

ワクチンキャリアーとしてのポリ  $\gamma$ -グルタミン酸ナノ粒子の有効性と安全性

中川 晋作

**Efficacy and Safety of Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) Based Nanoparticles ( $\gamma$ -PGA NPs) as Vaccine Carrier**

Shinsaku NAKAGAWA

*Department of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan*

(Received July 22, 2008)

Recently, nanoscopic systems that incorporate therapeutic agents, and molecular targeting and diagnostic imaging capabilities are emerging as the next generation of functional nanomedicines to improve the outcome of drug therapeutics. Among the many nanoparticulate systems, micelle-like aggregates or nanoparticles formed with amphiphilic block- or graft- copolymers are currently being studied for possible application as protein carriers. We recently developed a technique to prepare uniform nanoparticles ( $\gamma$ -PGA NPs) using amphiphilic  $\gamma$ -PGA ( $\gamma$ -PGA-L-PAE), in which L-phenylalanine ethyl ester (L-PAE) is introduced as a hydrophobic residue into the  $\alpha$ -position group carboxyl of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) ( $\gamma$ -PGA) which is a biodegradable polymer derived from a natto mucilage.  $\gamma$ -PGA NPs are excellent vaccine carriers capable of delivering antigenic proteins to antigen-presenting cells (APCs) and eliciting potent immune responses based on antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. In mice, subcutaneous immunization with  $\gamma$ -PGA NPs entrapping ovalbumin (OVA) more effectively inhibited the growth of OVA-transfected tumors than immunization with OVA emulsified using Freund's complete adjuvant. In addition,  $\gamma$ -PGA NPs did not induce histopathologic changes after subcutaneous injection or acute toxicity through intravenous injection. Importantly,  $\gamma$ -PGA NPs efficiently delivered entrapped antigenic proteins into APCs through cytosolic translocation from the endosomes, which is a key process of  $\gamma$ -PGA NP-mediated anti-tumor immune responses. These antigen-capturing APCs migrated to regional lymph nodes. Our results demonstrate that a  $\gamma$ -PGA NP system for antigen delivery will advance the clinical utility of vaccines against cancer.

**Key words**—drug delivery system;  $\gamma$ -glutamic acid (poly); nanoparticle; vaccine carrier

**1. はじめに**

近年のライフサイエンス研究の目覚ましい進展は、「薬」そのものの概念を大きく変革し、現代医療体系では従来の低分子有機化合物のみならず生命体の機能発揮・恒常性維持を担う核酸やタンパク質をも薬物として捉えることが可能となった。しかし、これら生体高分子は体内安定性に乏しく、多彩な生理活性を示すことによる副作用発現が問題となり、医薬品化されているものはごく少数に限られている。さらに、多くの生体高分子は組織内の特定の細胞あるいは細胞内の特定のオルガネラへ送達されてはじ

めて有効性を発揮する。したがって、生体高分子を有効な医薬品として開発するに当たっては、体内安定性を確保するとともに体内動態を緻密に制御し得る新たな DDS 基盤技術の確立が不可欠である。

一方、米国ではナノテクノロジーに立脚した National cancer institute 主導の研究プログラム (Cancer Nanotechnology Plan) が基幹プロジェクトとして採択され、また本邦においても医学・工学・薬学など多分野にまたがる府省連携プロジェクトとして「ナノ DDS」をテーマにしたプロジェクトが開発されている。これら国家プロジェクトの研究成果によって、原子操作や高分子物質の自己組織化などを利用して、従来では全く想像できなかった新しい物性・特性を持ったナノ構造体の創製が可能になってきており、ナノテクノロジーは生体高分子の DDS キャリアー開発における革新的技術として大

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム GS3 で発表したものを中心に記述したものである。

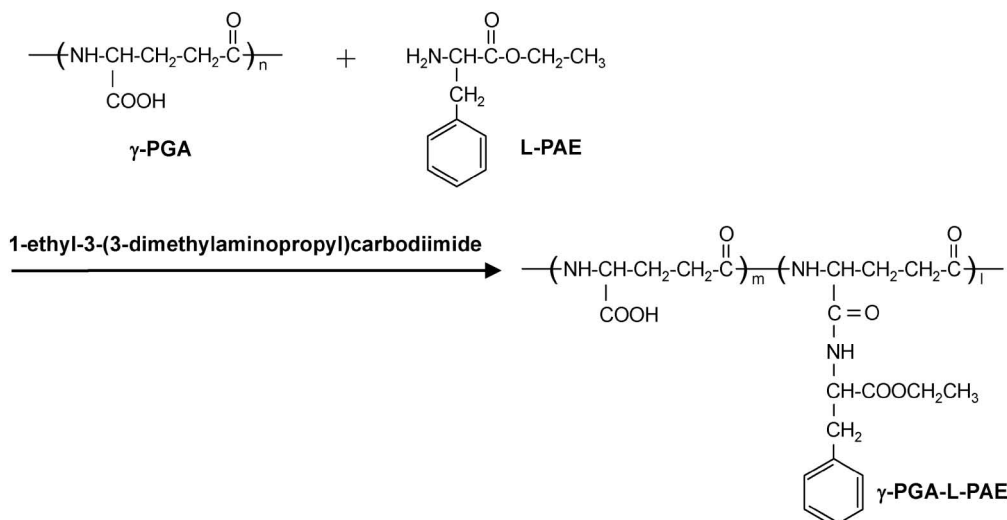


Fig. 1. Chemical Structure of  $\gamma$ -PGA and Synthesis of  $\gamma$ -PGA-L-PAE

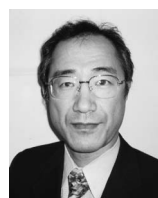
いに期待されている。<sup>1-3)</sup>しかし、実際に原子・分子の配列を制御することによって得られたナノ構造体の DDS キャリアーとしての特性及び発展性に関する情報はほとんどないのが現状であり、ナノ構造体の具体的な DDS 用途を提案するとともに、ナノテクノロジーの医薬品開発における有用性を作用機序と治療効果との関連評価から実証し、それらの基礎的知見をより理論的な DDS キャリアーの設計へとフィードバックしていく必要がある。

これまでにわれわれは、大阪大学大学院工学研究科、明石 満教授らとの共同で、ポリ  $\gamma$  グルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) を素材とした自己組織化ナノデバイスの開発とワクチン用 DDS キャリアーとしての応用研究を推進してきた。 $\gamma$ -PGA は、納豆粘質物由来の天然高分子であり、その  $\alpha$  位カルボキシル基に疎水基としてフェニルアラニンエチルエステルを導入した両親媒化  $\gamma$ -PGA-L-PAE (Fig. 1) は、タンパク質水溶液に分散させるだけで疎水性相互作用を介した自己組織化による均一なタンパク質内包ナノ粒子を形成する。<sup>4,5)</sup> この両親媒化高分子の自己組織化を利用した微粒子 ( $\gamma$ -PGA NP) が、タンパク質キャリアーとして非常に優れた特性を有しており、本稿ではその応用例として腫瘍ワクチンキャリアーとしての有効性と安全性について紹介する。

## 2. $\gamma$ -PGA NP の腫瘍ワクチンキャリアーとしての有用性評価<sup>6,7)</sup>

生体内には、がん細胞を正常細胞と見分けて排除する腫瘍免疫機構が備わっており、この腫瘍免疫を

増幅・活性化することによってがんを抑圧しようとするがん免疫療法が、従来の外科療法、化学療法、放射線療法を補完する第 4 のがん治療戦略として注目されている。<sup>8,9)</sup> がん免疫療法においては、腫瘍関連抗原 (TAA) となるタンパク質やペプチドを抗原提示細胞 (APC) に効率よく送達し、がん細胞排除の実質的な担い手である細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を TAA 特異的に活性化する必要がある。<sup>10)</sup> しかしながら、TAA タンパク質やペプチドをそのまま生体に投与しても速やかに分解されてしまうため、APC による十分な抗原認識とその後の腫瘍免疫応答の誘導を期待することはできない。現在、臨床試験が進められているがん免疫療法プロトコールにおいては、フロイント不完全アジュバント (IFA) を用いて TAA 分子をエマルジョン化し、TAA 分子の生体内安定化と徐放化を達成するアプローチが広く用いられているが、<sup>11)</sup> 本手法は抗原特異的な CTL の誘導効果に乏しく、また投与局所に硬結や紅斑などの副作用を招くという問題点を抱えている。<sup>12)</sup> 一方、APC は直径 50 nm–3  $\mu$ m の粒子状物質



中川晋作

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授。1959 年生まれ。1984 年、神戸学院大学大学院薬学研究科修士課程修了、参天製薬(株)中央研究所勤務、神戸学院大学薬学部実験助手、大阪大学薬学部助手、講師、助教授などを経て 2005 年から現職。受賞：1994 年 Zoological Science Award (日本動物学会)、2004 年第 4 回日本 DDS 学会永井賞 (日本 DDS 学会)。

を効率よく取り込む性質を有していることが知られており、<sup>13,14</sup> APC への抗原送達効率の促進という観点からは TAA を微粒子キャリアーに内包して投与する DDS 戦略が有望である。<sup>15,16</sup> そこでわれわれは、タンパク質用 DDS キャリアーとして優れた特性を保持している  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 ( $\gamma$ -PGA NP) をがん免疫療法における抗原タンパク質送達キャリアーとして応用し、マウス腫瘍モデルにおける有効性並びに安全性を評価した。

まず、 $\gamma$ -PGA NP の抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての有効性をモデル抗原として OVA を用いて評価した。その結果、E.G7-OVA 細胞に対する抗腫瘍予防ワクチンの検討において、OVA 封入  $\gamma$ -PGA NP 免疫群は、現存する最強の CTL 誘導アジュバントであるフロイント完全アジュバント (CFA) を適用した群をはるかに上回る腫瘍生着抑制効果並びに延命効果を認めた (Fig. 2)。さらに、CFA を適用して 100  $\mu$ g を免疫した群と比較して 10  $\mu$ g の OVA を  $\gamma$ -PGA NP にて免疫した群において優れた有効性が認められたことから、 $\gamma$ -PGA NP はがん免疫療法における投与抗原量を劇的に低減できる優れたワクチンキャリアーになり得る可能性が示唆された。続いて、高い肺転移能を有する B16-OVA 細胞を用いて、治療的投与プロトコールによる  $\gamma$ -PGA NP の有効性を評価したところ、CFA 適応群よりも強力な肺転移抑制効果が確認された

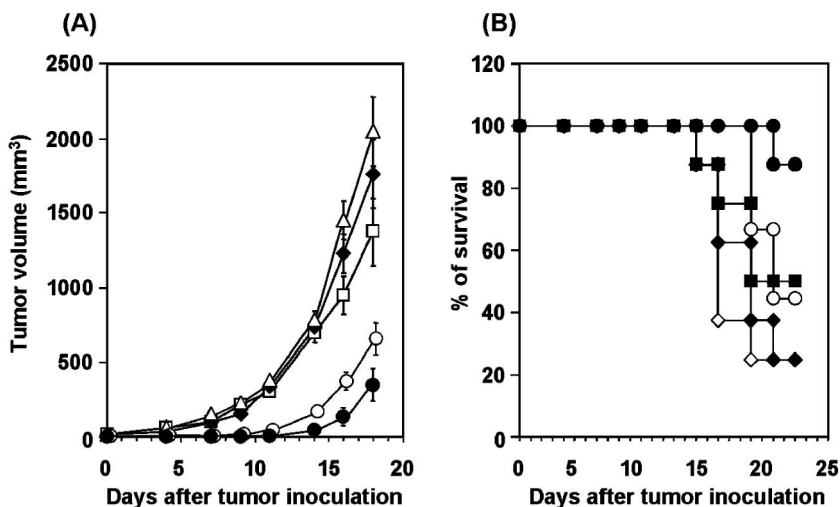


Fig. 2. Prophylactic Effect against E.G7-OVA Tumor Growth by Vaccination of  $\gamma$ -PGA NP/OVA  
 C57BL/6 mice were subcutaneously immunized with  $\gamma$ -PGA NP/OVA (●: 100 mg OVA, ○: 10 mg OVA), CFA/OVA (□: 100 mg OVA), OVA solution (◆: 100 mg OVA), or PBS (△). Ten days later, 10<sup>6</sup> E.G7-OVA cells were intradermally inoculated into the flank of these mice, and tumor volume (A) and survival rate (B) were monitored. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. from 5–9 mice.

(Fig. 3). 以上の結果から、 $\gamma$ -PGA NP は予防、治療、両プロトコールにおいて有効性を発揮する優れたワクチンキャリアーであることが明らかとなった。

### 3. 抗原タンパク質内包 $\gamma$ -PGA NP の抗原特異的免疫誘導機序の解明<sup>6,7)</sup>

$\gamma$ -PGA NP の抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての有効性をメカニズムベースで解析することは、ナノテクノロジーのがん免疫療法への応用に理論的根

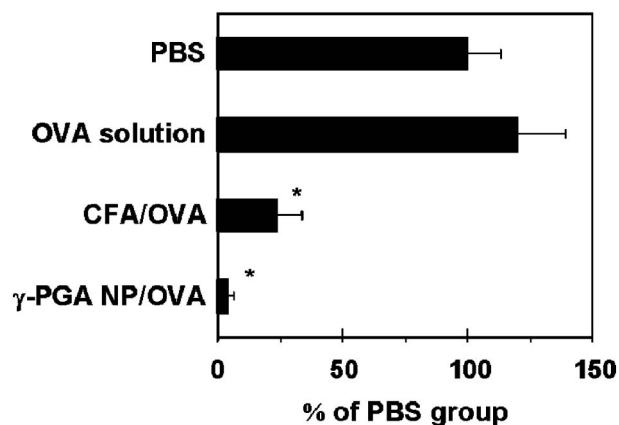


Fig. 3. Therapeutic Effect against B16-OVA Lung Metastasis by Three Times Immunization of  $\gamma$ -PGA NP/OVA  
 C57BL/6 mice were intravenously injected with 5  $\times$  10<sup>4</sup> B16-OVA cells. These mice were immunized with  $\gamma$ -PGA NP/OVA, CFA/OVA, or OVA solution on day 0, 3, and 7 at 100 mg OVA/mouse. Likewise, PBS was injected three times as control. Eighteen days after the last immunization, the lungs were harvested from these mice, and the number of metastatic nodules was counted. The data are expressed as % of PBS group (control), and represent the mean  $\pm$  S.E. from 9 mice. Statistical analysis was carried out using Mann-Whitney U-test: \*  $p$  < 0.01 vs PBS group.

抛を与えるのみならず、作用機序に基づいたより高度な機能性微粒子キャリアーの設計・創製を可能とする。TAA タンパク質をコンポーネントワクチンとして投与するがん免疫療法においては、APC が、①投与部位において TAA タンパク質を捕食し、②その TAA タンパク質からプロセッシングしたエピトープペプチドを主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子を介して細胞表面に提示し、③近傍の所属リンパ組織へと移行して T 細胞を TAA 特異的に感作・活性化する<sup>17,18)</sup> ことによって腫瘍免疫の誘導・増強が達成される。そこでこれら①-③の免疫イベントに対する  $\gamma$ -PGA NP の効果を解析することによって、抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての  $\gamma$ -PGA NP の作用機序の解明を試みた。

まず、FITC 標識 OVA を内包した  $\gamma$ -PGA NP ( $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA) を調製し、生体内で最も強力な APC である樹状細胞 (DC) による捕捉性を検討したところ、FITC 標識 OVA 溶液の適用では細胞内への取り込みが認められない低用量の条件においてさえ、 $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA をパルスした DC の細胞内にはスポット状に多数の蛍光が観察された (Fig. 4)。また、 $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA の DC による捕食は低温条件下において阻害されたことから、エンドサイトーシス経路を介した取り込み機構であることが示唆された。次に、 $\gamma$ -PGA NP により OVA を取り込ませた DC において、OVA のエピトープペプチドへのプロセッシング並びに

MHC 分子を介した T 細胞への抗原提示の効率を評価した。OVA 溶液をパルスした DC では、ほとんど抗原提示が認められなかったのに対して、 $\gamma$ -PGA NP 適用 DC では上述の顕著な抗原取り込みを反映して、OVA 用量依存的に MHC class I 及び class II 分子を介した OVA ペプチド提示レベルの増大が観察された (Fig. 5)。腫瘍免疫で中心的なエフェクター細胞として機能する CD8 陽性 CTL を活性化するためには、APC による MHC class I 分子を介した抗原提示が必須であり、一般的に MHC class I 経路に送達される抗原は細胞質内で発現する内在性タンパク質とされている。一方、エンドサイトーシスによって取り込まれた外来性抗原は、主に MHC class II 分子を介して細胞表面に提示され、CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) の活性化を誘導する。そこで、 $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA をパルスした DC のエンドソームを蛍光免疫染色し、 $\gamma$ -PGA NP の細胞内動態を経時的に観察した。DC に取り込まれた  $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA は、パルス 25 分後では初期エンドソーム内に局在していたが、120 分後には大部分が初期エンドソーム及び後期エンドソームとは異なる部位に存在していた (Fig. 6)。したがって、詳細な機構は不明であるが、エンドサイトーシスで取り込まれた  $\gamma$ -PGA NP は、初期エンドソームから後期エンドソームへと移行する過程で細胞質内に脱出し、内包している抗原タンパク質の一部をあたかも内在性抗原として DC に認識

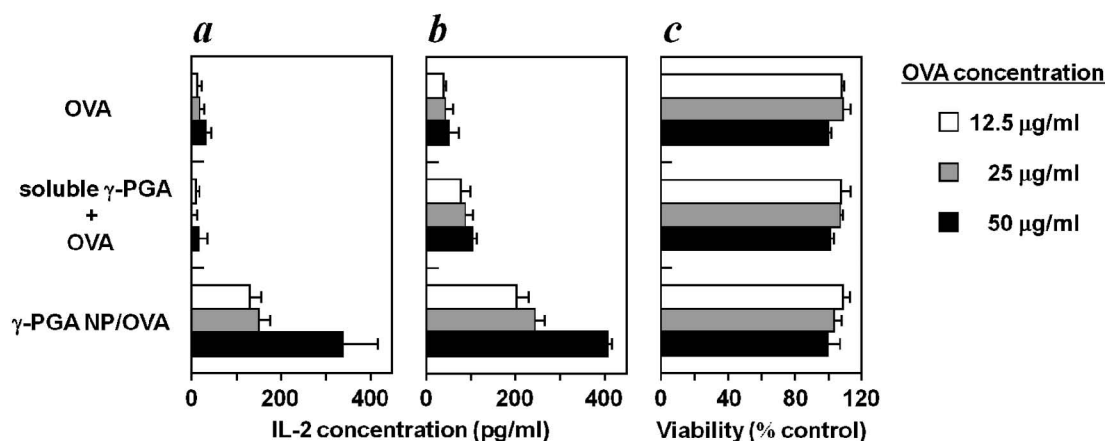


Fig. 5. Efficient Presentation of OVA Delivered by  $\gamma$ -PGA NP on MHC Molecules

DCs were incubated with  $\gamma$ -PGA NP/OVA, the mixture of soluble  $\gamma$ -PGA and OVA, or OVA solution for 3 h at the indicated OVA concentration. The presentation of OVA-derived epitope peptides *via* MHC molecules on these DCs was determined by IL-2 levels released from CD8-OVA1.3 (specific for OVA<sub>257-264</sub>/H-2K<sup>b</sup> complex; a) and OT4H.1D5 (specific for OVA<sub>265-277</sub>/I-A<sup>b</sup> complex; b) cells during additional 24 h-co-culture. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. from three independent cultures.

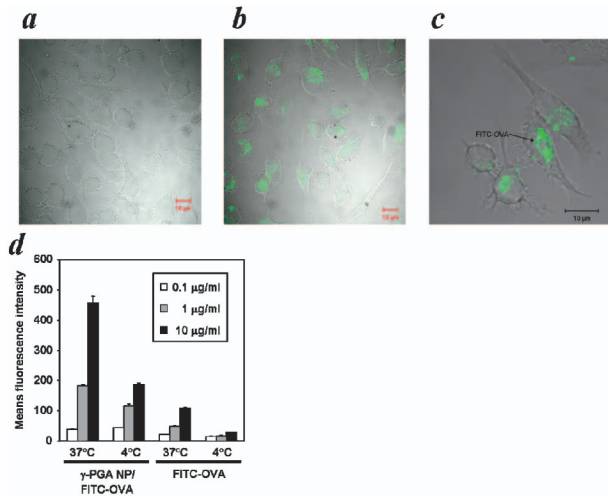


Fig. 4. Endocytotic Uptake of  $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA by DCs

a–c, DCs were pulsed with FITC-OVA solution (a) or  $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA (b and c) at 1 mg FITC-OVA/ml for 5 h at 37°C, and then FITC-OVA uptake was observed under CLSM. Original magnification is  $\times 60$  (a and b) and  $\times 100$  (c). d, DCs were pulsed with FITC-OVA solution or  $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA at various concentration of FITC-OVA for 5 h at 4 or 37°C, and then were analyzed for the FITC-OVA uptake levels by flow cytometry. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of mean fluorescence intensity from three independent cultures.

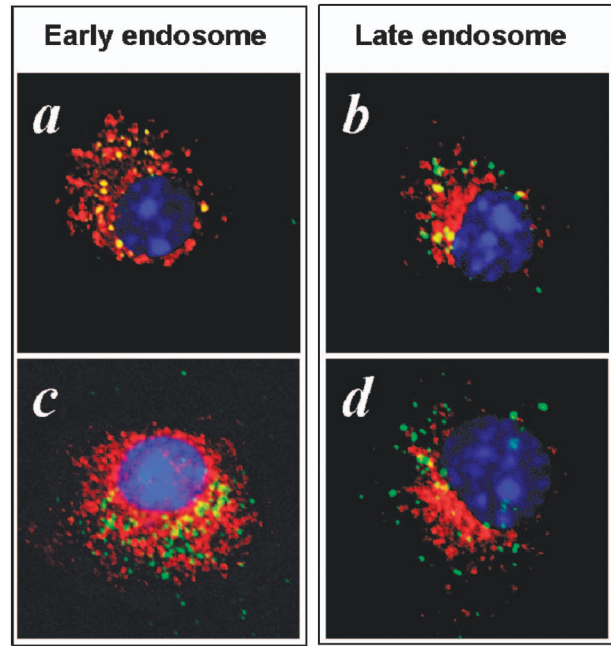


Fig. 6. Endosomal Escape of FITC Labeled Antigens Entrapped in  $\gamma$ -PGA NP

DCs were pulsed with  $\gamma$ -PGA NP/FITC-OVA at the concentration of 1  $\mu$ g FITC-OVA/ml for 10 min at 37°C. After washing, the cells were incubated in culture medium for additional 25 (a and b) or 120 (c and d) min at 37°C. Then, the cells were fixed and stained for SNX-1 (a and c, specific for early endosome) or STX-7 (b and d, specific for late endosome). The nucleus was counter stained with DAPI (blue). The signals were electronically merged, and co-localized regions of FITC-OVA (green) and early or late endosome (red) appear yellow. Original magnification of photographs is  $\times 400$ .

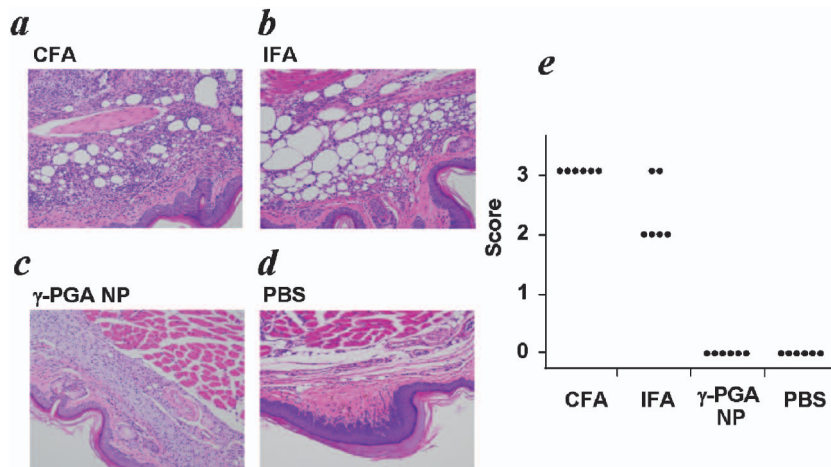


Fig. 7. Inflammatory Response against  $\gamma$ -PGA NP at the Injection Site

CFA emulsified with equal volume of PBS (a), IFA emulsified with equal volume of PBS (b), empty  $\gamma$ -PGA NP (10 mg  $\gamma$ -PGA-L-PAE/ml; (c), or PBS (d) was subcutaneously injected into the footpad of C57BL/6 mice at 20 ml/mouse. One week later, histopathological changes for the injection site were examined using hematoxylin and eosin-stained specimens. Original magnification of photographs is  $\times 150$ . (e); Histological score of each specimen was assigned to one of four groups according to severity of the inflammatory cell infiltration: 0, no; 1, weak; 2, moderate; 3, severe.

させることによって、MHC class II 提示経路のみならず MHC class I 提示経路へも抗原送達したものと考えられた。

続いて、*in vivo* に投与された  $\gamma$ -PGA NP の APC による取り込みと、その後の所属リンパ組織への遊走について検討した。 $\gamma$ -PGA NP/FITC-

OVA を皮下投与したマウスの所属リンパ節には、数日間に渡って多数の蛍光スポットが観察され、それらの分布は MHC class II 陽性 APC のリンパ節内局在と一致した。したがって、抗原タンパク質を内包した  $\gamma$ -PGA NP は、*in vivo* においても投与局所の APC に効率よく貪食され、その抗原捕食 APC が所属リンパ節へと移行することによって、T 細胞を抗原特異的に感作・活性化したことが強く示唆された。

以上の結果をまとめると、 $\gamma$ -PGA NP は、内包抗原タンパク質を免疫系の司令塔である APC の MHC class I 及び class II 提示経路へ極めて効率よく送達できる DDS キャリアーであり、その効果を反映して免疫誘導の場であるリンパ組織へ移行する抗原提示 APC 数が増大することによって、T 細胞依存性の強力な抗原特異的免疫応答を誘導することが明らかとなった。

#### 4. $\gamma$ -PGA NP の安全性評価<sup>7)</sup>

納豆粘質物由来の天然高分子である  $\gamma$ -PGA は、既に食品添加物や保湿化粧品として実用化されている生体適合性に優れた素材であり、経口あるいは経皮的に生体適用した場合の安全性は実証されている。しかしながらこの  $\gamma$ -PGA を素材として粒子化した場合、またそれを注射により生体に投与する場合は、新たに安全性を評価しなければならない。われわれは、 $\gamma$ -PGA NP の起炎性並びに組織傷害性を評価するために、投与部位を病理組織学的に観察した。その結果、CFA や IFA を投与したマウスの皮下組織では激しい炎症反応が誘導されていたのに対して、 $\gamma$ -PGA NP は投与局所にほとんど傷害を与えることなく、炎症性細胞の浸潤もほとんど認められなかった (Fig. 7)。

次に、 $\gamma$ -PGA NP を静脈内投与し、その急性毒性を肝臓や腎臓の組織傷害マーカーである GOT, GPT, 並びにクレアチニン値を指標に評価した。PBS 投与群と比較すると、 $\gamma$ -PGA NP を 1 mg 及び 10 mg/mouse で投与した群では、投与 24 時間において GOT, GPT やクレアチニン値の上昇はほとんど認められなかった (Table 1)。さらにこれらマウスの肝臓、腎臓、脾臓、及び肺を病理組織学的に観察したところ、 $\gamma$ -PGA NP 投与群では、Kupffer 細胞、MPS (Macrophage Phagocytic System) 細胞、及びマクロファージなどの貪食系細胞の腫脹が認め

Table 1. *In vivo* Acute-toxicity Assay through Intravenous Injection of  $\gamma$ -PGA NP

Group	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	GRE (mg/ml)
$\gamma$ -PGA NP (1 mg/mouse)	51±8.2	10±2.8	0.34±0.028
$\gamma$ -PGA NP (10 mg/mouse)	61±11	11±1.2	0.30±0.014
PBS	51±16	8±1.8	0.26±0.019

Table 2. Histopathological Findings against Intravenous Injection with  $\gamma$ -PGA NP

Organ	Histopathological findings $\gamma$ -PGA NP	Score <sup>b)</sup>		
		0 mg	1 mg	10 mg
Liver	Swelling of the kupffer cells	—	+	++
	Small mass of mononuclear	—	—	—
	Atrophy of hepatic cells	—	—	—
Spleen	Swelling MPS <sup>a)</sup> cells	—	+	++
	Atrophy of lymphoid follicle	—	—	+
Lung	Increase of macrophage	—	+	++
	Infiltration of mononuclear	—	+	++
	Emphysema pulmonum	—	—	±

a) Macrophage Phagocytic System, b) Score : —, no : ±, weak : +, moderate : ++, severe.

られたのみであり、これ以外の重篤な傷害は全く観察されなかった (Table 2)。

$\gamma$ -PGA NP は、1 mg 当たり 100  $\mu$ g の抗原タンパク質を内包することができる。通常、臨床試験における抗原タンパク質の投与量が数百  $\mu$ g 程度であるという事例<sup>19,20)</sup>と、今回の急性毒性試験の結果を考え合わせると、少なくとも抗原量として数百  $\mu$ g を適用する場合において、 $\gamma$ -PGA NP は極めて安全性の高い抗原送達キャリアーであることが示唆された。将来的には、粒子を構成する素材の分子量や親水・疎水バランスを最適化することによって、単位粒子当たりのタンパク質内包量を向上させることができ、キャリアーの投与量を削減でき、さらに安全性の高い抗原送達システムを構築可能であると考えている。

#### 5. 終わりに

DDS 研究は、バイオテクノロジーや材料工学などの研究成果を医薬品創製に合致する基盤技術へと展開させることによって、より効果的で安全な薬物療法の実現を目指す学問として進化し続けてきた。

現代ではゲノム、プロテオーム解析などのライフサイエンス研究の進展によって低分子有機化合物のみならず核酸やタンパク質など生体高分子の医薬品化が注目されており、これまで以上に高度な DDS 技術の開発が要求されている。この点を踏まえると様々な技術的進歩を取り入れることによって発展してきた DDS 研究に、ナノテクノロジーという超微小加工技術を導入することは必然的な流れであると考えられる。このような流れに呼応するかのように、DDS は既に医・薬・工学分野が連携して推進するナノテクノロジーの共通目標として、近年では世界的に注目されており、DDS 分野におけるナノテクノロジーの用途探索と産業化を目指した研究が盛んに行われている。

本稿では、医薬品としての応用が期待されているが、多様な生理活性や体内安定性の乏しさが原因で医薬品化が困難な生体高分子の DDS 製剤化をモデルケースとして捉え、DDS キャリアーの開発におけるナノテクノロジーの有用性について概説した。近年の分子生物学やバイオテクノロジーの進歩は目覚しく、生体高分子を有効な医薬品として応用しようとする試みは重要性を増していくことが予想される。本研究で示した知見を含め、今後より多くの情報を集積することで、ナノテクノロジーを用いた革新的な DDS 製剤が考案され、さらには実用化へとつながることを期待する。

**謝辞** 本稿における筆者らの研究は、科学技術振興事業団 (JST) 戦略的基礎研究推進事業 (CREST)、「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」領域の支援の下に推進されたものであり、研究にご協力頂いた関係者の皆様に深く感謝いたします。また、薬学会シンポジウムに参加する機会を与えて頂きました薬学会関係者の皆様方に改めて感謝の意を表します。

## REFERENCES

- Zhang S., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1171–1178 (2003).
- Hilt J. Z., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1533–1536 (2004).
- Rosler A., Vandermeulen G. W., Klok H. A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 95–108 (2001).
- Akagi T., Higashi M., Kaneko T., Kida T., Akashi M., *Macromol. Biosci.*, **5**, 598–602 (2005).
- Akagi T., Kaneko T., Kida T., Akashi M., *J. Control. Release.*, **108**, 226–236 (2005).
- Yoshikawa T., Okada N., Oda A., Matsuo K., Matsuo K., Mukai Y., Yoshioka Y., Akagi T., Akashi M., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 408–413 (2008).
- Yoshikawa T., Okada N., Oda A., Matsuo K., Matsuo K., Kayamuro H., Ishii Y., Yoshinaga T., Akagi T., Akashi M., Nakagawa S., *Vaccine*, **26**, 1303–1313 (2008).
- Urban J. L., Schreiber H., *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 617–644 (1992).
- Smyth M. J., Godfrey D. I., Trapani J. A., *Nat. Immunol.*, **2**, 293–299 (2001).
- Huang, A. Y., Golumbek P., Ahmadzadeh M., Jaffee E., Pardoll D., Levitsky H. R., *Science*, **264**, 961–965 (1994).
- Wang F., Bade E., Kuniyoshi C., Spears L., Jeffery G., Marty V., Groshen S., Weber J., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2756–2765 (1999).
- Toes R. E., Blom R. J., Offringa R., Kast W. M., Melief C. J., *J. Immunol.*, **156**, 3911–3918 (1996).
- Singh M., O'Hagan, D. T., *Int. J. Parasitol.*, **33**, 469–478 (2003).
- Singh M., O'Hagan D. T., *Pharm Res.*, **19**, 715–728 (2002).
- Falo Jr. L. D., Kovacsovics-Bankowski M., Thompson K., Rock K. L., *Nat. Med.*, **1**, 649–653 (1995).
- Storni T., Kundig T. M., Senti G., Johansen P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 333–355 (2005).
- Steinman R. M., Inaba K., Turley S., Pierre P., Mellman I., *Hum. Immunol.*, **60**, 562–567 (1999).
- Mellman I., Steinman R. M., *Cell*, **106**, 255–258 (2001).
- Sue D. X., Anja S., Gabriela M., Cassandra D., Vasso A., Patricia L. M., Magdalena P., *Methods*, **40**, 1–9 (2006).
- Ian D. D., Weisan C., Heather J., Phillip P., Eric W. H., Lloyd J. O., Jonathan S. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 10697–10702 (2004).