入用の脂質ナノ粒子製剤を開発した。この脂質ナノ粒子製剤は、培養細胞だけではなく、*in vivo* においても腫瘍内投与により高い遺伝子発現を誘導できることを明らかにしている。さらに、がん特異的に遺伝子導入するために、がん特異的リガンドである葉酸で修飾した葉酸修飾ナノ粒子 (NP-F) も開発した。そして、これら脂質ナノ粒子

製剤を用いて治療用 pDNA あるいは siRNA によるがん遺伝子治療あるいは抗がん剤との併用療法を行った結果、高い抗腫瘍効果を得ることに成功した。現在、静脈内投与により腫瘍へ集積し高効率に遺伝子発現を誘導できるナノ粒子製剤の開発は成功されていないことから、今後は、臨床で使用できる静脈内投与可能ながん遺伝子治療用脂質ナノ粒子の開発を目指して研究を進めたいと考えている。

謝辞 本稿で紹介した研究は、星薬科大学医薬品化学研究所創剤構築研究室において行われたものであり、本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました星薬科大学米谷芳枝教授に感謝いたします。また、研究にご協力頂きました大学院生の皆様にお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Haccin-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M. P., Wulffraat N., Le-boulch P., Lim A., Osborne C. S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J. I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L. E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T. H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., *Science*, **302**, 415-419 (2003).

- 2) Marshall E., *Science*, **286**, 2244–2245 (1999).
- 3) Liu F., Huang L., *J. Control. Release*, **78**, 259–266 (2002).
- 4) Smyth T. N., *DNA Cell Biol.*, **21**, 857–867 (2002).
- 5) Hirko A., Tang F., Hughes J. A., *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1185–1193 (2003).
- 6) Gao X., Huang L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 280–285 (1991).
- 7) Felgner J. H., Kumar R., Sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P. L., *J. Biol. Chem.*, **269**, 2550–2561 (1994).
- 8) Bennett M. J., Aberle A. M., Balasubramaniam R. P., Malone J. G., Malone R. W., Nantz M. H., *J. Med. Chem.*, **40**, 4069–4078 (1997).
- 9) Percot A., Briane D., Coudert R., Reynier P., Bouchemal N., Lievre N., Hantz E., Salzmann J. L., Cao A., *Int. J. Pharm.*, **278**, 143–163 (2004).
- 10) Okayama R., Noji M., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **408**, 232–234 (1997).
- 11) Nakanishi M., *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1289–1296 (2003).
- 12) Ding W., Hattori Y., Higashiyama K., Maitani Y., *Int. J. Pharm.*, **354**, 196–203 (2008).
- 13) Hattori Y., Ding W. X., Maitani Y., *J. Control. Release*, **120**, 122–130 (2007).
- 14) Ichim T. E., Li M., Qian H., Popov I. A., Rycerz K., Zheng X., White D., Zhong R., Min W. P., *Am. J. Transplant.*, **4**, 1227–1236 (2004).
- 15) Hattori Y., Yoshizawa T., Koga K., Maitani Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2294–2301 (2008).
- 16) Hattori Y., Hagiwara A., Ding W., Maitani Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 5228–5232 (2008).
- 17) Hattori Y., Maitani Y., *Curr. Drug Deliv.*, **2**, 243–252 (2005).
- 18) Shiokawa T., Hattori Y., Kawano K., Ohguchi Y., Kawakami H., Toma K., Maitani Y., *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2018–2025 (2005).
- 19) Kawano K., Onose E., Hattori Y., Maitani Y., *Mol. Pharm.*, **6**, 98–104 (2009).
- 20) Ohguchi Y., Kawano K., Hattori Y., Maitani Y., *J. Drug Target.*, **16**, 660–667 (2008).
- 21) Yamada A., Taniguchi Y., Kawano K., Honda T., Hattori Y., Maitani Y., *Clin. Cancer Res.*, **14**, 8161–8168 (2008).
- 22) Hayama A., Yamamoto T., Yokoyama M., Kawano K., Hattori Y., Maitani Y., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **8**, 3085–3090 (2008).
- 23) Hattori Y., Maitani Y., *J. Control. Release*, **97**, 173–183 (2004).
- 24) Hattori Y., Maitani Y., *Cancer Gene Ther.*, **12**, 796–809 (2005).
- 25) Hattori Y., Kubo H., Higashiyama K., Maitani Y., *J. Biomed. Nanotech.*, **97**, 176–184 (2005).
- 26) Yoshizawa T., Hattori Y., Hakoshima M., Koga K., Maitani Y., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **70**, 718–725 (2008).
- 27) Hattori Y., Fukushima M., Maitani Y., *Int. J. Oncol.*, **30**, 1427–1439 (2007).
- 28) Hattori Y., Hakoshima M., Koga K., Maitani Y., *Int. J. Oncol.*, **36**, 1039–1046 (2010).
- 29) Yamasaki H., Naus C. C., *Carcinogenesis*, **17**, 1199–1213 (1996).
- 30) Fukushima M., Hattori Y., Yoshizawa T., Maitani Y., *Int. J. Oncol.*, **30**, 225–231 (2007).
- 31) Koga K., Hattori Y., Komori M., Narishima R., Yamasaki M., Hakoshima M., Fukui T., Maitani Y., *Cancer Sci.*, **101**, 941–947 (2010).