耐性克服を目的とした遺伝子デリバリー

特集 耐性克服とDDS

川上 茂・橋田 充*

Gene delivery system for multidrug-resistance

Multidrug resistance (MDR) is a major obstacle in cancer chemotherapy. In order to overcome the MDR, pharmacologically active compounds, designated MDR modulators or chemosensitizers, may circumvent the "classical" MDR phenotype by inhibiting the efflux pump activity of P-glycoprotein. One obstacle in applying MDR modulators arises from their commonly occurring intrinsic toxicity at doses necessary to be active, e.g. heart failure, hypotension, hyperbilirubinemia, and immunosuppression. Additionally, tumor cells can develop resistance against the applied chemosensitizers, so-called tertiary resistance. Consequently, it is necessary to develop alternative, less toxic and more efficient strategies to overcome MDR. Such an alternative procedure to circumvent P-glycoprotein mediated MDR in cancer cells is to prevent the biosynthesis of P-glycoprotein by selective blocking the expression the MDR1 mRNA.

In this article, we shall focus on the progress of novel gene therapy system against the MDR.

抗がん剤に対する耐性は、がん患者における化学療法を行ううえで非常に重要な問題である。構造的に関連性のない広範囲な抗がん剤に耐性になることを多剤耐性という。これら多剤耐性を克服する試みとして、これまでにP-糖蛋白質の薬剤結合部位と結合させる低分子医薬品による競合阻害法が検討されてきた。しかしながら、P-糖蛋白質競合剤が固有に有する生理活性による副作用の問題や耐性細胞が併用されているP-糖蛋白質競合剤に対する第3の耐性を獲得することも知られている。したがって、耐性を克服するため、従来の方法とは根本的に異なる新しい概念に基づく方法論の構築も強く望まれている。そのなかの一つに、耐性の原因となるMDR1遺伝子発現の抑制により、耐性を克服する遺伝子治療法が考案されている。この方法においては、低分子阻害剤が有する問題を有していないため、安全かつ有効な耐性克服法になることが期待されている。

そこで本稿では、がん細胞(組織)に対する遺伝子デリバリーシステムの現状について紹介するとともに、耐性克服を目的とした最新の遺伝子治療法について論述する。

Shigeru Kawakami・Mitsuru Hashida*

key words : MDR, P-glycoprotein, gene therapy, gene delivery, drug delivery system

抗がん剤に対する耐性は、がん患者における化学療法を行ううえで非常に重要な問題である。構造的に関連性のない広範囲な抗がん剤に耐性になることを多剤耐性(multidrug resistance: MDR)という。多剤耐性克服は、がんに対する化学療法を行ううえで大きな課題である。多剤耐性に関与する膜輸送蛋白として、がん細胞でのP-糖蛋白質(P-glycoprotein, PGP), MRP(multidrug resistance protein)1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, BCRPの過剰発現が知られている¹⁾。

なかでもP-糖蛋白質は、広い認識性を有し、多く

の抗がん剤に耐性を示す蛋白であることが知られている。P-糖蛋白質は、膜輸送蛋白のなかでも最も大きく多様なファミリーであるABC(ATP binding cassette)トランスポータースーパーファミリーに分類され、MDR1遺伝子によって発現する170 kDaの膜輸送蛋白であることが知られている。

一方、P-糖蛋白質が関与しない多剤耐性細胞の多くに、190kDaの膜輸送蛋白であるMRPが発現して耐性機構に関与していることが知られている。MRPもP-糖蛋白質同様、ABCトランスポータースーパーファミリーに分類され、5種のアイソフォームの存在が明らかにされている。

これらは、それぞれMRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5とよばれており、それぞれ異なる認識性に

* 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

表 1 耐性に関与する ABC トランスポーターと
その発現組織および基質となる抗がん剤

一般的名称	系統的名称	発現する組織	基質となる抗がん剤
MDR1, PGP	ABCB1	小腸, 肝臓, 腎臓, 胎盤, 血液脳関門	ドキソルビシン, ダウノルビシン, ビンクリスチン, ビンブラスチン, アクリノマイシン, パクリタキセル, エトポシド
MRP1	ABCC1	多くの組織	ドキソルビシン, エピルビシン, エトポシド, ビンクリスチン, メトトレキサート
MRP2, cMOAT	ABCC2	肝臓, 腎臓, 小腸	メトトレキサート, エトポシド, ドキソルビシン, シスプラチン, ビンクリスチン
MRP3	ABCC4	膵臓, 腎臓, 小腸, 肝臓, 副腎	エトポシド, メトトレキサート, シスプラチン, ビンクリスチン, ドキソルビシン
MRP4	ABCC4	前立腺, 精巣, 子宮	メトトレキサート
MRP5	ABCC5	多くの組織	メルカプトプリン

より, 抗がん剤への耐性に関与している。それぞれ耐性に関与する ABC トランスポーターを表 1 にまとめる。がん細胞以外では, これらのトランスポーターは表 1 に示すような正常組織において, それぞれ発現している。これら ABC トランスポーター群による多剤耐性を克服する試みとして, これまでに低分子化合物であるベラパミル, シクロスポリン A, キニジン, タモキシフェンなどが P-糖蛋白質の薬剤結合部位と結合することから, 併用された抗がん剤が P-糖蛋白質に結合するのを妨げ, P-糖蛋白質により排出されないようにする競合阻害法が検討されてきた(表 2)²⁾。

しかしながら, P-糖蛋白質競合剤が固有に有する生理活性による副作用の問題³⁾や, 耐性細胞が併用されている P-糖蛋白質競合剤に対する第 3 の耐性を獲得することも知られている。したがって, 耐性を克服するため, 従来の方法とは根本的に異なる新しい概念に基づく方法論の構築も強く望まれている。そのなかの一つに, 耐性の原因となる MDR1 遺伝子発現の抑制により, 耐性を克服する遺伝子治療法が考案されている。この方法においては, 低分子阻害剤が有する問題を有していないため, 安全かつ有効な耐性克服法になることが期待されている。

そこで本稿では, がん細胞(組織)に対する遺伝子デリバリーシステムの現状について紹介するとともに, 耐性克服を目的とした最新の遺伝子治療法について論述する。

表 2 耐性克服のための低分子医薬品

カルシウム拮抗薬
ベラパミル, ニフェジピン, ニカルジピン
抗不整脈薬
アミオダロン, キニジン
抗生物質
エリスロマイシン, セフォペラゾン
ホルモン類
タモキシフェン, プロゲステロン
その他
テルフェナジン, タクロリムス, シクロスポリン A, キニン

遺伝子導入法の現状

遺伝子を細胞へ効率的に導入するためには, 投与してから標的細胞において実際に遺伝子発現に至るまでには, ① 生体成分および非標的細胞との非特異的な相互作用, ② DNA 分解酵素による分解, ③ 標的細胞への移行, ④ エンドソームからの細胞質内への移行, ⑤ 核への移行などの過程が存在し, それぞれが遺伝子導入において障壁となりうるため, それぞれの過程を制御するための遺伝子導入ベクターが必要である。

現在, 遺伝子導入ベクターとしては, ウイルス性ベクターおよび非ウイルス性ベクターがあり(表 3), それぞれベクター系が固有に有する長所, 短所を有しているため, それぞれ改良が進められている。一過性の遺伝子発現は, 治療目的により位置づけが異なるが, 耐性克服を目的とした遺伝子治療の場合

表 3 遺伝子導入ベクターの種類と特徴

	長 所	短 所
ウイルスベクター アデノウイルス	高い導入効率 非分裂細胞への導入可 一過性の遺伝子発現	免疫反応性 細胞傷害性 一過性の遺伝子発現
レトロウイルス	染色体への組込み (安定長期発現)	非分裂細胞へ導入不可 染色体への組込みによる変異 (がん化の可能性)
非ウイルスベクター カチオン性リポソーム カチオン性ポリマー	安全性 経済性、簡便性 一過性の遺伝子発現	低い導入効率 一過性の遺伝子発現

は、長所と考えられる。現在、耐性克服に向けた遺伝子治療の基礎実験は培養細胞を用いた *in vitro* で検討が多いため、ベクターとしてはどちらでも用いることが出来るが、臨床において耐性克服を目的に用いられる場合、遺伝子医薬品を直接体内へ注入により、がん組織へターゲティングする方法が重要となってくるため、より厳密なドラッグデリバリーシステムの概念に基づくキャリア開発が望まれている。

ウイルスベクターは、ウイルスの持つ感染機構を利用しているため遺伝子導入効率が高い反面、毒性も強く、ウイルスに起因するとされる免疫性ショック死(1999年、米国)や白血病発症(2002年、フランス)などの事例も報告されている。したがって、ウイルスベクターの場合、免疫細胞への認識をされないような DDS 技術の開発が重要である。さらに、ウイルスベクターにおいても標的細胞へ選択的に遺伝子発現させるためのターゲティング技術の開発も重要である。

一方、非ウイルスベクターは、生産性、経済性、汎用性、さらに、ウイルス自体が固有に有する毒性を有していないため、安全性もすぐれており、臨床応用が期待されている。非ウイルスベクターにおいては、*in vivo* における遺伝子導入効率の低さが問題であったが、近年の研究の成果により、たとえば、カチオン性リポソームの場合は脂質組成、複合体の電荷、カチオン性ポリマーの場合は使用するポリマーの種類や分子量、複合体の電荷、などといった因子の最適化により、遺伝子導入効率を大きく改善

できることが明らかとなった。

一方、これらキャリアは正電荷による非特異的な相互作用による遺伝子導入法であるため、ウイルスベクターと同様、標的細胞へ選択的に遺伝子発現させるためのターゲティング技術の開発も重要である。これには、標的細胞表面に過剰に発現するレセプターのリガンドとなる分子をパイロット分子としてキャリアに導入する方法が有用である。

筆者らは、ガラクトースやマンノースなどの糖鎖をカチオン性リポソームに導入することで、これらをリガンドとして認識するレセプターが、発現する肝実質細胞⁴⁾やマクロファージ⁵⁾へ *in vivo* において細胞選択的に遺伝子導入することに成功している。一方で、多剤耐性克服のための遺伝子治療のためには、同様の戦略で標的となるがん細胞に対して、親和性を有するリガンドをパイロット分子としてキャリアシステムに導入し、がん細胞指向性を付与する必要がある。

がん細胞への認識能を有する遺伝子導入キャリアの作製に関しては、これまでの検討により、葉酸⁶⁾、トランスフェリン⁷⁾などのリガンドをカチオン性リポソームまたはカチオン性ポリマー(ポリエチレンイミン)へ導入することで、がん細胞表面において過剰発現しているそれぞれのレセプターを介して細胞選択的に導入する方法が検討されており、キャリアとプラスミド DNA との複合体を形成させることにより、*in vivo* でのがん細胞選択的な遺伝子導入に成功している。耐性克服における遺伝子治療の場合、遺伝子発現を抑制するためのオリゴヌクレオチドを

同様の戦略によりデリバリーできるものと考えられる。

しかしながら、プラスミド DNA の *in vivo* デリバリーにおけるがん細胞での遺伝子発現レベルは、必ずしも充分であるとはいえず、より効率的なキャリアシステムの開発は、今後非常に重要である。

アンチセンス法を用いた耐性克服

耐性克服のための遺伝子治療法としてはアンチセンス法による試み、つまり、MDR1 遺伝子の抑制法が検討されている。MDR1 遺伝子の抑制には、リボザイム、アンチセンス DNA/RNA、siRNA を用いるアンチセンス法が用いられている。

リボザイム法は、相補的な mRNA の切断活性を有する RNA 分子であり、標的 mRNA に対するアンチセンス部分と切断活性を担う活性部分により構成される。アンチセンス DNA/RNA 法としては、標的 mRNA に相補的な塩基配列を持つアンチセンスオリゴヌクオチドとアンチセンス遺伝子によって発現されるアンチセンス RNA を用いて、mRNA からの転写を阻害することで標的遺伝子の発現を抑制するものである。

RNA 干渉法(RNAi)法は、二本鎖 RNA によってその配列特異的に mRNA が分解され標的遺伝子の発現を抑制する方法であり、近年、21 塩基の二本鎖 RNA である siRNA を用いる方法が哺乳類動物細胞へ適用されるようになって、その配列特異性の高さと発現抑制効果の高さにより非常に注目されている⁸⁻¹⁰⁾。特に、ポストゲノム時代にあり、siRNA に代表される遺伝子発現抑制技術の進歩は、臨床における遺伝子治療を大きく進展させるものであると期待されている。

ここでは、*in vitro* もしくは動物において *ex vivo* で基礎検討されているアンチセンス法を用いた MDR1 遺伝子の抑制による耐性克服の試みに関して、最新の知見を論述する。

1. リボザイム法を用いた耐性克服法

リボザイムを用いた方法に関しては、MDR1 遺伝子に対する抑制による耐性克服が検討されている。

Kobayashi らは、MDR1 遺伝子に対するリボザイムをレトロウイルスベクターによるシステムにより導入したリボザイムの安定発現株を用いて、耐性克服の評価を行っている^{11,12)}。

ヒト急性白血病細胞株である MOLT-3 の耐性株である MOLT-3/TMQ₈₀₀細胞に対して、MDR1 遺伝子に対するリボザイム発現レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、G418 によるセクションにより、安定発現株を樹立した。この安定発現株において、MDR1 mRNA レベルの有意な減少、ならびに P-糖蛋白質の有意な減少が確認された。また、耐性に関して評価したところ、ビンクリスチンへの感受性が約 6 倍高まっていることが明らかとなった。また、ヒトリンパ球細胞株においても同様の結果であることも見いだしている。以上、安定発現株を用いた検討により、MDR1 遺伝子に対するリボザイムの導入により、耐性を克服できることが示された。

In vivo での遺伝子治療の可能性を検討するためには、アデノウイルスや非ウイルスベクターを用いた一過性の遺伝子発現により、治療を実現させる必要がある。Masuda らは 1998 年に、リボザイムをプラスミド DNA で発現できるシステムを構築し、カチオン性リボソームである DOTAP リボソームとの複合体を用いて MDR1 遺伝子の抑制を試みた¹³⁾。ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 の耐性株 MCF-7/R(親株にくらべ 170 倍ドキソルピシンへの感受性が低い)に対して、MDR1 遺伝子に対するリボザイムを導入したところ、リボザイム導入細胞において MDR1 mRNA の有意な低下が認められ、また、このリボザイム発現細胞では、ビンクリスチンに対して約 10~100 倍もの感受性の増加が認められた。

同様に Huesker らは、リボザイム発現アデノウイルスベクターにより、リボザイムを肝がん細胞株である HB8065 の耐性株 HB8065/R へ導入することにより、併用したエピルピシンまたはドキソルピシンへの感受性をそれぞれ 60 および 20 倍高めることに成功している¹⁴⁾。

2. アンチセンス DNA/RNA 法を用いた耐性克服法

アンチセンス DNA/RNA を用いた種々の疾患に対する遺伝子治療法は、すでに欧米では臨床開発が進んでおり、今後の医療分野において広く使われていくものと期待されている。一方で、日本での開発は非常に遅れているのが現状である。アンチセンス DNA/RNA を用いた方法に関しても、MDR1 遺伝子に対する抑制による耐性克服が検討されている。

1998 年 Motomura らは、ヒト myelogenous 急性白血病細胞株である K562 のアドリアマイシン耐性株 K562/ADM に対して、MDR1 遺伝子に対するアンチセンス DNA をカチオン性リポソームである Transfectam と複合体を形成させて遺伝子導入することで、P-糖蛋白質の発現レベルが 26% まで抑制され、ダウノルビシンに対する感受性が約 6 倍上がることを報告した¹⁵⁾。また、Chan らは、ヒト急性白血病細胞に対して、MDR1 遺伝子に対するアンチセンス DNA を導入させることで、ダウノルビシンに対する感受性が 3~6 倍上がることを報告している。

同様に、MDR1 遺伝子に対するアンチセンス RNA をカチオン性リポソームである Lipofectamine を用いて、ヒト肝がん由来細胞株 HepG 2 の多剤耐性株である HepG 2/DR 導入することで、P-糖蛋白質の発現抑制が可能であり、これら遺伝子導入細胞では耐性株に比べ、ドキソルビシン、ビンクリスチン、メトトレキサートに対する感受性がそれぞれ、約 2~6 倍上がることを報告されている¹⁶⁾。

MDR1 遺伝子に対するアンチセンス DNA の効果を改善するための試みとして、Alahari らはオリゴヌクレオチドのチオエート体を基本骨格とし、リボース環中の 2' 部位へメトキシエトキシ基を導入させた化学修飾型オリゴヌクレオチドを用い、カチオン性リポソームである Lipofectin や樹状カチオン性高分子である dendriamer と複合体を形成させることで、より効果的な P-糖蛋白質の発現抑制が可能であることを報告している¹⁷⁾。このように、オリゴヌクレオチドの化学修飾も効果改善の有益な手法と考えられ、化学修飾法に関する系統的な研究が望まれる。

3. RNA 干渉法を用いた耐性克服法

siRNA は遺伝子に対して比較的簡単にデザインできて、その標的遺伝子の抑制効果が高いことから¹⁰⁾、耐性克服を目的とした遺伝子治療法においても MDR1 遺伝子の抑制が検討されている。また、同じく標的 mRNA 分解を作用とするリボザイムは、プラスミド DNA やウイルスベクターを用い、細胞内にて遺伝子発現させる必要があったが、RNAi を引き起こす siRNA などはベクター系に組み込まず、そのままカチオン性リポソームとの複合体を形成させ用いることも出来る。

2003 年に Nieth らは、MDR1 遺伝子に対する RNAi となる 2 種類の siRNA をデザインし、siRNA とカチオン性リポソームであるオリゴフェクトアミンを用いて複合体を形成させ遺伝子導入を行った¹⁸⁾。ヒトすい臓がん由来細胞株 EPP85-257P およびヒト胃がん由来細胞株 EPG85-181-P の耐性株である EPP85-257RDP, EPG85-181-RDP に対して、MDR1 遺伝子の発現を mRNA レベルで評価したところ、mRNA の抑制ならびに P-糖蛋白質の低下が認められた。また、siRNA 導入細胞ではダウノルビシンに対する感受性が約 2~8 倍上がったことが報告されている。

同時に彼らは、MDR1 に対するアンチセンス DNA 法も同時に評価しているが、RNA 干渉法のほうが耐性克服効果が強いことを示しており、RNA 干渉法の有用性を示している。この結果は、先ほどの Grünweller ら¹⁰⁾によるアンチセンス DNA と siRNA とを比較した検討ともよく一致する。Wu らも同様に、MDR1 に対する RNAi となる siRNA とオリゴフェクトアミンを用いて複合体を形成させ、siRNA 導入細胞での耐性克服を報告している¹⁹⁾。

一方、プラスミド DNA を用いて MDR1 に対する RNAi となる siRNA を発現させる試みも検討されている。この場合、より長期間での siRNA の発現の持続が可能になると考えられる^{20,21)}。

最近、Yagüe らは、上記の RNA 発現プラスミド DNA を構築し、エレクトロポレーション法を用いて白血病細胞 K562 のドキソルビシン耐性株に遺伝子導入し、G418 によるセクションにより、MDR1 に対する RNAi となる short hairpin (sh) RNA の安

定発現株を樹立した。その結果、安定発現株ではドキソルビシンへの感受性が約 45~56 倍上がることを報告している²²⁾。

結 論

耐性を克服するうえで、耐性遺伝子の発現を抑制する遺伝子治療法の有用性が示された。*In vivo*において、オリゴヌクレオチドをがん細胞選択的に送達させるための遺伝子デリバリーキャリアの開発により、耐性克服の遺伝子治療も可能になると考えられる。

遺伝子治療を実現していくためには、遺伝子導入ベクターの種類を問わず、DDS が非常に重要である。特に、全身投与における遺伝子導入法に関しては、さまざまな障壁があり、複合体の物性、体内動態、細胞内動態などの各プロセスの制御を可能にしなければならない。今後すぐれた遺伝子デリバリーキャリアの開発により、耐性克服における遺伝子治療が実現できることを期待したい。

文 献

- Gottesman M, Fojo T, Bates SE: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev* 2: 48-58, 2002.
- Fisher GA, Lum BL, Hausdorff J, Sikic BI: Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32: 1082-1088, 1996.
- Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, Grogan TM, Laufman LR et al.: A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. *Cancer* 75: 815-820, 1995.
- Fumoto S, Kawakami S, Ito T, Shigeta K, Yamashita F et al.: Enhanced hepatocyte-selective *in vivo* gene expression by stabilized galactosylated liposome/plasmid DNA complex using sodium chloride on complex formation. *Mol Ther* 10: 719-729, 2004.
- Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M: Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannoseylated cationic liposomes. *Gene Ther* 7: 292-299, 2000.
- Reddy JA, Abburi C, Hofland H, Howard SJ, Vlahov I et al.: Folate-targeted, cationic liposome-mediated gene transfer into disseminated peritoneal tumors. *Gene Ther* 9: 1542-1550, 2002.
- Kirchels R, Wightman L, Schreiber A, Robitzka B, Rossler V et al.: Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther* 8: 28-40, 2001.
- Elbashir SM, Harboth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K et al.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001.
- Hanson GJ: RNA interference. *Nature* 418: 244-251, 2002.
- Grünweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA et al.: Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucl Acid Res* 31: 3185-3193, 2003.
- Kobayashi H, Takemura Y, Wang FS, Oka T, Ohnuma T: Retrovirus-mediated transfer of anti-mdr1 hammerhead ribozymes into multidrug-resistant human leukemia cells: screening for effective target site. *Int J Cancer* 81: 944-950, 1999.
- Wang FS, Kobayashi H, Liang KW, Holland JF, Ohmura T: Retrovirus-mediated transfer of anti-MDR1 ribozymes fully restores chemosensitivity of P-glycoprotein-expressing human lymphoma cells. *Hum Gene Ther* 10: 1185-1195, 1999.
- Masuda Y, Kobayashi H, Holland JF, Ohnuma T: Reversal of multidrug resistance by a liposome-MDR1 ribozyme complex. *Cancer Chem. Pharmacol* 42: 9-16, 1998.
- Huesker M, Folmer Y, Schneider M, Fulda C, Blum HE et al.: Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology* 36: 874-884, 2002.
- Motomura S, Motoji T, Takanashi M, Wang YH, Shiozaki H et al.: Inhibition of P-glycoprotein and recovery of drug sensitivity of human acute leukemic blast cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense oligonucleotides. *Blood* 91: 3163-3171, 1998.
- Chan JYW, Chu ACY, Fung KP: Inhibition of P-glycoprotein expression and reversal of drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense RNA. *Life Sci* 67: 2117-2124, 2000.
- Alahari SK, DeLong R, Fisher MH, Dean NM, Villet P et al.: Novel chemically modified oligonucleotides provide potent inhibition of P-glycoprotein expression. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 419-428, 1998.
- Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H: Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 545: 144-150, 2003.
- Wu H, Hait WN, Yang JM: Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (p-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 63: 1515-1519, 2003.
- Miyagishi M, Taira K: U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnol* 20: 497-500, 2002.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553, 2002.
- Yagüe E, Higgins CF, Raguz S: Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther* 11: 1170-1174, 2004.