

体内・細胞内動態制御機能を搭載した熱ショックタンパク質の 開発とワクチンデリバリーへの応用

西川元也,* 竹本誠二, 高倉喜信

Development of Heat Shock Proteins with Controlled Distribution Properties and Their Application to Vaccine Delivery

Makiya NISHIKAWA,* Seiji TAKEMOTO, and Yoshinobu TAKAKURA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 18, 2006)

Antigen delivery to antigen-presenting cells (APCs) is a key issue in developing effective cancer vaccines. Controlling the tissue distribution of antigens, which are administered in a peptide/protein or DNA form, can increase antigen-specific immune responses, including the induction of cytotoxic T lymphocytes. Heat-shock protein 70 (Hsp70), a member of a highly conserved family of molecular chaperones, forms complexes with a variety of tumor-related antigens *via* its polypeptide binding domain. Because Hsp70 is taken up by APCs through the recognition by Hsp receptors, such as CD91 and LOX-1, its application to antigen delivery systems has been examined both in experimental and clinical settings. A tissue distribution study revealed that Hsp70 is mainly taken up by the liver, especially by hepatocytes, after intravenous injection in mice. A significant amount of Hsp70 was also delivered to regional lymph nodes when it was injected subcutaneously, supporting the hypothesis that Hsp70 is a natural targeting system to APCs. Model antigens were complexed with or conjugated to Hsp70, by which greater antigen-specific immune responses were achieved. Cytoplasmic delivery of Hsp70-antigen further increased the efficacy of the Hsp70-based vaccines. These findings indicate that effective cancer therapy can be achieved by developing Hsp70-based anticancer vaccines when their tissue and intracellular distribution is properly controlled.

Key words—heat-shock protein; DNA vaccine; pharmacokinetics; antigen delivery; intracellular trafficking

1. はじめに

抗原特異的な免疫応答を誘導する免疫療法は、癌や感染症に対する有効かつ安全な治療法として期待されている。抗原を投与することで特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が誘導され、この CTL が標的となる癌細胞などを傷害することで治療効果が得られるものと考えられる。一般に CTL の誘導には、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APC) が抗原タンパク質又は抗原ペプチドを取り込んだあと、これを細胞内で分解し、生成されたペプチド断片を MHC class I 分子上に提示する

必要がある。こうした免疫療法は、からだに本来備わっている免疫機能を利用し、これを活性化することで標的細胞を攻撃することから、抗癌剤や放射線などを利用した治療法と比較して副作用の危険が低いことが利点とされる。その一方で、治療に必要なレベルの CTL を誘導することが困難であることが問題とされ、十分な治療効果が得られていないのが現状である。その主な原因として、1) 抗原タンパク質・抗原ペプチドの APC への移行量が少ない、2) APC に移行後の抗原タンパク質・抗原ペプチドの利用率が低い、3) APC の CTL 誘導能が低い、ことが挙げられる。このうち 1) 及び 2) に関しては、投与された抗原の体内動態の制御、さらには APC に取り込まれたあとの細胞内動態を制御することで効果増強が可能である。

筆者らはこれまでに、卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) をモデル抗原タンパク質として用いた

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

*e-mail: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

検討において、効率的な CTL の誘導を目的に APC への OVA デリバリーシステムの開発を行ってきた。APC に発現するスカベンジャーレセプターが負電荷高分子を特異的に認識することから、このレセプターを介して APC にデリバリー可能なサクシニル化 OVA を開発し、^{1,2)} これにより CTL 誘導の増大、さらには OVA 発現癌細胞を移植した担癌マウスの生存日数の延長に成功した。また、OVA をカチオン化することで APC への取り込みを大幅に増大することにも成功し、このカチオン化 OVA によっても効率的な CTL が誘導可能であることを示した。³⁾ スカベンジャーレセプターを介したデリバリーやカチオン化による効率的な CTL 誘導は、APC による取り込みが増大した抗原 (OVA) がエンドソーム/ライソゾーム経路から細胞質に誤送され、MHC class I 分子にクロスプレゼンテーションされた結果と推察される。

さらなる免疫効果の増強には、抗原の体内動態の制御に加えて、APC 内での動態 (細胞内トラフィック) 制御並びに APC の活性化が有効と考えられる。近年、腫瘍免疫の分野において、熱ショックタンパク質が強力な免疫賦活化物質として注目を集めている。熱ショックタンパク質は熱などの刺激により発現が亢進するタンパク質群であり、分子シャペ

ロンとして細胞内タンパク質の高次構造の形成や輸送、分解等を介助することが知られている。⁴⁾ 代表的な熱ショックタンパク質である heat shock protein 70 (Hsp70) は、C 末に存在する抗原ペプチドと結合可能なドメイン (polypeptide binding domain) を有する。⁵⁾ また、マクロファージや樹状細胞などの APC に発現する CD91 や LOX-1 などのいわゆる Hsp レセプターにより認識され APC に効率よく取り込まれること、^{6,7)} さらに CD40, Toll-like receptor (TLR)-2, TLR-4 などを介して APC を活性化するアジュバント活性があることも報告されている。⁸⁾ したがって、抗腫瘍免疫を目的とした抗原デリバリーにおいて、Hsp70 は理想的な抗原キャリアであると考えられ、これを利用することで効果的な抗腫瘍免疫が誘導されることが期待される (Fig. 1)。そこで本稿では、熱ショックタンパク質の体内・細胞内動態に焦点を当て、Hsp 利用によるワクチン開発について概説する。

2. Hsp70 の体内動態

2-1. 静脈内投与

細胞外の熱ショックタンパク質は、細胞に危険を伝えるシグナル (danger signal) としての重要な機能を持つ。しかしながら、細胞外へ移行した熱ショックタンパク質の体内動態については明らかとはされていなかった。そこで筆

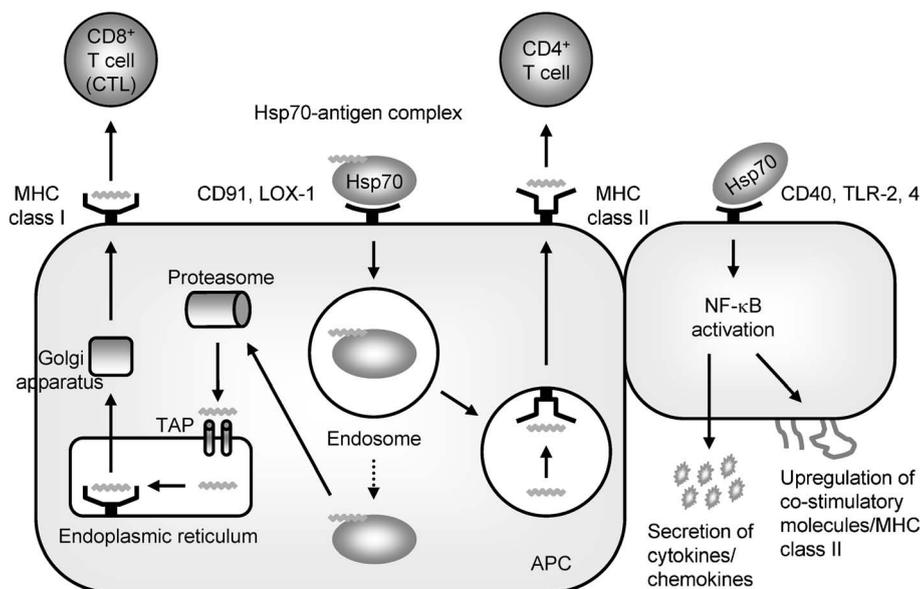


Fig. 1. Roles of Hsp70 in Immune Response

Hsp70 is recognized by signaling receptors, such as CD40 and Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4, on APCs, activates nuclear factor- κ B (NF- κ B), then up-regulates the expression of costimulatory molecules and MHC class II and induces the secretion of cytokines/chemokines. In addition, Hsp70 is recognized by Hsp receptors, such as LOX-1 and CD91, and internalized. When antigen peptides are bound or conjugated to Hsp70, the internalized peptides can be processed and presented on MHC molecules.

者らは、熱ショックタンパク質を利用した抗原デリバリーシステムの合理的開発を目的に、代表的な熱ショックタンパク質である Hsp70 の体内挙動についてマウスを用いて検討した。⁹⁾

¹¹¹In で放射標識を施したマウス Hsp70 をマウス尾静脈内に投与したところ、Hsp70 は速やかに血中から消失し主として肝臓に集積した (Fig. 2)。投与量を 50 倍 (100 μ g/マウス) に増加した場合にも体内動態に顕著な違いは認められなかったことから、少なくともこの投与量の範囲においては体内動

態が線形であることが明らかとなった。その一方で、過剰量の非標識 Hsp70 を前投与することで標識体の血漿中からの消失並びに肝取り込みは有意に阻害され、特異的な取り込み機構の関与が示唆された。Hsp70 を認識するレセプターには、マクロファージや樹状細胞などの APC に発現する LOX-1 が挙げられる。¹⁰⁾ このレセプターは、ポリアニオンを認識するスカベンジャーレセプターの 1 種であり、リガンドとしてスクシニル化牛血清アルブミン (BSA) 並びにマレイル化 BSA, poly [I] などを認

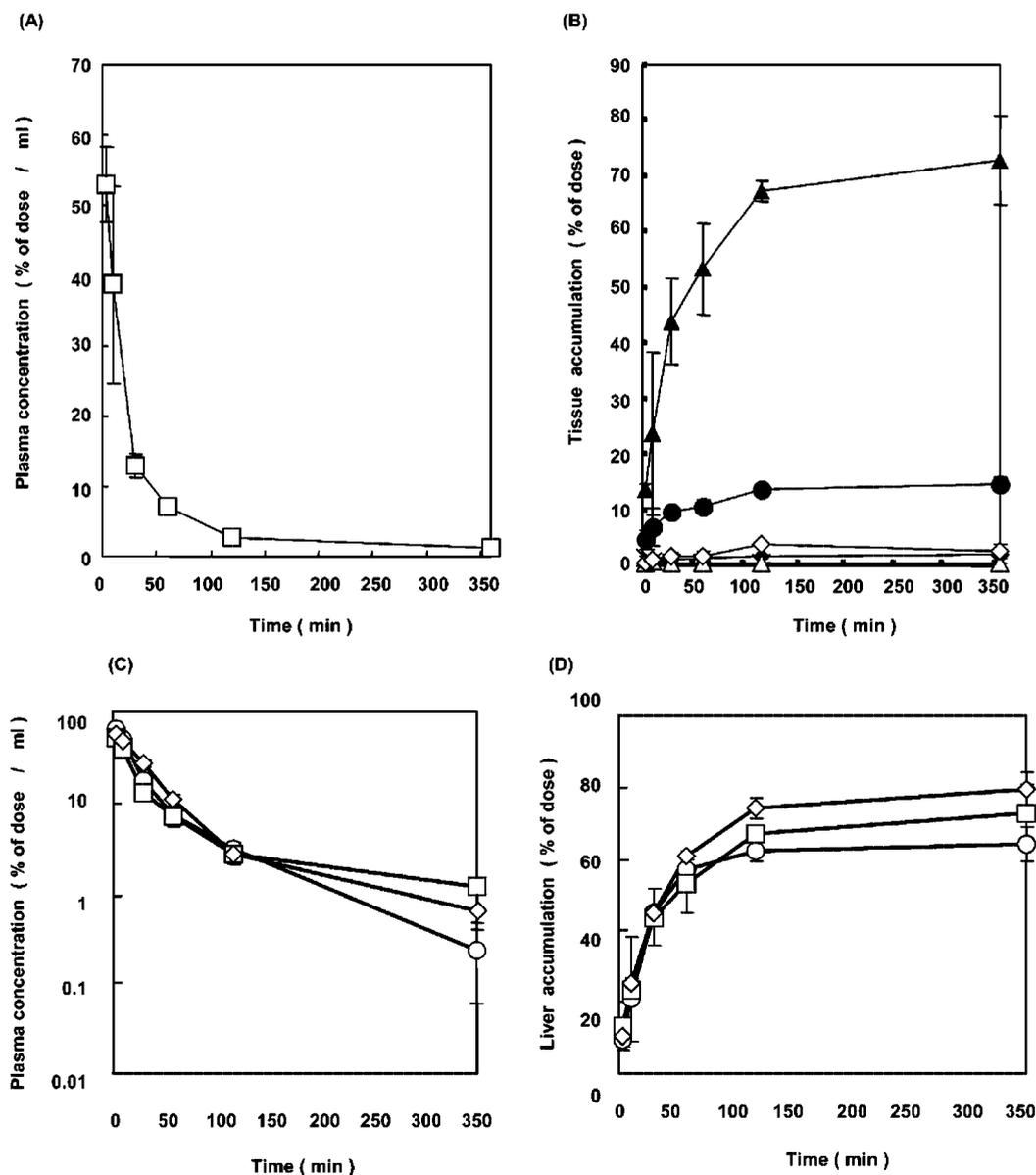


Fig. 2. Tissue Distribution of ¹¹¹In-radioactivity after Intravenous Injection of ¹¹¹In-Hsp70 in Mice

(A, B) After injection of ¹¹¹In-Hsp70 at a dose of 10 μ g/mouse, the radioactivity in plasma (A) and organs (B) was measured and expressed as % of dose/ml (A) or % of dose (B). Keys: (▲): liver, (●): kidney, (◇): urine, (◆): spleen, (△): heart, (×): lung. (C, D) After injection of ¹¹¹In-Hsp70 at a dose of 2, 10 or 100 μ g/mouse, the radioactivity in plasma (C) and liver (D) was measured and expressed as % of dose/ml (C) or % of dose (D). Keys: (○): 2 μ g/mouse, (□): 10 μ g/mouse, (◇): 100 μ g/mouse. Results are expressed as mean \pm S.D. of three mice. Cited from *Pharm. Res.*, 22 (3), 419-426 (2005).

識することが知られている。そこで、これらポリアニオンを前投与したところ、Hsp70の肝臓への取り込みは有意に阻害された (Fig. 3)。したがって、Hsp70の肝臓取り込みには LOX-1 などのスカベンジャーレセプターの関与が考えられる。

一方、LOX-1とは別の Hsp レセプターである CD91は、マクロファージや線維芽細胞、肝細胞などに発現する。¹¹⁾ CD91のリガンドである α_2 -マクログロブリン (α_2 -M)を前投与した場合にも、Hsp70の肝臓取り込みは顕著に阻害された (Fig. 3)。こうした結果は、Hsp70が静脈内投与後 LOX-1や CD91などの Hsp レセプターに認識され、主に肝臓に取り込まれることを示唆するものである。コラゲナーゼを含む緩衝液を灌流することで肝臓構成細胞を肝細胞と、Kupffer細胞や類洞内皮細胞を含む非実質細胞とに分離したところ、Hsp70は肝細胞に多く取り込まれることが明らかとなった。マウスから単離培養した肝細胞を用いた検討においても、 α_2 -Mあるいは抗 CD91抗体の共存により、Hsp70の細胞取り込みが抑制された。したがって、循環血液中に移行した Hsp70は、主に肝実質細胞に発現

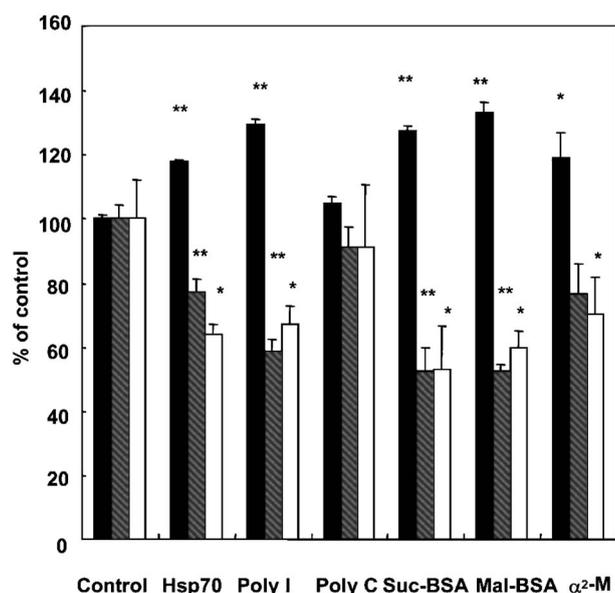


Fig. 3. Effects of Pre-administration of Various Compounds on the Plasma Clearance, Hepatic and Splenic Uptake of ^{111}In -Hsp70

Each compound (200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was injected into the tail vein of mice 10 min prior to the injection of ^{111}In -Hsp70 at a dose of 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. At 10 min after injection of ^{111}In -Hsp70, the radioactivity in plasma, liver and spleen was measured. Keys: (closed bar) plasma, (hatched bar) liver, (open bar) spleen. Results are expressed as mean \pm S.D. of three mice. Statistically significant differences were assessed using Student's *t* test compared with controls. Cited from *Pharm. Res.*, 22 (3), 419-426 (2005).

する CD91 に認識され、その多くが肝臓、特に肝細胞に取り込まれることが示唆された。

2-2. 皮下投与 抗腫瘍効果を目的としたワクチンの投与部位として皮膚や筋肉などが検討されている。一般に、筋肉や皮膚、皮下組織に投与された高分子は、投与部位に貯留され、血管やリンパ管へ吸収される。リンパ節には APC が豊富に存在し、抗原提示などの免疫応答に重要なイベントが行われる。マウスの足蹠に皮下投与後、Hsp70は投与部位から徐々に消失し、投与後 2—24 時間の時点で投与量の約 20% が肝臓に集積した。このとき、所属リンパ節へも非常に高い移行 (約 3%) が認められ、効率的な免疫応答には、本投与経路が有効である可能性が示された。

3. 熱ショックタンパク質を利用したワクチン開発

これまでに熱ショックタンパク質を利用したワクチン開発の試みが報告されている。前述の通り、熱ショックタンパク質は標的細胞である APC により効率よく認識されることから、それ自身にターゲティングのための認識素子が搭載されていることになる。したがって、熱ショックタンパク質を利用したワクチン開発においては、どのような抗原をどのような方法で熱ショックタンパク質に吸着・結合させるか、さらには細胞に取り込まれたのちの細胞内動態をいかに制御するかが問題となる。これまでに熱ショックタンパク質のペプチド結合能を利用して抗原を吸着させる試みと、抗原を共有結合した融合タンパク質を利用する試みが検討されている。融合タンパク質の場合には遺伝子として投与可能であることから、DNA ワクチンに関しても検討されている。

3-1. 熱ショックタンパク質—抗原複合・結合体による免疫誘導

熱ショックタンパク質と抗原との複合体の形成についてはいくつかの報告がある。癌組織から抽出・回収された Hsp70 には内因性ペプチドが結合しており、APC に取り込まれることでこのペプチドが腫瘍関連抗原としてクロスプレゼンテーションされる。こうした複合体を利用することで、ペプチド単独と比較して APC の免疫応答が劇的に増強されることが報告されている。¹²⁾ しかしながら、ペプチドと Hsp70 との結合親和性はペプチド配列に依存することから、¹³⁾ Hsp70 複合体としてデリバリー可能な抗原の種類は限られる。Moroi

らは、Hsp70のペプチド結合ドメインに高い結合親和性を有するペプチドをあらかじめ抗原に結合することで、複合体形成における親和性の問題を解決している。¹⁴⁾ すなわち、小胞体に存在するHsp70のホモログであるBipに対して高い親和性を示すペプチド(HWDFAWPW)をOVAのMHC class I抗原(SIINFEKL)に結合することで、抗原ペプチドとHsp70との複合体の安定化に成功している。マウスに免疫後の特異的CTL反応を指標とした検討において、Bip結合ペプチドが有用であり、これにより腫瘍の退縮や拒絶が可能であることを報告している。

熱ショックタンパク質と抗原とを直接結合した融合タンパク質の利用も検討されている。Udonoらは、熱ショックタンパク質の1つであるheat shock cognate protein 70に、OVAのMHC class I抗原を共有結合した融合タンパク質を開発し、マウスへの投与により抗原特異的なCTL誘導に成功している。¹⁵⁾

3-2. 細胞内動態制御による効果増強 通常、高分子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。Hsp70並びにその抗原結合(複合)体は、APC細胞のHspレセプターに認識されて細胞内に内在化されると考えられる。熱ショックタンパク質を利用した抗原デリバリーでは、APC内で抗原がMHC class I分子上に提示される必要があるが、一般にエンドサイトーシスを受けた高分子は、エンドソームからライソゾームへ輸送され、そこで酵素により分解される。これまでの検討において筆者らは、化学修飾によりモデル抗原OVAのAPC取り込みを増大させることでクロスプレゼンテーションが促進され、効率的な免疫応答が得られることを報告している。^{2,3)} したがって、Hsp70を抗原キャリアとする試みにおいても抗原分子の細胞内動態を制御する、すなわちエンドソームなどから細胞質へ積極的に輸送することで免疫誘導活性の増強が期待される(Fig. 1)。

高分子の細胞外から細胞質への輸送は、遺伝子導入を目的とした検討において多数報告されてきた。エンドソームでは、膜上のプロトンATPaseがベシクル内にプロトンを汲み入れることでエンドソーム内のpHを下げる。このとき、生理的pH以下でプロトン化する窒素原子を持つ化合物がエンドソーム

内に存在すると、エンドソームに入ってきたプロトンが消費され、pHの低下が抑制される。エンドソーム内へ塩化物イオンの流入を伴ってプロトンが流入することでエンドソームの浸透圧が増大し、最終的にエンドソームが崩壊し、内包物が細胞質に放出されると考えられている。この効果は「プロトンスポンジ効果」と呼ばれ、弱塩基性高分子であるポリエチレンジアミンでその効果が報告¹⁶⁾されて以来、多くの化合物が同様の効果を持つことが示され、主に遺伝子発現の増大を目的にその利用が検討されている。

筆者らは、プロトンスポンジ効果を有する化合物としてポリヒスチジン(His)を選択し、Hsp70を利用した抗原デリバリーにおける有用性について検討した。これまでのところ、Hsp70-抗原複合体にさらにHisを結合することで、抗原複合体をAPCの細胞質へ積極的にデリバリー可能であることを明らかにした。マウス皮内投与により高いCTL誘導並びに強力な抗腫瘍効果が得られ、Hsp70を利用した抗原デリバリーにおける細胞内動態の重要性が示されている。

4. 熱ショックタンパク質を利用したDNAワクチンの開発

抗原分子の遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを筋肉や皮膚に注射することで、抗原特異的な免疫誘導が得られる。この方法はDNAワクチンと総称され、体液性免疫のみならず細胞性免疫をも誘導できることから癌治療への応用が期待されている。プラスミドDNAの投与部位としては筋肉や皮膚が用いられることが多く、ほとんどの場合プラスミドDNA単独(naked DNA)が用いられる。DNAワクチンの効果は、産生される抗原の時間的、量的特性と、抗原とAPCとの相互作用頻度によって決定されると考えられることから、ワクチンを投与する部位近傍のAPC数や遺伝子発現プロファイルがDNAワクチンの効果を決定するものと考えられる。遺伝子発現の観点からは、持続的な遺伝子発現が得られる骨格筋が皮膚や脾臓等と比較して有望であるが、¹⁷⁾ APCが豊富に存在する皮膚内への投与も有効と考えられる。DNAの投与形態はほとんどの場合プラスミドDNA単独(naked DNA)であり、遺伝子発現効率を増大するためにエレクトロポレーションや超音波等が併用される。

筆者らはこれまでに、プラスミド DNA を効率よく APC にデリバリーすることを目的にカチオン性高分子であるメチル化 BSA (mBSA) との複合体を調製し、筋肉内あるいは皮内投与することでモデル抗原特異的な CTL の誘導並びに抗体産生の増大に成功した.^{18,19)} このアプローチでは、プラスミド DNA を mBSA と複合体化することで樹状細胞への遺伝子導入が増大することが可能であった (Fig. 4 (A)). その一方で、マウス筋肉内に投与したときの遺伝子発現は複合体化により大幅に減少した (Fig. 4 (B)). その理由として、筋肉や皮膚に投与した複合体が APC と遭遇する機会が非常に少なく、投与した複合体の大部分が筋肉細胞やケラチノサイトに取り込まれること、これら細胞での遺伝子発現は複合体よりも naked DNA で効率的であることが挙げられる。DNA ワクチンの利点として、し

ばしば APC に直接遺伝子導入することで、内因性抗原に対する Th1 型の免疫誘導が可能であることが挙げられるが、遺伝子導入時の DNA 動態や遺伝子発現の結果から考えると、投与したプラスミド DNA により抗原が APC 内で発現し、これが免疫誘導につながる可能性は低いことが推察される。

以上のことから、Hsp70 を利用した DNA ワクチンの試みにおいても、遺伝子発現の大部分は APC 以外の細胞で起きる可能性が高い。したがって、APC 以外の細胞で発現した Hsp70-抗原結合体を APC にデリバリーし、効率的にクロスプレゼンテーションを誘導することで Hsp70 を利用した DNA ワクチンの効果増強が期待される (Fig. 5). われわれはこうした考えの基、His-Hsp70-抗原ペプチドの融合タンパク質を発現するプラスミド DNA を構築し、マウス皮内投与後の CTL 誘導並

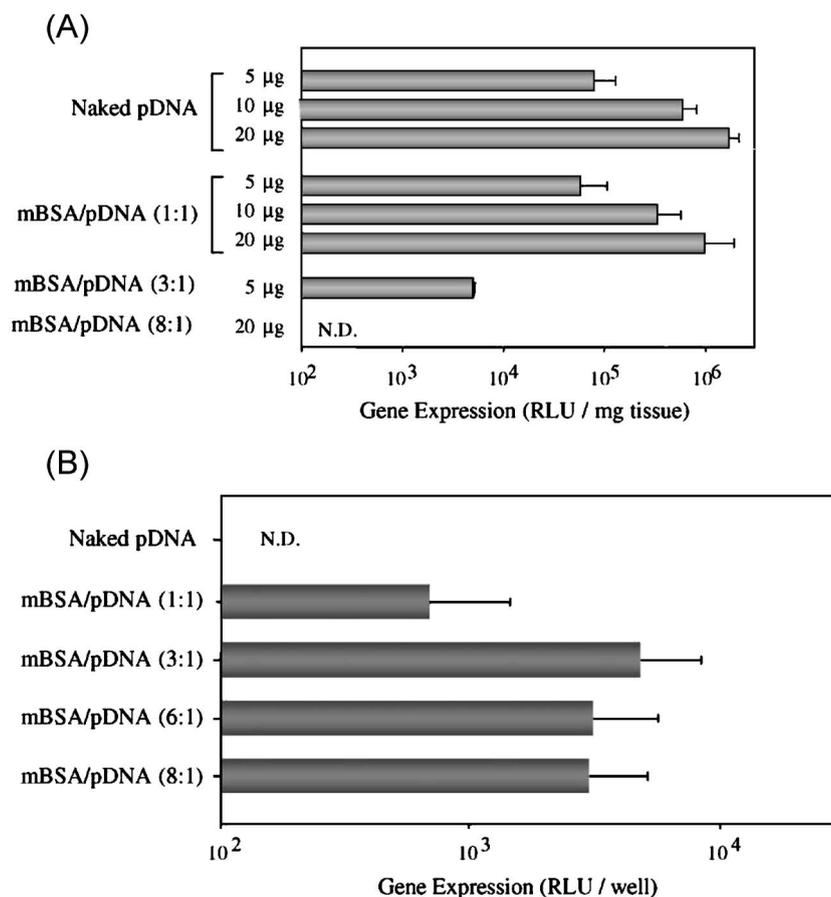


Fig. 4. Transgene Expression by Naked and Complexed Plasmid DNA in Skeletal Muscle (A) and Mouse Dendritic Cell Line, DC2.4 (B)

(A) Plasmid DNA encoding firefly luciferase was injected into the quadriceps of mice as the naked or complexed form with methylated bovine serum albumin (mBSA) at indicated doses and weight ratios. At 3 days after injection, the luciferase activity was measured. (B) Naked or complexed plasmid DNA was added to DC2.4, and the luciferase activity in the cells was measured 18 h after transfection. Results are expressed as mean \pm S.D. of three mice or three determinations. Cited from *Int. J. Pharmaceut.*, 293 (1-2), 291-301 (2005).

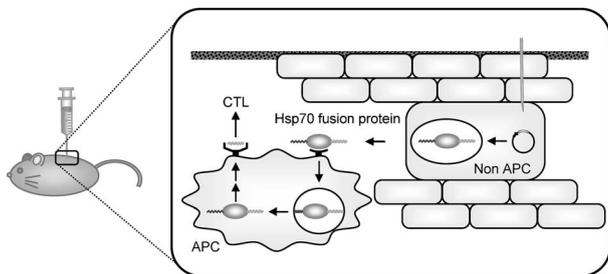


Fig. 5. Gene Delivery of Hsp70-antigen Conjugates

Because of the few numbers of APCs in the tissues for administration of DNA vaccines, it is important to deliver Hsp70-antigen conjugates expressed in non-APCs to the cytoplasm of APCs.

びに抗腫瘍効果について検討を行っている。融合タンパク質を用いた検討から有効であった His 融合 Hsp70 を抗原キャリアとして利用し、さらに遺伝子発現細胞から融合タンパク質を分泌させるために分泌シグナルを組み込むことで、発現タンパク質の細胞外への分泌、並びにマウス投与後の抗腫瘍効果をj確認している。

5. おわりに

本稿では、熱ショックタンパク質 Hsp70 を利用した抗原デリバリーシステムに関する最近の報告を紹介した。熱ショックタンパク質は生体由来物質であり、標的細胞の APC に認識されること、さらにはこの細胞を活性化することから、抗腫瘍免疫を目的とした抗原デリバリーシステムとして非常に有望である。様々な利用方法が考えられ、既に患者本人の腫瘍組織から抽出した熱ショックタンパク質-ペプチド複合体をワクチンとして投与する試みなどが検討されている。²⁰⁾ 今後、体内・細胞内動態のより厳密な制御により、APC へのデリバリーや細胞内での抗原プロセッシング過程の効率化を実現することで、効果的な抗腫瘍免疫を誘導可能な抗原デリバリーシステムが開発されるものと期待する。

REFERENCES

- 1) Yamasaki Y., Sumimoto K., Nishikawa M., Yamashita F., Yamaoka K., Hashida M., Takakura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 467-477 (2002).
- 2) Shakushiro K., Yamasaki Y., Nishikawa M., Takakura Y., *Immunology*, **112**, 211-218 (2004).
- 3) Ikenaga T., Yamasaki Y., Shakushiro K.,

- Nishikawa M., Takakura Y., *Vaccine*, **22**, 2609-2616 (2004).
- 4) Hartl F. U., *Nature*, **381**, 571-579 (1996).
- 5) Zhu X., Zhao X., Burkholder W. F., Gragerov A., Ogata C. M., Gottesman M. E., Hendrickson W. A., *Science*, **272**, 1606-1614 (1996).
- 6) Binder R. J., Han D. K., Srivastava P. K., *Nat. Immunol.*, **1**, 151-155 (2000).
- 7) Delneste Y., Magistrelli G., Gauchat J., Haeuw J., Aubry J., Nakamura K., Kawakami-Honda N., Goetsch L., Sawamura T., Bonnefoy J., Jeannin P., *Immunity*, **17**, 353-362 (2002).
- 8) Srivastava P., *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 395-425 (2002).
- 9) Takemoto S., Nishikawa M., Takakura Y., *Pharm. Res.*, **22**, 419-426 (2005).
- 10) Delneste Y., Magistrelli G., Gauchat J., Haeuw J., Aubry J., Nakamura K., Kawakami-Honda N., Goetsch L., Sawamura T., Bonnefoy J., Jeannin P., *Immunity*, **17**, 353-362 (2002).
- 11) Herz J., Strickland D. K., *J. Clin. Invest.*, **108**, 779-784 (2001).
- 12) Javid B., MacAry P. A., Oehlmann W., Singh M., Lehner P. J., *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 622-625 (2004).
- 13) Flynn G. C., Pohl J., Flocco M. T., Rothman J. E., *Nature*, **353**, 726-730 (1991).
- 14) Moroi Y., Mayhew M., Trcka J., Hoe M. H., Takechi Y., Hartl F. U., Rothman J. E., Houghton A. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 3485-3490 (2000).
- 15) Udono H., Yamano T., Kawabata Y., Ueda M., Yui K., *Int. Immunol.*, **13**, 1233-1242 (2001).
- 16) Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7297-7301 (1995).
- 17) Thanaketspaisarn O., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **22**, 883-891 (2005).
- 18) Kawase A., Kobayashi N., Isaji K., Nishikawa M., Takakura Y., *Int. J. Pharm.*, **293**, 291-301 (2005).
- 19) Kawase A., Isaji K., Yamaoka A., Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y., *Vaccine*, **24**,

- 5535–5545 (2006).
- 20) Belli F., Testori A., Rivoltini L., Maio M., Andreola G., Sertoli M. R., Gallino G., Piris A., Cattelan A., Lazzari I., Carrabba M., Scita G., Santantonio C., Pilla L., Tragni G., Lombardo C., Arienti F., Marchiano A., Queirolo P., Bertolini F., Cova A., Lamaj E., Ascani L., Camerini R., Corsi M., Cascinelli N., Lewis J. J., Srivastava P., Parmiani G., *J. Clin. Oncol.*, **20**, 4169–4180 (2002).