血中グルコース濃度の変化に応答した 効率的な血液脳関門通過型 DDS

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学分野 (神経内科)*

桑原宏哉*・横田隆徳*

An efficient drug delivery system crossing the blood-brain barrier in response to glycemic control

We are developing an efficient blood-brain barrier (BBB)-crossing drug delivery system utilizing a physiological glucose transport pathway via glucose transporter-1 (GLUT1). Several drug carriers targeting GLUT1 by incorporating glucose as the ligand have been tried, but none of them was transported into the brain at a high level upon intravenous administration. Thus, we adopted an original biological strategy of glycemic control. We constructed a self-assembled supramolecular micellar nanoparticle, having a property as a drug carrier, decorated with glucose ligands on the surface. Intravenously injected glucose-decorated nanoparticle accumulated highly in the brains of mice in response to an increase of glycemic concentration after a prior fasting condition. We observed the transport of glucose-decorated nanoparticle from cerebral blood vessels into brain parenchyma in real time, and identified the delivery of glucose-decorated nanoparticle into neurons and microglia. The BBB-crossing delivery is considered to occur along with the phenomenon of intracellular recycling of GLUT1 in the brain microvascular endothelial cells. Our novel BBB-crossing technology introducing glycemic control as an animal-side conditioning is expected to become a powerful tool for delivering high molecular drugs such as oligonucleotide and monoclonal antibody drugs, to achieve effective disease modifying therapy in the brain.

筆者らは、脳の主要なエネルギー源であるグルコースの、脳微小血管内皮細胞におけるグルコーストランスポーター 1 (GLUT1) を介した生理学的な輸送経路を活用して、血液脳関門を効率的に通過する DDS を開発している。過去の研究から、薬物キャリアの表層にグルコースをリガンドとして修飾するのみでは、静脈内投与で脳への十分な送達は実現できないと考えられたことから、筆者らは血中グルコース濃度の制御という独自の生物学的手法を導入した。薬物キャリアとしての特性をもつ高分子ミセル型ナノ粒子の表層に、グルコースを多数修飾し、空腹状態のマウスに静脈内投与した後、血中グルコース濃度の上昇を誘導した。その結果、グルコース修飾ナノ粒子は血液脳関門を通過し、従来の技術と比べて著しく高い効率で脳内に集積し、神経細胞やミクログリアに到達することが明らかとなった。生体側のコンディショニングとしての血中グルコース濃度の変化に応答した筆者らの血液脳関門通過型 DDS は、抗体医薬や核酸医薬をはじめとしたさまざまな中～高分子薬剤を脳へと送達するプラットフォーム技術としての発展が期待される。

Hiroya Kuwahara*, Takanori Yokota*

Keywords: blood brain barrier (BBB), glycemic control, glucose transporter-1 (GLUT1), supramolecular micelle, nanoparticle

1. はじめに

多くの中枢神経疾患の治療を困難にしている大きな原因の1つとして、血液から脳への物質輸送を

厳密に制御する生体内バリア機構としての血液脳関門 (blood brain barrier : BBB) の存在があげられる¹⁾。BBB では脳微小血管内皮細胞がバリア機能の中核を成し、脳の活動に必須な栄養成分を選択的に輸送する一方で、多くの薬剤の脳への送達を著しく制限している¹⁾。効率的かつ安全に薬剤を脳に送達する BBB 通過型 DDS は、高分子薬剤である抗体医

* Department of Neurology and Neurological Science,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

薬や核酸医薬による中枢神経疾患の効果的な分子標的治療を実現するなどの大きな意義がある。本稿では、まずBBB通過型DDSの開発状況を概説したうえで、次に、現在開発されている技術の中で最も高い効率で脳内への集積を実現し、社会実装への展開に力を入れている筆者ら独自のDDSを紹介する。

2. BBB通過型DDSの開発状況

従来の低分子薬剤に加え、近年では抗体医薬、核酸医薬、ペプチド医薬といった中～高分子の薬剤が盛んに開発され、さまざまな中枢神経疾患への治療に応用され始めている。脊髄性筋萎縮症に対する画期的な核酸医薬(アンチセンス核酸)のヌシネルセンが2017年に販売承認を受けたことは記憶に新しいが、全身投与ではBBBを通過できないため、髄腔内投与にて使用される²⁾。一般に、受動拡散によりBBBを通過して脳内に到達できる薬剤はおおむね450 Da未満の低分子で、脂溶性かつ水素結合数6個以下という特性を有するものに限定される¹⁾。したがって、中～高分子の薬剤を全身投与して脳内で作用させる場合には、効率的かつ安全にBBB通過を実現するDDSが不可欠である。以下、BBB通過型DDSの開発の現状について、脳微小血管内皮細胞の間隙を通過する経路(paracellular route)を介した場合と脳微小血管内皮細胞の内部を通過する経路(transcellular route)を介した場合に分けて概説する。

2-1. 脳微小血管内皮細胞の間隙を通過するDDS

脳微小血管内皮細胞の間隙の経路(paracellular route)を通過するDDSとして、いくつかの戦略が考案されている。例えば、子宮筋腫や本態性振戦などの治療に用いられている集束超音波の医療技術を活用する方法³⁾、BBBに発現するGタンパク質共役型アデノシン受容体(A2A受容体)の活性化を介して密着結合を開口させる方法⁴⁾、最近になってその特性が解明され始めた3つの脳微小血管内皮細胞の角が接する部位の密着結合(tricellular tight junction)を制御する方法⁵⁾などが試されている。細胞間隙を構成する密着結合の機能を制御することの

有効性の検証に加え、細胞間隙の開口による脳内への異物侵入のリスクの検証が重要と考えられる。

2-2. 脳微小血管内皮細胞の内部を通過するDDS

脳微小血管内皮細胞の内部の経路(transcellular route)を通過するDDSは、BBB通過型DDS開発の主流を成し、非臨床フェーズおよび臨床フェーズのいずれでも盛んに試されている。

特に、脳微小血管内皮細胞の血管側の細胞膜に発現する受容体を標的化し、受容体介在性トランスサイトーシス(receptor-mediated transcytosis)によりBBBを通過させようとするDDSは、精力的に開発されている。トランスフェリン受容体^{6~9)}、LDLR-related protein 1^{10~14)}、インスリン受容体^{15,16)}、レプチン受容体といった受容体に、これらに対するリガンドを修飾した薬剤またはそのキャリアが結合すると、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、その一部が脳側の細胞膜でエキソサイトーシスにより脳実質内に放出されると考えられている¹⁷⁾。リガンドとしては、これらの受容体に対する高い結合親和性を有する抗体やペプチドが用いられていることが多い。一方で、脳微小血管内皮細胞上の受容体数が限られていること、エンドソームやライソゾームといった輸送小胞中で分解を受ける可能性があること、リガンドと受容体の結合親和性が高すぎる場合には脳微小血管内皮細胞の脳側の細胞膜で脳実質内に放出されにくい可能性があることなどから、BBBの通過効率を上昇させる工夫が必要となるかもしれない。

細胞膜が負電荷を帯びている特性を踏まえ、カチオン性の細胞膜透過ペプチドを活用して、吸着介在性トランスサイトーシス(adsorptive-mediated transcytosis)をねらったDDSも開発されている¹⁷⁾。BBB通過を意図した細胞膜透過ペプチドとして、ヒト免疫不全ウイルス1型に由来するtrans-activator of transcription(TAT)ペプチド、アルギニンのみで構成される人工ペプチド(オリゴアルギニン)、ショウジョウバエのホメオプロテイン由来のpenetratin、神経ペプチドであるガラニン由来の12アミノ酸とハチ毒であるマストラパン由来の14アミノ酸を融合したキメラペプチドのtransportan、

SynB などが試されている。これらの細胞膜透過ペプチドは、やはり薬剤またはそのキャリアに結合して用いられ、特定の受容体に依存しないマクロピノサイトーシスなどの内在化経路を介して細胞内に取り込まれることが想定されるが、BBB 標的の選択性に乏しいため、脳以外のさまざまな臓器・組織への移行性も高めてしまう懸念がある。

グルコースやアミノ酸などの栄養成分のトランスポーターを標的化し、その基質として薬剤を脳内に輸送しようとする DDS も以前より開発されている。しかし、これらのトランスポーターは一般的に低分子を基質として認識するため、中～高分子の薬剤を標的化するのは困難と考えられている。また、BBB には P-糖タンパク質に代表されるさまざまな排出トランスポーターも発現していることから、それらの阻害を介して基質薬剤の脳への移行を向上させることが期待できるが、この場合も中～高分子の薬剤の脳内への送達はやや容易でない可能性が高い。したがって、トランスポーター介在性の BBB 通過型 DDS を実現するには、基質としての輸送とは異なる戦略が必要と考えられる。

3. 血中グルコース濃度の変化に応答した効率的な血液脳関門通過型 DDS

筆者らは、血中グルコース濃度の変化に応答して効率的に BBB を通過し、既存の技術と比較して桁違いに高い効率で脳内へ集積する DDS を開発している¹⁸⁾ (日本国特許第6086566号、米国や中国でも特許成立)。筆者らのオリジナルの研究成果を踏まえ、低分子薬剤のみならず、抗体医薬や核酸医薬をはじめとしたさまざまな中～高分子薬剤を送達する創薬プラットフォーム技術としての BBB 通過型 DDS を社会実装すべく、東京医科歯科大学と東京大学の双方発のバイオベンチャー「株式会社ブレイゾン・セラピューティクス」が2015年10月に設立され、今ではグローバルな事業展開を進めるまでに至っている。筆者らの BBB 通過型 DDS は、静脈内投与により多くの中枢神経疾患の主たる治療標的である神経細胞への送達を実現することから、画期的な治療薬開発へと展開されることが期待される。以

下、筆者らの BBB 通過型 DDS の研究成果について紹介したい。

3-1. グルコーストランスポーター1 (GLUT1) を活用したデリバリー戦略

BBB の中核を成す脳微小血管内皮細胞には、脳の主要なエネルギー源であるグルコースを輸送するためのグルコーストランスポーター1 (GLUT1) が、他のトランスポーターや受容体と比較して桁違いに多く発現している¹⁹⁾。そこで、薬剤そのものまたは薬剤のキャリアにグルコースを結合させて脳へ送達させようという試みがこれまでなされてきたものの、十分な送達は実現されなかった。これは、前述したように、基質としての輸送を意図したトランスポーター介在性の BBB 通過型 DDS が実現性に乏しいためと考えられる。

その一方で、脳微小血管内皮細胞の GLUT1 は、低血糖時にはおそらく血中から脳内に多くのグルコースを取り込むために脳微小血管内皮細胞の血管側の細胞膜上に多く局在すること²⁰⁾、また細胞膜上の GLUT1 はエンドサイトーシスを受けて細胞内の小胞にプールされること^{21, 22)} から、生体内での血中グルコース濃度の変化に応じて GLUT1 のダイナミックな細胞内リサイクリングが生じていることが想定される。そこで筆者らは、脳微小血管内皮細胞における GLUT1 の局在部位が血中グルコース濃度の変化に伴って変わる可能性に着目し、生体側のコンディショニングとしての血中グルコース濃度の変化を誘導することにより、効率的な BBB 通過型 DDS が実現できるのではないかと考えた。

具体的には、空腹状態では血中から脳内に多くのグルコースを取り込むために GLUT1 が脳微小血管内皮細胞の血管側の細胞膜上に多く局在することから、まずは空腹状態に、グルコースを表層に修飾した薬剤キャリア (グルコース修飾ナノ粒子) を静脈内投与する。その結果、グルコース修飾ナノ粒子は、脳微小血管内皮細胞膜上の GLUT1 に多く接着することが予想される (図1)。その後、高濃度グルコース溶液を投与して血中グルコース濃度を上昇させると、脳微小血管内皮細胞膜上の GLUT1 が細胞内リサイクリングの機序により

図1 GLUT1の細胞内リサイクリングを活用したBBB通過型デリバリー仮説

内在化することに伴い、グルコース修飾ナノ粒子もGLUT1とともにエンドサイトーシスを受ける。この際、内在化した一部のGLUT1が脳微小血管内皮細胞の脳側の細胞膜上に到達すると仮定すると、グルコース修飾ナノ粒子はトランスサイトーシスにより脳内に到達しうるのではないかと考えた(図1)。

3-2. グルコース修飾ナノ粒子の構築

親水性の高分子鎖と水に難溶性の高分子鎖とを連結したブロック共重合体は、水中で自律的に多分子会合し、粒径の揃った数十nmスケールのコア・シェル型ナノ粒子(高分子ミセル)を形成する²³⁾。高分子ミセルの外殻(シェル)は、血漿タンパク質や細胞などの生体成分との非特異的相互作用を極力抑制しつつ、高分子ミセル表層に配置したリガンド分子によって、標的細胞を特異的に認識することが可能である。一方、高い凝集力を有する内核(コア)は、ミセル構造の安定化に寄与するとともに、薬物などの生理活性物質の保持と周囲の微小環境変化に

応じた制御放出に基づく薬理機能の発現をつかさどる²³⁾。生体への安全性が担保されたブロック共重合体により構成される高分子ミセルは、抗がん剤などをデリバリーするプラットフォーム技術として、臨床フェーズの開発も精力的に進められている²³⁾。

本研究では、このブロック共重合体を構成分子とし、表層にグルコースをリガンドとして修飾して約3nm大のGLUT1²⁴⁾を的確に認識する直径約30nmの高分子ミセルを構築した(図1)。具体的には、疎水性ブロック(カチオン性およびアニオン性のポリアミノ酸)に生体適合性を有する親水性ブロック(ポリエチレングリコール)を連結し、さらにGLUT1に対するリガンドとしてのグルコースをGLUT1への結合に関与しないとされている6位の水酸基²⁵⁾を介して結合させ、水溶液中で自律的に多分子会合させることで、コア・シェル型の単分散のナノ粒子が形成された。

なお、グルコースの1分子とGLUT1の1分子の結合力は弱い($K_m = 1.5 \text{ mM}$)²⁶⁾ことから、それぞ

れ複数の分子同士で結合する多価効果を意図した設計が必要と考えた。そこで、ブロック共重合体へのグルコース修飾量をさまざまに変えることで、表層のグルコース密度の異なるナノ粒子を構築した(グルコースリガンド率:0・10・25・50%)。いずれのグルコース密度のナノ粒子も、単分散で直径約30 nmとなった。また、細胞実験や動物実験におけるナノ粒子の動態や局在を評価するため、いずれのナノ粒子にも蛍光標識(Cy5)を施した。

動物実験に先立ち、グルコース修飾ナノ粒子のGLUT1への結合を細胞実験にて評価すべく、プラスミドにてGLUT1遺伝子を導入したGLUT1強発現の安定細胞株を樹立した。この細胞の培地にグルコース修飾ナノ粒子を加え、30分後に細胞懸濁液の蛍光を定量した結果、グルコース修飾ナノ粒子はGLUT1強発現細胞に多く取り込まれ、またこの取り込みはGLUT1阻害剤であるサイトカラシンBやフロレチンにより阻害されることが判明した。また、GLUT1を強発現させていない細胞に対しては、グルコース修飾ナノ粒子の取り込みは明らかでなかった。以上より、グルコース修飾ナノ粒子は、細胞表面のGLUT1に結合すると考えられた。

3-3. グルコース修飾ナノ粒子の脳への集積

このように構築したナノ粒子について、まずは血中滞留性を評価すべく、マウスの静脈内に投与した後、経時的に血液を採取して蛍光(Cy5)を定量測定した。その結果、いずれのグルコース密度のナノ粒子も投与後90分の時点で投与量の80%以上が血液中に残存し、高い血中滞留性を示すことが判明した。

次に、通常の食餌を与えているマウスにナノ粒子を静脈内投与し、48時間後に主要な臓器・組織への集積を蛍光定量により測定したところ、グルコース修飾の有無やグルコース密度に関わらず、いずれのナノ粒子も脳を含むほぼすべての臓器・組織で各1 gあた

り投与量の1%に満たない集積であった。肝臓のみ集積量は1 gあたり5~6%であったが、ナノ粒子へのグルコース修飾の有無による変化はなく、肝臓への取り込みは非特異的な機序が主体と考えられた。GLUT1の基質としての輸送は困難であることを反映してか、ナノ粒子の表層をグルコースで修飾するのみでは脳への実質的な取り込みはほとんど期待できないと判断した。

そこで、生体側のコンディショニングとして、マウスの血中グルコース濃度の変化を誘導することとした。マウスを24時間絶食とした後、ナノ粒子を静脈内投与し、その30分後に20%グルコース溶液を投与して血中グルコース濃度を(正常範囲内で)上昇させたところ、ナノ粒子へのグルコース修飾の有無に関係なく、肝臓を含むほとんどの臓器において、通常の食餌を与えているマウスと同等の集積量を示した。しかし、驚くべきことに、脳にだけは1 gあたり投与量の約6%ものグルコース修飾ナノ粒子が集積することが判明した(図2)。この集積量は、グルコース非結合ナノ粒子と比べ100倍以上高く(図2)、またグルコース修飾ナノ粒子を通常の食餌を与えていたマウスに投与した場合と比べ約56倍高いものであった。この約6%という集積量は、グルコースリガンド率25%のナノ粒子を用いた場合であり、リガンド率が10%の場合や50%の場

図2 グルコース修飾ナノ粒子の脳集積量

合の集積量は脳1 g あたり1～2 % 程度にとどまった。これまでに開発された BBB 通過型 DDS は、いずれも脳への集積量が脳1 g あたり投与量の1 % に満たない²⁷⁾ ことから、筆者らのグルコース修飾ナノ粒子の BBB 通過効率は著しく高く、また、ナノ粒子のグルコースリガンド率には最適値があるものと考えられた。

なお、グルコースリガンドを3位の水酸基を介して結合させたナノ粒子(グルコースリガンド率は25 %)を構築し、マウスの血中グルコース濃度の変化を同様に誘導して投与した場合には、脳への集積はほとんど観察されなかった。グルコースの GLUT1 への結合には、1位と3位と4位の水酸基を介するとされ、6位の水酸基は介さないとされている²⁵⁾。この知見を踏まえると、ナノ粒子へのグルコースリガンドの結合位置の違い(3位または6位)のみで脳への集積量が著しく異なるという筆者らの実験結果は、グルコース修飾ナノ粒子の脳への到達には GLUT1 を介することを示唆している。また、GLUT1 阻害剤であるフロレチンを投与したマウスにおいては、グルコースリガンドを6位の水酸基を介して結合させたナノ粒子(グルコースリガンド率は25 %)の脳への集積が著しく低下した。この結果も、グルコース修飾ナノ粒子の脳への到達には GLUT1 を介する可能性を示唆している。

3-4. グルコース修飾ナノ粒子の BBB 通過

グルコース修飾ナノ粒子の BBB 通過を検証すべく、脳内におけるグルコース修飾ナノ粒子の挙動を生体内共焦点レーザー顕微鏡でリアルタイムに観察した。マウスを24時間絶食とした後、グルコース修飾ナノ粒子を静脈内投与し、その30分後に20 % グルコース溶液を投与したところ、血中グルコース濃度の上昇から10～20分遅れてナノ粒子が脳血管から脳実質に分布する様子が記録された(図3)。GLUT1 と同じグルコーストランスポーター

図3 BBB を通過するグルコース修飾ナノ粒子(赤)のリアルタイム観察

の GLUT4 では、細胞内リサイクリングに12～35 分の時間がかかると報告されている²⁸⁾ ことを考えると、筆者らの実験での10～20分遅れてという結果は、グルコース修飾ナノ粒子が GLUT1 の基質としてではなく、GLUT1 の細胞内リサイクリングの機序を介して脳内に送達されていることを示している可能性がある。

また、二光子励起レーザー顕微鏡を用いた観察では、BBB を通過した後のグルコース修飾ナノ粒子が、細胞成分の少ない脳表層の分子層を除き、脳の広範囲に様に分布することが明らかになり、脳実質内の細胞体に広く取り込まれることが示唆された(図4)。

さらに、グルコース修飾ナノ粒子の投与から48 時間後に採取した脳の免疫組織化学では、BBB を通過したナノ粒子が脳内の神経細胞やミクログリアに多く観察された(図4)。この結果は、グルコースリガンド率が25 % と50 % の双方の場合で明瞭であったが、50 % の場合は脳微小血管内皮細胞にもナノ粒子が多く観察された。前述のように、ナノ粒子の表層に修飾したグルコースリガンドは、脳微小血管内皮細胞の GLUT1 と結合する際に多価効果を生じることが想定されることを踏まえると、リガンド率50 % の観察結果は、グルコースリガンドと GLUT1 との結合数が多いために、脳微小血管内

図4 二光子励起レーザー顕微鏡(左)と免疫組織化学(右)による観察

皮細胞の脳側の細胞膜で離れることができなくなっているグルコース修飾ナノ粒子が多い状況を反映している可能性がある。脳への集積量を評価した前述の実験結果と同様に、グルコース修飾ナノ粒子のBBB通過に際しては、グルコースリガンド率の最適値が存在すると考えられる。

なお、リサイクリングエンドソームのマーカである Rab11a の抗体を用いた免疫組織化学では、グルコース修飾ナノ粒子の一部は、血中グルコース濃度の変化を誘導した場合にのみ、BBB通過のタイミングで脳微小血管内皮細胞のリサイクリングエンドソームに局在することがわかった。したがって、グルコース修飾ナノ粒子の少なくとも一部は、脳微小血管内皮細胞において GLUT1 の細胞内リサイクリングの機序に沿って脳に輸送されたと考えられるが、デリバリー機序の詳細についてはさらなる解析が必要であろう。

4. おわりに

以上より、筆者らの開発した BBB 通過型 DDS は、ナノテクノロジーとバイオロジーの観点から、以下のポイントが重要と考えられる。

- ・ナノテクノロジー：直径約 30 nm のナノ粒子(ブロック共重合体を構成分子とした高分子ミセル)の表層に、グルコースを適切に修飾する。グルコースリガンドは、適切な位置(グルコースの 6 位の水酸基)に結合する必要がある、また最適のリガンド率が存在する。

- ・バイオロジー：効率的な BBB 通過を実現するには、空腹状態にグルコース修飾ナノ粒子を静脈内投与し、その後に血中グルコース濃度を上昇させることが必要である。BBB 通過の機序として、少なくとも一部は GLUT1 の脳微小血管内皮細胞における細胞内リサイクリングを活用していると考えられる。

グルコース修飾ナノ粒子は、抗体医薬や核酸医薬をはじめとした中～高分子薬剤を搭載できることか

ら、種々の薬剤のBBB通過能を著しく高め、さまざまな中枢神経疾患の治療に向けたイノベーションをもたらすことが期待される。

文献

- 1) Abbott N.J., *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, **37**, 13-25 (2010)
- 2) Finkel R.S., *et al.*, *Lancet*, **388**, 3017-3026 (2016)
- 3) Timbie K.F., *et al.*, *J. Control. Release*, **219**, 61-75 (2015)
- 4) Gao X., *et al.*, *ACS Nano*, **8**, 3678-3689 (2014)
- 5) Zeniya S., *et al.*, *J. Control. Release*, **283**, 126-134 (2018)
- 6) Fishman J.B., *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, **18**, 299-304 (1987)
- 7) Pardridge W.M., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 66-70 (1991)
- 8) Yu Y.J., *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 261ra154 (2014)
- 9) Bien-Ly N., *et al.*, *J. Exp. Med.*, **211**, 233-244 (2014)
- 10) Demeule M., *et al.*, *J. Neurochem.*, **106**, 1534-1544 (2008)
- 11) Kurzrock R., *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 308-316 (2012)
- 12) Ren J., *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 3324-3333 (2012)
- 13) Kafa H., *et al.*, *J. Control. Release*, **225**, 217-229 (2016)
- 14) Ke W., *et al.*, *Biomaterials*, **30**, 6976-6985 (2009)

謝辞

本稿に記した研究成果は、ナノ医療イノベーションセンターの片岡一則博士や東京大学大学院工学研究科の安楽泰孝博士をはじめとした工学研究者との医工連携の研究体制で得られたものであり、グルコース修飾ナノ粒子の構築・提供や動物実験にご尽力いただいた共同研究者の方々に感謝したい。

- 15) Boado R.J., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 2317-2325 (2014)
- 16) Boado R.J., *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **24**, 1741-1749 (2013)
- 17) Banks W.A., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **15**, 275-292 (2016)
- 18) Anraku Y., *et al.*, *Nat. Commun.*, **8**, 1001 (2017)
- 19) Uchida Y., *et al.*, *J. Neurochem.*, **117**, 333-345 (2011)
- 20) Simpson I.A., *et al.*, *J. Neurochem.*, **72**, 238-247 (1999)
- 21) Eyster C.A., *et al.*, *Traffic*, **10**, 590-599 (2009)
- 22) Riskin A., *et al.*, *Pediatr. Res.*, **63**, 56-61 (2008)
- 23) Cabral H., *et al.*, *Chem. Rev.*, **118**, 6844-6892 (2018)
- 24) Alexis S.B., *et al.*, *Biophys. J.*, **87**, 2990-2999 (2004)
- 25) Barnett J.E.G., *et al.*, *Biochem. J.*, **131**, 211-221 (1973)
- 26) Lodish H., *et al.*, in *Molecular Cell Biology*, 4th edn (W. H. Freeman, 2000)
- 27) Wiley D.T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, 8662-8667 (2013)
- 28) Foley K., *et al.*, *Biochemistry*, **50**, 3048-3061 (2011)