

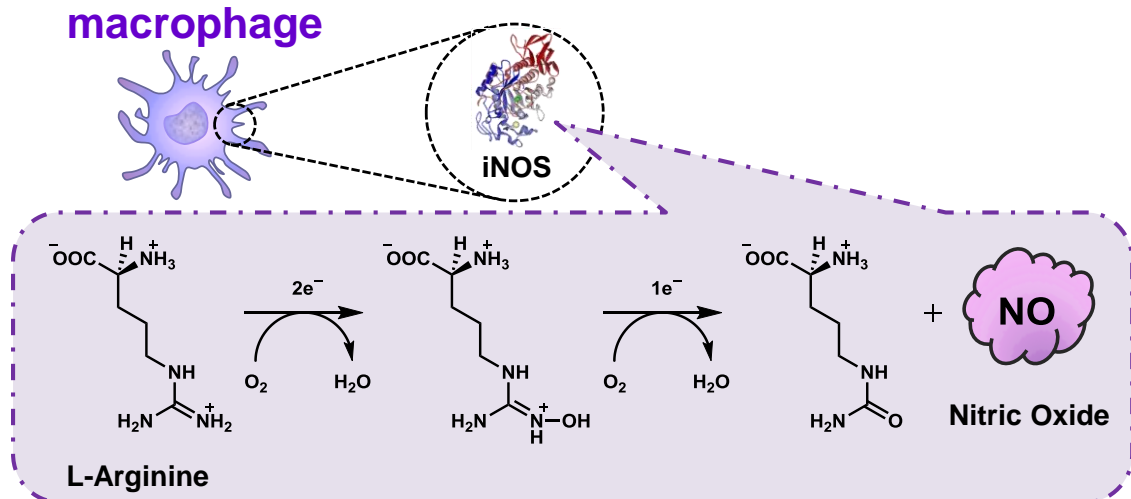
専攻名	物性・分子工学
学籍番号	201130111
学生氏名	工藤 心平
学位名	博士 (工学)
指導教員	長崎 幸夫 印

博士論文題目 Preparation of Core-shell-type Polyion Complex Micelles  
Containing Poly(L-Arginine) Segments in Block Copolymers  
for Novel Cancer Immunotherapy  
(新規がん免疫療法に向けたポリ(L-アルギニン)セグメントを含むブロック共重合  
体から成るコアシェル型ポリイオンコンプレックスミセルの調製)

## 1. 研究背景

次世代のガン治療法として、ガン免疫療法 (Cancer immunotherapy)が近年大きな注目を集めている<sup>1)</sup>。腫瘍組織にはガン細胞のみならず、多くの種類の免疫細胞が浸潤しておりガン細胞の増殖を抑制するよう働きかけている。しかしながら、腫瘍が成長するにつれてガン細胞は Tumor Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )などのサイトカインを分泌することでこのような免疫細胞の活性を著しく下げてしまう。この腫瘍組織内の免疫細胞を再び活性化して抗腫瘍活性を高める治療法がガン免疫療法である。腫瘍組織内の免疫系の中で、ガン細胞を直接攻撃して細胞死 (アポトーシス)を誘導する免疫細胞には細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)、ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)、そしてマクロファージが挙げられる。現在、米国食品医薬品局(FDA)が承認した免疫療法による治療薬には CTL や NK 細胞を活性化するインターロイキン-2(IL-2)があるが、ガンへ特異的に取り込まれる機構を持たず、現状では過剰量を全身投与しているため、重篤な毒性が確認されている。また、ガン細胞が TGF- $\beta$  を分泌し始めたガン環境では免疫細胞の活性化は限られてしまうことも解決しなければならない問題である。

そのような背景のもと、本研究ではこれらの2つの問題点を克服するような新しいガン免疫療法のストラテジーを構築することを目的とした。すなわち、ナノ粒子を用いたドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system, DDS)の概念を用いて腫瘍組織に存在する免疫細胞の抗腫瘍活性を高めることである。上述した直接ガン細胞を攻撃する3種類の免疫細胞のうち、本研究ではマクロファージに注目した。腫瘍組織に存在するマクロファージは細胞内に inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)酵素を発現しており、アルギニンを基質とすることで一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO)を産生する(Figure 1)。この NO は脂溶性のガス状分子であり、マクロファージから産生されるとすぐに組織中に拡散しガン細胞内に侵入する。ガン細胞内に侵入した高濃度の NO は DNA を損傷させることでアポトーシスを誘導する<sup>2)</sup>。すなわちマクロファージによる抗腫瘍活性を仲介する物質は NO である。マクロファージによるこの NO 産生量はアルギニン濃度が律速段階になっていることが報告されているため<sup>3)</sup>、腫瘍内にアルギニンを大量にデリバリー出来ればマクロファージによる抗腫瘍活性が高まるのではないかという仮説が本研究のモチベーションとなっている。

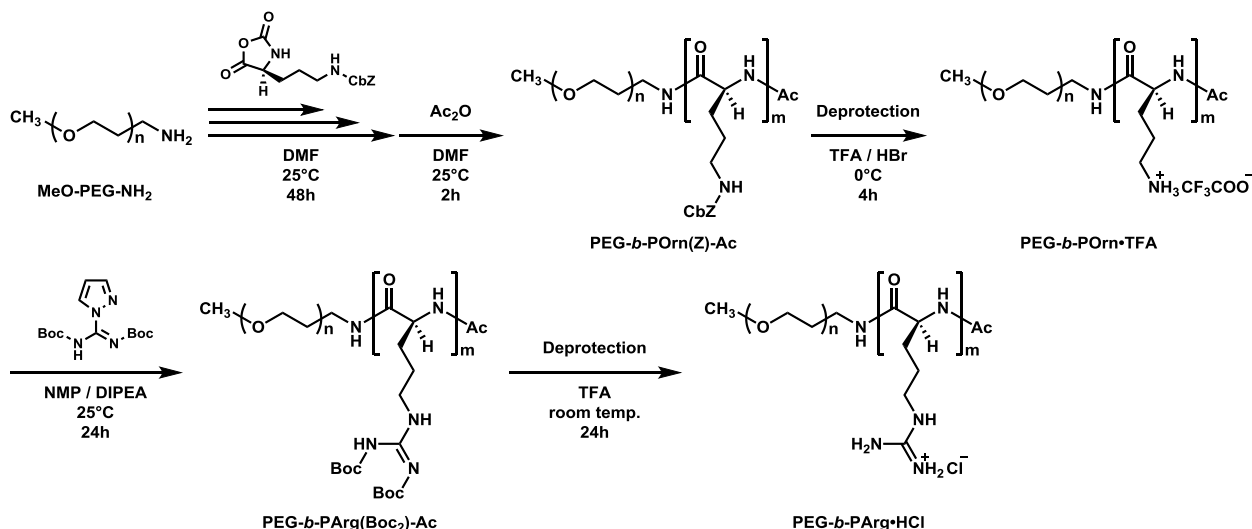


**Figure 1** Schematic illustration of NO generation mechanism from macrophage.

腫瘍組織に効率的にアルギニンを送達するために、本研究では DDS キャリアの技術を応用する。ガン治療を目指した DDS キャリアには腫瘍組織周辺の微小血管環境を利用した設計が必要となる。ガン組織はその増殖が急速であるため、栄養を確保するよう血管新生が過剰に起こっている。この血管は数百 nm から数  $\mu\text{m}$  の空隙が存在し、血液の透過性が亢進していることが知られている。またガン組織はリンパ回収系が欠如しており、異物を排出しにくい性質を持っている。以上の点より、血中を長期的に循環することのできるタンパク質、高分子化合物やナノ粒子は高効率でガン組織へ集積し、長期的に組織内に滞留することが出来る。この性質は EPR 効果 (Enhanced permeability and retention effect) と呼ばれる<sup>4)</sup>。以上の観点から、血中で安定なナノ粒子にアルギニンを担持させることでガン組織への特異的な集積が期待できる。このようなアルギニンキャリアとして、最初に考えられるのは表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾したリポソームへのアルギニン内包であるが、アルギニンは生理条件で側鎖のグアニジノ基が正電荷を有する塩基性アミノ酸であるためリポソームの膜を不安定化してしまう。このような水溶性低分子をデリバリーするために、本研究では PEG とポリアルギニンのブロック共重合体 PEG-*b*-poly(L-Arginine) (以下、PEG-*b*-P(L-Arg)) を合成し、負電荷をもつポリアニオンとの静電相互作用によって形成されるコアシェル型のポリイオンコンプレックスミセル (Polyioncomplex micelle, PIC ミセル) を調製した<sup>5)</sup>。本研究で調製した PIC ミセルは生理条件下で優れた安定性を示し、血中タンパクとの相互作用を回避した。また、PIC ミセルをマクロファージとともに共培養したところ多量の取り込みが認められた後、NO 産生量が有意に増加することがわかった。これはマクロファージ内でポリアルギニンが分解され、アルギニン濃度が上昇したことを示唆する。さらに PIC ミセルを担ガンマウスに全身投与し、PIC ミセルが腫瘍成長に与える影響を評価した。本論文では、この新規ガン免疫療法を一から構築したことを報告する。

## 2. PEG-*b*-P(L-Arg) ブロック共重合体の合成

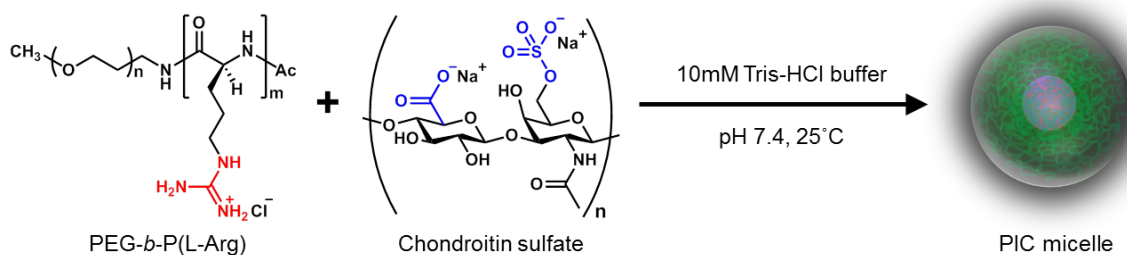
ポリアルギニンはありふれたホモペプチドであるが、副産物がなく、かつ、分子量分布の小さい、制御されたポリアルギニンセグメントを含むブロック共重合体の合成報告はわずか 1 報のみである<sup>6)</sup>。本研究では PEG-*b*-P(L-Arg) の前駆体である PEG-*b*-poly(L-Ornithine) (以下、PEG-*b*-P(L-Orn)) を合成し、POrn の側鎖の  $\delta$ -アミノ基をグアニジノ基に変換することで PEG-*b*-P(L-Arg) を合成した (Figure 2)。



**Figure 2** Synthetic scheme of PEG-*block*-poly(L-Arginine) block copolymer (PEG-*b*-P(L-Arg)).

重合度と分子量分布がコントロールされたホモペプチドは、アミノ酸無水物 ( $\alpha$ -amino acid *N*-carboxyanhydride, NCA)を開環リング重合することで得られる<sup>7)</sup>。本研究では  $\omega$ -アミノ基末端 PEG マクロイニシエーター (PEG-NH<sub>2</sub>)による NCA 開環重合によって PEG とポリペプチドのブロック共重合体を得た。Fuchs-Farthing 法で合成した *N* <sup>$\delta$</sup> -benzyloxycarbonyl-L-ornithine-NCA (Orn(Z)-NCA)をモノマーとして開環重合を行い、PEG-*b*-P(L-Orn(Z))ブロック共重合体を合成した。ポリペプチド側鎖の Z 保護基の脱保護によって得た PEG-*b*-P(L-Orn)の側鎖にある  $\delta$ -アミノ基に対してグアニジノ化試薬である *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine (PCX(boc<sub>2</sub>))と反応させることで非常に温和な条件で 97%以上の定量的なグアニジノ基の導入が確認された。これは従来用いられてきたグアニジノ化試薬である pyrazole-1-carboxamidine hydrochloride (PCX·HCl)よりも反応性に優れ、副反応も起こらない改善された導入法であることがわかった<sup>8)</sup>。最後に、PEG-*b*-P(L-Arg(boc<sub>2</sub>))の Boc 保護基の脱保護によって PEG-*b*-P(L-Arg)を塩酸塩として回収した (PEG:  $M_n=12,000$ , P(L-Arg):  $M_n=5,800$ )。<sup>1</sup>H-NMR より、得られた PEG-*b*-P(L-Arg)の重合度は前駆体である PEG-*b*-P(L-Orn)から変化がないことから脱保護過程でペプチド主鎖の開裂は起きていないことを確認した。また GFC ダイアグラムより分子量分布( $M_w/M_n$ )は 1.03 と小さく、非常に制御されたブロック共重合体が合成可能な経路であることがわかった。ジグアニジンのような側鎖に生じる副産物がなく、分子量分布が制御されたポリアルギニンと PEG とのブロック共重合体の合成報告はこれまでないため、本研究で初めて合成を確認した。

### 3. コアシェル型ポリイオンコンプレックスミセル(PIC ミセル)の調製と安定性評価



**Figure 3** Schematic illustration of PIC micelle composed of PEG-*b*-P(L-Arg) and Chondroitin sulfate (CS).

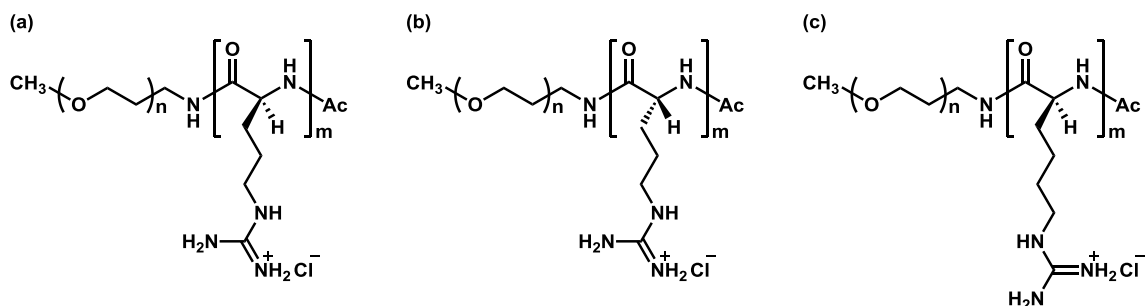
PEG-*b*-P(L-Arg)の側鎖にあるグアニジノ基は生理条件下で正電荷を帯びるためポリカチオンである。このようなポリカチオンは血中に投与しても容易に血中タンパクと相互作用してしまい、迅速に肝臓や脾臓の細網内皮系(reticuloendothelial system, RES)に非特異吸着するため、ガン組織への集積は望めない。そのような問題を解決するために、PEG-*b*-ポリカチオンとポリアニオンとの静電相互作用が駆動力となって自己組織化されるコアシェル型ポリイオンコンプレックスミセル (PIC ミセル)を調製した(Figure 3)。本研究ではポリアニオンとして、ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid, HA)とコンドロイチン硫酸 C (Chondroitin sulfate C, CS)の2種類を検討した。分子量は共に5万程度であるが、CSのほうが荷電密度は約2倍となっている。PIC ミセルはPEG-*b*-ポリカチオン水溶液とポリアニオン水溶液を混合することで調製した。この時の混合の割合は Cation/Anion ratio (C/A ratio, the residual molar ratio of the amino/guanidino groups on each block copolymer to the carboxylic/sulfo groups on each polyanion)という指標値を用いて最適な混合比を決定した。PEG-*b*-P(L-Arg)と CS によって形成される PIC ミセル (以下、PEG-*b*-PArg-CS/m)の散乱強度 (light scattering intensity, LSI)と多分散度 (Polydispersity index, PDI)および流体力学的直径 (z-averaged size)と表面電位 ( $\zeta$ -potential)の C/A 比依存を静的(Static light scattering, SLS)または動的( Dynamic light scattering, DLS)によって評価した。レイリー散乱による LSI は通常、過剰レイリー比( $\Delta R$ )に変換され、LSI が大きい値になるほど $\Delta R$  も大きな値となる。この $\Delta R$  値は測定サンプルの分子量、濃度、分極率( $\alpha$ )の2乗に比例する。分極率 $\alpha$ はガウスの法則よりサンプルの粒径の3乗に比例するため、大きな LSI が得られた場合は分子量増加・粒径増加によって PIC ミセルが形成されたことを示唆する。C/A 依存の LSI 評価実験ではサンプル濃度の影響は無視できる。また、DLS によって得られる相関関数を解析することで得られる PDI 値が 0.1 以下の時に非常に単分散なナノ粒子であることを意味する。C/A 値が 0.75-1.5 の範囲にある時、急激な LSI の増加が確認されたことからこの範囲で PIC ミセルの形成が示唆された。また、LSI の増加に伴い PDI が 0.1 以下になることから非常に単分散な PIC ミセルを形成していることがわかった。C/A=1 の時に最も SLI が大きくなったことを考えれば、この混合比で最も多くの PEG-*b*-P(L-Arg)と CS が自己組織化してマルチアゼンブリ (PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m)を形成したと考えられる。DLS によって得られる拡散係数をアインシュタイン-ストークスの式に代入して算出される z-averaged size は C/A=1 のとき、約 37 nm であった。この粒子サイズは EPR 効果によって有意に腫瘍組織への集積が期待できる大きさである。また、この時の表面電位がニュートラルであることから PIC ミセルはしっかり PEG ブラシで覆われたコアシェル型であると考えられる。PEG-*b*-P(L-Arg)と PEG-*b*-P(L-Orn)から得られる PIC ミセルを比較してみると、PEG-*b*-P(L-Arg)による PIC ミセルの粒径の方が小さいことがわかる。これは SLS 評価により、一つの PIC ミセルを構成するポリカチオンとポリアニオンの会合数の違いが原因と考えられる<sup>9)</sup>。

PIC ミセルは静電相互作用によって自己組織化しているため、血中のイオン強度やポリアニオン(主にアルブミン)によってその相互作用が弱められ、ミセルが崩壊してしまうことが解決しなければならない問題となっている<sup>10)</sup>。PIC ミセルの安定性が十分でなければ、全身投与してもせっかく形成していたミセル構造が壊れてポリカチオンがむき出しになって血中滞留性が期待できない。そこで、本研究で調製した4種類の PIC ミセルのイオン強度耐性及びウシ胎児血清(FBS)耐性を Förster Resonance Energy Transfer (FRET)によって評価した。ポリカチオンおよびポリアニオンを各々 Cy3 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 550/570 nm)、フルオレセイン ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 490/520 nm)で蛍光ラベル化したポリマーを評価に用いた。PIC ミセルを形成している状態では Cy3 及びフルオレセインはコア部にパッキングされているため、互いが非常に近距離に存在することで FRET 効率は高くなる。一方、ミセルが崩壊すると2種類の蛍光色素は離れてしまうため FRET 効率は低くなる。各 PIC ミセルを 24 時間様々な塩濃度のバッファ中でインキュベートした後、励起光 470nm にて FRET 効率を測定した。水溶液中の塩濃度が高くなるといずれの PIC ミセルの FRET 効率も低下することが確認された。しかしながらその低下の割合は PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m で最も小さく他の PIC ミセルに比べて安定であることが分かった。生理条件の 150 mM NaCl 濃度ではほとんど FRET 効率の減少が見られないことから非常に安定な PIC ミセルであることが示唆される。つまり、グアニジノ基を側鎖に有する PEG-*b*-P(L-Arg)と荷電密度の高い CS が PIC ミセルの安定性へ貢献する。同様に、

FBS 耐性も PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m では 50%FBS と 24 時間接触させてもほとんど FRET 効率の減少が見られなかった。以上より、PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m は生理条件あるいは血液中であっても非常に高い安定性を持つことが期待される。

#### 4. PEG-*b*-P(L-Arg)と iNOS 酵素の酵素反応による NO 産生評価

PEG-*b*-P(L-Arg)およびその分解物が iNOS 酵素の基質となって目的の NO が産生されるかどうかを評価した。コントロールとして PEG-*b*-P(D-Arg)および側鎖のアルキル基が 1 つ分長い PEG-*b*-P(L-Lys-G) を **Figure 2** と同様の方法で合成して iNOS 酵素の L-アルギニン選択性を評価した(**Figure 4**)。いずれのポリペプチドセグメントの重合度は同じである。これら 3 種類のブロックコポリマーを 24 時間、37°C の条件でトリプシンとプレインキュベートした後、iNOS 酵素と混合してさらに 24 時間インキュベートした。トリプシンは細胞のリソソーム内に存在する消化酵素モデルとしている。この系中に存在する亜硝酸イオンをグリース法で定量することで間接的に NO 産生量を定量した。この方法は一般的な NO 定量法である。ブロックコポリマーの代わりに同量の PEG および L-アルギニンモノマーを加えた系ではトリプシンによる前処理があってもなくても亜硝酸イオンの存在が確認できた。つまり、この系では L-アルギニンが iNOS 酵素の基質となって NO を産生することを意味する。一方で、PEG-*b*-P(D-Arg)と PEG-*b*-P(L-Lys-G)はトリプシン処理を行った後でも NO 産生が確認できなかった。トリプシン処理によりペプチド結合が切れて D-Arg、L-Lys-G モノマーに分解されたことはニンヒドリンテストで確認している。この結果は、これら 2 種類のモノマーは iNOS 酵素の基質になり得ないことを意味している。一方、PEG-*b*-P(L-Arg)はトリプシン処理を行わない場合では iNOS 酵素とインキュベートしても NO 産生は確認できなかったが、トリプシン処理によってペプチド結合が分解された後の系では有意に NO 産生が確認できた。この NO 産生量は PEG と L-アルギニンモノマーの系と同程度であることから、ペプチド結合が分解されて生じた全てのアルギニンモノマーが iNOS 酵素の基質となったのではないかと考えられる。以上より、本研究で合成した PEG-*b*-P(L-Arg)は消化酵素によって分解されることで L-アルギニンモノマーをリリースし、これが iNOS 酵素の基質になり得ることを確認した。



**Figure 4** Structures of (a) PEG-*b*-P(L-Arg), (b) PEG-*b*-P(D-Arg) and (c) PEG-*b*-P(L-Lys-G).

#### 5. PIC ミセルとマクロファージの接触による NO 産生量の評価

実際に PEG-*b*-P(L-Arg)による PIC ミセルがマクロファージに取り込まれ、分解されることで NO が産生するかどうか培養マクロファージを用いて評価した。モデルマクロファージはマウス腫瘍由来のマクロファージ RAW264.7 を培養した。PIC ミセルは PEG-*b*-P(L-Arg)、PEG-*b*-P(D-Arg)、または PEG-*b*-P(L-Lys-G)とコンドロイチン硫酸からなる PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m、PEG-*b*-P(D-Arg)-CS/m、そして PEG-*b*-P(L-Lys-G)-CS/m を C/A=1 で調製した。いずれの PIC ミセルも同じ粒径を示したことから物理的

性質は同程度であると考えられる。各 PIC ミセルは 3 時間のインキュベートでマクロファージに多く取り込まれていることを共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーで確認した。また、今回の実験で使用した PIC ミセルはいずれも毒性を示さないことも確認している。この PIC ミセルと RAW264.7 を 72 時間インキュベートした後、リポ多糖(LPS)でマクロファージを刺激して iNOS を発現させて腫瘍組織のマクロファージと同様の性質にした。腫瘍組織に存在するマクロファージは LPS を加えなくても iNOS 酵素を発現しているが、RAW264.7 のような培養マクロファージは LPS で刺激しなければ iNOS 酵素を発現しない<sup>11)</sup>。LPS で 6 時間刺激した後の培地の上澄みに含まれる亜硝酸イオンをグリース法で定量することで NO 産生量を評価した。LPS で RAW264.7 マクロファージを活性化しなければ iNOS 酵素は発現しないため、いずれの PIC ミセルおよびコンドロイチン硫酸単独投与でも有意な NO 産生は確認できなかった。これは PIC ミセル自身あるいはコンドロイチン硫酸自身ではマクロファージを活性化しないことを意味する。LPS で刺激することでいずれの系でも NO の産生が確認できた。L-PAArg/m を投与したマクロファージのみ、他の系よりも有意な NO 産生を確認できた。これはマクロファージによって取り込まれた PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m がインキュベート中にミセル構造が崩壊し、さらに PEG-*b*-P(L-Arg)が分解され細胞内の L-アルギニン濃度が上昇したことを示唆する結果となった。これは酵素実験の結果と一致する。以上より、PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m はマクロファージをターゲットにした場合、L-アルギニンキャリアとして利用できることがわかった。

## 6. PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m の担ガンマウスに対する抗腫瘍活性評価

調製した PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m の抗腫瘍活性を評価するため、担ガンマウスへ全身投与した後、腫瘍体積とマウス体重を追跡した。マウス結腸癌由来 Colon-26 細胞を右大腿部へ移植した担ガンマウスに L-PAArg-CS/m を尾静脈より投与し(1 回投与量: L-アルギニン 16 mg/kg)、3 日ごとに腫瘍体積とマウス体重を計測した。投与回数が 1 回の群から 1 日おきに投与回数を増やして最大 4 回投与した群までを用意して、その投与回数の依存性を評価した。1 回投与の群から 4 回投与の群までいずれもコントロールに比べて有意な体重の減少が見られなかったことから、PIC ミセルに由来する毒性は見られなかった。

PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m の投与回数によって腫瘍成長曲線は大きく変化することが確認できる。1 または 2 回投与ではコントロールよりも腫瘍成長が加速するが、3 回投与ではコントロールとの有意差はなく、さらに 4 回投与になると今度は腫瘍成長が遅延することがわかった。一見、複雑な結果に見えるが NO 濃度とガン細胞の関係に関連があると考えられる。すなわち、ガン細胞は低 NO 濃度環境では血管新生を促進する低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )の活性化や細胞生存シグナル伝達経路である PI3K-Akt 経路が活性化されるため腫瘍成長が促進するが、高 NO 濃度になってくるとアポトーシスを誘導する p53 経路の活性化が起こるため腫瘍成長が遅延されたのではないかと考えられる<sup>12), 13)</sup>。また、高 NO 濃度環境はニトロソ化された異常タンパクが蓄積して小胞体ストレス経路が活性化されるためアポトーシスが起きやすくなることも報告されている<sup>14)</sup>。NO の生体内での役割には未だ不明な点が多いが、現在最も支持されている上述したメカニズムを当てはめると今回の結果を上手く説明できる。以上より、PEG-*b*-P(L-Arg)-CS/m は過剰投与により腫瘍成長を抑制出来ることが分かった。また、過剰投与しても少なくとも体重変化に関する毒性は見られなかった。しかし、ドーズ量に注意しないと逆に腫瘍の成長を促進してしまうために、新規ガン免疫療法とすることにはブレーキがかかるだろう。

## 7. 総括

本論文では、新規ガン免疫療法の可能性を追求した。これまで注目されていなかったマクロファージをターゲットにしてL-アルギニンをデリバリーすることでマクロファージからのNO産生量を有意に増加させることが出来た。L-アルギニンデリバリー的手段として本論文ではPEG-*b*-P(L-Arg)を新規に合成し、コンドロイチン硫酸との静電相互作用によりPICミセルを調製した。このPICミセルは生理条件のイオン強度や血清タンパクに耐えうる非常に高い安定性を示すことがわかった。このPICミセルを担ガンマウスに全身投与することでドーズ依存的な腫瘍成長が観察された。少ないドーズではコントロールに比べて腫瘍成長を促進するが、ドーズが多くなると腫瘍成長を遅らせることが出来た。この腫瘍成長促進活性と抗腫瘍活性はNO濃度に関連していると考えることが出来る。このNO濃度を上手くコントロール出来るようになれば、マクロファージをターゲットにした新規ガン免疫療法は有益な治療法になると考えられるが、現状では諸刃の剣の領域を脱することは出来ないだろう。

## 8. 参考文献

- 1) Jason Park, Stephen H. Wrzesinski, Eric Stern, Michael Look, Jason Criscione, Ragy Ragheb, Steven M. Jay, Stacey L. Demento, Atu Agawu, Paula Licon Limon, Anthony F. Ferrandino, David Gonzalez, Ann Habermann, Richard A. Flavell and Tarek M. Fahmy, *Nature materials*, 11, 895-905, (2012)
- 2) Douglas D. Thomas, Lisa A. Ridnour, Jeffrey S. Isenberg, Wilmarie Flores-Santana, Christopher H. Switzer, Sonia Donzelli, Perwez Hussain, Cecilia Vecoli, Nazareno Paolocci, Stefan Ambs, Carol A. Colton, Curtis C. Harris, David D. Roberts, David A. Wink, *Free Radical Biol. Med.*, 45, 18-31, (2008)
- 3) Kelly K. McDonald, Sergei Zharikov, Edward R. Block and Michael S. Kilberg, *J. Biol. Chem.*, 272, 31213-31216, (1997)
- 4) Yasuhiro Matsumura, Hiroshi Maeda, *Cancer Research*, 46, 6387-6392, (1986)
- 5) Kazunori Kataoka, Atsushi Harada and Yukio Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 113-131, (2001)
- 6) ERIC P. HOLOWKA, VICTOR Z. SUN, DANIEL T. KAMEI AND TIMOTHY J. DEMING, *Nature materials*, 6, 52-57, (2007)
- 7) Jin Huang and Andreas Heise, *Chem. Soc. Rev.*, 42, 7373-7390, (2013)
- 8) Michael S. Bernatowicz, Youling Wu and Gary R. Matsueda, *J. Org. Chem.*, 57, 2497-2502, (1992)
- 9) Kevin A. Schug and Wolfgang Lindner, *Chem. Rev.*, 105, 67-113, (2005)
- 10) Horacio Cabral, Kanjiro Miyata, Akihiro Kishimura, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 74, 35-52, (2014)
- 11) Michael Graham Espey, Katrina M. Miranda, Ryszard M. Pluta and David A. Wink, *J. Biol. Chem.*, 275, 11341-11347, (2000)
- 12) Douglas D. Thomas, Michael Graham Espey, Lisa A. Ridnour, Lorne J. Hofseth, Daniele Mancardi, Curtis C. Harris and David A. Wink, *PNAS*, 101, 8894-8899, (2004)
- 13) Lorne J. Hofseth, Shin'ichi Saito, S. Perwez Hussain, Michael G. Espey, Katrina M. Miranda, Yuzuru Araki, Chamelli Jhappan, Yuichiro Higashimoto, Peijun He, Steven P. Linke, Martha M. Quezado, Irit Zurer, Varda Rotter, David A. Wink, Ettore Appella, and Curtis C. Harris, *PNAS*, 100, 143-148, (2003)
- 14) Samie R. Jaffrey, Hediye Erdjument-Bromage, Christopher D. Ferris, Paul Tempst and Solomon H. Snyder, *Nature cell biol.*, 3, 193-197, (2001)