ナノ粒子に対する補体活性化の功罪

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野*

清水太郎*・異島 優*・石田竜弘*

Merit and demerit of complement activation by nanoparticles

Complement system is one of the central part of innate immunity partly responsible for recognition and removal of foreign materials, not only pathogens but also artificial nanoparticles. Complement system composed of more than 30 proteins causes cascade enzymatic activation, produces various bioactive substances, and finally induces inflammation and phagocytosis of foreign materials. It is well known that artificial nanoparticles activate complement system and physicochemical properties of nanoparticles affect level of complement activation, resulting in unexpected pharmacokinetics change of nanoparticles and toxicity. Hence, it is important to understand the mechanism behind complement activation by nanoparticles. In addition, intrinsic role of complement system in immune response is useful for development of vaccine. In this review, we introduce the negative and positive aspect of complement activation against nanoparticles.

補体系は、自然免疫系の1つであり、初期の異物認識機構で中心的な役割を果たしており、病原体だけでなく、人工のナノ粒子の排除にも深く関わっている。補体系の活性化(カスケード反応)に伴い、生物学的活性をもつさまざまな分子が生成され、異物の貪食や炎症反応を誘導している。ナノ粒子の物性に応じて補体の活性化の程度はさまざまに変化するため、ナノ粒子の予期せぬ体内動態変化や毒性発現が想定されている。このような現象はナノ粒子による薬物送達効率を低下させるため、ナノ粒子に対する補体活性化機構を理解することは、非常に重要である。一方で、補体活性化に伴う免疫活性化は、ナノ粒子を用いたワクチンへ応用することが可能であると考えられる。本稿では、ナノ粒子に対する補体活性化の負と正の両側面について紹介する。

Taro Shimizu*, Yu Ishima*, Tatsuhiro Ishida*

Keywords: nanoparticle, complement activation, toxicity, vaccine

1. はじめに

補体系は30種類以上のタンパク質から構成されており、酵素反応カスケードを介して炎症性ペプチドの放出、異物のオプソニン化、細菌表面でのMAC(membrane attack complex)の形成とこれに伴う溶菌作用などを引き起こし、自然免疫応答において重要な役割を果たすことが知られている¹⁾。これに対して、補体系の獲得免疫への寄与についても徐々に明らかとなってきた²⁾。補体系タンパク質の主な産生源は肝臓であるが、免疫系の細胞も補

体系タンパク質を局所的に産生する³⁾。補体系タンパク質は血中に豊富に存在するが、相対的に分子量が大きいため、組織中への拡散性は乏しい。したがって、血流が乏しい領域では、各免疫細胞による局所的な補体の産生が重要となる。補体系タンパク質の中でもC3(complement component 3)は、このカスケード反応の中で最も重要なタンパク質であり、その欠損は病原体による重篤な感染症を引き起こすことが知られている⁴⁾。C3は活性化に伴い、C3b、iC3b、C3dへと酵素的に変換されていき、それぞれが異なる生理活性を示す。これらのC3分解産物はC3受容体(CR: complement receptor)によって認識されるが、CRには、CR1(CD35)、CR2(CD21)、

* Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University

CR3(CD11b/CD18)、CR4(CD11c/CD18)、CRIg(complement receptor of the immunoglobulin superfamily)などがあり、B細胞やマクロファージ、樹状細胞、顆粒球などに発現している⁵⁾。

補体系の活性化は、大別して古典経路、レクチン経路、代替経路に分けられている⁶⁾。古典経路では、病原体などに結合した免疫グロブリンにC1qが結合し、カスケード反応を開始する(図1)。レクチン経路では、高密度のマノースに結合性を示すMBL(Mannose-binding lectin)やその他の糖鎖に反応性を示すficolin、collectinが開始因子となり、MASP(MBL-associated serine proteases)を活性化する。代替経路は、異物表面のヒドロキシ基やアミノ基に自発的に加水分解・活性化されたC3が結合することによって活性化が開始される。いずれの経路を介して活性化されても、補体系は多量のC3転換酵素(C4b2a;古典経路・レクチン経路、C3bBb;古典経路)を生成し、多量のC3をC3aと

C3bに切断する。病原体に結合したC3bおよび変換体であるiC3b、C3dは、各々オプソニン分子として働き、貪食細胞によって病原体が取り込まれやすくなる。またC3bはC3転換酵素にさらに結合してC5転換酵素となり、C5からのC5aの放出とC5b-C9からなるMACの形成を引き起こす。また活性化の過程で放出されるC3aやC5aは免疫細胞の遊走や貪食を誘導することが知られている。

一方、C3の加水分解は異物が進入していない正常な状況でも生じるため、補体活性化を制御するタンパク質が存在することも報告されている。C1インヒビター(C1INH)は古典経路やレクチン経路を介した活性化を阻害し、H因子は代替経路の活性化を阻害する。細胞表面に発現しているI因子やCD55はC3転換酵素の分解を促し、CD46はC3bやC4bに結合してI因子によるプロテアーゼ活性の共因子として働く。これらの抑制機構が補体系による正常細胞への傷害を防いでいる。

図1 補体系の活性化機構

2. ナノ粒子による補体系の活性化

ナノ粒子によって補体系が活性化されることは以前からよく知られており、FDAのガイドライン(Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs ; <https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm065014.htm>)などでも、免疫毒性の1つとして開発対象のナノ粒子による補体活性化の有無について検討することが記載されている。このように補体系とナノ粒子との相互作用を明らかにすることは、ナノ粒子を用いた医薬品開発において極めて重要な事象となっている。

補体系の活性化に影響を与えるナノ粒子側の要因としては、粒子径、粒子形状、表面電荷、ポリマー修飾の有無、ポリマーの長さや密度、ナノ粒子表面の官能基など⁷⁾があげられる(表1)。また、生体側の要因としては、種差が大きな問題となるが、本稿ではナノ粒子側の要因に関する知見を中心に紹介させていただく。

表1 補体系活性化に与えるナノ粒子の物性

物 性	補体活性化に与える影響
粒子径	大きい粒子>小さい粒子
粒子形状	形(球、ロッド、キューブ)、固さに依存
電荷	アニオン性、カチオン性>中性
修飾ポリマー	ポリマー修飾密度、長さに依存
官能基	ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基>メトキシ基、 α -ブチル基

粒子径が100 nm前後の粒子は、それよりも大きなナノ粒子と比較して補体活性化能が低いことが知られている。さらにC3転換酵素であるC4b2aの分子サイズがおよそ30 nmであることから、30 nmよりも小さい粒子は、古典経路やレクチン経路を介した補体活性化を生じにくいと考えられている。実際、PEG(polyethylene glycol)修飾脂質を含む100 nm前後のリポソームは補体を活性化したが、同物質からなる30 nm前後のミセルは補体を活性化しない⁸⁾。しかしながら、PEO(polyethylene oxide)とPPO(polypropylene oxide)からなるブロックコ

ポリマーのポロキサマーは、ミセル体・モノマー体のいずれにおいても補体を活性化すること⁹⁾やCremophor-ELからなるミセル(8~25 nm)も補体を活性化することから、ナノ粒子単体の粒子径では説明がつかない。事実、血中においてナノ粒子は、さまざまなタンパク質と相互作用し¹⁰⁾、粒子径が増大するため、C3転換酵素が結合するのに必要な十分な大きさを獲得し、補体系が活性化される可能性がある。そのため、血中タンパク質が結合した際の粒子径が重要であると考えられる。

補体系の中心タンパク質であるC3は、チオエステル基を介して病原体表面の求核基に結合する。代表的な求核基は、上述のとおりヒドロキシ基とアミノ基である。ポリマーの末端がメトキシ基や α -ブチル基のものと比較して、ヒドロキシ基、アミノ基が末端にあるポリマーは代替経路を介して補体をより活性化する^{11,12)}。ヒドロキシ基末端のポリマーが最も補体活性化能が高いことが知られている。リポソームに対する補体の活性化では、構成成分のコレステロールのヒドロキシ基やリン脂質のリン酸基がC3の結合部位であり、この結合がトリガーとなり補体系が活性化されるといわれている。そのため、コレステロール含量を減少させ、リン脂質のリン酸基をメチル化することで補体活性化を抑制できることが報告されている^{8,13)}。他の官能基として、カルボキシ基も補体系を活性化するが、アミノ基と比較すると弱い。その一方で、ヒドロキシ末端ポリマーのみからなるナノ粒子では、補体活性化後のC3が活性型のC3bから不活性化型のiC3bに変換されやすいが、カルボキシ末端ポリマー(80%)とヒドロキシ末端ポリマー(20%)を混合して調製したナノ粒子は、補体活性化後に高い割合でC3bが保持され、補体活性化が持続する¹⁴⁾。C3bからiC3bへの変換にはI因子が関与し、H因子はI因子の共因子として働くため、C3の結合性だけではなく、補体制御因子のH因子やI因子との親和性が重要であることが示唆されている。H因子をあらかじめ結合させることで、ナノマテリアルに対する補体活性化を抑制できることが近年報告されており、補体活性化を抑制するナノ粒子の設計が今後期待される。

代替経路の開始因子であるC3とは異なり、古典

図2 抗PEG IgMの違いによる補体活性化能の違い

経路の開始因子のC1qやレクチン経路の開始因子のMBLはナノ粒子に対して異なる反応性をもつ。C1qは若干正電荷を有することから、リボソームの構成成分のリン脂質のうち、アニオン性のホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、ホスファチジルセリン、カルジオリピンなどに直接結合し、古典経路を活性化することが報告されている¹⁵⁾。古典経路は主に抗体依存的に活性化されるが、抗体の種類によっても活性化の程度が異なる(図2)。PEG修飾タンパク質で誘導された抗PEG IgMは、PEG修飾タンパク質およびPEG修飾リボソームと反応した後に補体系を同程度活性化するが、PEG修飾リボソームで誘導された抗PEG IgMは、PEG修飾リボソームと反応した場合にのみ補体系を活性化する¹⁶⁾。レクチン経路を活性化させるナノマテリアルの1つとして、造影剤であるSPIO(superparamagnetic iron oxide)のデキストラン修飾体があげられる。デキストランが多糖であるためにレクチン経路が活性化される。このデキストラン分子間をepichlorohydrinによって化学的に架橋することにより、レクチン経路の活性化を阻害できる¹⁷⁾。またSWNT(single-walled carbon nanotube)もレクチン経路を介して活性化されることが報告されているが、SWNT中の補体活性化因子については同定されておらず、別の血中タンパク質(アポリポタンパク質など)などとの相互作用とこれに伴う物性の変化がこの現象に影響を与えている

のではないかと推定されている¹⁸⁾。

修飾ポリマーの密度が補体活性化に与える影響については、相反する結果が報告されている。金ナノ粒子表面へのポリビニルアルコールの修飾¹⁹⁾やポリスチレンナノ粒子へのポロキサマーの修飾²⁰⁾は、ポリマー修飾密度の増加に伴って補体系の活性化を抑制する。一方で、ポリスチレンナノ粒子へのグルコース含有ポリマーの修飾²¹⁾や赤血球への高分岐鎖ポリグリセロールの修飾²²⁾は、ポリマー修飾密度の増加に伴って補体系の活性化が増大する。このような差異が生じる原因については現状では明らかではないが、被修飾体と修飾ポリマーそれぞれの補体活性化能の違いや、補体制御因子の結合性の変化が影響を与えていると考えられる。ポリマー修飾密度の違いは、最終的な補体活性化の程度だけでなく、活性化経路をも変化させるようである²⁰⁾。事実、ポロキサマー修飾ポリスチレンナノ粒子において、修飾密度の増加に伴って古典経路や代替経路による補体活性化が減少し、レクチン経路を介した活性化が増大する。

3. 補体系の活性化によるナノ粒子の取り込み

生体内においてナノ粒子の除去に主として寄与するのは肝臓や脾臓のマクロファージである。これらのマクロファージは、補体系タンパク質に対する受容体(CR)、抗体のFc部分に対するFc受容体、変

性したりポタンパク質に対するスカベンジャー受容体、糖鎖に対するレクチン受容体などを発現している。本稿では、CRを中心を紹介させていただく。

肝マクロファージであるクッパー細胞は、マウスではCR3とCRIgの2つの補体受容体を発現していることが知られている^{5,23)}。CRIgはC3bとiC3bに結合できるのに対し、CR3はiC3bのみに結合できる。またCR3はオプソニン化した粒子の取り込みに Mg^{2+} と Ca^{2+} を必要とする。CRIg欠損マウスにおいて、オプソニン化された病原体のクリアランスが著しく低下することから、CR3よりもCRIgの方がクッパー細胞での貪食に重要であることが示唆されている²⁴⁾。

マクロファージによるナノ粒子の取り込みについては古くから研究されてきた。例えばリポソームでは、粒子径が大きく、コレステロール含量が多いリポソームへの補体結合量(C3)が増加し、それに比例して肝臓や脾臓へのリポソームの蓄積が増大することが報告されている²⁵⁾。PEG修飾リポソームを5日の投与間隔で繰り返し投与した際に、2回目

投与PEG修飾リポソームが速やかに消失するABC (accelerated blood clearance)現象発現時においても、補体系は重要な役割を果たしていることが示されている。初回投与によって誘導された抗PEG IgM量に比例して補体活性化が誘導され、肝蓄積量が増大する^{26,27)}。またSNA(spherical nucleic acid)ナノ粒子においては、グアニンを豊富に含むSNAナノ粒子が、チミンを豊富に含むSNAナノ粒子よりも補体系を活性化し、マクロファージによってより多く取り込まれ、補体受容体の阻害によって取り込み量が減少することが示されている²⁸⁾。一方で前述のとおり、マクロファージは他の取り込み受容体をもっていることにも注意すべきである。実際、グアニンを豊富に含むSNAナノ粒子はスカベンジャー受容体を介しても取り込まれることが明らかになっており、補体系の活性化だけでマクロファージの取り込みを類推することはできない。

補体系の活性化を介したナノ粒子の取り込みは、マクロファージ以外でも報告されている。PEG修飾リポソームを3日の投与間隔で繰り返し投与した

図3 補体の結合を介した脾臓辺縁帯B細胞によるPEG修飾リポソームの取り込み

際、2回目投与PEG修飾リポソームは脾臓において辺縁帯B細胞に選択的に取り込まれる。2回目投与PEG修飾リポソームに抗PEG抗体と補体成分が結合した後に、辺縁帯B細胞に取り込まれることを明らかにしている^{29,30)}(図3)。辺縁帯B細胞は、マクロファージに高発現しているCR3、CRIgとは異なる補体受容体であるCR2を高発現しており、これを介して取り込まれていると想定される。また orthopyridyl disulfide 基を含む PEG 修飾リポソームは、補体系の活性化を介して、顆粒球型骨髓由来抑制細胞に取り込まれやすいことが報告されている³¹⁾。当該細胞上のCR3が取り込みに関与していると考えられるが、細胞選択性の理由については明らかになっていない。

病態によってもナノ粒子の体内動態が変化することが知られている³²⁾。担がんマウスでは、ナノ粒子の血中滞留性が低下することが知られている³³⁾。この原因の1つとして、マクロファージの表現型の変化があげられる。がんにおいては、炎症性のM1型マクロファージよりも、抗炎症性のM2型マクロファージが優位になっている。M2型マクロファージは、スカベンジャー受容体やレクチン受容体の発

現が亢進しており、これらを介したナノ粒子の取り込みが一般的に増加している。がん内に浸潤しているマクロファージがCRIgを高発現しているという報告もあり³⁴⁾、ナノ粒子の血中滞留性が補体/補体受容体を介して低下している可能性も考えられる。

4. 補体系の活性化による毒性

ナノ粒子投与後に現れる毒性として、溶血、急性アレルギー反応、発熱、サイトカインストーム、血栓形成、免疫抑制などが知られている³⁵⁾。補体の活性化に伴う毒性発現の概略を図4に示す。

ナノ粒子投与後の補体活性化に伴う代表的な毒性に、CARPA(complement activation-related pseudoallergy)があげられる³⁶⁾。ナノ粒子投与後にしばしば急性アレルギー様反応が起こることは古くから知られていた。症状としては、血圧上昇/血圧降下、呼吸困難、紅潮、発疹などがあげられ、ときには死に至ることもある。I型アレルギーとは異なり、前感作がなく、初めて投与された際に誘導される点が特徴的である。CARPAは、補体系の活性化に伴うものであることが明らかになっている。補

図4 補体系の活性化に伴う毒性発現

体の活性化に伴って放出されるアナフィラトキシンのC3a、C4a、C5aは、マスト細胞からのヒスタミンの放出、血管透過性、免疫細胞の遊走などを亢進させ、炎症反応を引き起こす。CARPAの誘導には個体差があるのはもちろんではあるが、種差が大きいことも明らかになっている。ラットではCARPAの誘導が弱く、ブタやビーグル犬では誘導が強い³⁷⁾。CARPAの誘導機構に関する研究は、主にリポソーム製剤(Doxil、Ambisome)を用いて行われているが、Cremophor ELや治療抗体、造影剤投与によっても誘導されることが知られている。リポソームにおいては、粒子径の増加や、荷電の付加、抗体の結合によって、CARPAが強くなり生じる。このような急性アレルギー様症状を回避するために、現在は抗炎症・抗アレルギー薬の前投与や点滴速度を抑えることが行われている。またCARPAの誘導は2回目投与以後減少することから、薬物を含まない空のナノキャリア(DoxilのプラセボとしてDoxebo)を投与することで、急激なアレルギー様症状を予防する試みもなされている。

凝固因子と補体系の相互作用についてもいくつか報告されている。ナノマテリアルに対する凝固反応においては、凝固第Ⅻ因子が負電荷の表面に結合して活性化し、プレカリクレインをカリクレインに変換し、最終的にC3やC5を切断してアナフィラトキシンのC3aやC5aを産生させる³⁸⁾。また、同じく負電荷のポリマーは、凝固第Ⅶ因子活性化プロテアーゼを活性化し、C3aやC5aを産生させる³⁹⁾。一方で好中球は、C5a刺激を受けた後、外因系血液凝固因子のtissue factorを分泌し、凝固反応を促進する⁴⁰⁾。また好中球上のCR3は、iC3bが結合した粒子に結合するだけでなく、フィブリン凝集物にも結合する⁴¹⁾。このように補体活性化と凝固反応が協働しているため、ナノ粒子投与後には両因子とも誘導されないように注意しなければならない。

補体系はがんの成長にも深く関与する^{42, 43)}。補体系の中でも主にC3aやC5aは、がん細胞の増殖・アポトーシス抑制、血管新生、がんの浸潤を促すことが報告されている。そのため、薬物を搭載していない空のナノ粒子をがん移植マウスに投与した際、補体活性化の程度に応じて、がんの成長を促進して

しまうことが報告されている⁴⁴⁾。さらに、C5欠損マウスやC5a受容体欠損マウスにおいては、補体活性化ナノ粒子投与によるがんの成長促進が抑制されており、C5/C5a受容体の重要性が明らかになっている。このように、ナノ粒子投与に伴う補体の活性化はがん治療効果に悪影響を与える可能性があることも考慮しなければならない。

5. 補体系の活性化を利用したワクチン開発

CRは、補体成分が結合した抗原の取り込みに関わるため、抗原提示細胞による抗原の取り込みを促進する。またCRのなかでもB細胞に選択的に発現しているCR2は、B細胞受容体(BCR)と共役してB細胞刺激の閾値を低下させる。そのため、補体成分が結合した抗原は、BCRとCR2に認識され、B細胞による抗体分泌を促進する。特にC3の分解産物であるC3dは、他のCRのリガンドにならないCR2選択的なリガンドであり、B細胞を特異的に活性化するために、有用であると考えられている。

実際C3dを抗原へ直接結合させることでワクチン効果を向上させる試みは古くから行われてきた⁴⁵⁾。初期の報告では、ニワトリ卵白リゾチームにいくつかのC3d分子を結合させることにより、抗体誘導に必要な抗原量を少なくとも10,000倍は減少できることを明らかにしている。同様に、HIVのgp120とC3dの融合タンパク質を発現するpDNAを用いたDNAワクチンにおいても、高い抗体価が誘導されている。新生児では、C3の血中濃度が低いことが知られているが、C3を抗原に結合させることで、抗体が誘導されるようになることも報告されている⁴⁶⁾。C3dによるワクチン効果の向上は、B細胞上のCR2が関与すると考えられているが、これが関与しない経路についても報告されている⁴⁷⁾。抗原自体の性質、投与量、投与経路、C3dの結合数に依存して、CR2の関与が変化する可能性がある⁴⁸⁾。

C3が細胞性免疫に与える影響はあまり知られていないが、いくつか報告がなされている。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染時において、C3がCD8⁺ T細胞反応を抗原エピトープ選択的に促進す

図5 補体活性化ポリマー修飾リポソームを用いたワクチン開発

ることが報告されている⁴⁹⁾。T細胞はCR1やCR2を発現しているが、C3が結合した抗原がT細胞上のCRに直接結合して活性化しているわけではなく、CRをもつ抗原提示細胞による抗原取り込みが増加して抗原提示が増強され、その結果CD8⁺ T細胞誘導が促進されたと考えられる⁵⁰⁾。C3以外では、C5a/C5aRシグナルがCD8⁺ T細胞反応を促進することも報告されている。つまり、T細胞自身がC5aを分泌し、自身のC5a受容体を介して自己エフェクター機能を調節しており、補体の活性化を利用してT細胞機能を直接制御できるかもしれない⁵¹⁾。

補体系の活性化を利用したナノ粒子ワクチンについては、まだあまり報告されていない。ヒドロキシ末端プルロニックナノ粒子を皮内投与した場合、メトキシ末端プルロニックナノ粒子と比較して、補体活性化能が高く、樹状細胞の成熟化能・抗体誘導能が高いことが報告されている⁵²⁾。また市販のカルボキシ末端ポリスチレンナノ粒子は、ヒドロキシ末端プルロニックナノ粒子と同様に、樹状細胞に取り込まれるものの、樹状細胞の成熟は誘導せず、補体活

性の重要性が述べられている。補体は血中に多量に存在するが、皮膚局所での補体量は少ないと考えられる。前述のように、局所の免疫細胞が補体を分泌することも報告されているが、局所から分泌された補体がナノ粒子に結合しているのか、またどのように樹状細胞を活性化しているかはまだ明らかにされていない。また別のナノ粒子として、PRINT (particle replication in non-wetting templates) ナノ粒子は、皮下投与後のリンパ節移行性が高く、また補体を活性化することで、結合させた抗原に対する抗体分泌が増加することが報告されている⁵³⁾。いずれにおいても、ナノ粒子への補体の活性化を介して抗体分泌(体液性免疫)を誘導することに成功しているが、細胞性免疫の誘導までは確認されていない。今後、補体活性化ナノ粒子を用いた細胞性免疫誘導と、それに伴うがん治療への応用が期待される。

現在、筆者らは、補体活性化能をもつポリマー修飾リポソームを静脈内投与し、脾臓辺縁帯B細胞にがん抗原を選択的に送達し、がんに対する細胞傷害性T細胞を誘導することでがんを治療できる新規ワクチンの開発に取り組んでいる(図5)。今回は詳

細を割愛させていただくが、当該リボソームを用いることで抗腫瘍免疫反応を誘導できる予備的検討結果を得ている。補体活性化を利用したナノ粒子ワクチンが、今後新規ワクチンとして開発されていくことが期待される。

6. おわりに

補体系の活性化はナノ粒子を用いた薬物送達を台無しにしてしまう可能性があるため、補体系の活性化を避ける戦略がこれまで研究されてきた。リボソームの PEG 修飾は代表的な例であろう。本稿で

はナノ粒子による補体活性化について概説を試みた。補体の活性化は、生体内のさまざまな機構およびナノ粒子の物性によって大きく影響されるため、これらを理解した上で、今後よりよい薬物送達システムとしてのナノ粒子を設計する必要がある。その一方で補体系は生体が本来もつ自然免疫機構の1つであり、ナノ粒子への補体活性化を利用すれば効率的なワクチン開発や免疫疾患治療につながると考えられる。同じ自然免疫系の toll-like receptor と補体系との協働的な免疫制御についても近年報告されており、さらなる発展が期待される。

文献

- 1) Ricklin D., et al., *Nat Immunol.*, **11**, 785-797 (2010)
- 2) Carroll M. C., *Nat Immunol.*, **5**, 981-986 (2004)
- 3) Kolev M., et al., *Nat Rev Immunol.*, **14**, 811-820 (2014)
- 4) Figueroa J. E., et al., *Clin Microbiol Rev.*, **4**, 359-395 (1991)
- 5) He J. Q., et al., *Mol Immunol.*, **45**, 4041-4047 (2008)
- 6) Lubbers R., et al., *Clin Exp Immunol.*, **188**, 183-194 (2017)
- 7) Moghimi S. M., et al., *Adv Drug Deliv Rev.*, **63**, 1000-1007 (2011)
- 8) Moghimi S. M., et al., *FASEB J.*, **20**, 2591-2593 (2006)
- 9) Moghimi S. M., et al., *Biochim Biophys Acta.*, **1689**, 103-113 (2004)
- 10) Lee Y. K., et al., *Int J Nanomedicine*, **10**, 97-113 (2015)
- 11) Sperling C., et al., *Biomaterials*, **28**, 3617-3625 (2007)
- 12) Salvador-Morales C., et al., *Biomaterials*, **30**, 2231-2240 (2009)
- 13) Ishida T., et al., *Int J Pharm.*, **224**, 69-79 (2001)
- 14) Thomas S. N., et al., *Biomaterials*, **32**, 2194-2203 (2011)
- 15) Tan L. A., et al., *Protein Cell*, **1**, 1033-1049 (2010)
- 16) Shimizu T., et al., *Biol Pharm Bull.*, **35**, 1336-1342 (2012)
- 17) Wang G., et al., *ACS Nano*, **8**, 12437-12449 (2014)
- 18) Hamad I., et al., *Mol Immunol.*, **45**, 3797-3803 (2008)
- 19) Arima Y., et al., *Biomaterials*, **31**, 6926-6933 (2010)
- 20) Hamad I., et al., *ACS Nano*, **4**, 6629-6638 (2010)
- 21) Yu K., et al., *ACS Nano*, **8**, 7687-7703 (2014)
- 22) Leung V. L., et al., *Acta Biomater.*, **31**, 252-263 (2016)
- 23) Small A. G., et al., *Swiss Med Wkly.*, **146**, w14301 (2016)
- 24) Ishida T., et al., *Biosci Rep.*, **22**, 197-224 (2002)
- 26) Wang X., et al., *J Control Release*, **119**, 236-244 (2007)
- 27) Ishida T., et al., *J Control Release*, **126**, 162-165 (2008)
- 28) Chinen A. B., et al., *Small*, **13**, 1603847 (2017)
- 29) Shimizu T., et al., *Immunobiology*, **218**, 725-732 (2013)
- 30) Shimizu T., et al., *Immunobiology*, **220**, 1151-1160 (2015)
- 31) Kullberg M., et al., *Nanomedicine*, **11**, 1355-1363 (2015)
- 32) Jones S. W., et al., *J Clin Invest.*, **123**, 3061-3073 (2013)
- 33) Ukawa M., et al., *Biol Pharm Bull.*, **39**, 215-220 (2016)
- 34) Liao Y., et al., *Lab Invest.*, **94**, 706-715 (2014)
- 35) Dobrovolskaia M. A., et al., *J Control Release*, **172**, 456-466 (2013)
- 36) Szebeni J., *Mol Immunol.*, **61**, 163-173 (2014)
- 37) Dezsai L., et al., *J Control Release*, **195**, 2-10 (2014)
- 38) Schmaier A. H., *J Clin Invest.*, **118**, 3006-3009 (2008)
- 39) Muhl L., et al., *FEBS J.*, **276**, 4828-4839 (2009)
- 40) Ritis K., et al., *J Immunol.*, **177**, 4794-4802 (2006)
- 41) Wright S. D., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **85**, 7734-7738 (1988)
- 42) Rutkowski M. J., et al., *Mol Cancer Res.*, **8**, 1453-1465 (2010)
- 43) Pio R., et al., *Semin Immunol.*, **25**, 54-64 (2013)
- 44) Bergmann-Leitner E. S., et al., *Clin Immunol.*, **121**, 177-185 (2006)
- 46) Pihlgren M., et al., *Vaccine*, **23**, 329-335 (2004)
- 47) Haas K. M., et al., *J Immunol.*, **172**, 5833-5837 (2004)
- 48) Musa H. H., et al., *J Microbiol Immunol Infect.*, **47**, 57-62 (2014)
- 49) Suresh M., et al., *J Immunol.*, **170**, 788-794 (2003)
- 50) De Groot A. S., et al., *Immunol Cell Biol.*, **93**, 189-197 (2015)
- 51) Wang Y., et al., *Cancer Discov.*, **6**, 1022-1035 (2016)
- 52) Reddy S. T., et al., *Nat Biotechnol.*, **25**, 1159-1164 (2007)
- 53) Mueller S. N., et al., *Mol Pharm.*, **12**, 1356-1365 (2015)