生体関門輸送機能を基盤とした疾患メカニズムの解明と治療への展開

伊藤 慎悟

Elucidation of Disease Mechanisms Based on Transport Function at Tissue Barriers and Challenges in Drug Development

Shingo Ito

Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University;
5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan.

(Received July 10, 2018)

Tissue barriers contribute to the maintenance of homeostasis in the body, and tissue barrier dysfunction presents a risk factor for a variety of diseases. The blood-brain barrier (BBB) is a major tissue barrier acting as a static barrier and dynamic interface that plays an important role in the maintenance of central nervous system homeostasis. We show the functional characterization of the brain-to-blood efflux transport system of amyloid- β peptide ($A\beta$) across the BBB. We found that activated vitamin D3 may be a candidate agent for modulating the $A\beta$ clearance across the BBB. Cerebral creatine deficiency syndromes are caused by loss-of-function mutations in the creatine transporter (CRT; SLC6A8), which transports creatine at the BBB. We found that functional impairment of CRT due to a G561R mutation resulted in incomplete N-linked glycosylation due to misfolding during protein maturation, leading to impaired creatine transport activity at the BBB. To develop a delivery system for biomedicine across the tissue barrier, we established a screening system to identify cell-penetrating peptides by a combination of *in vitro* cell permeability screening assays and phage display technology. Using this system, we identified cyclic hepta-peptides that are able to facilitate intestinal absorption of phages *in vitro* and *in vivo*, which are promising candidates as a carrier for macromolecular biomedicines. In conclusion, these studies focusing on the dynamic interface of tissue barriers will contribute to knowledge on disease pathogenesis as well as the development of a targeted biomedicine delivery system.

Key words—Alzheimer's disease; blood-brain barrier; cell penetrating peptide; cerebral creatine deficiency syndromes; creatine transporter; drug delivery system

1. はじめに

生体には末梢と中枢を隔てる血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) や外界と体内を隔てる消化管バリアなど様々な生体関門がある。生体関門の実体は、血管内皮細胞や上皮細胞であり、それらが強固な密着結合による物理的障壁とトランスポーターや受容体などの物質輸送機構を介した動的インターフェースによるバリア機能を発揮し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。一方、生体関門は標的組織への治療薬の送達を妨げる大きな障壁となっている。特に、劇的な治療効果があるバイオ医薬品は分子量が大きいために生体関門を透過するこ

とができない。そこで筆者らは、この問題を解決する方法として新しい細胞膜透過ペプチド (cell-penetrating peptides; CPPs) 同定法を開発し、消化管において動的インターフェースを利用したバイオ医薬品の経口投与を可能にする小腸透過 DNP ペプチドを同定した。本稿では、生体関門における輸送機構の解明を発端に疾患の発症原因からバイオ医薬品のドラッグデリバリー技術開発まで横断的に研究した成果に関して紹介する。

2. BBB とアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD)

BBB は最も強固なバリア機能を有する生体関門である。BBB の解剖学的実体は脳毛細血管内皮細胞がアストロサイトの足突起とペリサイトによって取り囲まれている脳毛細血管である。この中で脳毛細血管内皮細胞が強力な密着結合による物理的障壁とトランスポーターなどの物質輸送機構による動的

熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学系) 微生物薬学分野 (〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)
e-mail: ishingou@kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成 29 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Structure and Transport Model of the Blood-Brain Barrier

インターフェースを介してバリア機能の中心的役割を果たしている (Fig. 1). 一方で, BBB は選択的な物質輸送を介して脳機能の恒常性維持に貢献しており, この BBB における輸送機能低下は, 認知症や精神遅滞, てんかんなどで観察されており, BBB 輸送機能破綻と神経変性疾患発症の関係に注目が集まっている.

AD は記憶や知的機能が徐々に失われる老年性認知症の原因としては最も頻度が高い神経変性疾患である. これまでの基礎及び臨床知見から, アミロイド β ペプチド (amyloid- β peptide; $A\beta$) の蓄積が AD 脳で観察される様々な病理変化の最上流に位置し, 神経細胞の機能障害と脱落の引き金となっていることが考えられている. 脳内 $A\beta$ 濃度は産生系及びクリアランス系のバランスによって決定される. ヒトにおいて安定同位体標識法を用いた $A\beta$ の産生とクリアランスの速度論的解析から, 遺伝子変異によらない孤発性 AD では脳内 $A\beta$ クリアランスの低下が脳内 $A\beta$ 濃度増加の要因であることが示唆されている.¹⁾ 脳内 $A\beta$ クリアランスは主にネプリライシンやインスリン分解酵素などの $A\beta$ 分解酵素による分解機構と BBB を介した排出輸送機構によって担われている. 筆者らは BBB を介した $A\beta$ 排出輸送系に着目し, 脳内から循環血液中への BBB を介した物質透過過程を解析できる brain efflux index (BEI) 法を用いて BBB を介した $A\beta$ 排出輸送特性とそれに係わる分子について検討を行った. BEI 法を用いてラット及びマウス大脳皮質に投与された ^{125}I -human $A\beta$ (1-40) [$hA\beta$ (1-40)] は消失半減期 43-45 分で BBB を介して脳内から消失した.^{2,3)} ま

た, BBB を介した ^{125}I - $hA\beta$ (1-40) 排出輸送は AD の最大の危険因子である加齢によって低下した.^{4,5)} 脳から循環血液中への BBB を介した ^{125}I - $hA\beta$ (1-40) 排出輸送は二量体化やアポリポタンパク質 E (apoE) と結合することによって減少した.⁶⁾ 興味深いことに, AD の遺伝学的危険因子である apoE4 が ^{125}I - $hA\beta$ (1-40) と結合した場合の脳内からの BBB を介した排出は apoE2 や apoE3 よりも小さいことを見出した.⁶⁾ したがって, 脳内の $A\beta$ の存在状態が BBB を介した $A\beta$ 排出輸送に影響を与え, 脳内 $A\beta$ 濃度の増加に一部寄与していることが考えられる.

筆者らは BEI 法を用いた解析において, 既報の low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) や P-glycoprotein (P-gp) は BBB を介した ^{125}I - $hA\beta$ (1-40) 排出輸送に対する寄与が小さく, インスリン感受性分子機構が関与することを示した.^{2-4,7)} そこで, BBB におけるインスリン感受性分子を同定するために, マウス脳毛細血管内皮細胞のモデル細胞である TM-BBB4 細胞を用いて BBB における ^{125}I - $hA\beta$ (1-40) 内在化分子を検討した. その結果, TM-BBB4 細胞への ^{125}I - $hA\beta$ (1-40) 内在化はインスリンやインスリン分解酵素阻害剤によって低下し, ネプリライシン阻害剤によって低下しなかった.⁸⁾ また, インスリン分解酵素が TM-BBB4 細胞の細胞膜に発現し, 速やかに細胞内に内在化することを見出した.⁸⁾ 以上の結果から, BBB に発現するインスリン分解酵素は $hA\beta$ (1-40) 排出輸送に関与する分子であることが示唆された.

病態における脳内 $A\beta$ 増加メカニズムを解明する

ために、慢性酸化ストレスを惹起する α -tocopherol transfer protein (α TTP) 遺伝子欠損マウスにおける脳内 A β クリアランスを検討した.⁵⁾ その結果、 α TTP 遺伝子欠損マウスにおいて、BBB を介した 125 I-hA β (1-40) 排出輸送は 28% 減少することを見い出した。興味深いことに、BBB を介した 125 I-hA β (1-40) 排出輸送は減少したにもかかわらず、 α TTP 遺伝子欠損マウスの脳毛細血管における LRP-1 や P-gp タンパク質発現量は増加していた。また、 α TTP 遺伝子欠損マウス脳におけるネプリライシン活性は野生型マウス脳と変わらなかったのに対し、脳内インスリン分解酵素のタンパク質発現量は顕著に低下していた。さらに、 α TTP 遺伝子欠損マウスと AD モデルマウスを掛け合わせたところ、脳内 A β 蓄積は増加し、行動試験において認知機能の低下が促進された.⁹⁾ 以上の知見から、慢性酸化ストレスによる BBB におけるインスリン分解酵素の発現低下が脳内 A β 蓄積とそれに伴う認知機能低下を惹起するメカニズムの 1 つであることが示唆された。

BBB における A β 排出輸送は加齢によって低下することから、この低下を回復させることが AD の発症や進行を抑制することに有効であることが考えられる。そこで筆者らは、ドラッグ・リポジショニングを目指して BBB を介した A β 排出輸送を促進させる治療薬を既存薬の中から探索した。その結果、活性型ビタミン D3 [$1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3; $1\alpha,25$ (OH) $_2$ D3] が BBB における A β 排出輸送を促進させることによって大脳皮質の A β 濃度を低下させることを見い出した (Fig. 2).¹⁰⁾ 疫学調査によって血液中 vitamin D3 濃度は AD 患者で低い傾向にあり、¹¹⁾ $1\alpha,25$ (OH) $_2$ D3 投与が AD モデルマウスの脳内 A β を低下させることが報告されている。¹²⁾ したがって、ビタミン D 補充療法は BBB 排出輸送を標的とした AD 予防・治療薬となる可能性があることが考えられる。

3. BBB と脳クレアチン欠乏症候群

脳内エネルギーの恒常性維持は神経細胞の発達や機能発現に必須であり、そのエネルギー物質は主に BBB を介した血液からの供給に依存している。クレアチン (Creatine) は ATP 貯蔵機能を担う物質であり、Na⁺, Cl⁻ を駆動力とする 12 回膜貫通型トランスポーターであるクレアチントランスポー

Fig. 2. Effect of $1,25$ (OH) $_2$ D3 on the Elimination of 125 I-hA β (1-40) across the Blood-Brain Barrier (A), and the Level of Endogenous Amyloid- β Peptide (1-40) in the Mouse Brain (B)

Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 3-8$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different compared to the vehicle-treated group. This figure was modified from Ito *et al.*, 2010.¹⁰⁾

ター (creatine transporter; CRT, SLC6A8) によって輸送される。この CRT 遺伝子の変異は脳内クレアチンを欠乏させ、知的障害、言語発達遅滞、てんかんを引き起こす脳クレアチン欠乏症候群 (cerebral creatine deficiency syndromes; CCDSs) の発症原因となる。現在、CCDSs に対する有効な治療法は開発されておらず (アンメットメディカルニーズ)、革新的な治療薬の開発が期待されている。

近年、日本人の小児精神遅滞患者から新規変異 CRT 遺伝子 (c.1681 G > C, G561R) が見い出され、この G561R 変異型 CRT 遺伝子を有する患者の脳内クレアチン濃度は顕著に低下していた。¹³⁾ Uniprot におけるトポロジー解析から、CRT 遺伝子における G561R 変異は CRT の第 12 膜貫通ドメインに局在することが予想される。CRT と類似構造をとることが想定される細菌 (*Aquifex aeolicus*) ロイシントランスポーターの構造解析結果から、CRT の第 1 及び第 6 膜貫通ドメインがクレアチン結合に必須であると予想されている。したがって、G561R 変異は CRT のクレアチン輸送の活性中心部位から離れており、直接的な影響を及ぼさないことが推測される。そこで、G561R 変異型 CRT がクレアチン輸送を低下させる分子機序を解明するために、G561R 変異型 CRT 強制発現細胞を用いた検討を行った。¹⁴⁾ その結果、 14 C-creatine を用いた輸送実験において、G561R 変異 CRT によるクレアチン初期取り込み速度は野生型に比べて 73% 減少した一

Fig. 3. The Mechanism of Creatine Transport Activity Attenuation by the G561R Mutation

方で、G561R 変異 CRT によるクレアチン取り込み特性は野生型 CRT と同様に飽和性と Na^+ - Cl^- 依存性を示した。免疫組織化学的解析から、野生型 CRT は主に細胞膜に局在するのに対し、変異型 CRT は主に細胞内に局在していた。さらに、Western blot 法による CRT タンパク質発現解析において、野生型 CRT は主に細胞膜画分の 68 kDa にバンド検出されたのに対し、変異型 CRT は主に粗膜画分の 55, 110, 165 kDa にバンドが検出された。これら両細胞の CRT バンドは脱 N 型糖鎖反応によってともに 50 kDa にシフトした。以上の結果から、G561R 変異型 CRT は CRT タンパク質の未熟な N 型結合糖鎖修飾による細胞膜へのメンブランチラフィッキングの減少を引き起こし、その結果、クレアチン輸送活性の低下を引き起こすことが明らかとなった (Fig. 3)。この研究成果から、G561R 変異型患者において BBB における血液から脳へのクレアチン供給が著しく低下している可能性が考えられる。

これまでに CCDSs に対する治療薬開発は、シクロクレアチンを筆頭にクレアチン類似体を用いた研究が展開されてきた。今回、筆者らの研究から CRT タンパク質の糖鎖修飾異常やフォールディング、メンブランチラフィッキングを改善させることが CCDSs の治療につながる可能性を見出した。CCDSs に関連する遺伝子変異は少なくとも 30 種類報告されており、その中で活性中心部位から離れた変異も多数報告されている。¹⁵⁾ 既報の強制発現系を用いた ^{14}C -creatine 輸送実験とタンパク質発現解析の結果から、CRT タンパク質の糖鎖修飾異常やフォールディング、トラフィッキングが異常でクレアチン輸送活性が失活している変異もあることが予想される。¹⁶⁾ CCDSs と同様に小児の希少難治性肝

疾患として進行性家族性肝内胆汁うっ滞症がある。この疾患の原因遺伝子である *bile salt export pump* (BSEP, *ABCB11*) 変異体は輸送活性があるものの肝毛細胆管側膜における発現量が低い。そこで、BSEP の細胞膜発現量を増加させる作用を有する化合物の 1 つとして、尿素サイクル異常症の治療薬である 4-phenylbutyrate が同定され、¹⁷⁾ 現在、臨床試験が実施されている。¹⁸⁾ 今後、各種遺伝子変異による CRT 活性低下機序を明らかにしていくことが、CCDSs 患者に対する治療薬を開発する上で重要な情報になると考えられる。

4. バイオ医薬品の経口投与における小腸吸収

消化管は外界と体内を隔てるバリアであり、消化管の中でも特に小腸は栄養の吸収や病原菌など外敵の侵入に対する防御に重要な役割を果たしている。一方で、消化管から吸収させる経口投与は最も汎用されている医薬品の投与経路であり、低分子医薬品に関しては約 60% が経口投与薬である。しかし、劇的な治療効果が期待できるバイオ医薬品であるペプチド・タンパク性医薬品や核酸医薬品が増加してきているが、高分子量であるため、経口投与で十分な吸収性や安定性がないことがボトルネックとなり、バイオ医薬品の経口投与は実現していない。したがって、バイオ医薬品の小腸吸収を改善するドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) の開発は、高分子であるバイオ医薬品の開発・適応を加速・拡大し、さらに、患者 QOL を向上させるために、創薬領域において重要な課題である。

これまでに CPPs がバイオ医薬品の小腸吸収を改善することが報告されている。例えば、CPPs の 1 種である penetratin を共投与することで、インスリンの小腸吸収が改善され、血糖降下作用が観察され

Fig. 4. The Strategy for Discovery of Cyclic Peptides That Promote Intestinal Permeability

This figure was modified from Yamaguchi *et al.*, 2017.²²⁾

ている。¹⁹⁾しかし、penetratinやTAT、R8などの既存のCPPsは正に帯電しているため、細胞膜を透過後、細胞内において負に帯電する細胞内小器官にトラップされ易く、小腸上皮細胞内から循環血中へは移行しづらい。²⁰⁾つまり、既存のCPPsは高分子化合物であるバイオ医薬品やナノキャリアと結合させることによって細胞膜透過を促進させて細胞内に効率的に移送することはできるものの、細胞内から細胞外への排出が抑制されるために、経細胞輸送はほとんど促進させないことが考えられる。実際に、既存のCPPsを高分子化合物に結合させた場合、小腸透過が促進されないことが報告されている。²¹⁾バイオ医薬品の小腸吸収促進において求められるCPPの特性は、管腔側から血管側に小腸上皮細胞を効率的に「透過」させることである。そこで筆者らは、phage display法及びヒト小腸透過モデルとして汎用されるCaco-2細胞透過試験に着目した。Phage(長さ約1 μm)はバイオ医薬品(約10 nm)やナノキャリア(約100 nm)よりも巨大であるため、phageを透過させることができればバイオ医薬品やナノキャリアも透過可能と考え、phageをバイオ医薬品モデルとした。また、標的親和性や安定性に優れる環状ペプチドを提示するphage libraryを環状ペプチドが結合したバイオ医薬品モデルとした。この環状ペプチド提示phage libraryをCaco-2細胞透過試験によってスクリーニングすることで、バイオ医薬品の小腸透過を促進する新規小腸透過性環状ペプチドを同定することを行った(Fig. 4)。²²⁾その結果、Caco-2細胞を透過する3種類の7アミノ酸から構成される環状ペプチドを同定することに成功した。特に、DNPGNET(DNP)は塩基性アミノ酸(アルギニン、リジン、ヒスチジン)を含

Fig. 5. Time-dependent Transcellular Transport of DNP-phage across a Caco-2 Cell Monolayer (A), and Time-dependent Plasma Concentration of DNP-phage into a Closed Mouse Intestinal Loop *in Situ* (B)

Data represents mean $\pm$ S.E.M. ($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, significantly different compared to the control phage. Closed circle, DNP-phage; Open circle, control phage. DNP-phage; cyclic DNPGNET peptide displaying phage, Control phage; no cyclic peptide displaying phage. This figure was modified from Yamaguchi *et al.*, 2017.²²⁾

ず、PI値は2.72であり、消化管内で負に帯電していることが予想され、既存のCPPとは異なる物性を持っていた。

次に、同定した環状ペプチドの輸送解析を行った。環状ペプチドDNP提示phage(環状DNP-phage)はCaco-2細胞を最も速く透過し、添加後30分における透過量はペプチドを提示しないcontrol phageと比較して38倍高かった[Fig. 5(A)]。また、この環状DNP-phageが提示するペプチドと同配列の合成環状DNPペプチドを添加することで、Caco-2細胞透過量は51%低下した。次に、*in vivo*におけるマウス小腸透過能を*in situ* closed loop法を用いて解析した。その結果、投与後30分における血漿中DNP-phage濃度はcontrol phageと比較し、620倍高かった[Fig. 5(B)]。小腸におけるDNPペプチドの安全性をCaco-2細胞を用いて検討したところ、DNPペプチドはCaco-2細胞の生

存率及び密着結合には影響しなかった。したがって、環状ペプチド DNP は安全性の高い新規のバイオ医薬品の小腸透過を促進させる CPP であることが明らかになった。

以上の結果から、同定した環状ペプチド DNP は高分子医薬品やナノキャリアよりも巨大な phage の小腸透過を促進させることが明らかになった。ペプチドはリポソームといったナノキャリア表面への修飾が容易である。現在の DNP ペプチドは L 体アミノ酸から構成されており、消化管において分解を受け易い。これまでに、ペプチドを構成するアミノ酸を L 体から D 体へと置換することで、ペプチドの消化管内における安定性が改善されることが報告されている。今後、D 体化 DNP ペプチドを用いることで、経口投与型バイオ医薬品に適応可能な新規小腸透過 DDS の開発が期待される。

5. 今後の展望

生体関門における物質輸送を担うトランスポーターなどの膜輸送分子の細胞・組織・個体における恒常性維持への関与は複雑多岐にわたり、これまでに、原因となる膜輸送分子の実体には到達したものの、細胞・組織・個体レベルで認められる生理機能や疾患発症機序の理解にまで至っていないものが多い。今後は、生体関門における 1 つの鍵となる膜輸送分子の単一分子機能とともにオミクスを駆使して周辺の膜輸送分子の発現・機能変動や細胞内分子ネットワークを統合的に解析していくことが必要であり、将来、生体関門の膜輸送分子を標的とした創薬の実現につなげていきたい。

謝辞 本研究の遂行にあたり、熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系）大槻純男教授、平山未央助教、東北大学大学院薬学研究科 寺崎哲也教授、立川正憲准教授、東京医科歯科大学 横田隆徳教授に深く感謝申し上げます。また、ともに本研究を遂行してくれた熊本大学薬学部/大学院薬学教育部微生物薬学分野及び東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野の学生諸氏に心よりお礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Mawuenyega K. G., Sigurdson W., Ovod V., Munsell L., Kasten T., Morris J. C., Yarasheski K. E., Bateman R. J., *Science*, **330**, 1774 (2010).
- 2) Ito S., Ohtsuki S., Terasaki T., *Neurosci. Res.*, **56**, 246–252 (2006).
- 3) Ito S., Ueno T., Ohtsuki S., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **113**, 1356–1363 (2010).
- 4) Shiiki T., Ohtsuki S., Kurihara A., Naganuma H., Nishimura K., Tachikawa M., Hosoya K., Terasaki T., *J. Neurosci.*, **24**, 9632–9637 (2004).
- 5) Nishida Y., Ito S., Ohtsuki S., Yamamoto N., Takahashi T., Iwata N., Jishage K., Yamada H., Sasaguri H., Yokota S., Piao W., Tomimitsu H., Saido T. C., Yanagisawa K., Terasaki T., Mizusawa H., Yokota T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 33400–33408 (2009).
- 6) Ito S., Ohtsuki S., Kamiie J., Nezu Y., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **103**, 2482–2490 (2007).
- 7) Ito S., Matsumiya K., Ohtsuki S., Kamiie J., Terasaki T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **33**, 1770–1777 (2013).
- 8) Ito S., Ohtsuki S., Murata S., Katsukura Y., Suzuki H., Funaki M., Tachikawa M., Terasaki T., *J. Alzheimers Dis.*, **38**, 185–200 (2014).
- 9) Nishida Y., Yokota T., Takahashi T., Uchihara T., Jishage K., Mizusawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 530–536 (2006).
- 10) Ito S., Ohtsuki S., Nezu Y., Koitabashi Y., Murata S., Terasaki T., *Fluids Barriers CNS*, **8**, 20 (2011).
- 11) Littlejohns T. J., Henley W. E., Lang I. A., Annweiler C., Beauchet O., Chaves P. H., Fried L., Kestenbaum B. R., Kuller L. H., Langa K. M., Lopez O. L., Kos K., Soni M., Llewellyn D. J., *Neurology*, **83**, 920–928 (2014).
- 12) Durk M. R., Han K., Chow E. C., Ahrens R., Henderson J. T., Fraser P. E., Pang K. S., *J. Neurosci.*, **34**, 7091–7101 (2014).
- 13) Kato H., Miyake F., Shimbo H., Ohya M., Sugawara H., Aida N., Anzai R., Takagi M.,

- Okuda M., Takano K., Wada T., Iai M., Yamashita S., Osaka H., *Brain Dev.*, **36**, 630–633 (2014).
- 14) Uemura T., Ito S., Ohta Y., Tachikawa M., Wada T., Terasaki T., Ohtsuki S., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 49–55 (2017).
- 15) van de Kamp J. M., Mancini G. M., Salomons G. S., *J. Inherit. Metab. Dis.*, **37**, 715–733 (2014).
- 16) Betsalel O. T., Pop A., Rosenberg E. H., Fernandez-Ojeda M., Jakobs C., Salomons G. S., *Mol. Genet. Metab.*, **105**, 596–601 (2012).
- 17) Hayashi H., Sugiyama Y., *Hepatology*, **45**, 1506–1516 (2007).
- 18) Ito S., Hayashi H., Sugiura T., Ito K., Ueda H., Togawa T., Endo T., Tanikawa K., Kage M., Kusuhashi H., Saitoh S., *Pediatr. Int.*, **58**, 506–509 (2016).
- 19) Kamei N., Morishita M., Kanayama Y., Hasegawa K., Nishimura M., Hayashinaka E., Wada Y., Watanabe Y., Takayama K., *J. Control. Release*, **146**, 16–22 (2010).
- 20) Lindgren M. E., Hällbrink M. M., Elmquist A. M., Langel U., *Biochem. J.*, **377**, 69–76 (2004).
- 21) Kristensen M., de Groot A. M., Berthelsen J., Franzyk H., Sijts A., Nielsen H. M., *Bioconjug. Chem.*, **26**, 477–488 (2015).
- 22) Yamaguchi S., Ito S., Kurogi-Hirayama M., Ohtsuki S., *J. Control. Release*, **262**, 232–238 (2017).