バイオ医薬に利用されるキャリア開発： B 型肝炎ウイルスの初期感染機構に基づくバイオナノカプセル

大阪大学 産業科学研究所*

曾宮正晴*・黒田俊一*

Carrier development for biopharmaceuticals: Bio-nanocapsules based on the early infection machinery of hepatitis B virus

DDS nanocarriers are used to provide spatiotemporal control in the body of therapeutic agents. Specifically, they should have multi-stage delivery functions, such as (1) encapsulating therapeutic drugs, (2) escaping from capture by the immune system, (3) reaching the affected area (organ/cell), and (4) releasing appropriate amount of the therapeutic drugs at the target site inside and outside the cell at appropriate timing. DDS nanocarriers that have been developed so far are roughly classified into chemical products and biologics, but the former does not have any of the above functions. On the other hand, there is a virus as the latter model having all the above functions. In this paper, we will outline the DDS nanocarrier “Bio-nanocapsule” that mimics the early infection machinery of hepatitis B virus that specifically infects the human liver.

DDS ナノキャリアは、治療用薬剤の体内における時空間的制御を行うために使用される。具体的には、①治療用薬剤を包含し、②免疫系による捕捉から逃れ、③患部(臓器・細胞)に到達し、④細胞内・外の標的部位に治療用薬剤を適切な量とタイミングで送達するなどの多段階の機能が求められる。これまで開発されてきた DDS ナノキャリアは、化成品と生物製剤に大別されるが、前者には上記すべての機能を有するものは存在しない。一方、上記すべての機能を有する後者のモデルとしてウイルスがある。本稿では、ヒト肝臓に特異的に感染する B 型肝炎ウイルスの初期感染機構を模倣した DDS ナノキャリア「バイオナノカプセル」について概説する。

Masaharu Somiya*, Shun'ichi Kuroda*

Keywords: hepatitis B virus, bio-nanocapsule, early infection machinery, fusogenic domain, receptor-binding domain

1. はじめに

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)は、重篤な肝疾患(肝炎、肝硬変、肝がん)を引き起こす DNA ウイルスであり、血液などの体液を介して体内に侵入し、血流に乗って肝臓に到達し、極めて高い効率でヒト肝細胞に感染することが知られている。HBV は、1964年にオーストラリア原住民の血漿中にウイルス様粒子として初めて発見されたが(当時は「オーストラリア抗原」と称され、B型肝炎との関係は未確定)、その詳細な分子レベルの解析には分子生物学の発展が必要であった。1979年

になり、ようやく複数の研究グループにより初めて HBV の遺伝子クローニングが行われ、HBV 全体の構造が明らかになり(図1)、その後、HBV の抗原・抗体系の解析が大きく進んだ。当時、B型肝炎の治療は不可能であり、B型肝炎ワクチンによる予防のみが有効であった。そのため、B型肝炎患者血漿中から単離精製した外皮 S タンパク質粒子が同ワクチンの抗原として利用されていたが、原料供給と安全性の問題があり、その普及が妨げられていた。1982年になり、米国 Chiron 社(当時)の Valenzuela らが出芽酵母を用いて HBV の外皮 S タンパク質を直径 22 nm のナノ粒子として発現することに成功し¹⁾、安定供給可能で安全な遺伝子組換え型 B 型肝炎ワクチンが全世界に普及する契機となった。しか

* The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

しながら、1985年頃から外皮Sタンパク質に対する抗体の惹起だけでは、全ワクチン接種者の1割程度に未応答者もしくは低応答者が出現することが指摘され、追加の抗原の必要性が叫ばれ始めた。そして、1985年に米国ニューヨーク血液センターのグループが、外皮Sタンパク質遺伝子の upstream にコードされている pre-S領域が新たな免疫源として有効であることを示した²⁾。さらに、翌年、同グループから、pre-S領域はHBVのヒト肝臓特異的感染能を示すドメインが含まれるという、その後のDDSナノキャリア開発につながる注目すべき報告があった³⁾。

1986年から武田薬品工業(株) 生物工学研究所に在籍していた筆者(黒田)は、HBV感染予防のための高効率ワクチンの抗原として、HBVに含まれる最大の外皮Lタンパク質(pre-S1+pre-S2+S領域)を出芽酵母によりナノ粒子として発現することを試みていた。しかしながら、外皮タンパク質のナノ粒子化には、同タンパク質のN末端部分が酵母小胞体膜を効率的に透過することが必要であったが、pre-S1領域部分には膜透過を強く阻害する活性があり、世界中の研究者が外皮Lタンパク質粒子の発現に失敗していた⁴⁾。そこで、酵母小胞体膜を効率よく透過させるために、鶏リゾチーム分泌シグナルを外皮Lタンパク質のN末端側に融合して出芽酵母で発現させたところ、外皮Lタンパク質が酵母の可溶性タンパク質の約40%までに達し、世界に先駆けて外皮Lタンパク質粒子(以下L粒子)の生産に成功した⁵⁾。L粒子は直径50~100nmの脂質二重膜に約100分子のLタンパク質が局在する中空ナ

ノ粒子であり、マウスにおいて効率的に抗S抗体、抗pre-S2抗体、抗pre-S1抗体を誘導した⁶⁾。その後、L粒子は高度な熱安定性を有することがわかり、熱処理とアフィニティクロマトグラフィー(硫酸セルロファイン)を併用した簡易精製法を開発して、高純度L粒子を大量に得ることに成功した⁷⁾。

2. ワクチン抗原から DDS ナノキャリアへ

2-1. POC(Proof of Concept)の確認

1994年に黒田はアカデミア(神戸大学バイオシグナル研究センター)へ移り、旧知の岡山大学工学部 妹尾昌治先生、神戸大学工学部 近藤昭彦先生、慶応義塾大学医学部 上田政治先生とL粒子に関して議論する機会を得た。その際、L粒子外周がHBV外周と酷似していること、ならびにL粒子内部は中空であること(図1)に着目し、「L粒子はHBVと同様に静注するとヒト肝臓に高効率で感染できるのではないか?」、「L粒子内部に封入した物質はヒト肝臓細胞内部に放出されるのではないか?」と仮説をたてた。そこで、L粒子は細胞膜と同じ脂質二重膜を有することから、遺伝子や蛍光物質をL粒子とキュベット内で共存させ、エレクトロポレーション法(電気穿孔法)によりL粒子中空部分に封入し、ヒト肝がん由来培養細胞に添加(*ex vivo*)やヒト肝がん由来組織を有するヌードマウスに静注(*in vivo*)したところ、L粒子内封入物を特異的かつ効率的にヒト肝がん由来細胞および組織に送達できることを見出した^{8,9)}。そこで、2003年、筆者らはL粒子を「バイオナノカプセル(bio-nanocapsule: 以下BNC)」と

図1 B型肝炎ウイルス(HBV)とバイオナノカプセル(BNC)

命名し、HBV感染機構を搭載したヒト肝臓特異的 DDS ナノキャリアとして開発を開始した。

2-2. 低抗原性化への工夫

元来、BNC は B 型肝炎ワクチンの抗原であるが、意外とヒト免疫系により認識されにくい性質を有する。実際、B 型肝炎ワクチンとして使用する際には、アラムアジュバントと混合し 3 回以上筋注または皮下注しないと、有効なレベルの HBV に対する中和抗体は現れない。しかし、BNC を DDS ナノキャリアとして開発するためには、弱い抗原性でも課題となる。そこで、HB ワクチン接種者にも感染することができる HBV エスケープ変異体群を多数解析した。その結果、多くの HBV エスケープ変異体群に共通して見出されるアミノ酸変異 2 カ所を同定した(外皮 L タンパク質における Gln292→Arg ; Gly308→Arg)。両変異を導入した BNC は、マウスに繰り返し投与しても有意な抗体産生を惹起せず、B 型肝炎患者由来中和抗体による認識能も大幅に減弱していた。そこで、同 BNC を「ステルス型 BNC」と命名し以後の研究開発に使用することとした¹⁰⁾。

2-3. さまざまな治療用薬剤への対応

HBV と同様に BNC は物理的ストレスに対して高い耐性を有している。そのため、エレクトロポレーション法で BNC 内部にさまざまな治療用薬剤(化成品、タンパク質、遺伝子等)を効率よく封入することは困難であった。そのような中、筆者らは BNC とリポソーム(liposome : LP)を共存させると、HBV の膜融合活性(後述)により安定的な BNC-LP 複合体を形成することを見出した。また、同複合体は BNC 単独と同等なヒト肝臓に対する特異性および物質送達能を *ex vivo* および *in vivo* で示した¹¹⁾。すでに他の研究者らにより、LP 内部へのさまざまな治療用薬剤の封入方法は数多く開発済みであり、BNC-LP 複合体は BNC 技術の用途を著しく拡大する。最近、BNC-LP 複合体形成を弱酸性(pH3~4)および高温(70℃ 前後)で行うと、(BNC-LP 複合体は外周がゴツゴツとした形状であったのに対し) DDS ナノキャリアに適した粒子特性(直径150 nm

以下、PDI 0.1 前後)を有する virosome になることを見出した。実際、ドキソルビシン封入 virosome を作成し、ヒト肝がん由来組織を有するヌードマウスに投与したところ、ドキソルビシン単剤、ドキソルビシン封入 LP と比較して低薬量で、効果的ながん増殖抑制効果を示した。また、低線量の放射線治療を併用すると、ドキソルビシン封入 virosome は極めて効率よくがん治療効果を示した¹²⁾。

また、BNC は遺伝子導入に頻用される polyplex とも複合体形成し、LP に対する効果と同様な効果を与えることも判明している¹³⁾。最近、次世代医薬品として RNA 医薬が注目されているが、膨大になりがちな投与量を削減するために標的化 DDS ナノキャリアへの搭載が求められている。しかしながら、RNA 医薬は負電荷を帯びているため、非特異的吸着が強いカチオン性 LP 等への封入例しかなかった。筆者らは、世界に先駆けて Ca イオンとエタノールを併用することで非カチオン性 LP への効率的な RNA 医薬封入法を開発した¹⁴⁾。従来、BNC-カチオン性 LP 複合体に RNA 医薬の搭載を行っていたが¹⁵⁾、本方法により *in vivo* で使用可能な BNC-非カチオン性 LP 複合体への RNA 医薬の搭載が可能になり、RNA 医薬使用量の大幅な低減が期待される。

2-4. 再標的化 BNC の開発

BNC にはヒト肝臓由来細胞・組織に対する効率的な標的化能と強い細胞内侵入能が備わっている(後述)ので、前者(標的化能)を改変してヒト肝臓以外の部位への再標的化を行っている。まず、L タンパク質の N 末端側に上皮成長因子(epidermal growth factor : EGF)を融合すると、EGF 受容体を発現するヒト扁平上皮がん由来 A431 細胞(*ex vivo*)に対して同改変型 BNC は物質導入できた⁸⁾。次に、悪性度の高いがん細胞に高頻度で発現する糖鎖構造($\beta(1-6)\text{GlcNAc}$)を認識する *Phaseolus vulgaris* アグルチニン由来 L4 イソレクチン(L4-PHA)を提示した BNC は、*ex vivo* および *in vivo* において悪性度の高いがん組織に対し極めて高い標的化能および細胞内侵入能を示した¹⁶⁾。対照として、蛍光標識した L4-PHA についても検

討したが、L4-PHA 提示BNC と同じ挙動は示さなかった。これは、多くの糖鎖認識レクチンの糖鎖に対する親和性は、抗体等と比較して低いことから、レクチン単独では *ex vivo* および *in vivo* において特異性を示すのは困難であることを示していた。一方、レクチン分子を BNC 表層に多数整列提示して全体として親和性(avidity)を上昇させることにより、DDS ナノキャリアの再標的化分子として利用可能になることを示している。また、ペプチドライブラリーを提示するファージを生体に投与し、特定の細胞や組織に集積したファージを回収した後、当該細胞や組織に親和性を示すホーミングペプチドが近年注目されている¹⁷⁾。筆者らは、当時報告されていたホーミングペプチド数種類を、それぞれ BNC 表層に多数提示させ、ペプチド単独と同様な細胞および組織特異性を示すか *ex vivo* および *in vivo* で検討したが、いずれも失敗に終わった。これは、BNC が巨大であるため、ホーミングペプチドが十分に機能しないと考えられ、今後の解決すべき課題である。

2-5. 抗体提示用BNC の開発

抗体分子(特に IgG)は、生体内で高い特異性、高い安定性、低い抗原性を示すことから、DDS ナノキャリアの再標的化分子として非常に有望である。そこで、筆者らは外皮 L タンパク質の N 末端側に、*Staphylococcus aureus* Protein A 由来 IgG Fc 結合領域(Z ドメイン)をタンデムに結合した ZZ 分子を挿入した ZZ-BNC を作成した。同粒子と IgG を混在させると、自発的に IgG Fc 領域が BNC 表層の ZZ 分子に結合し、IgG の抗原結合部位(Fv 領域)が放射状に展開することが、高速原子間力顕微鏡観察により明らかにされている¹⁸⁾。その結果、ZZ-BNC 表層に整列提示された多数の IgG は、IgG 1 分子の親和性よりも強い親和性(avidity)を示した¹⁹⁾。また、一度 ZZ-BNC に結合した IgG は、高濃度の IgG が周辺に存在しても置き換わらないことが示されている。そこで、DDS ナノキャリアとしての用途ではないが、ZZ-BNC のユニークな性質を応用して、原子間力顕微鏡による 1 分子単離²⁰⁾、水晶発振子微量天秤などのバイオセンサー²¹⁾、蛍光標識 ZZ-BNC

による同時多重染色サイトケミストリー²²⁾、同一抗体によるサンドイッチ ELISA²³⁾などで活用されている(ZZ-BNC に関する詳細については総説²⁴⁾を参考にされたい)。最近では、現代のがん治療を中心的に担う抗体医薬に ZZ-BNC を混合すると、*ex vivo* および *in vivo* において抗体医薬単独と比べて約 10 分の 1 の抗体量で同等の薬効を示すことが判明した²⁵⁾。抗体医薬を提示した ZZ-BNC-LP 複合体を作成し、LP 内部に抗がん剤を封入すれば、画期的な抗がん剤になる可能性がある。

筆者らは、免疫系の中核で抗原提示細胞として中心的な役割を担っている樹状細胞に、DDS ナノキャリアにより抗原を送達すれば、液性免疫のみならず細胞性免疫を効率的に惹起できると考えた。まず、ZZ-BNC 表層に、マウス樹状細胞の表層抗原を認識する抗 CD11c 抗体と、モデル抗原として日本脳炎ウイルス外皮タンパク質を提示させ、マウスに静注したところ、同抗原を脾臓内樹状細胞に効率よく送達させ、極めて強力な抗体産生能と細胞免疫誘導能を示し、実際に日本脳炎ウイルス感染実験でも防御効果を示した^{26, 27)}。この結果から、樹状細胞標的化 BNC を用いたワクチンは、一般的な液性免疫による感染症予防だけでなく、細胞性免疫が必要なウイルス感染細胞の除去などにも有効と考えられた。また、抗 CD11c 抗体提示 ZZ-BNC による免疫誘導において、BNC に含まれている酵母由来の糖鎖や Fc 結合ドメインが複合的に、樹状細胞以外の免疫細胞にも作用していることが予想された。これら ZZ-BNC の構成成分が、いわゆるアジュバントとして働くことで、効率的な免疫誘導が生じていると考えられ、こうした副次的な免疫誘導効果が得られるのも、ZZ-BNC を利用するワクチンの利点である。

最近では、Protein A の Z ドメインは IgG の動物種やサブタイプに大きく依存するので、大半の IgG と結合できる Protein G の Fc 領域結合ドメインを提示した GG-BNC や、IgG 以外の抗体とも結合できる Protein L の Fab 領域結合ドメインを提示した LL-BNC も作成し、抗体による BNC の再標的化法の汎用性を高めている²⁸⁾。例えば、上記 Protein G と Protein L の各ドメインを提示する GL-BNC は、

IgG を添加すると凝集し、粒子径が増大する。その結果、マクロファージのような貪食細胞に効率的に取り込まれることとなる。こうした性質を利用した、マクロファージ標的化DDS として応用できる²⁹⁾。以上、DDS ナノキャリアとしてのBNC に関する詳細は総説³⁰⁾を参考にされたい。

3. BNC による HBV 初期感染機構の解析

HBV をはじめさまざまなウイルスは、生体内でウイルスゲノムを標的の細胞や臓器に高効率で送達する「天然のナノキャリア」である。そのため、個々のウイルスの初期感染機構に、①宿主免疫系に捕らわれないステルス能、②標的細胞表層に特異的に結合する標的化能、③標的細胞質内への侵入能(エンドソーム脱出能と同義)が関与しているはずであるが、特定ウイルスに対して網羅的に解析した例は極めて少ない。約半世紀前に発見された古典的存在のHBV でも例外ではなく、これは純粋なHBV を大量に得るのが不可能なことに起因する。一方、筆者らはBNC を大量に得ることができるので、偽HBV としてHBV の初期感染機構の解析を行っている。

まず、①ステルス能であるが、筆者らの解析からL タンパク質中程の pre-S2 領域に含まれる重合アルブミン受容体(polymerized albumin receptor : PAR)³¹⁾が、ヒト血液中に大量に含まれる重合アルブミンをBNC/HBV 表面にリクルートし、免疫系

からの認識(オプソニン化等)を回避する可能性が指摘されている(高木ら、投稿中)。また、一般にアルブミンは肝臓等に発現する胎児性Fc 受容体に認識されて、血液中に積極的にリサイクルされることから、重合アルブミンを表面に提示するBNC/HBV の血中濃度維持に貢献していると考えられている。

次に、②標的化能であるが、2012年に筆者らはBNC を用いてヒト肝臓由来細胞表面のHBV 受容体には、低親和性と高親和性の2種類が存在することを示した³²⁾。一方、同時期に、中国の研究グループから胆汁酸輸送に関与するNTCP(sodium taurocholate co-transporting polypeptide)が、HBV 受容体であると報告された³³⁾。確かに、NTCP が存在しないとHBV はヒト肝臓由来細胞に感染しないが、NTCP を異所的に発現させた細胞は必ずしもHBV 感染しないことが謎であった。その後、筆者らは、細胞表層NTCP はHBV 感染に関与せず、エンドソームNTCP が関与する可能性を強く示唆した³⁴⁾。一方、細胞表層ではHSPG(heparan sulfate proteoglycan)とL タンパク質のN末端側(30-42)領域が結合することを見出した^{35,36)}。以上、現時点での知見をまとめると、BNC/HBV は細胞表層でHSPG(低親和性HBV 受容体)と結合し、エンドソーム内に移行してNTCP(高親和性HBV 受容体)と結合して感染を成立させると考えている(図2)。

最後に、③細胞質内侵入能であるが、その本態はBNC/HBV のエンベロープ膜とヒト肝臓由来細胞

図2 BNC-LP 複合体の細胞内侵入機構

図3 HBV ゲノタイプ6種類および Wooly monkey (WM) HBV と BNC の pre-S1 領域 (Myr (ミリスチル基) 付加2-50 残基) のアミノ酸配列と機能ドメイン

のエンドソーム膜が弱酸性条件下 (エンドソーム内) で融合する膜融合ドメインである。これまでに L タンパク質の中程の pre-S2 領域と S 領域近傍^{37~40)} に膜融合ドメインの報告があったが、pre-S1 領域を欠いた変異 L 粒子は細胞質内に封入物を放出しないことから、pre-S1 領域内に新規の膜融合ドメインが存在すると考えられた。筆者らは、pre-S1 (9-24) 領域に弱酸性条件下で膜融合能が高まるドメインを同定した⁴¹⁾。この領域は、既知の膜融合ドメインとは異なり、弱酸性条件下で α ヘリックスを

形成せず、ランダムコイル構造のままであった。また、弱酸性条件下で2つの Asp 残基がプロトン化を受けて疎水性が亢進することが判明している⁴²⁾。実際に、BNC-LP 複合体に金ナノ粒子を封入したものをヒト肝がん由来細胞株に取り込ませて、細胞内部の金ナノ粒子の局在を電子顕微鏡で観察したところ、一部の金ナノ粒子はエンドソーム脱出を行って

図4 BNC/HBV L タンパク質に含まれる DDS ナノキャリアに関係する機能ドメイン

細胞質内に局在していた⁴¹⁾。

前述の HSPG 結合ドメイン、今回の膜透過ドメイン、そしてすでに明らかにされている NTCP 結合部位は、多数のゲノタイプが見出されている HBV の中で高度に保存されている部位であり、HBV 初期感染機構の中心的役割を担っていることは間違いない (図3、4)。また、BNC の DDS ナノキャリ

図5 Bio-mimicking/Virus-inspired DDS ナノキャリアに求められる機能ドメインと性状

アとしての重要な機能を担っている部分が、わずか50残基程度のアミノ酸で構成されていることは、非常に興味深い。以上、BNC を使用した HBV や各種ウイルスの初期感染機構に関する詳細は総説^{43,44)}を参考にされたい。

4. おわりに

これまでに筆者らは HBV の初期感染機構を明らかにするとともに、同機構を搭載した DDS ナノ

キャリア「BNC」の開発を行ってきた。その結果、従来の化成品 DDS ナノキャリアでは到底再現できないような高度な機能を有するものができたのではないかと考えている。しかしながら、本 DDS ナノキャリアは、CMC の観点から非常に開発困難である。今後は、HBV の各機能ドメインを抽出し、CMC 的に有利な化成品 DDS ナノキャリア表面で再構成することに注力したい(図5)。また、HBV 以上に高度な能力を有するウイルスは多数存在すると考えられるので、今後、それらの解析を通して「Bio-mimicking」かつ「Virus-inspired」な DDS ナノキャリアの開発を目指したい。

謝辞

本研究は、日本学術振興会(JSPS)：科学研究費補助金 基盤研究S(16H06314)、日本医療研究開発機構(AMED)：感染症実用化研究事業 肝炎等克服実用化研究事業 B型肝炎炎創薬実用化等研究事業、次世代がん医療創生研究事業、文部科学省：人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミック・アライアンスによるものです。

文献

- Valenzuela P., et al., *Nature*, **298**, 347-350 (1982)
- Milich D.R., et al., *Science*, **228**, 1195-1199 (1985)
- Neurath A. R., et al., *Cell*, **46**, 429-436 (1986)
- Kniskern P.J., et al., *Hepatology*, **8**, 82-87 (1988)
- Kuroda S., et al., *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953-1961 (1992)
- Yamada T., et al., *Vaccine*, **19**, 3154-3163 (2001)
- Jung J., et al., *Protein Exp. Purif.*, **78**, 149-155 (2011)
- Yamada T., et al., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885-890 (2003)
- Matsuura Y., et al., *Eur. Surg. Res.*, **46**, 65-72 (2011)
- Jung J., et al., *Nanomedicine*, **14**, 595-600 (2018)
- Jung J., et al., *J. Controll. Release*, **126**, 255-264 (2008)
- Liu Q., et al., *Int. J. Nanomedicine*, **10**, 4159-4172 (2015)
- Somiya M., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 3873-3879 (2012)
- Somiya M., et al., *Int. J. Pharm.*, **490**, 316-323 (2015)
- Ohno M., et al., *Oncotarget*, **5**, 5581-5590 (2014)
- Kasuya T., et al., *Hum. Gene Ther.*, **19**, 887-895 (2008)
- Pasqualini R., et al., *Nature*, **380**, 364-366 (1996)
- Iijima M., et al., *Sci. Rep.*, **2**, 790 (2012)
- Iijima M., et al., *Biomaterials*, **32**, 1455-1464 (2011)
- Kawamura R., et al., *Nano Lett.*, **17**, 7117-7124 (2017)
- Noi K., et al., *Sensors and Actuators B: Chemical*, **293**, 59-62 (2019)
- Iijima M., et al., *Biomaterials*, **32**, 9011-9020 (2011)
- Iijima M., et al., *Analyst*, **138**, 3470-3477 (2013)
- Iijima M., et al., *Biosens Bioelectron.*, **89**, 810-821 (2017)
- Iijima M., et al., *Acta Biomater.*, **86**, 373-380 (2019)
- Matsuo H., et al., *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 3341-3350 (2012)
- Matsuo H., et al., *J. Nanobiotechnology*, **16**, 59 (2018)
- Tatematsu K., et al., *Acta Biomater.*, **35**, 238-247 (2016)
- Li H., et al., *Acta Biomater.*, **73**, 412-423 (2018)
- Somiya M., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **95**, 77-89 (2015)
- Michel M.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7708-7712 (1984)
- Yamada M., et al., *J. Controll. Release*, **160**, 322-329 (2012)
- Yan H., et al., *Elife*, **13**, 3 (2012)
- Somiya M., et al., *Virology*, **497**, 23-32 (2016)
- Liu Q., et al., *Biomater. Sci.*, **7**, 322-335 (2018)
- Takamatsu S., et al., *Glycobiology*, **26**, 1180-1189 (2016)
- Lu X., et al., *Int. J. Med. Sci.*, **1**, 21-33 (2004)
- Cooper A., et al., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1614**, 89-96 (2003)
- Rodriguez-Crespo I., et al., *J. Gen. Virol.*, **75**, 637-639 (1994)
- Oess S., et al., *Gene Ther.*, **7**, 750-758 (2000)
- Somiya M., et al., *J. Controll. Release*, **212**, 10-18 (2015)
- Liu Q., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **474**, 406-412 (2016)
- Liu Q., et al., *World J. Gastroenterol.*, **22**, 8489-8496 (2016)
- Somiya M., et al., *Nanotheranostics*, **1**, 415-429 (2017)