

わば糖鎖工場と見立てて培養液中に糖鎖を大量に生産させる技術である。

本研究ではこのマススペクトロメトリーと糖鎖プライマー法を網羅的発現糖鎖解析（グライコミクス）に利用して、ヒト未分化細胞（白血病細胞をはじめとする小児腫瘍細胞や間葉系幹細胞などのヒト幹細胞）に発現している糖鎖を網羅的に解析し、これまで微量しか発現していなかったためその存在が明らかではなかった糖鎖を同定し、細胞の糖鎖発現パネルを作製すると共に、その発現糖鎖の中から診断に有用な糖鎖を検索し、将来的に診断・治療に臨床応用することを目指す。更に糖鎖プライマー法で生産した糖鎖は化学的修飾を施し、抗原として利用して糖鎖抗体の樹立を目指す。

B. 研究方法

1) 固相抽出による糖脂質の分画

LC/MSによる分析では、試料を前処理して余分な夾雑物を出来る限り除いておくことでより高精度な結果が得られる。またMSでは検出の際に陰イオンになりやすい分子と陽イオンになりやすい分子では適切な分析モード（ネガティブイオンモードとポジティブイオンモード）が異なるため、より高精度に分析するためにはそれらの分子群を予め分画しておくことが望ましい。すなわち糖脂質においてはシアル酸を持つガングリオシドと中性糖脂質を分離・分画する方法を確立する必要がある。その方法として固相抽出 (Solid Phase Extraction: SPE) 法を採用した。使用した固相としては、シリカゲルのみの固相(Si)、シリカゲル担体にオクタデシル基が付いた固相(ODS)、シリカゲル担体にアミノプロピル基を結合させた

固相(NH₂)を用いた。このNH₂担体は分子を極性で分ける順相的な性質とアミノ基によるイオン交換的な性質を併せ持ち、溶出条件を変えることで前記ガングリオシドと中性糖脂質を分離・分画できるばかりでなく、極性の低いコレステロールなどを取り除くことも出来る可能性がある。これらSPEカラムに脂質及び糖脂質標準品を通し、pH・イオン強度・極性の異なった溶媒で溶出して分画する条件を検討した。

2) LC/MSによる糖脂質分離条件検討

細胞から抽出した糖鎖や糖鎖プライマー法で生産した糖鎖を実際に解析する前に、市販糖鎖標準品を用いて微量な試料からLC/MSで糖鎖を高精度で高感度に検出・同定する方法を複数確立した。LC/MSのCapLCはAgilent Technology社製1100 systemを、MSはBruker Daltonics社製HCT Ultraを使用した。液体クロマトグラフィーの分離モードとしては逆相と順相双方を検討した。カラムは逆相では、Imtakt社製 Unison UK-C18 (150 mm x 0.3 mmφ) を使用し、移動相はトリフルオロ酢酸若しくはギ酸を0.1%添加した（水：アセトニトリル）混合溶媒系を使用し、アセトニトリルの混合比をリニアグラディエントで増加させ、試料を分離・溶出した。順相ではImtakt社製Unison UK-Silica, (150 mm x 0.3 mmφ)、または昭和電工社製ShodexNH2P50 (150 mm x 0.3 mmφ) を使用した。UK-Silicaの場合、（クロロフォルム/メタノール/水）混合移動相で混合組成を一定に保って分離するアイソクラティックモードと混合比を変更させて分離・溶出を行うグラディエントモードの双方で検討した。NH2P50の場合、（アセトニトリル：水）の混合溶媒系を使用し、水の混合

比をリニアグラディエントで増加させて試料を分離・溶出する方法と共に移動相中のイオン強度を上げて溶出する方法を検討した。

3) 糖鎖プライマー法で産生した糖鎖の回収及び分析

糖鎖プライマー法による培養細胞での糖鎖生産および糖鎖抽出は慶應義塾大学理工学部佐藤研究室において行われた。即ち糖脂質合成系に対する糖鎖プライマー (LacC12) 及び糖蛋白質O結合型糖鎖合成系に対する糖鎖プライマー (GalNAcαThrC12) を50 μMの濃度で各培養細胞について培養液中に添加し、48時間後に培地を回収した。この培地よりODS固相抽出カートリッジを使用して産生された糖鎖を回収し、LC/MS分析を行う試料とした。LC/MSによる分析にはカラムに昭和電工社製ShodexNH2P50を使用し、(アセトニトリル:水)の混合溶媒系で水の混合比をリニアグラディエントで増加させ、試料を分離・溶出すると共に、移動相中のイオン強度を上げて溶出する方法で分離した。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞株を用いた実験のみ実施した。

C. 研究結果

1) 糖脂質の固相抽出による分画

細胞に含まれる脂質のうち、コレステロールを固相抽出で除去する方法を確立した。すなわち、Si及びNH₂の固相に試料を注入した場合、溶出溶媒にクロロフォルムを使用することでコレステロールおよびトリグリセリドは溶出され、その他の両親媒性脂

質は保持させることが可能であった。次にこの固相にアセトン、メタノールのような極性の高い溶媒を用いることで、リン脂質や糖脂質を効率よく溶出することが可能であった。更に固相にNH₂を用いた場合には、ガングリオシドはメタノールのような極性の高い溶媒でも保持されたままになり、溶媒中のイオン強度を上げることで溶出することが可能であった。

以上のように、細胞から有機溶媒を使って抽出される脂質のうち、(1) コレステロールと単純脂質、(2) 中性糖脂質とリン脂質、(3) ガングリオシドの3群に固相抽出法で分画する方法を確立した。

2) LC/MSによる糖脂質分離条件検討

逆相モードでは、LC/MSによる糖脂質由来シグナルがMSで検出されなかった。一方、Unison UK-Silicaを用いた順相モード場合、代表的なガングリオシドであるGM3, GM2, GM1をそれぞれ分離することが可能であった。中性糖脂質では、GlcCer, LacCer, Gb3Cer, Gb4Cerをそれぞれ分離する条件を確立した。ShodexNH2P50でも同様にいくつかの糖脂質糖鎖を分離することが可能であった。現在、より短時間で高精度に分離する条件検討に着手している。

3) 糖鎖プライマー法で産生した糖鎖の回収及び分析

試料として、神経芽腫細胞株に糖蛋白質O結合型糖鎖合成系に対する糖鎖プライマーを与えて糖鎖産生させたものを使用し、ShodexNH2P50を使用してLC/MSで分離分析した。これまでにその試料中に存在する糖鎖プライマー法によって産生された糖鎖は、糖鎖配列を同定したもので14種類にのぼった。現在、より多くの糖鎖プライマー由来

糖鎖の糖鎖配列決定に着手すると共に糖脂質生合成系に対する糖鎖プライマーを使用して産生された糖鎖の構造決定に着手している。

D. 考察

これまで糖脂質を含む糖鎖の分析にはTLCやレクチンなどをプローブとした分析法が多用されてきたが、感度や特異異性に大きな問題点があった。中でもTLCでは、細胞から有機溶媒で抽出した総脂質を直接載せてして分離し、糖のみを検出する試薬を噴霧して検出する方法が採られてきたが、この方法ではリン脂質のTLC上での挙動が糖脂質と非常に近いため、しばしば結果に影響を与えることがあった。それを避けるためアルカリ条件下によるリン脂質の分解操作が行われてきたが、透析などで操作途中に試料の一部を損なう可能性があるため、微量の試料を扱う際には問題があった。固相抽出法は微量でも試料のロスが少なく、再現性の良い結果を得ることが出来るため、MSで分析する試料の前処理として現在多用されている。本研究においても、固相抽出法でガングリオシドと中性糖脂質を分離・分画することが出来たが、代表的な細胞膜構成分子であるリン脂質とターゲットとする糖脂質を分画することはできなかった。リン脂質と糖脂質では今回検討した(クロロフォルム：メタノール：水)溶媒系で挙動が非常に似通った分子であるため、この溶媒系を用いた順相による固相抽出法では分画が難しいのかもしれない。全く異なった混合溶媒系を選択すれば分画出来る可能性がある。同時にリン脂質分子中には糖脂質にないエステル結合が存在しているの

で、これをアルカリ性条件下で予め分解して、全く違った物性のものに変換しておくことで糖脂質を分画出来る可能性がある。現在異なった溶媒を用いた固相抽出法を検討すると共にアルカリ分解法と固相抽出を組み合わせた分画法の検討に着手している。

LC/MSによる分離ではこれまで市販品として手に入るもののみ検討してきた。それらの分離・分析には順相モードで一部成功しているが、Unison UK-Silicaを使用したアイソクラティックモードの場合、溶出ピークパターンが広くなり、微量な試料の場合には検出できなくなる可能性がある。今後グラディエントモードでシャープなピークが得られる条件を検討し、ごく微量な糖脂質でも検出・構造決定できる実験系の確立を目指す。

糖鎖は多様な構造が存在することが知られているが、市販品として入手可能なものはごく一部である。入手困難な糖鎖については培養細胞に糖転移酵素を強制発現させることによって得ることが出来るものもある。現在、糖脂質生合成系の糖転移酵素のクローニングに着手しており、クローニングが完了した酵素については培養細胞に導入し、順次発現糖鎖分析・同定法を確立する。

糖鎖プライマー法は糖鎖を細胞から抽出する場合に比べて大量に得ることが出来る方法である。しかしながら得られた糖鎖の標準品が無い場合、LCによる分離方法やMSによる構造決定法は完全に確立されていない。現段階で糖蛋白質O結合型糖鎖生合成系に対する糖鎖プライマーを用いて得られた未知の構造の糖鎖を14種類同定し、その糖鎖配列を明らかにすることが出来た。糖

鎖プライマー法の糖鎖を大量に得ることが出来るという利点により、今後構造解析が難しかったO結合型糖鎖の構造決定法を確立する上で、大きなアドバンテージが得られると考えられる。

E. 結論

細胞の成熟やがん化に伴い発現パターンが大きく変化する糖鎖を持つ分子としては細胞表面に存在する糖脂質と糖蛋白質が知られている。本年度の検討により、そのうち糖脂質糖鎖のLC/MSを使った分離・分析および構造解析法は整いつつある。糖蛋白質O結合型糖鎖についても糖鎖プライマー法を用いて一部確立することが出来た。これらの複合糖質は多様な構造を取るため、遺伝子操作等で発現糖鎖パターンを人工的に変換させ、発現量が田の糖鎖に比べて極端に少ないために同定が難しかった糖鎖についても分析及び構造解析が出来るよう体制を整えつつある。

糖蛋白質N結合型糖鎖については今後、エンドグリコシダーゼを用いて糖鎖を切り出し、糖鎖の還元末端アルデヒド基を利用して化学的にビーズに糖鎖を結合させ、夾雑物を除く方法を確立する予定である。この方法ではビーズに固定化した糖鎖は、還元剤を用いてビーズより遊離させ、LC/MSで分析することが可能である。

来年度以降は、LC/MSで得られたそれぞれの細胞の糖脂質糖鎖、糖蛋白質糖鎖のマスペクトルを得て、多変量解析・主成分分析等の統計学的手法で診断に有用な発現糖鎖パターンを選び出すことを目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima H, Sato T. Construction of an oligosaccharide library by cultured cells for use in glyco-biotechnology. [Editor Yuasa H.: in NANOTECHNOLOGY IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY] Transworld Research Network 167-173, 2006

- 2) 中島英規. オリゴ糖合成-糖鎖プライマー法で生産した糖鎖の医療分野への応用-. 高分子 55:25, 2006

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

分担研究報告書

糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

分担研究者 齋藤 実 株式会社グライコメディクス 主任研究員

研究要旨：糖鎖パネルを作製するために、ヒト胎児腎臓由来の HEK-293A細胞を用いて糖鎖プライマー法により得られる糖鎖構造の解析を行い、4種類の中性の糖鎖と8種類の酸性の糖鎖を得た。細胞に発現された糖鎖の分離や機能解析に有用なヒトGalectin-1を発現させるためのベクターの構築を行った。

研究協力者

盛山 優子、渡邊 莊子

（株式会社グライコメディクス研究員）

A. 研究目的

糖は生体内において単に栄養源としてばかりでなく、糖脂質、糖蛋白質などの複合糖質として主に細胞膜表面に存在し、発生、分化、細胞増殖など様々な生命現象に関わっていると考えられている。一方、生体内の生理活性の主体である蛋白質はそのおよそ半数が何らかの糖鎖修飾を受けていると考えられており、生命現象の網羅的解明には遺伝子や蛋白質の解析と共に、糖鎖の機能解析が必要である。

糖鎖がどのような機能を果たしているのかを明らかにするにはいくつかの手法が存在するが、まず材料となる糖鎖構造を入手することは必要不可欠な課題である。糖鎖プライマー法は糖転移酵素の基質となるオ

リゴ糖と脂質を結合させた糖鎖プライマーを培養細胞に投与することによって培地中に細胞内の糖転移酵素の発現様式（量、種類、活性）を反映した糖鎖伸長生成物を簡便に得ることが出来る手法で、糖鎖の機能解析を行う際の糖鎖構造の入手手段として利用可能である。また、糖鎖の機能解析を生体物質との結合を指標として行う場合、糖鎖を固定化した糖鎖マイクロアレイは有効な手段となり得る。将来的にはマイクロアレイに糖鎖プライマー法で入手した糖鎖伸長生成物を利用することが理想であるが、その準備段階として、既知の糖鎖と糖結合性蛋白質（レクチンなど）との結合を検出できるか否か確認しておく必要がある。

本研究では、ヒト胎児腎臓由来の HEK-293A細胞（以下293細胞）が持つ糖鎖生合成経路を糖鎖プライマー法でモニターすることを目的とする。さらに、がん組織で発現量が増加することが報告されている

Galectin-1蛋白質（レクチンの一種）をほ乳類細胞で強制発現させるベクターの構築を行う。分子量約14 kDaの β -galactoside結合性lectinであるGalectin-1は様々ながんにおいて高発現することが知られており、がんの悪性度や転移能との関連も示唆されている蛋白質であることから、Galectin-1と糖鎖との結合性を検出する系を確立することにより、糖鎖アレイのプロトタイプを構築できることが期待される。

B. 研究方法

1) Galectin-1ベクターの構築

ヒトGalectin-1遺伝子 (NM_002305) の強制発現ベクターの構築にはInvitrogen社のpcDNA3.1Directional TOPO Expression Kitを選択した。このベクターはCMVプロモーターの下流に目的遺伝子のコーディングシーケンスを挿入することで、ウイルス由来のV5及びHisタグとの融合蛋白質として目的蛋白質を発現することが出来るようにPCR用のオリゴDNAプライマーをデザインした。

total RNAをヒト肝臓がん由来HuH7細胞から抽出した (RNeasy Tissue Kit, QIA Shredder, QIAGEN)。抽出した1 μ gのtotal RNAからオリゴdTプライマーを用いてcDNAを合成した (ReverTra-plus kit, TOYOBO)。合成したcDNAを鋳型としてヒトGalectin-1遺伝子のcoding sequence領域 (stop codonを含まない) をPCR法によって増幅した (ReverTra-plus kit, TOYOBO)。得られたPCR産物をpcDNA 3.1Dベクターにligation (pcDNA3.1Directional TOPO Expression Kit, Invitrogen) し、competent cell (Top10, Invitrogen) をtransformationした。

Galectin-1発現ベクター、self ligationによって得られたコントロールベクターのインサート塩基配列をDNAシーケンサーによって解析した。

2) 293細胞への糖鎖プライマー投与

100 mm ϕ dishにサブコンフルエントとなるように293細胞を播種し、Lac-C12とGlcNAc-C12の二種類の糖鎖プライマーを50 μ M濃度で投与した。48時間後に培地を回収し、Sep-Pakカラムに通し、生成物を回収した。これに10%-100% MeOHを用いてStepwiseに生成物を抽出した。得られた生成物はHPTLC (展開溶媒組成 ; Chroloform: MeOH: 0.2% CaCl₂ = 5:4:1) で展開して、レゾルシノール染色による発色をおこなった。

HPTLCで分離した糖鎖伸長生成物はTLCブロットイングによってPVDF膜に転写後、MALDI-TOF-MS (Autoflex, Bruker Daltonics) によって質量分析を行った。中性の生成物はポジティブモードで、酸性の生成物はネガティブモードで測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞株を用いた実験のみ実施した。

C. 研究結果

1) Galectin-1発現ベクターの作成

Galectin-1 遺伝子のPCRに用いた oligo DNA primer配列、PCR反応条件、及びPCR産物のアガロースゲル電気泳動パターンによりGalectin-1発現ベクターが構築された事が明らかとなった。

2) 293細胞での糖鎖構造解析

293細胞へDMSO, Lac-C12, GlcNAc-C12を投与した培地をSepPak抽出し、HPTLCによって分離染色した。染色前のHPTLCプレー

ト上のメタノール30%溶出画分に赤色物質のバンドが認められた。DMSO投与群からは内在性糖脂質GM3と思われるバンドがメタノール90-100%画分において検出された。Lac-C12, GlcNAc-C12共に糖鎖伸長生成物と思われるバンドはメタノール40-80%画分に検出された。未反応のプライマーはメタノール80-90%画分に認められた。Lac-C12, GlcNAc-C12の両者を比較すると同じ濃度で投与したにもかかわらずLac-C12の方が量、質共に多くの糖鎖伸長生成物が検出された。

HPTLCプレートのレゾルシノール、オルシノール染色の結果、70% MeOH溶出画分に9種類、80% MeOH溶出画分に3種類、合計12種類の糖鎖伸長生成物を確認した。100% MeOH溶出画分に少量の内在性GM3と思われるバンドを検出した。これらの糖鎖伸長生成物に移動距離の長い順にN1, N2, N3, N4, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8と名前を付け、それぞれの質量数をMALDI-TOF MSによる解析を行った。

シアル酸非含有糖鎖伸長生成物 (N1-N4) 及びシアル酸含有糖鎖伸長生成物 (A1-A8) のMALDI-TOF-MSスペクトルを測定した。その結果より、N1はLac-C12プライマーに硫酸基が、N2はLac-C12プライマーにHexoseが、N3はLac-C12プライマーにHexNAcが、N4はN2にHexNAcがそれぞれ一分子付加した構造であることが判明した。さらに、A1はLac-C12プライマーにシアル酸が、A2はA1にHexNAcが、A3はHexoseが、A4はA3にHexNAcが、A5はA4にHexoseが、A6はA3にシアル酸が、A7はA5にHexoseとHexNAcが、A8はA7にシアル酸がそれぞれ一分子伸長した構造であることが判明した。この結果

をもとに各糖鎖伸長生成物の糖鎖配列を推定した。N1はSM3様構造、N2はGb3様構造、N3はGg3あるいはLc3用構造、N4はGb4様構造であると考えられる。また、A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8はそれぞれGM3様構造、GM2様構造、GM1様構造、GalNAc GM1様構造、GalGalNAcGM1様構造、GD1a様構造、(GalGalNAc)2GM1様構造、NeuAc(GalGalNAc)2GM1様構造であると考えられる。この結果より、293細胞にはGM3, GM2, GM1, GD1aに代表されるガングリオシドa系列とGb3, Gb4に代表されるグロボ系列の糖鎖合成経路が存在することが示唆された。糖鎖が長く伸長したA5, A7, およびA8はガングリオシドa系列には存在しない構造であり、特にA7, A8に見られるHexNAc-Hexの繰り返し構造はネオラクト系糖鎖合成経路に特徴的なポリラクトサミン構造に類似しており、A7, A8を構成する単糖にはGlcNAcが含まれている可能性もある。この可能性を追求するには単糖異性体の識別を行う必要がある。

D. 考察

ヒトGalectin-1遺伝子発現ベクターとコントロールベクターの構築に成功した。糖鎖プライマー法を糖鎖マイクロアレイに応用するには糖鎖が特定の蛋白質などの生体物質と結合することを確実に検出しなければならない。そのためには糖鎖プライマーへの糖鎖伸長生成物のプレートへの固定化や特定の糖鎖構造を認識するレクチンを用いた糖鎖伸長生成物との結合実験およびその検出などが必要となる。前者はこれまでの研究により可能であることが示されている。糖鎖とレクチンとの結合を特異的に検出す

る系を確立するには、様々な生体物質が混ざっている細胞抽出物あるいは血清などを用いた結合実験へと進むと考えられる。これらの研究の材料として今回構築した Galectin-1発現ベクターを細胞へ導入し、細胞内で多量に発現されたGalectin-1と糖鎖との特異的な結合が検出されるならば、糖鎖プライマー法の糖鎖アレイへの応用を目指す上での基盤技術となり得ることが期待される。

糖鎖アレイの構築には糖鎖ライブラリーが必要である。それを構築する手法はこれまでに、生体からの抽出、有機合成および酵素合成により行われている。しかしながら細胞が発現している多様な構造を全て合成するのは容易ではない。また、糖鎖マップが明らかになり、それらの糖鎖構造が有する認識機能を測定するには、糖鎖プライマー法により作られた糖鎖ライブラリーを利用するの方がより合理的であると考えられる。そのためには培養が容易な細胞を用いて、大量に合成する実験系を構築する必要がある。糖鎖プライマー法により得られた複数の糖鎖伸長生成物を分離する手法の検討も進んでおり、今後は、細胞により得られた糖鎖を固定化する手法を開発して糖鎖アレイを作成することで、糖鎖の機能解析が可能になってくるものと期待される。

E. 結論

糖鎖の機能解析に利用できる Galectin-1の発現ベクターの構築を行った。また HEK-293A細胞に糖鎖プライマーを投与する事で、中性4種類および酸性8種類の糖鎖伸長生成物が得られることがわかった。これらの構造の解析を質量分析装置により

行うことで、糖脂質の糖鎖生合成経路の一端を明らかにする事ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

III 研究成果に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nakajima Hideki, Sato Toshinori	Construction of an oligosaccharide library by cultured cells for use in glyco-biotechnology.	Yuasa Hideya	Nanotechnology in carbohydrate chemistry	Transworld Research Network		2006	167-173
清河信敬	免疫学的分類・診断	別所文雄	新小児がんの診断と治療	診断と治療社	東京	印刷中	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hashimoto M., Morimoto M., Saimoto H., Shigemasa Y., Yanagie H., Eriguchi M., Sato T.	Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages.	Biotechnology Letters	28	815-821	2006
Hu D., Tan X., Sato T. , Yamagata S., Yamagata T.	Apparent suppression of MMP-9 activity by GD1a as determined by gelatin zymography.	Biochemical and Biophysical Research Communications	349	426-431	2006
Ito T., Iida-Tanaka N., Niidome T., Kawano T., Kubo K., Yoshikawa K., Sato T. , Yang Z., Koyama Y.	Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: Protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional adhesion.	J. Controlled Rel.	112	382-388	2006
佐藤 智典	糖鎖生命工学：細胞機能を利用したオリゴ糖鎖の合成	野口研究所時報	49	21-29	2006
Matsubara T., Iijima K., Nakamura M., Taki T., Okahata Y., Sato T.	Specific binding of GM1-binding peptides to high-density GM1 in lipid membranes	Langmuir	23	708-714	2007
Zhu X., Sato T.	The distinction of underivatized monosaccharides using electrospray ionization ion trap mass spectrometry.	Rapid Communications in Mass Spectrometry,	21	191-198	2007

Taguchi T., Takenouchi H., Matsui J., Tang W. R., Itagaki M., Shiozawa Y., Suzuki K., Sakaguchi S., Ktagiri Y. U. , Takahashi T., Okita H., Fujimoto J. , Kiyokawa N.	Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in pro-B-cell development.	Exp. Hematol.	34	508-518	2006
Suzuki K., Kiyokawa N. , Taguchi T., Takenouchi T., Saito M., Shimizu T., Okita H., Fujimoto J.	Characterization of monocyte-macrophage lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro.	Int. J. Hematology	In press		2007
塩沢 裕介, 北村 紀子, 竹野内 寿美, 田口 智子, 大喜多 肇, 林 泰秀, 小原 明, 花田 良二, 土田 昌宏, 藤本 純一郎 , 清河 信敬 .	4 カラーデジタルフローサイトメトリーを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み.	Cytometry Research	16	11-17	2006
Cui C., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., and Umezawa A.	Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells	Mol. Biol. Cell	In press		2007
Umezawa A. , Toyoda M.	Two MSCs : Marrow stromal cells and mesencymal stemcells.	Inflammation and Regeneration	27	28-36	2007
Sugiki T., Uyama T., Toyoda M., Morioka H., Kume S., Miyado K., Matsumoto K., Saito H., Tsumaki N., Takahashi Y., Toyama Y., Umezawa A.	Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts.	J. Cell Biochem.	100	1240-1254	2007
Yamada Y., Sakurada K., Takeda Y., Gojo S., Umezawa A.	Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells.	Exp. Cell Res.	313	698-706	2007
Tomita M., Mori T., Maruyama K., Zahir T., Ward M., Umezawa A. , Young M. J.	A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells.	Stem Cells	24	2270-2278	2006

Nagayoshi K., Ohkawa H., Yorozu K., Higuchi M. Higashi S. Kubota N., Fukui H., Imai N., Gojo S., Hata J., Kobayashi Y., and Umezawa A.	Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification.	J. Cellular Physiology	208	188-194	2006
Yazawa T., Mizutani T., Yamada K., Kawata H., Sekiguchi T., Yoshino M., Kajitani T., Shou Z., Umezawa A. , Miyamoto K.	Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells.	Endocrinology	147	4104- 4111	2006
中島 英規	オリゴ糖合成 -糖鎖ブライマー法で生産した糖鎖の医療分野への応用-	高分子	55	25	2006

IV 研究成果の刊行物・別冊

Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages

Mayu Hashimoto · Minoru Morimoto ·
Hiroyuki Saimoto · Yoshihiro Shigemasa ·
Hironobu Yanagie · Masazumi Eriguchi ·
Toshinori Sato

Received: 13 February 2006 / Accepted: 14 February 2006 / Published online: 31 May 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract Chitosan is a biodegradable and biocompatible polymer and is useful as a non-viral vector for gene delivery. In order to deliver pDNA/chitosan complex into macrophages expressing a mannose receptor, mannose-modified chitosan (man-chitosan) was employed. The cellular uptake of pDNA/man-chitosan complexes through mannose recognition was then observed. The pDNA/man-chitosan complexes showed no significant cytotoxicity in mouse peritoneal macrophages, while pDNA/man-PEI complexes showed strong cytotoxicity. The pDNA/man-chitosan complexes showed much higher transfection efficiency than pDNA/chitosan complexes in mouse peritoneal macrophages. Observation with a confocal laser microscope suggested differences in the cellular uptake mechanism between pDNA/chitosan complexes and pDNA/

man-chitosan complexes. Mannose receptor-mediated gene transfer thus enhances the transfection efficiency of pDNA/chitosan complexes.

Keywords Mannose · Chitosan · Gene transfer · Receptor-mediated endocytosis · Macrophage · Plasmid DNA

Introduction

Macrophages play an important role as effector cells in inflammation and antigen presentation. Macrophages accumulate at pathological sites, including tumors, atherosclerotic plaques, arthritic joints and sites of infection (Kelly et al. 1988). Activated macrophages can release cytokines such as interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and reactive oxygen intermediates to defend against microbial infection and lyse tumor cells (Higuchi et al. 1990). Therefore, gene transfer to macrophages can be applied to not only genetic disease, but also to DNA vaccination and cancer therapy (Griffiths et al. 2000).

Recently, several non-viral gene delivery systems have been developed. Chitosan is a naturally occurring polysaccharide consisting of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine linked by a $\beta(1 \rightarrow 4)$ -glycosidic bond. It has the potential to condense anionic DNA to a compact structure

M. Hashimoto · T. Sato (✉)
Department of Biosciences and Informatics, Keio University, 3-14-1, Hiyoshi, Yokohama 223-8522, Japan
e-mail: sato@bio.keio.ac.jp

M. Morimoto · H. Saimoto · Y. Shigemasa
Department of Materials Science, Tottori University, 4-101, Koyama-Minami, Tottori 680-8552, Japan

H. Yanagie · M. Eriguchi
Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Tokyo 153-8904, Japan

through electrostatic interaction. Since chitosan has been proved to be non-toxic, biodegradable and biocompatible (Hirano et al. 1988), chitosan is considered to be a promising DNA carrier. DNA/chitosan complexes have shown high transfection efficiency in several cell lines (Sato et al. 1996; Thanou et al. 2002; Corsi et al. 2003). However, they did not show uptake into white blood cells (Sato et al. 2001) and, to our knowledge, transfection of DNA/chitosan complexes to macrophages has not been reported yet.

Receptor-mediated endocytosis offers the potential to target specific cells and enhances their uptake. Active targeting using receptor-mediated interaction has been effective in gene delivery (Varga et al. 2000). For example, macrophages express a mannose receptor that is used for endocytosis and phagocytosis of a variety of antigens (Stahl et al. 1980). Mannose-mediated drug delivery systems have often been employed to target macrophages (Sato and Sunamoto 1992). For gene delivery systems, mannosylated PEI, PLL and liposomes have been employed to deliver genes into dendritic cells and macrophages (Ferkol et al. 1996; Kawakami et al. 2000). However, PEI has strong cytotoxicity (Moghimi et al. 2005), and PLL requires chloroquine to induce transfection (Midoux et al. 1993). In this study we have employed mannosylated chitosan as a gene carrier with high transfection efficiency and low cytotoxicity, and the uptake of pDNA/man-chitosan complexes and their transfection efficiency in mouse peritoneal macrophages was investigated.

Materials and methods

Preparation of mannose-modified (man-chitosan)

Chitosan (average molecular weight, 53 kDa; degree of deacetylation, 93%) was obtained from Koyo Chemical Co. Ltd. Mannosylated chitosan (man-chitosan) was synthesized according to the literature (Holme and Hall 1992). Briefly, after allyl mannoside was reductively ozonolyzed to

provide formylmethyl mannoside, chitosan dissolved in 1% aqueous acetic acid was coupled with formylmethyl mannoside by reductive alkylation in the presence of sodium cyanoborohydride. The degree of substitution (DS) was calculated to be 5 and 21% from elementary analysis. Calc. for 5% man-chitosan ($[(C_8H_{13}NO_5)_{0.03}(C_6H_{11}NO_4)_{0.92}(C_{14}H_{25}NO_{10})_{0.05}] 1 H_2O$): C, 40.82; H, 7.25; N, 7.28. Found: C, 42.8; H, 7.597; N, 7.422. Calc. for 21% man-chitosan ($[(C_8H_{13}NO_5)_{0.03}(C_6H_{11}NO_4)_{0.76}(C_{14}H_{25}NO_{10})_{0.21}] 1 H_2O$): C, 41.67; H, 7.19; N, 6.21. Found: C, 43.98; H, 7.59; N, 6.024.

Plasmid DNA

Plasmid DNA (pDNA), pGL3-Luc, encoding luciferase (Promega) was amplified in *E. coli* DH5 and isolated with a Qiagen Endotoxin-free Plasmid Giga Kit (Qiagen Inc.) according to the instruction manual provided. pGL-3Luc was labeled with YOYO-1 (Molecular Probes Inc.) for the evaluation of cellular uptake (Ogris et al. 2000). Briefly, 10 μ l of pGL-3Luc (1 mg/ml) was mixed with 10 μ l 10 μ M YOYO-1 and incubated at room temperature for 1 h in the dark.

Mouse peritoneal macrophages

Female ICR mice were purchased from Japan SLC Co. The mice used in the study were 6–8 weeks old, and were housed under pathogen-free conditions in the animal facility of the Center for Disease Biology and Integrative Medicine, the University of Tokyo. Elicited macrophages were harvested from the peritoneal cavity of female ICR mice 3 days after intraperitoneal injection of 2 ml 3% (w/v) thioglycolate medium (Nissui Pharmaceutical). Cells were washed and then suspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, JRH). The cells were plated on either a 24- or 96-well culture plate at a density of 3×10^5 cells/cm². After incubation for 2 h at 37°C in 5% CO₂-95% air, non-adherent cells were washed away with PBS (–) and the residual adherent was cultured under the same conditions for another 24 h.

Preparation of pDNA/chitosan complexes

pDNA/chitosan complexes were prepared as in the method previously reported (Sato et al. 2001). pDNA solution (0.1 mg/ml water) was mixed with a given amount of man-chitosan solution (0.3 mg/ml) in PBS (-) adjusted to pH 6.5. The mixture of pDNA and man-chitosan was incubated at room temperature for 15 min. The YOYO-1-labeled pDNA described above was used for the evaluation of cellular uptake. The ratio of the plasmid phosphate anion to the chitosan amino groups (N/P) was 5.

Measurement of zeta potential and particle size

The concentration of pDNA was adjusted to 1.5 µg/ml by diluting with 20 mM HEPES buffer (pH 6.5). Zeta potentials and particle sizes of pDNA complexes were measured with DELSA 440 (Beckman Coulter) at 25°C.

Cellular uptake

Mouse peritoneal macrophages were seeded at 1×10^5 cells/well in 96-well plates 24 h prior to transfection. pDNA complexes containing 1 µg YOYO-1-labeled pDNA were incubated with cells in RPMI1640 adjusted to pH 6.5 containing 10% (v/v) FBS at 37°C under a 5% CO₂ humidified atmosphere for 1 h. The culture medium was replaced with PBS (-) after rinsing with PBS (-) three times. The cells were then measured for their fluorescence intensity using a fluorescence microplate reader (Safire, TECAN) at excitation and emission wavelengths of 490 and 520 nm, respectively. For competition studies, the cells were treated with pDNA/man-chitosan complexes in the presence of 72 µg/ml mannan.

Luciferase assay

Mouse peritoneal macrophages were seeded at 4×10^5 cells/well in 24-well plates 24 h prior to transfection. pDNA complexes containing 5 µg of pDNA were incubated with cells in RPMI1640 (pH 6.5) containing 10% (v/v) FBS at 37°C under a 5% CO₂ humidified atmosphere for 4 h. The

medium was replaced with fresh complete medium and the cells were further incubated for 20 h before assays. Transfection with Lipofectin® (Gibco BRL) and mannosylated PEI (in vivo-jet-PEI-Man, Polyplus transfection) was carried out according to the instruction manuals. The transfected cells were washed three times with PBS (-) and lysed with cell lysate buffer (Promega). Luciferase gene expression was measured using a luciferase assay kit (Promega). The protein concentrations were determined with a DC protein assay kit (BIO-RAD). The relative light units (RLU) were measured with a luminometer and were corrected for by the protein concentration.

Confocal laser scanning microscopy

Cells were seeded at 2×10^5 cells/well in glass-bottomed dishes (diam. 35 mm), and incubated with pDNA/chitosan complexes for 4 h. The medium was replaced followed by washing with PBS (-). The subcellular distribution of YOYO-1-labeled pDNA/chitosan complexes was analyzed with a confocal laser-scanning microscope (TCS-NT, Leica) equipped with a heating stage (Temp-Control 37-2, Leica) and a Kr/Ar laser.

Cell viability

Mouse peritoneal macrophages adhered to a 96-well microplate were incubated with pDNA complexes for 24 h. Ten µl of WST-1 dye solution (10 mM WST-1 and 0.2 mM 1-methoxy PMS (Dojindo, Laboratories) per well was added to the culture medium. After 2 h, absorbance at 450 nm with a reference wavelength of 690 nm was measured using a microplate reader (Multiskan, Labsystem).

Results

The particle size and zeta potential of pDNA/chitosan, pDNA/5% man-chitosan and pDNA/21% man-chitosan complexes was about 300 nm and +15 mV, respectively (Table 1). The modification of mannose to chitosan with substitution degrees of 5% and 21% did not affect the size and zeta potential of pDNA/man-chitosan complexes.

Table 1 Particle size and zeta potential of pDNA/chitosan complexes

pDNA complex	Size	Zeta potential
Chitosan	316 ± 33	+17.4 ± 1.6
5% man-chitosan	205 ± 50	+14.1 ± 1.5
21% man-chitosan	334 ± 50	+15.5 ± 0.9

The carbohydrate recognition of pDNA/man-chitosan complexes was determined by agglutination induced by concanavalin A (ConA). With the addition of ConA, the turbidity of the pDNA/man-chitosan complexes increased significantly at 350 nm, while the pDNA/chitosan complex showed no change in turbidity (Fig. 1). Recognition of the pDNA/man-chitosan complexes depended on the substitution degree of mannose residues in chitosan. The increase in turbidity of the pDNA/21% man-chitosan complex was twice that of the pDNA/5% man-chitosan complex. Agglutination of the pDNA/man-chitosan complexes was reversible by adding 10 mM mannose. These results indicated that the mannose moieties of the pDNA/man-chitosan complexes were specifically recognized by ConA.

The interaction of pDNA/man-chitosan complexes with mouse peritoneal macrophages was investigated using YOYO-1-labeled pDNA. The

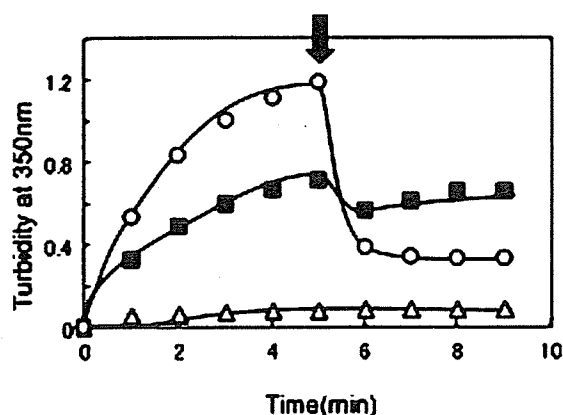


Fig. 1 Time courses of turbidity changes of pDNA complexes at 350 nm by the addition of ConA. pDNA = 25 µg/ml, ConA = 0.5 mM. Mannose (final concentration 10 mM) was added at the time marked by the arrow. Open triangle: pDNA/chitosan complex, filled square: pDNA/5% man-chitosan complex, open circle: pDNA/21% man-chitosan complex

amount of pDNA/man-chitosan complexes taken up into macrophages was almost the same as pDNA/chitosan complexes (Fig. 2). In the presence of mannan as an inhibitor, the amount of cellular uptake of pDNA/man-chitosan complexes was significantly decreased, while that of pDNA/chitosan complexes was not.

The transfection efficiency of pDNA/man-chitosan complexes was investigated by luciferase assay in macrophages. The transfection efficiency of both pDNA/5% man-chitosan and pDNA/21% man-chitosan complexes was significantly higher than that of pDNA/chitosan complexes, and was comparable to pDNA complexed with mannosylated PEI, a commercially available transfection reagent (Fig. 3A). The transfection activity of pDNA/man-chitosan complexes was also investigated in COS7 cells (Fig. 3B). The transfection efficiency of pDNA/chitosan complexes was almost the same as pDNA/5% man-chitosan complexes, and that of pDNA/21% man-chitosan complexes was about a quarter of pDNA/chitosan complexes.

The subcellular distribution of pDNA/man-chitosan complexes in mouse peritoneal macrophages was visualized by a confocal laser scanning

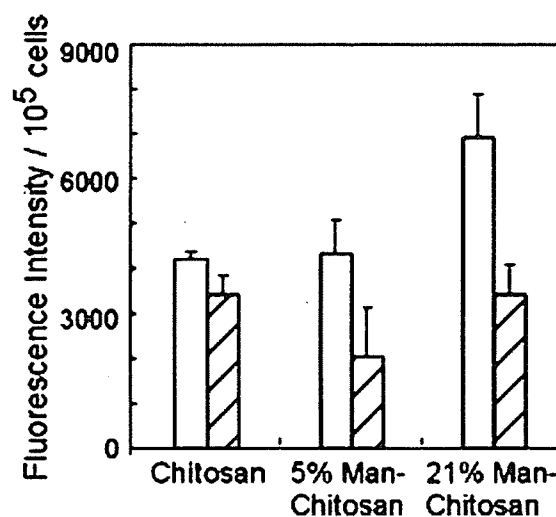


Fig. 2 Cellular uptake of pDNA complexes in mouse peritoneal macrophages. Macrophages (10^5 cells/well) were incubated with pDNA complexes (DNA = 10 µg/ml) in the absence (white bar) or presence (hatched bar) of mannan. After incubation for 1 h, the cells were washed and analyzed for fluorescence intensity. The values represent the mean ± SD, $n = 4$

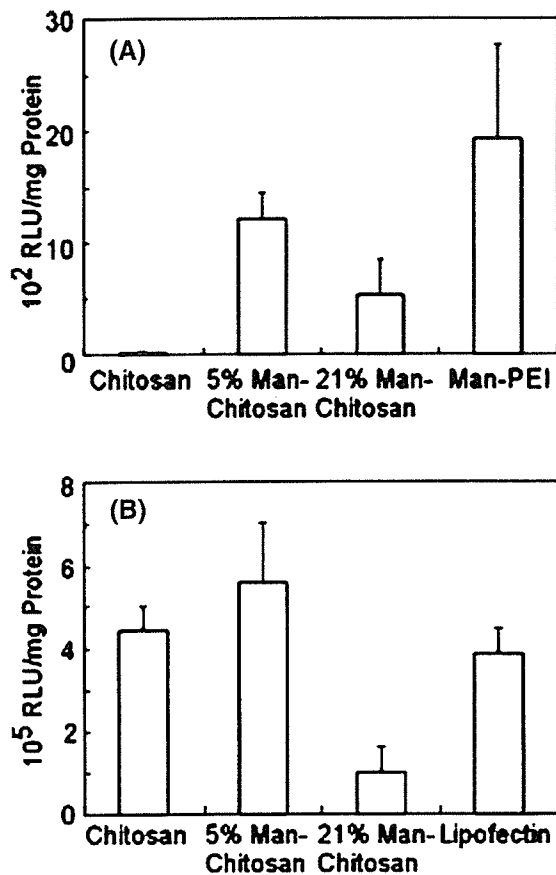


Fig. 3 Transfection efficiency of pDNA complexes for (A) mouse peritoneal macrophages and (B) COS7 cells. The concentrations of pDNA were 5 µg/ml for COS7 cells and 10 µg/ml for macrophages. The cells were incubated for 4 h with the pDNA complexes. The cells were lysed and their luciferase activity measured. pDNA complexes were prepared at N/P = 5

microscope. pDNA/chitosan complexes were mainly distributed near cell surface after 4 h incubation (Fig. 4A). On the other hand, pDNA/

man-chitosan complexes were largely taken up into macrophages (Fig. 4B, C).

The influence of pDNA/chitosan and pDNA/man-chitosan complexes on the cell viability of mouse peritoneal macrophages was investigated by MTT assay. As shown in Fig. 5, cell viability was reduced by increasing the concentration of pDNA/chitosan complexes, while pDNA/man-chitosan complexes showed no cytotoxicity below 10 µg/ml of DNA concentration. The commercially available mannosylated PEI showed strong cytotoxicity depending on the concentration.

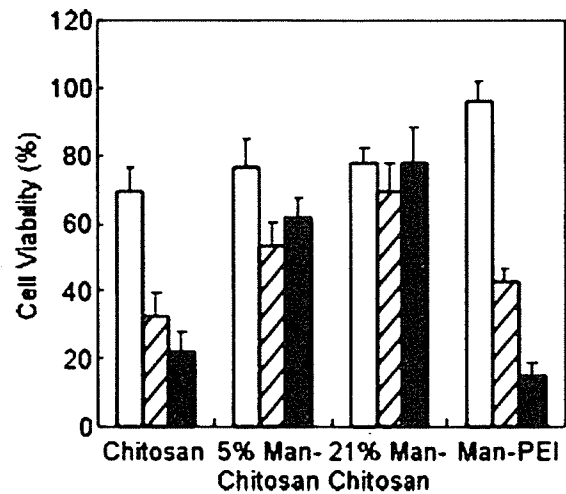


Fig. 5 Cytotoxicity of pDNA/chitosan complexes and pDNA/man-chitosan complexes in mouse peritoneal macrophages. The concentrations of pDNA were 1 µg/ml (white bar), 5 µg/ml (hatched bar), and 10 µg/ml (black bar). The cells were incubated with pDNA complexes for 24 h

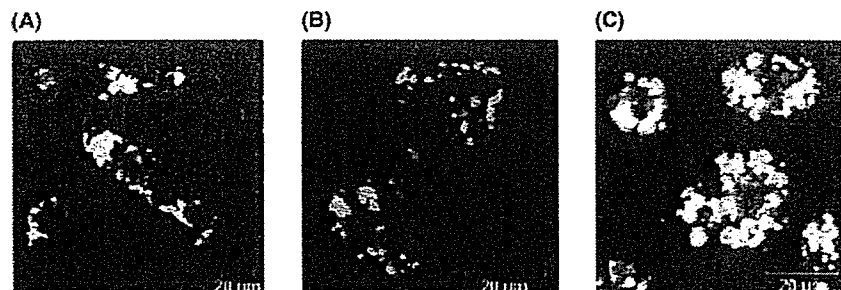


Fig. 4 The subcellular distribution of pDNA/chitosan complexes and pDNA/man-chitosan complexes in mouse peritoneal macrophages. (A) pDNA/chitosan complex,

(B) pDNA/5% man-chitosan complex, and (C) pDNA/21% man-chitosan complex. The cells were incubated with pDNA complexes for 4 h

Discussion

Macrophages expressing a mannose receptor has been utilized for several target-specific drug delivery systems. In this study, we showed that mannosylated chitosan is a good gene carrier with high transfection efficiency and low cytotoxicity in macrophages. The substitution degree of mannose in chitosan was sufficient at 5% to enhance the transfection efficiency to macrophages. The cellular uptake of pDNA/man-chitosan complexes by macrophages was inhibited by mannan, while the transfection efficiency of pDNA/chitosan complexes was almost the same as the pDNA/5% man-chitosan complexes in COS7 cells. These results suggest that pDNA/man-chitosan was taken up by macrophages through mannose-receptor mediated interaction.

Carbohydrate recognition often depends on sugar density and is strengthened by the multivalent effect; however, the modification of amino groups in chitosan decreased the charge density of chitosan and the DNA-binding strength as well as PEI (Zanta et al. 1997). Thus, the balance of DNA condensation and receptor-recognition by modified chitosan would affect cell transfection efficiency. We then synthesized man-chitosans with different substitution degrees, 5 and 21%, as DNA carriers. The substitution degree of mannose in chitosan did not affect the size and zeta potential of pDNA complexes (Table 1). When pDNA complexes were incubated with DNase I under the condition that naked pDNA was digested completely, pDNAs complexed with chitosan, 5% man-chitosan and 21% man-chitosan showed resistance to DNase I (data not shown). We also examined DNase digestion of pDNA complexed with 47% man-chitosan. Although the formation of the pDNA/47% man-chitosan complex was confirmed by agarose gel electrophoresis, pDNA complexed with 47% man-chitosan was completely digested by DNase I (data not shown). Therefore, it was confirmed that low substitution degrees (5 and 21%) of mannose in chitosan were preferable for the formation of stable pDNA complexes.

The pDNA/21% man-chitosan complex was taken up in macrophages with the same efficiency as the pDNA/5% man-chitosan complex, and

there was no significant difference between the complexes in the transfection efficiency for macrophages (Fig. 3A). Therefore, the substitution degree of mannose in chitosan was sufficient at 5% for gene delivery to macrophages.

The modification of chitosan with mannose significantly enhanced the transfection efficiency in macrophages in this study. Although it was reported that the mannose receptor-mediated gene delivery enhanced transfection efficiency (Kawakami et al. 2000), the mechanism has been little investigated. In order to investigate the cell transfection mechanism of the mannose-mediated gene carrier, we evaluated the effect of endocytosis inhibitor on cellular uptake and observed the sub-cellular distribution of pDNA complexes with a confocal laser scanning microscope. Treatment with cytochalasin B, which inhibits the accumulation of microtubules, significantly inhibited the cellular uptake of pDNA/chitosan and pDNA/man-chitosan complexes (data not shown). These results suggest that pDNA complexes were taken up by macrophages through phagocytosis. Microscopic observation indicated that pDNA/chitosan complexes and pDNA/man-chitosan complexes showed different intracellular transport in macrophages (Fig. 4); while pDNA/chitosan complexes were localized in early phagosomes near the plasma membrane, pDNA/man-chitosan complexes were delivered inside the cells.

Phagosome movement in macrophages is modulated by several receptors associated with cell uptake (Aderem and Underhill 1999). Therefore, it is considered that the phagocytosis of pDNA/man-chitosan complexes is distinct from that of pDNA/chitosan complexes. Since pDNA/chitosan complexes stayed near the plasma membrane, interaction of the pDNA/chitosan complexes with cell surface receptor may induce signal transduction to arrest phagosome movement. On the other hand, bacteria such as *M. tuberculosis* with lipoarabinomannan on the surface, were efficiently internalized via the mannose receptor (Kag and Schlesinger 1998). Likewise, it is considered that phagosome movement of pDNA/man-chitosan complexes occurred in macrophages. pDNA/man-chitosan complexes showed little cytotoxicity against mouse peritoneal macrophages, while pDNA/chitosan complexes exerted a toxic effect

on the proliferation of macrophage cells in a dose-dependent manner as well as pDNA/man-PEI complexes (Fig. 5). The cytotoxicity of pDNA/PEI complexes has been reported in several papers (Köping-Höggård et al. 2001; Moghimi et al. 2005), while that of pDNA/chitosan complexes is known to be low compared to other complexes (Thanou et al. 2002; Corsi et al. 2003). pDNA/chitosan complexes also showed little cytotoxicity for COS7 cells employed in this study (data not shown). Thus, their cytotoxicity may be confined to macrophages.

The mannosylation of chitosan decreased the cytotoxicity of pDNA/chitosan complexes. The hydrophilic surface of pDNA/man-chitosan complexes suppresses the formation of aggregation followed by non-specific adhesion to the cell surface. The low cytotoxicity of pDNA/man-chitosan complexes may be caused by the hydrophilicity of its surface.

Conclusion

In conclusion, we found that mannose-modified chitosan is a good gene carrier for macrophages. The modification of mannose to chitosan significantly enhanced the transfection efficiency of the pDNA/chitosan complex and reduced its cytotoxicity in macrophages.

Acknowledgements This work was partly supported by the Special Coordination of Funds for Promoting Science and Technology from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of the Japanese Government (T.S.).

References

- Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophage. *Annu Rev Immunol* 17:593–623
- Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC (2003) Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 24:1255–1264
- Ferkol T, Perales JC, Mularo F, Hanson RW (1996) Receptor-mediated gene transfer into macrophage. *Proc Natl Acad USA* 93:101–105
- Griffiths L, Binkley K, Iqbal S, Kan O, Maxwell P, Ratcliffe P, Lewis C, Harris A, Kingsman S, Naylor S (2000) The macrophage—a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther* 7:255–262
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144:1425–1431
- Hirano S, Seino H, Akiyama Y, Nonaka I (1988) Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administration. *Polym Mat Eng Sci* 59:897–901
- Holme KR, Hall LD (1992) Preparation and characterization of *N*-[2-(glycosyloxy)-ethyl]chitosan derivatives. *Carbohydr Res* 225:291–306
- Kag BK, Schlesinger LS (1998) Characterization of Mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect Immun* 66:2769–2777
- Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M (2000) Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther* 7:292–299
- Kelly PM, Davison RS, Bliss E, McGee JO (1988) Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer* 57:174–177
- Köping-Höggård M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM, Artursson P (2001) Chitosan as a nonviral gene delivery system: structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*. *Gene Ther* 8:1108–1121
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche AC (1993) Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res* 21:871–878
- Moghimi SM, Symond P, Murray JM, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A (2005) A two-stage poly(ethyleneimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther* 11:990–995
- Ogris M, Wagner E, Steinlein P (2000) A versatile assay to study cellular uptake of gene transfer complexes by flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1474:237–243
- Sato T, Ishii T, Okahata Y (2001) *In vitro* gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22:2075–2080
- Sato T, Shirakawa N, Nishi H, Okahata Y (1996) Formation of a DNA/polygalactosamine complex and its interaction with cells. *Chem Lett* 725–726
- Sato T, Sunamoto J (1992) Recent aspects in the use of liposome in biotechnology and medicine. *Prog Lipid Res* 31:345–372
- Stahl PD, Schulesinger PH, Singardson E, Rodman JS, Lee YC (1980) Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell* 19:207–215
- Thanou M, Florea BI, Geldof M, Junginger HE, Borchard G (2002) Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. *Biomaterials* 23:153–159
- Varga CM, Wickham TJ, Lauffenburger DA (2000) Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design. *Biotechnol Bioeng* 70:593–605
- Zanta MA, Boussif O, Adib A, Behr JP (1997) *In vitro* gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconj Chem* 8:839–844