キャリアによる細胞内デリバリー戦略と今後の課題

原島秀吉・篠原康雄・際田弘志*

Perspective on the new strategy of intracellular delivery of macromolecules with carrier

The concept of drug delivery system(DDS) was born approximately 30 years ago and developed in many aspects such as controlled release, absorption enhancement and targeting. New aspect in DDS is required for gene therapy with highly controlled delivery system especially to control the intracellular trafficking of carrier as well as DNA. Multi-functional carrier system will be required to overcome the barriers such as plasma membrane, endosomal membrane and nuclear membrane. Receptor-mediated endocytosis is one of the most selective and efficient entrance pathway for gene delivery, however, endosomal escape is then a critical barrier for efficient cytosolic delivery. pH-sensitive liposome is able to deliver encapsulated macromolecules into cytosol depending on the decreased endosomal pH. Active targeting to nuclear compartment is essential, otherwise DNA will be degraded in cytosol. Nuclear localization signals have been identified and used for nuclear delivery of macromolecules including DNA. For the rational optimization of the carrier system for gene delivery, quantitative assay of DNA in each organella should be critical. New method in measuring the amount of DNA in nucleus has been established using PCR amplification method. This method can be applied to measure intracellular amount of DNA in other organella, which leads to optimize the intracellular trafficking of DNA with artificial carrier and to surpass the efficiency of virus.

Hideyoshi Harashima・Yasuo Shinohara・Hiroshi Kiyada*

key words : intracellular trafficking, gene delivery, liposome, endocytosis

細胞内動態制御の重要性

薬物送達システム(Drug Delivery System: DDS)の概念が生まれてはや30年が経過し、この間に、①放出制御、②吸収促進、③ターゲティングなどさまざまな観点から研究が進められてきた¹⁾。その結果、化学修飾による物性の変化や高分子化などにより、実際に薬物の体内動態をコントロールすることが可能となった。薬物の体内動態に関する研究も急速に進行し、組織レベルの解析に基づいた理論体系はほぼ完成したといえよう。現在では、分子レベルでのメカニズム解明に立脚したDDSの研究に着手されつつある。

21世紀のDDSに期待される課題として、遺伝子治療などの高度な治療法を確立するために、高分子の細胞内での動きをどのようにしてコントロールするかという問題が²⁾、もっとも重要な課題の一つであると考えられる。高分子を細胞内の標的部位(たとえば核)へ選択的に送達するためには、多くのバリアを越えて作用部位へ送達させる高度な制御システムの構築が必須である。このためには、多様な機能を有した担体の開発が必要となるが、複数の機能を一つの分子にもたせることは現在の技術では困難であり、高分子あるいは微粒子などを薬物担体として用いることが戦略としてすぐれている。筆者らはこれまで、薬物担体としてのリポソームの体内動態を組織レベルで解明し、その変動要因の解明を行ってきた^{2,3)}。近年は

* Department of Biopharmacy, The University of Tokushima, Shomachi-1, Tokushima 770-8505 徳島大学薬学部薬剤学教室
Offprint requests to : Hideyoshi Harashima, Ph.D.

「細胞内動態制御」の重要性に注目し、遺伝子治療への応用を指向した研究に着手している。

まず、癌の遺伝子治療を例にとり、体内に投与された遺伝子の運命を考えてみよう。遺伝子などの高分子を裸のまま体内に投与すると、体液中での酵素的分解や免疫系によって攻撃され、たちまち分解されてしまう。これに対し、リポソームなどを担体として用いると、その安定性は飛躍的に向上する。そこで、以下の過程は、リポソームに封入した遺伝子を導入する場合について考える。まず、腫瘍組織への選択的送達が問題になる。腫瘍組織においては毛細血管がリーキーであるため、リポソームを血中でより長時間滞留させ、かつ適当な粒子径を選べば、細胞間隙まで到達可能となる^{4,5)}。血中でより長時間滞留させる目的では、リポソーム表面をポリエチレングリコール(PEG)などで修飾することが有用である。

本稿では、まず最初に遺伝子を細胞に入れるプロセスに関し簡単に紹介し、次いで筆者らの目指している研究について紹介したい。

細胞膜を介した遺伝子の細胞内導入

細胞膜を介して遺伝子などの高分子を細胞内へ導入する方法として直接膜融合させるものと、エンドサイトーシスの経路を利用するものの2種類が主要な導入経路として考えられる(図1)。

細胞膜と直接膜融合することにより細胞質中へ直接導入する方法が、ある種のウイルス(センダイウイルス、単純ヘルペスウイルス、HIV など)でみられている。センダイウイルスはその一例であり、真弓らは、センダイウイルスとリポソームを融合することにより膜融合リポソームを調製し、非常に効率よく細胞内導入が可能となることを示した⁶⁾。エンドソームからの脱出というバリアを最初から回避しているこの導入方法は非常に効率的である。この方法の最大の課題は選択的な細胞導入にあり、この点が解決されれば、もっとも強力な導入方法として用いることができる。

一方、受容体を介するエンドサイトーシス(RME)は、効率の面では直接膜融合と比較して劣るものの、細胞選択性の観点から考えて非常に有

図1 Two major methods to introduce foreign genes into mammalian cells using liposomes

効である。表1に示したように、腫瘍細胞で正常細胞と比較して過剰に発現している受容体は多数知られている。RMEを介して導入を行う場合、遺伝子複合体の大きさが重要な要因となる。というのは、エンドサイトーシスで取り込む粒子の大きさは、平均粒子径が200 nm程度以下であることが必要となるからである。しかしながら、一般に用いられるカチオンリポソームと遺伝子の複合体の粒子径分布は、ブロードでかつ大きな平均値を有している。そこで、poly(L-lysine)などのポリカチオンによるコンパクションが重要となる¹⁴⁾。poly(L-lysine)は毒性が強いため、核内にある塩基性蛋白質をはじめとする他のポリカチオンの探索が行われている。

われわれの目指すところ

これまでの薬剤学は、主として医薬品を細胞に入れるところまでのプロセスを取り扱ってきた。先にも述べたとおり、遺伝子治療などの最先端医療を考えるに際し、21世紀の薬剤学の中心課題が「細胞内動態制御」であることは明らかである。

筆者らは、リポソームに細胞選択性をもたせるために、細胞に入れる過程としてエンドサイトーシスに限定し、それ以降の過程について検討を開始した。

エンドサイトーシスの経路を介した遺伝子導入

表 1 Strategies for the selective gene delivery by receptor-mediated endocytosis and endosomal escape mechanism

Receptor	Target cells	Endosomal escape	Compaction	Reference
Transferrin	CFT1/KB/HeLa	Adenovirus(dI312)	poly(L-Lysine)	7
ASOR	Huh7	Adenovirus(dI312)	poly(L-Lysine)	8
Transferrin	K562/HeLa/	Influenza HA2 subunit	poly(L-Lysine)	9
Transferrin	BNL CL2	Influenza HA2 subunit	poly(L-Lysine)	10
	Macrophages	Listeriolysin O		11
ErbB-2	COS-1/SKBR3	Pseudomonas exotoxin A	GAL4	12
Folate	KB	DOPE/CHEMS	poly(L-Lysine)	13

に関して、これまでになされている研究をリガンド、エンドソーム脱出を促進させるための工夫、コンパクションの方法などの観点から表1にまとめた。この結果をみると、どのようにして細胞内での分解からのがれるか、どのようにして核へ選択的に送達させるかなどの問題に対して、すでに積極的なアプローチがなされている。しかしながら、それぞれの過程は必ずしも最適化されたものであるとは言い難い。

筆者らは、特定の細胞に遺伝子を導入し、その機能を効率よく発現させるためには、個々の過程を最適化すると同時に、細胞内動態の一つのシステムと考えて全体を分子レベルで最適化していくことがもっとも重要であると考え、試験にたとえば、総合点をもっとも高めるためには、各科目のための時間配分をどうしたらよいかということに相当する。そのためには、各過程の変動要因を分子レベルで理解し、それらの要因が互いにどのように関係しているかを解明することが必要となる。

そこで以下、筆者らが遺伝子の細胞内動態制御において重要と考える、細胞質中への脱出、核への選択的送達および核内転写制御というプロセスについて、筆者らの研究成果を交えながら議論したい。

細胞質中への脱出

インフルエンザウイルスは、エンドサイトーシスにより細胞内に進入し、エンドソーム内の酸性pH(～5.0)を利用して膜融合を起こし、細胞質中への放出を行っている¹⁵⁾。膜融合の過程が分子レ

ベルでもっとも良く解明されつつある例である。このウイルスの膜上にある赤血球凝集素蛋白質(HA蛋白質)は、HA₁とHA₂がそれぞれ3量体として存在し、細胞表面のシアル酸を標的として結合し、エンドサイトーシスにより細胞内へ進入する。エンドソームのpHが7から5へ低下するとHA₂に構造変化が起こり、HA₂のN末端にある11個の融合ペプチドが表面に露出してエンドソーム膜に突き刺さり、膜融合を誘起する。

一方、アデノウイルスは、ファイバーレセプターやインテグリンレセプターなどを介して細胞内に進入し、エンドソームのpHが低下すると、エンドソーム膜を壊して(膜融合ではなく)細胞質中へ脱出することが知られている¹⁶⁾。その分子機構には、ウイルスのキャプシド構造の変化やL3/p23プロテアーゼなどの関与が明らかとなっているが、詳細は不明である。

このように、ウイルスはいずれもエンドソームを脱出する目的で、そのpH低下という現象をうまく利用している。そこで筆者らは、pH-sensitive liposomesを利用してエンドソーム内から細胞質へ放出させる方法を採用した。Dioleoylphosphatidyl ethanolamine(DOPE)という脂質を用いると、pHが7のときには安定な脂質二重層を形成しているが、pHが5～6の領域でヘキサゴナルII構造をとり、急激な不安定化が起こる。その結果、エンドソーム膜と融合が起こり、細胞質中への放出が細胞系でも可能であることを示した(図2)¹⁷⁾。

核への選択的送達

細胞質に放出された高分子をいかにして核内へ輸送するかがつぎの関門となる。細胞質中には種々の分解酵素が存在しているので、それらの攻撃から回避するうえでも選択的核内輸送は重要となる。核膜には核膜孔(NPC)とよばれる直径約9 nmの大きな穴が開いている。この穴を通過できる分子(分子量が2~4万)は、単純拡散により自由に透過が可能であるが、大きな蛋白質などは単純拡散では透過できない。ではいったい、大きな核蛋白質はどのようにして核内へ輸送されているのかという疑問が生じ、非常に興味深いことがわかってきた。核蛋白質が核へ運ばれるためには「核局在化シグナル(NLS)」というペプチド配列が必要で、この配列はリジンのような塩基性アミノ酸を含んでいることがわかった¹⁸⁾。そして、この核内輸送には細胞質中の複数の因子が関与し¹⁹⁾、NLSを認識してNPCへエネルギー非依存的に輸送してNPCと結合する。NPCの透過にはエネルギーが必要で、このときNPCの直径は9 nmから最大26 nmまで開くことが知られている。

筆者らはこの機構に基づいて、マーカー分子としてアルブミンを用い、NLSを付与することにより核内への能動的送達に成功した(図3)。この結果は、マイクロインジェクションや膜の透過性を上げるといような非生理的条件下ではなく、正常な細胞の外からエンドサイトーシスの経路を介して細胞内に導入し、pH-sensitive liposomeで細胞質中に放出させ(図2)、NLSにより核内へ能動的に送達することに成功した初めての例である¹⁷⁾。

さて、筆者らはNLSの付加によって、BSAという巨大な分子を核に選択的に輸送することができた。つぎは遺伝子である。DNAを核に選択的に送達させることを考えはじめて、いくつかの障壁に直面した。まず、目的とする遺伝子が、核のなかにどれだけ取り込まれたかを評価する方法論がないことがわかった。これまで遺伝子導入を用いた研究が非常に多くなされているにもかかわらず、ほとんどすべての研究において、遺伝子が細胞内に導入されたことを活性によってのみ議論し

ており、どれだけの遺伝子が核内に取り込まれたかはまったく議論されていなかった。

そこで筆者らは、細胞内オルガネラ中の遺伝子定量法の確立に着手した。遺伝子の定量法としては、これまでに蛍光やアイソトープ標識が行われているが、これらの方法には、感度や分解物の混入などの点で大きな問題があった。そこで筆者らはまずPCR法を用いて、導入したDNA分子を選択的に検出する系の確立を試みた。その結果、核分画中に送達された標的遺伝子の定量法の確立に成功し、核1個あたりの遺伝子送達量の定量が可能となった(図4)²⁰⁾。

つい最近、NLSを付加したDNAの核への導入に関して、興味深い論文が発表された²¹⁾。彼らは、筆者らがBSAに対してとったのと同じアプローチで、DNA分子にNLSを化学的に結合させ、核への選択的送達を目指した。しかしながら、彼らの実験結果は、DNA分子はあまりに巨大であり、核に選択的に移行されるためには、DNA分子をDNAとして機能しなくなるまで修飾しないと(具体的には、1 kbpあたり100個ものNLSを付加しないと)、核内には送達しないことを意味していた。彼らは裸のDNA分子を導入しようとしたからである。NPCを介して巨大な遺伝子を核内に導入するためにはコンパクションが必須である。コンパクションについては、poly(L-lysine)にかわるコンデンサーとしてポリエチレンジアミンなどが開発されており²²⁾、このコンデンサーにNLSを付加することで、DNAにダメージを与えることなく核へと送達する方法を検討中である。

ウイルスの遺伝子導入を眺めてみると、たとえばSV40の場合には、実に5 kbp(分子サイズは3MDa)に及ぶ遺伝子を導入することに成功している。ウイルスは、これほどまでに巨大な分子を、構造蛋白質のNLSによりNPCを介して核内へ輸送していると考えられるが、分子機構の詳細は不明である。一方、アデノウイルス(36 kbp)や単純ヘルペスウイルス(~150 kbp)のように直径が90 nmあるいは125 nmという巨大なゲノムになると、一度解体してからNPCを透過せざるをえないだろう。これらの過程の分子機構が明らかと

図 2 Release of FITC-albumin into cytosol from endosome by pH-sensitive liposomes. Using pH-sensitive liposomes, efficient cytosolic distribution of FITC-albumin (green) was achieved. For detail, see ref. 17.

なれば、ウイルスから戦略を学ぶこともできよう。

核内転写制御

導入された遺伝子が効率よく発現するかどうかは、もっぱら導入する遺伝子の転写調節能にかかっている。哺乳類の細胞では、普遍的に発現させることが可能な SV40 などのプロモーターが利用されることが多いが、その転写効率はさほど高くない。宮崎らによって確立された pCAGGS は²³⁾、現在もっとも効率の良い発現ベクターとして繁用されており、この観点で非常に重要な意味をもっているように思われる。

以上述べたのは、遺伝子治療など、特定の遺伝子を発現させる場合についてであり、長い DNA を導入することを前提としている。一方、すでに細胞のもっている遺伝子の転写をコントロールすることも重要になってくると思われる。多くの遺伝子の転写制御は、転写制御因子とよばれる蛋白質によって調節されている。転写制御因子は、特定の遺伝子の比較的短い塩基配列(転写調節エレメント)を特異的に認識してこれに結合し、転写のコントロールを行っている。したがって、転写調

図 3 The transport of FITC-albumin with NLS to the nuclear compartment by pH-sensitive liposomes

A: FITC-albumin (green), B: nucleus labeled with propidium iodide (red), C: phase contrast microscopy and D: superimposed image of A and B (from ref. 17)

図 4 Example of a calibration PCR used for the quantitative determination of nuclear transported plasmid DNA

λ/Sty I represents size marker.

節エレメントを核内に多量に導入することができれば、そのエレメントに結合する転写調節因子の

活性発現を少なくとも抑制することが可能であると期待される。アンチセンス法が、転写そのものには影響を与えないのに対し、この方法であれば転写そのものを抑制することが可能であるので、より高い有効性が期待される。

この戦略の有効性については、すでに Holt が、*c-fos* 遺伝子の転写を血清刺激エレメント (SRE) の導入によって抑制したとの報告があるが²⁴⁾、彼はエレメントの核への移行をコントロールしているわけではない。筆者らは、核への DNA の選択的送達を行うことが可能であると考えているので、彼の成果を遙かに上回る効果を発現させることができるものと確信している。また筆者らは、具体的なターゲット遺伝子として、悪性度の高い癌細胞で多量に発現して、活発な増殖を担っていることが明らかになってきた II 型ヘキソキナーゼを考えている²⁵⁾。腫瘍組織は、比較的低酸素条件であるにもかかわらず、活発な増殖を続ける。腫瘍組織では、細胞が低酸素条件下に曝された場合においても増殖が可能のように、II 型ヘキソキナーゼなど、解糖系の酵素の転写が亢進している。この過程には、低酸素誘導因子 (HIF) が関与しているであろうことが明らかになってきている²⁶⁾。そこで、この因子の結合エレメント (5'-ACGTGCG) をタンデムに連結させた DNA 断片の 5' 末端に、NLS を 2 価架橋試薬で付加させた分子を調製し、これを癌細胞に導入することによる癌細胞の増殖抑制という実験に着手している。

また、核内での遺伝子の転写制御に応用することを考えると、Dervan らの研究成果は非常に興味深い。彼らは、特定の塩基配列を認識する化合物を合成し、実に細胞レベルで特定の遺伝子の転写を調節することに成功している²⁷⁾。DNA に加え、このような分子をもリボソームに封入し、核内転写制御という問題に取り組んでいきたいと考えている。

最適化の重要性：リボソームからマイクロマシンへ

遺伝子導入キャリアという観点からウイルスをみると、生命の歴史とともに進化(最適化)を重ね

図 5 Kinetic model of the fate of transfected DNA

To achieve the efficient gene delivery, optimization of all key processes is very important.

てきているので、その分子機構が解明されるとともに、人知を越えた仕掛けの光明さに驚嘆せざるを得ない。しかしながら、人類は鳥を越える飛行機やロケットを設計することに成功し、また、どんな魚よりも速く進む船をつくることに成功している。21 世紀は焦点をミクロの世界に移して、ウイルスを越える遺伝子送達キャリアの設計に挑戦する時代といえよう。したがって、はじめはウイルスを師と仰ぎ、その長所に学び、最終的にはウイルスを越えるキャリアを設計することが可能であると確信している。そのためには、ウイルスの効率良い遺伝子導入機構を分子レベルで理解するとともに、人工遺伝子送達キャリアの体内動態および細胞内動態の最適化を行うことが不可欠となる。

図 5 は、遺伝子の標的組織への分布以降の過程を速度論的に解析するためのモデル図である。遺伝子治療への応用研究を考える場合には、最終的には、*in vivo* で循環血液中へ投与することにより標的細胞(たとえば癌細胞)へ送達し、さらに細胞内動態を制御することが要求される。したがって、実際には全体を考慮した生理学的モデルの構築が不可欠であり、血中滞留性の問題や毛細血管透過性などもきわめて重要な役割を果たすわけであるが、それらを支配する要因についてはこれまでの研究から明らかとなっているので、ここでは、細胞内への送達以降の過程に焦点を絞ってモデルを

考えている(図5)。

遺伝子の細胞内動態の詳細は、実はほとんど明らかにはなっていない。したがって、図5のモデルは、厳密には想定されるモデル図、というべきである。というのは、遺伝子の細胞内分布の定量方法が確立していないので、われわれは定量的データをほとんど持っていないからである。先にも述べたが、幸いなことに筆者らは、核中に送達したDNAの超高感度検出法の確立に成功した。今後は、細胞質画分、エンドソーム/ライソゾーム画分、細胞膜画分の定量法も確立することにより、図に示したモデル中の各パラメーターの実測を行い、各パラメーターの変動要因の解明を行うとともに、最適化戦略を具体的に展開していきたい。

これまで述べてきたように、遺伝子導入に際して問題になるであろうと考えられる、① 遺伝子のコンパクション、② 細胞選択性、③ エンドソームからの効率脱出、④ 核への能動的な送達などについて研究が行われている。これらのすべてを備えた遺伝子キャリアシステムは、「マイクロマシン」という表現がふさわしいかもしれない。昔、「ミクロの決死隊」というSFがあり、人間が小さくなって体内に進入し病気を治すという夢のような話があったが、21世紀にはわれわれの手で現実のものとするを旨とし、研究を行っている。

本総説は、第14回日本DDS学会(1998年7月、横浜)において「臓器特異的デリバリーの開発戦略：分子から個体へ」と題する公開討論会にて、原島が話題提供を行ったものに追加し、とりまとめたものである。ディスカッションリーダーの杉山雄一教授と橋田 充教授に感謝の意を表したい。

また、本研究の遂行にあたりご援助をいただいた、文部省科学研究費(09557197, 10877390, 10145242)および武田科学振興財団に深く感謝する。

文 献

- 1) 橋田 充：ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たな挑戦—。第2章 動きを制御する技術—DDS。化学同人、1995、p9-22。
- 2) Harashima H, Kiwada H: Liposomal targeting and drug delivery: Kinetic consideration. *Adv. Drug Del. Rev.* 19: 425-444, 1996.
- 3) Harashima H, Matsuo H, Kiwada H: Identification of proteins mediating clearance using a liver perfusion system. *Adv. Drug Del. Rev.* 32: 61-79, 1998.
- 4) Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K et al.: Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11460-11464, 1991.
- 5) Uchiyama K, Nagayasu A, Yamagiwa Y, Nishida T, Harashima H et al.: Effect of liposomal fluidity and size on its tumor accumulation: A presumption of interaction between liposomes and solid tumor. *Int. J. Pharm.* 121: 195-203, 1995.
- 6) Mizuguchi H, Nakagawa T, Nakanishi M, Imazu S, Mayumi T et al.: Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 402-407, 1996.
- 7) Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, Cotten M: Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8850-8854, 1991.
- 8) Wu GY, Zhan P, Sze LL, Rosenberg AR, Wu CH: Incorporation of adenovirus into a ligand-based DNA carrier system results in retention of original receptor specificity and enhances targeted gene expression. *J. Biol. Chem.* 269: 11542-11546, 1994.
- 9) Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML: Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: Toward a synthetic virus-like gene transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7934-7938, 1992.
- 10) Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E: The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer system. *J. Biol. Chem.* 269: 12918-12924, 1994.
- 11) Lee K, Oh Y, Portnoy DA, Swanson JA: Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 271: 7249-7252, 1996.
- 12) Fominaya J, Wels W: Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein: Novel non-viral gene delivery system. *J. Biol. Chem.* 271: 10560-10568, 1996.
- 13) Lee RJ, Huang L: Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* 271: 8481-8487, 1996.
- 14) Gao X, Huang L: Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 35: 1027-1036, 1996.
- 15) Helenius A: Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69: 577-578, 1992.
- 16) Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow

- GR : Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 73 : 309-319, 1993.
- 17) Tachibana R, Harashima H, Shono M, Azumano M, Niwa M et al. : Intracellular regulation of macromolecules using pH-sensitive liposomes and nuclear localization signal : qualitative and quantitative evaluation of intracellular trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 251 : 538-544, 1998.
 - 18) Goldfarb DS, Garipey J, Schoolnik G, Kornberg RD : Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322 : 641-644, 1986.
 - 19) Yoneda Y : How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J. Biochem.* 121 : 811-817, 1997.
 - 20) 橋理恵子, 井手奈保子, 太田慈子, 篠原康雄, 原島秀吉・他 : リポソームによる高分子医薬品の細胞内動態制御法に関する研究(3), 第13回日本薬物動態学会年会(1998年11月, 仙台).
 - 21) Sebestyen MG, Ludtke JJ, Bassik MC, Zhang G, Budker V et al. : DNA vector chemistry : the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat. Biotechnol.* 16 : 80-85, 1998.
 - 22) Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP : Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 273 : 7507-7511, 1998.
 - 23) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J : Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108 : 193-200, 1991.
 - 24) Holt JT : Cutting the chain of command : specific inhibitors of transcription. *Antisense Res. Dev.* 1 : 365-369, 1991.
 - 25) 篠原康雄, 寺田 弘 : がん細胞特有のエネルギー代謝系のキャラクタリゼーション, サイエンスリポート, (印刷中).
 - 26) 日野真美, 畑中 貴, 篠原康雄, 寺田 弘 : がん細胞における型ヘキソキナーゼの酸素による転写制御, 生化学 70 : 1003, 1998.
 - 27) Gottesfeld JM, Neely L, Trauger JW, Baird EE, Dervan PB : Regulation of gene expression by small molecules. *Nature* 387 : 202-205, 1997.