

オリゴアルギニン固定化高分子と生体膜との相互作用の科学的検証

摂南大学薬学部薬剤学研究室

佐久間 信至

We have been investigating cell-penetrating peptide-linked polymers as a new class of penetration enhancers. Cell-penetrating peptides are cationic oligopeptides such as oligoarginine and penetratin and they are internalized into cells via macropinocytosis. We designed a novel polymer: poly (N-vinylacetamide-co-acrylic acid) (PNVA-co-AA) modified with oligoarginine, with the expectation that the polymers would enable poorly membrane-permeable molecules physically mixed with them to effectively penetrate cell membranes without their concomitant cellular uptake. Here, we evaluated the performance of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA on cell membranes. When cultured Caco-2 cells were incubated with 5(6)-carboxyfluorescein (CF), about 0.1% of applied CF was internalized into the cells during a 30-min experiment. This poor membrane permeability was dramatically enhanced by the D-octaarginine-linked polymers. A similar enhancement was observed when anionic CF was substituted with cationic atenolol and nonionic FITC-dextran. None of the individual components had any influence on CF uptake, demonstrating that only D-octaarginine anchored chemically to the polymeric platform enhanced the membrane permeation of CF. The polymer-enhanced CF uptake was consistently high even when the incubation time was extended to 120 min. Confocal laser scanning microphotographs of cells incubated with D-octaarginine-linked polymers bearing rhodamine red demonstrated that the cell outline was stained with red fluorescence. The polymer-enhanced CF uptake was significantly suppressed by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride, which is an inhibitor of macropinocytosis. Results indicated that D-octaarginine-linked polymers remained on the cell membrane and poorly membrane-permeable molecules were continuously internalized into cells mainly via macropinocytosis repeated for the individual peptidyl branches in the polymer backbone without the concomitant cellular uptake of the polymers.

1. 緒言

薬物は、さまざまな経路を介して生体に投与される¹⁾。経口、経鼻などの非侵襲的ルートを通じて生体に投与された薬物は、膜透過過程を経て全身循環血へ移行し、作用部位へ運ばれた後、治療効果を発揮する。しかし、生体膜は不必要な分子の侵入を防ぐ障壁であり、生体にとって異物である薬物の膜透過性は概して低い。

膜透過促進は、コントロールドリリース、ターゲティングと並ぶDDS研究の主課題である²⁾。低膜透過性分子の細胞膜透過性を改善して細胞内へ効率的にデリバリーするDDS的手法は、脂溶性の改善やトランスポーターによる認識などを利用したプロドラッグ、吸収促進剤などを用いて共存する低膜透過性分子の膜透過性を改善する物理混合物に大別される³⁻⁴⁾。現状、実質的な選択肢は前者であり、後者については、膜透過促進剤としてカプリン酸ナトリウムを処方したアンピシリン及びセフトゾキシムの坐剤が上市されているのみである⁵⁾。一方、前者についても、技術の普遍性を欠く限定的なものであり、膜透過促進技術の開発は困難を極めている。

このような中、現状を打破する可能性を秘めたDDSキャリアとして、HIVウイルスの感染機構の研究中に見出された細胞膜を容易に透過するタンパク質をベースに開発された膜透過ペプチドが精力的に研究されている⁶⁾。膜透過ペプチドは塩基性アミノ酸を多く含む10残基程度のカチオン性オリゴペプチドであり、代表的なものとしてオリゴアルギニン、ペネトラチンなどが知られている。これらのペプチドは、主にマクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれる⁷⁾。マクロピノサイトーシスとは、細胞が本来備えている貪食作用の1つであり、負電荷の細胞膜表面との静電的相互作用により膜表面に濃縮された正電荷の分子が細胞内に取り込まれる現象をいう (Fig. 1)。

膜透過ペプチドを用いた細胞膜透過促進手法に関して、低膜透過性分子を膜透過ペプチドに化学結合させたプロドラッグが広く研究されている⁸⁾。この手法の場合、細胞膜を透過しない核酸も細胞内にデリバリーできることが報告されている。一方、細胞内でプロドラッグからペアレントドラッグが放出されなければ薬効は発現せず、この点が本手法の解決すべき課題となっている。負電荷の低膜透過性分子と正電荷の膜透過ペプチドを静電的に相互作用させた物理混合物も研究されている⁹⁾。調製方法は簡便であるが、膜透過促進作用を獲得するためには静電的相互作用が不可欠であり、負電荷の低膜透過性分子に限定された手法である。さらに、膜透過ペプチドが低膜透過性分子とともに細胞内に取り込まれた時点で膜透過促進作用が消滅するため、同分子の持続的な取り込みが期待できない。膜透過ペプチドを表面に固定化した微粒子に低膜透過性分子を内包させ



Performance of oligoarginine-linked polymers physically mixed with poorly membrane-permeable molecules on cell membranes

Shinji Sakuma

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University

たキャリアも研究されている¹⁰⁾。ウイルスベクターに代わる安全な遺伝子デリバリーキャリアとして期待されているが、導入効率の向上が解決すべき課題となっている。

このような現況下、我々は、オリゴアルギニンなどを側鎖に化学結合させたカチオン性オリゴペプチド固定化高分子を設計・合成し、『低膜透過性分子と混合して生体膜上に適用するだけで、膜上に留まる同高分子により繰り返し誘導されるマクロピノサイトーシスを介して、共存する低膜透過性分子のみの膜透過が促進される』ユニークな機構に基づく膜透過促進剤として同高分子の開発を進めている¹¹⁻¹³⁾。具体的には、N-vinylacetamide (NVA) と acrylic acid (AA) のランダム共重合体で、生体適合性の優れる poly (N-vinylacetamide-co-acrylic acid) (PNVA-co-AA) をプラットフォームとして用いたオリゴアルギニン固定化高分子 (Fig. 2) を合成し、研究を進めている。既に我々は、マウスを用いた *in vivo* 経鼻吸収実験及び *in vitro* 細胞取り込み実験を通して、オリゴアルギニン固定化高分子がインスリンの経鼻吸収を促進して血糖降下作用を増強すること、同高分子が FITC-デキストランの Caco-2 細胞内への取り込みを促進することを証明している¹¹⁾。また、粘膜投与型ワクチンの抗原キャリアとしてのオリゴアルギニン固定化高分子の可能性を検証し、同高分子とタンパク抗原をマウス鼻腔内に複数回投与することにより、抗原特異的な血清中の IgG に加え、鼻腔内の分泌型 IgA も誘導されることを明らかにしている¹³⁾。

オリゴアルギニン固定化高分子のオリゴアルギニン鎖は、Fig. 3 に示す機構 (作業仮説) に基づき、細胞が本来備えている貪食作用の1つのマクロピノサイトーシスを誘導す

る。低膜透過性分子を同高分子と混合して生体膜上に適用すると、ペプチド鎖の近くに存在する低膜透過性分子は偶発的に細胞内に取り込まれる。オリゴアルギニン固定化高分子に対するマクロピノサイトーシスは他点で同時起こるため、同高分子自体は細胞内に取り込まれず、膜透過促進作用は持続する。比較的少量の促進剤の添加で、安全かつ効率的に薬物の膜透過を促進するアイデアである。本項では、現状で最も強い膜透過促進作用が確認されている D-オクタアルギニン固定化高分子と生体膜との相互作用の検証を通して、同高分子の膜透過促進機能を定量化するとともに、同高分子の膜透過促進機構の解明を試みた結果を報告する。

2. 実験

2.1 D-オクタアルギニン固定化高分子の合成

PNVA-co-AA への D-オクタアルギニンの固定化方法を Fig. 4 に示す。PNVA-co-AA の脱塩後、N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) を用いて PNVA-co-AA のカルボキシル基を活性化し、N-hydroxysuccinimide と反応させ、PNVA-co-AA N-hydroxysuccinimide ester とした。次に、N-oxy succinimide 基と置換することによって、PNVA-co-AA のカルボキシル基に D-オクタアルギニンのアミノ基を結合させた。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた実験に用いるため、D-オクタアルギニン固定化高分子に蛍光色素のローダミンレッドを導入した高分子も合成した。本研究で用いられた D-オクタアルギニン固定化高分子の物性を Table 1 にまとめる。

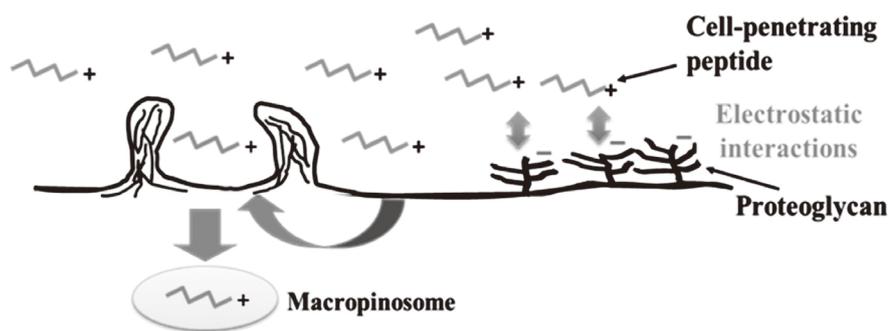


Fig. 1 Schematic representation of macropinocytosis.

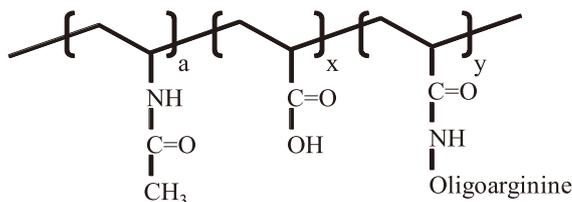


Fig. 2 Chemical structure of oligoarginine-linked poly (N-vinylacetamide-co-acrylic acid) (PNVA-co-AA).

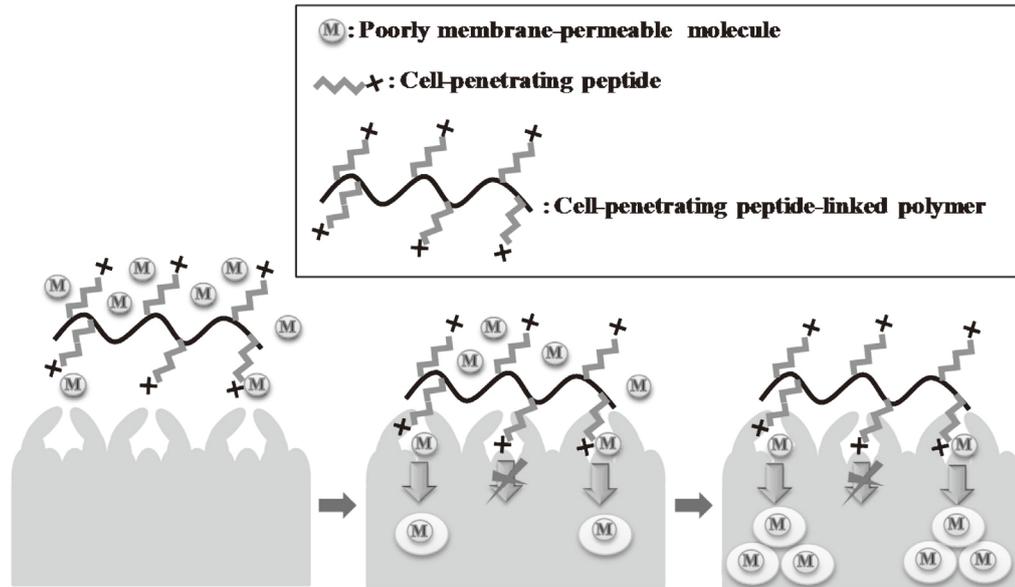


Fig. 3 Schematic representation of the cellular uptake of poorly membrane-permeable molecules physically mixed with oligoarginine-linked polymers.

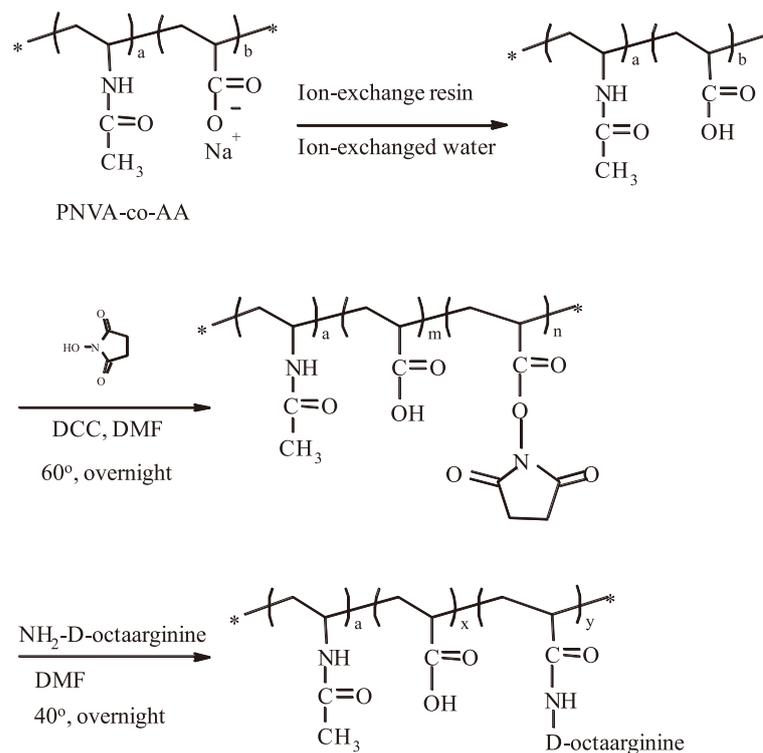


Fig. 4 Synthesis of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA.

Table 1 Characterization of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA used in this study.

Polymers	Content of the respective units ^a			Mw (kDa) ^c
	NVA	AA	D-Octaarginine ^b	
D-Octaarginine-linked PNVA-co-AA	70	19	11	1600
D-Octaarginine-linked PNVA-co-AA bearing rhodamine red	70	9	21	1600

^aPercentage of the number of the respective monomer units to the total number of monomer units

^bThe monomer units of acrylic acid grafting D-octaarginine

^cWeight-average molecular weight of original PNVA-co-AA

2.2 In vitro 細胞実験

2.2.1 Caco-2細胞の培養及び細胞懸濁液の調製

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEN) 溶液に fetal bovine serum (FBS) を10%、antibiotic-antimycotic mixture (penicillin-streptomycin) を0.5%、non-essential amino acidsを1%となるように加え、培養液を調製した。

Caco-2細胞を 6×10^4 cells/mLの濃度でflaskに播種し、37°C、95% O₂/5% CO₂の条件下で培養した。0.25% trypsin-EDTAを用いて細胞をflaskから剥離させた後、 1×10^6 cells/0.30mLの濃度で培養液に懸濁させた。遠心分離後、沈殿した細胞をPBS210μL中に懸濁させた。

2.2.2 In vitro 細胞内取り込み実験

低膜透過性のモデル化合物として、アニオン性の5(6)-carboxyfluorescein (CF)、カチオン性のatenolol及びノニオン性の分子量4000のFITC-dextran (FD-4)を用いた。PBSを溶媒として用いて、CF水溶液(0.1–5mM)、atenolol水溶液(2.5mM)、FD-4水溶液(2mM)、膜透過促進剤(D-オクタアルギニン固定化高分子あるいはその構成成分、0.1–2mg/mL)を含む水溶液、阻害剤(5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA, 1mM)、chlorpromazine (CPZ, 1mM)あるいはmethyl-β-cyclodextrin (MβCD, 20 mM))を含む水溶液を別々に調製した。2.2.1の細胞懸濁液210μLにモデル化合物水溶液、膜透過促進剤水溶液、阻害剤水溶液を30μLずつ添加した(コントロール実験で一部の水溶液を添加しないときは、代わりにPBSを同量添加)。37°C、95% O₂/5% CO₂の条件下で30–120分間インキュベートした後、遠心分離により細胞を分取した。PBSで数回洗浄することにより細胞内に取り込まれていないフリーのモデル化合物を除いた後、細胞をPBS200μLに分散させた。細胞を破碎し、モデル化合物を抽出した後、その濃度をHPLCにより求め、細胞内に取り込まれたモデル化合物の割合(細胞内に取り込まれたモデル化合物の量/細胞にアプライしたモデル化合物の量)を算出した。

2.2.3 D-オクタアルギニン固定化高分子と細胞との相互作用

ロータミンレッドを導入したD-オクタアルギニン固定化高分子をPBSに溶解させ、2mg/mLとした。2.2.1の細胞懸濁液210μLに蛍光性高分子水溶液30μL及びPBS60μLを添加した。37°C、95% O₂/5% CO₂の条件下で30分間インキュベートした後、遠心分離により細胞を分取した。PBSで数回洗浄することにより細胞に付着していないフリーの蛍光性高分子を除いた後、細胞をPBS200μLに分散させた。PBSを10v/v%ホルムアルデヒド水溶液に置換し、細胞を固定化した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。

3. 結果と考察

3.1 D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機能の定量化

CFは分子内にカルボキシル基を持つ分子量376.3の蛍光物質である。高水溶性であることから膜透過性は極めて低く、主に細胞間隙を透過して細胞内にわずかに取り込まれる程度である。まず、D-オクタアルギニン非存在下、CF濃度を変えて、Caco-2細胞とCFを30分間インキュベートした後に細胞内に取り込まれたCFの量を求めた。その結果、CF濃度に関係なく、添加したCFの約0.1%が細胞内に取り込まれることが確認された(データ省略)。本実験ではCaco-2細胞を浮遊状態で用いており、細胞間隙ルートは関与しないことから、ごくわずかのCFが受動拡散により細胞内に取り込まれたと考えられた。D-オクタアルギニン固定化高分子の添加により細胞内に取り込まれるCF量が増加することが予想されることから、細胞懸濁液中のCF濃度を低濃度の0.01 mMに固定し、以後の実験を行った。

Zaroらは、オリゴアルギニンの細胞内取り込みに要する時間は15分以下であることを報告している¹⁴⁾。高分子に固定化されたオリゴアルギニンは細胞内に取り込まれないと我々は考えていることから、インキュベーション時間を30分に固定し、CFの細胞内取り込みに及ぼすD-オクタアルギニン固定化高分子の濃度の影響を検討した。その結果、Fig. 5に示すように、濃度依存的に膜透過促進作用は明らかに強くなった。細胞懸濁液中のD-オクタアルギニン固定化高分子の濃度が0.2mg/mLになるように調製したときのCFの細胞内取り込み量は、同高分子未添加時の20倍以上であった。一方、D-オクタアルギニン固定化高分子の濃度を0.01mg/mLまで低下させると、CFの細胞内取り込み促進効果は消失した。以上の結果から、D-オクタアルギニン固定化高分子の濃度を0.2mg/mLに固定し、実験を継続した。

インキュベーション時間を30分とし、D-オクタアルギニン固定化高分子の構成成分であるD-オクタアルギニン、PNVA-co-AA、両者の物理混合物によるCFの細胞内取り込み促進効果を検討した。結果をFig. 6に示す。膜透過促進剤を添加せずにCFをCaco-2細胞と30分間インキュベートしたとき、アプライしたCFの約0.1%が細胞内に取り込まれた。D-オクタアルギニン固定化高分子の添加により、CFの細胞内取り込みは再現性よく促進され、30分間にアプライしたCFの約2.0%が取り込まれた。一方、D-オクタアルギニン固定化高分子の構成成分を同濃度で添加した場合、いずれの条件においてもCFの細胞内取り込みはまったく促進されなかった。以上の結果から、高分子に固定化されたD-オクタアルギニンのみが膜透過促進

効果を示すことが明らかとなった。

次に、アニオン性のCF、カチオン性のatenolol及びノニオン性のFD-4を用いて、D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進作用に及ぼす低膜透過性分子の電荷の影響を検討した。後二者は正に帯電したD-オクタアルギニン固定化高分子と静電的に相互作用しないと考えられる。Table 2に示すように、低膜透過性分子の電荷に関わらず、D-オクタアルギニン固定化高分子は共存する低膜透過性分子の膜透過を促進することが確認された。このことから、低膜透過性分子とD-オクタアルギニン固定化高分子との間の静電的相互作用は、本システムにおいて必要条件でないことが示された。

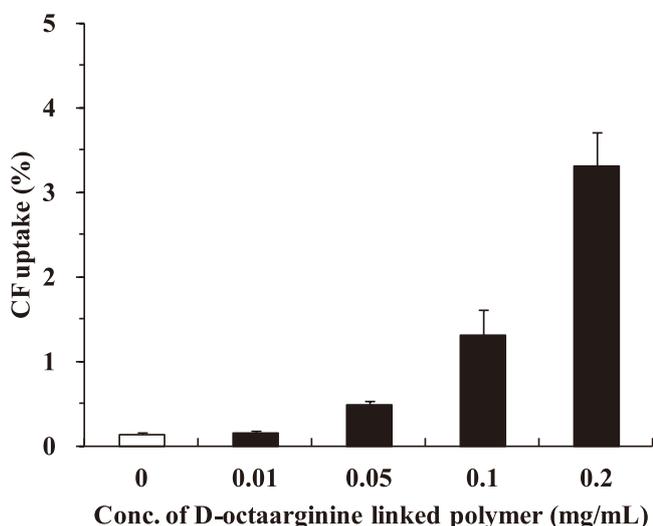


Fig. 5 Cellular uptake of CF in the absence (□) and presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (■) at different concentrations. Caco-2 cells were incubated with CF (0.01 mM) and the polymer (0.01–0.2 mg/mL) in PBS at 37°C for 30 min. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3).

3.2 D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構の解明

我々の期待に反してD-オクタアルギニン固定化高分子が細胞内に取り込まれるのであれば、同高分子が低膜透過性化合物とともに細胞内に取り込まれた時点で膜透過促進作用が終結し、継続的な取り込みが観察されないと考えられる。そこで、インキュベーション時間を120分まで延長し、細胞内に取り込まれるCFの量の経時変化を観察した。仮に、30分間にD-オクタアルギニン固定化高分子のほとんどが細胞内に取り込まれるならば、それ以降のCFの細胞内取り込みの増加量は、同高分子の非存在下同様、受動拡散のみに依存する。Fig. 7から明らかなように、D-オク

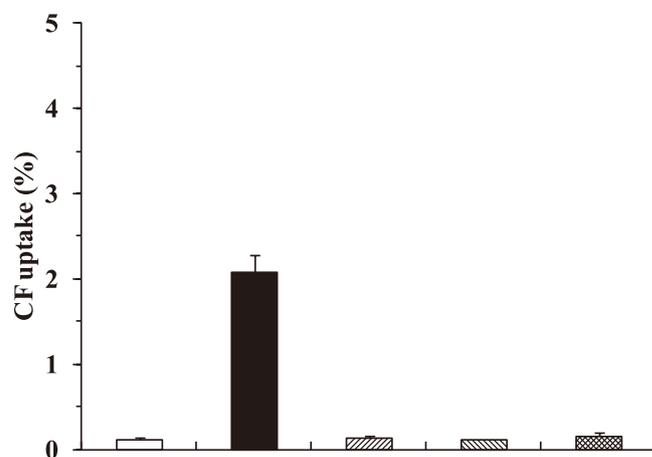


Fig. 6 Cellular uptake of CF in the absence (□) and presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (■) and its individual components (▨: D-octaarginine, ▩: PNVA-co-AA, ▧: a physical mixture of D-octaarginine and PNVA-co-AA). Caco-2 cells were incubated with CF (0.01mM) and each substance (0.2mg/mL) in PBS at 37 °C for 30 min. When the physical mixture was used, the respective concentrations of D-octaarginine and PNVA-co-AA were adjusted to 0.2mg/mL. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3).

Table 2 Effect of charges on the penetration enhancement of poorly membrane-permeable molecules in the absence and presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA.

Molecules	Charge	Concentration ^a (mM)	Cellular uptake (%) ^b	
			In the absence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA	In the presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA
CF	Anionic	0.01	0.145 ± 0.035	2.37 ± 0.48
Atenolol	Cationic	0.25	0.313 ± 0.021	1.05 ± 0.12
FD-4	Neutral	0.2	0.141 ± 0.0065	3.37 ± 0.23

^aConcentration of each molecule in cell suspension

^bThe percentage of the amount of each molecule taken up into Caco-2 cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3)

タアルギニン固定化高分子存在下、CFは継続的に細胞内に取り込まれ、減弱する傾向は観察されなかった。この結果は、D-オクタアルギニン固定化高分子が細胞外で機能し続けていることを示唆しており、低膜透過性分子と混合して生体膜上に適用するだけで、それ自体は細胞内に取り込まれずに共存する同分子のみの膜透過を促進するD-オクタアルギニン固定化高分子の機能を支持するものと判断された。

引き続き、ローダミンレッドで蛍光ラベルしたD-オクタアルギニン固定化高分子とインキュベートした後のCaco-2細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、Fig. 8に示すように、ローダミンレッドに由来する赤色蛍光は、細胞の輪郭に沿うように観察された。このデータのみでは、D-オクタアルギニン固定化高分子の細胞内取り込みがまったく起こっていないと断言できないが、大部分のD-オクタアルギニン固定化高分子は細胞膜上に滞留していると考えられた。

我々は、オリゴアルギニン固定化高分子の存在下における低膜透過性分子の膜透過促進機構として、「①1本の高

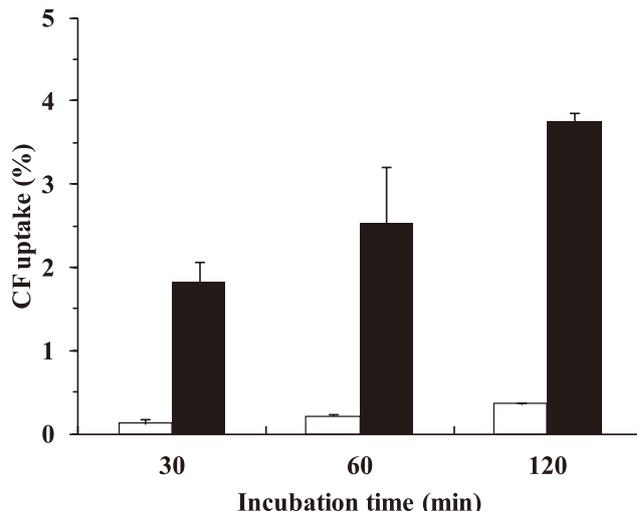


Fig. 7 Cellular uptake of CF in the absence (□) and presence (■) of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA. The incubation time was set at 30, 60, or 120 min. Caco-2 cells were incubated with CF (0.01mM) and the polymer (0.2 mg/mL) in PBS at 37 °C . After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3).

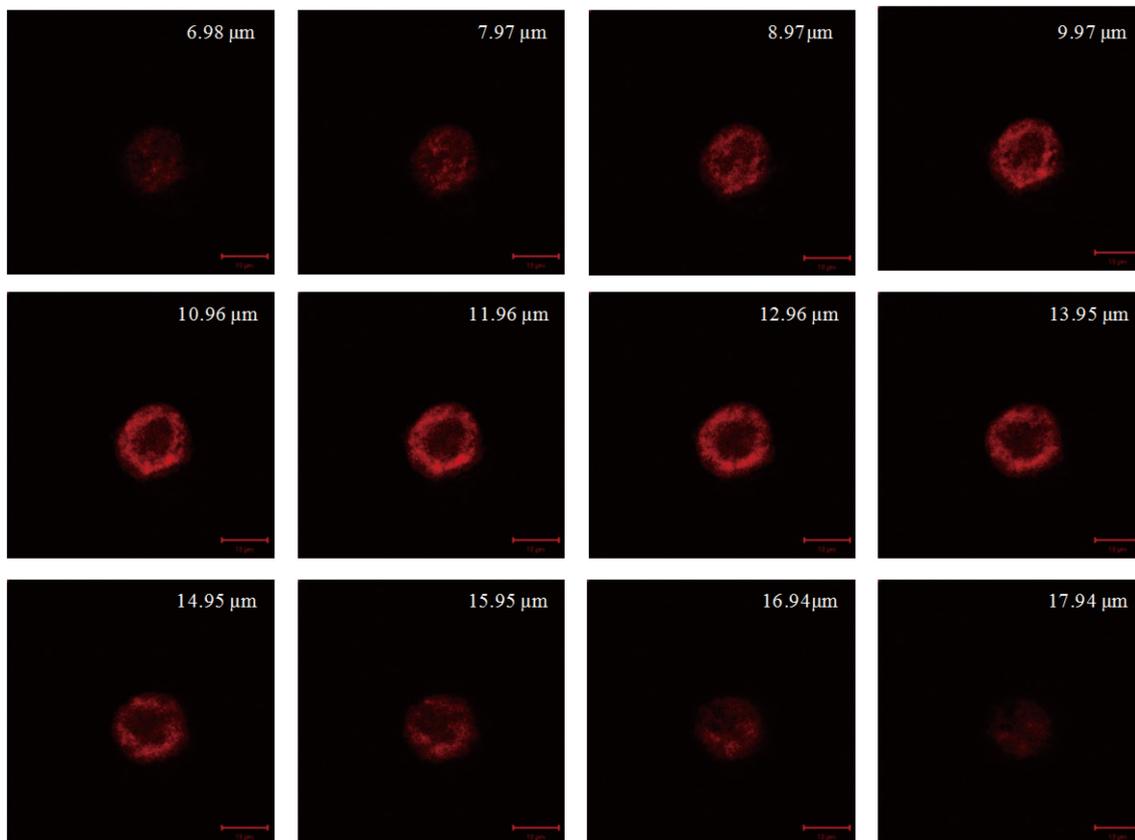


Fig. 8 Consecutive images of a Caco-2 cell captured with a confocal laser scanning microscope equipped with a helium-neon laser (543nm) (red bar: 10μm). Caco-2 cells were incubated with D-octaarginine-linked PNVA-co-AA bearing rhodamine red in PBS at 37°C for 30 min, and were fixed with formaldehyde after the removal of free fluorescent polymer. The laser was used with a primary dichroic beam-splitter. Emissions above 560 nm were detected to observe the cellular distribution of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA bearing rhodamine red. Optical sections were gathered at 1-μm intervals perpendicular to the z-axis. The dimensions of the image displayed on the monitor were set as 512 × 512 pixels.

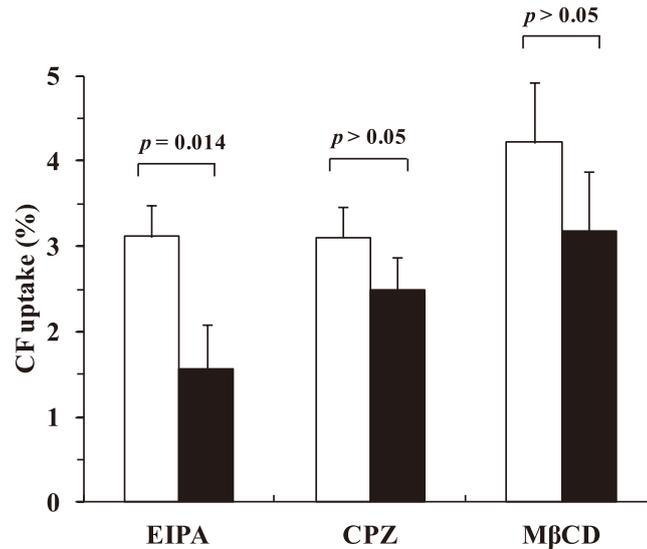


Fig. 9 Effect of inhibitors on the cellular uptake of CF in the presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA. Caco-2 cells were incubated with CF (0.01 mM) and the polymer (0.2 mg/mL) in the absence (□) and presence (■) of each inhibitor (EIPA: 0.1 mM, CPZ: 0.1 mM, MβCD: 2 mM) in PBS at 37°C for 30 min. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3).

分子鎖に固定化された多数のオリゴアルギニンに対するマクロピノサイトーシスが多点で同時に進行する。②マクロピノサイトーシス間の競合が起こるため、細胞は高分子を取り込むことができないものの、オリゴアルギニン鎖近くに存在する低膜透過性分子のみが偶発的に細胞内に取り込まれる。③細胞膜上に留まるオリゴアルギニン固定化高分子によりマクロピノサイトーシスが繰り返し誘導され、低膜透過性分子の細胞内取り込みが著しく促進される。」を提唱している。EIPAは、マクロピノソームを形成するためのNa⁺/H⁺逆輸送を阻害することによりマクロピノサイトーシスを阻害する。Fig. 9に示すように、D-オクタアルギニン固定化高分子によるCFの細胞内取り込みは、EIPAにより有意に抑制された。このことから、マクロピノサイトーシスは、D-オクタアルギニン固定化高分子存在下の低膜透過性分子の膜透過促進に明らかに関与していると判断された。さらに、代表的なエンドサイトーシスであるクラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスがD-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構に関与している可能性について、それぞれの阻害剤であるCPZ及びMβCDを用いて検討した。いずれも統計学的な有意差はなかったが、MβCD存在下におけるCFの細胞内取り込み量は約20%減少していた。二木らの研究グループは、脂質ラフト介在性エンドサイトーシスがオクタアルギニンの細胞内取り込みに寄与することを報告し、脂質ラフト介在性マクロピノサイトーシスの存在の可能性を提唱している¹⁵⁾。前述の結果は、D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構にも脂質

ラフト介在性エンドサイトーシスが関与していることを示しているのかもしれない。

4. 総括

カチオン性オリゴペプチド固定化高分子は、「それ自体は細胞内に取り込まれることなく、細胞が本来備えている貪食作用の1つのマクロピノサイトーシスを繰り返し誘導し、共存する低膜透過性分子のみの細胞膜透過を飛躍的に促進すること」を期待して設計された新規の膜透過促進剤である。同高分子の膜透過促進剤としての可能性を見出すことに成功した我々は、現在、D-オクタアルギニン固定化高分子をシーズとして、カチオン性オリゴペプチド固定化高分子の実用化を目指したトランスレーショナルリサーチを強力に推進している。単に混合して生体膜上に適用するだけで共存する低膜透過性分子を効率的に細胞内にデリバリーするだけでなく、優れた安全性及び薬物を限定しない優れた汎用性の観点からも、カチオン性オリゴペプチド固定化高分子を用いた細胞膜透過促進手法は、ライフサイエンス分野で広く受け入れられることが期待される。

(引用文献)

- 1) 橋田充：DDSとは何か—医薬品の投与経路と生体内運命—, 橋田充監修, 高倉喜信編集：図解で学ぶDDS, じほう, 2010年8月15日, pp.4-5.
- 2) 橋田充：DDSとは何か—DDSの方法論—, 橋田充監修, 高倉喜信編集：図解で学ぶDDS, じほう, 2010年8月15日, pp.6-10.

- 3) Tamai I, Tsuji A: Carrier-mediated approaches for oral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 20, 5-32, 1996.
- 4) Sakuma S, Hayashi M, Akashi M: Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 21-37, 2001.
- 5) 山本昌 : DDSの目的と技術—薬物の吸収とその制御—, 橋田充監修, 高倉喜信編集: 図解で学ぶDDS, じほう, 2010年8月15日, pp.24-27.
- 6) Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, Futaki S: Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, 598-607, 2008.
- 7) Jones AT: Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and a role in the uptake of cell penetrating peptides, *J. Cell Mol. Med.*, 11, 670-684, 2007.
- 8) Futaki S: Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 547-558, 2005.
- 9) Morishita M, Kamei N, Ehara J, Isowa K, Takayama K: A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin, *J. Control. Release*, 118, 177-184, 2007.
- 10) Kogure K, Akita H, Yamada Y, Harashima H: Multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral gene delivery system, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, 559-571, 2008.
- 11) Sakuma S, Suita M, Masaoka Y et al.: Oligoarginine-linked polymers as a new class of penetration enhancers, *J. Control. Release*, 148, 187-196, 2010.
- 12) Sakuma S, Suita M, Yamamoto T et al.: Performance of cell-penetrating peptide-linked polymers physically mixed with poorly membrane-permeable molecules on cell membranes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81, 64-73, 2012.
- 13) Sakuma S, Suita M, Inoue S et al.: Cell-penetrating peptide-linked polymers as carriers for mucosal vaccine delivery, *Mol. Pharmaceutics*, 9, 2933-2941, 2012.
- 14) Zaro JL, Shen WC: Evidence that membrane transduction of oligoarginine does not require vesicle formation, *Exp. Cell Res.*, 307, 164-173, 2005.
- 15) Noguchi H, Matsumoto S, Okitsu T et al.: PDX-1 Protein Is Internalized by Lipid Raft-Dependent Macropinocytosis, *Cell Transplant.*, 14, 637-645, 2005.