エクソソームを含む細胞外小胞の体内動態

Tissue Distribution of Exosomes and Other Extracellular Vesicles

二神 岳

東京理科大学薬学部
〒278-8510
千葉県野田市山崎 2641

Gaku FUTAGAMI
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tokyo University of Science
2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510

草森 浩輔

東京理科大学薬学部
〒278-8510
千葉県野田市山崎 2641

Kosuke KUSAMORI
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tokyo University of Science
2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510

西川 元也

東京理科大学薬学部
〒278-8510
千葉県野田市山崎 2641

Makiya NISHIKAWA
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tokyo University of Science
2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510

論文要旨：エクソソームは、脂質二重膜で覆われたナノサイズの細胞外小胞（EVs）であり、その中には核酸やタンパク質、脂質など、エクソソームを産生する細胞固有の物質が含まれる。エクソソームを含むEVsの様々な生理的状態や疾患との関連性の深さから、幅広い疾患において診断あるいは治療用のツールとしてのEVsの応用が期待されている。しかしながら、EVsは産生される細胞の起源やそのサブタイプによって体内動態が異なることが報告されていることから、個々のEVsの体内動態特性を理解することは極めて重要である。そこで、EVsの体内動態の解明や治療効果向上に向けた体内動態制御、さらには低分子化合物やタンパク質、核酸などの様々な薬物のデリバリーキャリアとしての適用拡大を目的とした研究が盛んに行われている。本稿では、エクソソームを含む直径100 nm程度のsmall EVsに焦点を当て、標識方法を含むEVsの体内動態と、その制御方法および制御技術に関するこれまでの研究報告を紹介する。

Abstract: Exosomes are lipid bilayer-enclosed, nano-sized extracellular vesicles (EVs) which contain fingerprints of the cells that produce them, e.g., nucleic acids, proteins and lipids. Based on the close relationship of EVs including exosomes to various physiological and pathogenic conditions, EVs are expected to be applied to a wide range of diseases as diagnostic or therapeutic tools. Since EVs are known to exhibit diverse tissue distribution depending on their cell of origin and their subtypes, it is quite important to understand the tissue distribution properties of individual EVs. Therefore, researchers have been trying to elucidate the tissue distribution of EVs and to control it to increase the therapeutic potential of EVs as well as to expand their application as delivery vehicles for various pharmaceuticals, including low molecular weight compounds, proteins, and nucleic acids. In this review, we focus on small EVs with a diameter of about 100 nm, which include exosomes, and discuss about their tissue distribution, including their labeling methods, and approaches and technologies how to control it.

Key words: extracellular vesicle, exosome, tissue distribution, drug delivery

1 はじめに

細胞外小胞 (EVs) は、細胞が分泌する脂質膜で構成された直径がナノサイズの粒子の総称である。EVs には、EVs を産生した細胞に由来する様々なタンパク質や核酸が含まれていて、EVs が受容細胞に取り込まれることで細胞間情報伝達が行われることが明らかにされている¹⁾。近年の EVs 研究により、がんをはじめとする様々な疾患における EVs の関与が明らかとされ、EVs を基盤とした疾患の診断法あるいは治療法の開発が期待されている。EVs に内包された機能性分子を利用した疾患治療の検討においては、間葉系幹細胞 (MSC) 由来の EVs が炎症性疾患に治療効果を示すなど²⁾、細胞治療の代替としての利用も報告されている。また、EVs は細胞が産生する非人工的なナノ粒子であることから生体適合性が高く、EVs の内部に薬物を包入することで、EVs を薬物送達キャリアとして利用する治療法の開発に対する期待も大きい。そこで本稿では、これまでに報告されている EVs を分類するとともに、EVs の体内動態規定因子や体内動態、細胞取り込みを評価するための標識方法を整理し、体内動態特性と体内動態制御に関する報告を紹介する。

2 EVs の分類

EVs は、細胞が分泌する脂質膜で構成された小胞の総称であり、それぞれの名称は粒子サイズや細胞からの分泌様式・経路に基づいて分類される (Fig. 1)。まず、細胞からの分泌様式・経路によってエクソソームとマイクロベシクルの2つに大別される。エクソソームは粒子径が 30-100 nm であり、エンドソームコンパートメントから分泌される³⁾。より詳細には、多胞性のエンドソーム (multivesicular body : MVB) 内に形成された腔内膜小胞 (intraluminal vesicle : ILV) が由来とされており、MVB の成熟後、MVB 膜が細胞膜と融合することによって MVB 内の ILV がエクソソームとして細胞外へ分泌される。これに対して、マイクロベシクルは細胞膜から出芽 (budding) することで細胞外へ分泌される小胞であり、そのサイズは 50-1,000 nm と比較的大きなものを含む⁴⁾。これら以外の EVs として、アポトーシス細胞が急速に断片化されることで形成される 1-5 μm ほどのサイズのアポトーシス小体がある。

これらの EVs を回収する方法として、遠心力を利用して分離する超遠心法がゴールドスタンダードとしてこれまで用いられてきた⁵⁾。しかしながら、超遠心法では粒子径の類似したエクソソームとマイクロベシクルの分離は困難である。Zhang らは、非対称フロー式フィー

ルド・フロー・フラクシオネーション法を用いることで EVs を細かい粒子径で分別することに成功し、35 nm 以下の脂質二重膜に囲まれていない粒子をエクソメア (exomere)、60-80 nm の粒子を small exosome (Exo-S)、90-120 nm の粒子を large exosome (Exo-L) と名付けた⁶⁾。さらに、これらサイズの異なる粒子は、表面電荷や構成脂質、内包する生理活性物質が異なることも報告している。EVs のサイズや表面電荷、膜タンパク質の違いは EVs の体内動態を決定する要因であることから、これらの EVs は、それぞれ固有の体内動態を示すことが推測される。したがって、EVs の体内動態を正確に評価するに当たっては EVs の分離が重要である。また、回収した EVs は、粒子径に加えてマーカー分子の有無によって同定することが必要である。これまでに報告されているエクソソームマーカーには、CD9、CD63、CD81 などのテトラスパニンや熱ショックタンパク質 HSP70、多胞体関連タンパク質 Alix などがある⁷⁾。一方、マイクロベシクルのマーカーとしては CD40 などが用いられてきた。しかしながら、複雑なナノ粒子の集合体である EVs を厳密に分類することができるマーカー分子は現時点では存在しない。

3 EVs の体内動態を規定する因子

EVs の膜表面には様々なタンパク質や糖鎖があり、それらの構成が EVs の体内動態を規定することが報告されている。これは、異なる細胞由来の EVs が固有の体内動態を示すことや⁸⁾、EVs をプロテアーゼで処理することで静脈内投与後の組織分布が変化し、血中クリアランスが遅延するといった報告⁹⁾からも裏付けられている。例えば、がん細胞由来の EVs は転移組織への移行性が高く、がん微小環境の形成に関与することが報告されている^{10, 11)}。Hoshino らは、がん細胞由来 EVs が他の組織と比較して、肺などの転移巣が形成される組織に移行しやすいことを見出し、この移行に EVs 膜に発現するインテグリンが関与することを報告している¹²⁾。また、マウスに静脈内投与されたがん細胞由来 EVs は、マクロファージのアポトーシスを誘導するクロドロネートリボソームの投与により血中からの消失が遅延することが報告されており、マクロファージが EVs の血中濃度を調節する重要な因子の一つと考えられている^{13, 14)}。また、特定のがん細胞由来 EVs は、表面に CD47 があることでマクロファージによる取り込みが回避されることが報告されており、さまざまな組織への移行性が上昇することが示唆されている^{15, 16)}。

マクロファージが、EVs をはじめとするナノ粒子を認識する要因としては、その粒子径や形状が重要である

と報告されている¹⁷⁾が、これに加えてリン脂質の関与も報告されている¹⁸⁾。フォスファチジルセリン(PS)は、生細胞ではフリッパーゼと呼ばれる酵素の働きによって脂質二重膜で構成される細胞膜の内側に局在しているが、死細胞ではフリッパーゼが機能しないことで細胞膜の外側にも分布する。このPSが、マクロファージの膜表面に発現するTim4タンパク質に認識されることでEVsがマクロファージに取り込まれることが報告されている¹⁹⁾。また、PSやフォスファチジルグリセロールで構成された負電荷のリボソームがマクロファージによるEVsの取り込みを競合阻害したのに対し、フォスファチジルコリンで構成された電氣的に中性のリボソームは競合阻害しないことも報告されている¹⁸⁾。このことから、リン脂質の構成に加えて、EVsの電荷もマクロファージによる取り込みに重要であることが示唆される。

4 EVsの標識法と体内動態評価への応用

EVsの主な標識法とその特徴をTable 1に示す²⁰⁾。それぞれの標識法で標識されたEVsを用いてEVsの体内動態が評価されてきた。具体的には、ルシフェラーゼなどに代表される生物発光を利用した画像解析(bioluminescence imaging: BLI)や蛍光分子標識による画像解析(fluorescent imaging: FI)、放射性同位体の利用や核磁気共鳴画像法(MRI)などが挙げられる。中でも、BLIやFIはEVsの体内動態評価に数多く用いられている。BLIの特長は検出感度が高いことであり、発光シグナルに対するバックグラウンドが低いことから、非侵襲的なEVsの*in vivo*イメージングに汎用されている。一方で、BLIの場合、空間分解能が低いことに加えて、EVsの検出には発光基質を投与する必要があることから、時間分解能が低いことが欠点である^{21, 22)}。BLIを目的としたEVsの標識には、EVsマーカーのCD63やEVs膜構成脂質のPSに高親和性を有するラクトアドヘ

リン(LA)が利用されている。マウス血液由来EVsにLA融合Gaussia ルシフェラーゼ(Gluc)を添加することで、EVsをGlucで標識できることが示されている。GFP(green fluorescent protein)などの蛍光タンパク質を用いたFIは、BLIと比較して空間分解能が非常に高い反面、励起光および蛍光の生体透過性が低いことから非侵襲的なEVsの*in vivo*イメージングには利用できないことが欠点とされる。そこで、生体透過性の高い励起光および蛍光が利用可能な近赤外蛍光シアニン色素DiRなどを用いることで、組織深部に存在するEVsの*in vivo*イメージングが可能となる。しかしながら、DiRを利用したFIも、BLIと同様に空間分解能および時間分解能が低いことが課題とされる^{19, 20)}。また、蛍光分子は、標識したEVsから解離したり、EVsが分解された後も検出される可能性があり、EVsの血中半減期や体内動態を評価する際に正確なデータが得られない点に注意が必要である²³⁾。さらに、親油性蛍光色素PKHなどを用いた標識の場合は、色素同士のミセル形成や標識EVsが凝集体を形成する可能性があり、標識EVsの粒子径や物性に影響を与える点にも注意が必要である²⁴⁾。最近では、Anthonyらが生物発光共鳴エネルギー移動(bioluminescence resonance energy transfer: BRET)を用いて、NanoLuc ルシフェラーゼによる励起エネルギーを利用したGFPのBRET蛍光で非侵襲的なEVsの*in vivo*イメージングに成功するなど²⁵⁾、高感度EVs検出法の開発が現在も盛んに行われている。

上記の標識法で標識したEVsを用いて評価したEVsの体内動態に関する報告をTable 2に整理した^{20, 26-33, 36)}。EVsを産生する細胞については、SV40 Large T抗原を発現するヒト胎児腎細胞株HEK293T細胞が多くの文献で使用されており、疾患治療への応用が期待されている間葉系幹細胞や転移組織への移行性が報告されているがん細胞なども多く用いられている。静脈内投与後の

Table 1 EVsの標識方法

検出方法	代表例	利点*	欠点**
生物発光タンパク質	ルシフェラーゼ(NLuc, Gluc)	・検出感度↑↑↑ ・シグナルーノイズ比↑↑	・空間分解能↓ ・時間分解能↓
近赤外蛍光色素化合物	DiR	・検出感度↑ ・組織浸透↑	・空間分解能↓ ・時間分解能↓
蛍光タンパク質	GFP	・検出感度↑ ・空間分解能↑↑↑	・組織浸透↓
放射性同位体	¹¹¹ In	・検出感度↑↑ ・組織浸透↑↑↑	・空間分解能↓
核磁気共鳴	超常磁性酸化鉄	・時間分解能↑↑↑ ・組織浸透↑↑↑	・検出感度↓

*↑↑↑ 非常に良い, ↑↑ 良い, ↑ 中程度。**↓ 悪い。

Table 2 EVsの体内動態

標識体	EVs由来細胞	適用マウス	投与経路 (投与量)	分布・移行組織	文献
生物発光					
Renilla luciferase (Rluc)	ヒト甲状腺がん CAL-62 細胞 ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞	BALB/c	静脈内 (25 µg)	CAL62 (Rluc) : 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓 CAL62 (Rluc+DiR) : 肝臓, 肺, 脾臓 MDA-MB-231 : 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓	26
Gluc	ヒト胎児腎 HEK293T 細胞	Athymic nude	静脈内 (100 µg)	脾臓, 肝臓, 肺, 腎臓, 脳, 心臓, 筋組織	27
Gluc	マウスメラノーマ B16-BL6 細胞	BALB/c	静脈内 (5 µg)	肺, 脾臓, 腎臓, 肝臓, 心臓, 脳, 小腸	28
蛍光					
DiR	ヒト臍帯由来 MSC	K7M2 (骨肉腫細胞) 移植 nude	静脈内 (5 mg/kg)	脾臓, 肝臓, がん組織, 肺, 腎臓, 脳, 心臓	29
DiR	骨髓由来 MSC	C57BL/6	腹腔内 (8×10^9 particles)	肝臓, 脾臓, 痔臓	30
PKH67	骨髓由来 MSC	TUBO (乳がん細胞) 移植 BALB/c	静脈内 (30 µg)	がん組織, 脾臓, 腎臓, 肝臓, 肺	31
DiR	ヒト胎児腎 HEK293T 細胞	NMRI C57BL/6	静脈内 腹腔内 皮下	静脈内 : 肝臓, 消化管, 脾臓, 肺, 痔臓 腹腔内 : 肝臓, 消化管, 痔臓, 脾臓, 肺 皮下 : 消化管, 肝臓, 痔臓, 肺, 脾臓	36
放射性同位体					
^{111}In	マウスメラノーマ B16-F10 細胞	B16-F10 移植 C57BL/6・NSG	静脈内 (1×10^{11} particles)	肝臓, 脾臓, 骨, 腎臓, 肺	32
MRI					
金ナノ粒子	ヒト MSC	C57BL/6	静脈内 (2.8×10^9 particles)	肝臓, 脾臓, 腎臓, 甲状腺, 胃, 肺	33

Table 3 EVsの体内動態制御技術

修飾法	EVs由来細胞	修飾分子	体内動態	文献
EVs膜タンパク質への修飾				
アミノ基-アルデヒドの相互作用	骨髓間質細胞	BMSC 標的アプタマー	・骨への蓄積増加 ・骨粗鬆症モデルマウスへの骨再生効果	38
NOTA	マウス乳がん 4T1 細胞	PEG	・肝クリアラシスの減少 ・24 時間後の腫瘍部位への取り込み向上	39
EVs膜への化学的修飾				
DSPE	ウシ血清	PEG-mannose	・マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞への取り込み増加 ・リンパ節への蓄積増加 (<i>in vivo</i>)	40
Click chemistry	マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞	RGERPPR peptide (ニューロロピリン 1 受容体標的ペプチド)	・BBB を通過して, 神経膠腫細胞を標的化 ・神経膠腫のマウスモデルでの生存率改善	41
EVs脂質への修飾				
DMPE-PEG-streptavidin (DPS) cloak, C1C2 domain	心臓由来 CDC 細胞	筋組織標的ペプチド 虚血組織標的ペプチド	・筋組織標的ペプチド : 筋芽細胞への取り込み増加 ・虚血組織標的ペプチド : 虚血性心筋への取り込み増加	44

Fig. 1 EVs の分泌経路

EVs の体内動態に共通する点は、肝臓や脾臓、肺への高い集積性である。Gupta らは、CD63 を介して ThermoLuc ルシフェラーゼを標識した HEK293T 細胞由来 EVs の静脈内投与後の体内動態を BLI により評価し、EVs が投与後 30 秒以内に肺へ集積し、60 秒後には肝臓へ、90 秒後には脾臓へ移行することを報告した³⁴⁾。この結果から、静脈内投与後の EVs は、90 秒以内に主要な組織に移行することが示されている。これは、LA を介して Gluc で標識したマウスメラノーマ B16-BL6 細胞

由来 EVs を静脈内投与した際の血中半減期が 1~2 分と非常に短く、投与後速やかに血中から消失する結果と一致している³⁵⁾。また、EVs の体内動態は投与経路に依存して大きく変動することが示されている。これまでの報告の多くでは静脈内投与後の EVs の体内動態が評価されているが、Wiklander らは、静脈内投与に加えて腹腔内あるいは皮下投与した DiR 標識 HEK293T 細胞由来 EVs の体内動態を評価している³⁶⁾。その結果、静脈内投与した場合と比較して、腹腔内投与した場合には EVs の肝臓や脾臓への移行性が低下し、脾臓や消化管への移行が増大することが示されている。また、皮下投与した場合も、EVs の肝臓や脾臓への移行の低下と、消化管への移行の増大が認められた。したがって、EVs の体内動態は投与経路に大きく依存すると考えられる。

5 EVs の体内動態制御技術

これまでの報告から、EVs は様々な組織を標的とした疾患治療に利用できる可能性が示されており、EVs を産生する細胞や投与経路を選択することで治療効果を向上できる可能性も考えられる。しかしながら、EVs のより効率的な送達や特定の臓器や細胞への標的化には、EVs の体内動態を制御する技術が必要である。EVs の体内動態制御技術に関する報告を Table 3 に整理した^{37-41, 44)}。

EVs の体内動態制御技術は、その多くが EVs の膜表面を分子で修飾する方法であり、EVs の血中滞留性の

Fig. 2 EVs の表面分子と修飾方法

向上あるいはEVsの標的組織への効率的な送達が報告されている。EVsの血中滞留性を向上させる方法には、EVs膜をポリエチレングリコール(PEG)で修飾する方法がある。PEGは親水性ポリマーであり、静脈内に投与したナノ粒子の血中滞留性を向上させることが報告されており、リポソーム製剤などに応用されている。Kooijmansらは、EVsをPEGで修飾することにより細胞との非特異的な相互作用を抑制し、EVsの血中滞留性が向上することを報告した⁴²⁾。しかしながら、EVsのPEG化は細胞取り込みや、細胞に取り込まれた後のエンドソームからの脱出を抑制する可能性がある⁴³⁾ことから注意が必要である。

EVs膜をリガンドで修飾する方法についても数多く報告されており、代表的なものをFig. 2に整理した。1つ目は、LAなどに代表されるタンパク質とEVs膜との相互作用を利用した修飾である。この方法は、EVsの体内動態評価を目的としたGlucなどのレポータータンパク質修飾にも用いられている。Antesらは、CSTSMKACの3回繰り返し配列からなる虚血組織標的ペプチドとLAのC1C2ドメインとの融合タンパク質をHEK293細胞由来EVsに修飾することで、心臓の虚血部位へのEVsの移行性が増大することを報告した⁴⁴⁾。2つ目は、LAMP2bなどに代表されるEVs膜タンパク質を介した修飾である。この方法は、標的分子を膜タンパク質のN末端側またはC末端側のどちらかに修飾するかにより、修飾分子の膜に対する配向性を選択することが可能である。Kimらは、心筋標的ペプチドとLAMP2bとの融合タンパク質をHEK293細胞に導入することで、EVs膜の外側を心筋標的ペプチドで修飾することに成功し、これにより静脈内投与後のEVsの心臓への移行が15%上昇することを報告した⁴⁵⁾。これらの報告から、EVsに発現する膜を利用することで、EVs標的分子で効率的に修飾できることが示されている。3つ目の方法として、クリックケミストリーなどの化学反応を用いた修飾が挙げられる。前述の2つの修飾法に応用可能な分子がペプチドやタンパク質などに限定されるのに対し、化学反応を介した修飾は糖などにも適応可能であり、より広範囲な標的分子を修飾することが可能である。

6 おわりに

本稿では、EVsの体内動態評価やその制御法に関する研究の現状を網羅的に整理した。EVsの体内動態に関しては現在までに数多くの報告があるものの、そのほとんどは体外から投与したEVsに関するものである。将来的には、EVsと疾患との関連性をより詳細に解明するために、内因性EVsの体内動態についても明らか

にする必要があると考える。

文 献

- 1) El Andaloussi, S. *et al. Nat. Rev. Drug*, **12**, 347-357 (2013).
- 2) Harrell, C. R. *et al. Cells*, **11**, 1605 (2019).
- 3) van der Pol, E. *et al. Pharmacol. Rev.*, **64**, 676-705 (2012).
- 4) Niel, V. *et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 213-228 (2018).
- 5) Li, P. *et al. Theranostics*, **26**, 789-804 (2017).
- 6) Zhang, H. *et al. Nat. Cell Biol.*, **20**, 332-343 (2018).
- 7) Lötval, J. *et al. J. Extracell. Vesicles*, **3**, 26913 (2014).
- 8) Wiklander, O. P. B. *et al. J. Extracell. Vesicles*, **4**, 1-13 (2015).
- 9) Charoenviriyakul, C. *et al. Mol. Pharm.*, **15**, 1073-1080 (2018).
- 10) Wortzel, I. *et al. Dev. Cell*, **6**, 347-360 (2019).
- 11) Steinbichler, T. B. *et al. Semin. Cancer Biol.*, **44**, 170-181 (2017).
- 12) Hoshino, A. *et al. Nature*, **527**, 329-335 (2015).
- 13) Charoenviriyakul, C. *et al. Eur. J. Pharm. Sci.*, **96**, 316-322 (2017).
- 14) Imai, T. *et al. J. Extracell. Vesicles*, **9**, 26238 (2015).
- 15) Lian, S. *et al. Onco. Targets Ther.*, **4**, 9105-9114 (2019).
- 16) Kamerkar, S. *et al. Nature*, **546**, 498-503 (2017).
- 17) Allen, T. M. *et al. Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 56-64 (1991).
- 18) Matsumoto, A. *et al. J. Pharm. Sci.*, **106**, 168-175 (2017).
- 19) Sims, B. *et al. Int. J. Nanomedicine*, **12**, 4823-4833 (2017).
- 20) Yi, Y. W. *et al. Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 665 (2020).
- 21) Cassidy, P. *et al. J. R. Soc. Interface*, **2**, 133-144 (2005).
- 22) Youn, H. *et al. Immune. Netw.*, **12**, 223-229 (2012).
- 23) Reisch, A. *et al. Small*, **12**, 1968-1992 (2016).
- 24) Mehdi, D. *et al. Sci. Rep.*, **12**, 9533 (2020).
- 25) Anthony, Y. T. W. *et al. Adv. Sci. (Weinh.)*, **16**, 2001467 (2020).
- 26) Gangadaran, P. *et al. Oncotarget*, **8**, 109894-109914 (2017).
- 27) Lai, C. P. *et al. ACS Nano*, **8**, 483-494 (2014).
- 28) Takahashi, Y. *et al. J. Biotechnol.*, **165**, 77-84 (2013).
- 29) Abello, J. *et al. Theranostics*, **9**, 2325-2345 (2019).
- 30) Mendt, M. *et al. JCI Insight*, **3**, e99263 (2018).
- 31) Naseri, Z. *et al. Int. J. Nanomed.*, **13**, 7727-7747 (2018).
- 32) Faruqu, F. N. *et al. Theranostics*, **9**, 1666-1682 (2019).
- 33) Perets, O. B. N. *et al. ACS Nano*, **11**, 10883-10893 (2017).
- 34) Gupta, D. *et al. J. Extracell. Vesicles*, **21**, 1800222 (2020).
- 35) Takahashi, Y. *et al. J. Biotechnol.*, **20**, 77-84 (2013).
- 36) Wiklander, O. P. B. *et al. J. Extracell. Vesicles*, **20**, 26316 (2015).
- 37) Murphy, D. E. *et al. Exp. Mol. Med.*, **51**, 32 (2019).
- 38) Luo, Z. W. *et al. Nanoscale*, **21**, 20884-20892 (2019).

- 39) Shi, S. *et al. Bioconjug. Chem.*, **16**, 2675-2683 (2019).
- 40) Choi, E. S. *et al. Macromol. Biosci.*, **19**, e1900042 (2019).
- 41) Jia, G. *et al. Biomaterials*, **178**, 302-316 (2018).
- 42) Kooijmans, S. A. A. *et al. J Control. Release*, **224**, 77-85 (2016).
- 43) Suk, J. S. *et al. Adv. Drug Deliv. Rev.*, **99**, 28-51 (2016).
- 44) Antes, T. J. *et al. J. Nanobiotechnol.*, **16**, 61 (2018).
- 45) Kim, H. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **499**, 803-808 (2018).

Table 3 補注

NOTA : 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid

DMPE : 1,2-Bis(diphenylphosphino) ethane

BMSC : bone marrow mesenchymal stem cells

CDC : cardiosphere derived cells