がん治療のための short hairpin RNA 発現ベクターのデリバリー

特集 遺伝子・核酸医薬品のデリバリー

西川元也・高橋有己・高倉喜信*

Delivery of vectors expressing short hairpin RNA for cancer therapy

Cancer is linked to aberrant gene expression, so that its correction can be an effective approach to treating cancer patients. Silencing oncogenes or other genes contributing to tumor progression or metastasis will provide a cancer-specific therapy with minimal side effects.

RNA interference has realized the silencing of target mRNA expression in a sequence-specific manner. Both small interfering RNA (siRNA) and vectors expressing short hairpin RNA (shRNA) have been reported to be effective in silencing the genes of interest once they enter target cells. Plasmid DNA expressing shRNA (pshRNA) inhibits the expression of target genes for a longer period of time than siRNA. Because gene expression can be silenced only in cells reached by pshRNA, its delivery to tumor cells is an important factor determining its efficacy on cancer therapy.

Here we review several approaches to delivering pshRNA to tumor cells for cancer therapy.

がんは遺伝子の発現異常と密接に関連することから、その異常を修復することによりがん治療が実現可能である。がん遺伝子やがんの進展・転移に関連する遺伝子の発現を抑制することで、副作用の少ないがん特異的治療が実現するものと期待される。

RNA 干渉の発見により、配列特異的な遺伝子発現抑制が現実のものとなった。これまでに siRNA または短鎖ヘアピン型 RNA (shRNA) 発現ベクターの細胞内導入により、標的遺伝子の発現を効率よく抑制可能であることが報告されている。shRNA 発現プラスミド DNA (pshRNA) を用いることで、siRNA と比較して長期間の遺伝子発現抑制が得られる。pshRNA が移行した細胞でのみ遺伝子発現が抑制されることから、RNA 干渉の誘導によるがん治療効果を決定する重要な要因として pshRNA のがん細胞へのデリバリー効率があげられる。

本稿では、がん治療を目的とした pshRNA のがん細胞へのデリバリーについて概説する。

Makiya Nishikawa・Yuki Takahashi・Yoshinobu Takakura*

key words : RNA interference, short hairpin RNA, hydrodynamic delivery, electroporation, tumor growth, hypoxia inducible factor

バイオテクノロジーの飛躍的な発展やヒトゲノム計画の完了などを背景として、近年、がんに対する化学療法の分野にさまざまな新しい治療薬が投入されるようになった。なかでもがん細胞特有の“標的分子”を狙う分子標的治療は、がん細胞に発現する変異蛋白質と特異的に相互作用するようにデザインされていることから、従来型の抗がん剤と比較して効果が高く副作用が少ない。標的には、細胞周期調節や血管新生阻害などに関与する遺伝子や蛋白質が選択される場合が多い。代表的なものには、慢性骨

髄性白血病に対するグリベックや非小細胞肺癌に對するイレッサなどの低分子有機化合物に加えて、乳がんに対するハーセプチンに代表されるモノクローナル抗体があげられる。

分子標的治療には、塩基配列特異的な遺伝子発現抑制が可能な mRNA を標的とする試みも含まれる。アンチセンスやリボザイムなどについては、以前よりさまざまな検討が試みられており、Isis 社の Vitravene がサイトメガロウイルス性網膜炎治療薬として米国 FDA に認可されている。アンチセンス法と比較して RNA 干渉は配列特異性が高いこと、遺伝子発現抑制効果が強力であることから、よりすぐれた分子標的治療法として期待されている。しか

* Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University 京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野

図1 プラスミドDNAを用いた各種遺伝子導入法による肝臓での遺伝子発現レベルの比較

ホタルルシフェラーゼ発現プラスミドDNA (pCMV-Luc) を種々の投与量でマウスに投与したときの、6時間後の肝臓中ルシフェラーゼ活性 (RLU/10 sec/mg protein) を投与量に対してプロットした。

DI: 肝臓への直接注射²⁾。DI+EP: 肝臓への直接注射後エレクトロポレーション (500 V/cm, 5 ms, 12 回, 4 Hz) を併用²⁾。IV+EP: 尾静脈注射後エレクトロポレーション (500 V/cm, 5 ms, 12 回, 4 Hz) を併用³⁾。Gal-PEI, ip: ガラクトース修飾ポリエチレンイミン複合体の門脈内注射⁴⁾。Gal-pOrn-mHA2: ガラクトース修飾ポリオルニチン-膜融合ペプチド複合体の尾静脈内注射⁵⁾。Gal-lipo, ip: ガラクトース修飾カチオン性リポソーム複合体の門脈内注射⁶⁾。HD: ハイドロダイナミクス法による尾静脈内注射⁹⁾。

しながら、核酸医薬品であることから酵素安定性ならびに生体膜透過性が低く、安定性を改善することに加えて標的細胞内へのデリバリー効率を増大することが有効な治療の実現には必須である。

核酸医薬品の細胞内デリバリーに関しては、これまでさまざまな技術が開発されてきた。なかでも非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入に関する検討においては、プラスミドDNA単独の投与方法の最適化にはじまり、電気パルスや超音波などの物理刺激の利用、各種高分子・微粒子ベクターとの複合体化による遺伝子発現の増大など、多岐にわたる技術が集積されている¹⁾。各方法論を利用することで遺伝子発現効率の増大、すなわち核酸医薬品(この場合はプラスミドDNA)の細胞内デリバリーが改善される。しかしながら、そのデリバリー効率は利用する投与方法に依存し、また培養細胞での結果とマウスなどに対する場合とでも結果は大きく異なる。

CMVプロモーターにドライブされたホタルルシフェラーゼcDNAをコードするプラスミドDNA

(pCMV-Luc)を種々の投与方法でマウスに投与したときの、肝臓中ルシフェラーゼ活性の最大値(投与6時間後のデータ)を図1に示す。プラスミドDNA単独を肝臓に直接注射することにより遺伝子発現が得られるが、その発現レベルはエレクトロポレーションを併用することで有意に増大する²⁾。プラスミドDNA単独を血管内に投与後、肝臓を対象にエレクトロポレーションを併用することでも高い遺伝子発現が得られる³⁾。あるいは、レセプター介在性エンドサイトーシスを利用した細胞特異的デリバリーも可能であり、肝細胞を標的とした場合には、ガラクトース修飾を施したカチオン性ポリマー、あるいはカチオン性リポソームの利用により肝臓での遺伝子発現が得られる^{4~6)}。

こうした投与方法では、マウス1匹当たり通常10~50 μgのプラスミドDNAが用いられ、ルシフェラーゼ活性で $10^5 \sim 10^7$ RLU/10 sec/mg protein程度の遺伝子発現が得られる。こうしたアプローチに対して、プラスミドDNA水溶液を尾静脈内に急速に投与するハイドロダイナミクス(HD)法^{7~10)}の場合には、マウス1匹当たりわずか0.01 μgの投与量でも 10^7 RLU/10 sec/mg protein以上の高い遺伝子発現が認められ、発現の最大値も 10^{10} RLU/10 sec/mg proteinを超え、他の投与方法と比較して1,000倍以上である。また、HD法による遺伝子導入の場合には、多くの細胞での遺伝子発現が可能である。

β-ガラクトシダーゼを発現するプラスミドDNAを投与したマウスのX-gal染色像を図2に示す。局所投与の場合と比較して、HD法による投与では肝臓全体で非常に多くの細胞が外来遺伝子を発現することが示されている。

これらの遺伝子導入を目的とした検討から、少なくとも*in vivo*の検討においては、プラスミドDNAなどの核酸医薬品を単独の形で投与することで、標的細胞内への効率的なデリバリーが実現可能と考えられる。そこで本稿では、筆者らの検討結果を中心にsiRNA (small interfering RNA) 単独、あるいはshRNA (short hairpin RNA) 発現プラスミドDNA単独を利用した*in vivo* RNA干渉によるがん治療の試みについて解説する。

肝臓への直接注射

尾静脈注射後エレクトロ
ポレーション併用

ハイドロダイナミクス法に
よる尾静脈注射

図2 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド DNA 投与後の肝臓での
 β -ガラクトシダーゼ発現細胞の分布

β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド DNA を種々の投与方法でマウスに投与したときの、24 時間後の肝臓中 β -ガラクトシダーゼ活性を X-gal を用いた染色により評価した。

図3 B16-BL6 細胞への siRNA 単回導入後の RNA 干渉効果の経時変化

ルシフェラーゼを安定に発現する B16-BL6 細胞を対象に、LipofectAMINE2000 を用いてルシフェラーゼに対する siRNA を導入したときの細胞中ルシフェラーゼ活性を指標に求めた遺伝子発現の割合の経時変化を示す。(a) 1 nM, (b) 10 nM, (c) 100 nM. *: $P < 0.05$

(Takahashi Y et al., 2006)¹³⁾

pshRNA と siRNA

RNA 干渉は、21~23 塩基対からなる短い二本鎖 RNA である siRNA により配列特異的に mRNA が分解される現象である¹¹⁾。機能分子である siRNA 本体を利用する、あるいは細胞内転写により shRNA を発現するベクターを利用することで RNA 干渉が誘導可能である。両者の物性面での違いについては既報¹²⁾であるが、重要な相違点として遺伝子発現抑制効果の持続時間があげられる。siRNA は経時的に分解されることで RNA 干渉効果が減弱する。実際、細胞における経時的な RNA 干渉効果を定量的に解析した検討から、メラノーマ B16 細胞での効果は投与量依存的であり、抑制

効果は 2~4 日程度であることを示した¹³⁾(図 3)。shRNA 発現プラスミド DNA (pshRNA) の場合についても検討したところ、RNA 干渉誘導は若干遅延すること、その一方で遺伝子発現抑制効果はより持続的であることが明らかとなった。したがって、持続的な遺伝子発現の抑制には siRNA よりも shRNA 発現ベクターが望ましいと考えられる。

In vivo への適用を考えた場合には、標的細胞へのデリバリー効率も効果を左右する重要な因子となる。siRNA と pshRNA とでは、分子サイズに大きな違いが存在する¹²⁾。しかしながら、サイズが小さい siRNA の場合でも 13,000 程度の分子量であり、単純拡散により細胞内移行可能なサイズよりは遥かに大きい。したがって、通常の投与方法では RNA

図 4

GFP 発現プラスミド DNA あるいはその発現ユニットを PCR で増幅した DNA 断片をハイドロダイナミクス法でマウス尾静脈内注射したときの肝臓での GFP 発現細胞の分布

GFP を発現するプラスミド DNA (a), または PCR 増幅 DNA 断片 (b) をマウス当たり 8.4 pmol の投与量で投与 6 時間後に肝臓を摘出し、作製した肝臓切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(Hirata K et al., J Pharm Sci, 印刷中)¹⁶⁾

干渉がほとんど誘導されない。

筆者らはこれまでに、肝細胞あるいはがん細胞を標的とした *in vivo* RNA 干渉誘導に関する検討において、HD 法によるデリバリーあるいは腫瘍局所へのエレクトロポレーションを利用した導入の場合、遺伝子発現抑制効果の最大値には両者に顕著な違いがないことを報告している^{14,15)}。こうした実験結果からは、安定性やデリバリー効率などを含めた最終的な遺伝子発現抑制効果には、siRNA と pshRNA との間に顕著な違いはないものと考えられる。

筆者らは、HD 法を利用した遺伝子デリバリーに関する最近の検討において、遺伝子導入ベクターの短縮化による遺伝子発現細胞数の増大を試みた。しかしながら、4.8 kbp の GFP 発現プラスミド DNA、あるいは発現に必要な部分のみ (1.7 kbp) を PCR で増幅した DNA 断片を HD 法でマウスに遺伝子導入したときの肝臓では、ほぼ同数の細胞で遺伝子発現が認められた¹⁶⁾ (図 4)。したがって、HD 法による肝臓へのデリバリーに関しては分子サイズの影響は小さいものと考えられる。また、分子量 4,000 の PEG を用いた検討では、HD 法を用いても充分な肝臓での集積がみられなかったことから、デリバリーの観点からはサイズが小さいことが必ずしも有利とは限らないことが推察される⁸⁾。

局所投与による遺伝子ノックダウン

血液凝固因子などの分泌蛋白質の遺伝子治療の

場合には、ベクターの導入される細胞数・割合などは、治療効果を考えるうえで必ずしも重要なパラメーターとはならない。しかしながら、RNA 干渉を目的とした pshRNA デリバリーの場合には、標的細胞にどれくらいの割合で pshRNA をデリバリー可能かが治療効果を大きく左右する。図 2 に肝臓の結果を示すが、プラスミド DNA を組織に注射した場合には投与部位近傍の数 mm 程度でしか遺伝子発現が得られない¹⁷⁾。これは RNA 干渉誘導による疾患治療を考えるうえで大きな障壁になるものと考えられる。

局所投与したプラスミド DNA の組織内拡散性を増大する方法として、各種物理刺激の利用があげられ、その代表的なものとして一定の電気パルスを DNA 投与部位に対して与えるエレクトロポレーションがある。一般に、局所注射により投与されたプラスミド DNA からの遺伝子発現は、エレクトロポレーションの併用により 10~100 倍程度増大することが報告されている¹⁾。このときの発現増大は、たんに細胞当たりの発現量が増大することによるばかりでなく、発現細胞数の増大も観察される。図 5 には、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋、皮膚を対象に、 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド DNA を局所注射したときの発現を示すが、いずれの場合にもエレクトロポレーションの適用により遺伝子発現細胞数の増大が認められる²⁾。

マウス皮下腫瘍に対して pshRNA を局所注射し、エレクトロポレーションを適用することで高い遺伝子発現抑制効果が得られている。筆者らは、ホタル

図5 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド DNA 投与後の β -ガラクトシダーゼ発現細胞の分布
 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド DNA を種々の投与方法でマウスに投与したときの、
 24 時間後の各臓器中 β -ガラクトシダーゼ活性を X-gal を用いた染色により評価した。
 (Thanaketsarn O et al., 2005)²⁾

ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを発現するマウスメラノーマ B16-BL6 細胞株を用いることで、ホタルルシフェラーゼに対する pshRNA デリバリーによる抑制効果の定量解析を行った¹⁴⁾。一定量(30 μ g)の pshRNA を単回投与 24 時間後の皮下腫瘍中ホタルルシフェラーゼ活性は、対照群の約 30%程度にまで低下した。この結果から、少なくとも 70%以上のがん細胞で RNA 干渉を誘導可能で

あることが推察される。内因性遺伝子を標的とした場合にもほぼ同等の発現抑制効果が得られている。

β -catenin あるいは *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α) を標的とした検討では、pshRNA の腫瘍内注射とエレクトロポレーションにより mRNA レベルを対照群の 25~35%程度に抑制可能であることが示されている¹⁸⁾。これらががんの増殖や転移に関与する遺伝子の発現を抑制することで有意ながん増

コントロールプラスミド DNA

β -catenin に対する
shRNA 発現プラスミド DNA

$HIF-1\alpha$ に対する
shRNA 発現プラスミド DNA

図6 B16 メラノーマ皮下腫瘍への shRNA 発現プラスミド DNA 投与による腫瘍縮小効果
 β -catenin あるいは $HIF-1\alpha$ を標的とする shRNA 発現プラスミド DNA を腫瘍内注射し、エレクトロポレーション (1,000 V/cm, 5ms, 12 回, 4Hz) を併用した. (Takahashi Y et al., 2006)¹⁸⁾

殖の抑制が得られ、一部マウスではがんの完全退縮が認められた(図6)。

こうした pshRNA のデリバリーによる腫瘍増殖の抑制効果は腫瘍サイズ依存的であり、腫瘍サイズの増大とともに抑制効果が減弱することも明らかとなった。これは、腫瘍の増大に伴い pshRNA がデリバリーされるがん細胞数の割合が減少することによるものと考えられ、デリバリー効率をさらに増大する工夫が必要である。

ハイドロダイナミクス法の利用による 経血管デリバリー

pshRNA を経血管的に投与する方法は、多くの細胞へのデリバリーを可能にする有用な方法である。2002 年に Kay らのグループは、ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を同時に投与する評価系において、siRNA あるいは pshRNA を HD 法で投与することで肝臓での効率的な RNA 干渉の誘導に成功している¹⁹⁾。siRNA, pshRNA の投与により平均 81% および 93% の高い遺伝子発現抑制効果が得られている。

筆者らは、モデル標的としてホタルルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA と遺伝子導入効率の

補正のためのウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を投与することで作製したモデル系において、pshRNA による遺伝子ノックダウン効果の定量的解析を行った。その結果、肝臓および腎臓、肺において有意な遺伝子発現抑制効果が得られている²⁰⁾。

内因性遺伝子を標的とした検討においても、HD 法を利用した pshRNA デリバリーによる標的遺伝子発現抑制効果が示されている。筆者らは、肝臓の P-糖蛋白質の遺伝子 *MDR1* を標的とした検討を行い、pshRNA の HD 法による投与により *MDR1* の mRNA 発現ならびに P-糖蛋白質量が有意に低下することを報告している¹⁵⁾。しかしながら、標的としてレポーター遺伝子を同時投与した場合と比較して、内因性遺伝子を標的とした RNA 干渉効果は低いことも示された。これは、HD 法による遺伝子導入細胞数が肝臓の約 40% であることを反映するものと考えられる。HD 法の場合、遺伝子導入が可能、すなわちプラスミド DNA をデリバリー可能な細胞数は投与量を増大させても、ある一定以上は増加しないことが報告されており⁷⁾、より効率的な遺伝子発現抑制を実現するためには、他のアプローチの併用などを検討する必要があると考えられる。

HD 法を利用したデリバリー技術は、肝臓中に存

在する転移性がん細胞に対しても利用可能である。筆者らは、ルシフェラーゼ遺伝子で標識した B16-BL6 細胞を門脈内に移植することで作製した実験的肝転移モデルマウスを用いた検討から、pshRNA の HD 法による投与により肝臓中がん細胞での標的遺伝子発現を有意に抑制可能であることを報告している¹⁴⁾。また最近では、*HIF-1 α* を標的とした RNA 干渉誘導により肝臓でのがん細胞増殖を有意に抑制可能であることも明らかにしており、HD 法を利用した肝臓への経血管デリバリーが肝臓構成細胞だけでなく、肝転移過程にあるがん細胞に対しても有効であることを明らかにしている。

HD 法を応用した遺伝子デリバリーは、骨格筋を対象としたジストロフィン遺伝子導入にも応用されている。Wolff らのグループはこれまでに、ラットやサルにおいて血管内圧を増大することで多くの筋肉細胞に遺伝子導入が可能であることを報告している²¹⁾。筆者らも Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスを用いた検討において、ジストロフィンあるいはマイクロジストロフィンをコードしたプラスミド DNA を経血管的に投与することで筋肉での高い遺伝子発現を得ている²²⁾。

ジストロフィンを欠損する筋肉細胞では筋細胞膜が脆弱化し、細胞内にカルシウムイオンが流入することが報告されている。このカルシウムイオンにより細胞内プロテアーゼであるカルパインが活性化し、ジストロフィンなどの限定分解に関与することが報告されている。したがって、ジストロフィン遺伝子導入に加えてカルパイン活性を抑制することで、高いジストロフィン遺伝子発現を得ることが可能と考えられる。筆者らの検討において、カルパインを対象とする pshRNA を同時にデリバリーすることで、ジストロフィン遺伝子発現を増強可能であることが示された。

おわりに

In vivo で効率的に RNA 干渉を誘導することが可能となれば、病原性蛋白質発現の抑制による難治性疾患の治療が可能になるものと考えられる。しかしながら、その実現には siRNA あるいは shRNA

発現ベクターを標的細胞に効率よくデリバリーする方法論の開発が不可欠である。

研究開発が進むにつれて、RNA 干渉による疾患治療の可能性だけでなく、その問題点も明らかとされてきた。治療遺伝子の投与や、DNA ワクチンによる抗原デリバリーなどと RNA 干渉とを組み合わせることで、RNA 干渉によるがん治療の可能性が高まるものと期待する。

文 献

- 1) Nishikawa M, Huang L : Nonviral vectors in the new millennium : delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12 : 861-870, 2001.
- 2) Thanaketsrisarn O, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M : Tissue-specific characteristics of *in vivo* electric gene : transfer by tissue and intravenous injection of plasmid DNA. *Pharm Res* 22 : 883-891, 2005.
- 3) Sakai M, Nishikawa M, Thanaketsrisarn O, Yamashita F, Hashida M : Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and *in vivo* electroporation. *Gene Ther* 12 : 607-616, 2005.
- 4) Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y et al. : Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther* 7 : 254-261, 2003.
- 5) Nishikawa M, Yamauchi M, Morimoto K, Ishida E, Takakura Y et al. : Hepatocyte-targeted *in vivo* gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system. *Gene Ther* 7 : 548-555, 2000.
- 6) Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M : *In vivo* gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. *Pharm Res* 17 : 306-313, 2000.
- 7) Liu F, Song Y, Liu D : Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6 : 1258-1266, 1999.
- 8) Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y : Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 297 : 853-860, 2001.
- 9) Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y : Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane : implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 6 : 584-592, 2004.
- 10) Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y : The hydrodynamics-based procedure for controlling the pharmacokinetics of gene medicines at whole body, organ and cellular levels. *Adv Drug Deliv Rev* 57 : 713-731, 2005.
- 11) Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA : Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev* 13 : 3191-3197, 1999.
- 12) 西川元也, 小林直樹, 高倉喜信 : RNAi によるマウス個体での遺伝子ノックダウン. *Drug Delivery System* 19 : 385-391, 2004.
- 13) Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y : Moment analysis for kinetics of gene silencing by RNA

- interference. *Biotechnol Bioeng* 93 : 816-819, 2006.
- 14) Takahashi Y, Nishikawa M, Kobayashi N, Takakura Y : Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice : quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. *J Control Release* 105 : 332-343, 2005.
 - 15) Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y : Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference. *Pharm Res* 22 : 2091-2098, 2005.
 - 16) Hirata K, Nishikawa M, Kobayashi N, Takahashi Y, Takakura Y : Design of PCR-amplified DNA fragments for *in vivo* gene delivery : size-dependency on stability and transgene expression. *J Pharm Sci*, (in press).
 - 17) Nishikawa M, Hashida M : Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy. *Biol Pharm Bull* 25 : 275-283, 2002.
 - 18) Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y : Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting β -catenin or hypoxia inducible factor-1 α . *J Control Release* 116 : 90-95, 2006.
 - 19) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ et al : RNA interference in adult mice. *Nature* 418 : 38-39, 2002.
 - 20) Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M et al : Vector-based *in vivo* RNA interference : dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 308 : 688-693, 2004.
 - 21) Herweijer H, Wolff JA : Gene therapy progress and prospects : Hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther* 14 : 99-107, 2007.
 - 22) Liang KW, Nishikawa M, Liu F, Sun B, Ye Q et al : Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther* 11 : 901-908, 2004.