

研究の中心に位置しており、極めて期待が大きい DDS キャリヤーと言える。欧米においてさまざまなリポソームが臨床で用いられていることから分かるように、リポソームはヒトに対する安全性が確保され、技術的にもある程度完成された汎用性が高い DDS キャリヤーであるということが出来る。しかしながら、人工細胞を用いた治療や RNA 干渉 (RNAi) 療法のような次世代の医療を実現するため、そしていまだ治療が難しいがんに立ち向かうためには、基礎および臨床双方におけるリポソーム研究のさらなる進展が必要である。本稿ではがん化学療法および遺伝子治療におけるリポソーム研究の現状を簡単に述べ、そして我々の最近の取り組みとその研究成果について紹介したい。リポソームの基礎および多種多様な応用に関して興味のある方は、よくまとまった成書が出版されているので参照されたい<sup>1)</sup>。

#### リポソームを用いたがん化学療法の現状

リポソームによる一般的ながんへのターゲティングは、脆弱な新生血管に起因する透過性亢進によってリポソームが集積し、そのうえリンパ管が乏しいためにがん局所にとどまるというメカニズムに基づいている。いわゆる enhanced permeability and retention (EPR) 効果を利用した標的化機構である。長期血中滞留型のリポソームは長時間にわたって EPR 効果を発揮するため、結果的により高いがん集積性を示す。このような標的化は passive targeting と称され、すでに実用化されている Doxil<sup>®</sup> などがこのタイプのリポソームである。Doxil<sup>®</sup> はドキソルビシンの主な副作用である心毒性が著しく軽減されたリポソーム製剤であり、治療成績の向上というよりはむしろ副作用の軽減が大きな特徴となっている。リポソーム化による標的化効果が直接的に薬理効果の向上につながっていない

のは、がん細胞によるリポソーム取り込み量やリポソームからの薬物放出量が原因として考えられている。このことは、リポソームの生体内安定性を向上させた結果としてがん細胞の薬物取り込み量が低下したと述べることもでき、製剤設計の難しさをよく表している。

一方で、抗体などの機能性リガンドを結合したリポソームによる標的化は、active targeting と称される。がん細胞に対して親和性を有する何らかのリガンドを結合したリポソームは、標的細胞との相互作用によってがん局所に集積するとともに、受容体介在性エンドサイトーシスによって積極的に細胞に内在化されると考えられている。したがってリガンド結合型リポソームは、上述した課題が改善された第 2 世代のリポソーム製剤として期待されている。基礎研究においてこのタイプのリポソームの有効性が認められた例は数多くあり、臨床試験まで進んでいる製剤も存在する。このようなりポソームは、EPR 効果が出やすいがんにおいては高い治療効果が得られるものと期待される。

しかし、EPR 効果が出にくいがん、すなわち比較的血管密度が低いがんにおいては、このようなりポソームであってもそのポテンシャルを発揮しにくいと考えられる。つまり、リポソームが新生血管間隙を通過するステップが律速段階となるため、リガンド修飾による標的化をあくまで 2 次的な標的化としてとらえなくてはならない。がん細胞に標的化したリガンド結合型リポソームは、がんの新生血管密度によってリポソームの集積量が増減し、そのことによって抗がん活性が左右されると考えられている。さらに、EPR 効果によって集積したリポソームは、そのほとんどが新生血管近傍の間隙にとどまるため、血管から離れたがん細胞に対しての殺傷効果は低いと考えられる。これらの点は、active targeting の盲点となるので注意が必要である。

リポソームの実用化には、基本的特許やレギュレーションの問題などもクリアしなければならぬが、我々はここに記載した内容に関して臨床応用への壁になっていると考えている。実際、担がん動物モデルにおいて多くのリガンド結合型リポソームに著しい治療成績の向上が認められているにもかかわらず、結局のところなかなか実用化に結びついていないのが現状である。がんの治療成績向上を実現する次世代のリポソームを開発するためには、斬新かつ臨床ニーズにかなった概念においてリポソーム研究を行い、調製したリポソームを適切な実験モデルにおいて評価することが大切である。やみくもにリガンドや封入薬剤を変え、がんを皮下移植したマウスにて治療実験を行う研究手法には限界がある。

#### 標的化リポソームによる 腫瘍新生血管傷害療法

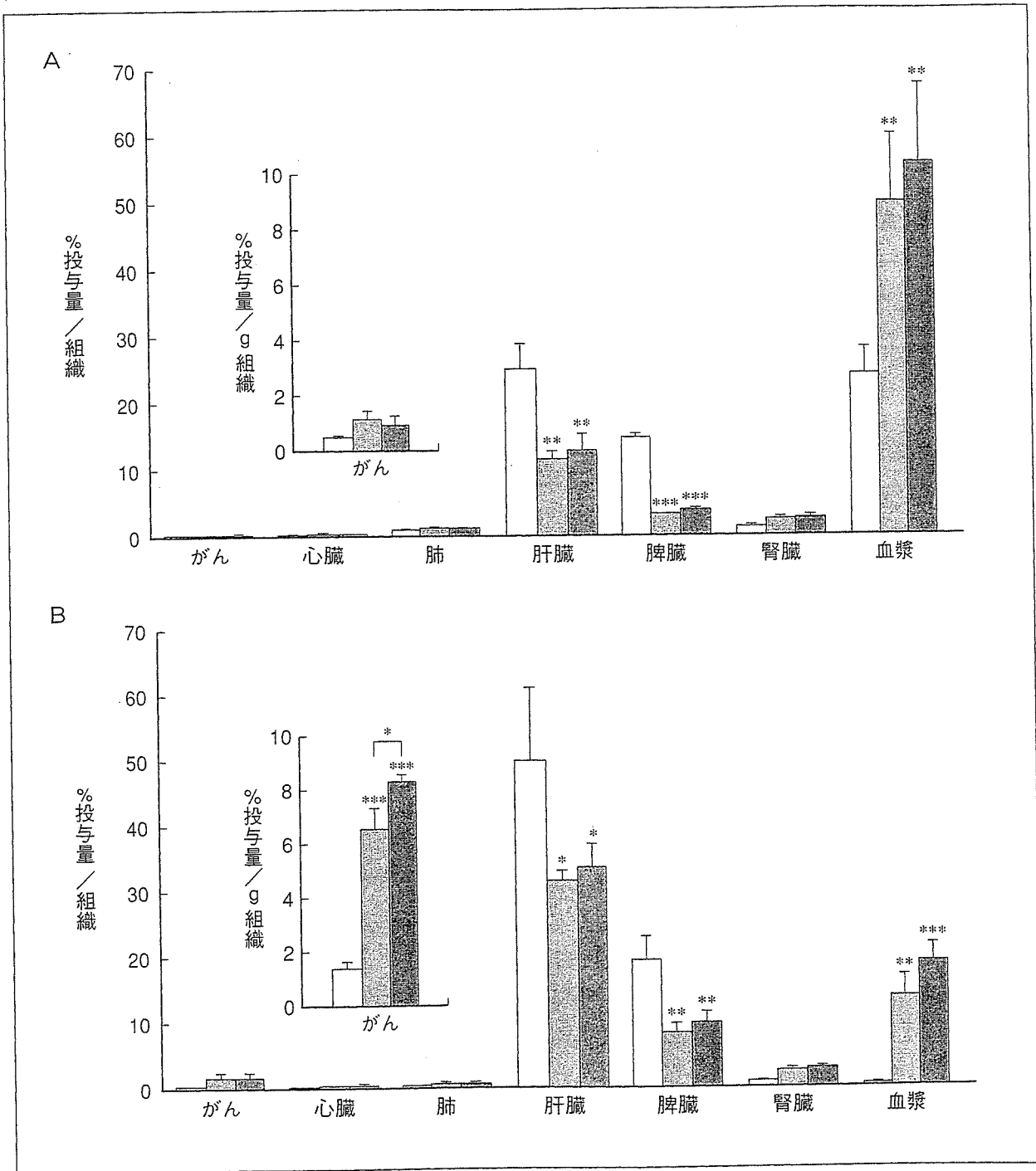
我々はこれまでに、標的化リポソームによる「腫瘍新生血管傷害療法 (antineovascular therapy)」を考案し、その有効性について基礎的研究を遂行して証明してきた。腫瘍新生血管傷害療法とは、リポソームなどの DDS 技術によって抗がん剤を腫瘍新生血管に送達し、血管構造の破壊を介して固形がんを攻撃する化学療法のことを指している<sup>2)</sup>。血流に面した新生血管内皮細胞に標的化するという新しい概念のリポソーム DDS は、従来の EPR 効果に依存した標的化機構とは一線を画した DDS 効果が望める。これにより、これまでのリポソーム製剤では効果が表れにくかったがんに対しても有効性を示す可能性があり、リポソームの適用範囲の拡大が期待できると考えられる。腫瘍新生血管傷害療法の数々の利点および腫瘍新生血管標的化リポソームに関する我々の研究成果については、これまでも総説としてまとめているので興

味のある方は参照されたい<sup>3-5)</sup>。ここでは標的化リポソームによる腫瘍新生血管傷害療法に関して我々の最近の取り組みを中心に述べ、海外の研究動向についても触れたい。

我々は、腫瘍新生血管特異的ペプチド (Ala-Pro-Arg-Pro-Gly: APRPG) をポリエチレングリコール (PEG) 鎖の先端に提示した粒子径約 150nm の APRPG-PEG 修飾リポソームを開発した<sup>6)</sup>。がんにおけるリポソームの組織内分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果、PEG 修飾リポソームが EPR 効果によって新生血管近傍の間質にとどまっている様子、および APRPG-PEG 修飾リポソームが選択的に内皮細胞に結合している様子が明らかとなった。したがって、APRPG-PEG 修飾リポソームによる腫瘍新生血管標的化は、がん細胞への active targeting で言われている「EPR 効果に次ぐ 2 次的な標的化」とは質が異なるものと言える。担がんマウスを用いてリポソーム体内分布を検討した際には、静注 24 時間後において APRPG-PEG 修飾リポソームは PEG 修飾リポソームよりも有意に高くがんを集積した (図 1)。ドキソルビシン (DOX) を封入したリポソームによる抗腫瘍効果について検討したところ、DOX 封入 APRPG-PEG 修飾リポソーム投与群では、DOX 封入コントロールリポソーム、DOX 封入 PEG 修飾リポソーム投与群と比較し、有意に腫瘍増殖を抑制した (図 2)。これらの結果より、DOX 封入 APRPG-PEG 修飾リポソームを用いた腫瘍新生血管傷害療法の有効性が示唆された。

現在は、難治がんの治療成績向上および QOL の改善を最終目標とし、膺がん同所移植モデルにおいて腫瘍新生血管標的化 DDS の有効性を評価している。膺がんは難治がんとしてよく知られており、また乏血管性ではあるが血管新生がその悪性度に関与すると考えられている。これまでに膺がんを適応とす

図1 APRPG-PEG 修飾リポソームの体内分布

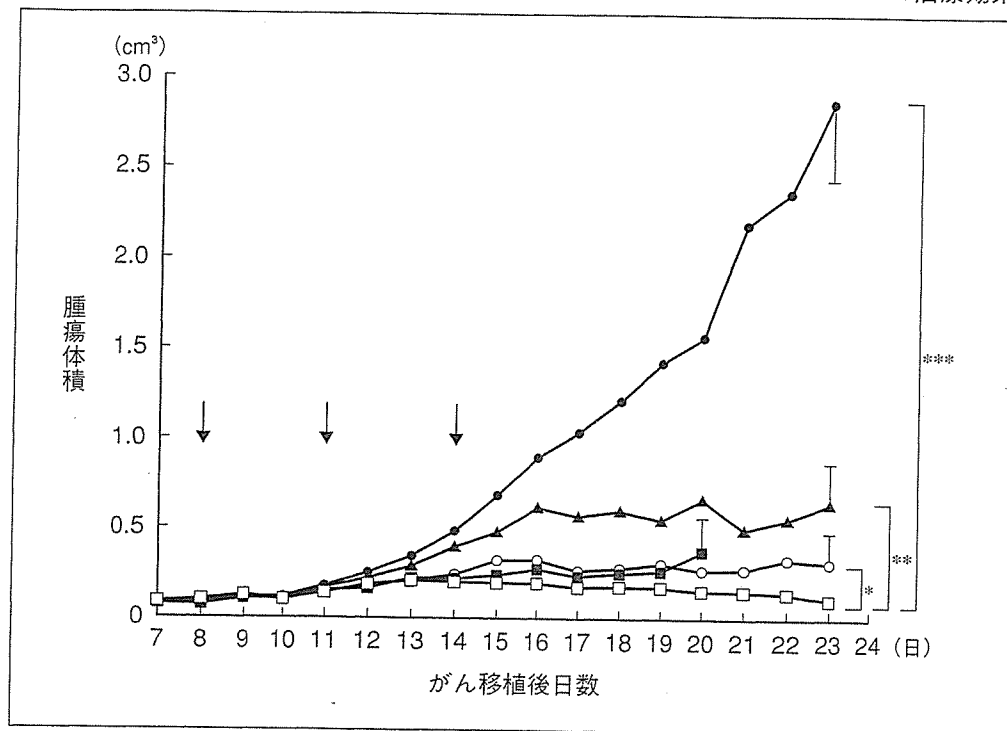


C26 NL-17 大腸がん担がんマウスに放射標識したコントロールリポソーム (□), PEG 修飾リポソーム (▨), または APRPG-PEG 修飾リポソーム (▩) を尾静脈内投与し, 1 時間 (A) または 24 時間 (B) 後の体内分布を検討した. がんおよび各臓器の放射活性を測定し, がん 1 g 当たりのリポソーム集積量および各組織当たりのリポソーム集積量を % 投与量として算出した. なお, グラフのデータはリポソームの平均集積量および標準偏差を示し, アスタリスクは有意差を示している (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

るリポソーム製剤というものは存在しないが, 本来リポソームにとって障壁となる新生血管密度が低いという特徴をうまく利用すること

によって, 効果的な治療法につながる可能性がある. 乏血管性の膵がん同所移植モデルで評価することにより, ① 比較的少ない新生

図2 ドキソルビシン (DOX) 封入 APRPG-PEG 修飾リポソームによるがん治療効果



C26 NL-17 大腸がん担がんマウスにコントロールとして 0.3M グルコース (●), DOX (■), DOX 封入リポソーム (▲), DOX 封入 PEG 修飾リポソーム (○) または DOX 封入 APRPG-PEG 修飾リポソーム (□) を DOX 量で 10mg/kg 投与し, 抗がん効果を評価した. DOX 封入 APRPG-PEG 修飾リポソームを用いた腫瘍新生血管傷害療法により, 最も優れた腫瘍増殖抑制効果が得られた. グラフのデータは平均腫瘍体積および標準偏差を示し, アスタリスクは有意差を示している (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). 矢印は投与日を示している.

血管をねらうことによって逆に高い治療効果が得られる可能性, ② 新生血管の悪性度への関与を絶つことによって治療成績の向上につながる可能性, ③ がん組織内の間質圧の低下を招くことによって2次的な DDS 効果が働く可能性などを明らかにすることができる. これまでに我々は, ヒト膵がん細胞株の SUI-2 細胞をヌードマウスに同所移植することによって乏血管性の膵がんモデルの構築に成功し, DOX 封入 APRPG-PEG 修飾リポソームの効果を検討した. その結果, DOX 封入 APRPG-PEG 修飾リポソーム投与群では, DOX 封入 PEG 修飾リポソーム投与群と比較して高い治療効果が得られた (未公表データ). このような新しいコンセプトのもとに腫瘍新生血管標的化 DDS の有効性を評

価することにより, 難治がんに対する新しいリポソーム DDS の創製につながるであろうと期待している.

ところで, 国外においても腫瘍新生血管標的化リポソームの研究は鋭意進行している. 最近では Procyon Biopharma 社が開発を進めている Tumor Vasculature Targeting liposomal doxorubicin (TVT-DOX) の前臨床試験結果が, マイアミで開催された Nature Biotechnology Winter Symposium Angiogenesis in Cancer and Vascular Disease 学会にて発表された. TVT-DOX は 2003 年の『Cancer Research』誌に掲載された Asp-Gly-Arg (NGR) モチーフを有するペプチドを結合したリポソームがベースとなった製剤である<sup>7)</sup>. NGR ペプチドは新生血管の内皮細

胞に発現する CD13 に結合することが分かっており、TVT-DOX はその名のとおりがんの新生血管を選択的に破壊する。2006 年 2 月の時点において TVT-DOX は 1 年以内に IND 申請を実施するスケジュールとなっており、実用化に向けて着実に開発が進行している。腫瘍新生血管標的化リポソームの有効性が臨床においても証明されることが期待される。

### 核酸医薬におけるリポソーム

プラスミド DNA や siRNA のような核酸医薬による治療開発においては、治療標的分子はもちろんのこと、核酸のキャリアー（ベクター）開発が成否の鍵となる。がんなどの難治性疾患や遺伝性疾患を対象とした遺伝子治療が注目されて久しいが、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症などごく一部の疾患を除いて期待されたような効果はなかなか得られていない。そのような中、効果的な遺伝子治療を実現するための取り組みの 1 つとして、導入効率と安全性が高く、なおかつ全身性投与（静脈内投与）が可能な治療用ベクターの開発が行われてきた。リポソームは非ウイルス系ベクターの代表的な存在であり、カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体が遺伝子導入によく用いられている。カチオン性リポソームは研究用試薬として多くの製品がラインナップされており、広く一般的に用いられている。全身性投与が可能な治療用ベクターとしては、PEG 修飾を施したカチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体やプラスミド DNA を包含したタイプのリポソームなどが開発されている。

近年では、siRNA のキャリアーとしてもリポソームが注目を集めるようになった。siRNA を用いた RNAi は特異性が高く、さらに細胞内在性の遺伝子発現抑制システムを利用するために、従来の遺伝子制御技術と

比較して非常に低濃度で効果的に遺伝子発現を抑制できる。現在、RNAi を利用した治療法に関する研究は急速に進行しており、同時に siRNA の導入に最適化したキャリアーの開発が急がれている。科学の進歩によって siRNA のような革新的な遺伝子発現制御ツールが誕生し、次々と新しい治療標的が明らかになっていく中、治療応用に結びつけるのに不可欠なのが優れた導入キャリアーである。研究用途で siRNA を細胞に導入する場合には、研究用試薬として販売されているリポソームで十分なことが多い。しかし治療応用を考えた場合には、添加剤を要さずリポソームのみによって効率的に導入でき、なおかつ生体内において安全に機能する新規 siRNA デリバリーシステムの確立が必要となる。ここでは、治療応用を見据えた siRNA デリバリーシステムの開発に関し、我々の最近の研究成果を紹介したい。

### ポリカチオンリポソームを用いた siRNA デリバリー

現在我々は、臨床応用可能な siRNA 導入キャリアーの開発を目指して、cetyl-polyethylenimine (cetyl-PEI) を付加したポリカチオンリポソーム (PCL) に関する研究を実施している。これまでに PCL を用いたプラスミド DNA の導入では、*in vitro* および *in vivo* で高い導入効果が確認されている<sup>8)9)</sup>。そして、PCL はポリカチオンおよびカチオン性リポソームの両者の利点を併せ持つ遺伝子キャリアーであることが明らかとなっている。我々は、この PCL が siRNA デリバリーに応用可能であるとの仮説を立て、まず PCL の脂質組成および PCL/siRNA 複合体の最適窒素/リン酸 (N/P) 比を検討した。PCL による siRNA 導入効果は、HT-1080 ヒト線維芽肉腫細胞の GFP 安定発現株に GFP に対する siRNA を導入し、GFP タン

パク質の減少率を指標にして抑制効果を評価した。併せて PCL/siRNA 複合体の細胞毒性を MTT 改変法によって評価した。すべての実験の対照には, *in vitro* において高い siRNA 導入効果を示す Lipofectamine 2000 を用いた。その結果, PCL のヘルパー脂質として DOPE とコレステロールを使用し, N/P 比を 24eq. とした粒子径約 150nm の PCL/siRNA 複合体において最大の RNAi 効果が得られた。また最も高い効果を示した PCL/siRNA 複合体において細胞傷害性は観察されなかった。さらに PCL は, 研究用試薬として広範に利用されている Lipofectamine 2000 と比較し, 高効率かつ低毒性という優れた特徴を有する導入キャリアーであることが明らかとなった。次に PCL を DiD で, siRNA を FAM で二重蛍光標識した PCL/siRNA 複合体を HT-1080 細胞に導入し, 共焦点レーザースキャン顕微鏡下にておのおの細胞内動態を解析した。24 時間後には大部分の複合体が細胞膜から細胞質に移行し, 細胞質においては経時的に複合体が解離していく様子が観察された。ここまでの検討で, 「治療応用を指向した新規 siRNA キャリヤー」の基本骨格部分となる siRNA 導入用 PCL の高い導入効率が明らかとなった。実際に生体内において効率的な siRNA 導入を実現するためには, 安定性を向上するための PEG 修飾や標的細胞への特異性を付与するためのリガンド修飾などのさらなる製剤設計を要する。しかし, あらかじめ基本骨格となるリポソームを開発し, 後に改良を加えるこ

とができるのも, 機能性分子による修飾が容易なりポソームならではの利点と言える。近年脚光を浴びているナノメディシン研究において, 今後もしポソームが大きな役割を果たしていくと考えられるが, 我々の研究がその一助になれば幸甚である。

#### 文 献

- 1) 秋吉一成, 他 監修: リポソーム応用の新展開 - 人工細胞の開発に向けて -。株式会社エヌ・ティー・エス, 東京, 2005.
- 2) Oku N, et al: Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 21 (17): 2662-2669, 2002.
- 3) 前田典之, 他: リポソーム製剤のドラッグデリバリーシステムへの応用展開。人工血液 12 (4): 114-120, 2004.
- 4) 浅井知浩, 他: 標的化リポソームを用いた腫瘍新生血管傷害療法。Drug Delivery System 19 (6): 488-494, 2004.
- 5) 浅井知浩: 腫瘍新生血管標的化リポソームの新展開。薬剤学 65 (3): 169-174, 2005.
- 6) Maeda N, et al: Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J Control Release* 100 (1): 41-52, 2004.
- 7) Pastorino F, et al: Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res* 63 (21): 7400-7409, 2003.
- 8) Matsuura M, et al: Polycation liposome-mediated gene transfer *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 1612 (2): 136-143, 2003.
- 9) Sugiyama M, et al: Possible mechanism of polycation liposome (PCL)-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1660 (1-2): 24-30, 2004.

---

Novel Application of Liposomal DDS

Tomohiro Asai, Naoto Oku

Department of Medical Biochemistry and COE Program in the 21st Century,  
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

## siRNA 実用化の鍵をにぎる DDS

浦上武雄

Takeo URAKAMI

静岡県立大学大学院薬学研究科大学院生

奥 直人

Naoto OKU

静岡県立大学薬学部教授

## 1 はじめに

Small (short) interfering RNA (siRNA) は、わずか 20 数塩基対の二本鎖 RNA であるが細胞内で特定の遺伝子の発現を強力に抑える機能を持つ。siRNA はその特異性と効果から、これまでに治療が困難であった様々な疾患治療の強力なツールとして期待されている。しかしながら、実用化に当たっては他の薬物と同様に薬理作用、体内動態や安全性など多くの基準をクリアしなくてはならない。この実用化の鍵をにぎるのが drug delivery system (薬物送達技術; DDS) である。本稿では、我々が siRNA 技術の恩恵を受けるために必要な DDS とその課題を紹介する。

## 2 化学合成 siRNA とベクター系 siRNA

2001 年に Tuschl らは、21 塩基の化学合成した相補性のある二本の RNA をアニーリング (相補的な配列を持つ塩基同士で水素結合により会合) することにより siRNA を作成し、哺乳類の細胞で特異性の高い遺伝子の発現抑制ができることを報告した。<sup>1)</sup> これ以降、化学合成 siRNA はその手軽さから、広く遺伝子発現の抑制実験に用いられている。化学合成 siRNA は安定性や特異的抑制効果の向上のため化学的に修飾することが可能であるが、細胞内での効果は長くても 10 日間程度と考えられている。

ベクター系の siRNA は、化学合成 siRNA で不十分な点である持続的な遺伝子抑制効果及びトランスフェクションの効率が低い細胞に対する抑制効果を改善するために開発された。ベクター系 siRNA は、プラスミド DNA (環状二本鎖 DNA) またはウイル

ス (アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスなど) に組み込んで用いられ、核内で転写後に細胞質に輸送され siRNA となる。

ウイルスをベクターとした siRNA は、高い効率で標的細胞に感染し、遺伝子の発現を抑制する。しかしながら哺乳類の疾患治療において、ウイルスベクターの安全性には不明確な部分が残っている。

化学合成及びプラスミドベクターに組み込まれた siRNA は、細胞への導入効率や安定性を高めるために、ほとんどの場合キャリアー (遺伝子輸送担体) と複合体を形成させて用いられる。非ウイルスベクターは、キャリアーの工夫により導入効率や生体内での安定性の向上、標的組織の選択性の向上など様々な機能を持たせることが可能であり、キャリアーの開発は siRNA の DDS において極めて重要な部分を占めている。

## 3 遺伝子導入キャリアー

現在研究されているキャリアーには、様々なものがある。一般的には数十～数百ナノメートルの大きさを持つため、ナノパーティクルと呼ばれている (図 1)。代表的なキャリアーを構造的な違いで分類すると以下ようになる。

**リボソーム**：生体膜を形成するリン脂質や中性脂質等からなる 2 分子膜構造の閉鎖小胞。siRNA との複合体には、①電荷を利用したカチオン性リポソーム (表面修飾により正電荷を持たせることで、負電荷を持つ DNA や RNA とイオン結合により複合体を形成) や、②カプセル型 (脂質小胞内の水層または脂質層に DNA や RNA を内封) などがある。

**高分子ミセル**：親水性の構造と疎水性の構造からなるブロック共重合体とよばれる化合物が、水中で



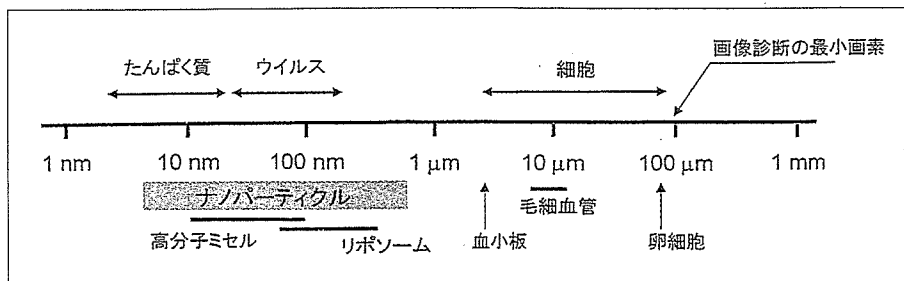


図1 ナノパーティクルの大きさ

自律的に会合することによって形成される、ミセル構造(外側に親水性の部分、内側に疎水性の部分を持つ球状の集合体)の複合体。複合体の構造は、単量体の性質に依存し、機能的な複合体をデザインすることが可能である。

その他のナノパーティクル：ゼラチンやコラーゲンなどのタンパク質は、他のタンパク質やペプチド等で容易に修飾でき、siRNA と約 200 nm の粒子を形成させることが可能である。その他、細胞への導入効率を高めるためにウイルスの外殻タンパク質を利用したナノパーティクルなど発想は多様であり、血中滞留性をはじめとした様々な機能を付加したものも得られている。

これらキャリアーのなかで、リポソームは最も古くから使われてきたキャリアーである。我々は、以前より遺伝子導入用リポソームの開発研究を行ってきたが、なかでも Cetyl-PEI を用いたポリカチオンリポソーム(図2)は、血清中での安定性及び細胞への遺伝子導入効率に優れている。<sup>2)</sup> このリポソームは、siRNA の導入においても良好な結果が得られている。

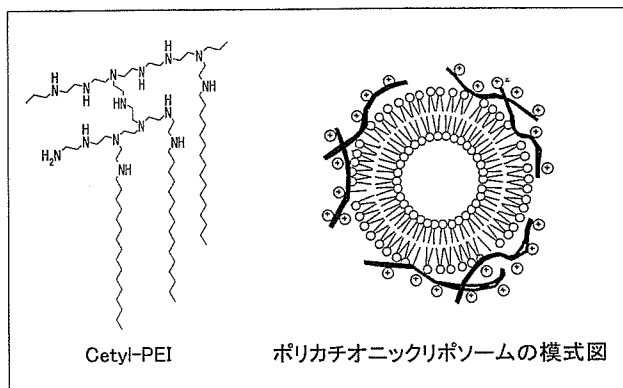


図2 Cetyl-PEI とカチオニックリポソーム

#### 4 生体内での siRNA に対する障壁と DDS による対策

siRNA 医薬品の DDS には、血中で不安定な siRNA を目的の細胞に効率よく運び、標的の mRNA を特異的に分解させるという複数の機能を持たせることがポイントとなってくる。当然のことながら siRNA で治療を行う場合、疾患によって用いられ方は異なる。局所投与での治療が可能な疾患では、現時点の DDS のレベルでは局所投与の方が有利であり、実際にヒトでの開発も先行している。しかしながら局所投与で対応できない疾患も多数あり、局所投与と全身投与の双方から DDS の研究を進めていかなければならない。siRNA の全身性の投与時には、考慮しなくてはならない幾つかの点が知られている。

##### 1. 糸球体濾過と臓器での捕捉

分子量約 13,000 の siRNA 単体は、糸球体で濾過されて腎臓より速やかに排泄されてしまう。糸球体濾過を回避するには、分子量としては約 7 万以上、粒子サイズでは 5 nm 以上が要求される。siRNA 用キャリアーは、siRNA との複合体を形成し、キャリアーの大きさを調節することで糸球体濾過を回避することが可能である。

毛細血管には、70~100 nm の小孔が多数空いている有窓性毛細血管と称される血管がある。肝臓の類洞血管などは小孔がやや大きく、約 100 nm 以下のサイズのものは、小孔を通じて肝細胞に到達する。

逆に粒子径にして 200 nm 以上の大きさを持つ薬物キャリアーは、静脈内投与されると肝臓や脾臓に代表される細網内皮系(reticuloendothelial systems; RES)に捕獲されることが知られている。<sup>3)</sup>

リポソームは大き過ぎても、小さ過ぎてもよくなく 100 nm 前後が動的に優れている。

リポソーム研究の成果から、表面を機能性分子により修飾することで RES による捕獲を回避するための方法が開発されている。赤血球の研究より、 $G_{M1}$  などのシアル酸含有糖脂質でリポソームを修飾することで肝臓への分布が抑制され、血中滞留性が上がることが報告された。我々は、シアル酸含有糖脂質と構造的に類似したグルクロン酸脂質誘導体 (PGlcUA) を合成し、リポソームの血中滞留性の向上に有効であることを報告した。<sup>4)</sup> その後に、水溶性高分子であるポリエチレングリコール、デキストランやポリグリセロールの脂質誘導体による修飾でも高い血中滞留性を有することが次々に報告された。

これらの薬物動態学や DDS 研究の知見から、適切なサイズを持ち、表面を修飾することで体内動態を改善できる siRNA キャリアーが設計できる (図 3)。

## 2. 血液中での安定性

化学合成 siRNA は血中で RNA 分解酵素 (RNase) により、急速に分解されてしまう。RNase による分解を避けるには、siRNA 自身の化学的修飾やキャリアーとの複合体形成などの方法で安定性を高める方法がある。

## 3. 標的細胞への取り込みと RNAi 効果

細胞への取り込み：細胞膜は膜タンパク質や糖脂質などを含む脂質二重膜構造を持つ。siRNA が細胞内で機能するためには、まず細胞膜のバリアを超

えて細胞質に入る必要がある。細胞内への取り込まれ方は、受動輸送や能動輸送など様々である。キャリアー表面を標的細胞と親和性の高い低分子化合物、ペプチド、糖鎖、タンパク質、アプタマー、抗体などで修飾することで特定の細胞への取り込みを高める手法が研究されている。<sup>5)</sup>

細胞内輸送：細胞に取り込まれた siRNA は、細胞質でタンパク質との複合体 (RNA-induced silencing complex; RISC) を形成し、標的とする mRNA を分解することで遺伝子の発現を抑制する。したがって、キャリアーにより導入された化学合成 siRNA は、細胞質でキャリアーから離れる必要がある。

ベクター型の siRNA は、細胞膜、核膜を超えて核に輸送された後に転写され、細胞質に輸送される。効率よく siRNA 前駆体を転写させるためには効率のよい核内への輸送が必要である。一般的に、siRNA やベクター DNA とキャリアーとの静電的結合が強固であればあるほど細胞質での解離も困難であり、siRNA 効果が減弱すると考えられる (図 4)。

## 5 siRNA 医薬品の DDS 戦略

現在、研究開発が進められている siRNA 医薬品のなかから、主なものを疾患と DDS (剤型、投与経路など) を関連づけて紹介する。

### 1. 局所投与 (Local administration)

眼疾患：眼内投与：加齢性黄斑変性 (age-related macular degeneration; AMD) は、高齢者の罹患率が高く、欧米では失明の主要な原因の 1 つに挙げられる。AMD は、その特徴から萎縮型 (約 85~90%) と滲出型 (約 10~15%) の 2 種類のタイプに分類される。滲出型では、網膜の中心付近の黄斑に異常な血管新生が起こり、不完全な血管からの血液の滲出が原因となり、視覚を障害する。この血管形成には VEGF とその受容体 (VEGF receptor; VEGFR) の関与が知られている。

既に米国で 2 社 (Acuity 社<sup>6)</sup> の Bevasiranib/VEGF-siRNA と、Sirna 社<sup>7)</sup> の Sirna-027/VEGFR 1-siRNA) が臨床試験を行っている。投与は、眼内へ直接注入する方法がとられている。眼内は非常に閉鎖的な空

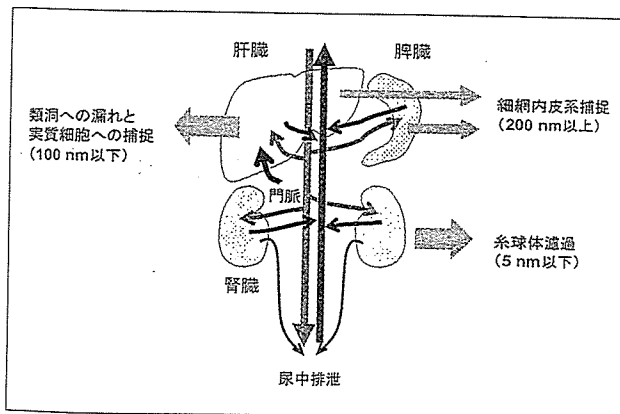


図 3 siRNA の体内動態を大きく左右する臓器

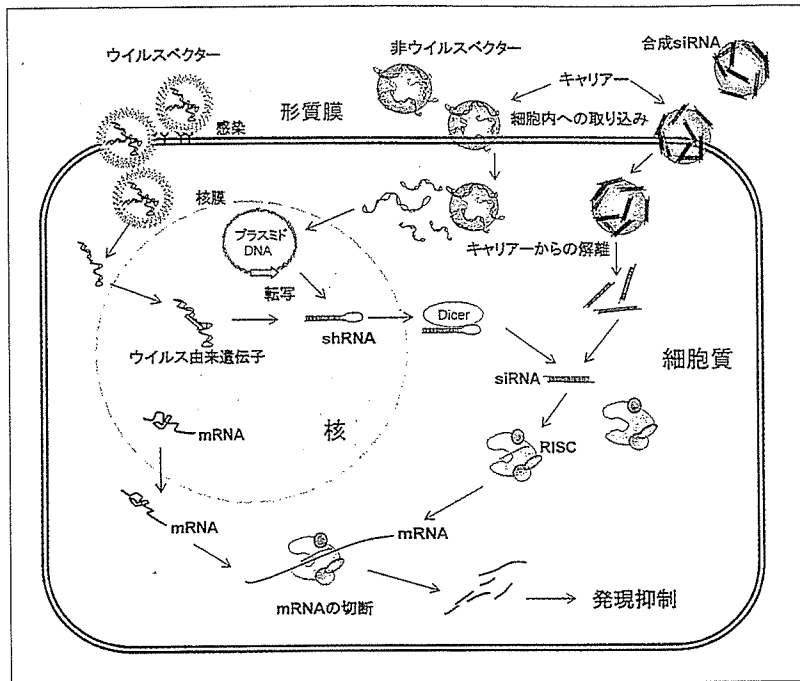


図4 標的細胞への取り込みとRNAi効果

間であり、重篤な全身性の副作用も現時点ではみられていないとされている。

**呼吸器疾患(肺)：**吸入及び鼻内噴霧等呼吸器合胞体ウイルス(respiratory syncytial virus；RSV)感染症は、重症の細気管支炎につながる幼児の感染症として知られる。幼児や高齢者において有効な治療法がなく、唯一の治療薬は抗体医薬品「シナジス(Synagis)」である。米 Alnylam 社<sup>9)</sup>は、鼻内噴射製剤 ALN-RSV 01(化学的に修飾した siRNA)の開発を行っている。RSV の遺伝子に対する siRNA であるため、もともと生体内にある遺伝子の抑制にもとづく副作用が理論的には回避できることや、RSV が呼吸器に感染するウイルスで鼻内噴霧により直接標的臓器である肺に送達できるなどの DDS 上の利点があることから、感染症に対する初めての siRNA 製剤として臨床試験が行われている(図 5 A)。

その他の呼吸器疾患では、喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)治療薬の開発も進められている。喘息は主に気道における炎症が原因であり、吸入による気管や気管支への送達は比較的容易である。それと比較して COPD や肺感染症の治療では、siRNA を肺の隅々まで効果的に行き渡らせるために、粒子径や投与装置などに DDS 上の工夫が必要である。

他にも新型インフルエンザウイルス(H5N1型)や SARS コロナウイルスなど多くの重篤な呼吸器感染症に対する研究が行われている。

**遺伝性疾患及び神経変性疾患：**siRNA は、これまで有効な治療法がない難治性の疾患の治療において非常に期待されている。特に、先天性遺伝性疾患においては siRNA が直接的に疾患原因遺伝子を抑制できるため、根本的な治療効果が期待されている。しかしながら対象とする遺伝子と発現部位が明確であったとしても、siRNA 医薬品が実用化され一般的な治療法として確立されるためには、克服すべき多くの課題が残されている。

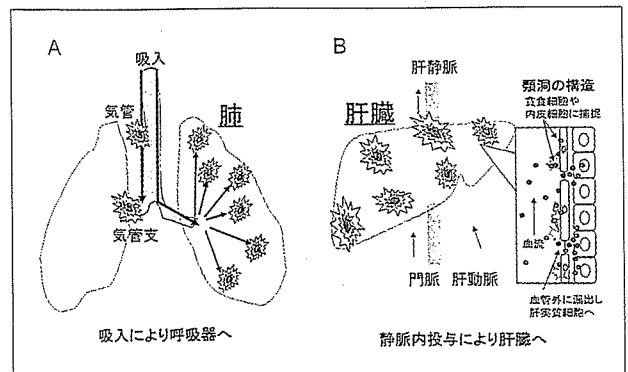


図5 肺・肝臓への DDS

a) 導入効率の問題：哺乳類における細胞間の siRNA の移行は確認されていないため、標的とする細胞 1 つ 1 つに siRNA を導入する必要がある。

b) RNAi 効果の維持：これらの疾患の多くは原因遺伝子により長い時間をかけて、疾患が進行していく。継続的な投与方法と長期の安全性を確立していく必要がある。

Sirna 社(ハンチントン病), Alnylam 社(嚢胞性線維症, パーキンソン病, ハンチントン病, 脊椎損傷), CytRx 社<sup>9)</sup>(筋萎縮性側索硬化症)などが積極的に研究を行っている。

**外用；除毛剤：***hairless gene* (HR) は、先天性の全身脱毛症の原因遺伝子として報告されている。Sirna 社は、HR に対する siRNA を用いた除毛剤の開発を試みている。塗布することで、毛穴から浸透し毛根の細胞に作用する。DDS では、製剤用の基質や標的細胞への導入効率を上げることにある。同社は、除毛剤の開発により siRNA の外用塗布薬としての有用性を確認した後に、他の皮膚疾患に応用していきたいとしている。

**体外での siRNA 導入：**エイズ関連性悪性リンパ腫は、HIV 感染者の約 10% で発症する。現在治療は自家血から造血幹細胞 (CD 34+ 細胞) を取り出し体外で培養増殖させ、化学療法後に再度患者に戻される方法がとられている。この治療の際、体内の HIV は完全には除去されていないため、戻した造血幹細胞に再び HIV が感染してしまう。Benitec 社<sup>10)</sup>は、複数の HIV に対する siRNA を体外で造血幹細胞に導入することで、治療後の HIV の再感染を抑制しようと試みている。この場合、siRNA の導入は体外で培養造血幹細胞に対して行われ、生体内に投与するものとは必要なプロファイルが異なる。これまでの *in vitro* のキャリアーの開発で集積された技術が活用される例である。

## 2. 全身性投与(Systemic administration)

一般的に薬剤の全身性投与 DDS において、肝臓は非常に大きな障壁となっている。組織重量も大きく、単球系の細胞による貪食能も高い。また類洞は血管外に漏れ易い構造となっている。この性質を逆に利用することで、肝臓に全身性の投与で薬物を集積させることが可能である。さらに、糖鎖やペプチ

ドなどで修飾することで肝臓に特異的に集積する DDS 技術も既に確立されている。このような理由で、肝臓は DDS 上全身性の投与に有利な臓器でもある。この点から肝臓を中心とした疾患標的は、siRNA の全身性投与の実用化に最も近いといえるかもしれない(図 5 B)。

**ウイルス性肝炎：**C 型肝炎ウイルス (HCV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染による肝炎治療のための siRNA 製剤の研究が行われている。Benitec 社は HVC に対するベクター型の siRNA を、Sirna 社は HVC, HVB に対する siRNA を、開発している。DDS 技術により投与量の大部分を肝臓に集積させることが可能であるが、ウイルス除去のために必要とされる長期間大量の暴露がヒトに及ぼす影響は慎重に観察する必要がある。

**高脂血症, 糖尿病：**高脂血症の治療薬として Alnylam 社は、アポリポrotein B (ApoB) に対する siRNA を、Sirna 社は、糖尿病の治療として PTP-1 B に対する siRNA を開発している。

ApoB は、主に肝臓及び小腸で発現しており、コレステロールの輸送や代謝に重要な超低密度リポタンパク質 (VLDL) や低密度リポタンパク質 (LDL) の構成に必須である。ApoB に対する siRNA を PEG 修飾したリポソームに内封し、カニクイザルに静脈内投与し、24 時間後から 10 日後まで血中の ApoB 及び LDL が低下することを確認している。

チロシン脱リン酸化酵素 PTP-1 B は、2 型糖尿病 (インシュリン非依存型糖尿病) におけるインシュリン抵抗性に重要な働きをしていると考えられている。PTP-1 B に対する化学的に修飾した siRNA を、PEG 修飾リポソームに内封した製剤を用いてマウスに静脈内投与し、肝臓での PTP-1 B の発現を 67% 抑制したとしている。

**悪性腫瘍：**がん細胞は正常細胞と異なる性質を多く持ち、siRNA を用いた治療候補になりうる多くの標的分子がある。siRNA の標的が、がん細胞特異的であるならば、全身に投与しても標的タンパク質の発現抑制に基づく副作用を回避することが可能である。様々な分子を標的とした研究が試みられているが、現在のところ低分子医薬品同様、siRNA の標的となるタンパク質の選択は難しい。現時点で

は、標的のバリデーション(がん化学療法剤による治療の標的として妥当な分子であるかの検証)にも siRNA の有用性が期待されている。

がんが成長する過程で新生血管の形成は重要な働きを果たすと考えられている。我々は、DDS により新生血管を選択的に傷害することで、より効果的な化学療法につながることを報告してきた。<sup>11)</sup> 新生血管はがんの種類に依存しないと考えられているため、理論的にはかなり多くのがんに対して有効であると考えられている。

Intradigm 社<sup>12)</sup>や Sirna 社は、VEGFR に対する siRNA を開発している。Intradigm 社の ICS-283 は、VEGFR 2 に対する siRNA である。ICS-283 は、自己会合性の高分子ミセルであり、siRNA を正電荷部位と結合してミセル内層に封入し、その外を PEG で保護している。外層表面には新生血管に選択的に結合するペプチドを修飾している。静脈内投与で腫瘍新生血管に集積し、血管新生を抑制することで抗腫瘍効果を期待している。

## 6

## 今後の展望

siRNA は、非常に魅力的な技術である。残念ながら siRNA を含めた核酸医薬品の開発は、欧米で先行している。しかしながら、現在先行して行われている siRNA の臨床試験や前臨床試験は、決して難しい発想に基づくものばかりではない。これらは DDS の面で完成されているわけではなく、改善できる点も多数残っている。全身性の投与においては、非常に特異的な臓器である肝臓を除いて組織選択的な DDS 技術は十分には確立されていない。特異的な集積を示す DDS を開発したとの報告があっても、投与量の大部分を集める技術レベルにはない。

現時点で十分な治療法のない疾患における

siRNA 医薬品の効果と、既存の治療法を改善しようとする疾患での効果は、分けて評価する必要がある。siRNA を用いた治療結果の、他の治療法との比較による有用性の客観的な評価が求められる。

現在 siRNA 医薬品で承認されているものはまだないが、少数の成功例を皮切りに、研究開発のスピードは一層加速化されるであろう。それに付随してヒトでの症例数が増えることで予期せぬ副作用や問題点が浮上するかもしれない。我々は、浜松ホトニクス社と協力して、リポソーム製剤のポジトロン断層診断(PET)による *in vivo* での非侵襲的な動態解析を世界に先駆けて行った。<sup>13)</sup> このような手法を用いることで、PET を用いた薬物動態試験等が可能となり、siRNA 医薬品や新たなキャリアーの開発をサポートする有用なツールとなると考えている。

現在の DDS 技術は発展途上であり、今後も継続した DDS 研究が siRNA の可能性を最大限に引き出すために必要である。優れた siRNA 医薬品を 1 日も早く開発し、その結果、一人でも多くの人々に恩恵をもたらすことを切に願っている。

## 参考資料

- 1) Sayda M. *et al.*, *Nature*, 411, 494-498 (2001).
- 2) Matsuura M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1612(2), 136-144 (2003).
- 3) 秋吉一成, 辻井 薫監修, “リポソーム応用の新展開.” エヌ・ティイー・エス, 東京, 2005 年.
- 4) Namba Y. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1663-1666 (1990).
- 5) “ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開,” メディカルドゥ, 大阪, 2006 年, pp. 130-134.
- 6) Acuity Pharmaceuticals (<http://www.acuitypharma.com/>)
- 7) Sirna Therapeutic (<http://www.sirna.com/wt/page/index>)
- 8) Alnylam Pharmaceuticals (<http://www.alnylam.com/>)
- 9) CytRx Corporation (<http://www.cytrx.com/>)
- 10) Benitec Limited (<http://www.benitec.com/>)
- 11) Shimizu K. *et al.*, *Expert Opin. Ther. Targets*, 9, 63-76 (2005).
- 12) Intradigm Corporation (<http://www.intradigm.com/>)
- 13) Oku N. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90 (1995).



## Adult T-Cell Leukemia in a Liver Transplant Recipient That Did Not Progress after Onset of Graft Rejection

Shinsuke Suzuki,<sup>a</sup> Kimiharu Uozumi,<sup>c</sup> Masahiko Maeda,<sup>b</sup> Yoshiko Yamasuji,<sup>b</sup> Shin-ichi Hashimoto,<sup>b</sup> Yasuji Komorizono,<sup>d</sup> Satsuki Owatari,<sup>a</sup> Masahito Tokunaga,<sup>a</sup> Kouichi Haraguchi,<sup>a</sup> Naomichi Arima<sup>c</sup>

*Departments of <sup>a</sup>Haematology and Immunology, and <sup>b</sup>Gastroenterology, Kagoshima University Hospital; <sup>c</sup>Division of Host Response, Center for Chronic Viral Diseases, Faculty of Medicine, Kagoshima University; <sup>d</sup>Nanpu Hospital, Kagoshima, Japan*

Received October 28, 2005; received in revised form February 15, 2006; accepted February 23, 2006

### Abstract

A liver allograft recipient developed acute-type adult T-cell leukemia (ATL) during tacrolimus treatment, 2 years after undergoing transplantation for subacute fulminant hepatitis. Both donor and recipient were asymptomatic carriers of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I), but the ATL cells originated from the recipient. Tacrolimus treatment was discontinued, and combination chemotherapy was administered. The patient achieved complete remission, but the transplanted liver was acutely and chronically rejected. The patient did not respond to rescue therapy with tacrolimus, prednisolone, and mycophenolate mofetil and died of hepatic failure. Liver biopsies showed CD4<sup>+</sup> ATL cell infiltration at the onset of ATL but not at the terminal stage. Moreover, Southern blotting revealed clonal integration of HTLV-I into the host genome of lymphoma cells at onset but not at the terminal stage. ATL after liver transplantation has not been previously described. The clinical course of the posttransplantational ATL was atypical, because it did not progress after the onset of rejection.

*Int J Hematol.* 2006;83:429-432. doi: 10.1532/IJH97.05158

©2006 The Japanese Society of Hematology

**Key words:** ATL; Liver transplantation; Rejection

### 1. Introduction

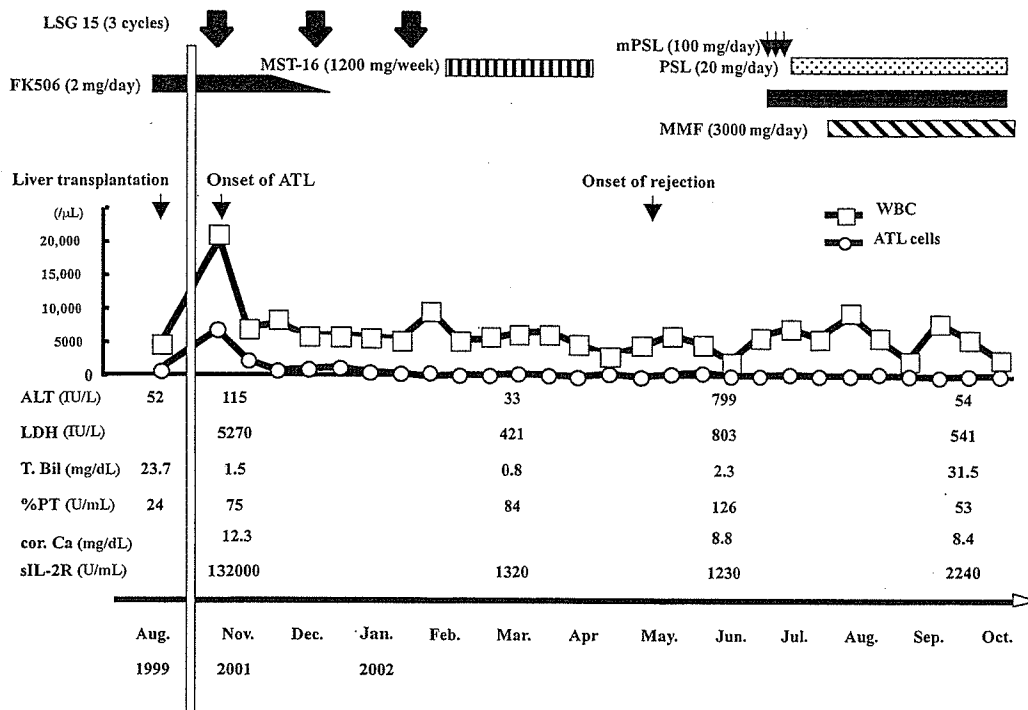
Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is etiologically associated with adult T-cell leukemia (ATL), but the mechanisms of leukemogenesis are not fully understood. ATL consists of 4 clinical subtypes (smoldering, chronic, lymphoma, and acute) [1]. Although smoldering and chronic ATL have mild clinical courses that do not require intensive chemotherapy, the outcomes of chemotherapy for acute and lymphoma ATL remain poor [2,3]. Posttransplantation lymphoproliferative disorders (PTLD) develop after solid organ and bone marrow transplantation [4-6]. Such disorders generally differ from malignant lymphomas in terms of histopathologic findings, increased extranodal involvement, a more aggressive clinical course, poorer response to conventional therapies, and poorer outcomes. Withdrawal of

immunosuppression has been recommended as the first step in the treatment of PTLT [7,8]. PTLT are predominantly of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas and occasionally of T-cell lymphomas [9-11]. Some ATL cases have been associated with kidney transplantation in Canada [12], Japan [13,14], the Caribbean [15], and Europe [16]. To date, no case associated with liver transplantation has been reported. We describe the first reported case of ATL that developed after liver transplantation. The patient died of hepatic failure after acute cellular and chronic rejection of the liver. However, even though chemotherapy was not given for 6 months after rejection, the ATL did not progress.

### 2. Case Report

Figure 1 shows the clinical course of our patient. In August 1999, a 47-year-old man with subacute fulminant hepatitis of unknown etiology underwent transplantation of a liver donated by his sister, who had an identical class 1 haplotype. Both the donor and recipient were asymptomatic carriers of HTLV-I. Results of tests for hepatitis C virus antibody and hepatitis B surface antigen were negative. To

Correspondence and reprint requests: Shinsuke Suzuki, Department of Haematology and Immunology, Kagoshima University Hospital, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8520, Japan; 81-99-275-5326; fax: 81-99-264-3504 (e-mail: suzuki2@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp).



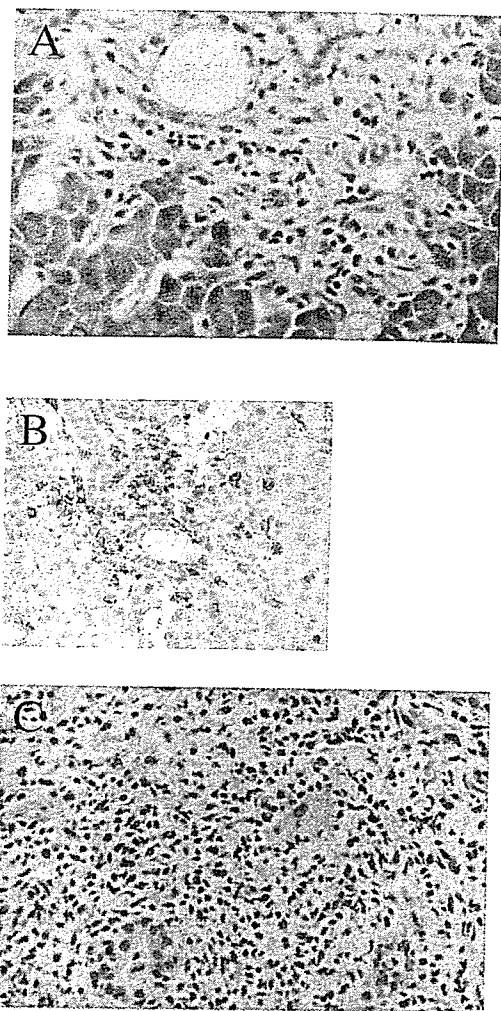
**Figure 1.** Clinical course of the patient from transplantation to death. LSG15 indicates granulocyte colony-stimulating factor-supported combination chemotherapy for ATL [3]; MST-16, sobuzoxane; FK506, tacrolimus; mPSL, methylprednisolone; PSL, prednisolone; MMF, mycophenolate mofetil; WBC, white blood cells; ATL, adult T-cell leukemia; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; T. Bil, total bilirubin; %PT, % prothrombin time; cor. Ca, corrected calcium; sIL-2R, soluble interleukin 2 receptor.

prevent graft rejection after liver transplantation, we used tacrolimus (trough concentration, 10-15 ng/mL) and short-term methylprednisolone. The dosage was decreased gradually, and the patient was immunosuppressed with tacrolimus (1 mg twice daily) as a maintenance therapy. In August 2001, swelling in the right cervical lymph node was observed, and hepatosplenomegaly developed in October 2001. Laboratory findings revealed the following: white blood cells,  $21,640/\mu\text{L}$ ; atypical lymphocytes and ATL cells characterized by an irregular nuclear contour circulating in the peripheral blood (Figure 2); platelets,  $7.5 \times 10^9/\text{L}$ ; red blood cells,  $462 \times 10^9/\text{L}$ ; lactate dehydrogenase, 5270 U/L; corrected calcium concentration, 12.3 mg/dL; soluble interleukin 2 receptor,  $13.2 \times 10^4$  U/mL; and serum trough level of tacrolimus, 1.8 ng/mL. The immunophenotype of the lymphoid cells was CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>, T-cell receptor  $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ )<sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>-</sup>, and HLA-DR<sup>+</sup>; this phenotype was consistent with that of ATL cells [1]. The patient's diagnosis was acute-type ATL. We could not detect any period of smoldering or chronic ATL. Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of the sex chromosomes was possible in 97.2% of 537 peripheral blood lymphocytes, which comprised XY (58.7%) and XYY (38.5%) karyotypes; no XX cells were detected. The unusually high proportion (38.5%) of tetraploid cells was taken to reflect the presence of a sizeable tumor cell population. These results proved that the ATL cells originated from the male recipient. Chromosomal analysis of peripheral blood lymphocytes was not successful because no metaphase cells were obtained.

Three cycles of combined chemotherapy (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone, ranimustine, carboplatin, etoposide, and vindesine) following the LSG15 protocol [3] and sobuzoxane maintenance therapy administered after stopping immunosuppressive therapy resulted in complete remission. However, acute cellular and chronic rejection of the liver occurred in June 2002. The patient was unresponsive to tacrolimus, prednisolone, and mycophenolate mofetil as rescue therapy and died of liver failure in



**Figure 2.** Staining of leukemia cells in the peripheral blood. Medium to large cells with highly indented nuclei containing condensed chromatin and some nucleoli and with agranular and basophilic cytoplasm (May-Grünwald/Giemsa, original magnification  $\times 600$ ).

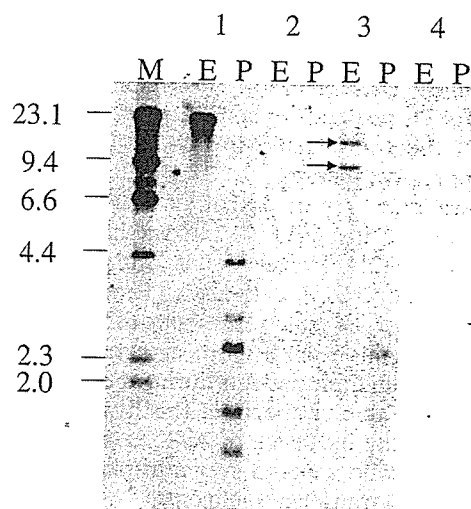


**Figure 3.** Hematoxylin and eosin staining of liver biopsy on diagnosis (A) and at the terminal stage (C) and immunoperoxidase staining with antibody specific for CD4 (B) (original magnification,  $\times 200$ ). Abnormal lymphocytes infiltrated the portal area at diagnosis (A), and immunoperoxidase staining reveals these lymphocytes to be CD4<sup>+</sup> (B). The loss of small bile ducts from the portal area is consistent with chronic ductopenic rejection at the terminal stage (C).

October 2002 (Figure 1). A liver biopsy at the onset of ATL revealed infiltrating abnormal lymphocytes (Figure 3A) with the CD4<sup>+</sup> immunophenotype (Figure 3B). A liver biopsy at the terminal stage showed degenerative changes in the interlobular bile duct that were consistent with chronic ductopenic rejection (Figure 3C). Moreover, Southern blotting revealed 2 clonal bands present in the host genome of peripheral blood lymphocytes at onset, but not at the terminal stage (Figure 4). For 6 months after the onset of rejection and in the absence of chemotherapy, the ATL did not progress.

### 3. Discussion

To our knowledge, this patient represents the first reported instance of ATL developing following liver trans-



**Figure 4.** Restriction enzyme fragment profiles for peripheral blood lymphocytes at disease onset and the terminal stage; fragments were hybridized with a human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) probe. Two clonal bands (arrows) were detected with *EcoRI* (lane 3E), which does not cut within the HTLV-I genome. Lane 1, positive control; lane 2, negative control; lane 3, sample taken at onset; lane 4, sample taken at the terminal stage. E indicates sample digested with *EcoRI*; P, sample digested with *PstI*. DNA size markers (M) are indicated in kilobases.

plantation. Some reports have described ATL associated with kidney transplantation [12-16], and many reports have described B-cell lymphoma [4-6]. The similarity in clinical course and mechanism of ATL leukemogenesis in our patient to those of PTLD of B-cell lineage highlights several important considerations, including whether the cancer responds to withdrawal of immunosuppression or rejection of the liver and whether liver transplants are associated with a higher incidence of ATL than renal transplants. The origin of the ATL cells should be determined if both the donor and recipient are HTLV-I carriers. It is important to understand the clonality of the ATL cells, because PTLD incorporates polyclonal and monoclonal proliferations [17].

Acute-type ATL is highly aggressive, with a median survival time of less than 1 year [2,3]. Moreover, Tsai et al reported that an elevated lactate dehydrogenase ratio, organ dysfunction, and multiorgan involvement by Epstein-Barr virus-associated PTLD were independent prognostic factors for a lack of response to a reduction in immunosuppression [18]. However, our patient, despite all these factors, achieved complete remission after the reduction in immunosuppression and chemotherapy. Although we restarted immunosuppression as a rescue therapy against chronic rejection of the liver, the ATL did not progress in the absence of chemotherapy for 6 months after the onset of rejection. Clonal integration of HTLV-I into the host genome was not proved to have occurred in peripheral blood lymphocytes at the terminal stage (Figure 4). A graft-versus-leukemia effect after withdrawal of immunosuppression develops in some ATL patients who undergo allogeneic hematopoietic stem cell



transplantation [19,20]. Although we cannot discount the possibility that our patient achieved a complete remission with combined chemotherapy, this finding supports the notion that ATL responds to activation of the immune system against the transplanted liver after the reduction of immunosuppressive therapy.

Nakamura et al reported that of 120 renal-transplant recipients, none of the 6 HTLV-1 carriers that were reviewed developed ATL [21]. However, the risk of lymphoma is approximately doubled in patients who receive liver transplants, compared with renal transplants [22]. This increased risk probably results from a more aggressive immunosuppression strategy in these patients during the first year to prevent graft failure due to rejection. This hypothesis supports the notion that the incidence of ATL development among HTLV-I carriers who undergo liver transplantation is higher than among renal transplant recipients.

Although a few cases of donor-derived PTLD have been reported [23,24], the FISH study of the sex chromosomes revealed that the recipient was the origin of the ATL cells. Polyclonal proliferation is common in PTLD [17]. However, as shown in Figure 4, proliferation of monoclonal ATL with integration of 2 HTLV-I genomes, which is common in ATL [25], is strongly suspected because the densities of the 2 bands were similar in this case.

In conclusion, our patient developed acute-type ATL following liver transplantation. The origin of the ATL cells was from the recipient, even though both donor and recipient were HTLV-I carriers. The clinical course of ATL in our patient was atypical, supporting the notion that ATL responds to activation of the immune system against the transplanted liver.

## Acknowledgments

This study was supported by a grant-in-aid for Cancer Research from the Ministry of Welfare (Grant 14S-1). We thank Dr. Y. Soejima (Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan) for performing the liver transplantation. We also thank Dr. R. A. F. Macleod (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Department of Cell Cultures, Braunschweig, Germany) for critically reading this manuscript.

## References

- Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma: a report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol.* 1991;79:428-437.
- Hanada S, Utsunomiya A, Suzuki S, Uozumi K, Makino T, Arima T. Treatment for adult T-cell leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40(suppl):S47-S50.
- Yamada Y, Tomonaga M, Fukuda H, et al. A new G-CSF-supported combination chemotherapy, LSG15, for adult T-cell leukaemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study 9303. *Br J Haematol.* 2001;113:375-382.
- Frizzera G, Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, et al. Polymorphic diffuse B-cell hyperplasias and lymphomas in renal transplant recipients. *Cancer Res.* 1981;41:4262-4279.
- Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, Frizzera G, et al. Epstein-Barr virus (EBV) induced polyclonal and monoclonal B-cell lymphoproliferative diseases occurring after renal transplantation: clinical, pathologic, and virologic findings and implications for therapy. *Ann Surg.* 1983;198:356-369.
- Nalesnik MA, Makowka L, Starzl TE. The diagnosis and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Curr Probl Surg.* 1988;25:367-472.
- Morrison VA, Dunn DL, Manivel JC, Gajl-Peczalska KJ, Peterson BA. Clinical characteristics of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Med.* 1994;97:14-24.
- Nalesnik MA. Clinicopathologic characteristics of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Recent Results Cancer Res.* 2002; 159:9-18.
- van Gorp J, Doornwaard H, Verdonck LF, Klopping C, Vos PF, van den Tweel JG. Posttransplant T-cell lymphoma: report of three cases and a review of the literature. *Cancer.* 1994;73:3064-3072.
- Hanson MN, Morrison VA, Peterson BA, et al. Posttransplant T-cell lymphoproliferative disorders: an aggressive, late complication of solid-organ transplantation. *Blood.* 1996;88:3626-3633.
- Gentile TC, Hadlock KG, Uner AH, et al. Large granular lymphocyte leukaemia occurring after renal transplantation. *Br J Haematol.* 1998;101:507-512.
- Zanke BW, Rush DN, Jeffery JR, Israels LG. HTLV-1 T cell lymphoma in a cyclosporine-treated renal transplant patient. *Transplantation.* 1989;48:695-697.
- Tsurumi H, Tani K, Tsuruta T, et al. Adult T-cell leukemia developing during immunosuppressive treatment in a renal transplant recipient. *Am J Hematol.* 1992;41:292-294.
- Hoshida Y, Li T, Dong Z, et al. Lymphoproliferative disorders in renal transplant patients in Japan. *Int J Cancer.* 2001;91:869-875.
- Williams NP, Buchner LM, Shah DJ, Williams W. Adult T-cell leukemia/lymphoma in a renal transplant recipient: an opportunistic occurrence. *Am J Nephrol.* 1994;14:226-229.
- Jenks PJ, Barrett WY, Raftery MJ, et al. Development of human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma during immunosuppressive treatment following renal transplantation. *Clin Infect Dis.* 1995;21:992-993.
- Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, et al. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood.* 1995;85:552-565.
- Tsai DE, Hardy CL, Tomaszewski JE, et al. Reduction in immunosuppression as initial therapy for posttransplant lymphoproliferative disorder: analysis of prognostic variables and long-term follow-up of 42 adult patients. *Transplantation.* 2001;71:1076-1088.
- Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, et al. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res.* 2004;64:391-399.
- Okamura J, Utsunomiya A, Tanosaki R, et al. Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 2005;105:4143-4145.
- Nakamura N, Tamaru S, Ohshima K, Tanaka M, Arakaki Y, Miyauchi T. Prognosis of HTLV-I-positive renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005;37:1779-1782.
- Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant.* 2004;4: 222-230.
- Spiro IJ, Yandell DW, Li C, et al. Brief report: lymphoma of donor origin occurring in the porta hepatis of a transplanted liver. *N Engl J Med.* 1993;329:27-29.
- Lones MA, Lopez-Terrada D, Weiss LM, Shintaku IP, Said JW. Donor origin of posttransplant lymphoproliferative disorder localized to a liver allograft: demonstration by fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med.* 1997;121:701-706.
- Kamihira S, Sugahara K, Tsuruda K, et al. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clin Lab Haematol.* 2005;27:235-241.

# Reduced Frequency, Diversity, and Function of Human T Cell Leukemia Virus Type 1-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell in Adult T Cell Leukemia Patients<sup>1</sup>

Tomohiro Kozako,\* Naomichi Arima,<sup>2\*</sup> Shingo Toji,<sup>†1</sup> Izumi Masamoto,\* Masaki Akimoto,\* Heiichiro Hamada,<sup>‡</sup> Xiao-Fang Che,<sup>§</sup> Hiroshi Fujiwara,<sup>‡</sup> Kakushi Matsushita,<sup>‡</sup> Masahito Tokunaga,\* Koichi Haraguchi,\* Kimiharu Uozumi,\* Susumu Suzuki,<sup>†</sup> Toshiro Takezaki,<sup>†</sup> and Shunro Sonoda<sup>†</sup>

Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CTL are thought to be immune effectors that reduce the risk of adult T cell leukemia (ATL). However, in vivo conditions of anti-HTLV-1 CTL before and after ATL development have yet to be determined. To characterize anti-HTLV-1 CTL in asymptomatic HTLV-1 carriers (AC) and ATL patients, we analyzed the frequency and diversity of HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells in PBMC of 35 AC and 32 ATL patients using 16 distinct epitopes of HTLV-1 Tax or Env/HLA tetramers along with intracellular cytolytic effector molecules (IFN- $\gamma$ , perforin, and granzyme B). Overall frequency of subjects possessing Tax-specific CD8<sup>+</sup> T cells was significantly lower in ATL than AC (53 vs 90%;  $p = 0.001$ ), whereas the difference in Env-specific CD8<sup>+</sup> T cells was not statistically significant. AC possessed Tax<sub>11-19</sub>/HLA-A\*0201-specific tetramer<sup>+</sup> cells by 90% and Tax<sub>301-309</sub>/HLA-A\*2402-specific tetramer<sup>+</sup> cells by 92%. Some AC recognized more than one epitope. In contrast, ATL recognized only Tax<sub>11-19</sub> with HLA-A\*0201 and Tax<sub>301-309</sub> with HLA-A\*2402 at frequencies of 30 and 55%. There were also significant differences in percentage of cells binding Tax<sub>11-19</sub>/HLA-A\*0201 and Tax<sub>301-309</sub>/HLA-A\*2402 tetramers between AC and ATL. Anti-HTLV-1 Tax CD8<sup>+</sup> T cells in AC and ATL produced IFN- $\gamma$  in response to Tax. In contrast, perforin and granzyme B expression in anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> T cells of ATL was significant lower than that of AC. Frequency of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T cells in AC was related to proviral load in HLA-A\*0201. These results suggest that decreased frequency, diversity, and function of anti-HTLV-1 Tax CD8<sup>+</sup> T cell clones may be one of the risks of ATL development. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 5718–5726.

Adult T cell leukemia (ATL)<sup>3</sup> is caused by infection with human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) (1–3), a retrovirus infecting ~10–15 million people worldwide, in southern Japan, the Caribbean basin, South America, Melanesia, and equatorial Africa (4). More than 800 cases of ATL are diagnosed each year in Japan (5). Although there has been recent progress in chemotherapy for ATL, with the LSG15 protocol showing an overall 5-year survival rate of 17.5% (6), the prognosis of ATL is still poor. The recent report of successful, sustained complete remission of ATL by hemopoietic stem cell

transplantation led to the hypothesis that immunocompetency reconstructed by stem cell transplantation may regenerate cytotoxic immune effectors against HTLV-1-transformed T cell and related tumor Ags, and then induce a graft-vs-leukemia reaction in ATL patients (7, 8).

HTLV-1-specific CTL plays an important role in suppressing proliferation of HTLV-1-infected or -transformed T cells in vitro (9–12) and thus may prevent development of ATL (13, 14). Because ATL develops in ~2% of people infected with HTLV-1 after a long latent period (15), it is possible that CTL fails in only a fraction of HTLV-1 carriers with a specific immunogenetic background (16–18). Previously, we identified HTLV-1 Tax epitopes recognized by HLA class I molecules using PMBC of asymptomatic HTLV-1 carriers (AC) in vitro and reported that the frequencies of HLA alleles lacking epitope anchor motifs, HLA-A\*26, HLA-B\*4002, HL-B\*4006, and HLA-B\*4801, were higher in ATL patients than in AC. These findings suggested that insufficient generation of CTL allowed outgrowth of HTLV-1-transformed cells in the host (19). Indeed, ATL patients produced anti-Tax CD8<sup>+</sup> T cell in short-term cultivation, although their IFN- $\gamma$  production was insufficient (14). These findings suggested a key role of anti-HTLV-1 Tax CTL in prevention of ATL leukemogenesis.

The chromium-51 (<sup>51</sup>Cr) release assay and the calcein acetoxyethyl fluorescence assay are the most widely used methods for estimating CD8<sup>+</sup> CTL (19–23). However, these assays are not suitable for mass screening of clinical samples because they are time-consuming. In addition, these assays do not reflect the in vivo status because they require short-term culture. Infected or leukemic cells easily produce HTLV-1 Tax protein as rapidly as within

\*Division of Host Response, Center for Chronic Viral Diseases, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University; <sup>†</sup>International Island and Community Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University; <sup>‡</sup>Department of Hematology and Immunology, Kagoshima University Hospital, and <sup>§</sup>Department of Molecular Oncology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Japan; and <sup>1</sup>Medical and Biological Laboratories, Co., Ltd, Nagoya, Japan

Received for publication April 19, 2006. Accepted for publication July 28, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup>This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Area for Cancer Research (122198232 and 12218104) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

<sup>2</sup>Address correspondence and reprint requests to Dr. Naomichi Arima, Division of Host Response, Center for Chronic Viral Diseases, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan. E-mail address: nao@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

<sup>3</sup>Abbreviations used in this paper: ATL, adult T cell leukemia; HTLV-1, human T cell lymphotropic virus type 1; AC, asymptomatic HTLV-1 carrier; 7-AAD, 7-amino-actinomycin D.

a few hours in culture (12, 24–26). Flow cytometric assay with HLA tetramers in combination with intracellular IFN- $\gamma$ , perforin, and granzyme B, which play important and diverse roles in controlling many viral infections (27, 28), is useful because of its simplicity, specificity, and sensitivity in detection of Ag-specific CTL in PBMC in vivo or in vitro (29–31).

In the present study, we developed 14 HTLV-1/HLA tetramers to detect anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> CTL clones. To characterize the in vivo status of anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> CTL in AC and ATL patients, we analyzed clonal frequency, diversity, and function of anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> CTL in freshly isolated PBMC by examining the 16 distinct HTLV-1/HLA tetramers with HLA-A\*0201 and HLA-A\*2402 in combination with functional CTL assay for intracellular molecules relevant to cytolytic effector function. We found that frequency, diversity, and function of HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell are significantly reduced in ATL.

## Materials and Methods

### Subjects

The study subjects included 35 AC (22–82 years old; mean, 60.0; male:female, 15:20) and 32 ATL (27–85 years old; mean, 61.2; male:female, 14:18), all of whom were recruited from Kagoshima University Hospital located in southern Kyushu, Japan. All subjects came to the hospital for examination of HTLV-1 infection and clinical checkup. They were examined by standard serological testing for HTLV-1 and hematological examinations for ATL. Those patients positive for HTLV-1 serology but with no clinical symptoms of ATL (32) or other HTLV-1-related diseases (33) were designated as AC. Diagnosis of ATL was made according to Shimoyama's criteria (32). We tested PBMC of all ATL patients before treatment. All subjects were inhabitants of Kagoshima prefecture, southern Kyushu, Japan, where ATL is endemic. All subjects signed an informed consent to participate in the present study and to allow review of their medical records, and gave a sample of peripheral blood for HLA typing and HLA tetramer assay. The study protocol was reviewed and approved by the Medical Ethical Committee of Kagoshima University. By HLA typing, 88% of the HTLV-1-infected subjects (AC and ATL combined) were shown to have HLA-A\*02 or HLA-A\*24. HLA allele types were representative of the population of Southern Kyushu (34). Of the 35 AC, 10 had HLA-A\*0201, 24 had HLA-A\*2402, 3 had both alleles in heterozygous combination, and 4 included as negative controls had neither HLA-A\*0201 nor HLA-A\*2402. Of the 32 ATL patients, 10 had HLA-A\*0201, 22 had HLA-A\*2402, 4 had both alleles in heterozygous combination, and 4 included as negative controls had neither HLA-A\*0201 nor HLA-A\*2402.

### Preparation of PBMC

PBMC were obtained from peripheral blood by separating on Ficoll Hypaque (Amersham Biosciences) density gradient centrifugation at 400  $\times$  g for 30 min, followed by washing three times with 1% FCS RPMI 1640 at 200  $\times$  g centrifugation for 10 min to remove residual platelets. The fresh PBMC were used for tetramer assay and in vitro expansion of anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> CTL. The remaining PBMC were cryopreserved in liquid nitrogen until examination as described previously (35).

### HLA typing of PBMC

Subjects positive for HLA-A\*02 and A\*24 were screened by serological staining with mAbs for HLA-A\*02 supertype (clone BB7.2) and HLA-A\*24 supertype (clone 17A10) (Medical and Biological Laboratories), followed by secondary staining with goat anti-mouse IgG-FITC (Immuno-tech) according to the manufacturer's instruction and subjected to flow cytometry on a FACScan (BD Biosciences). HLA allele types were determined by the PCR-sequence-specific oligonucleotide probes protocols with the Luminex 100 xMAP flow cytometry dual-laser system method using high m.w. DNA isolated from the cryopreserved PBMC as described (G&G Science) (36). Briefly, amplification was as follows: target DNA was PCR-amplified using 5'-biotin-labeled primers that are highly specific to certain sequences of HLA genes. Hybridization was as follows: after denaturation at 95°C, amplified DNA was allowed to hybridize to complementary DNA probes coupled to microbeads. Streptavidin-PE reaction was as follows: the hybridized PCR product on the oligobeads was labeled with streptavidin-PE. Measurement was as follows: Luminex apparatus identified the fluorescent intensity of PE on each coded oligobead that has hybridized with the biotin-labeled PCR product. Genosearch typing soft-

ware (G&G Science) assisted in determining the HLA genotype (alleles) of the sample DNA.

### Preparation of HTLV-1 Tax, Env/HLA tetramers

A total of 16 distinct HTLV-1/HLA tetramers were used in the present study (Table I). We originally developed 14 distinct PE-conjugated HLA-A\*0201 and HLA-A\*2402 tetramers for four Tax and three Env peptides. These Tax and Env peptides were selected based on our own published data of CTL epitope mapping for HTLV-1 Tax and Env peptides in vitro (19). Two additional HTLV-1/HLA tetramers for Tax peptides were purchased from Beckman Coulter. We and Beckman Coulter developed tetramers by the same procedure. HLA tetramers were produced as described previously (37, 38). Briefly, recombinant  $\beta_2$ -microglobulin and the extracellular portion of the HLA class I H chain containing the BirA recognition sequence in frame at its C terminus were expressed in *Escherichia coli* as insoluble aggregates that formed inclusion bodies. Purified inclusion bodies were solubilized in urea, and monomeric peptide-HLA class I complexes were refolded around peptides by dilution denaturing conditions. After buffer exchange, a specific lysine residue in the H chain C-terminal tag was biotinylated with the BirA enzyme. Monomeric complexes were purified by monomeric avidin gel chromatography (Pierce). Tetrameric arrays of biotinylated peptide-HLA class I complexes were formed by the addition of PE-labeled streptavidin (Prozyme) at a molar ratio of 4:1. The purity of each 16 HLA tetramer was tested by HPLC and its binding affinity was evaluated from the BIMAS score at Medical and Biological Laboratories.

### Detection of anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> T cells in PBMC using tetramer

The procedure was slightly changed from Haanen et al. (39) and Skinner et al. (40). We used Alexa Fluor 488-labeled anti-CD8 mAbs and Alexa Fluor 647-labeled mouse-anti-PE mAbs following PE-labeled HTLV-1/HLA tetramer because these dyes provide resistance to photobleaching. Briefly, the PBMC were incubated with PE-labeled HTLV-1/HLA tetramer (20  $\mu$ g/ml) with normal goat serum for 50 min at 4°C in the dark. The PBMC were washed with PBS, and then incubated with Alexa Fluor 488-labeled anti-CD8 mAbs (6  $\mu$ g/ml; Caltag Laboratories) and Alexa Fluor 647-labeled mouse-anti-PE mAbs (20  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich), which was produced using Alexa Fluor 647 mAbs Labeling kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's manuals, for 50 min at 4°C in the dark. Finally, the PBMC were washed three times, and then mounted to slides with 10  $\mu$ l of ProLong Gold (Molecular Probes). Stained PBMC were visualized using an OLYMPUS IX81 confocal microscope.

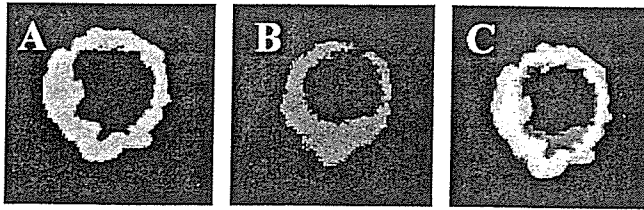
### HTLV-1 Tax, Env/HLA tetramer assay

Aliquots of  $1 \times 10^6$  freshly isolated PBMC or cultured cells were incubated with the HTLV-1/HLA tetramers with each of the 16 distinct HTLV-1 Tax or Env peptides for 45 min at 4°C, followed by staining with FITC-conjugated murine anti-human CD8 mAbs (Beckman Coulter) and anti-CD45-PerCP (BD Biosciences) for 45 min at 4°C according to the manufacturer's instructions (Medical and Biological Laboratories). Aliquots of  $1 \times 10^5$  fresh CD45-positive lymphocytes were performed using

Table I. HTLV-1 Tax, Env/HLA tetramers<sup>a</sup>

Tetramers	HLA Allele	HTLV-1 Peptide	Epitopes
T11	A*0201	Tax <sub>11-19</sub>	LLFGYPVVV
T123	A*0201	Tax <sub>123-131</sub>	TLGQHLPTL
T155	A*0201	Tax <sub>155-163</sub>	YLYQLSPPI
T178	A*0201	Tax <sub>178-186</sub>	QLGAFLTNV
T307	A*0201	Tax <sub>307-315</sub>	LLFEYVTNI
E175	A*0201	Env <sub>175-183</sub>	FLNTEPSQL
E239	A*0201	Env <sub>239-247</sub>	VLYSPNVSV
E442	A*0201	Env <sub>442-450</sub>	ALQTGITLV
T12	A*2402	Tax <sub>12-20</sub>	LFYGPVVVF
T187	A*2402	Tax <sub>187-195</sub>	PYKRIEELL
T289	A*2402	Tax <sub>289-297</sub>	SFLLSHGLI
T301	A*2402	Tax <sub>301-309</sub>	SFHSLLHLF
T311	A*2402	Tax <sub>311-319</sub>	EYTNIPISL
E11	A*2402	Env <sub>11-19</sub>	FFQFCPLIF
E21	A*2402	Env <sub>21-29</sub>	DYSPSCCTL
E153	A*2402	Env <sub>153-161</sub>	HFSKCGPFF

<sup>a</sup> HLA binding peptide anchor motifs are shown in bold.



**FIGURE 1.** Ex vivo detection of anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> T cell. Freshly isolated PBMC were stained with FITC-labeled anti-CD8 mAbs (A) and Alexa 647-labeled anti-PE mAbs in combination with PE-labeled HTLV-1/HLA tetramer (B). C, Colored overlay of A and B.

FACScan (BD Biosciences) (41) and analyzed with FlowJo software (Tree Star) (28). In the cultured PBMC samples, apoptotic or necrotic cells in the cultures were stained with 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter) (42), and the 7-AAD-positive cells were excluded by FACScan analysis. HIV/HLA tetramer (Medical and Biological Laboratories) for negative and CMV/HLA tetramer (Beckman Coulter) were also stained.

#### Real-time PCR quantification of HTLV-1 proviral load in PBMC

DNA was extracted from  $1 \times 10^6$  cells of PBMC using SMI TEST EX-R&D (G&G Science). The HTLV-1 proviral load in PBMC was assayed in 64 of 67 subjects by methods of quantitative PCR using a Light Cycler System (Roche Diagnostics) by intraassay using a series of duplicate measurements of 12 test samples with standard DNA of four different dilutions for each assay as described previously (43). In brief, the duplicate intraassay for HTLV-1 provirus load in PBMC was run by simultaneous measurements of  $\beta$ -globin DNA and HTLV-1 DNA using the standard DNA,  $\beta$ -globin DNA from Roche Diagnostics, and HTLV-1 provirus DNA from MT-2 cells. One PBMC has two copies of  $\beta$ -globin gene (equivalent to 6 pg of  $\beta$ -globin DNA) and one MT-2 cell has eight copies of HTLV-1 provirus DNA (equivalent to 6 pg of HTLV-1 in DNA). The  $\beta$ -globin PCR primer and probe sets were commercial kits (Roche Diagnostics). The HTLV-1 primer set corresponded to the highly conserved HTLV-1 pX region, SK43 and SK44. The HTLV-1 pX probe set was designed by ourselves for the two adjacent parts of the pX region, which were labeled with different fluorophores according to the manufacturer's instructions. The HTLV-1 provirus load was expressed as number of copies per  $10^3$  cells using the following formula: HTLV-1 provirus load = ((HTLV-1 pX copy number)/( $\beta$ -globin copy number/2))  $\times 10^3$ . The detection limit of this method was 0.2 copies of HTLV-1 provirus/ $10^3$  cells.

#### Induction of HTLV-1 Tax, Env-specific CTL

Aliquots of PBMC ( $1 \times 10^6$  cells) were used for in vitro expansion of CD8<sup>+</sup> CTL clones in cultures with  $2 \times 10^{-6}$  M of distinct HTLV-1 Tax and Env peptides in RPMI 1640 medium supplemented with the following reagents: 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 0.1 mM nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM 2-ME, 50 U/ml recombinant human IL-2, and 10% heat-inactivated FCS (RPMI 1640-CM). All culture conditions were the same as described elsewhere (41). The cultured PBMC were examined using the HTLV-1/HLA tetramer assay described above.

#### Intracellular IFN- $\gamma$ , perforin, and granzyme B assay

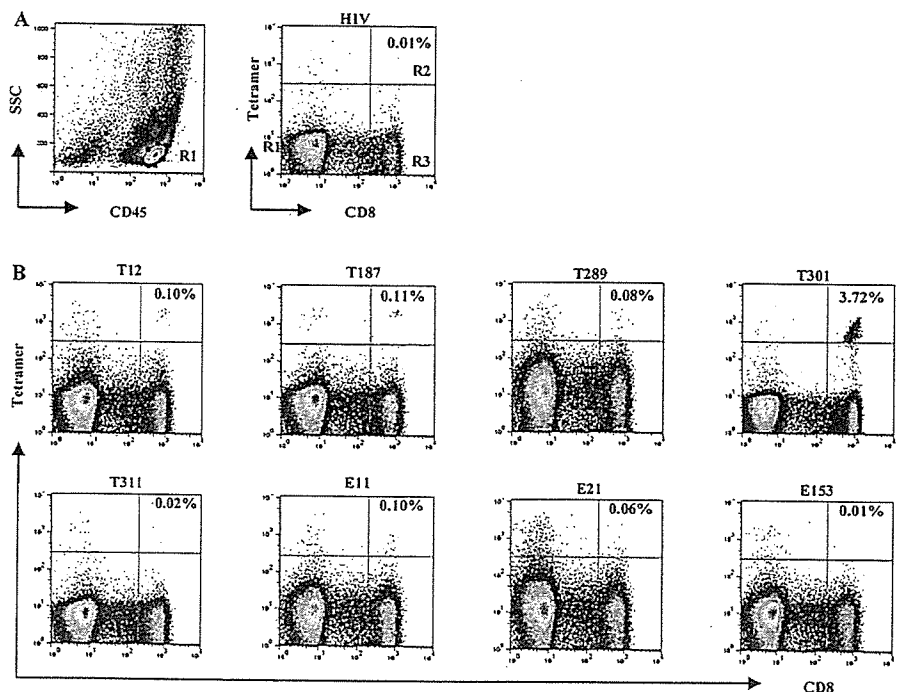
PBMC ( $1 \times 10^6$ ) for IFN- $\gamma$  analysis were cultured for 16 h with or without 0.02  $\mu$ M HTLV-1 Tax peptide in combination with brefeldin A (BD Biosciences) in RPMI 1640-CM. Harvested cells for IFN- $\gamma$  and freshly isolated PBMC for perforin and granzyme B were labeled with HTLV-1/HLA-tetramer-PE and anti-CD8-allophycocyanin Ab (BD Biosciences) for cell surface Ags (44). The cells were further treated with Permeabilizing Solution (BD Biosciences) for 10 min. After washing with buffer containing 0.1% saponin, the cells were incubated with anti-human IFN- $\gamma$ -FITC, perforin-FITC, or granzyme B-FITC Ab (BD Biosciences) in buffer containing saponin. FastImmune Control  $\gamma$ 2aFITC/ $\gamma$ 1PE was stained as negative control (BD Biosciences). Aliquots of  $1 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were performed using FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software.

#### CD107a mobilization assay

PBMC ( $1 \times 10^6$ ) were cultured for 6 h with or without 0.02  $\mu$ M HTLV-1 Tax peptide in combination with anti-CD107a mAbs-FITC (Southern Biotech) and the secretion inhibitor monensin (BD Biosciences) in RPMI 1640-CM (45, 46). Following incubation, cell suspensions were washed with cold PBS. The cells were further stained with tetramer-PE and anti-CD8 mAb-PE-Cy5 (Beckman Coulter) as described above. Aliquots of  $1 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were performed using FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software.

#### Statistical analysis

Differences in HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell frequency between AC and ATL patients were evaluated by  $\chi^2$  test or exact test. The Mann-Whitney *U* test was used to compare the percentages of cells binding tetramer<sup>+</sup> or tetramer<sup>+</sup>intracellular cytokine<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> lymphocytes between subjects with AC and ATL, between the proviral load of Tax-tetramer positive AC



**FIGURE 2.** Variety of anti-HTLV-1 CD8<sup>+</sup> T cells in fresh PBMC. A, Tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were estimated in CD45<sup>+</sup> T lymphocyte region (R1). We observed HIV-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells as negative control. B, Fresh PBMC isolated from AC were stained with eight distinct HTLV-1/HLA-A\*2402-tetramers (T12, T187, T289, T301, T311, E11, E21, and E153). Numbers in the upper right quadrants represent the percentages of tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> T lymphocytes (R2/R2+R3).