

Mini Review

生体吸収性カチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いたプラスミドDNAの徐放化とその生物活性の増強

- NK4プラスミドDNAの腫瘍転移抑制効果を例として -

櫛引俊宏, 友重龍治, 田畑泰彦

京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門生体材料学分野

Controlled release of plasmid DNA by cationized gelatin hydrogel

Recent rapid development of molecular biology together with the steady progress of genome projects has been given us some essential and revolutionary informations of gene to elucidate all the biological phenomena at the molecular level. Under these circumstances, gene transfection has become one of the fundamental technologies indispensable to the basic research of medicine and biology. Human gene therapy has been performed with plasmid DNA alone or the virus vector constructs. However, there are clinical limitations, low gene expression of plasmid DNA and the immunogenicity and toxicity of virus itself or the possible mutagenesis of cells transfected. Therefore, several non-viral vectors of synthetic materials have been explored to enhance the transfection efficiency of gene into mammalian cells both *in vitro* and *in vivo*. In this paper, as one research trial, the controlled release of plasmid DNA is overviewed. A new system of plasmid DNA release with a biodegradable hydrogel is explained while the biological activity of a plasmid DNA of hepatocyte growth factor antagonist, NK4, is augmented by use of the release system.

Rec.3/18/2004, Acc.5/21/2004, pp634-641

Toshihiro Kushibiki, Ryuji Tomoshige, Yasuhiko Tabata

Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Key words controlled release, plasmid DNA, cationized gelatin, gene expression, NK4

近年の遺伝子治療に関する技術の進展は目覚ましいものがある。1980年代の遺伝性疾患に始まり、悪性腫瘍・自己免疫性疾患に対して遺伝子治療の臨床応用が開始され、欠損遺伝子や変異遺伝子を補充する治療や生体が本来有している治癒力を補う治療も行われている¹⁾。これら遺伝子治療において、生体内で細胞へ安全に、かつ効率的に遺伝子を導入する方法の開発は重要な課題である。また、遺伝子導入は、遺伝子治療のみならず、遺伝子改変細胞を用いた

細胞療法²⁾や再生医療^{3,4)}、分子生物学など、広い分野に対しても必要な研究技術である。遺伝子の細胞内への導入方法としては、ベクターと呼ばれる遺伝子の運搬体を用いるのが一般的であり、ウイルスを用いる方法と非ウイルスを用いる方法とに大別できる。前者はアデノウイルスやレトロウイルスなどが主として用いられ、遺伝子導入効率が高いという利点があるが、その免疫原性や体内動態をコントロールできないという問題がある⁵⁾。これに対して、

ラスミドDNA水溶液を直接投与する方法は、遺伝子導入効率においてはウイルスに劣るものの、安全性の点で優れている⁵⁾。しかしながら、水溶液投与されたプラスミドDNAは、細胞に導入される前に生体内に存在する核酸分解酵素などによって分解、失活するため、プラスミドDNAを大量投与しなければ期待する効果を得ることができないことも多い。また、プラスミドDNAなどの核酸分子は、その分子がマイナスに帯電しているため、そのままではマイナスの電荷を有している細胞表面に付着できず、細胞内にも導入されにくいと考えられている。

そこでこれらの問題を解決する方法の一つとして、cationic liposomeやpolyethylenimineなどのカチオン性の合成高分子を用いた遺伝子導入方法が数多く研究、報告されている⁵⁾。カチオン性高分子とのポリイオンコンプレックスにより、プラスミドDNAの見かけの分子サイズが減少するとともに、コンプレックスの表面電荷がプラスになり、プラスミドDNAの細胞表面への付着、その結果として起こる細胞内への導入が容易になると考えられている⁶⁾。さらに、エンドサイトーシスにより細胞内のエンドソーム内に導入された塩基性のコンプレックスを中和するために、エンドソーム内へ水分子とともにプロトンが供給される結果、エンドソームが破壊され、プラスミドDNAが細胞質内に放出される（buffering効果）ことでプラスミドDNAの核内への導入を促進することが報告されている⁷⁾。

遺伝子治療を臨床的に有用な治療手段とするためには、細胞内に導入された遺伝子が長期間にわたり安定にタンパク質を発現することが必要である。例えば、これまでの研究報告から、ウイルス性ベクターを用いてプラスミドDNAを細胞内に導入した場合にも、ある程度のタンパク質の持続的な発現が認められるものの、その発現期間を人為的にコントロールすることは難しいことがわかる。遺伝子発現レベルとその期間とをコントロールする方法の一つとして、Drug Delivery System (DDS)の徐放技術の利用が考えられる。例えば、高分子担体内にプラスミドDNAを包含、徐放することによって、遺伝子発現レベルやその発現期間をコントロールできることが報告されている(表 1^{25,26)})。これらの徐放システムにより、プラスミドDNAの徐放が達成されている。しかしながら、これらのシステムでは、上述したような遺伝子導入効率を高めるためのプラスミドDNAの分子サイズとその電荷についての工夫は加えられていない。

そこで、私たちは、これらの点を考慮したプラスミドDNAの徐放システムを考案している^{25,26)}。すなわち、プラスミドDNAとポリイオンコンプレックス形成ができるカチオン化高分子からプラスミドDNAの徐放化担体を作

る。担体の分解によりプラスミドDNAは徐放される。このシステムでは、プラスミドDNAはカチオン化高分子とコンプレックスを形成していることから、その分子サイズは低下し、かつ負電荷が中和された状態でプラスミドDNAは徐放される。徐放担体のための高分子としてゼラチンを用い、それにアミノ基を導入することでカチオン化ゼラチンを作製した。

ゼラチンは、長年にわたり外科用材料や医薬品添加物として医療に用いられてきた材料であり、その生体安全性と適合性とは立証されている。また、ゼラチンは化学修飾によりその物理化学的性質を変化させ、種々の生理活性物質と親和性を持たせることができる。これまでに、私たちは、ある種類のゼラチンを架橋して作製したハイドロゲルを利用することで、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)²⁷⁾、肝細胞増殖因子(HGF)²⁸⁾や形質転換成長因子 β (TGF β)²⁹⁾などの生理活性物質を生物活性を持った状態で徐放できることを報告している。このシステムでは、生理活性物質がゼラチン分子との物理的相互作用力によってゼラチンハイドロゲル内に固定化されている。ハイドロゲルが分解され、それに伴うゼラチン分子の水可溶化によって、固定化生理活性物質は徐放される²⁷⁾。すなわち、このハイドロゲルシステムでは、徐放担体の分解性を変化させることによって、生理活性物質の徐放性をコントロールすることができる²⁷⁾。

本稿では、このハイドロゲルシステムによるプラスミドDNAの徐放化について概説するとともに、具体例を示しながらプラスミドDNAの徐放化が、その生理活性物質の発現に有効であることを強調する。まず、プラスミドDNAとポリイオンコンプレックスを形成させるために、ゼラチンをカチオン化する。このカチオン化ゼラチンからなるハイドロゲルを作製し、そのハイドロゲル担体内にプラスミドDNAを物理化学的に固定化した。ハイドロゲル徐放担体の分解に伴うカチオン化ゼラチン分子の水可溶化により、固定化プラスミドDNAは徐放する。このプラスミドDNAの徐放化システムのアイデアと、このシステムを用いたプラスミドDNAの徐放がその発現に与える効果について紹介する。

プラスミドDNAとして、*lacZ*とNK4のプラスミドDNAを用いた。NK4はHGFのN末端へアピン構造と4つのkringle構造からなるHGFのアンタゴニストである。すでに、NK4にはHGFにより促進される腫瘍細胞の浸潤と転移を抑制する作用のあることが報告されている³⁰⁾。しかしながら、体内で不安定なNK4タンパク質あるいはその遺伝子を水溶液として体内に投与するだけではその生物作用は必ずしも期待できない。そこで、NK4の生物活性

表 Research reports on the controlled release of plasmid DNA

Carrier material	Plasmid DNA	Biological function	References
Poly(D, L-lactic acid- <i>co</i> -glycolic acid) (PLGA)	β -Galactosidase, Platelet-derived growth factor (PDGF)	Deliver intact and functional plasmid DNA at controlled rates. The ability to create porous polymer scaffolds capable of controlled release rates may provide a means to enhance and regulate gene transfer within a developing tissue, which will increase their utility in tissue engineering.	Murphy et al ⁽⁸⁾ Shea et al ⁽⁹⁾ Wang et al ⁽¹⁰⁾ Capan et al ⁽¹¹⁾ Luo et al ⁽¹²⁾ Hedley et al ⁽¹³⁾ Jang et al ⁽¹⁴⁾
Polymethacrylic acid (PMA) and polyethylene glycol (PEG), hydroxypropylmethylcellulose-carbopol		The <i>in situ</i> gelling systems can be considered as a valuable injectable controlled-delivery system for plasmid DNA in their role to provide protection from DNase degradation.	Ismail et al ⁽¹⁵⁾
Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG)	Luciferase	Release plasmid DNA from nanoparticles in a controlled manner.	Perez et al ⁽¹⁶⁾
Poly(2-aminoethyl propylene phosphate)	β -Galactosidase	Enhanced β -galactosidase expression in anterior tibialis muscle in mice, as compared with naked DNA solution injections.	Wang et al ⁽¹⁷⁾
Poly(α -(4-aminobutyl)-L-glycolic acid) (PAGA)	β -Galactosidase	The complexes showed about 2-fold higher transfection efficiency than DNA complexes of poly-L-lysine (PLL) which is the most commonly used polycation for gene delivery.	Lim et al ⁽¹⁸⁾
Poloxamers	β -Galactosidase	The use of <i>in situ</i> gelling and mucoadhesive polymer vehicles could effectively and safely improve the nasal retention and absorption of plasmid DNA. Moreover, the rate and extent of nasal absorption could be controlled by choice of polymers and their contents.	Park et al ⁽¹⁹⁾
Poly(ethylene- <i>co</i> -vinyl acetate) (EVAc)	Sperm-specific lactate dehydrogenase C4, β -Galactosidase	The EVAc disks are efficient and convenient vehicles for delivering DNA to the vaginal tract and providing long-term local immunity.	Shen et al ⁽²⁰⁾
Silk-elastinlike polymer (SELP)	Luciferase	The ability to precisely customize the structure and physicochemical properties of SELP using recombinant techniques, coupled with their ability to form injectable, <i>in situ</i> hydrogel depots that release DNA, renders this class of polymers an interesting candidate for controlled gene delivery.	Megeed et al ⁽²¹⁾
Denatured collagen-PLGA	β -Galactosidase	Increase the level of gene expression because of integrin-related mechanisms and associated changes in the arterial smooth muscle cell actin cytoskeleton.	Perlstein et al ⁽²²⁾
Atelocollagen	Green fluorescent protein (GFP), Fibroblast growth factor 4 (FGF4)	Increased serum and muscle FGF4 levels and long-term release and localization of plasmid DNA <i>in vivo</i> .	Ochiya et al ^(23,24)
Gelatin	β -Galactosidase	Plasmid DNA release period can be regulated only by changing the hydrogel degradability.	Fukunaka et al ⁽²⁵⁾ Kushibiki et al ⁽²⁶⁾

を発現させるための一つの方法として、カチオン化ゼラチンハイドロゲルからの NK4 プラスミド DNA の徐放化を行い、その生物活性について検討した³¹⁾。

カチオン化ゼラチンハイドロゲルからのプラスミド DNA の徐放

ゼラチン分子のカルボキシル基にエチレンジアミンを

化学的に導入することによりカチオン化ゼラチンを作製した^{25,26)}。このカチオン化ゼラチンをグルタルアルデヒドにて化学架橋することでハイドロゲルを作製した。その際、グルタルアルデヒド濃度を变化させることでハイドロゲルの含水率を变化させることができる。このカチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス大腿筋組織内に埋入後、生体内における残存率を経時的に測定した結果、初期の分解速度

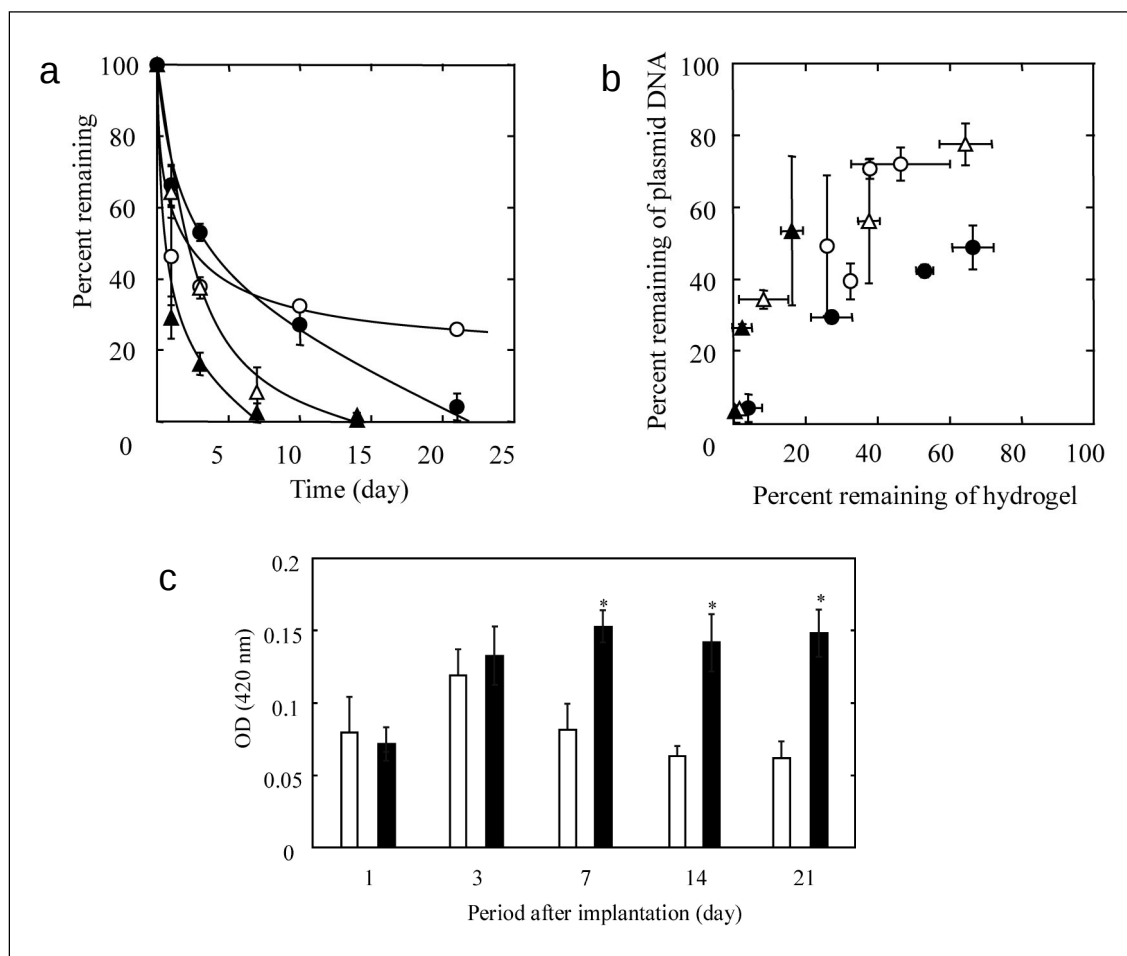


図1

(a) The time course of the radioactivity remaining of ^{125}I -labeled cationized gelatin hydrogels after implantation into the femoral muscle of mice (The wet weight of hydrogel implanted=0.2 g). The water content of cationized gelatin hydrogels is 96.4 ($\circ$), 97.4 ($\bullet$), 98.3 ($\triangle$) or 99.7 wt% ($\blacktriangle$).

(b) The radioactivity remaining of cationized gelatin hydrogels incorporating ^{125}I -labeled lacZ plasmid DNA plotted against that of ^{125}I -labeled cationized gelatin hydrogels after implantation into the femoral muscle of mice: The water content of cationized gelatin hydrogels is 96.4 ($\circ$), 97.4 ($\bullet$), 98.3 ($\triangle$) or 99.7 wt% ($\blacktriangle$).

(c) The time course of lacZ gene expression after implantation of cationized gelatin hydrogels incorporating lacZ plasmid DNA into the femoral muscle of mice: free lacZ plasmid DNA (open bar) and lacZ plasmid DNA incorporated in cationized gelatin hydrogels (water content=97.4 wt%) (closed bar). The lacZ plasmid DNA dose is 100 μg /mouse muscle (3 mice/group). * $p < 0.05$: significant against the OD value of free plasmid DNA injected group.

は同じであるものの、カチオン化ゼラチンハイドロゲルの含水率を変化させることで、生体内残存期間をコントロールすることができることがわかった(図1a)。また、このカチオン化ゼラチンハイドロゲルにlacZプラスミドDNAを含浸固定した後、マウス大腿筋組織内に埋入した。lacZプラスミドDNAの筋組織内残存性を評価したところ、カチオン化ゼラチンハイドロゲル担体の分解とともにlacZプラスミドDNAは徐放され、lacZプラスミドDNA水溶

液投与と比較して、その生体内残存期間が延長した。また、カチオン化ゼラチンハイドロゲルの含水率、つまり生体残存性をコントロールすることでlacZプラスミドDNAの徐放期間をコントロールすることができた(図1b)。さらに、lacZプラスミドDNAを徐放することによって、lacZプラスミドDNA水溶液投与時と比較して、発現効率の増加と発現期間の延長が認められた(図1c)²⁵⁾。

lacZプラスミドDNA分子はハイドロゲル内でカチオン

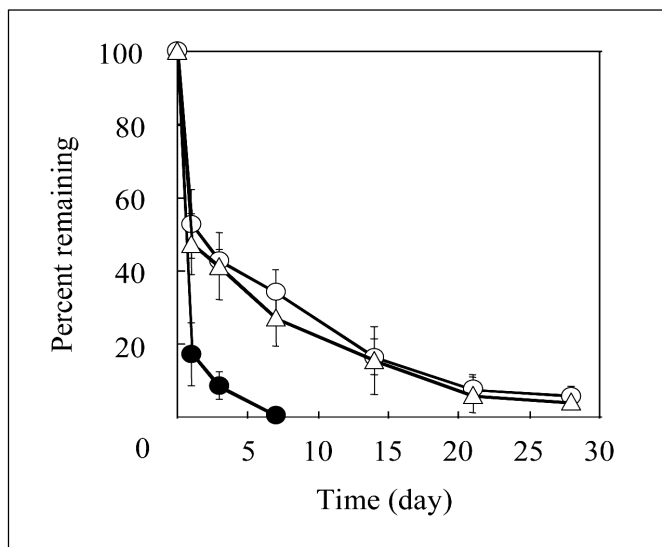


図2

The time course of radioactivity remaining of cationized gelatin microspheres incorporating ^{125}I -labeled NK4 plasmid DNA (○) and free ^{125}I -labeled NK4 plasmid DNA (●) or ^{125}I -labeled cationized gelatin microspheres (△) after the subcutaneous injection into the back of mice.

化ゼラチン分子とポリイオンコンプレックスを形成しているため、プラスミドDNAはハイドロゲルが分解しない状態では徐放されない。すなわち、担体ハイドロゲルが分解されることにより生じた水溶性のカチオン化ゼラチンフラグメントとコンプレックスされた状態でプラスミドDNAは徐放されていると考えられる。また、蛍光試薬により各々を標識したカチオン化ゼラチン分子とプラスミドDNA分子のコンプレックスが、コンプレックスを形成した状態で細胞内へ移行していることも確認された²⁵⁾。徐放されたプラスミドDNA分子がカチオン化ゼラチン分子とコンプレックスを形成しているため、プラスミドDNA分子の負電荷は中和され、プラスミドDNA自身と比べて負電荷を持つ細胞表面と相互作用しやすくなり、プラスミドDNAの細胞内への導入も容易になっていると考えられる²⁶⁾。また、エンドサイトーシスにより細胞内のエンドソーム内に導入されたカチオン化ゼラチン分子とプラスミドDNA分子のコンプレックスがbuffering効果を誘導することでプラスミドDNAの核内への導入を促進することも報告している³²⁾。さらに、徐放することにより、細胞周辺局所でのプラスミドDNA濃度が維持される結果、プラスミドDNAの細胞内への導入効率も増加すると考えられる。

このカチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いたプラスミドDNA徐放システムは、これまで報告されている徐放担体からの拡散によるプラスミドDNAの徐放とは異なっている。つまり、徐放されたプラスミドDNAがポリイオンコンプレックスを形成していること、徐放期間および発現期間のコントロールができるという点において新しい徐放システムである。また、ハイドロゲルの形によらず、injectableなカチオン化ゼラチンマイクロスフェアを用いてもプ

ラスミドDNAを徐放することができる。

カチオン化ゼラチンマイクロスフェアを用いた徐放化NK4プラスミドDNAによる抗腫瘍効果の増強

肺に転移することが知られているLewis Lung Carcinoma (LLC)細胞をマウス背部皮下に接種し、4日後、放射ラベル化したカチオン化ゼラチンマイクロスフェアおよび放射ラベル化NK4プラスミドDNAを含浸固定したカチオン化ゼラチンマイクロスフェアを腫瘍塊近傍に投与した。皮下投与されたNK4プラスミドDNA水溶液は投与部位より速やかに消失した。これに対して、カチオン化ゼラチンマイクロスフェアおよびそれに含浸されたNK4プラスミドDNAの放射活性は、時間とともに4週間にわたって投与部位から徐々に減少した(図2)。カチオン化ゼラチンマイクロスフェアおよびNK4プラスミドDNAの消失パターンが時間的によく一致したことから、NK4プラスミドDNAがマイクロスフェアの分解とともに*in vivo*で徐放されたことを示している。また、NK4プラスミドDNAを含有するカチオン化ゼラチンマイクロスフェア投与群のマウス生存期間は、他のコントロール群と比較して、有意に増加した(図3)。HGFのアンタゴニストとして発現したNK4タンパク質が腫瘍細胞表面に存在するHGF receptor (c-Met)に結合することで、HGF依存性の腫瘍細胞の浸潤・転移を抑制したと考えられた。NK4プラスミドDNAを含有するカチオン化ゼラチンマイクロスフェア投与群の腫瘍組織中の血管数および血管径においても、他のコントロール群と比較して有意な減少が認められた(図4a)。

NK4は、HGF依存性の腫瘍細胞の浸潤・転移を抑制す

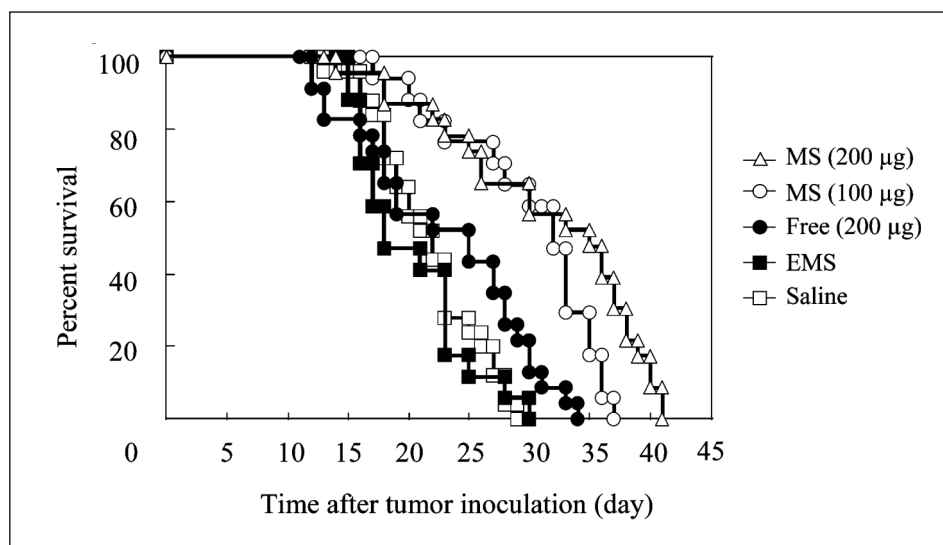


図3

Survival curves of tumor-bearing mice following the single injection of cationized gelatin microspheres incorporating NK4 plasmid DNA and free NK4 plasmid DNA into the subcutaneous tissue around the tumor mass: cationized gelatin microspheres incorporating 100 [MS (100 µg)]* and 200 µg of NK4 plasmid DNA [MS (200 µg)]*, 200 µg of free NK4 plasmid DNA [free (200 µg)], empty cationized gelatin microspheres (EMS), and saline. * $p < 0.05$: significant against the survival curve of saline-injected, control mice (Kaplan-Mayer method).

ることだけではなく、bFGFや血管内皮増殖因子(VEGF)による新生血管の形成を阻害することが知られている³⁹⁾。このNK4の作用により、腫瘍組織中の血管数および血管径の減少が認められたと考えられた。NK4プラスミドDNAを含有するカチオン化ゼラチンマイクロスフェア投与群では腫瘍組織中のアポトーシス細胞数も有意に増加した(図4b)。発現したNK4タンパク質による腫瘍組織中の新生血管形成が抑制された結果、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されたと考えられた。

NK4プラスミドDNAを徐放しているカチオン化ゼラチンマイクロスフェアを腫瘍塊近傍に投与することで、長期間、NK4プラスミドDNAが腫瘍細胞近傍に存在している。このことは、腫瘍細胞内へプラスミドDNAの導入効率が増加した理由の一つであると考えられる。

おわりに

カチオン化ゼラチンハイドロゲルまたはカチオン化ゼラチンマイクロスフェアを用いてプラスミドDNAを徐放化することにより、プラスミドDNAの発現を持続させることが可能となった。このカチオン化ゼラチンを用いた徐放システムは、プラスミドDNAの種類に関係なく応用可能であることから、種々の疾病の遺伝子治療に有用なDDS手段になると考えられる。

謝 辞

本研究に際して、ご指導ご鞭撻をいただきました大阪大学大学院医学研究科 中村敏一教授、松本邦夫助教授に深甚なる謝意を表します。さらに、種々の貴重なご助言を賜りました京都大学再生医学研究所 生体材料学分野研究室員の諸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 遺伝子医学別冊:これだけは知っておきたい遺伝子医学の基礎知識, 本庶 佑監修, メディカルドゥ, 大阪, 2003.
- 2) Nabel EG, Plautz G, Boyce FM, Stanley JC, Nabel GJ: Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. Science, 244: 1342-1344, 1989.
- 3) Deasy BM, Huard J: Gene therapy and tissue engineering based on muscle-derived stem cells. Curr Opin Mol, Ther, 4: 382-389, 2002.
- 4) Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. Circulation, 105: 732-738, 2002.
- 5) Niidome T, Huang L: Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors. Gene Ther, 9: 1647-1652, 2002.

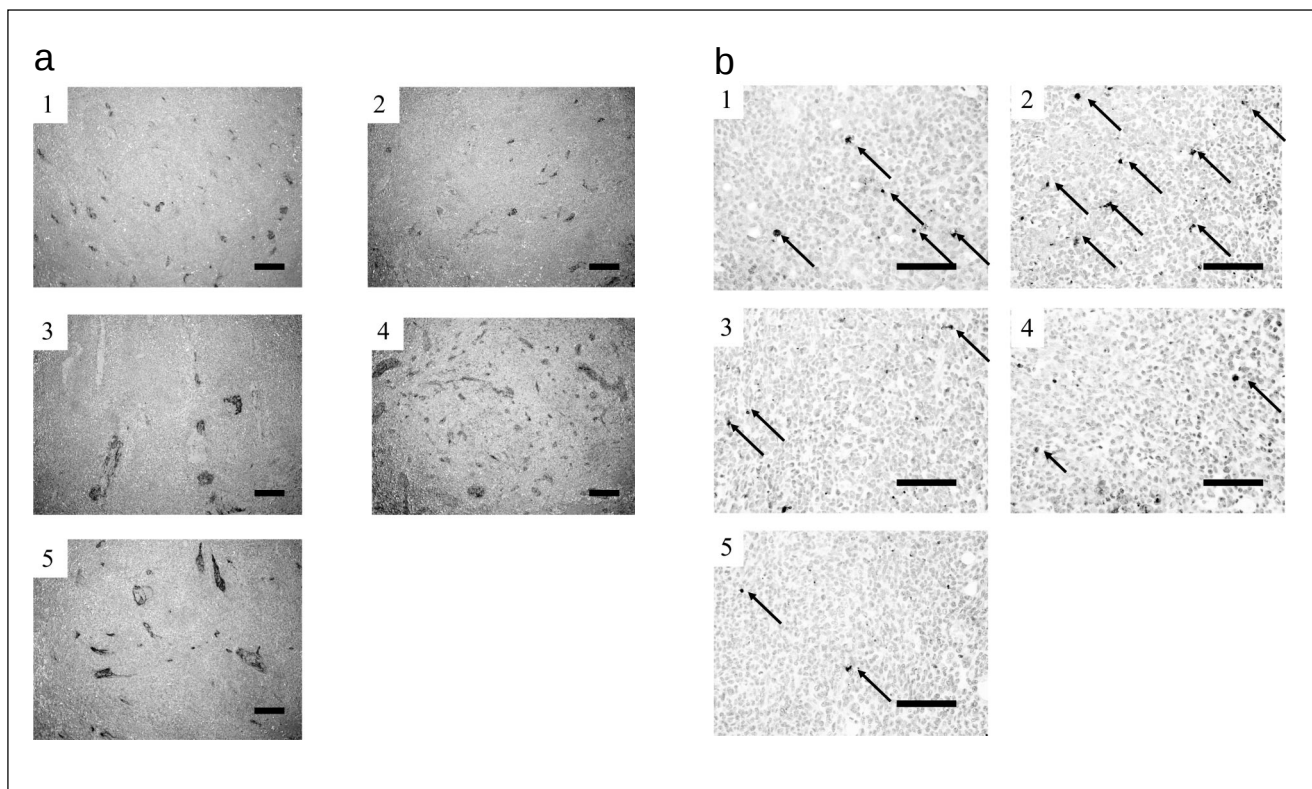


図4

(a) Immunohistochemical views of blood vessel formation of tumor tissues 28 days after the single injection of cationized gelatin microspheres incorporating NK4 plasmid DNA and free NK4 plasmid DNA into the subcutaneous tissue around the tumor mass: cationized gelatin microspheres incorporating 100 (1) and 200 µg of NK4 plasmid DNA (2), 200 µg of free NK4 plasmid DNA (3), empty cationized gelatin microspheres (4), and saline (5) (magnification; X100). The bar length is 200 µm.

(b) TUNEL staining of tumor tissues 28 days after the single injection of cationized gelatin microspheres incorporating NK4 plasmid DNA and free NK4 plasmid DNA into the subcutaneous tissue around the tumor mass: cationized gelatin microspheres incorporating 100 (1) and 200 µg of NK4 plasmid DNA (2), 200 µg of free NK4 plasmid DNA (3), empty cationized gelatin microspheres (4), and saline (5) (magnification; X400). The bar length is 100 µm.

- 6) Kushibiki T, Tabata Y: A new gene delivery system based on controlled release technology. *Curr Drug Deliv*, in press.
- 7) Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7297-7301, 1995.
- 8) Murphy WL, Mooney DJ: Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. *J Periodontal Res*, 34: 413-419, 1999.
- 9) Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ: DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 17: 551-554, 1999.
- 10) Wang D, Robinson DR, Kwon GS, Samuel J: Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-co-

glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery. *J Control Release*, 57: 9-18, 1999.

- 11) Capan Y, Woo BH, Gebrekidan S, Ahmed S, DeLuca PP: Preparation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of poly (L-lysine) complexed plasmid DNA. *Pharm Res*, 16: 509-513, 1999.
- 12) Luo D, Woodrow-Mumford K, Belcheva N, Saltzman WM: Controlled DNA delivery systems. *Pharm Res*, 16: 1300-1308, 1999.
- 13) Hedley ML: Formulations containing poly (lactide-co-glycolide) and plasmid DNA expression vectors. *Expert Opin Biol Ther*, 3: 903-910, 2003.
- 14) Jang JH, Shea LD: Controllable delivery of non-viral DNA from porous scaffolds. *J Control Release*, 86: 157-168, 2003.

- 15) Ismail FA, Napaporn J, Hughes JA, Brazeau GA: In situ gel formulations for gene delivery: release and myotoxicity studies. *Pharm Dev Technol*, 5: 391-397, 2000.
- 16) Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso MJ: Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Release*, 75: 211-224, 2001.
- 17) Wang J, Zhang PC, Mao HQ, Leong KW: Enhanced gene expression in mouse muscle by sustained release of plasmid DNA using PPE-EA as a carrier. *Gene Ther*, 9: 1254-1261, 2002.
- 18) Lim YB, Han SO, Kong HU, Lee Y, Park JS, Jeong B, Kim SW: Biodegradable polyester, poly [α -(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm Res*, 17: 811-816, 2000.
- 19) Park JS, Oh YK, Yoon H, Kim JM, Kim CK: In situ gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA. *J Biomed Mater Res*, 59: 144-151, 2002.
- 20) Shen H, Goldberg E, Saltzman WM: Gene expression and mucosal immune responses after vaginal DNA immunization in mice using a controlled delivery matrix. *J Control Release*, 86: 339-348, 2003.
- 21) Megeed Z, Cappello J, Ghandehari H: Controlled release of plasmid DNA from a genetically engineered silk-elastinlike hydrogel. *Pharm Res*, 19: 954-959, 2002.
- 22) Perlstein I, Connolly JM, Cui X, Song C, Li Q, Jones PL, Lu Z, DeFelice S, Klugherz B, Wilensky R, Levy RJ: DNA delivery from an intravascular stent with a denatured collagen-poly(lactic)-poly(glycolic acid)-controlled release coating: mechanisms of enhanced transfection. *Gene Ther*, 10: 1420-1428, 2003.
- 23) Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Nishida A, Itoh H, Nagai Y, Terada M: New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med*, 5: 707-710, 1999.
- 24) Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H, Terada M: Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines. *Curr Gene Ther*, 1: 31-52, 2001.
- 25) Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y: Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J Control Release*, 80: 333-343, 2002.
- 26) Kushibiki T, Tomoshige R, Fukunaka Y, Kakemi M, Tabata Y: In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *J Control Release*, 90: 207-216, 2003.
- 27) Tabata Y, Ikada Y: Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 31: 287-301, 1998.
- 28) Ozeki M, Ishii T, Hirano Y, Tabata Y: Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J Drug Target*, 9: 461-471, 2001.
- 29) Yamamoto M, Tabata Y, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y: Bone regeneration by transforming growth factor β 1 released from a biodegradable hydrogel. *J Control Release*, 64: 133-142, 2000.
- 30) Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T: HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett*, 420: 1-6, 1997.
- 31) Kushibiki T, Matsumoto K, Nakamura T, Tabata Y: Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin. *Gene Ther*, in press.
- 32) Hosseinkhani H, Aoyama T, Yamamoto S, Ogawa O, Tabata Y: In vitro transfection of plasmid DNA by amine derivatives of gelatin accompanied with ultrasound irradiation. *Pharm Res*, 19: 1471-1479, 2002.
- 33) Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T: HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res*, 60: 6737-6743, 2000.