

1. 環状オリゴ糖を基盤分子とする革新的がん治療法の開発

有馬 英俊

Key words: シクロデキストリン, 抗がん剤,
ドラッグデリバリーシステム, 抗腫瘍効果

熊本大学 大学院生命科学研究部
(薬学系) 製剤設計学分野

緒言

がん治療の DDS 研究において、パッシブターゲティング能は必要不可欠な概念ではあるが、それだけでは抗がん剤由来の副作用を完全に払拭することは困難であるため、アクティブターゲティング能を付与したキャリアの開発が必要である。キャリアに標的細胞・組織選択性を付与させる方法として、リガンド修飾法が知られている。がん細胞標的リガンドとして、葉酸 (FA) は、1) 安価である、2) 葉酸レセプター (FR- α) は、各種上皮がん細胞で過剰発現し、FA をがん細胞選択的に取り込む、3) 抗原性がなく、反復投与が可能である、4) 分子量が比較的小さいことから、キャリアの細胞内動態に影響を与えにくい、などの利点からリガンド分子として汎用されている。

環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CyD) は、種々の薬物をその疎水空洞内に取り込み包接複合体を形成する単分子的ホスト分子に分類される。CyDs の超分子的な包接特性は、食品、化粧品、臨床検査薬、高分子化学など多方面で利用されており、薬剤学・製剤学領域では、CyDs の機能性や生体適合性を利用して、複合体形成による医薬品の安定化、溶解性の調節、バイオアベイラビリティの向上、苦味・悪臭および局所刺激性の軽減などに応用されている。

細胞膜上にはリピッドラフトと呼ばれるコレステロールやスフィンゴ脂質が局在する脂質マイクロドメインの存在が知られ、シグナル伝達において重要な足場として機能している。当研究室ではラット肺胞マクロファージ由来 NR8383 細胞において、ジメチル- β -CyD (DM- β -CyD) はリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、PI3K-Akt 経路を抑制し、アポトーシスを誘導することを明らかにした¹⁾。一方、Grosse らは、メチル- β -CyD (M- β -CyD) を担がんマウスの腹腔内に単独投与 (800 mg/kg) すると、ドキソルビシン (DOX) 単独投与系 (2 mg/kg) より高い抗腫瘍効果を示すことを報告した。これらのことから、M- β -CyD はリピッドラフトを介した抗腫瘍活性を有する新規抗がん剤として有用であると考えられる。そこで本研究では、M- β -CyD にがん標的リガンドである FA を修飾した FA-M- β -CyD を調製し、その腫瘍細胞選択的新規抗がん剤としての有用性を検討した^{2,4)}。

次に、CyD の薬物包接特性を改良した抗がん剤キャリアとしての構築を試みた。具体的には、 β -CyD にがん標的リガンド分子である葉酸、スペーサーとしてカプロン酸を 1 つおよび 2 つ導入した 2 種の葉酸 7 分岐修飾 CyDs (per-(Fol-cap1)- β -CyD および per-(Fol-cap2)- β -CyD) を新規に調製し、腫瘍特異的抗がん剤ナノキャリアとしての有用性を評価した^{5,7)}。

一方、siRNA により、標的 mRNA を配列特異的に分解する RNA 干渉 (RNAi) 法を用いたがん治療研究が盛んに行われている。siRNA を医薬品へ応用するためには、生体内で安定性を維持し、標的組織や細胞への効率的な導入を可能とするデリバリー技術の確立が必要となる。当研究室では、カチオン性ポリマーである Starburst[®] Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer (デンドリマー, Generation (G) 3) と α -CyD との結合体 (α -CDE (G3, Degree of substitution (DS) of α -CyD=2.4) が市販の導入試薬と比較して、ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA の RNAi 効果を *in vitro* および *in vivo* において効率よく誘導することを報告し、 α -CDE (G3, DS 2.4) が siRNA キャリアとして有用であることを示してきた。本研究では、 α -CDE (G3, DS 2.4) に、FA をポリエチレングリコールを介して修飾した Fol-PaC (G4) を調製し、がん細胞選択的な siRNA キャリアとしての有用性を検討した^{8,9)}。

以下に、① 抗がん剤としての新規 CyD 誘導体の開発と評価 (FA-M- β -CyD) および ② 抗がん剤キャリアとしての機能性 CyD 誘導体の構築と評価 (per-(Fol-cap)- β -CyDs および Fol-PaC) について得られた知見を詳述する。

方法、結果および考察

1. 抗がん剤としての新規 CyD 誘導体の開発と評価

1-1) FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性

まず、FA-M- β -CyD が FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有するか否かを検討するため、FR- α 高発現細胞であるヒト口腔がん細胞由来 KB 細胞 (FR- α (+)) および FR- α 低発現細胞であるヒト肺がん上皮細胞由来 A549 細胞 (FR- α (-)) を用いて FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性を WST-1 法により評価した。FA-M- β -CyD は、KB 細胞において濃度依存的かつ、DM- β -CyD には劣るものの、 β -CyD および M- β -CyD と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。一方、A549 細胞において DM- β -CyD は KB 細胞と同様に強い細胞障害性を示したが、FA-M- β -CyD は 10 mM まで抗腫瘍活性を示さなかった。また、誌面の都合上データには示さないが、FA-M- β -CyD は他の FR- α 高発現細胞であるヒトメラノーマ細胞由来 Ihara 細胞や M213 細胞においても有意に高い抗腫瘍活性を示した。これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有することが示唆された。

1-2) FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性誘導機構

1-2-1) FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼす葉酸レセプター (FR) の影響

次に、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性が FR- α を介するか否かを FR 競合阻害剤を用いて検討した。FR 競合阻害剤である FA (1 mM) を共存させた状態で、各種 β -CyDs (0-10 mM) を 2 時間処理した後の抗腫瘍活性を検討したところ、 β -CyD、DM- β -CyD および M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA 添加の影響を受けなかった。一方、FA 添加系における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA 非添加系と比較して有意に低下した。また、データは示さないが、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は FR- α ノックダウン KB 細胞において有意に低下した。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は FR- α を介することが強く示唆された。

1-2-2) オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

本項では、オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。なお、オートファゴソームは、マーカー分子である LC3-II を Cyto-ID[®] を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。その結果、FA-M- β -CyD 処理により、LC3-II 由来の蛍光が観察された。さらに、オートファジー阻害剤である LY294002 の添加により、LC3-II 由来の蛍光は著しく減弱した。これらの結果より、FA-M- β -CyD は、オートファジーを誘導することが示唆された。また、FA-M- β -CyD はミトコンドリア膜電位を著しく上昇させたことから、ミトコンドリアにストレスを与え、マイトファジーを誘導した可能性が考えられる。今回は、データは示さないが、各種 FR- α 高発現細胞において、FA-M- β -CyD により誘導されたオートファゴソームはミトコンドリアと一部共局在したことから、FA-M- β -CyD はマイトファジーを誘導することが示唆された。

FA-M- β -CyD によるオートファジーの誘導は、前述したように、ミトコンドリア膜電位の上昇に示されるストレスに起因するものと推察される。近年、ミトコンドリア膜にもリピッドラフトが存在しており、ミトコンドリアの機能や細胞死を制御していることが報告された。また、Ziolkowski らは、ラット肝臓から回収したミトコンドリアを M- β -CyD で処理すると、リピッドラフトからコレステロールが漏出され、ミトコンドリアのエネルギー代謝や膨潤などの形態学的変化が抑制されることを明らかにした。さらに、ミトコンドリア外膜のリピッドラフトには、膜電位を調節する VDAC が局在しており、pore の開閉を調節してミトコンドリアと細胞質間の ATP や呼吸基質などの物質輸送を行っている。これらの報告より、細胞膜上の FR- α を介して細胞内に取り込まれた FA-M- β -CyD は、何らかの方法でエンドソームを脱出した後、ミトコンドリアのリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、そのエネルギー代謝や膜電位調節機能を破綻させ、オートファジーを誘導した可能性が考えられる。一方、データは示さないが、M- β -CyD は細胞内にほとんど取り込まれないために、細胞形質膜からのコレステロールの漏出を介してアポトーシス誘導へと向かうが、ミトコンドリア膜とは相互作用できず、オートファジーを誘導しなかったものと推察される。

1-3) FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性

前節までの検討において、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的にオートファジーを介した抗腫瘍活性を誘導することが示唆された。そこで本節では、FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を用いて作製した担がんマウスに FA-M- β -CyD を尾静脈内に単回投与し、腫瘍体積および生存率について検討した。コントロール群と比較して、FA-M- β -CyD 投与群では顕著に腫瘍の成長を抑制した。さらに、コントロール群では、

Colon-26 細胞を移植後 70 日目までに全例死亡したのに対して、FA-M- β -CyD 投与群では、140 日目においても 100% の生存率を示した。また、*in vitro* における結果より、FA-M- β -CyD による *in vivo* 抗腫瘍活性は、FR- α を介してがん細胞に効率良く取り込まれ、細胞死を誘導したものと推察される。近年、Chauhan らは粒子径 12 nm のナノメディシンが、粒子径 125 nm のナノ粒子と比較してより腫瘍深部まで到達可能であり、がん治療において有用であることを報告している。今回、データは示さないが、FA-M- β -CyD の粒子径は 10 nm 以下であることを確認していることから、FA-M- β -CyD は優れた腫瘍集積性を有するものと考えられる。また、データは示さないが、FA-M- β -CyD を Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスの尾静脈内に単回投与 24 時間後の血液生化学的パラメータは、コントロール群と差異は認められなかったことから、FA-M- β -CyD は *in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

FA-M- β -CyD による腫瘍細胞選択的な抗腫瘍活性誘導機構の推定図を図 1 に示す。FA-M- β -CyD は、1) 細胞形質膜上の FR- α を介して CLIC/GEEC 経路により細胞内に取り込まれた後、エンドソームから脱出し、2) ミトコンドリア膜のリピッドラフトに作用し、その膜電位を上昇させることでストレスを誘導し、3) オートファゴソームの形成およびマイトファジーを介して優れた抗腫瘍活性を示したものと考えられる。今後、*in vivo* での FA-M- β -CyD によるオートファジー誘導の有無および様々ながん種に対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性や安全性試験に関する検討を行う必要がある。

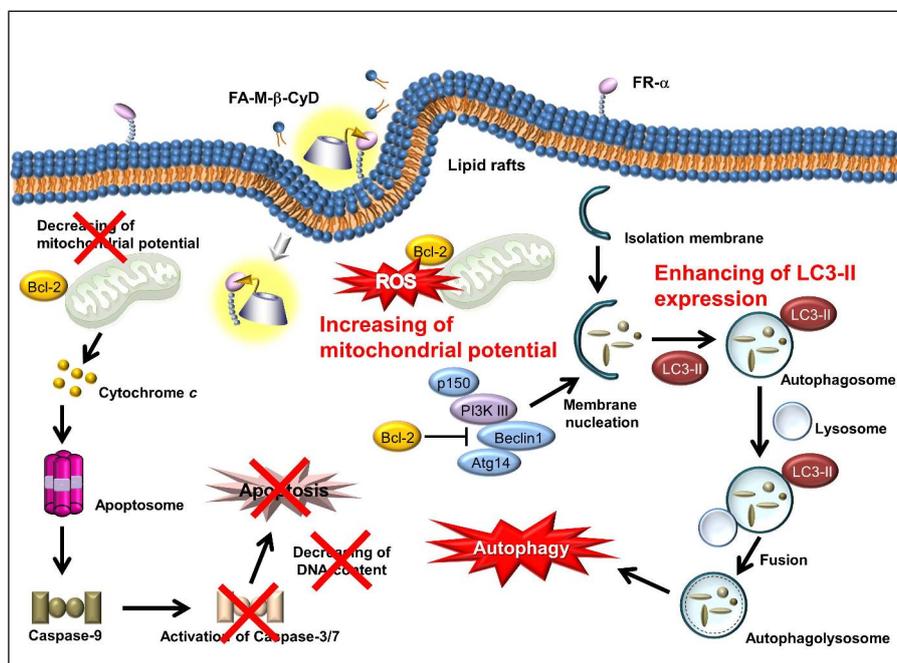


図 1. FA-M- β -CyD による腫瘍細胞選択的な抗腫瘍活性誘導機構 (推定)。

2. 抗がん剤キャリアとしての機能性 CyD 誘導体の構築と評価

2-1) 抗がん剤キャリアとしての葉酸 7 分岐修飾 CyDs (per-(Fol-cap)- β -CyDs)

2-1-1) 葉酸受容体 (FR- α) 高発現細胞における各種抗がん剤/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性

まず、FR- α 高発現細胞におけるドキソルビシン (DOX) の抗腫瘍活性に及ぼす per-(Fol-cap1)-CyD および per-(Fol-cap2)- β -CyD の影響を検討した。DOX/per-(Fol-cap1)- β -CyD および DOX/per-(Fol-cap2)- β -CyD (モル比 1:1 または 1:2) 複合体を KB 細胞 (FR- α (+)) に添加し 24 時間後の細胞生存率を調べたところ、per-(Fol-cap1)- β -CyD および per-(Fol-cap2)- β -CyD は、DOX と共存することで、DOX 単独よりも優れた抗腫瘍活性を示した。また、本実験条件下、per-(Fol-cap1)- β -CyD 単独および per-(Fol-cap2)- β -CyD 単独処理では、抗腫瘍活性を示さなかったことから、per-(Fol-cap1)- β -CyD および per-(Fol-cap2)- β -CyD は、DOX の抗腫瘍効果を増強させることが強く示唆された。

2-1-2) per-(Fol-cap)- β -CyDs と DOX との相互作用

CyDs を抗がん剤キャリアとして用いる場合、CyDs と主薬または添加剤との競合包接、生体適応後の複合体の解離および体内動態などを考慮する必要がある。一般に、薬物と CyDs との複合体の安定度定数 (K_c) が $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ 以上の値を示せば、静脈内投与後の薬物の体内動態を制御可能であることから、薬物と CyDs との複合体の安定度定数を算出することは極めて重要である。そこで本項では、DOX と各種 CyDs との相互作用を蛍光スペクトル法により検討し、スペクトルより得られた蛍光強度の変化を用いて、Scott 式から安定度定数を算出した。なお、血液中の pH が 7.3 ~ 7.4 であること、また、FR- α を介した細胞内取り込み経路は、CLIC/GEEC エンドサイトーシスであり、そのエンドソーム内 pH は 4.3 ~ 6.9 であることから、pH 7.3 および pH 6.8 での安定度定数を算出した。

pH 7.3 条件下、per-(Fol-cap1)- β -CyD および per-(Fol-cap2)- β -CyD は、DOX と極めて強く相互作用し、複合体の安定度定数はそれぞれ $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ および $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と著しく高い値を示した。また、データは示さないが、表面プラズモン共鳴法 (SPR) による解析からも、DOX と per-(Fol-cap2)- β -CyD との複合体の安定度定数は、 $3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と極めて高いことが明らかとなった。一方、DOX と per-(Fol-cap1)- α -CyD および per-(Fol-cap1)- γ -CyD との複合体の安定度定数は、それぞれ $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ および $5.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であり、空洞径の違いにより相互作用の強さが大きく異なることが示唆された。さらに、DOX と per-(NH₂-cap1)- β -CyD、Fol- β -CyD および天然 β -CyD との複合体の安定度定数は、それぞれ $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 $4.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ および $2.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ であったことから、 β -CyD にカプロン酸や葉酸を結合させることで、DOX との複合体形成能が著しく上昇することが示唆された。

一方、pH 6.8 条件下の DOX/per-(Fol-cap1)- β -CyD 複合体および DOX/per-(Fol-cap2)- β -CyD 複合体の安定度定数は、それぞれ $5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ および $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であった。このことから、複合体がエンドソーム内 (pH 4.3 ~ 6.9) 条件下に至ると、DOX を積極的にリリースする可能性が示唆された。

2-1-3) per-(Fol-cap)- β -CyDs の細胞内取り込み

一般に、CyDs は親水性かつ分子量が約 1,000 と大きいことから細胞内に取り込まれにくいことが知られている。そこで本項では、TRITC を付加した TRITC-per-(Fol-cap)- β -CyDs を用いて、FR- α 高発現細胞および FR- α 非発現細胞への細胞内取り込みを検討した。実験は、 $10 \mu\text{M}$ TRITC-per-(Fol-cap)- β -CyDs を添加し、1 時間後に TRITC の蛍光強度をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、TRITC-per-(Fol-cap)- β -CyDs は、A549 細胞 (FR- α (-)) よりも KB 細胞 (FR- α (+)) において、有意に取り込まれることが示唆された。また、KB 細胞 (FR- α (+)) における TRITC-per-(Fol-cap)- β -CyDs の細胞内取り込みを比較すると、TRITC-per-(Fol-cap1)- β -CyD よりも TRITC-per-(Fol-cap2)- β -CyD の方が有意に高かった。これらの結果より、per-(Fol-cap)- β -CyDs は FR- α 高発現細胞選択的に取り込まれることが強く示唆された。

2-1-4) DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体の *in vivo* 抗腫瘍効果

本節では、*in vivo* における DOX の抗腫瘍効果増強作用を検討するため、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を用いて作製した担がんマウスに DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体を尾静脈内に単回投与し、腫瘍体積、体重および生存率について検討した。その結果、コントロール群および DOX 単独投与群と比較して、DOX/per-(Fol-cap1)- β -CyD および DOX/per-(Fol-cap2)- β -CyD 複合体投与群は顕著に腫瘍の成長を抑制した。また、体重は各サンプル間において大きな差は認められなかった。さらに、DOX 単独投与群と比較して、DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体投与群では、担がんマウスの生存率を有意に改善した。これらの結果より、per-(Fol-cap)- β -CyDs は、*in vivo* においても DOX の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

以上、本章で得られた知見をもとに、DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体のがん細胞特異的抗腫瘍活性誘導機構を図 2 に示す。DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体の安定度定数は、pH 7.3 条件下、 10^6 オーダーと著しく高いことから、血中で解離することなく、1) 効率よくがん組織へと移行し、2) FR- α 介在性 CLIC/GEEC エンドサイトーシス経路によりがん細胞選択的に取り込まれ、3) エンドソーム内低 pH 環境下において複合体が解離し、4) エンドソーム脱出後、5) 解離した DOX が核移行し、6) 抗腫瘍活性を誘導するものと考えられる。しかしながら、血中における DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体の安定性やエンドソーム脱出機構については本検討で明らかとなっていないため、今後の課題としたい。

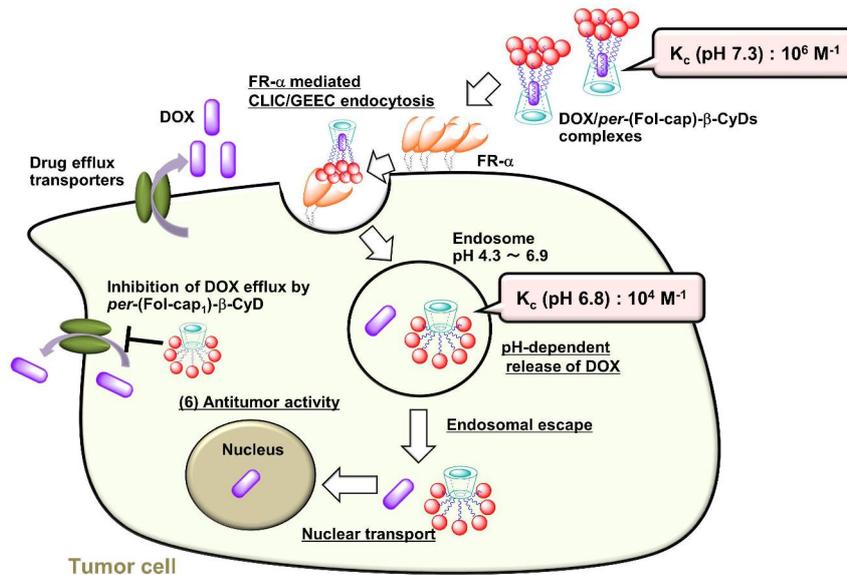


図2. DOX/per-(Fol-cap)- β -CyDs 複合体の抗腫瘍活性誘導機構 (推定) .

2-2) siRNA キャリアとしての PEG 化葉酸修飾デンドリマー/ α -CyD 結合体 (Fol-P α C)

2-2-1) Fol-P α C (G4)/siRNA 複合体の遺伝子発現抑制効果

まず、KB 細胞における Fol-P α C (G4) の遺伝子発現抑制効果を検討した。なお、用いた siRNA は、がん細胞において発現が亢進している Polo-like kinase-1 (PLK1) に対する siRNA (siPLK1) を用いた。その結果、Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体は、KB 細胞において優れた RNAi 効果を有することが示唆された。

2-2-2) Fol-P α C (G4)/siRNA 複合体の遺伝子発現抑制効果に及ぼす血清の影響

通常、非ウイルスベクターの siRNA 導入効率は、血清存在下で低下することが知られている。これは、キャリア/siRNA 複合体への血清タンパク質の非特異的な吸着により、キャリア/siRNA 複合体の解離、血清中の RNA 分解酵素 (RNase) による RNA 分解などに起因する。しかしながら、*in vivo* において RNAi 効果を誘導するためには、血清存在下でも高い RNAi 効果を保持する必要がある。そこで、Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体の遺伝子発現抑制効果に及ぼす血清 (FBS) の影響を検討した。その結果、Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体の遺伝子発現抑制効果は FBS の添加濃度依存的に低下したが、FBS 50% 添加時でも配列特異的な抑制効果を示したことから、Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体は血清耐性能を少なくとも一部有する可能性が示唆された。

2-2-3) Fol-P α C (G4)/siRNA 複合体の *in vivo* 抗腫瘍活性

次に、Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体の *in vivo* 抗腫瘍効果について検討した。実験は、2 日前から RPMI 1640 (Folic acid-free) 培地で培養した Colon-26 細胞を後肢に移植した担がんマウス (BALB/c, 雄性) を用い、腫瘍の長径が 10 mm に到達したマウスの尾静脈内に Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体を週に 2 回投与後の腫瘍体積を測定した。その結果、Fol-P α C (G4)/siPLK1 複合体投与群のマウスは、腫瘍の成長が著しく抑制されることが示された。一方、コントロールである Fol-P α C (G4)/siGL2 複合体は、腫瘍の成長を抑制しなかった。これらの結果より、Fol-P α C (G4) は、担がんマウスにおいて siPLK1 を挿入可能なことが示唆された。

以上、本章で得られた知見を基に、Fol-P α C (G4)/siRNA 複合体のがん細胞選択的遺伝子発現抑制効果誘導機構の推定図を図 3 に示す。Fol-P α C (G4)/siRNA 複合体は、①Fol-PEG 残基導入による血清中での安定性の向上、②弱い正電荷、ナノサイズ (約 120 nm) の粒子形成および Fol-PEG 残基によるがん細胞表面の FR への結合による、FR を介した siRNA の細胞内取り込み、③デンドリマーによるプロトンスポンジ効果および α -CyD によるエンドソーム膜破壊効果による siRNA の細胞質中へのリリース、④siRNA の細胞質中への局在化、⑤Fol-PEG 残基導入に伴う細胞質中にお

けるキャリアからの siRNA の遊離促進効果, などの要因が総合的に関与して, 結果として⑥配列特異的な遺伝子発現抑制効果を示すことが示唆された。

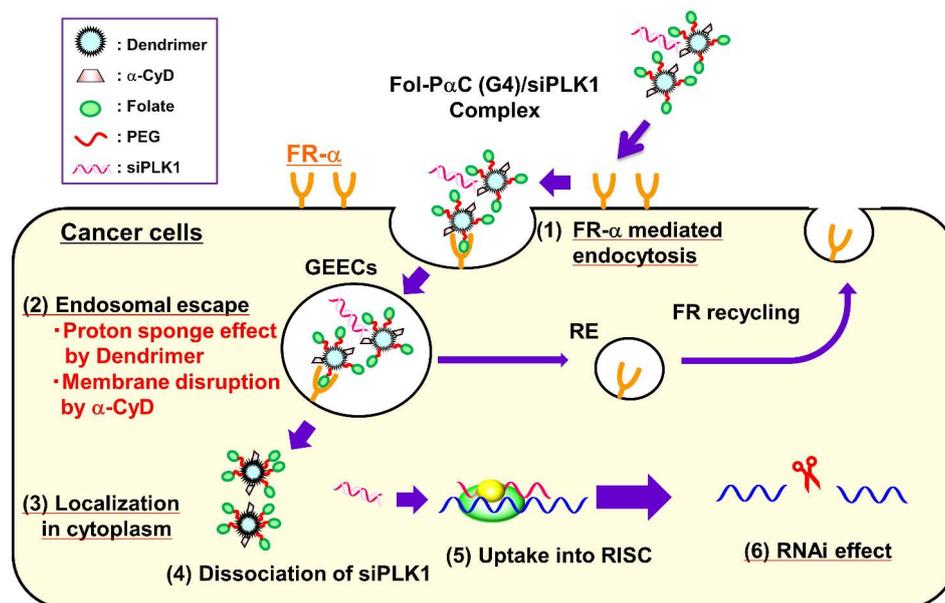


図 3. Folate-P α C (G4)/siPLK1 複合体のがん細胞選択的 RNAi 効果 (推定)。

共同研究者

本研究の共同研究者は, ナノデックス株式会社の服部憲治郎氏である。最後に, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Onodera, R., Motoyama, K., Okamatsu, A., Higashi, T., Kariya, R., Okada, S. & Arima, H. : Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **452** : 116-123, 2013.
- 2) Motoyama, K., Onodera, R., Tanaka, N., Kameyama, K., Higashi, T., Kariya, R., Okada, S. & Arima, H. : Evaluation of antitumor effect of folate-conjugated methyl- β -cyclodextrin for melanoma. *Biol. Pharm. Bull.*, **38** : 374-379, 2015.
- 3) Onodera, R., Motoyama, K., Okamatsu, A., Higashi, T. & Arima, H. : Potential use of folate-appended methyl- β -cyclodextrin as an anticancer agent. *Sci. Rep.*, **3** : 1104, 2013.
- 4) Onodera, R., Motoyama, K., Tanaka, N., Ohyama, A., Okamatsu, A., Higashi, T., Kariya, R., Okada, S. & Arima, H. : Involvement of autophagy in antitumor activity of folate-appended methyl- β -cyclodextrin. *Sci. Rep.*, **4** : 4417, 2014.
- 5) Motoyama, K., Onodera, R., Okamatsu, A., Higashi, T., Kariya, R., Okada, S. & Arima, H. : Potential use of the complex of doxorubicin with folate-conjugated methyl- β -cyclodextrin for tumor-selective cancer chemotherapy. *J. Drug Target*, **22** : 211-219, 2014.
- 6) Okamatsu, A., Motoyama, K., Onodera, R., Higashi, T., Koshigoe, T., Shimada, Y., Hattori, K., Takeuchi, T. & Arima, H. : Design and evaluation of folate-appended α -, β -, and γ -cyclodextrins having a caproic acid as a tumor selective antitumor drug carrier *in vitro* and *in vivo*. *Biomacromolecules*, **14** : 4420-4428, 2013.
- 7) Okamatsu, A., Motoyama, K., Onodera, R., Higashi, T., Koshigoe, T., Shimada, Y., Hattori, K., Takeuchi, T. & Arima, H. : Folate-appended β -cyclodextrin as a promising tumor targeting carrier for antitumor drugs *in vitro* and *in vivo*. *Bioconjug. Chem.*, **24** : 724-733, 2013.

- 8) Arima, H., Arizono, M., Higashi, T., Yoshimatsu, A., Ikeda, H., Motoyama, K., Hattori, K., Takeuchi, T., Hirayama, F. & Uekama, K. : Potential use of folate-polyethylene glycol (PEG)-appended dendrimer (G3) conjugate with α -cyclodextrin as DNA carriers to tumor cells. *Cancer Gene Ther.*, **19** : 358-366, 2012.
- 9) Arima, H., Yoshimatsu, A., Ikeda, H., Ohyama, A., Motoyama, K., Higashi, T., Tsuchiya, A., Niidome, T., Katayama, Y., Hattori, K. & Takeuchi, T. : Folate-PEG-appended dendrimer conjugate with α -cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA delivery carrier. *Mol. Pharm.*, **9** : 2591-2604, 2012.