非侵襲的な脳内への薬物送達技術の開発と脳神経疾患治療への応用

金 沢 貴 憲†

Development of Noninvasive Drug Delivery Systems to the Brain for the Treatment of Brain/Central Nervous System Diseases

Takanori Kanazawa†

Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences; 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan.

(Received July 31, 2017)

In general, the blood-brain barrier (BBB) poses a major challenge to drug development efforts targeting brain/central nervous system (CNS) diseases, since it limits the distribution of systemically administered therapeutics to the brain/CNS. Therefore, the development of effective strategies for enhancing drug delivery to the brain has been a topic of great interest in both the clinical and pharmaceutical fields. Intranasal administration has been noted as a method for noninvasive delivery of a drug to the brain/CNS by bypassing the BBB *via* the “nose-to-brain” route. This nose-to-brain delivery system has the potential to be highly versatile, and a combination of this system with new drugs and siRNA shows promise in the treatment of CNS diseases. Cell-penetrating Tat peptide-modified block copolymer micelles have the potential for improving mucosal permeability and nose-to-brain transport efficiency. In addition, nano-sized drug carriers can improve nose-to-brain delivery through their ability to increase the stability of encapsulated drugs against biological degradation in the nasal cavity and brain/CNS. In this review, we introduce the assessment of and mechanisms for delivery to the brain after intranasal drug/siRNA administration with our cell-penetrating peptide-modified nano-sized polymer micelles. Our findings show that the use of polymer micelles with surface modification by cell-penetrating peptides for intranasal administration enables the noninvasive delivery of therapeutic agents to the brain/CNS by increasing the nose-to-brain transfer of the drug or siRNA administered from the nasal cavity.

Key words—nose-to-brain route; drug delivery system; polymer micelle; cell-penetrating peptide; siRNA delivery; brain/central nervous system disease

はじめに

アルツハイマー病、パーキンソン病、脳血管障害、脳腫瘍に代表される難治性の脳・中枢神経系 (central nervous system; CNS) 疾患は、その多くがアンメットメディカルニーズの高い疾患である。現在行われている治療法として、薬物治療や外科的手術があるものの、そのほとんどは、根治療法ではなく、症状の進行を阻止して QOL を高める治療法となっている。そのため、CNS 疾患に対して、画期的なメカニズムを有する新規の低分子治療薬や、タンパク質やペプチドといったバイオ医薬、あるいは

は siRNA やアンチセンス核酸といった核酸医薬の開発に対して、新たな CNS 疾患治療薬として大きな期待が寄せられている。しかしながら、有効な治療を達成するためには、新規治療薬の開発のみならず、疾患部位である CNS へ効率的にこれら治療薬を届けるドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) を開発することが必要不可欠である。一般に、全身循環血流を介した脳への物質の移行は、血管内皮細胞同士の密着結合、連続した基底膜並びにその周囲に位置するアストロサイトの突起により構成される血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の存在により、電解質やグルコースといった一部の低分子化合物をのぞき、大きく制限されている。^{1,2)} そのため、経口投与や静脈内投与を介した脳への薬物送達はほとんど見込めず、BBB の存在が脳・中枢神経疾患治療の大きな障壁の 1 つとなっている。また、BBB を回避できる方法とし

東京薬科大学薬学部製剤設計学教室 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

現所属：†日本大学薬学部薬剤学研究室 (〒274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1)

e-mail: kanazawa.takanori02@nihon-u.ac.jp

本総説は、平成 28 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Structure of Tat Peptide-modified PEG-PCL Micelle (PEG-PCL-Peptide)

Carboxylic group in cell-penetrating peptide Tat (Peptide) was conjugated to the hydroxyl group in PEG-PCL by esterification. PEG, polyethylene glycol; PCL, polycaprolactone.

て、脳組織間隙に高濃度の薬物を直接送達できる脳室内投与や麻酔などに用いられている髄腔内投与が挙げられるものの、このような脳・髄腔への直接投与は、侵襲性が高いため、頻回投与が必要な治療の場合、患者への負担は大きい。そのため、非侵襲的かつ効率的に CNS へ薬物を送達する新規 DDS の開発が求められている。

近年、BBB を介さずに薬物を脳へ送り込む新たな手段として、鼻腔より鼻粘膜層を介して脳へ移行する“Nose-to-Brain”経路が報告されている。³⁻⁶⁾ 経鼻投与された薬物は、その大部分は BBB を介さず、鼻腔内の嗅粘膜上皮組織に局在する嗅神経や呼吸粘膜上皮組織に局在する三叉神経、あるいは脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF)などを介して脳へ移行することが報告されている。^{5,6)} また、経鼻投与は、非侵襲的であるため患者自身による自己投与や頻回投与が可能であることから、経口・静脈内投与や直接脳内あるいは髄腔内に投与する脳室内投与・髄腔内投与よりも有用性が高いと考えられ、近年では、低分子化学療法剤を始め、ペプチドやタンパクなどの脳・中枢神経系への送達手段として、数多く検討されている。⁵⁾ しかしながら、この“Nose-to-Brain”経路には、鼻粘膜上皮層や粘液、さらには

繊毛クリアランスなどの物理的障壁が存在している。そのため、低分子薬物や核酸医薬の効率的な Nose-to-Brain デリバリーを達成するには、これら障壁を突破させるための DDS キャリアの併用が必要となる。

本稿では、細胞透過性・粘膜透過性ペプチド修飾ナノキャリアを基盤とした新規 Nose-to-Brain DDS による薬物・核酸医薬デリバリーについて、その脳内への薬物移行性、Nose-to-Brain 促進機構並びに疾患モデルによる治療効果を中心に概説する。

1. 細胞透過性ナノキャリアの開発と経鼻投与後の脳への薬物・核酸医薬送達性⁷⁾

経鼻投与による脳への薬物送達効率を高めるには、鼻粘膜上皮層における透過性を向上させる必要

金沢貴憲

日本大学薬学部専任講師、博士 (薬学)。東京薬科大学薬学部客員講師、国立がん研究センター機能診断開発分野外来研究員 兼務。2006 年東京薬科大学大学院博士前期課程修了、同大学助手、助教、講師を経て、2017 年 4 月より現職。2013 年日本薬剤学会 Postdoctoral Presentation Award, 2016 年日本薬学会関東支部奨励賞受賞など。専門は、薬剤学、DDS。

がある。HIV-Tat タンパク質のアルギニンとリジンに富む塩基性ペプチド領域 (YGRKKRRQRRR, Tat ペプチド) は、負電荷の細胞膜表面と相互作用し易く高い細胞膜透過性を示すことが知られている。この Tat ペプチドには、細胞膜透過性に加え、細胞間の密着結合 (タイトジャンクション) を開口する作用もあるといわれており、安定性に優れたナノキャリアに修飾することで粘膜上皮細胞間並びに支持細胞間を介しての薬物移行促進作用を発揮することが期待できる。また、経鼻投与後の粘膜における排泄機構に対して、生体内安定性と薬物保持能を有するキャリアが必要不可欠である。そこで筆者は、親水性高分子であるポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) と疎水性コア領域を形成するポリカプロラクトン (polycaprolactone; PCL) を連結させた、水中で自己会合することで、ナノサイズの安定性に優れたミセルを形成するブロック共重合体 (PEG-PCL) を合成し、そこに Tat ペプチドを化学的に結合させた、Tat ペプチド修飾ブロック共重合体 (PEG-PCL-Peptide, Fig. 1) を開発した。⁸⁾ PEG-PCL-Peptide は、水中で疎水性基 (PCL) が内側に、親水性基 (PEG, Tat ペプチド) が外側に配位することにより、表面電荷が正に帯電した 50–60 nm のミセルを形成した (Table 1)。また、疎水性低分子の抗がん剤であるカンプトテシンを封入した結果、約 90% の高い封入効率を示した。さらに、正電荷を有することから、siRNA (21 bp, MW: 13300) と混合することで、静電的相互作用により、約 60 nm かつ正電荷を示すナノサイズの複合体を形成した。⁹⁾

次に、疎水性の蛍光モデル物質であるクマリンを封入した PEG-PCL-Peptide の経鼻投与後の体内分布を検討した。¹⁰⁾ Figure 2(A) には、クマリン単独及びクマリン封入 PEG-PCL-Peptide を脳腫瘍同所移植ラットへ経鼻投与した際の脳を含めた体内分布の結果を示す。いずれの群においても脳への高い分布が示され、経鼻投与による Nose-to-Brain デリバリーの有用性が示唆された。このとき、クマリン単独投与群で脳への最も高い分布がみられたものの、肺や腎臓などの末梢組織での分布も顕著に高くなった。一方、クマリン封入 PEG-PCL-Peptide 投与群では、末梢組織への分布は、脳への分布と比較し、いずれも低かった。また、クマリンを経鼻及び静脈

Table 1. Physicochemical Characterization of PEG-PCL-Peptide, Camptothecin (CPT)-loaded PEG-PCL-Peptide, and siRNA-loaded PEG-PCL-Peptide Micelles

Polymer	Mean diameter (nm)	Zeta potential (mV)
PEG-PCL-Peptide	83.9 ± 20.7	20.3 ± 2.98
CPT-loaded PEG-PCL-Peptide	125.8 ± 7.76	27.4 ± 4.21
siRNA-loaded PEG-PCL-Peptide	64.0 ± 14.0	13.0 ± 0.45

Each value represents the mean ± S.D., *n* = 3.

A) Coumarin (Hydrophobic low molecule)

B) Fluorescein-model siRNAs

Fig. 2. Biodistribution of Coumarin or Brain Distribution of Fluorescein-model siRNAs in Rats

A) Rats were sacrificed at 1 h (white bar) or 4 h (black bar) after intranasal administration of coumarin-loaded PEG-PCL-Peptide micelles, or 1 h (hatched bar) following the injection of coumarin solution (dose corresponding to 20 µg of coumarin). B) Rats were sacrificed at 1 h after intranasal or intravenous administration of naked fluorescein-model siRNAs (Naked) or with PEG-PCL-Peptide (dose corresponding to 40 µg of Fluorescein-model siRNAs), and each brain was enucleated. Each bar represents the mean ± S.E. (*n* = 4). **p < 0.01, *p < 0.05.

A) Olfactory mucosa

B) Trigeminal nerve

Fig. 3. Distribution of siRNAs in Olfactory Mucosa or Trigeminal Nerve in Rats

Rats were sacrificed at A) 15 min, or B) 15 min, 2 h and 4 h after intranasal administration of naked siRNA (Naked) or with PEG-PCL-Peptide (dose corresponding to 40 µg of siRNA). A) Olfactory mucosa was collected, and sliced to 16-µm sections. White color represents Fluorescein (FAM)-labeled control siRNA. OE, olfactory mucosa epithelium; LP, lamina propria; NC, nasal cavity. Scale bar=200 µm. B) Each trigeminal nerve was enucleated and observed using *in vivo* fluorescein imaging system (Maestro^{TM}).

投与した際の血中濃度推移を測定したところ、静脈内投与では 48 時間まで高い血液濃度を示したのに対し、経鼻投与群においては、クマリンを単独で投与した場合には初期に血中濃度の上昇がみられるものの、PEG-PCL ナノキャリアに封入して投与した場合には血中濃度は極めて低かった。¹⁰⁾ よって、PEG-PCL ナノキャリアを経鼻投与と併用することで、疎水性低分子薬の血中への移行や末梢組織への分布を低下させたことから、全身性の副作用が危惧される抗がん剤の CNS デリバリーへの応用が期待

できる。

さらに、水溶性高分子である核酸医薬の Nose-to-Brain デリバリーについて検討した。¹¹⁾ Figure 2(B) に蛍光標識した水溶性高分子である Dextran (MW: 10000) をモデル siRNA として経鼻投与した際の脳への移行性について、静脈投与と比較検討した結果を示す。経鼻投与時の脳内移行性は、静脈内投与時に比べ有意に高いことから、経鼻投与の有用性が示された。さらに、PEG-PCL-Peptide を用いて蛍光標識モデル siRNA を経鼻投与した群は、

モデル siRNA 単独投与 (Naked) 群に比べ顕著に高い脳内移行性を示した。

よって、PEG-PCL-Peptide ミセルは、疎水性低分子薬だけでなく、水溶性高分子である siRNA の Nose-to-Brain デリバリーを向上させる優れた Nose-to-Brain DDS キャリアであることが示された。

2. PEG-PCL-Peptide ミセルによる Nose-to-Brain 薬物移行促進機構¹¹⁾

本項では、PEG-PCL-Peptide ミセルによる Nose-to-Brain デリバリーの促進機構を検討するため、鼻腔から脳をつなぐ Nose-to-Brain 経路として報告されている嗅神経経路並びに三叉神経経路に着目した研究例を示す。一般に、嗅神経経路は鼻腔内嗅粘膜組織に局在している嗅神経を介した薬物輸送ルートであり、脳の先端に位置する嗅球へと薬物が運ばれ、三叉神経経路は、鼻腔内呼吸粘膜組織に局在している三叉神経枝を介して延髄・後脳へと薬物が運ばれることが報告されている。^{5,6)} これら経路に係わる嗅粘膜、三叉神経、CSF、並びに嗅球や延髄・後脳といった脳組織への siRNA の分布について検討した。

Figure 3(A)は、FAM で蛍光標識 siRNA (Control siRNA, 21 bp, MW: 13300) の経鼻投与 15 分後の嗅粘膜組織中の分布を共焦点顕微鏡で観察した結果である。結果より、PEG-PCL-Peptide を併用しない単独 (Naked) 群では、粘膜上皮表面にのみ蛍光が観察されるのに対して、PEG-PCL-Peptide を併用した群では、嗅粘膜上皮表面だけでなく、粘膜上皮下の粘膜固有層において強い蛍光が認められた。これは、PEG-PCL-Peptide 併用による粘膜内での安定性及び粘膜透過性の向上によるものと推察される。嗅粘膜には嗅神経が存在し、その先には嗅神経束、篩板、嗅球などの脳移行に重要な組織が続いている。そのため、脳への薬物送達量を増加させるためには、PEG-PCL-Peptide ミセルのように粘膜上皮の透過を促進する DDS キャリアが有用であることが示唆された。次に、蛍光標識モデル siRNA 経鼻投与後の三叉神経を *in vivo* 蛍光イメージング装置を用いて経時的に観察した。Figure 3(B)より、PEG-PCL-Peptide 併用群は、モデル siRNA 単独 (Naked) 群と比べ、三叉神経に強い蛍光が観察された。これらの結果より、PEG-PCL-Peptide は嗅神経経路と同様に、延髄・後脳につながる三叉神経

Fig. 4. Dynamics of siRNAs in Brain Tissue in Rats

Rats were sacrificed and brains were enucleated at each point after intranasal or intravenous administration of naked fluorescein-model siRNAs (Naked) or with PEG-PCL-Peptide (dose corresponding to 40 μ g of fluorescein-model siRNAs). Each sample was observed using *in vivo* fluorescein imaging system (Maestro^{TM}).

経路への移行も促進することで siRNA を広範囲の脳組織へ効果的に送達することが示唆された。また、経時的な CSF 濃度を測定した結果、PEG-PCL-Peptide 併用群は、単独群に比べ経鼻投与後の CSF 中の濃度が長時間有意に高く保たれていた。一般に嗅神経経路や三叉神経経路を介して、嗅球や延髄・後脳へ移行した薬物の一部は、到達組織やその周辺組織から CSF へと移行することが知られている。¹²⁾ よって、PEG-PCL-Peptide 併用群で siRNA の CSF 中濃度が増加した理由として、嗅神経経路並びに三叉神経経路を介する脳組織への移行が向上した結果、到達先である各脳組織やその周辺組織中の siRNA 濃度が増大したためであると推察される。

Figure 4 には、蛍光標識モデル siRNA を静脈内投与又は経鼻投与し 15 分と 1 時間後の脳を蛍光イメージング装置で観察した結果を示す。上段には、脳を上から撮影した図を、下段には、2 mm 毎にスライスした脳の断面図を示す。Figure 4 より、静脈内投与したラットの脳において蛍光は全く観察されなかったのに対し、経鼻投与したラットの脳では蛍光が観察された。特に、PEG-PCL-Peptide を併用

A) Kaplan-Meier survival curves

B) HE-stained brain tissue

Fig. 5. Survival and HE-stained Brain Tissue in Intracranial C6 Glioma-bearing Rats

A) Kaplan-Meier survival curves of intracranial C6 glioma-bearing rats, untreated (cross) or treated with intranasal administration of naked siRaf-1 (triangle), siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide (circle), camptothecin (CPT)/siControl-loaded PEG-PCL-Peptide (diamond) or CPT/siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide (square) (0.36 mg/kg CPT, 0.1 mg/kg siRNA, $n=5$). B) HE-stained brain tissue in intracranial C6 glioma-bearing untreated rats, or rats treated with intranasal administration of naked siRaf-1, siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide, CPT/siControl-loaded PEG-PCL-Peptide, and CPT/siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide. After two weeks, tissues were taken and sliced to 16 μ m-sections. Each section was stained with HE, and observed using light optical microscopy.

した群において、強い蛍光が広範囲に観察できた。さらにこのとき鼻から脳への代表的な移行経路である、脳の先端に位置する嗅球並びに脳の後方に位置する脳幹に強い蛍光が観察された。

以上のことから、PEG-PCL-Peptide による鼻から脳への Nose-to-Brain デリバリーは、嗅神経経路、三叉神経経路を介した脳・CSF への移行を増大させることが示された。

3. 脳腫瘍同所移植ラットにおける PEG-PCL-Peptide ミセルと Nose-to-Brain を用いた薬物・核酸医薬デリバリーによる治療効果¹⁰⁾

前項までの検討により、PEG-PCL-Peptide ミセルと Nose-to-Brain を併用することで、疎水性の低分子薬物だけでなく、水溶性高分子である核酸医薬の siRNA をも CNS へ効率的に送達できることを明らかとした。そこで、次に、PEG-PCL-Peptide

Table 2. Median Survival Period of Rats Bearing Intracranial C6 Glioma Treated with Camptothecin (CPT)-loaded Micelles

Treatment	Number of rats	Average of survival period (d)	p value
Untreated	5	16.6	
Naked siRaf-1	5	18.4	
siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide	5	20.4	<0.05 ^{a,b}
CPT/siControl-loaded PEG-PCL-Peptide	5	20.6	<0.05 ^{a,b}
CPT/siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide	5	28.4	<0.01 ^{a,b} , <0.05 ^{c,d}

^a Compared to untreated rats, ^b Compared to naked siRaf-1, ^c Compared to siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide, ^d Compared to CPT/siControl-loaded PEG-PCL-Peptide.

ミセルと Nose-to-Brain を併用した際の薬物・核酸医薬による CNS 疾患治療の可能性について検討するため、抗がん剤であるカンプトテシン及び抗アポトーシス作用及び細胞増殖の促進を引き起こす Raf-1 に対する siRNA (siRaf-1, 21 bp, MW: 13300) を共搭載させた PEG-PCL-Peptide ミセルを調製し、その脳腫瘍同所移植ラットにおける治療効果を評価した。

Figure 5 (A) 及び Table 2 に、C6 ラットグリオーマ細胞を同所移植したラットに、移植日より 7 日間 naked siRaf-1, siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide, CPT/Control siRNA (siControl)-loaded PEG-PCL-Peptide, CPT/siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide をそれぞれ経鼻投与した際の生存日数を示す。Table 2 より、未処置群, naked siRaf-1 群の平均生存日数は 16.6 日, 18.4 日と短かったのに対し, siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide, CPT/siControl-loaded PEG-PCL-Peptide 群は、それぞれ 20.4 日, 20.6 日と、未処置群と比較して有意な生存日数の延長が認められた。さらに、CPT/siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide 群では、平均生存日数は 28.4 日となり、他群と比べ有意な生存期間の延長を示した。Figure 5 (B) に、C6 細胞移植 2 週間後の未処置群と各投与群の脳切片を示す。結果より、siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide, 及び CPT/siControl-loaded PEG-PCL-Peptide 群では、未処置群, naked siRaf-1 群に比べて腫瘍組織の縮小が観察された。さらに、CPT/siRaf-1-loaded PEG-PCL-Peptide 群では、顕

著な腫瘍組織の浸潤抑制効果がみられた。よって、PEG-PCL-Peptide は、siRNA の Nose-to-Brain デリバリーによる CNS 疾患治療に有効なキャリアであることが示された。さらに、疎水性低分子薬物と共搭載できることから、薬物と核酸医薬による相加・相乗効果を発揮する可能性が示された。

おわりに

本研究により、経鼻投与と細胞透過性ナノキャリア (PEG-PCL-Peptide) を組み合わせた Nose-to-Brain DDS を用いることで、物質移行が非常に難しいとされる脳へ効率的に薬物や核酸を送達できることを明らかとした。本研究成果は、根治療法のない CNS 疾患に対する画期的な薬物療法の開発に貢献するものと期待される。今後、本 DDS 技術を用いて様々な薬物・バイオ医薬による CNS 疾患に対する有効性を評価していく予定である。また、Nose-to-Brain 研究に関して、移行経路や脳移行後の脳内における動態に関していまだ不明な点が残されている。さらにこれまで、げっ歯類での疾患モデルに対する薬理効果を示す報告は多いものの、その薬物動態や送達機構、及びヒトへの応用におけるボトルネックについての議論は非常に少ない。¹³⁾ 今後は、更なる研究発展のために、Nose-to-Brain を介した移行機構を解明し、ヒトへ応用可能な Nose-to-Brain DDS・製剤の開発につなげていきたい。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 岡田弘晃名誉教授、高島由季准教授に心より感謝申し上げます。また、研究の遂行においてご助言、ご協力頂きました、名古屋市立大学薬学部尾関哲也教授、日本大学薬学部鈴木豊史教授、帝京大学薬学部出口芳春教授、黄倉 崇教授、長浜バイオ大学福田常彦教授にこの場をお借りして深謝致します。本研究は、東京薬科大学薬学部製剤設計学教室にて実施され、瀬田康生教授、茨木ひさ子助手のご協力、並びに教室卒業生、修了生である、滝 洋幸修士、鈴木翔平学士、森崎一貴学士、秋山史成学士、柿崎詩野学士、金子真未学士の多大な努力により得られた研究成果となります。この場をお借りして心より感謝申し上げます。最後に、本研究は、科学研究費補助金を始めとする様々な助成金により行われました。ここに御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Armulik A., Genové G., Mäe M., Nisancioglu M. H., Wallgard E., Niaudet C., He L., Norlin J., Lindblom P., Strittmatter K., Johansson B. R., Betsholtz C., *Nature*, **468**, 557–561 (2010).
- 2) Pardridge W. M., *Drug Discov. Today*, **6**, 381–383 (2001).
- 3) Illum L., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 1–18 (2000).
- 4) Frey W. H., *Drug Deliv. Technol.*, **2**, 46–49 (2002).
- 5) Lochhead J. J., Thorne G., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 614–628 (2012).
- 6) Djupesland P. G., Messina J. C., Mahmoud R. A., *Ther. Deliv.*, **5**, 709–733 (2014).
- 7) Kanazawa T., *Med. Devices (Auckl)*, **8**, 57–64 (2015).
- 8) Tanaka K., Kanazawa T., Shibata Y., Suda Y., Fukuda T., Takashima Y., Okada H., *Int. J. Pharm.*, **396**, 229–238 (2010).
- 9) Kanazawa T., Morisaki K., Suzuki S., Takashima Y., *Mol. Pharm.*, **11**, 1471–1478 (2014).
- 10) Kanazawa T., Taki H., Tanaka K., Takashima Y., Okada H., *Pharm. Res.*, **28**, 2130–2139 (2011).
- 11) Kanazawa T., Akiyama F., Kakizaki S., Takashima Y., Seta Y., *Biomaterials*, **34**, 9220–9226 (2013).
- 12) in 't Veen J. P., van den Berg M. P., Romeijn S. G., Verhoef J. C., Merkus F. W., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **61**, 27–31 (2005).
- 13) Kozlovskaya L., Abou-Kaoud M., Stepensky D., *J. Control. Release*, **10**, 133–140 (2014).