カチオン性リポソームを用いた遺伝子医薬品の *in vivo* デリバリー

特集 遺伝子治療と DDS

川上 茂^{*1)}, 橋田 充^{*2)}, 西田孝洋・中村純三^{*1)}

Development of in vivo gene delivery system using cationic liposomes

Cationic liposomes have been considered as a potential non-viral vector for gene delivery, which possess a low immunogenicity unlike viral vectors. The gene transfer efficiency of cationic liposomes is lower than that of viral vectors but the advance of recent study revealed to enhance the gene expression levels of cationic liposomes. The most problem of cationic liposomes seem to be the lack of organ or cell selectivity because the lung shows highest gene expression organ after intravenous injection. Applying a cell-specific targeting technology to the liposomes would improve *in vivo* gene delivery and reduce unexpected side effects.

Liver parenchymal cells and liver non-parenchymal cells exclusively express large numbers of high affinity asialoglycoprotein and mannose receptors, respectively. Receptor-mediated gene delivery systems seems to introduce foreign DNA into specific cell types *in vivo*. However, we have confirmed that not only the nature of the ligands grafted to carriers but also the overall physicochemical properties of the complexes need to be optimized for the cell-selective targeting of plasmid DNA. In this article, we attempt to evaluate the gene delivery system based on the physicochemical properties of plasmid DNA and plasmid DNA/cationic liposomes or glycosylated cationic liposomes.

Shigeru Kawakami^{*1)}, Mitsuru Hashida^{*2)}, Koyo Nishida, Junzo Nakamura^{*1)}

key words : plasmid DNA, targeting, gene delivery, cationic liposome, gene therapy

遺伝子治療は、将来の医療の主要な技術として、先天的に遺伝的に欠損のある細胞に正常な遺伝子を導入する治療法のみならず、後天的な難治性の疾患に対する有効な治療法となることが期待されている。難治性疾患の遺伝子治療において十分な、臨床効果を発揮するには、治療の対象となる細胞に治療効果をもつ蛋白質を発現する遺伝子を導入する必要がある。

遺伝子導入法は、細胞を体外へ単離、培養してから遺伝子導入を行い、再び体内に遺伝子導入細胞を戻す *ex vivo* 法と、体内で静脈内投与などにより遺伝子導入を行う *in vivo* 法に大別される。前者は、生体内での分解なしに効率的に遺伝子を標的細胞直接導入できる点ですぐれており、現在のところ繁用されているものの、培養できる細胞の種類に限りがある。

るうえに、対象患者数が多い場合には実際的に無理があり、将来、遺伝子治療を一般化していくうえでは、後者の *in vivo* 法の開発が重要である。その場合、*in vivo* 法によって、遺伝子を目的とする細胞に導入するための新しいベクターの開発が非常に重要となってくる。

現在使われているベクターは、ウイルスベクターとカチオン性リポソームやカチオン性ポリマーなどを用いる非ウイルス性ベクターの2種類に分けられる。現在、アメリカにおいて遺伝子治療の臨床プロトコルで用いられている遺伝子導入ベクターは、ウイルスベクター(レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター)が主流であり、遺伝子治療全体の約8割を占めている¹⁾。ウイルスベクターの特徴は、遺伝子導入効率が非常にすぐれていることがあげられる。しかしながら、ウイルスが再び病原性を獲得する可能性や、ウイルスが抗原として免疫反応が誘導されてしまうため、複数回投与では、ウイルスベクターが分解される点が重要

^{*1)} School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University 長崎大学薬学部医療薬理学講座薬理学研究室

^{*2)} Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University 京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野

Offprint request to : Mitsuru Hashida, Ph. D.

な問題点として指摘されており、さらに改善の必要がある²⁾。

一方、カチオン性リポソームに代表される、非ウイルス性ベクターは安全性の観点からこれらウイルスベクターが本質的にもつ欠点をもたないものの、静脈内投与後の遺伝子導入効率の低さが問題として指摘されてきた。近年の研究の成果により、カチオン性リポソームの中性脂質を pH 感受性の中性脂質、DOPE からコレステロールに変更して複合体の生体内での安定性を改善する試みや、遺伝子医薬品に対するカチオン性リポソームの割合を多くし、負電荷をもつ血液中成分による中和を抑え、カチオン性エンドサイトーシスによって遺伝子導入を行う試みなどにより、遺伝子導入効率を大きく改善できることが報告されてきている^{3~11)}。しかしながら、これらの方法を用いた場合、遺伝子発現部位はいずれも肺で最も高く、他の臓器へ選択的に遺伝子を導入することは難しい^{3~11)}。したがって、今後の遺伝子治療においては、治療用遺伝子を目的とする細胞にだけ発現させる、細胞特異的遺伝子発現技術の方法論の確立が重要になってくると考えられる。

遺伝子医薬品を *in vivo* において、細胞特異的に発現させるには、まず、遺伝子医薬品を目的とする細胞へ移行させることが重要である。

そこで、本稿では、遺伝子医薬品やカチオン性リポソームとの複合体の物理化学的性質と体内動態分布特性について整理し、さらにその情報をもとにした、糖修飾カチオン性リポソームによる遺伝子医薬品の肝臓への細胞選択的遺伝子ターゲティングのアプローチについても概説する。

プラスミド DNA の基本的体内動態

全身投与された遺伝子医薬品は、生体内の赤血球、血漿蛋白などの内因性の物質との相互作用を受けながら、細胞へと取り込まれ、さらに核へと移行した一部が治療効果をもった蛋白質を発現する。またこの間に、循環血液内、細胞間隙内、細胞内に存在するヌクレアーゼにより速やかに分解されてしまう。*In vivo* での細胞選択的な遺伝子発現を制御するには、まず最初に、生体に投与された際の遺伝子医薬

品の体内動態を考慮にいれる必要があると考えられる^{12,13)}。

Kawabata らは、遺伝子医薬品の基本的な体内動態を明らかにすることを目的として、分子量約 285 万の chloramphenicol acetyltransferase (CAT) をコードしたプラスミド DNA (pCMV-CAT) をモデルとしてニクトランスレーション法により、³²P 標識を施し、安定性および体内分布実験を行った¹⁴⁾。その結果、マウスに静脈内投与後、プラスミド DNA は速やかに分解を受けた。これは、*in vitro* の系で血清とインキュベートした系よりも速やかであり、生体内で非常に不安定であることが示された。また、体内動態に関しては、血液中から速やかに消失し、5 分以内に投与量の約 70% が肝臓に蓄積して、その大部分は非実質細胞に回収された¹⁵⁾。プラスミド DNA は、ヌクレオチド間のリン酸基に由来する多数の負電荷をもつポリアニオンであるが、肝臓非細胞への取り込みは、他のポリアニオンの同時投与により有意に阻害された。ポリアニオンの特異的な肝臓実質細胞への取り込みは、スカベンジャーレセプターを介していることがすでに知られており、プラスミド DNA も同様に、スカベンジャーレセプター様の機構を介して肝臓非実質細胞へ取り込まれている可能性が示されているが、スカベンジャーレセプターのうち最も良く知られているクラス A の関与は否定されている¹⁶⁾。

一方、遺伝子発現は、プラスミド DNA をマウスに静脈内投与後、いずれの臓器においても定量限界以下であった。これは、プラスミド DNA の生体内での安定性の悪さや負電荷を有しているため、同じ負電荷に帯電している細胞膜に取り込まれにくいからだと考えられる。

肝臓非実質細胞を構成するクッパー細胞などマクロファージ系の細胞に取り込まれても遺伝子発現しないのは、これらの細胞は *in vitro* においても遺伝子導入が難しい細胞であり¹⁷⁾、積極的に取り込まれたあと酵素によって速やかに分解されてるものと考えられる。

カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体の体内動態および遺伝子発現

プラスミド DNA は負電荷をもっているため、正電荷をもつカチオン性リポソームとインキュベートすることで複合体を形成する。プラスミド DNA に正電荷をもたせることで、生体内での安定性は大きく改善され、さらに負電荷に帯電している細胞膜に取り込まれやすくなり、遺伝子発現は大きく改善される。これまで、培養細胞を用いた *in vitro* の実験により、カチオン性脂質の分子構造の修飾や、pH 感受性の中性脂質であるジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPE) を加えることで、遺伝子発現を改善できることが報告されており、さまざまな遺伝子導入試薬としてのカチオン性リポソームが開発されてきた¹⁸⁻²¹⁾。しかしながら、静脈内投与後、*in vivo* においては生体内に存在する血漿蛋白や赤血球などの内因性物質は負電荷をもっており、複合体の正電荷は中和されてしまうため、各臓器での遺伝子発現レベルは低くなってしまふ。近年、遺伝子発現レベルの問題は、複合体に十分な正電荷をもたせる試みや DOPE のかわりにコレステロールを用いる試みなどによりずいぶん改善されてきている。この場合、静脈内投与後の遺伝子が発現する臓器は、報告によって相対的な遺伝子発現レベルに多少の差があるものの、他の臓器にくらべ肺において最も高く発現する³⁻¹¹⁾ (図 1)。

Mahato らは、プラスミド DNA とカチオン性リポソームとの複合体の体内動態を明らかにすることを目的として、代表的なカチオン性リポソームである lipofectin[®] および lipofectACE[®] を用いて³²P 標識プラスミドとコンプレックスを調整し体内分布実験を行った^{22,23)}。いずれのリポソームの場合も、マウスに複合体を静脈内投与後、すぐに血漿中から放射活性は消失し、投与直後から約 5 分までの初期に、主に肺に蓄積し、以後、肝臓へ蓄積していくことが示された。遺伝子発現は、肺において最も高く、肝臓での遺伝子発現は定量限界以下であったことから、投与直後ごく短い間の体内分布が重要である可能性が示された。肝臓における放射活性は主に非実

図 1 カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体を静脈内投与後の遺伝子発現
ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミド DNA (pCMV-Luc) (30 μ g) をカチオン性リポソーム N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-n, n-trimethylammonium chloride (DOTMA : cholesterol=1:1) と電価比 2.3 で複合体を形成させ、マウス尾静脈内へ投与し、6 時間後の各臓器でのルシフェラーゼ遺伝子の発現。各臓器は、肺 (□)、肝臓 (■)、腎臓 (▨)、脾臓 (▩)、心臓 (▧) で表している。

質細胞で認められた。この肝臓非実質細胞への複合体の取り込みにおいては、スカベンジャーレセプターの基質である poly [C] の同時投与によって、有意な阻害効果が認められなかった。このことは、複合体の肝臓への取り込みが、プラスミド DNA 単独の場合と異なるメカニズムであることを示している。

カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体の物理化学的性質特性と体内動態

プラスミド DNA と lipofectin および lipofectACE[®] の重量比を 1:5 で調整した複合体は、1:10 で調整した複合体よりも高い肺への蓄積が認められた^{22,23)}。最近、プラスミド DNA とカチオン性リポソームの特性は、電荷のモル比 (電価比) を用いて一般に表される^{8,23)}。この研究で用いられた、

図2 カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体をさまざまな比率で混合したときの平均粒子径の変化
プラスミド DNA : カチオン性リポソーム (重量比で混合)

プラスミド DNA の場合は、1 ヌクレオチド当たり一つのマイナスチャージをもつと考えると、その 1 μg は、3.17 nmol の負電荷をもつことになった。同様な考えで、リポフェクチンの場合、その 1 μg は、0.78 nmol の正電荷をもつことになる。

Sakurai らは、複合体の物理化学的性質を調べるため、プラスミド DNA と平均粒径約 100 nm に調整した lipofectin® とをさまざまな比率で混合して、その平均粒子径の変化を調べた²⁴⁾。その結果、プラスミド DNA と lipofectin の重量比が 1:1 (電価比 0.3) のときに、平均粒子径約 120 nm であった複合体が、電価の中和に伴い徐々に増大し、1:5 (電価比 1.2) のときに、約 1,000 nm と最大になり、正電荷の増大すなわち重量比 1:7.5 (電価比 1.9) で約 200 nm 重量比 1:10 (電価比 2.5) で約 150 nm と再び小さくなることを報告している (図 2)。

図 3 は、複合体を原子間力顕微鏡を用いて捉えて画像化した写真である。カチオン性リポソームとプラスミド DNA の混合比率の変化によって、その粒子径が変化しているのがわかる。なお、データは示していないが、混合比 1:5 の画像においては、粒子径の大きいものも見られた。以上、カチオン性リポソームとプラスミド DNA 複合体は、その混合比に

よって、粒子径や電価など物理化学的特性に大きな変化があり、このことは体内動態さらに遺伝子発現に大きく影響するものと考えられる。

糖修飾カチオン性リポソームを用いた肝細胞選択的遺伝子導入

今後のカチオン性リポソームを用いた遺伝子治療を実現させていくには、治療用遺伝子を肺以外の細胞に特異的に発現させる、細胞特異的遺伝子発現技術が重要になってくる。これまでの検討により、*in vitro* において、カチオン性リポソームに糖²⁵⁻²⁷⁾、葉酸²⁸⁾、トランスフェリン²⁹⁾などのリガンドを導入することで、細胞特異的に発現しているレセプターを介して遺伝子医薬品を細胞選択的に導入できることが報告されている。なかでも、肝臓実質細胞が有するアシアロ糖蛋白質レセプターや肝臓非実質細胞が有するマンノースレセプターなどの糖鎖認識機構は、特定の細胞に発現し、また厳密な基質認識性を有することから、*in vivo* での肝細胞選択的ターゲティングへの利用が期待されており、これまでも糖蛋白質あるいは糖修飾高分子をキャリアとした薬物ターゲティングが試みられてきた³⁰⁻³²⁾。非ウイルスキャリアのなかでも、カチオン性リポソームは、遺伝子発現の点ですぐれており、糖をカチオン性リポソームに導入することで *in vivo* における高い発現機能を有する肝細胞選択的遺伝子導入キャリアとして期待できる。

複合体の体内動態を支配する生体側特性として、内因性物質との相互作用、血流、毛細血管の構築、単核食細胞系細胞による捕捉などがあげられ、循環血液中に到達した複合体は血流によって各組織に運搬されることから、移行先の各組織では、毛細血管壁の透過性に依存して血管外へ漏出する。毛細血管壁の構造は組織によって異なり、連続型、有窓型、および不連続型の 3 種類に分類され、高分子医薬品の体内分布は、移行先の各組織の毛細血管壁の透過性に依存して分布する³³⁾。複合体の物理化学的性質、特に、正電価は、遺伝子発現に大きく影響し、さらに、内因性物質との相互作用にも大きく影響する。また、上述したように複合体はカチオン性リポソ-

図 3 カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体をさまざまな比率で混合したときの複合体を原子間力顕微鏡を用いて捉え、画像化した写真複合体は、DNA とカチオン性リポソームをそれぞれ、1:0.5(A) (B), 1:2.5(C) (D), 1:5(E) (F), 1:50(I) (J) の重量比で混合し、調製した。

図4 ガラクトース修飾カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体を門脈内投与後の遺伝子発現 pCMV-Luc (30 μ g) をガラクトース修飾カチオン性リポソーム (DOTMA: cholesterol: Gal-C 4-Chol=1: 0.5: 0.5) とさまざまな電価比で複合体を形成させ、マウス門脈内へ投与し、6 時間後の各臓器でのルシフェラーゼ遺伝子の発現。各臓器は、肺 (□), 肝臓 (■), であらわしている。ND (=not detected) は、検出限界以下であった。

ムとプラスミド DNA の混合比によって大きく粒子径は変化し、その結果、体内動態に影響を与える。つまり、遺伝子医薬品を細胞選択的にデリバリーするには、たんにカチオン性リポソームにリガンドを導入するだけではなく、複合体の粒子径や電価といった物理化学的性質も制御する必要がある。

カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体は、比較的サイズが大きいため不連続内皮からなる毛細血管網を有する肝臓、脾臓、骨髄などの組織では移行しやすく、これらの臓器への遺伝子導入が可能だと考えられる。なかでも肝臓は、生体における物質代謝の中枢を担う臓器であり、それに関わる数多くの酵素が存在している。先天的にこれらのいずれかの酵素に異常が生じた場合、重大な代謝障害が生じて疾患が引き起こされることになる。肝臓における実際の遺伝子治療の最初の臨床試験は、LDL レセプター欠損による家族性高コレステロール血症で、肝臓の一部を切除し、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入したあと、門脈経由で再び生体に戻す *ex vivo* による方法がとられた³⁴⁾。安全性

や簡便性を考えても、カチオン性リポソームなどの非ウイルスベクターを用いた *in vivo* 法が理想的であるが、現在のところ、細胞選択性がないため肝臓への適応は難しい。

そこで、筆者らは、新たにガラクトースおよびマンノース修飾コレステロール誘導体 (cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2- β -D-thiogalactoyl)ethyl) amino) buthyl) formamide (Gal-C 4-Chol), cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2- β -D-thiomannosylethyl) amino) buthyl) formamide (Man-C 4-Chol)) を合成し、これを含む糖修飾カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体による肝細胞選択的遺伝子導入を試みた^{35,36)}。糖修飾リポソームとプラスミド DNA の複合体の粒子径は、1.6 以上の電価比で、いずれも 120~150 nm であった。ガラクトース修飾カチオン性リポソームを静脈内投与後、遺伝子発現は肝臓よりむしろ肺で高く発現したが、門脈内投与後、ガラクトース修飾カチオン性リポソームでは、肝臓において最も高い遺伝子発現を示した³⁵⁾。肝臓での遺伝子発現は、実質細胞に

において非実質細胞とくらべ、有意に高い発現を示した。ガラクトース修飾ウシ血清アルブミンの同時投与による阻害実験より、複合体がアシアロ糖蛋白質レセプターを介したメカニズムで取り込まれていることが示唆された。さらに、遺伝子発現における複合体の電荷の影響を検討したところ、上述した複合体の電価比が2.3~3.1で肝臓選択的な遺伝子発現が認められ、さらに高い電価比では、肝臓よりもむしろ肺で高く発現した(図4)。

一方、マンノース修飾カチオン性リポソームを静脈内投与後、遺伝子発現は肝臓において最も高い遺伝子発現を示した(図5)³⁶⁾。肝臓での遺伝子発現は、非実質細胞において実質細胞とくらべ、有意に高い発現を示した。さらに、この遺伝子発現は、マンノース修飾ウシ血清アルブミンの同時投与による阻害実験より、複合体がマンノースレセプターを介したメカニズムで取り込まれていることが示唆された。

さらに、遺伝子発現におけるマンノース修飾カチオン性リポソーム/プラスミドDNA複合体の電荷の影響を検討したところ、ガラクトース修飾リポソームの場合と同様に、電価比が2.3で肝臓選択的な遺伝子発現が認められ、さらに高い電価比では、肝臓よりもむしろ肺で高く発現した。肝臓における血管内皮は不連続内皮構造であり、その間隔は最大約200 nmであることが報告されている³⁷⁾。複合体が肝臓実質細胞へ移行するには、この間隔を透過する必要があるものの、内皮細胞またはクッパー細胞などの非実質細胞は透過しなくてもよい。調製した複合体のサイズ(120 から 150 nm)を考えると、十分透過できるサイズであるにも関わらず、静脈内投与後、ガラクトース修飾カチオン性リポソーム/プラスミドDNA複合体は、肺で高い遺伝子発現を示し、また、マンノース修飾カチオン性リポソーム/プラスミドDNA複合体は、肝臓で最も高い遺伝子発現を示した。

以上、静脈内投与後、複合体は血中物質と相互作用し、肝臓に到達する時点では、そのサイズが200 nm よりも大きくなっているため、このような結果になったものと推測される。肝実質細胞選択的遺伝子導入の今後の課題は、遺伝子発現機能を維持した状態でいかに生体成分などの相互作用を抑えるかと

図5 マンノース修飾カチオン性リポソームとプラスミドDNAの複合体を静脈内投与後の遺伝子発現
pCMV-Luc(50 μg)をマンノース修飾カチオン性リポソーム(Man-C4-Chol:DOPE=6:4)またはカチオン性リポソーム(DC-Chol/DOPE=6:4)と電価比2.3で複合体を形成させ、マウス静脈内へ投与し、6時間後の各臓器でのルシフェラーゼ遺伝子の発現。各臓器は、肺(□)、肝臓(■)、腎臓(▨)、脾臓(▧)、心臓(▩)であらわしている。

いう点にある。

以上の結果、糖鎖などのリガンドを導入したカチオン性リポソームとプラスミドDNAの複合体の物理化学的性質を最適化することで、*in vivo*における細胞選択的遺伝子導入が可能であることが示された。

おわりに

遺伝子医薬品の細胞選択的遺伝子導入の確立には、遺伝子医薬品の物理化学的性質と体内動態特性を調べるのが重要であることが示された。今後、本概念に基づいてデリバリーシステムを開発することにより、効果的な遺伝子ターゲティングが実現されるものと考えられる。

文 献

- 1) 谷憲三郎：癌遺伝子治療の最前線。実験医学 17: 2254-

- 2259, 1999.
- 2) 平井久丸：遺伝子治療の現状と展望. *Molecular Medicine* 34 : 408-414, 1997.
- 3) Liu F, Qi H, Hang L, Liu D : Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo* via intravenous administration. *Gene Ther* 4 : 517-523, 1997.
- 4) Mahato RI, Anwer K, Tagliaferri F, Meaney C, Lonard P, Wadhwa MS, Logan M, French M, Rolland A : Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration. *Hum Gene Ther* 9 : 2083-2099, 1998.
- 5) Liu Y, Mounkes LC, Liggitt HD, Brown CS, Solodin I, Heath TD, Debs RJ : Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nature Biotech* 15 : 167-173, 1997.
- 6) Song YK, Liu F, Chu S, Liu D : Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer *in vivo* by intravenous administration. *Hum Gene Ther* 8 : 1585-1594, 1997.
- 7) Hong K, Zheng W, Baker A, Papahadjopoulos D : Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient *in vivo* gene delivery. *FEBS Letters* 400 : 233-237, 1997.
- 8) Li S, Huang L : *In vivo* gene transfer via intravenous administrations of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 4 : 891-900, 1997.
- 9) Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L : Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 5 : 930-937, 1998.
- 10) Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN : Improved DNA : liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotech* 15 : 647-652, 1997.
- 11) Hofland HEJ, Nagy D, Liu JJ, Spratt K, Lee YL, Danos O, Sullivan SM : *In vivo* gene transfer by intravenous administration of stable cationic lipid/DNA complex. *Pharm Res* 14 : 742-749, 1997.
- 12) 高倉喜信, 橋田 充 : 遺伝子医薬品の DDS 開発とその問題点. *Drug Delivery System* 10 : 391-398, 1995.
- 13) Mahato RI, Takakura Y, Hashida M : Nonviral vectors for *in vivo* gene delivery : physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14 : 133-172, 1997.
- 14) Kawabata K, Takakura Y, Hashida M : The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice : involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 12 : 825-830, 1995.
- 15) Yoshida M, Mahato RI, Kawabata K, Takakura Y, Hashida M : Disposition characteristics of plasmid DNA in the single-pass rat liver perfusion system. *Pharm Res* 13 : 599-603, 1996.
- 16) Takakura Y, Takagi T, Hashiguchi M, Nishikawa M, Yamashita F, Doi T, Imanishi T, Suzuki H, Kodama T, Hashida M : Characterization of plasmid DNA binding and uptake by peritoneal macrophages from class A scavenger receptor knockout mice. *Pharm Res* 16 : 503-508, 1999.
- 17) Erbacher P, Bousser MT, Raimond J, Monsigny M, Midoux P, Roche AC : Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum Gene Ther* 7 : 721-729, 1996.
- 18) Felgner PL, Gadek TR, Roman HM, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M : Lipofectin : A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 7413-7417, 1987.
- 19) Gao X, Huang L : A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 280-285, 1991.
- 20) Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley LC, Basseville M, Lehn P, Lehn JM : Guanidium-cholesterol cationic lipids : efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 9682-9686, 1996.
- 21) Gorman CM, Aikawa M, Fox B, Fox E, Lapuz C, Michaud B, Nguyen H, Roche E, Sawa T, Wiener-Kronish JP : Efficient *in vivo* delivery of DNA to pulmonary cells using the novel lipid EDMPC. *Gene Ther* 4 : 983-992, 1997.
- 22) Mahato RI, Kawabata K, Takakura Y, Hashida M : *In vivo* disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes. *J Drug Target* 3 : 149-157, 1995.
- 23) Mahato RI, Kawabata K, Nomura T, Takakura Y, Hashida M : Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J Pharm Sci* 84 : 1267-1271, 1995.
- 24) Sakurai F, Inoue R, Nishino Y, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *J Controlled Release* (in press).
- 25) Remy JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, Behr JP : Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands : A stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 1744-1748, 1995.
- 26) Hara H, Kuwasawa H, Aramaki Y, Takada S, Koike K, Ishidate K, Tsuchiya S : Effect of fusogenic and DNA binding amphiphilic compounds on the receptor-mediated gene transfer into hepatic cells by asialofetuin-labeled liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1278 : 51-58, 1996.
- 27) Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M : Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 252 : 78-83, 1998.
- 28) 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.
- 29) Simoes S, Slepishkin V, Pretzer E, Dazin P, Gaspar R, Pedrosa de Lima MC, Duzgunes N : Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides. *J Leukocyte Biol* 65 : 270-279, 1999.
- 30) Nishikawa M, Miyazaki C, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties. *Am J Physiol* 268 : G 849-G 856, 1995.
- 31) Akamatsu K, Imai M, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M : Disposition characteristics of glycosylated poly(amino acids) as liver cell-specific drug carrier. *J Drug Target* 6 : 229-239, 1998.
- 32) Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M : Development of a hepatocyte-specific prostaglandin E₁ polymeric prodrug and its potential for preventing carbon tetrachloride-induced fulminant hepatitis in mice. *J Pharm Exp Ther* 290 : 1242-1249, 1999.
- 33) 橋田 充, 高倉喜信 : 生体内薬物送達学. 産業図書, 東京,

- 1994.
- 34) Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM : Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genet* 6 : 335-341, 1994.
 - 35) 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 : 305-312, 2000.
 - 36) Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M : Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther* 7 : 292-299, 2000.
 - 37) Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der Smissen P, McCuskey RS : The liver sieve : considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5 : 683-692, 1985.