

博士論文

論文題目 慢性期の HIV 感染者で生じる免疫系の変化の研究

氏名 佐藤秀憲

論文のタイトル：慢性期の HIV 感染者で生じる免疫系の変化の研究

所属：東京大学大学院医学系研究科内科学専攻生体防御感染症学

指導教員：岩本愛吉教授，四柳宏准教授

申請者名：佐藤秀憲

目次	3
----	---

略語一覧	5
------	---

はじめに	7
------	---

第一部 HIV 感染者の CD8 陽性 Naive T 細胞では OX40 の異常な発現を認め、それは

免疫老化と関連がある	11
------------	----

要旨	12
----	----

序文	13
----	----

材料と方法	18
-------	----

結果	24
----	----

考察	56
----	----

第二部 有効な ART が導入された HIV 感染者において prematurely terminated short

HIV-1 transcripts は、T 細胞の持続的な免疫活性化に相関する	61
---	----

要旨	62
----	----

序論	63
材料と方法	72
結果	75
考察	83
まとめ	85
謝辞	88
引用文献	90

略語一覽

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APC	antigen presenting cell
ART	antiretroviral therapy
CM	central memory
CMV	cytomegalovirus
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CVD	cardio vasucular disease
DHHS	Department of Health and Human Services
ELISA	enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
EM	effector memory
FCS	fetal bovine serum
FMO	fluorescence-minus-one
HATs	histone acetyltransferases
HC	helthy control
HIV	human immunodeficiency virus
HRP	Horseradish peroxidase
ICS	intracellular cytokine staining
KO	knock out
MHC	major histocompatibility complex
N	naïve

NCDs	Non-communicable diseases
NF- κ B	nuclear factor κ B
NFAT	nuclear factor of activated T cells
OD	optical density
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death-1
PHA	phytohaemagglutinin
PI	phosphatidyl inositol
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTE	recent thymic emigrants
STs	prematurely terminated short HIV-1 transcripts
SWI/SNF complex	SWI/SNF chromatin remodeling complex
TCR	T cell receptor
TEMRA	T effector memory reexpressing CD45RA
TG	transgenic
TMB	tetramethylbenzidine
TNFRSF	tumor necrosis factor receptor superfamily
TSCM	memory stem T cells
VL	viral load
WT	wild type

はじめに

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症は、レトロウイルス科レンチウイルス亜科に分類される HIV によるウイルス感染症である¹。未治療では予後不良で、ほとんどの HIV 感染者が数年から十数年の経過で後天性免疫不全症候群（AIDS）を発症し死亡する^{1,2}。2014 年末時点の全世界で 3690 万人の HIV 感染者が生存しており、2014 年の 1 年間に 200 万人が新規に HIV に感染したと推定されている³。先進国では 1990 年代後半に多剤併用の抗レトロウイルス療法（ART）が実用化・普及したことにより、HIV 感染者の予後は著しく改善した^{4,5}。

有効な ART により血漿中の HIV RNA 量（ウイルス量）が検出限界以下となり、CD4 陽性 T 細胞数（CD4 数）の回復した HIV 感染者は、細胞性免疫不全の一応の改善を得るため、AIDS による死亡は著しく減少する^{4,6,7}。しかし、体内の HIV を完全に排除することはできないため、生涯にわたり ART を継続する必要がある⁸。また、健常者と比較して動脈硬化^{9,10}、心血管疾患（CVD）¹¹⁻¹⁴、癌^{15,16}、腎機能障害¹⁷、慢性閉塞性肺疾患¹⁸、肝硬変¹⁹・肝細胞癌^{16,20}、骨塩量の低下²¹、認知機能の障害²²、フレイル²³などの Non-communicable diseases（NCDs）の罹患率が高く、平均余命も短いことが予想されている^{24,25}。原因として、残存する HIV⁸、ART の副作用^{26,27}、喫煙²⁸などの生活習慣、ウイルス性肝炎の合併^{20,29}、ART により HIV 感染症が慢性疾患となっ

た³⁰ことによる患者の高齢化，などが考えられるが，それらに加え，免疫系の持続的な活性化・老化が注目されている³¹。

HIV 感染症の主な病態は，細胞性免疫不全であるが，同時に持続的な免疫活性化が存在し³²，HIV 感染症自体の増悪³³や NCDs の発症・増悪に関与していると考えられる。HIV 感染者においては，(1) HIV 感染に対する免疫応答³⁴，(2) HIV タンパク質が免疫応答を介さずタンパク質の機能として免疫担当細胞を活性化する³⁵，(3) regulatory T 細胞の絶対数の減少³⁶，(4) HIV 感染早期に腸管壁バリアが傷害されることによる持続的な Microbial translocation^{37,38}，(5) 細胞性免疫不全から日和見感染症 (OI) の発症やサイトメガロウイルス (CMV) 再活性化³⁹など，が免疫担当細胞を活性化させ，炎症性サイトカインの増生や免疫担当細胞の細胞増殖を経て，持続的な免疫活性化を引き起こしていると考えられる。近年，NCDs における免疫系の重要性が示されている⁴⁰⁻⁴²が，HIV 感染者においても持続的な免疫活性化は，全死亡^{34,38,43}，CD4 数の回復が悪いこと³³や動脈硬化⁴⁴，などとの関連が示されている。更に，これらの病態が持続することで免疫系は老化すると考えられる。

慢性期の HIV 感染者の免疫研究において，HIV 感染者で見出される免疫の変化が，高齢者における加齢の免疫への影響と類似していることが指摘され，免疫系の老化 (免疫老化) として注目されている。HIV 感染者の免疫老化は，CD57 陽性 CD8 陽性

T 細胞の増加⁴⁵、Naive T 細胞比率の低下⁴⁶、CD4/8 比の低下⁴⁷、などをマーカーとして定量することが可能で、免疫老化が高度な患者は、ワクチンの効果の低下⁴⁸、全死亡の増加⁴⁷など、老化に関連したイベントと関連を示唆されている。しかし、疫学レベルでの研究が多く、その分子的な機序は明らかでない。

現状、実際の HIV 診療の現場で、持続的な免疫活性化・老化に対して唯一有効な介入は、早期の ART 導入のみである^{33,49-51}。2015 年 4 月に改定された米国保健福祉省の『Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents』

(DHHS の HIV 治療ガイドライン) で、「ART によりウイルスが抑制されているにも関わらず、持続する炎症 (原題 : Poor CD4 Cell Recovery and Persistent Inflammation Despite Viral Suppression)」と題された新章が追加された⁵²。新章では、ART によりウイルスが抑制されている症例で発生する AIDS 死亡や非 AIDS 死亡を予測する因子としての持続的な免疫活性化の存在は認めつつも、免疫活性化を軽減することを目的とした ART レジメンの変更や免疫標的治療 (immunologically targeted intervention) は「強く非推奨」としている。また、有効な介入がないことを理由に免疫活性化のモニタリングさえ「強く非推奨」としている。

故に、免疫系の持続的な活性化・老化を基礎医学的なアプローチにより解析し、有効な ART が継続されている HIV 感染者の予後改善につながる介入を見い出すことが

できれば、臨床応用へと繋がるテーマである。

以上の背景より、HIV 感染者の臨床検体を用いて、免疫系の持続的な活性化・老化を、T 細胞に注目して研究することを目指した。

第 1 部では、T 細胞の活性化や生存に重要な共刺激分子である OX40 に注目し、HIV 感染者では、本来 OX40 発現が低い CD8 陽性 Naive T 細胞で高発現となり、OX40 発現と個体の免疫老化が有意に相関を示すことを見出した。

第 2 部では、有効な ART により血漿中のウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者において、不完全なプロウイルスの転写がおきており、それが T 細胞の持続的な免疫活性化に関与していることを示した。

第 1 部

HIV 感染者の CD8 陽性 Naive T 細胞では OX40 の異常な発現を

認め、

それは免疫老化と関連がある

要旨

HIV 感染者で認める T 細胞の異常の一部は、健常高齢者で観察されるものと類似しており、免疫老化と呼ばれる。免疫老化の分子的な機序は明らかでない。また、HIV 感染症との関わりで、共刺激分子 OX40 の知見は少ない。

本研究で、HIV 感染者における OX40 の意味について模索し、最終的に、HIV 感染者では本来は OX40 発現が低い CD8 陽性 Naive T 細胞で OX40 陽性頻度が高値となっていることが明らかとなった (図 12)。また、その異常な OX40 発現と免疫老化のマーカであるサブセット分布の異常は相関を示すことを見出した (図 14)。

この結果は、CD8 陽性 Naive T 細胞における OX40 の異常発現は、免疫老化のマーカである、あるいは、原因の一部であることを示唆している。

序文

他の臓器と同様に免疫系も老化すると考えられる。HIV に感染していない高齢者（健常高齢者）の免疫系を若年者と比較した場合、(1) 造血幹細胞の機能異常⁵³、(2) 胸腺の退縮⁵⁴、(3) 末梢血中のナイーブ T 細胞の減少⁵⁵、(4) 分化段階の進んだ増殖能の乏しい CD28 陰性 T 細胞の増加^{56,57}、(5) IL-6 など炎症性サイトカインの増加⁵⁸、(6) CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の比率（CD4/8 比）の低下⁵⁶、(7) CMV の再活性化⁵⁹、などを認め、これらの程度が高い高齢者は全死亡^{58,60}やインフルエンザワクチン不応⁶¹、CVD⁵⁹などのリスクが高い。

HIV 感染者では持続的な免疫活性化が存在し、その一部は有効な ART により細胞性免疫が一応の回復を示した後も持続している。T 細胞に注目すると、免疫活性化が持続することは、(1) T 細胞の過剰な成熟、(2) 前駆細胞の枯渇、(3) T 細胞の機能不全、を引き起こす³¹。これらの T 細胞の異常は、健常高齢者で観察されるものと類似しており免疫老化（Immunosenescence）と呼ばれる。

CD4/8 陽性 T 細胞は、CD45RA や CCR7 などの表面分子をフローサイトメトリーを用いて解析することで分化段階に応じたサブセットに分画することが出来る⁶²。本研究では、CD45RA 陽性/CCR7 陽性のナイーブ T 細胞、CD45RA 陰性/CCR7 陽性の Central memory (CM) T 細胞、CD45RA 陰性/CCR7 陰性の Effector memory (EM) T 細胞、

CD45RA 陽性/CCR7 陰性の T effector memory reexpressing CD45RA (TEMRA), の 4 サブセットに分画した (図 1). ナイーブ T 細胞は抗原未接触で Effector 機能を持たないが, 高い増殖・分化能を持ち, 抗原刺激を経て CM, EM, TEMRA へと分化するに従って増殖・分能を失い Effector 機能を獲得していく. 分画に用いる分子に多少の多様性はあるが, この 4 サブセットは広く用いられている. CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率の低下は, CD57 陽性メモリー T 細胞の増加, CD4/8 比の低下, などと共に HIV 感染者の免疫老化のマーカーとして用いられており, 有効な ART が導入された HIV 感染者においてワクチン不応との関連が示されている⁴⁸ (図 2).

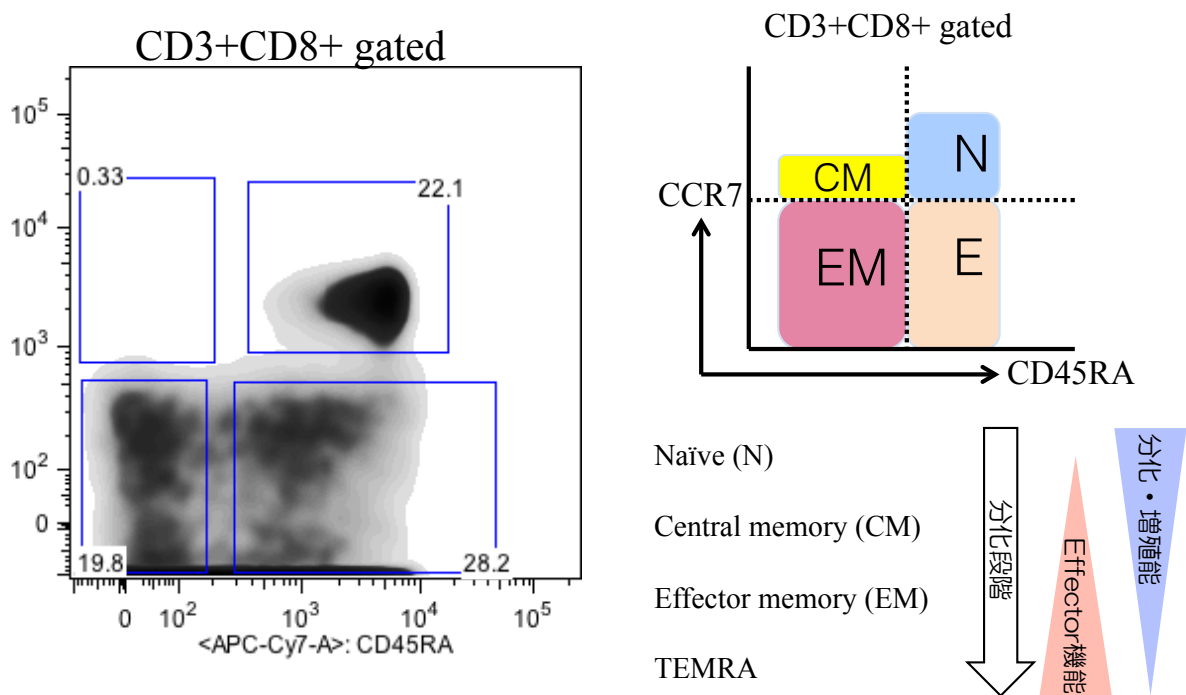


図1. フローサイトメータによる4サブセットへの分画
 分化段階によるT細胞サブセットはCD45RA, CCR7で同定した.
 文献⁶²を参考に申請者作成.

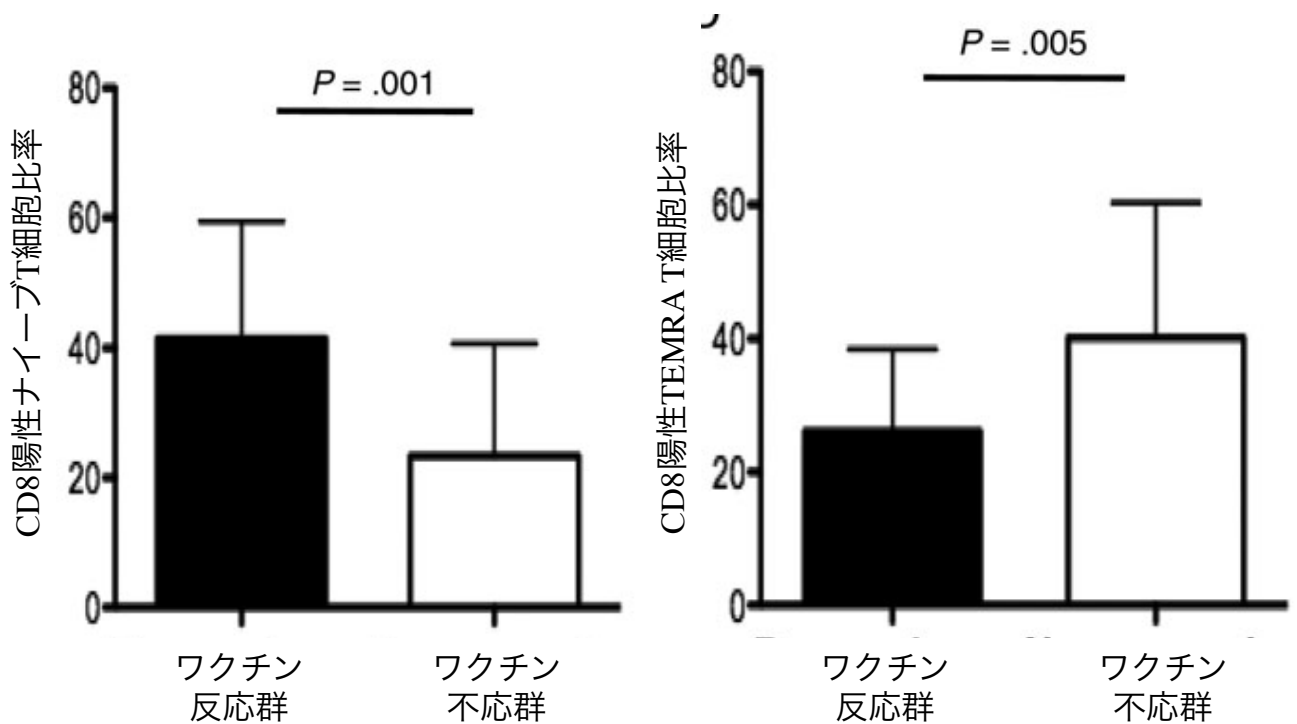


図2. CD8陽性ナイーブT細胞比率と新型インフルエンザワクチンへの不応 (引用文献⁴⁸よりラベルを追加した)

一般に、ナイーブ T 細胞をクローン増殖と分化させる活性化シグナルは、(1) ペプチド・主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 複合体と T 細胞受容体 (TCR) との相互作用 (TCR 刺激: シグナル 1), (2) 共刺激分子のシグナル (シグナル 2), (3) サイトカイン刺激 (シグナル 3), の 3 つが必要と考えられている⁶³。共刺激分子は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する CD28 が最も調べられている⁶³が、他にも増殖・分化を持続・修飾させる他の共刺激分子が知られている。

腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー (TNFRSF) に属する共刺激分子 OX40 は、活性化前のナイーブ T 細胞や休止期メモリー細胞では発現せず、TCR 刺激の 1~2 日後に一過性に発現し、抗原提示細胞 (APC) などに発現する OX40 リガンド (OX40L) と結合することで、活性化 T 細胞に共刺激シグナルを提供する⁶⁴。OX40 シグナルの作用は多岐にわたり、かつ研究途上であるが、(1) CD28 と同様に初感作の際の共刺激で Effector T 細胞の生存を増強する、(2) メモリー T 細胞の生成を増強する、(3) 末梢血管の内皮に発現する OX40L と結合することでメモリー T 細胞を再活性化する、(4) regulatory T 細胞を抑制する、(5) Th2 反応を増強する、(6) マスト細胞や血管内皮細胞に発現する OX40L を介して末梢の炎症を増強する、などが報告されている⁶⁵。機序として、OX40 の細胞内領域に Traf 2 が結合し、NF- κ B を介して T 細胞活性化を促進すること⁶⁶が知られているが、それで説明できる OX40 シグナルの作用は上

述の (1) (3) (6) のみであり, (2) などの機序は明らかでない.

HIV 感染症との関わりで, CD28 ファミリーに属する PD-1 や CTLA-4 など抑制性の表面分子は広く研究されている. しかし, OX40 の知見は少なく, 本研究では HIV 感染者の T 細胞における OX40 の役割について模索した. 最終的に, HIV 感染者で認める免疫老化と HIV 感染者における OX40 の異常発現との関連を見いだした.

HIV 感染者では, 本来 OX40 発現が低い CD8 陽性 Naive T 細胞で高発現となり, OX40 発現と個体の免疫老化が有意に相関を示すことを見出した.

材料と方法

HIV 感染者

東京大学医科学研究所附属病院外来に通院中の HIV 感染者で書面によるインフォームドコンセントが得られた患者を対象とした。この研究は東京大学医科学研究所（承認番号：20-47-210521）、および国立感染症研究所（承認番号：571）の倫理委員会の承認を得た。

患者検体を用いた全ての実験で、以下の条件で検体を収集した。全ての HIV 感染者由来の検体は、診断から 1 年以上経過した慢性期で、かつ、HIV 感染のリスク因子は同性間・異性間性交渉であり、血友病を含まない。未治療 HIV 感染者（未治療群）は、免疫系が完全に破綻した AIDS 期を避けるため、CD4 数 $300/\mu\text{l}$ 以上で収集した。更に、ウイルス量の免疫系への影響を層別できるようにウイルス量 5000copies/ml 以下の未治療低ウイルス群と、ウイルス量 25000copies/ml 以上の未治療高ウイルス群で収集した。有効な ART が導入された HIV 感染者（治療群）は、ART 導入より 1 年以上経過しており、ウイルス量が検出限界以下となったものを収集した。対照として HIV 非感染者（健常者）由来の検体を用いた。群間で年齢と CD4 数（健常者を除く）に有意差がつかないように調節し収集した。

末梢血単核球 (PBMC) の分離・保存と解凍

採取された末梢血は、同日中に 1500rpm, 20 分遠心後、血漿を分離し-80°Cで保存した。さらに血球成分から、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) による密度勾配遠心で、PBMC を分離し、洗浄後、液体窒素中で保存された。凍結 PBMC は、36°Cの温浴槽で解凍後に 10%非働化ウシ胎児血清, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 2mM L-グルタミン, 10mmol/L HEPES buffer (Sigma) を添加した Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) 培地に懸濁され, 37°C, 5%CO²で一晩培養後に実験に用いた。

PBMC の刺激と培養

PBMC は終濃度 5×10^5 cells/250 μ l で U 底 96 穴プレートに播種され, 刺激条件として未刺激, あるいは抗 CD3/CD28 抗体固相化ビーズ (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 ,Gibco) を添付文章の推奨濃度で添加し 37°C, 5%CO²のインキュベータで培養された。培養後, 1.5ml チューブに回収し, 培養上清は-80°C保存, PBMC は培地に再懸濁後, 専用の磁力を帯びた台に 2 分間静置し, 抗 CD3/CD28 抗体固相化ビーズを分離した上で上清を細胞とともに回収, 同日中にフローサイトメトリーで解析された。

抗体と死細胞染色, fluorescence-minus-one (FMO)コントロール

各実験のフローサイトメトリー (FCM) 解析は各々以下の蛍光抗体を用いた.

- HIV 感染者における OX40 発現を評価するための予備的な検討

CD3-PerCP (BioLegend), CD4-PE-CF594 (BD), CD8-Pacific Blue (BioLegend),
CD45RA-FITC (BioLegend), CCR7-PE-Cy7 (BioLegend), OX40-APC (BD),
CD25-APC-Cy7 (BD), CCR5-PE (BioLegend).

- 健常者 PBMC を用いた TCR 刺激による T 細胞のサブセット分化の検討

CD3-APC (BD), CD4-PE (BioLegend), CD8-Pacific Blue (BD), CD45RA-FITC
(BioLegend), CCR7-PE-Cy7 (BioLegend).

CD45RA と CCR7 の FMO コントロールを作成⁶⁷し, 比較して発現を評価した.

- HIV 感染者と健常者における CD8 陽性 T 細胞サブセット毎の OX40 発現と TCR 刺激による OX40 発現誘導

CD3-PE-CF594 (BD), CD8-PerCP (BioLegend), CD45RA-APC-Cy7 (BioLegend),
CCR7-PE-Cy7 (BioLegend), OX40-APC (BD), CD25-APC-Cy7 (BD), CD57-Pacific Blue
(BioLegend), PD-1-FITC (BioLegend).

ex vivo, TCR 刺激 48 時間後の各々で, 全表面分子の FMO コントロールを作成⁶⁷し,

比較して発現を評価した。

また、すべての実験で LIVE/DEAD Fixable Aqua stain fluorescence (Invitrogen)を利用して死細胞を同定した。

フローサイトメトリー

PBMC の分画と表面分子解析は、主に BD FACSAria cell sorter (Aria) (BD Bioscience) と一部を BD FCASCalibur HG (Calibur) (BD Bioscience) を用いて解析した。PBMC は染色前に FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec)で 4°C, 10 分処理された。刺激した PBMC は芽球化し表面分子発現の基準を設定するのが困難なため、最終的な患者検体の表面分子発現は fluorescence-minus-one (FMO) controls⁶⁷ と比較し解析した。Aria, Calibur から出力された FCS ファイルは FlowJo (version 8.8.7, Tree Star) で解析した。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

ケモカインの定量は DuoSetELISA Development System (R&D Systems) を用いた。Nunc イムノプレートマキシソープ (Thermo-Fisher Scientific) に各抗ケモカイン抗体を添付文章に記載されたそれぞれの濃度で 50 μ l/well ずつ添加し、室温、一晩で吸着させた。0.05% Tween-20/ Phosphate buffered saline (PBS), 300 μ l/well で 3 回洗浄後、

1% Bovine serum albumin (BSA) /PBS, 300 μ l/well, 室温, 1 時間でブロッキングした.

0.05% Tween-20/PBS, 300 μ l/well で 3 回洗浄後, 各サイトカインの希釈系列, および培養上清を 50 μ l/well ずつ添加し, 室温, 2 時間で反応させた. 0.05% Tween-20/PBS, 300 μ l/well で 3 回洗浄後, ビオチン化した各抗ケモカイン抗体を添付文章に記載されたそれぞれの濃度で 50 μ l/well ずつ添加し, 室温, 2 時間で吸着させた.

0.05% Tween-20/PBS, 300 μ l/well で 3 回洗浄後, Horseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジンを添加し, 室温, 20 分で反応させた. 0.05% Tween-20/PBS, 300 μ l/well で 3 回洗浄後, TMB substrate Kit (Bio-Rad Laboratories) に添付されている過酸化水素とテトラメチルベンジジン (TMB) を混和, 添加し, 遮光, 室温, 20 分で反応させた. 2 規定硫酸で反応を停止させ, プレトリーダーで 450nm の光学濃度 (OD 値) を測定した.

CMV 抗体価

CMV IgG 抗体価の測定は, CMV IgG ELISA Kit (Genesis Diagnostics) を用いた. 血漿は, 解凍後に 8000rpm, 5 分遠心して浮遊物を除去し, 添付の希釈液で 100 倍希釈した. 抗体がコートされている添付の 96 穴テストプレートに検体と標準血清を各々 200 μ l/well 添加し, 室温, 20 分で吸着させ, 3 回の洗浄の後, HRP 標識抗ヒト IgG 抗体

を添加し室温, 20 分で反応させた. 4 回の洗浄の後, 添付の TMB 基質を添加し室温, 10 分反応の後, プレトリーダーで 450nm の OD 値を測定した. Prism 6 (Graphpad Software) を用い, 標準血清より, 抗体価と OD 値の曲線近似を作成し, 検体の抗体価を算出した.

統計解析

相関は Spearman test, 2 群間差は Mann-Whitney U test, 多群間差は Kruskal-Wallis test, 二元配置分散分析は Friedman test を用い, Prism 6 (Graphpad Software) を使用した. 重回帰分析は JMP Pro 10.0 (SAS Institute Inc.) を使用した. 全ての検定で, 有意水準として $P = 0.05$ を用いた.

結果

HIV 感染者における OX40 発現を評価するための予備的な検討

HIV 感染者における OX40 は数例の報告を認めるのみで、発現の動態や T リンパ球サブセット毎の発現のデータは不明である。そこで、少数の患者と健常者由来の PBMC を用い予備的な検討実験を行った。本実験で用いた HIV 感染者とコントロールとして用いた HIV 非感染者（健常者）の背景を表 1 に示す。HIV 感染症と T 細胞における OX40 発現の関係を明らかにするため、病期に応じて、未治療高ウイルス群、未治療低ウイルス群、治療群、の 3 群に層別した。各群で CD4 数と年齢に有意差はない。また、臨床検体を用いた研究では、倫理的に検体の量に制限があるため一部の個体でタイムポイントが欠けている。

表 1. 本実験で用いた患者検体の背景

	群				群間差 p
	未治療群		治療群	健常者	
	高ウイルス群	低ウイルス群			
	n=9	n=8	n=8	n=8	
年齢	42.0	44.5	44.0	37.5	0.3126
性別(男性%)	7 (87.5)	8 (88.9)	6 (75)	8 (100)	
ウイルス量(copies/ml)	42000	1400	50		< 0.0001
CD4数(/ μ l)	364.0	422.0	480.5	-	0.6918
CD8数(/ μ l)	1359.0	847.5	828.0	-	0.0943
治療期間(月)	-	-	62.0	-	-
罹病期間(月)	40.0	37.5	79.0	-	0.0242

本実験では、未治療高ウイルス群 9 例、未治療低ウイルス群 8 例、治療群 8 例、健常者 8 例を使用した。

特に記載のない場合、数値は中央値で表記した。群間差は Kruskal-Wallis test で検定した。

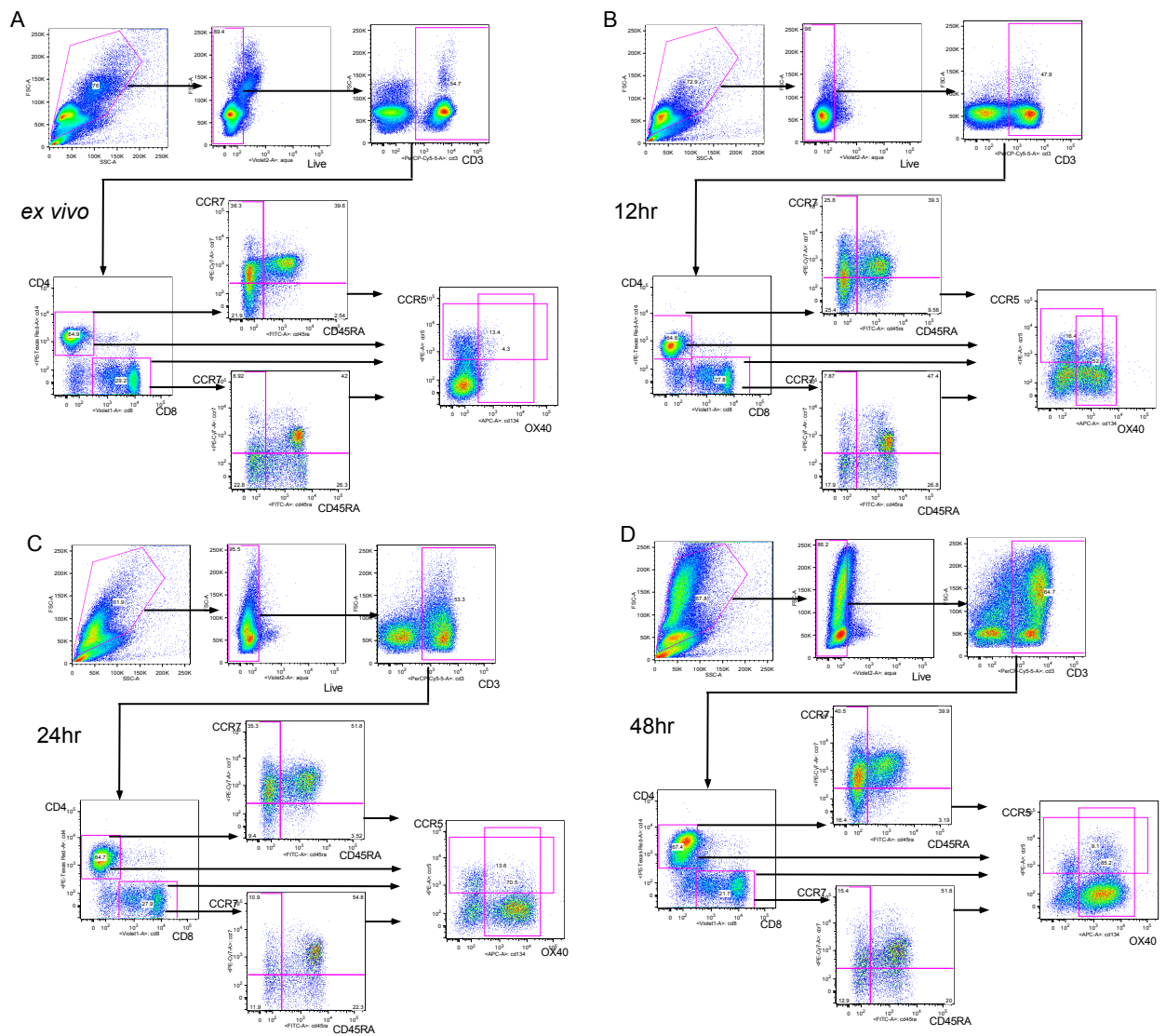


図 3. Gating strategy の 1 例

ex vivo (A), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 12 時間 (B), 24 時間 (C), 48 時間 (D) の健康者 1 例の FCM による表面分子解析の Gating strategy を示す。

OX40 は、活性化 T 細胞に発現するため広くリンパ球ゲートをかかけた後、死細胞除去、CD3 陽性を選択した。それを CD4/CD8 と CCR7/CD45RA で展開し、全 CD4/8 陽性細胞と CD4/8 陽性 T 細胞の 4 サブセットにおける OX40 発現を評価した。各タイムポイントにおいて、検体間、群間のゲーティングは共通である。

CD8 陽性 T 細胞における OX40 発現

ex vivo での異なる病期の HIV 感染者と健常者における CD8 陽性 T 細胞サブセット毎の OX40 陽性頻度を図 4A に示す. 未治療高ウイルス群は, 健常者と比較し, 全 CD8 陽性 T 細胞と 4 サブセット全てで OX40 陽性頻度が高かった (図 4A). 健常者では CD8 陽性ナイーブ T 細胞では OX40 の発現をほとんど認めなかったのに対し, 未治療 HIV 感染者では高ウイルス群, 低ウイルス群ともに異常な高発現を認め, それは有効な ART でも完全に回復していないことが示唆された.

OX40 は TCR 刺激により発現が誘導されることを特徴とするため, 抗 CD3/CD28 抗体による OX40 の発現誘導の群間比較を経時的に観察した. 抗 CD3/CD28 抗体存在下での培養開始時を 0 時間とし, 12 時間, 24 時間, 48 時間後の OX40 陽性頻度を図 4B-D に示す. また, CD8 陽性 T 細胞の各サブセット毎の OX40 陽性頻度を経時的にプロットしたものを図 5 に示す. TCR 刺激後 12 時間時点で全 CD8 陽性 T 細胞と 4 サブセットで OX40 発現が誘導され (図 5), CD8 陽性ナイーブ T 細胞を除き, *ex vivo* で観察された OX40 陽性頻度の群間差が消失する (図 4B). 24 時間から 48 時間で CD8 陽性ナイーブ T 細胞を除いた各サブセットで健常者の OX40 陽性頻度が患者群を上回った (図 4C, D). HIV 感染者では健常者と比較し *ex vivo* での OX40 発現は高いものの OX40 の発現誘導は低いことが示唆された (図 4, 5). CD8 陽性 T 細胞の各サブセ

ット毎の OX40 陽性頻度の経時的プロットでは, CD8 陽性 T 細胞の各サブセット毎の OX40 陽性頻度は TCR を介した刺激後, 経時的に上昇するが, 未治療高ウイルス群, 治療群では CD8 陽性 CM T 細胞で発現誘導が低いことが示唆された (図 5).

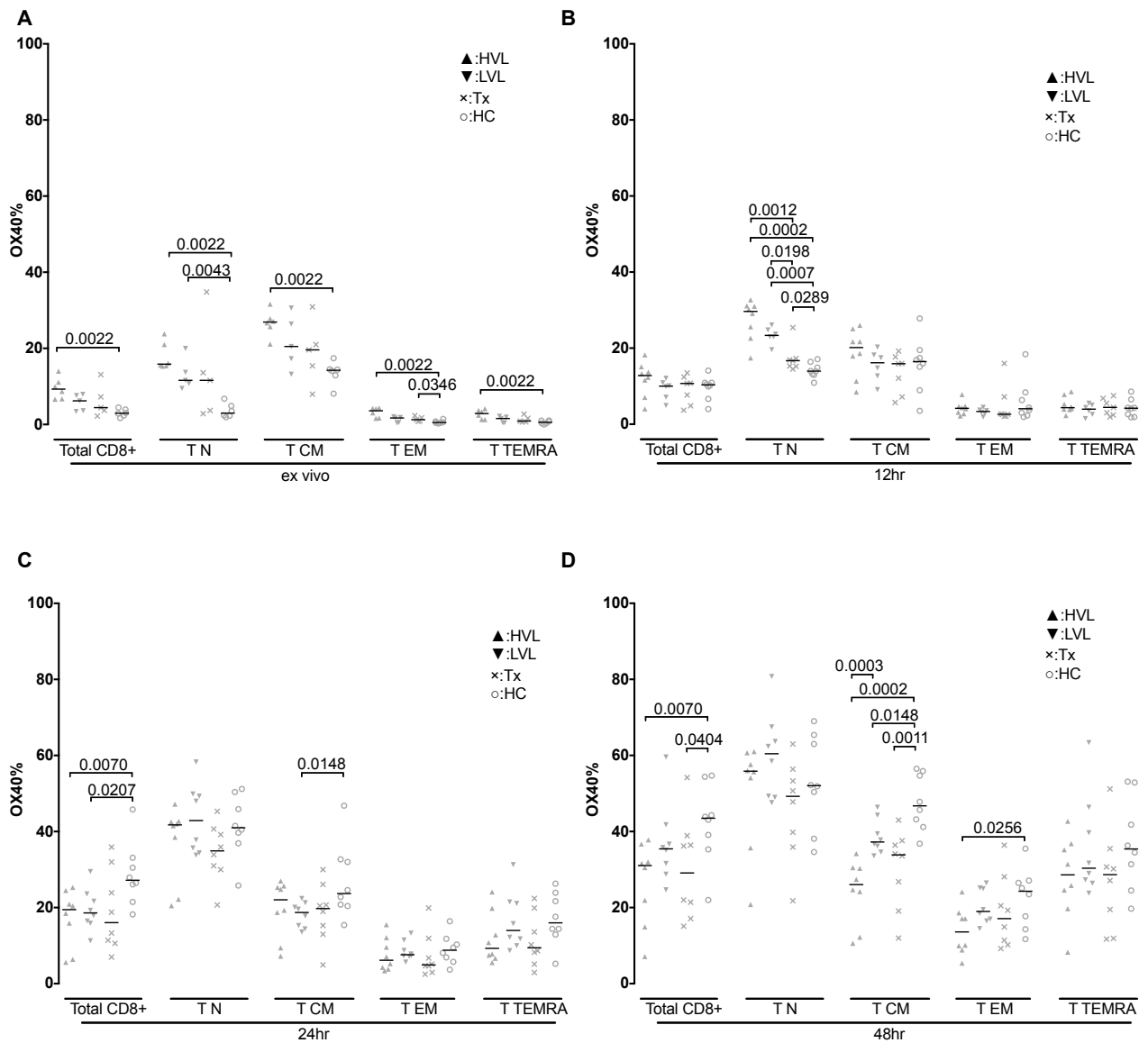


図 4. HIV 感染者の病態毎の CD8 陽性 T 細胞における OX40 陽性頻度の経時的な群間差

ex vivo (A), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 12 時間 (B), 24 時間 (C), 48 時間 (D) の OX40 陽性頻度の CD8 陽性 T 細胞サブセット毎の群間差を示す。

水平線は中央値を示す。2 群間差は Mann–Whitney U test を用いた。

T_N : CD8 陽性ナイーブ T 細胞, T_{CM} : CD8 陽性 central memory T 細胞, T_{EM} : CD8 陽性 effector memory T 細胞, T_{TEMRA} : CD8 陽性 terminal effector memory reexpression CD45RA T 細胞, ▲ : 未治療高ウイルス群, ▼ : 未治療低ウイルス群, × : 有効な ART が導入された HIV 感染者, ○ : 健常者。

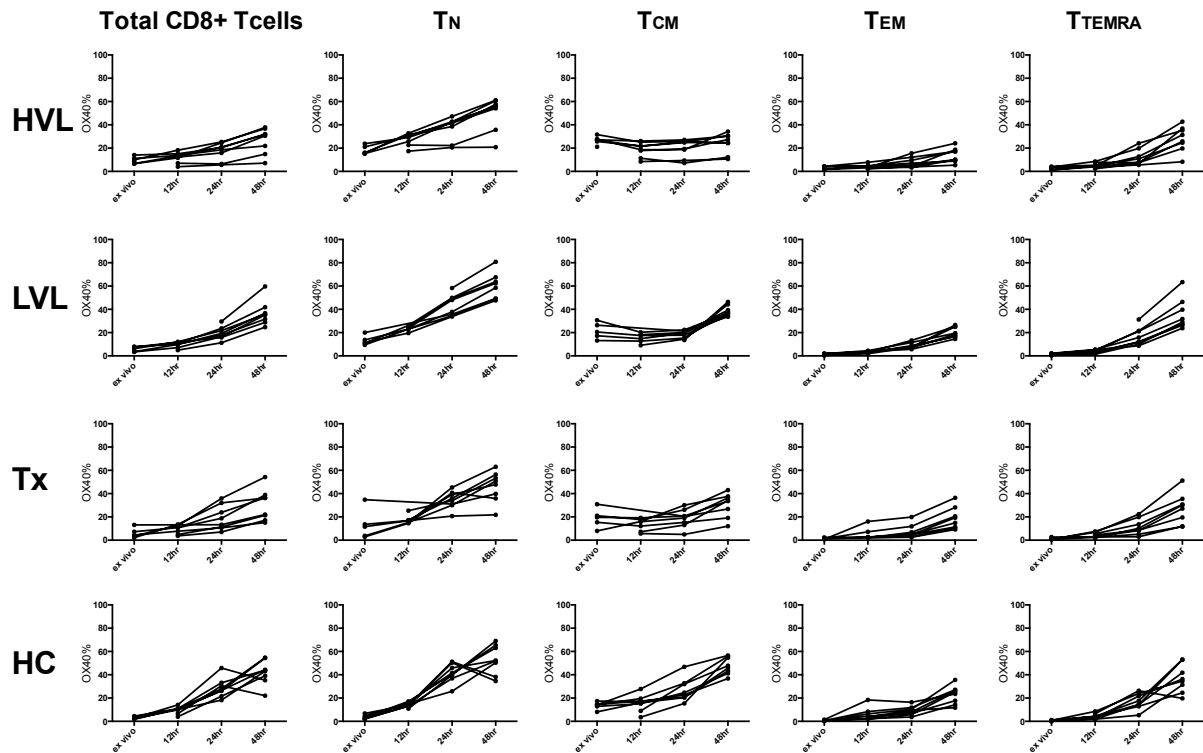


図 5. CD8 陽性 T 細胞の各サブセット毎の OX40 陽性頻度の経時変化

HIV 感染症の各病期と CD8 陽性 T 細胞の各サブセット毎に *ex vivo*, 抗 CD3CD28 抗体刺激後 12 時間, 24 時間, 48 時間後の OX40 陽性頻度の動態を示す

T_N : CD8 陽性 ナイーブ T 細胞, T_{CM} : CD8 陽性 central memory T 細胞, T_{EM} : CD8 陽性 effector memory T 細胞, T_{TEMRA} : CD8 陽性 terminal effector memory reexpression CD45RA T 細胞, HVL: 未治療高ウイルス群, LVL: 未治療低ウイルス群, Tx: 有効な ART が導入された HIV 感染者, HC: 健常人.

CD4 陽性 T 細胞における OX40 発現

CD8 陽性 T 細胞の検討と同様に, *ex vivo* での異なる病期の HIV 感染者と健常者における CD4 陽性 T 細胞サブセット毎の OX40 陽性頻度を図 6A に示す. 未治療高ウイルス群は, 健常者と比較し, 全 CD4 陽性 T 細胞と CD4 陽性 CM/EM T 細胞で OX40 陽性頻度が高かった (図 6A). 未治療 HIV 感染者の CD8 陽性ナイーブ T 細胞で認められた OX40 の異常な高発現は CD4 陽性 T 細胞では観察されなかった.

CD8 陽性 T 細胞と同様に, 抗 CD3/CD28 抗体による OX40 の発現誘導の群間比較を経時的に観察した. 抗 CD3/CD28 抗体存在下での培養開始時を 0 時間とし, 12 時間, 24 時間, 48 時間後の OX40 陽性頻度を図 6B-D に示す. 刺激により OX40 発現が誘導されることで, *ex vivo* で認めた全 CD4 陽性 T 細胞と CD4 陽性 CM/EM T 細胞における OX40 陽性頻度の群間差は消失した. *ex vivo* で群間差を認めなかった CD4 陽性ナイーブ T 細胞では, TCR 刺激後 12 時間から 48 時間まで未治療高ウイルス群, 未治療低ウイルス群, 治療群, 健常者の順に強く発現が誘導され, HIV 感染者では健常者と比較し OX40 発現の誘導が強く, ART でも完全には回復しないことが示唆された.

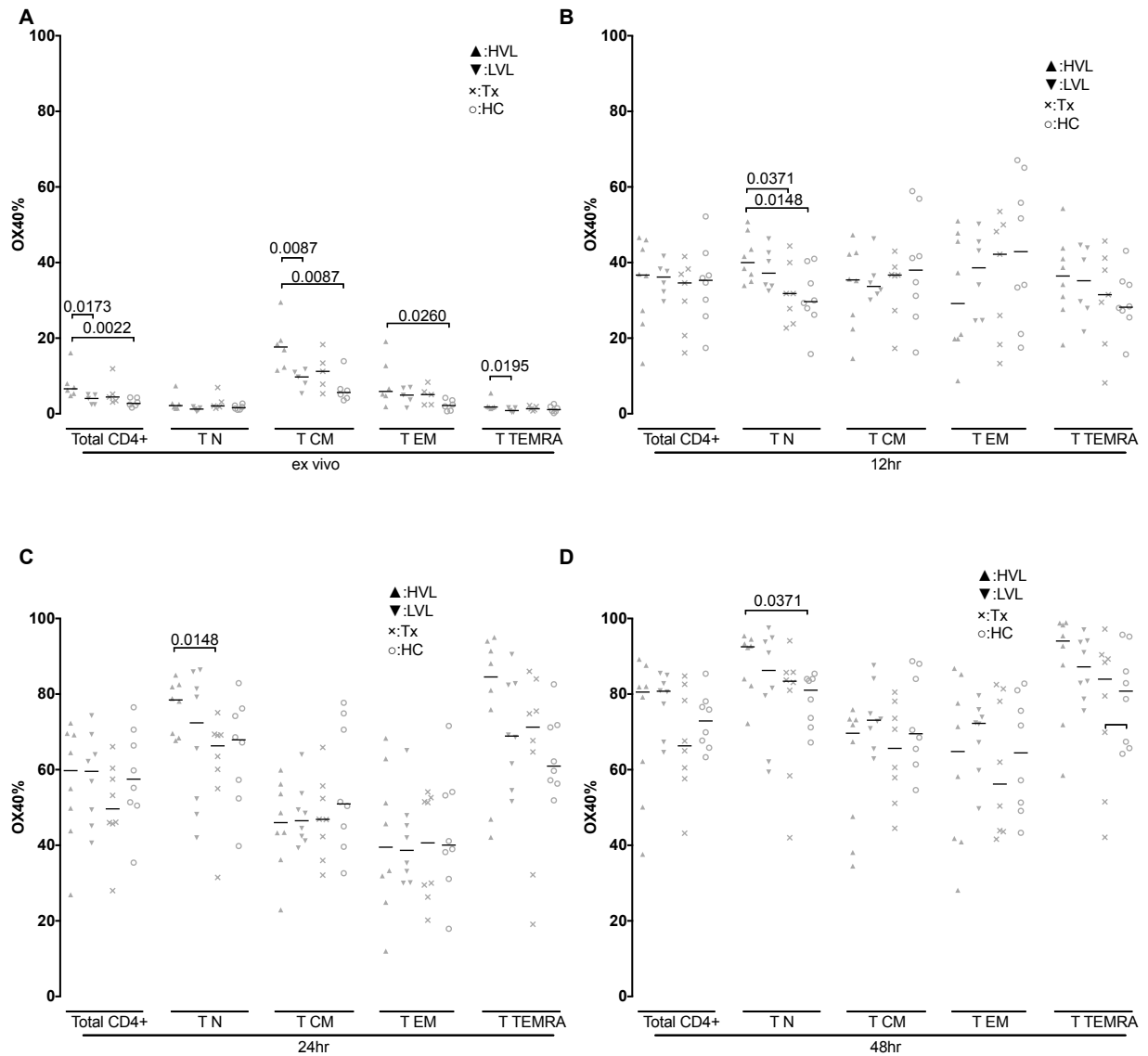


図 6. HIV 感染者の病態毎の CD4 陽性 T 細胞における OX40 発現の経時的な群間差 *ex vivo* (A), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 12 時間 (B), 24 時間 (C), 48 時間 (D) の OX40 発現の CD4 陽性 T 細胞サブセット毎の群間差を示す。

水平線は中央値を示す。2 群間差は Mann-Whitney U test を用いた。

▲：未治療高ウイルス群，▼：未治療低ウイルス群，×：有効な ART が導入された HIV 感染者，○：健常者。

健常者 PBMC を用いた TCR 刺激による T 細胞のサブセット分化の検討

予備的な検討で用いた刺激条件は PBMC 全体を刺激・培養するため他の免疫担当細胞が分泌するサイトカインや共刺激分子も併存し T 細胞の分化が進行すると考えられる。OX40 の発現誘導とサブセット分化の時間的な関係を検討するため、特にナイーブ T 細胞がメモリー T 細胞に分化する時間を明らかにするため、健常者の PBMC を用い、予備的な検討と同様の刺激条件で経時的にサブセットを同定した。

健常者 3 例の PBMC を抗 CD3/CD28 抗体存在下で培養し、0 日、2 日、4 日、6 日、8 日、10 日、13 日後の 4 サブセットの展開図を図 7A に示す。CD4/8 陽性 T 細胞ともに経時的にナイーブ T 細胞の減少とより分化したサブセットの増加を認める。各サブセット比率の経時変化を図 7B に示す。ナイーブ T 細胞は CD4/8、3 被験者の全てで 2 日目に増加し、以後は減少傾向となり、13 日目には 10%以下となった。胸腺からの供給のない条件で 2 日目にナイーブ T 細胞が増加したことは興味深い。 (1) 刺激により PBMC から分泌された IL-2, IL-7 などの作用によりナイーブ T 細胞が homeostatic proliferation した可能性、あるいは、(2) EM などのより分化したサブセットが刺激・培養条件で死に相対的に比率が増加した可能性、などが推測される。CM T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞において、4 から 6 日まで増加し、以後減少傾向となるが、13 日目にも 30-60%程度観察される。また、CD8 陽性 T 細胞において、4 から 10 日まで増加し、

以後減少傾向となるが、13日目には20-60%程度を占める。初期の増加傾向はナイーブT細胞がCMT細胞に分化し流入することを反映し、後期の減少はEMT細胞への流出を反映していると考えられた。EMT細胞はCD4/8、3被験者の全てで2日目まで減少し、以後は増加傾向となり、13日目には30-80%程度を占める。2日目までは既存のEMT細胞の内、疲弊・老化をきたしている集団が死亡し、以後は新規に分化したEMT細胞が流入するためと考えられた。TEMRA T細胞はCD4/8共に全経過で減少傾向を示す。一部は、4から8日目に一時的に増加傾向を示すが、上流のサブセットが分化し移入していることを反映している可能性がある。

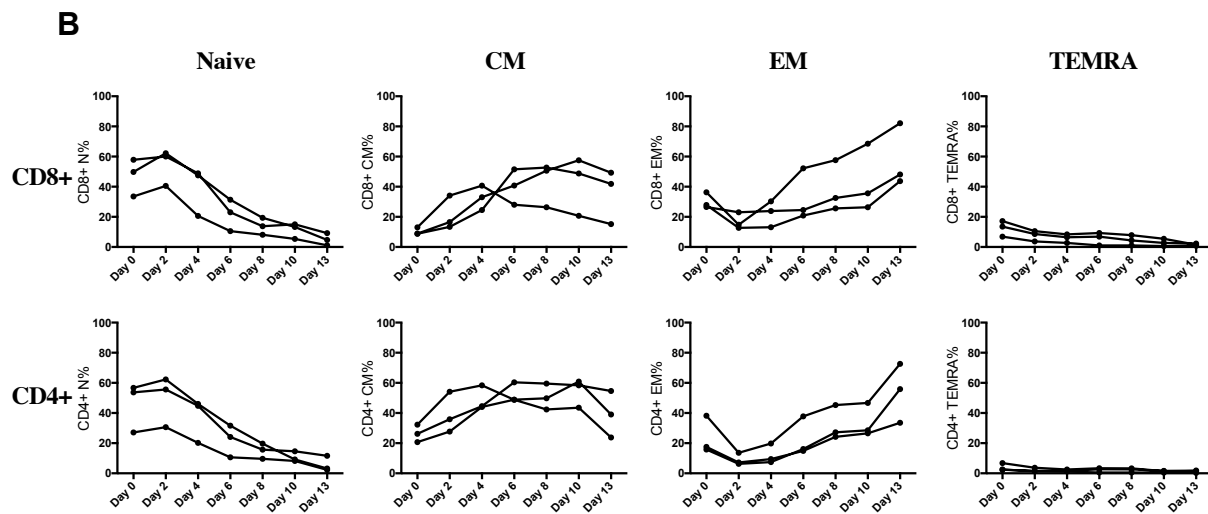
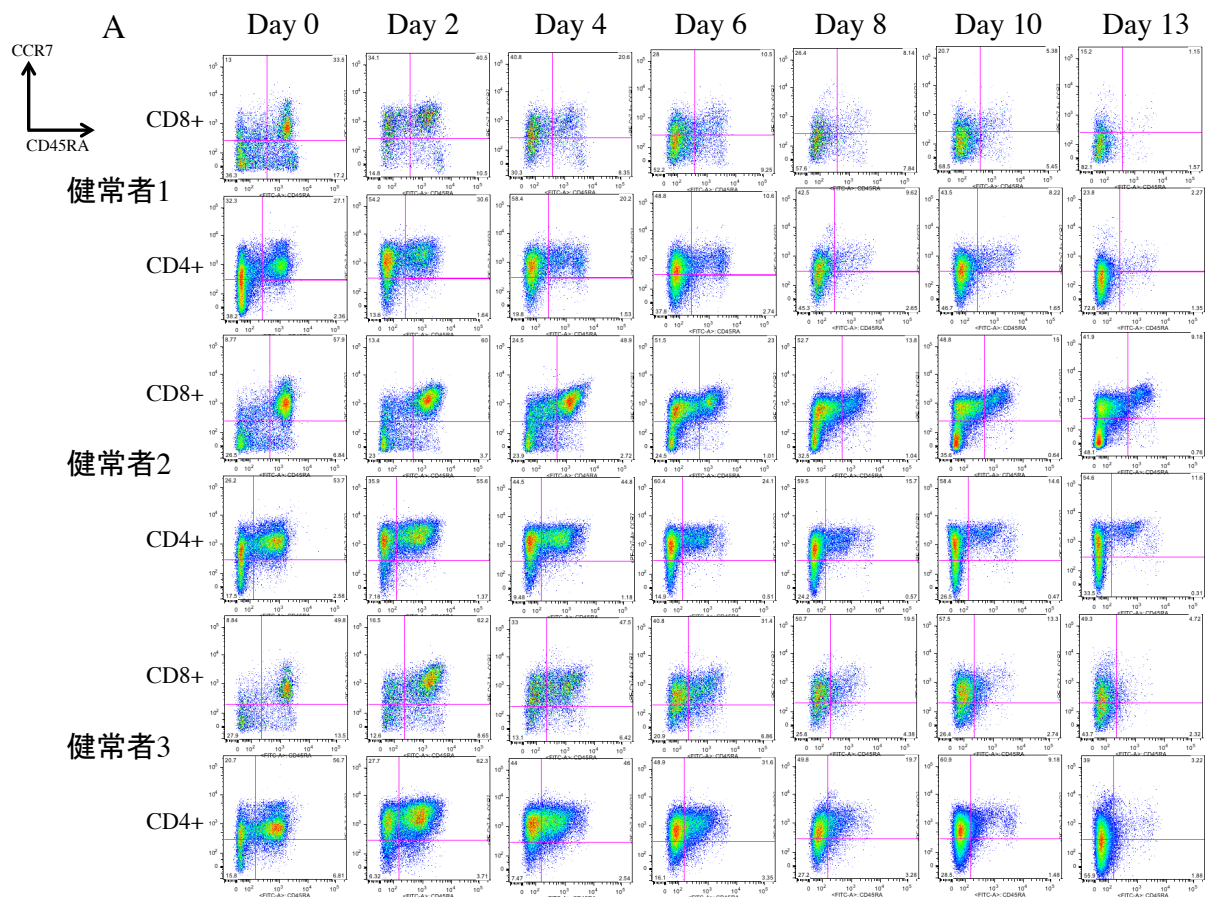


図7. 健常者 PBMC を TCR 刺激し T 細胞のサブセット分化を検討した
 健常者 3 例の CD4/8 陽性 T 細胞の各タイムポイントにおけるサブセット展開 (A).
 死細胞の除去, CD3 陽性細胞, CD4/8 陽性細胞でゲートし, CCR7, CD45RA 発現で
 4 分割された. 右上より反時計回りにナイーブ T 細胞, CM T 細胞, EM T 細胞, TEMRA
 T 細胞. CD4/8 陽性細胞の各サブセットの比率の経時変化 (B).

TCR 刺激による PBMC からのサイトカイン分泌と OX40

1990 年代より HIV 産生の抑制因子として CCR5 のリガンドとなる MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES が報告⁶⁸されている. CCR5 に対し Gp120 と競合的に働くためと考えられるが, また, 健常者の PBMC を OX40 刺激することでこれらのケモカインの産生が増加し, CCR5 のダウンレギュレーションを介して R5 ウイルスの感染に抑制的に働く報告⁶⁹がある. そこで予備的な検討で PBMC を刺激・培養した際の培養上清を用いて, 上清の MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の定量と OX40 陽性頻度の関係を検討した.

抗 CD3/CD28 抗体存在下での培養開始時を 0 時間とし, 12 時間, 24 時間, 48 時間後の培養上清中のベータケモカイン濃度を図 8 に示す. また, OX40 発現, 発現誘導が MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生に及ぼす影響を検討するため, 異なる病期の HIV 感染者と健常者をまとめて, *ex vivo*, 12 時間, 24 時間, 48 時間後の各タイムポイントにおける OX40 陽性頻度と, その同タイムポイント, あるいは, 後ろのタイムポイントにおける上清中の MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 濃度の相関を図 9 に示す. これら 3 ケモカインは, 主に CD8 陽性 EM/TEMRA T 細胞により産生される (当教室のデータ, 未発表). CD8 陽性 T 細胞における *ex vivo* の OX40 陽性頻度とその後の MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生には相関を認めないが, 12 時間における OX40 陽性頻度と同タイムポイントの MIP-1 β , あるいは, 24 時間, 48 時間の RANTES と有意に正

の相関を認めた (図 9A). TCR 刺激により OX40 発現が強く誘導された個体ではこれらのケモカイン産生も増加することを示唆している. *ex vivo* では, 全 CD8 における, 未治療 HIV 感染者高ウイルス群, 未治療 HIV 感染者低ウイルス群, 治療群, 健常者の順に OX40 陽性頻度が高値であったが, TCR 刺激後の OX40 陽性頻度は病態が重篤な群で低く, 次第に逆転し, 48 時間で健常者は HIV 感染者より高値となった (図 4).

OX40 発現誘導が MIP-1 β , RANTES 産生と関連した点 (図 9) と合わせ, HIV 感染者で OX40 発現誘導が低いことがこれらケモカイン産生に負の影響を及ぼし, 病態に関与している仮説を考慮した. しかし, ベータケモカイン濃度の群間差の直接比較 (図 8) では, 仮説は否定的であった. また, これらのケモカインの HIV 抑制作用は, CD4 陽性 T 細胞の CCR5 のダウンレギュレーションを介することが機序の一つと考えられる⁶⁹が, CD4 陽性 T 細胞における CCR5 陽性頻度の群間比較でも有意な差を認めなかった (図 10). FCM 解析は, 全 CD4/8 陽性 T 細胞や各サブセットにおける OX40 発現を一度に評価できるが, 培養上清中のサイトカイン定量は, PBMC 全体からの産生で, これ以上の追求は困難と考えられた. FCM による, 全 CD8 陽性 T 細胞および各サブセットにおける OX40 発現の確定したデータが得られた後に, 細胞内染色 (ICS) やサブセットを分取・培養した上清のサイトカイン定量などを考慮することとした.

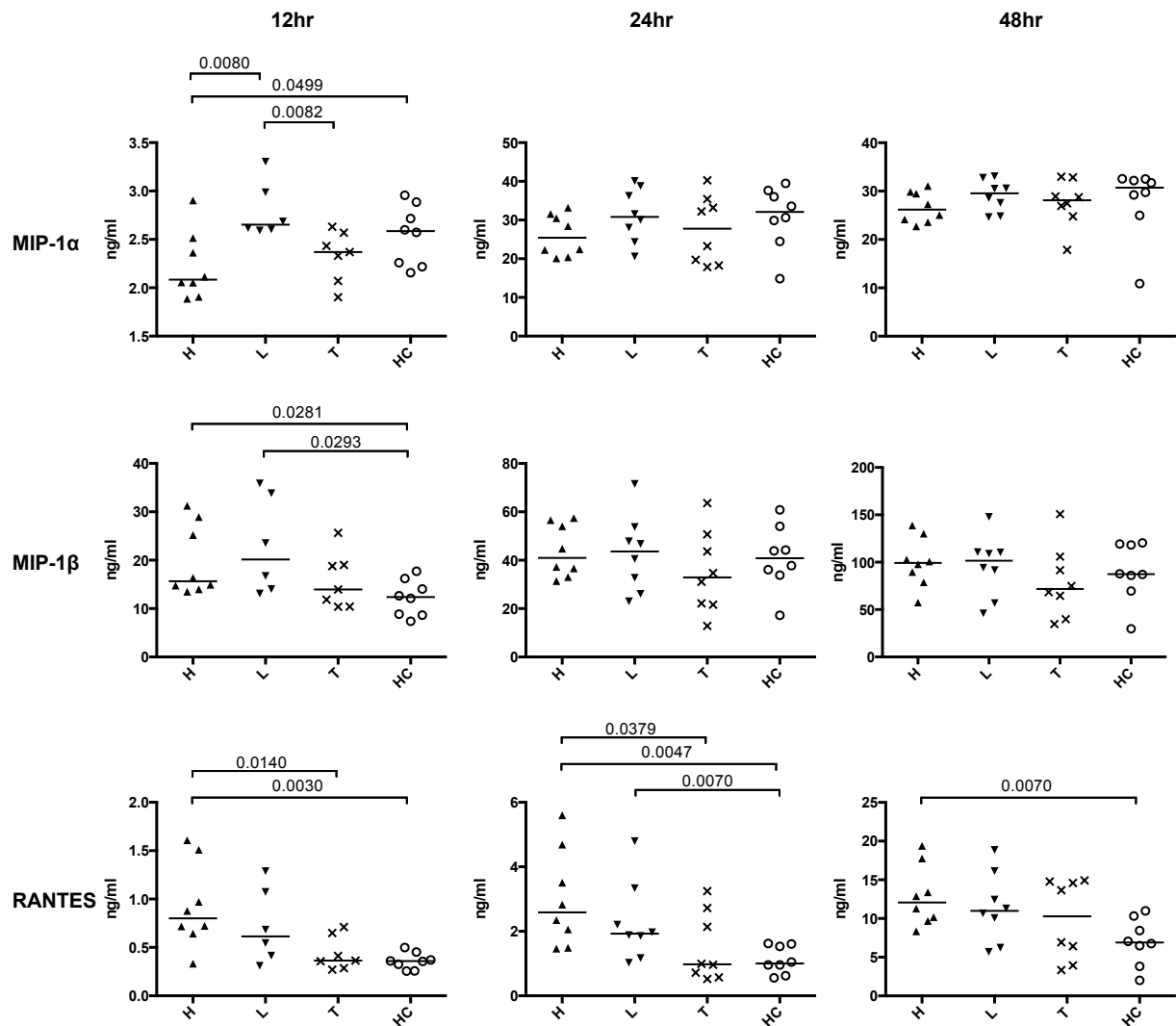
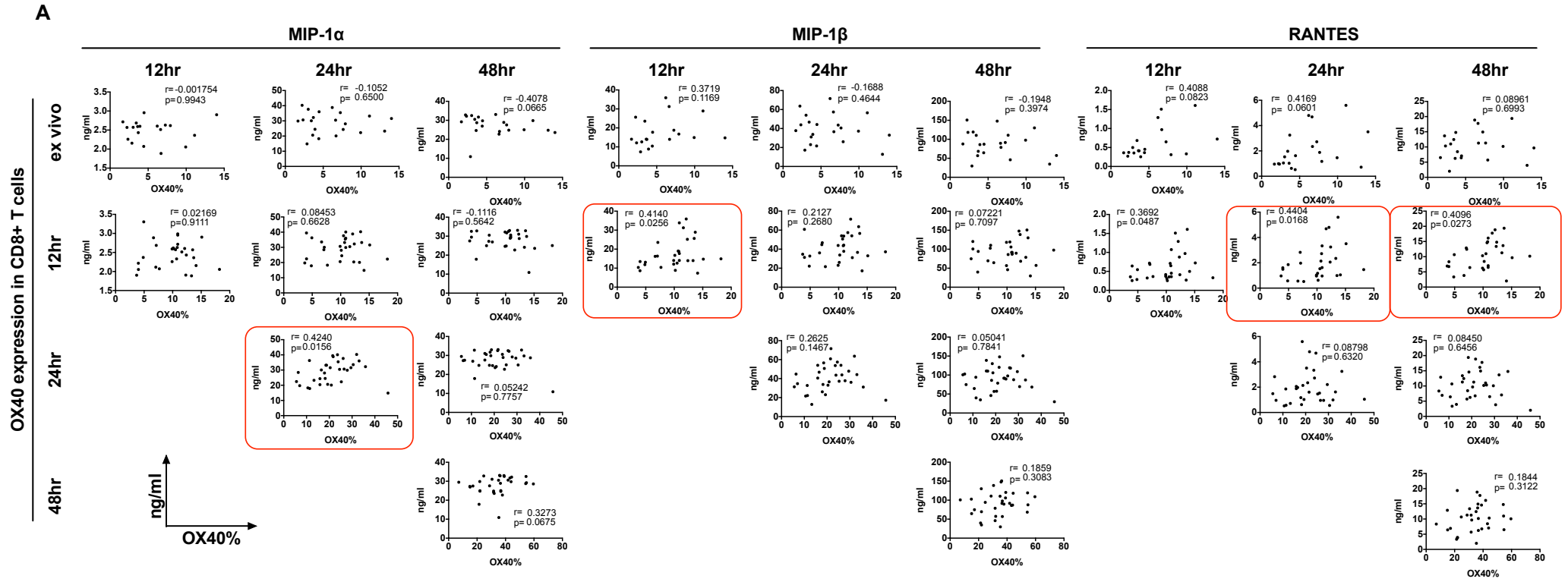


図 8. HIV 感染者の病態毎の TCR 刺激による PBMC の β ケモカイン産生の経時的な群間差

PBMC を抗 CD3CD28 抗体刺激し、12 時間、24 時間、48 時間後の培養上清中の β ケモカイン濃度を示す。

水平線は中央値を示す。2 群間差は Mann-Whitney U test を用いた。

▲：未治療高ウイルス群，▼：未治療低ウイルス群，×：有効な ART が導入された HIV 感染者，○：健常者。



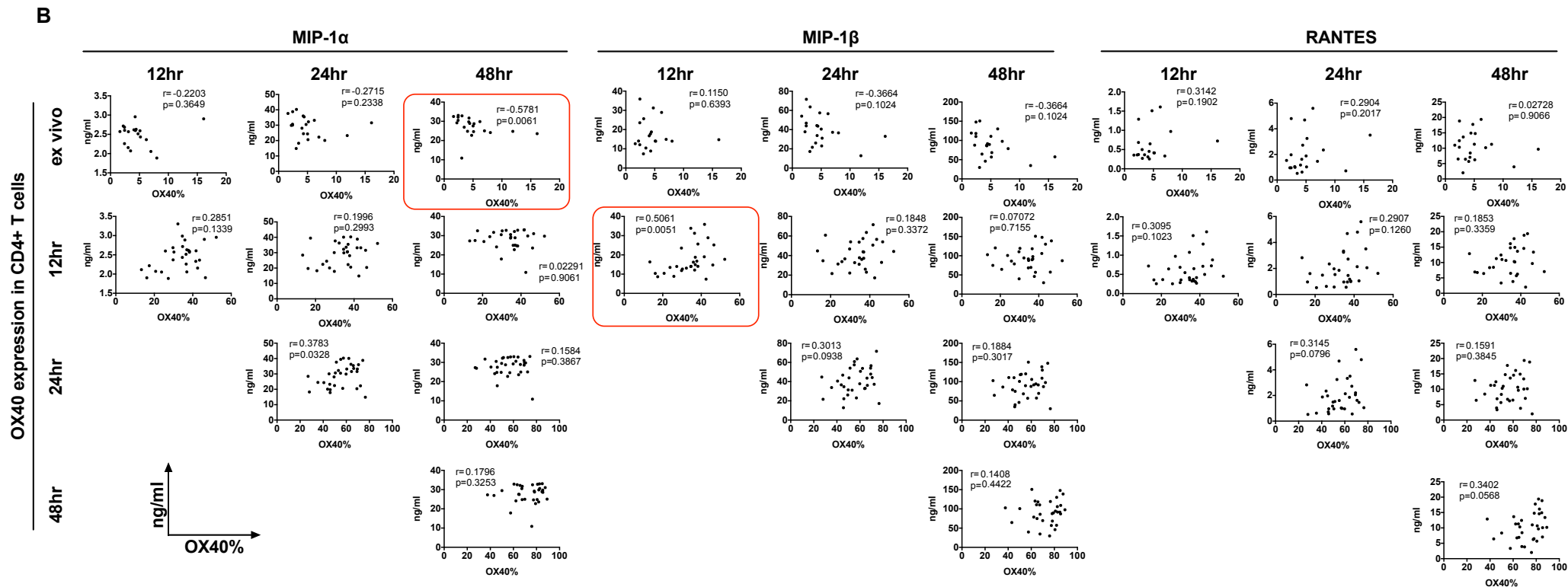


図 9. OX40 陽性頻度と培養上清中のケモカイン濃度の相関

異なる病期の HIV 感染者と健常者の, *ex vivo*, 12 時間, 24 時間, 48 時間後の各タイムポイントにおける CD8 陽性 (A) および CD4 陽性 (B) T 細胞の OX40 陽性頻度と, その同タイムポイント, あるいは, 後ろのタイムポイントにおける上清中の MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 濃度の相関.

相関は Spearman test を用いた. $|r| \geq 0.4$ かつ $p \leq 0.05$ を赤枠で括った. 各ケモカインの濃度は全て ng/ml で示した.

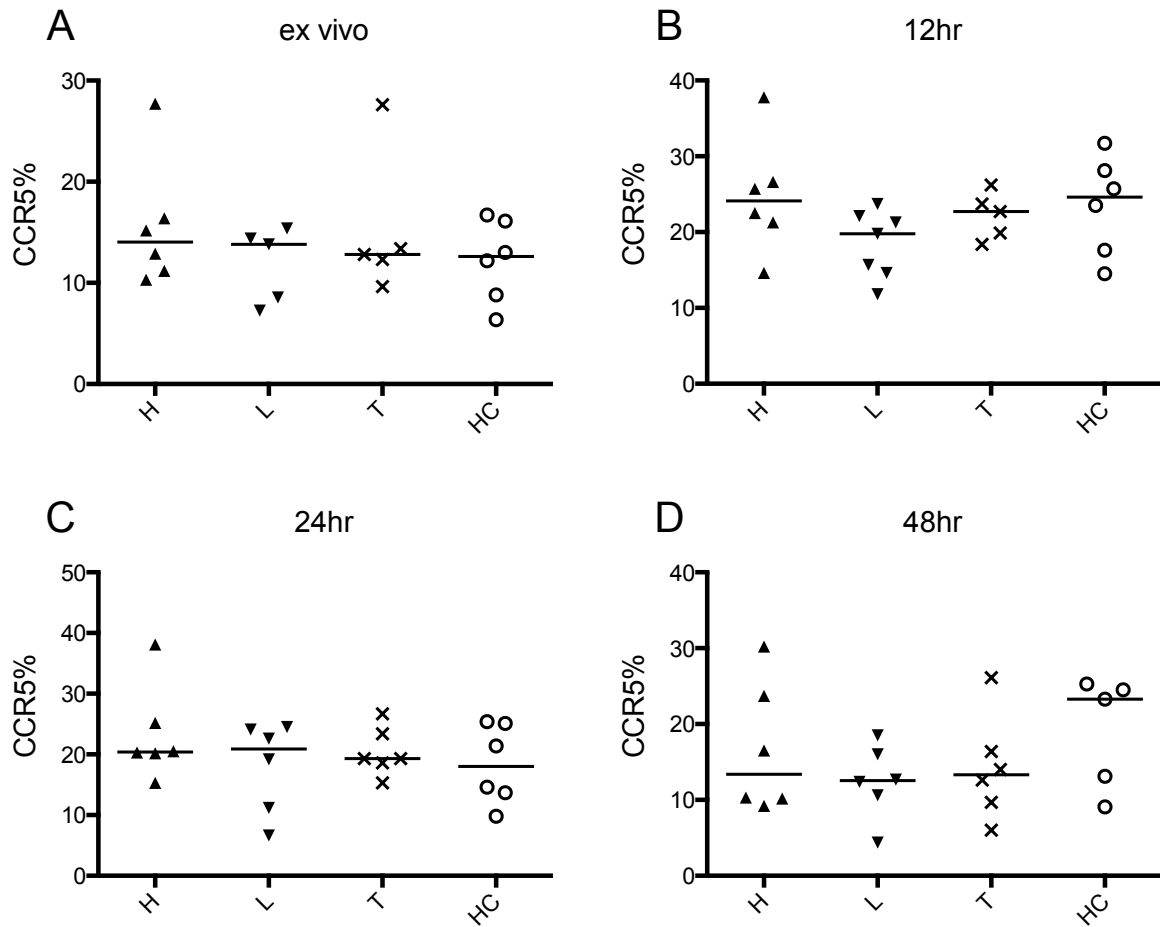


図 10. HIV 感染者の病態毎の CD4 陽性 T 細胞における CCR5 陽性頻度の経時的な群間差

ex vivo (A), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 12 時間 (B), 24 時間 (C), 48 時間 (D) の CCR5 陽性頻度の群間差を示す.

水平線は中央値を示す. 2 群間差は Mann-Whitney U test を用いた.

▲ : 未治療高ウイルス群, ▼ : 未治療低ウイルス群, × : 有効な ART が導入された HIV 感染者, ○ : 健常者.

予備的な検討で示唆された HIV 感染者における OX40 発現の論点

以上より (1) 未治療 HIV 感染者では、健常者では OX40 の発現をほとんど認めない CD8 陽性ナイーブ T 細胞で、異常な高発現を認め、それは有効な ART でも回復していない点 (図 4A), (2) TCR 刺激後に OX40 発現が誘導され、24 時間から 48 時間で CD8 陽性ナイーブ T 細胞を除いた各サブセットで健常者の OX40 発現が患者群を上回ったが、特に未治療高ウイルス群、治療群では CD8 陽性 CM T 細胞で発現誘導が低い点 (図 4C, D), (3) CD4 陽性 T 細胞では未治療高ウイルス群は、健常者と比較し、全 CD4 陽性 T 細胞と CD4 陽性 CM/EM T 細胞で OX40 の発現が高かったが、刺激により OX40 発現が誘導されることで、CD4 陽性ナイーブ T 細胞を除いて OX40 陽性頻度の群間差は消失した点 (図 6), などが興味深い点として挙げられた。

しかし、予備的な検討は (1) 各群の例数が少ない、(2) 細胞数の制限により 4 タイムポイントで十分な例数を確保できない、(3) TCR 刺激により芽球化した T 細胞のゲーティングは困難である、など制限も多かった。そのため、より多数のコホートで、予備的な検討で示唆された論点の再現性を確認するため、FMO を導入しより正確に表面分子の発現を評価するため、また、更に T 細胞の疲弊や老化のマーカーを同時に解析するため、次の実験を計画した。複数の論点が明らかとなった CD8 陽性 T 細胞に集中して解析することとし、刺激後培養時間として、48 時間を採用した。これ

は 48 時間で、発現誘導の群間差を比較するための十分な発現が得られると考えられ (図 4), また, 健常者 PBMC を用いた TCR 刺激による T 細胞のサブセット分化の検討より, 多少の分化が進行していることを留意しつつも各サブセットの評価は *ex vivo* と同様に可能と考えられた (図 7) ためである.

HIV 感染者と健常者における CD8 陽性 T 細胞サブセット毎の OX40 陽性頻度と TCR 刺激による OX40 発現誘導

本研究で用いた HIV 感染者とコントロールとして用いた HIV 非感染者 (健常者) の背景を表 2 に示す. *ex vivo* での異なる病期の HIV 感染者と健常者における CD8 陽性 T 細胞サブセット毎の OX40 陽性頻度を図 12 に示す. 未治療および有効な ART が導入された HIV 感染者は, 健常者と比較し, 全 CD8 陽性 T 細胞と CD8 陽性ナイーブ T 細胞, CD8 陽性 CM T 細胞で OX40 の発現が高かった (図 12A). 未治療 HIV 感染者のウイルス量によるサブグループ解析では, 高ウイルス群の CD8 陽性ナイーブ T 細胞における OX40 陽性頻度は, 低ウイルス群と比較し有意に高かった ($p=0.0376$). 予備的な検討と同様に健常者では CD8 陽性ナイーブ T 細胞では OX40 の発現をほとんど認めなかったのに対し, 未治療 HIV 感染者では異常な高発現を認め, それは有効な ART でも回復していないことが示された.

抗 CD3/CD28 抗体による 48 時間の OX40 の発現誘導の群間比較を図 12B に示す.

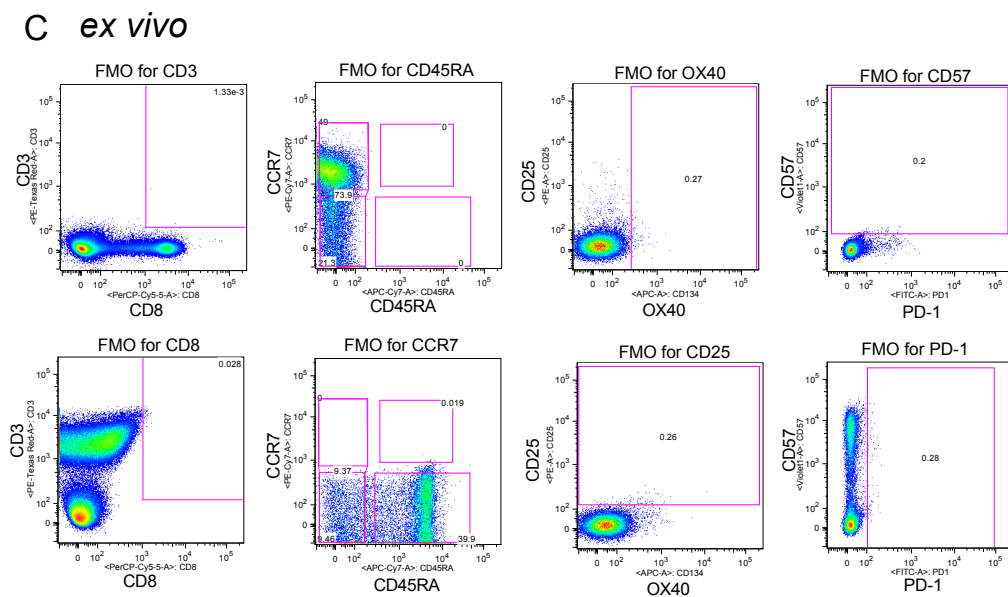
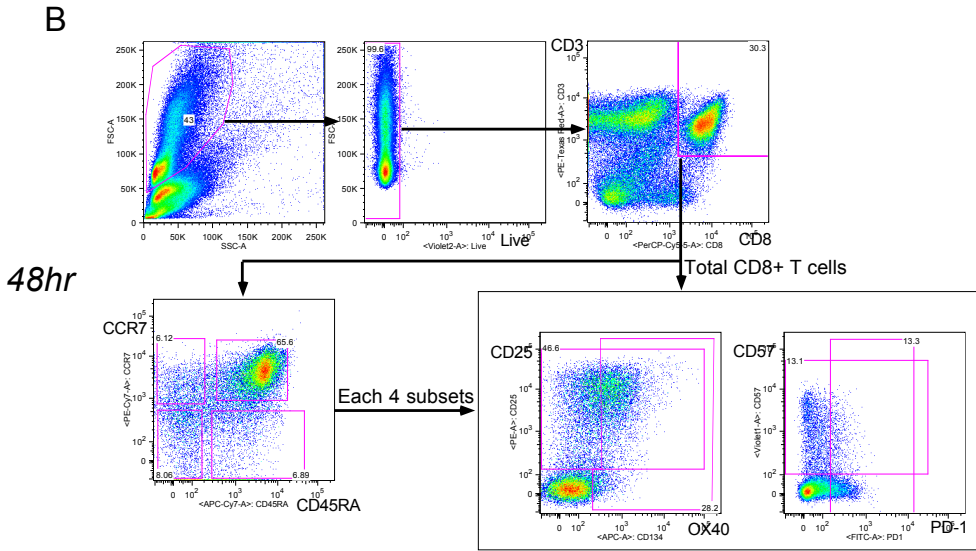
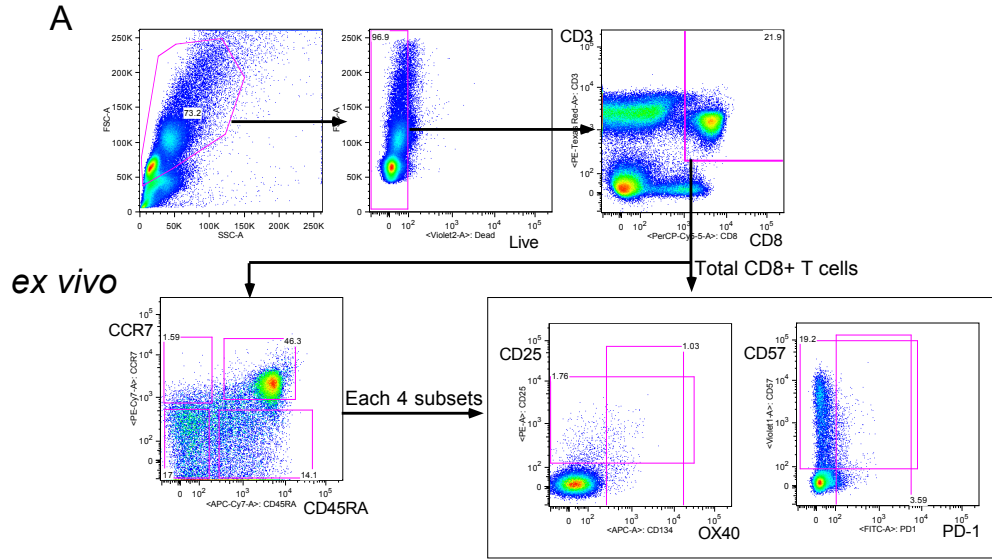
未治療 HIV 感染者は, 健常者や有効な ART が導入された HIV 感染者と比較し, 全 CD8 陽性 T 細胞と 4 サブセット全てで TCR 刺激後 48 時間においても OX40 陽性頻度が高かった (図 12B). 予備的な検討で示唆された HIV 感染者における OX40 発現の論点の (2) 未治療高ウイルス群と治療群における CD8 陽性 CM T 細胞で発現誘導が低い点について, 予備的な検討とは異なる結果となった.

表 2. 本実験で用いた検体の背景

	群				群間差 p
	未治療群		治療群 n=45	健常者 n=11	
	高ウイルス群 n=17	低ウイルス群 n=17			
年齢	37.0	34.0	39.0	36.0	0.2575
性別(男性%)	16 (94.1)	15 (88.2)	45 (100)	9 (81.8)	
ウイルス量(copies/ml)	44000	1200	40	–	< 0.0001
CD4数(/ μ l)	378.0	427.0	453.0	–	0.2157
CD8数(/ μ l)	1061.0	877.0	703.0	–	0.0009
CMV抗体価(IU/ml)	12.3	12.2	13.2	–	0.5040
治療期間(月)	–	–	41.0	–	–
罹病期間(月)	24.0	34.0	49.0	–	0.0031

本実験では，未治療高ウイルス群 17 例，未治療低ウイルス群 17 例，治療群 45 例，健常者 11 例を使用した。

特に記載のない場合，数値は中央値で表記した。群間差は Kruskal-Wallis test で検定した。



D 48hr

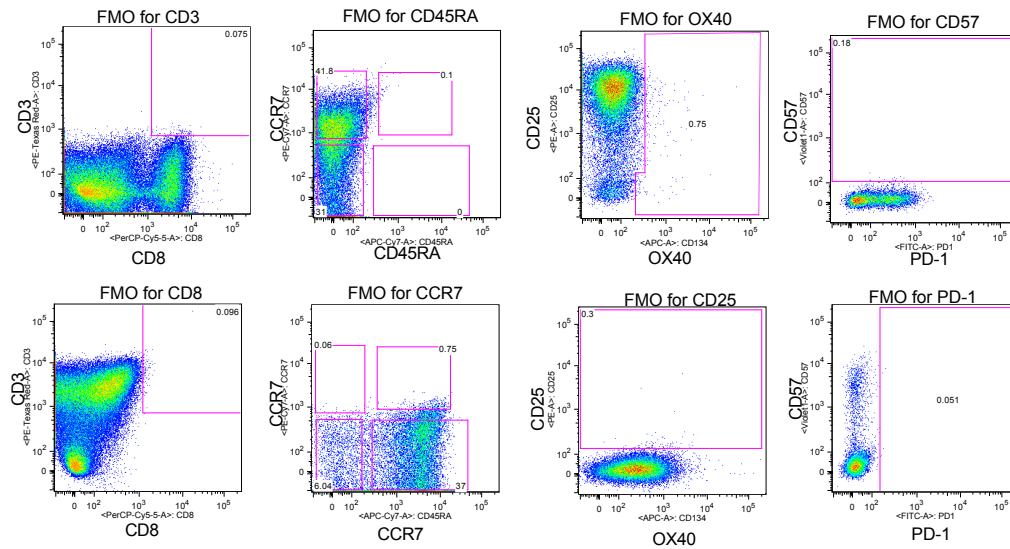


図 11. Gating strategy と FMO コントロール

ex vivo (A), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 48 時間 (B) の健常者 1 例の FCM による表面分子解析の Gating strategy を示す。OX40 は、活性化 T 細胞に発現するため広くリンパ球ゲートをかかけた後、死細胞除去後、CD3/CD8 と CCR7/CD45RA で展開し、全 CD8 陽性細胞と CD8 陽性 T 細胞の 4 サブセットにおける OX40 陽性頻度を評価した。各タイムポイントにおいて、検体間、群間のゲーティングは共通である。

ex vivo (C), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 48 時間 (D) の FMO コントロールを示す。広いリンパ球ゲートや刺激により芽球化したリンパ球における OX40 発現を正確に評価するため、評価したい 1 表面分子を除いた (fluorescence-minus one; FMO) 全表面分子で染色したサンプル (FMO コントロール) を各々の表面分子で作成し、ネガティブコントロールとしてゲーティングを行った。

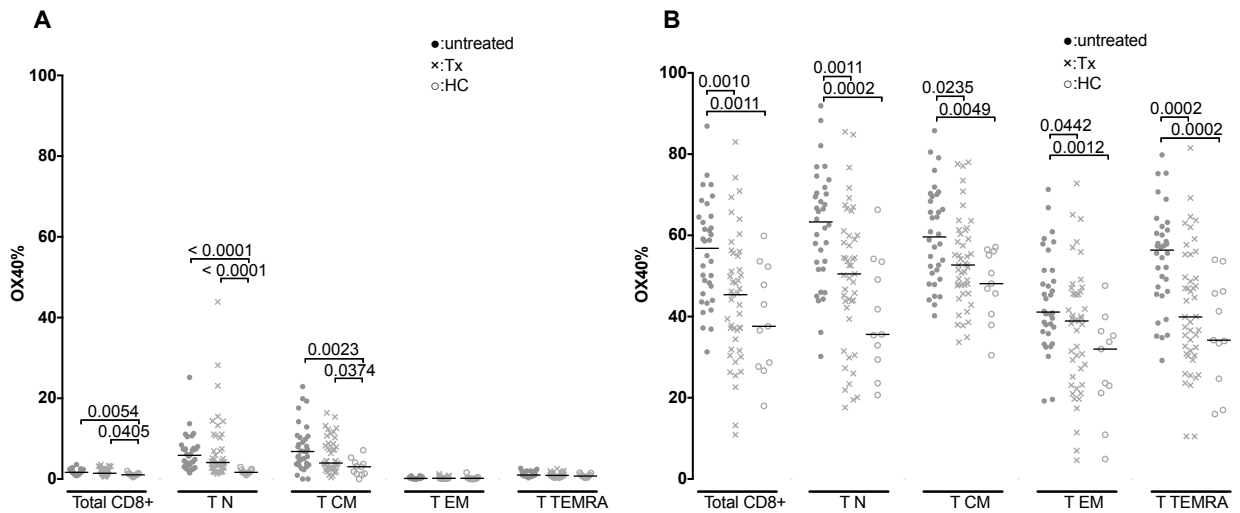


図 12. HIV 感染者の病態毎の CD8 陽性 T 細胞における OX40 陽性頻度 ex vivo (A), 抗 CD3CD28 抗体刺激後 48 時間 (B) の OX40 陽性頻度の CD8 陽性 T 細胞サブセット毎の群間差を示す。

水平線は中央値を示す. 2 群間差は Mann-Whitney U test を用いた.

● : 未治療 HIV 感染者, × : 有効な ART が導入された HIV 感染者, ○ : 健常者.

CD8 陽性ナイーブ T 細胞における OX40 の異常発現と免疫老化

図 13 に健常者，未治療 HIV 感染者（高ウイルス群），治療群 HIV 感染者，各々 2 例の CD8 陽性 T 細胞のサブセットの分布を例示する．また，HIV 感染者 79 例，健常者 11 例全例の CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率（図 14A）と CD8 陽性 TEMRA T 細胞比率（図 14B）の群間の比較を示す．既報と同様に本実験のコホートでも，未治療 HIV 感染者は，健常者と比較し，免疫老化との関連が明らかとなっている CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率の低下と CD8 陽性 TEMRA 細胞比率の上昇を認めた（図 13, 14A, B）．この免疫老化は有効な ART でも回復していなかった．

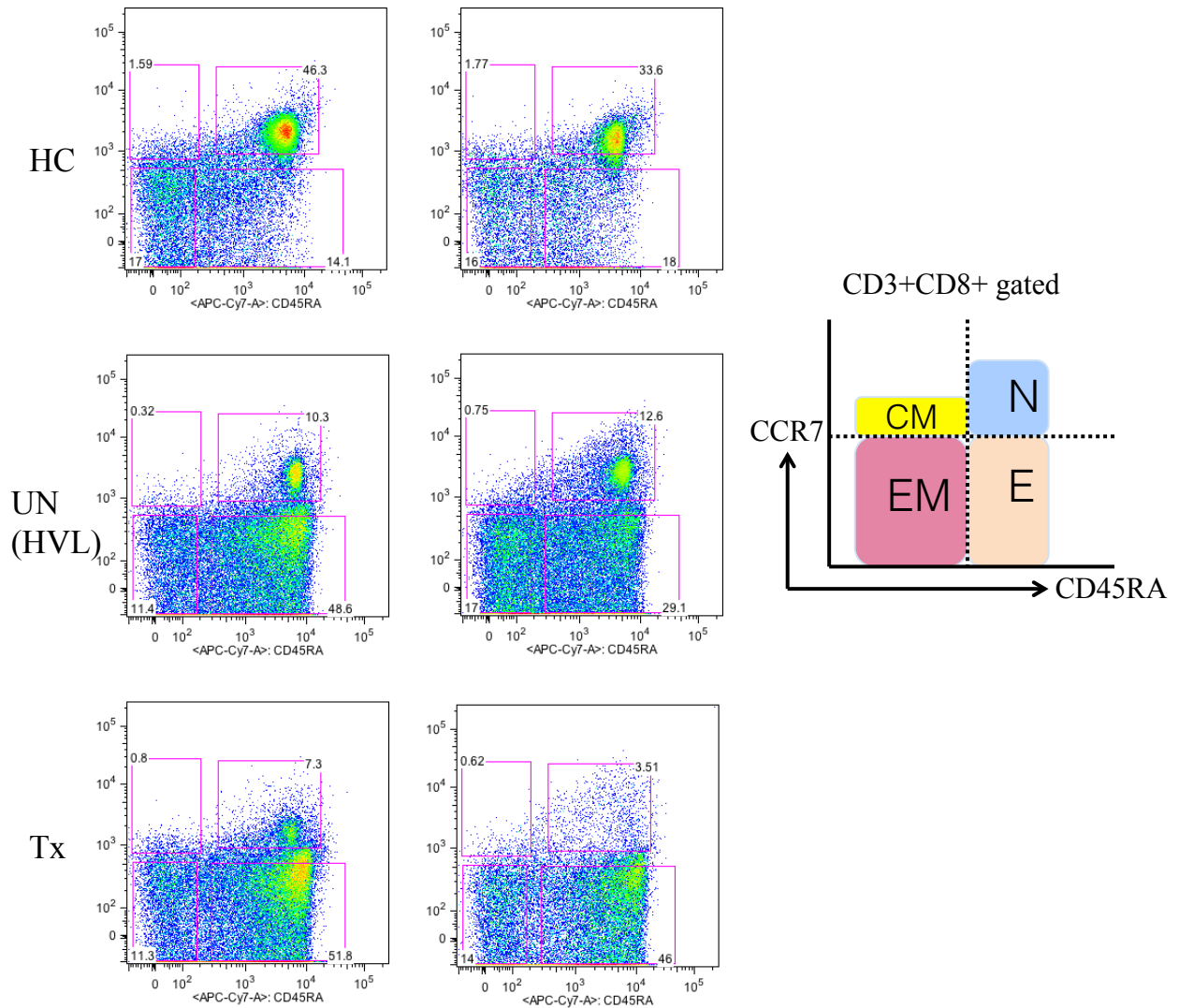


図 13. HIV 感染者における CD8 陽性 T 細胞サブセット分布の異常

ex vivo の健常者と未治療 HIV 感染者（高ウイルス群），治療群 HIV 感染者，各々 2 例の CD8 陽性 T 細胞に発現する CCR7/CD45RA の展開図を示す．右上から反時計回りに CD45RA 陽性/CCR7 陽性のナイーブ T 細胞，CD45RA 陰性/CCR7 陽性の Central memory (CM) T 細胞，CD45RA 陰性/CCR7 陰性の Effector memory (EM) T 細胞，CD45RA 陽性/CCR7 陰性の T effector memory reexpressing CD45RA (TEMRA)，の 4 サブセットに分画される．未治療 HIV 感染者や ART が導入された HIV 感染者では，ナイーブ T 細胞比率の低下と TEMRA の増加を認める．

UN：未治療 HIV 感染者，HVL：未治療高ウイルス群，Tx：有効な ART が導入された HIV 感染者，HC：健常者

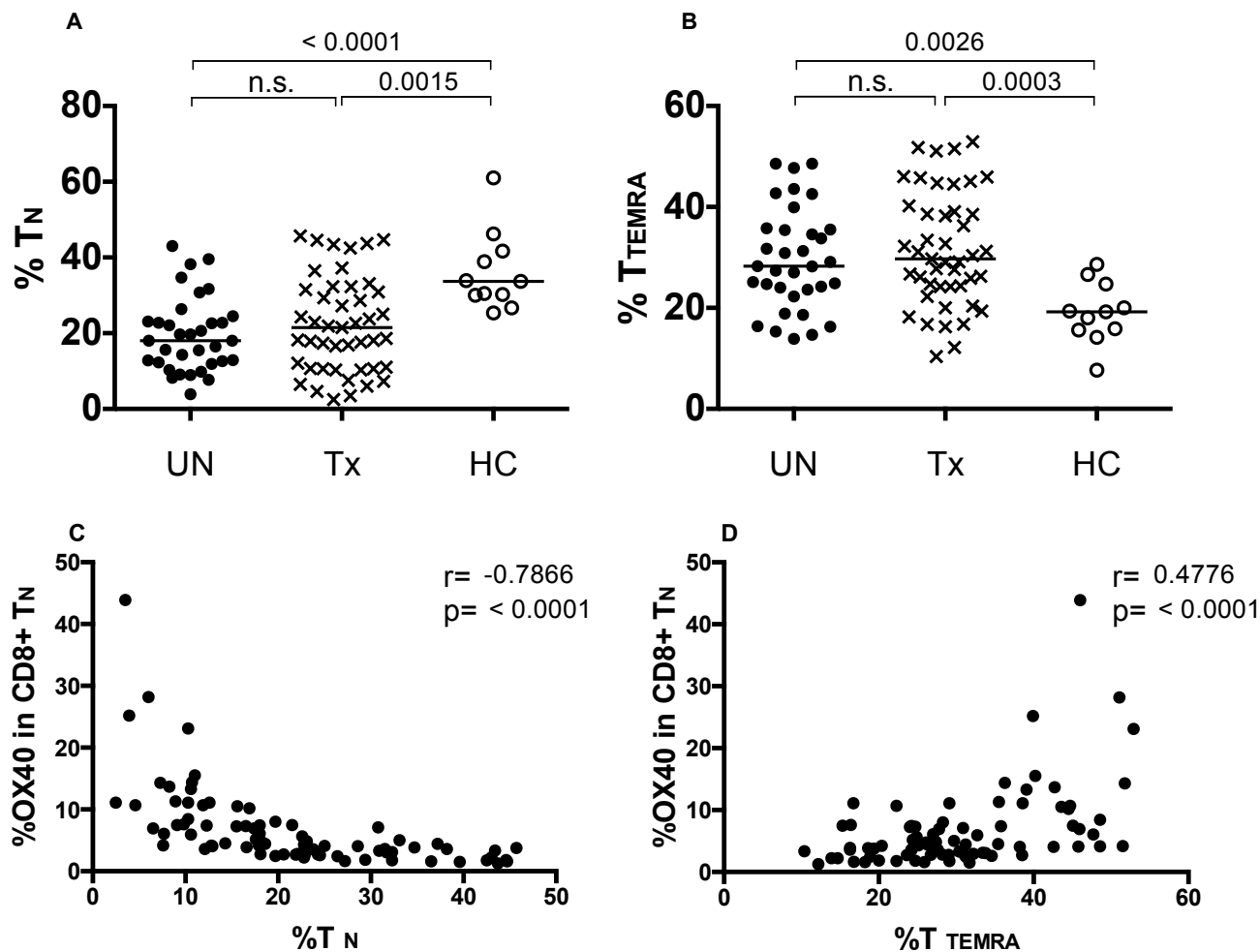


図 14. 免疫老化と CD8 陽性ナイーブ T 細胞における OX40 発現 (*ex vivo*)

HIV 感染者の病態毎の *ex vivo* の CD8 陽性ナイーブ細胞比率 (A) と CD8 陽性 TEMRA T 細胞比率 (B) の群間差を示す。

HIV 感染者の CD8 陽性ナイーブ細胞における *ex vivo* の OX40 陽性頻度と CD8 陽性ナイーブ細胞比率 (C), CD8 陽性 TEMRA T 細胞比率 (D) の相関を示す。

水平線は中央値を示す。2 群間差は Mann-Whitney U test, 相関は Spearman test を用いた。

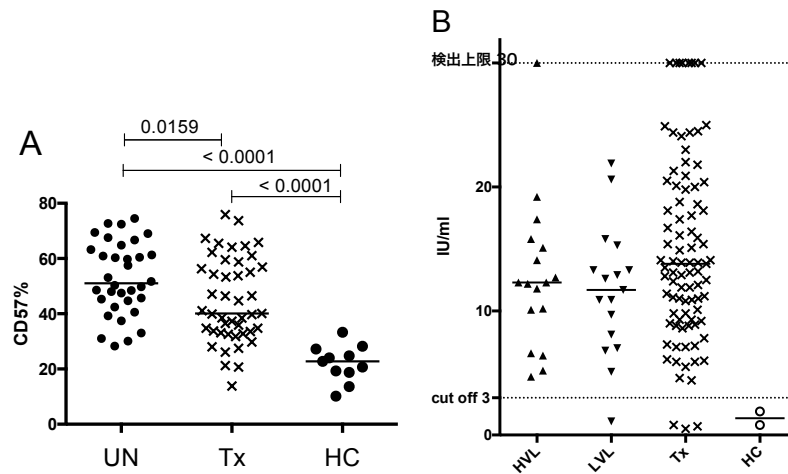
UN : 未治療 HIV 感染者, Tx : 有効な ART が導入された HIV 感染者, HC : 健常者

更に、未治療・治療含めた全 HIV 感染者における免疫老化と未刺激での CD8 陽性ナイーブ T 細胞の OX40 の異常発現の関連を解析した (図 14C, D). 未刺激での CD8 陽性ナイーブ T 細胞の OX40 の異常発現と CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率は有意に負の相関を示し、また、未刺激での CD8 陽性ナイーブ T 細胞の OX40 の異常発現と CD8 陽性 TEMRA 細胞比率は有意に正の相関を示した. ナイーブ以外の CD8 陽性 T 細胞サブセットにおける OX40 陽性頻度とサブセット比率には、相関を認めなかった. CD8 陽性ナイーブ T 細胞の OX40 の異常発現が高度な個体ほど免疫老化 (CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率の低下と CD8 陽性 TEMRA 細胞比率の上昇) が強い傾向を認めた.

今回新規に免疫老化との関連を見いだした *ex vivo* の CD8 陽性ナイーブ T 細胞における OX40 の異常発現と他の免疫老化に関連する因子を解析した. 免疫老化に関連する因子として、年齢 (real age)、全 CD8 陽性 T 細胞の CD57 陽性頻度、CMV 抗体価を検討した. 本コホートでは、群間に実年齢の有意な差を認めなかった (表 2). 代表的な免疫老化のマーカーである全 CD8 陽性 T 細胞における CD57 陽性細胞の比率の群間差を図 15A に示す. 既報と同様に未治療 HIV 感染者は、健常者より有意に CD57 陽性 CD8 陽性 T 細胞の比率が高かった. また、ART が導入された HIV 感染者の CD57 陽性 CD8 陽性 T 細胞の比率は、未治療群より低下しているものの、依然として健常者より高値であった (図 15A). 市販の ELISA キットを用いて測定した血漿中の CMV

IgG 抗体価を図 15B に示す。HIV 感染者 79 例中 72 例，健常者 11 例中 2 例で血漿が利用可能であった。HIV 感染者では，72 例中 68 例（94.4%）で CMV seropositive で，健常者は 2 例ともに seronegative であった。次にこれら免疫老化に関連する 5 因子の相関を図 15C, D に示す。一部の組み合わせを除き，これらの因子は互いに有意な相関関係にあった。そこで，これら 5 因子の重回帰分析を行った。

T 細胞の免疫老化の病態の主軸であり，また，臨床研究で HIV 感染者のワクチン不応との関連を示されている CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率の低下を独立変数とし，CD8 陽性 T 細胞の CD57 陽性頻度，年齢，CMV 抗体価，*ex vivo* の CD8 陽性ナイーブ T 細胞における OX40 の異常発現の 4 因子との関連を分析した（表 3）。CD8 陽性 T 細胞の CD57 陽性頻度 ($p < 0.0001$)，年齢 ($p = 0.0006$)，CD8 陽性ナイーブ T 細胞における OX40 の異常発現 ($p = 0.039$) の 3 因子は独立して免疫老化との関連を示した。



変数	vs. 変数	Spearmanの順位相関係数(ρ)	p値(Prob> ρ)
%57	CMV IgG	0.3831	0.0009*
age	CMV IgG	0.1945	0.1016
age	%57	0.1097	0.3360
%OX40 CD8N	CMV IgG	0.4222	0.0002*
%OX40 CD8N	%57	0.6194	<.0001*
%OX40 CD8N	age	0.3643	0.0010*
%N	CMV IgG	-0.4589	<.0001*
%N	%57	-0.6093	<.0001*
%N	age	-0.5253	<.0001*
%N	%OX40 CD8N	-0.7866	<.0001*

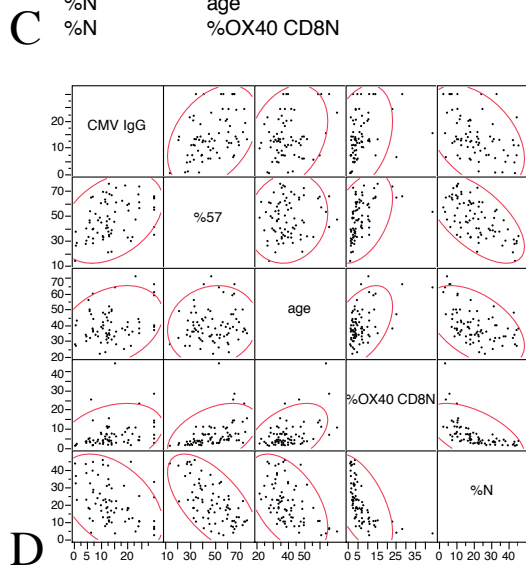


図 15. 本コホートにおける免疫老化に関連する因子の検討

全 CD8 陽性 T 細胞における CD57 陽性細胞の比率の群間比較 (A). 血漿中の CMV IgG 抗体価の群間比較 (B). 免疫免疫老化に関連する 5 因子の全ての組み合わせの Spearman test の相関係数と p 値 (C), 散布図行列 (D).

水平線は中央値を示す. 2 群間差は Mann-Whitney U test, 相関は Spearman test を用いた.

UN : 未治療 HIV 感染者, HVL : 未治療 HIV 感染者高ウイルス群, LVL : 未治療 HIV 感染者低ウイルス群, Tx : 有効な ART が導入された HIV 感染者, HC : 健常者

表 3. CD8 陽性ナイーブ T 細胞比率に影響する免疫老化の各因子の重回帰分析

R2 (coefficient of determination)	0.62					
adjusted R2	0.59					
RMSE	7.5					
p	<0.0001					
independent variables	B	β	t	p (Wald test)	VIF	simple correlation coefficient
%CD57 in total CD8	-0.36	-0.47	-5.2	<0.0001	1.4	-0.681
age	-0.36	-0.32	-3.6	0.0006	1.4	-0.449
CMV IgG titer	-0.14	-0.09	-1.1	0.28	1.3	-0.512
%OX40 in CD8 Naïve	-0.34	-0.2	-2.1	0.039	1.6	-0.800

以上より本研究では新規に HIV 感染者における免疫老化と CD8 陽性ナイーブ T 細胞の OX40 の異常発現の関連を見いだした。

考察

本研究では、免疫老化の程度が異なる感染者由来の T 細胞を用い、HIV 感染者は、健常者で OX40 発現が低い CD8 陽性ナイーブ T 細胞で、OX40 が高発現であることを示し、CD8 陽性ナイーブ T 細胞における異常な OX40 発現と個体の免疫老化が有意に相関を示すことを見出した。また、HIV 感染者では、TCR 刺激による OX40 の発現誘導が高く、易刺激性の状態であることを示した。

前述の OX40 シグナルの作用で、(1) 初感作の際の共刺激で Effector T 細胞の生存を増強する、(2) メモリー T 細胞の生成を増強する、の 2 作用はサブセット分布に影響する可能性がある。既往の OX40 研究の成果から特にサブセット分布に注目すると、OX40L ノックアウト (KO) マウスは野生型マウス (WT) と比較し、メモリー T 細胞比率が低い⁷⁰。反対に OX40L を恒常的に発現する OX40L トランスジェニック (TG) マウスは、Effector memory T 細胞比率が高くなる⁷⁰。同様に抗原に感作されていない野生型マウスを抗 OX40 刺激抗体で処理した場合も、対照群と比較して Effector memory T 細胞比率が高くなる⁷¹。ヒトにおいても概ね同様と考えられる。2013 年に初めてヒトにおける OX40 欠損症が報告⁷²された。古典的 (地中海型) カポジ肉腫を小児期に発症した 19 歳のトルコ人女性で、未知の先天性免疫不全として原因検索の過程で、OX40 の機能喪失型変異をヘテロ接合体でもつ両親から出生し、OX40 完全欠

損症であることが明らかとなった。表現型の1つとしてCD4/CD8陽性ナイーブT細胞比率の増加、CD4/CD8陽性EMT細胞比率の低下を認めた。これらの結果を考え合わせると、HIV感染者では、何らかの機序でCD8陽性ナイーブT細胞に異常なOX40発現が生じ、OX40LTGマウスと同様に、あるいはOX40KOマウスやOX40欠損症と反対に、サブセット分布の異常の一因となっている可能性が示唆される。

ナイーブT細胞でのOX40発現誘導の機序として、(1)胸腺の退縮により新鮮なナイーブT細胞の供給が減り、代償的にhomeostatic proliferationによりナイーブT細胞が維持されることによる質的な変性、(2)サイトカイン刺激等の抗原非依存性刺激 (antigen-independent manner)⁷³によるナイーブT細胞の質的な変性、(3)CD45RA、CCR7の発現によってのみ定義されたナイーブT細胞内の亜集団の量的変化の可能性、(4)OX40発現と分化の時間的な差、などが候補として挙げられる。機序(3)は、CD45RA、CCR7により定義されたナイーブT細胞(以下、古典的ナイーブT細胞とする)はヘテロな集団であり、胸腺より放出されて間もないrecent thymic emigrants (RTE)や、特異抗原によるTCR刺激を経験したにも関わらずCD45RA陽性/CCR7陽性を維持しているmemory stem T cells (TSCM)⁷⁴、など亜集団の存在が明らかとなっているが、何れかの亜集団がOX40陽性である可能性である。機序(4)は、OX40は48時間で発現が誘導されるのに対し、健常者PBMCを用いた検討ではTCR

刺激後 2-7 日程度で集団として次の分化段階へ移行した。持続的な免疫活性化にある HIV 感染者ではナイーブ T 細胞から分化したメモリー T 細胞への turnover が亢進しているため TCR 刺激により活性化と OX40 発現が誘導されているが次の分化段階へ移行する前の集団が観察されている可能性である。この場合、T 細胞分化のターンオーバーの亢進は、ナイーブ T 細胞の消費と TEMRA の増加に繋がるかもしれない。

機序 (3) の古典的ナイーブ T 細胞を亜亜集団に分画する試みは、現時点では「フローサイトメトリーが唯一の手法⁷⁵」と考えられており、表面分子による分画が試みられている。古典的ナイーブ T 細胞に含まれる、抗原未接触、かつ一度も homeostatic proliferation を経験していない、増殖・分化能を完全に維持しているナイーブ T 細胞を Truly Naive と定義した場合、RTE に加え Non-proliferated long lived Naive が想定され、CD31 がそのマーカーかもしれない⁷⁵。また、TSCM は、2011 年にマウスで報告され、古典的ナイーブ T 細胞のうち CD95 (Fas ; デスレセプター) 陽性で定義される亜亜集団でナイーブ T 細胞と CM T 細胞の中間の遺伝子発現と機能を示す。市販の抗 CD31 抗体、抗 CD95 抗体を用い、CD8 陽性 T 細胞について Truly Naive の亜亜集団を検出できないか、検討を行った。しかし、CD31 は細胞分裂により陰転化することが期待されるが、CD4 陽性 T 細胞では分化が進むと陰転化するが CD8 陽性 T 細胞においては陽性のままで、少なくとも CD8 陽性古典的ナイーブ T 細胞の分画には有用で

なかった. 抗 CD95 抗体も古典的ナイーブ T 細胞における異常な表面分子との関連を見い出すことは出来なかった.

表 4. CCR7, CD45RA による古典的な T 細胞サブセット画分と古典的ナイーブ T 細胞内の亜集団の関係

CCR7, CD45RAによる T細胞サブセットの同定	概念的な亜集団	実体	CD31	CD95	Trec	テロメア長
古典的ナイーブT細胞	Truly Naive	RTE	+	-	→	
		Non-proliferated long lived N	+?	-?	→?	
	Proliferated N	homeostatic proliferation	-?	-?	↓	
	Ag experienced N	Stem cell memory	?	+	↓?	
	Memory	サイトカイン刺激で, 分化中	-?	+?	↓?	
		弱いTCR刺激で, 分化中	-?	+?	↓?	
Centaral memory T細胞			-	+	↓	
Effector memory T細胞			-	+	↓	
Terminal effector memory reexpression CD45RA T細胞			-	+	↓	

文献^{74,75}を参考に申請者作成.

第 2 部

有効な ART が導入された HIV 感染者において
prematurely terminated short HIV-1 transcripts は、
T 細胞の持続的な免疫活性化に相関する

要旨

HIV 感染症において、細胞性免疫不全と共に、持続的に免疫系が活性化しており、非 AIDS 死亡や臓器障害に関連する。さらに、持続的な免疫活性化は有効な ART が導入された後も持続する。また、HIV 感染細胞にはウイルス転写が不完全な段階で停止した STs が存在することが知られ、転写因子との関連が研究されている。

本研究では、有効な ART によりウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者において、STs と T 細胞の持続的な免疫活性化のマーカーである CD8 陽性 T 細胞中の HLA-DR,CD38 共発現比率が相関を示すことを示した (図 20)。また、ART 導入前の T 細胞の活性化レベルが高い患者では、ART を導入しても不完全なプロウイルスの転写が十分に抑制されないことを明らかにした。

この結果は、STs がウイルス学的、免疫学的な要素を包含した transcriptional activity のマーカーであり、また、ART 中の HIV 感染者の一部で HIV 複製が原因で T 細胞の持続的な活性化を来すことを示唆している。

序文

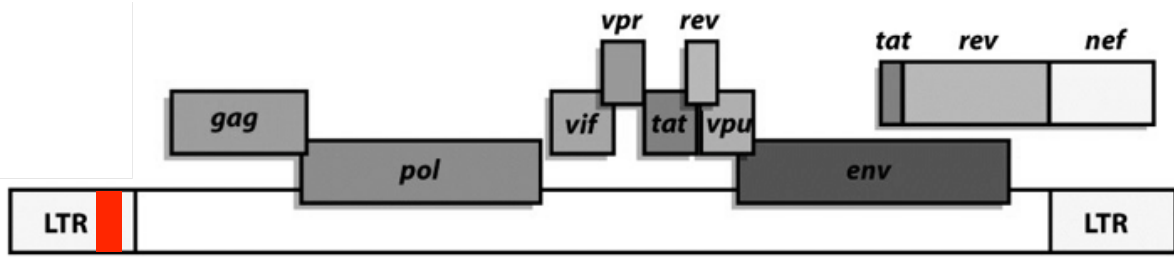
HIV 感染症の急性期に、HIV は急速に増殖し高ウイルス量のウイルス血症と CD4 数の急激な減少とを認めるが、感染直後に HIV に対する特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が立ち上がり、数週間後にウイルス量は減少する⁷⁶。しかし、HIV は完全に排除されず、免疫系と拮抗した慢性期となる⁷⁶。この拮抗状態は平均 10 年程度で破綻し、AIDS 期に移行する。破綻のウイルス側の要因として、CTL や中和抗体に対するエスケープ・ウイルスが増殖すること、免疫側の要因として、CD4 数が緩やかに減少すること、が良く知られるが、加えて、持続的に免疫系が活性化していることも主要な病態である⁷⁶。持続的な免疫活性化が HIV 感染症に与える影響として、①HIV が感染している CD4 陽性 T 細胞や単球系細胞の活性化により HIV 産生が増加する⁵¹、②HIV 産生が増加することで主な産生細胞である CD4 陽性 T 細胞の消失と代償的な産生による代謝回転の亢進、③活性化が持続することで免疫担当細胞上に抑制性マーカーの発現などを亢進させ免疫担当細胞の疲弊・老化を介して機能異常を引き起こす⁷⁷、④リンパ節における濾胞樹状細胞の脱落と線維化が進行する⁷⁸、などが挙げられる。また、持続的な免疫活性化は、CVD⁴⁴ や肝疾患⁷⁹、全死亡⁴³ など HIV 感染症以外の臓器障害にも関与する。更に、持続的な免疫活性化は有効な ART が導入された後も持続する^{50,51}。

T細胞の持続的な活性化に注目すると, CD38 陽性 HLA-DR 陽性 (CD38+HLA-DR+) T細胞比率が, 疫学的に臨床的なイベントとの関連を示された活性化マーカーとして広く用いられている. ART 導入前の CD38+HLA-DR+CD8 陽性 T細胞比率が高いほどウイルス量が高く⁵¹, ART 導入後の CD4 数の回復が悪い⁴³. CD38+HLA-DR+CD4/8 陽性 T細胞比率が高いほど頸動脈病変は増加する⁴⁴. ART 導入によりウイルス血症が抑制された HIV 感染者の CD38+HLA-DR+CD4/8 陽性 T細胞比率は有意に低下するが, しかし, 健常者より有意に高い^{33,51}. ART 導入後の CD38+HLA-DR+CD8 陽性 T細胞比率が高いほど, 死亡率が高い⁴³.

ART が導入され, ウイルス量が検出限界以下となった患者の一部は, 低レベルのウイルス複製が続いている⁸⁰. このようなウイルス・リザーバーのサイズ, あるいは活動性を定量する手法として血漿中の微量 HIV-RNA 検出, PBMC 中の HIV-DNA 検出, Viral outgrowth assay などが提唱されている⁸¹が, 同意を得たものはない. また, 測定操作は煩雑で多量の採血を要する. そのため, 簡便で, 少量の臨床検体を用いて測定可能な方法の開発が待たれている.

In vitro の検討で, HIV 感染細胞にはウイルス転写が不完全な段階で停止し, HIV RNA の初めの 60-70 塩基よりなる prematurely terminated short HIV-1 transcripts (STs) が存在することが知られている (図 16)⁸²⁻⁸⁴.

A



B

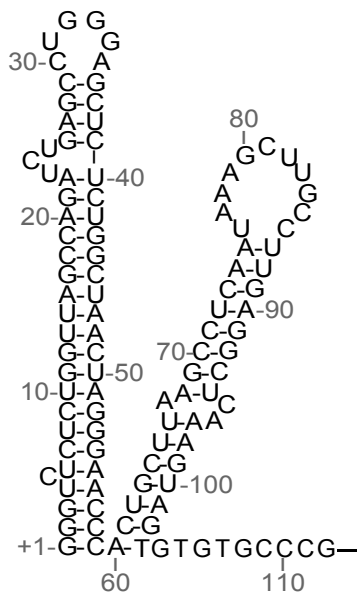


図 16. HIV ゲノムにおける prematurely terminated short HIV-1 transcripts (STs) の位置を示す (A). HIV ゲノムのはじめの 112 ヌクレオチドの 2 次構造を示す (B). 0-70 塩基程度までの不完全なウイルス転写である STs が提唱されている. STs は, 大部分が LTR 内の TAR と一致し, TAR のステムループ直後で転写が停止したものである. A : 文献⁶³より引用しマーカーを付加した, B : 投稿中の論文より引用した.

HIV プロウイルスの 5'LTR の転写開始部位にはヌクレオソーム-1 (nuc-1) が隣接している^{85,86}。nuc-1 の弛緩は、更なるウイルス転写の伸長に必須であり^{86,87}、クロマチン構造を弛緩する宿主因子として、SWI/SNF chromatin remodeling complex (SWI/SNF complex) がウイルス伸長に影響することが知られている⁸⁸⁻⁹⁰。共同研究者である微生物化学研究所の水谷壮利博士、石坂彩博士は、Brm 型 SWI/SNF complex が、nuc-1 の弛緩と HIV 転写の伸長に必要であることを報告⁹¹している。宿主の nuclear factor κ B (NF- κ B) や nuclear factor of activated T cells (NFAT) は histone acetyltransferases (HATs) や SWI/SNF complex を LTR にリクルートすることでウイルス転写の伸長を増強する^{92,93}。しかし、休止期の CD4 陽性 T 細胞では NF- κ B, NFAT は細胞質に隔離されており、Brm の発現はダウンレギュレートされている⁹¹ため、伸長できなかった転写産物が細胞内に蓄積する。ゆえに STs は、感染細胞の活性化・休止や、ウイルス転写の活性を反映する初期産物として、HIV LTR の transcriptional activity のマーカーとなりうる。しかし、STs と臨床的な因子や免疫活性化の関連については知られていない。

そこで水谷博士らは、東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科に通院中の HIV 感染者由来の検体を用い、PBMC 中の STs の測定を行った。

感染免疫内科より提供された患者由来の PBMC より、200 ヌクレオチド以下の短鎖 RNA が抽出され、cDNA を合成、real time PCR により STs が定量された。STs は 1×10^6

PBMC あたりのコピー数で表現され、検出限界は 100 copies/10⁶ PBMCs 程度である。

患者検体を用いた解析で、2~6 log¹⁰ copies/10⁶ PBMCs の範囲に分布する。定量的な

STs を用いて STs のレベルに応じ、ST 陰性群 (ST-), STs が < 1.5x10⁴ copies/10⁶ PBMCs

の ST 弱陽性群 (ST+), STs が ≥ 1.5x10⁴ copies/10⁶ PBMCs の ST 強陽性群 (ST++) の

3 群に分類した。

未治療 HIV 感染者 164 例における STs 解析と CD4 数、ウイルス量との関連を図 17 に示す。未治療 HIV 感染者において、十分に伸長したウイルス転写 (Elongated Transcript) が検出された 16 例中 15 例 (93.8%) で STs が検出された (図 17A)。また、Elongated Transcript が検出されなかった 148 例中 106 例 (71.6%) で STs が検出された (図 17A)。CD4 数と STs に注目すると ST++群は、ST+群と ST-群と比較し CD4 数が低く (図 17B)、ST 陽性例では STs と CD4 数には負の相関を認めた (図 17C)。ウイルス量と STs に注目すると、ST++群は、ST-群と比較しウイルス量が高かったが (図 17D)、STs とウイルス量には有意な相関を認めなかった (図 17E)。

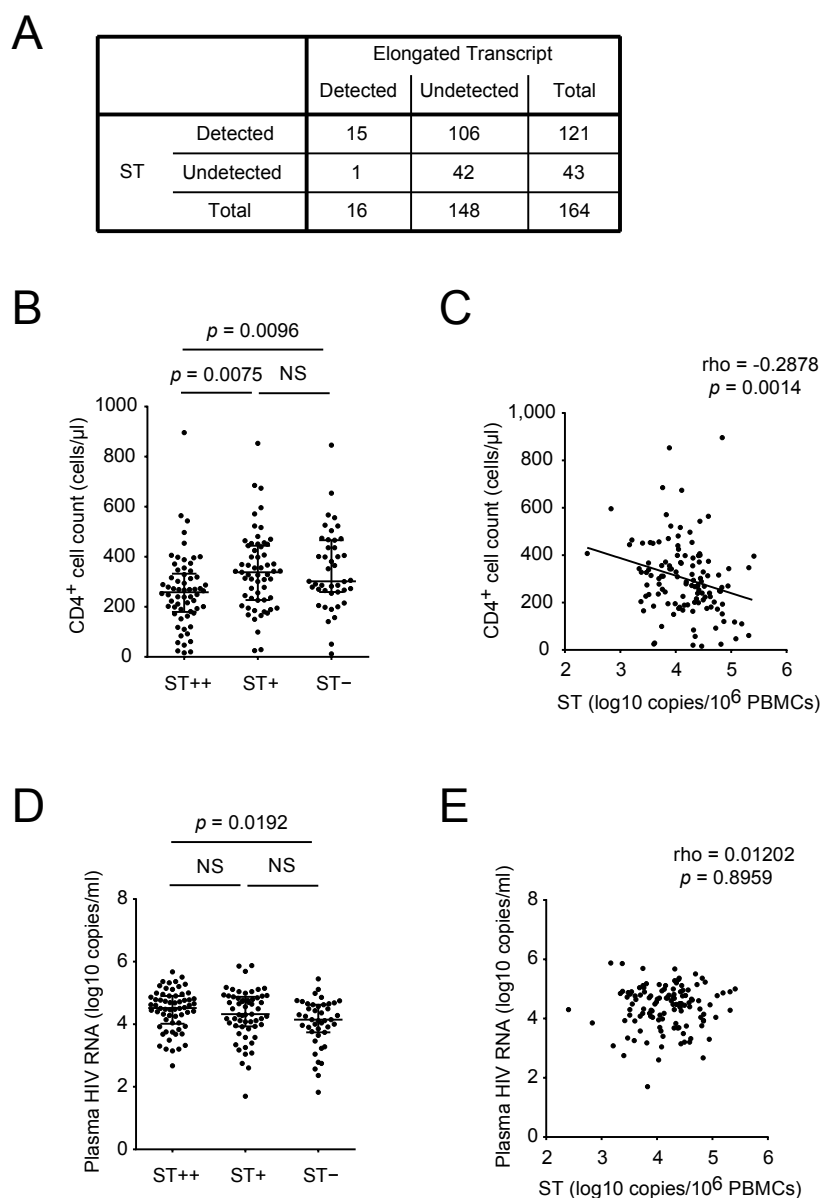


図 17. 未治療 HIV 感染者における STs 解析と CD4 数，ウイルス量との関連。

未治療 HIV 感染者 164 例における STs と Elongated Transcript 検出 (A)．未治療 HIV 感染者 164 例における CD4 数と STs の群間比較 (B)．STs が検出された未治療 HIV 感染者 121 例における CD4 数と STs の相関 (C)．未治療 HIV 感染者 164 例におけるウイルス量と STs の群間比較 (D)．STs が検出された未治療 HIV 感染者 121 例におけるウイルス量と STs の相関 (E)．

水平線は中央値と四分位値を示す．2 群間差は Kruskal-Wallis test，相関は Spearman test を用いた．

ST- : ST 陰性群，ST+ : STs が $< 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 弱陽性群，ST++ : STs が $\geq 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 強陽性群 (ST++)．

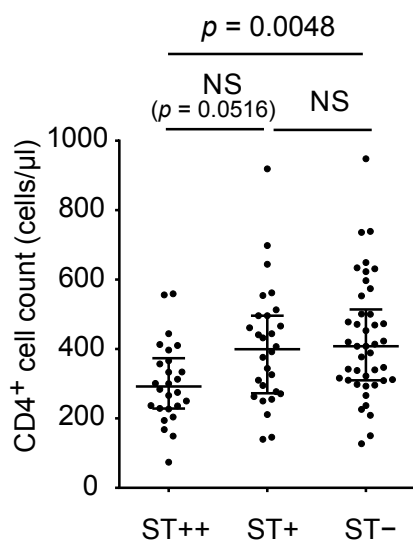
投稿中の論文より引用した．

有効な ART によりウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者 96 例における STs 解析と CD4 数との関連を図 18 に示す。ウイルス量が検出限界以下となった 96 例中 54 例 (56.3%) で STs が検出され、STs は血漿 HIV RNA 検出より高感度であることが示唆された (図 18A)。1 例のみ Elongated Transcript と STs が共に検出された (図 18A)。また、Elongated Transcript が検出されなかった 95 例中 53 例 (55.8%) で STs が検出された (図 18A)。CD4 数と STs に注目すると ST++群は、ST-群と比較し CD4 数が低く (図 18B)、ST 陽性例では STs と CD4 数には負の相関を認めた (図 18C)。

A

		Elongated Transcript		
		Detected	Undetected	Total
ST	Detected	1	53	54
	Undetected	0	42	42
	Total	1	95	96

B



C

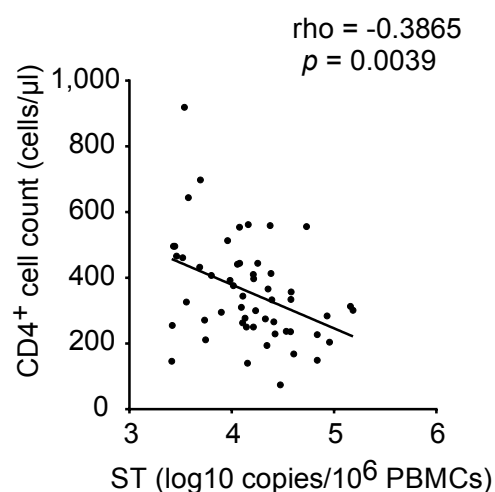


図 18. 有効な ART によりウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者における STs 解析と CD4 数との関連.

治療群 HIV 感染者 96 例における STs と Elongated Transcript 検出 (A).

治療群 HIV 感染者 96 例における CD4 数と STs の群間比較 (B). STs が検出された未治療 HIV 感染者 54 例における CD4 数と STs の相関 (C).

水平線は中央値と四分位値を示す. 2 群間差は Kruskal-Wallis test, 相関は Spearman test を用いた.

ST- : ST 陰性群, ST+ : STs が $< 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 弱陽性群, ST++ : STs が $\geq 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 強陽性群 (ST++).

投稿中の論文より引用した.

以上より HIV 感染者における STs は、未治療・治療群共に CD4 数との関連が示唆されること、また、transcriptional activity のマーカーである STs の原理より、STs と T 細胞の活性化の関連を解析する着想を得た。ウイルス血症の影響を排除し、STs と T 細胞の活性化の関連を解析するため、有効な ART によりウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者において、T 細胞の活性化を定量することとした。

有効な ART が導入された HIV 感染者における STs のレベルと T 細胞の持続的な活性化が有意に相関を示すことや、ART 導入前の T 細胞の活性化レベルが高い患者では ART 導入による STs の低下や陰転化が生じにくい事を示した。

材料と方法

HIV 感染者

東京大学医科学研究所附属病院外来に通院中の HIV 感染者で書面によるインフォームドコンセントが得られた患者を対象とした。この研究は東京大学医科学研究所（承認番号：20-47-210521, 20-31-1120）、および国立感染症研究所（承認番号：571, 572）の倫理委員会の承認を得た。

未治療 HIV 感染者（未治療群）は、一度も ART が導入されていない HIV 感染者とした。有効な ART が導入された HIV 感染者（治療群）は、ウイルス量が検出限界以下となったものを収集した。

末梢血単核球（PBMC）の分離・保存と解凍

採取された末梢血は、同日中に 1500rpm, 20 分遠心後、血漿を分離し-80°Cで保存した。さらに血球成分から、Ficoll-Paque PLUS（GE Healthcare）による密度勾配遠心で、PBMC を分離し、洗浄後、液体窒素中で保存された。凍結 PBMC は、37°Cの温浴槽で解凍後に 10%非働化ウシ胎児血清, 100U/ml ペニシリン, 100ug/ml ストレプトマイシン, 2mM L-グルタミン, 10mmol/L Hepes buffer (Sigma) を添加した Roswell Park

Memorial Institute 1640 (RPMI1640) 培地に懸濁され、37°C、5%CO₂ で一晩培養後にフローサイトメトリーに用いた。

フローサイトメトリー

PBMC の分画と表面分子解析は、BD FACSAria cell sorter (Aria) (BD Bioscience) を用いて行った。PBMC は染色前に FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) で 4°C、10 分処理された。Aria から出力された FCS ファイルは FlowJo (version 8.8.7, Tree Star) で解析した。

抗体と死細胞染色, fluorescence-minus-one (FMO) コントロール

FCM 解析は以下の蛍光抗体を用いた。

CD3-Brilliant Violet 510, CD4-PerCP, CD8-PerCP, CD45RA-APC-Cy7, CCR7-PE-Cy7,

HLA-DR-APC, CD38-PE, PD-1-FITC, CD57-Pacific Blue (BioLegend)。

CD45RA, CCR7, HLA-DR, CD38, PD-1, CD57 の FMO コントロールを作成⁶⁷し、

比較して発現を評価した。

propidium iodide (BD) を利用して死細胞を同定した。

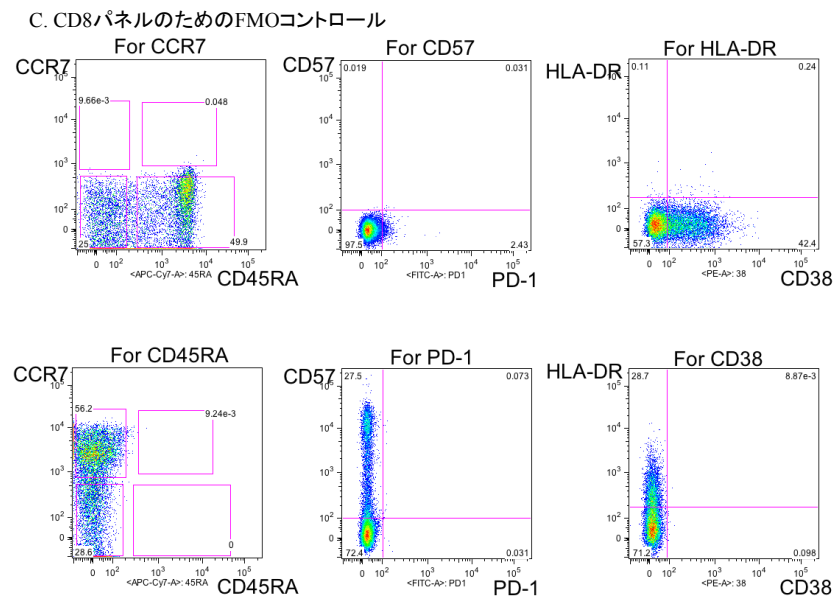
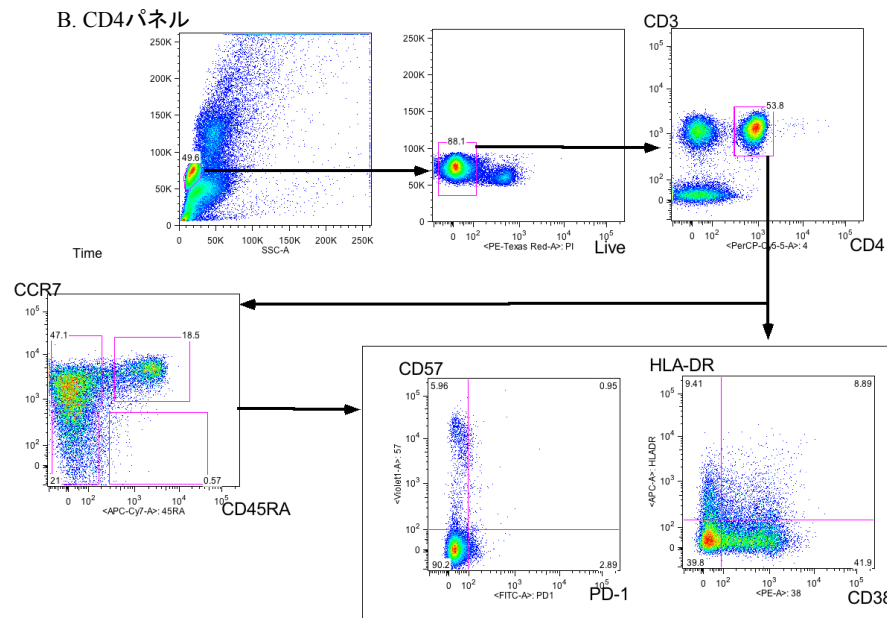
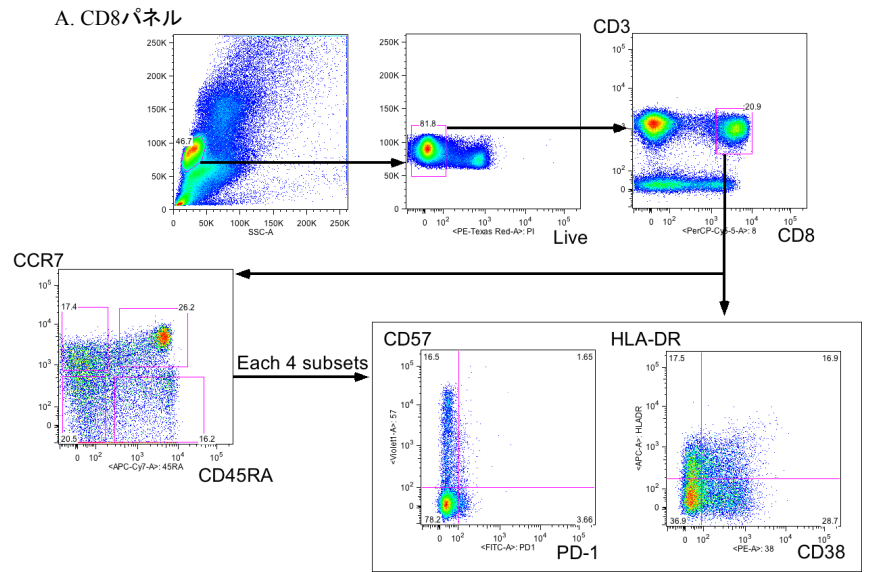
統計解析

相関は Spearman test, 2 群間差は Mann–Whitney U test, 多群間差は Kruskal-Wallis test を用い, Prism 6 (Graphpad Software) を使用した. 多変量解析は JMP Pro 10.0 (SAS Institute Inc.) を使用した. 全ての検定で, 有意水準として $P = 0.05$ を用いた.

結果

有効な ART が導入された HIV 感染者における T 細胞の持続的な活性化・疲弊・老化と STs との関係

有効な ART が導入されウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者における T 細胞の持続的な活性化と STs との関連を検討するため、STs が測定された同時の採血由来の PBMC が利用できた 54 例で、T 細胞の活性化マーカーである HLA-DR, CD38, 疲弊マーカーである PD-1, 老化マーカーである CD57 を CD4/8 陽性 T 細胞とそのサブセット毎にフローサイトメトリーで解析した (表 5)。事前の検討で CD4 数に有意差を認めた、ST 強陽性群と ST 陰性、ST 弱陽性群に群分けし、解析を行った。



D. CD4パネルのためのFMOコントロール

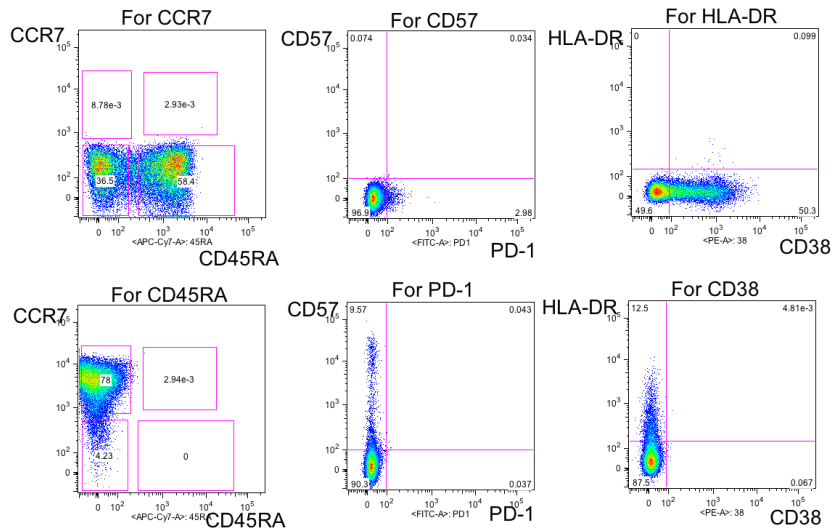


図 19. Gating strategy と FMO コントロール

CD8 陽性 T 細胞パネル (A), CD4 陽性 T 細胞パネル (B) の健常者 1 例の FCM による表面分子解析の Gating strategy を示す. リンパ球ゲート, 死細胞除去後, CD3/8 (A), あるいは CD3/4 (B) と CCR7/CD45RA で展開し, 全 CD4/8 陽性細胞と CD4/8 陽性 T 細胞の 4 サブセットにおける T 細胞の活性化マーカー (HLA-DR, CD38), 疲弊マーカー (PD-1), 老化マーカー (CD57) 発現を評価した. 検体間, 群間のゲーティングは共通である.

CD8 陽性 T 細胞パネル (C), CD4 陽性 T 細胞パネル (D) の FMO コントロールを示す. 表面分子の発現を正確に評価するため, 評価したい 1 表面分子を除いた (fluorescence-minus one;FMO) 全表面分子で染色したサンプル (FMO コントロール) を各々の表面分子で作成し, ネガティブコントロールとしてゲーティングを行った.

表 5. 全 CD4/8 陽性 T 細胞における表面分子発現の STs 群間差

	Median (IQR)		<i>p</i> value ^a
	ST++ <i>n</i> = 18	ST+ & ST- <i>n</i> = 36	
Percentages among total CD4⁺ cells			
PD-1 ⁺	4.74 (3.24 – 7.04)	3.89 (2.55 – 7.21)	0.3051
CD57 ⁺	14.15 (11.30 – 17.18)	12.25 (9.18 – 19.98)	0.7816
HLA-DR ⁺	21.40 (16.90 – 31.08)	19.05 (15.13 – 27.05)	0.2372
CD38 ⁺	63.85 (59.85 – 74.90)	65.60 (55.30 – 73.98)	0.9385
HLA-DR+ CD38 ⁺	12.15 (9.71 – 15.58)	11.60 (8.86 – 14.65)	0.5095
Percentages among total CD8⁺ cells			
PD-1 ⁺	2.29 (1.55 – 3.17)	2.76 (1.66 – 4.37)	0.4694
CD57 ⁺	62.15 (47.08 – 67.90)	50.60 (41.00 – 61.08)	0.0518
HLA-DR ⁺	48.05 (31.20 – 58.10)	31.55 (24.90 – 37.75)	0.0037 **
CD38 ⁺	63.45 (53.10 – 75.95)	69.10 (61.33 – 75.90)	0.4638
HLA-DR+ CD38 ⁺	29.95 (19.25 – 39.30)	23.60 (18.13 – 28.0)	0.0432 *

^a*P* values were calculated using Mann–Whitney test.

**P* values less than 0.05.

***P* values less than 0.01.

有効な ART が導入されウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者における T 細胞の活性化マーカー (HLA-DR, CD38), 疲弊マーカー (PD-1), 老化マーカー (CD57) を STs の各群で比較した。

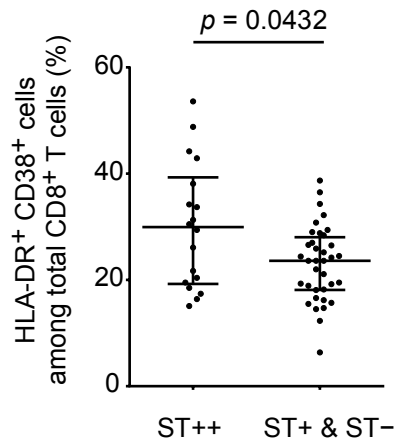
2 群間差は Mann-Whitney U test を用いた。

ST- : ST 陰性群, ST+ : STs が $< 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 弱陽性群, ST++ : STs が $\geq 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 強陽性群 (ST++)。

CD8 陽性 T 細胞における CD57 は、ST 強陽性群が、ST 陰性群、ST 弱陽性群と比較し、高い傾向にあったが有意ではなかった(表 5)。CD4/8 陽性 T 細胞における PD-1、CD4 陽性 T 細胞における CD57 陽性頻度、STs 群間で有意な差を認めなかった(表 4)。

活性化マーカーである CD8 陽性 T 細胞の HLA-DR、CD38 共陽性比率は、ST 強陽性群が、ST 陰性群、ST 弱陽性群と比較し、有意に高かった(表 5, 図 20A)。また、54 例中 STs が陽性であった 34 例において、STs の定量値と T 細胞の活性化は正の相関を示した(図 20B)。

A



B

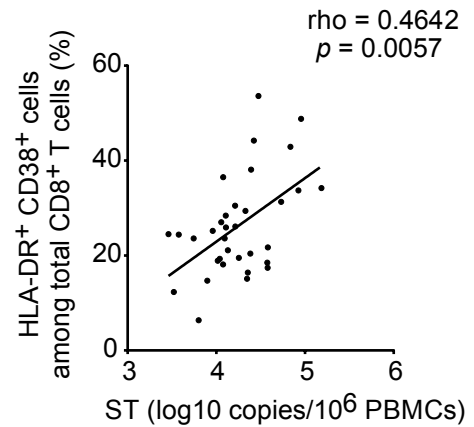


図 20. 有効な ART が導入されウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者における T 細胞の活性化マーカーは、STs と有意に相関する。

CD8 陽性 T 細胞の HLA-DR, CD38 共陽性比率の群間差 (A). STs が陽性となった 34 例における, STs の定量値と T 細胞の活性化の相関 (B).

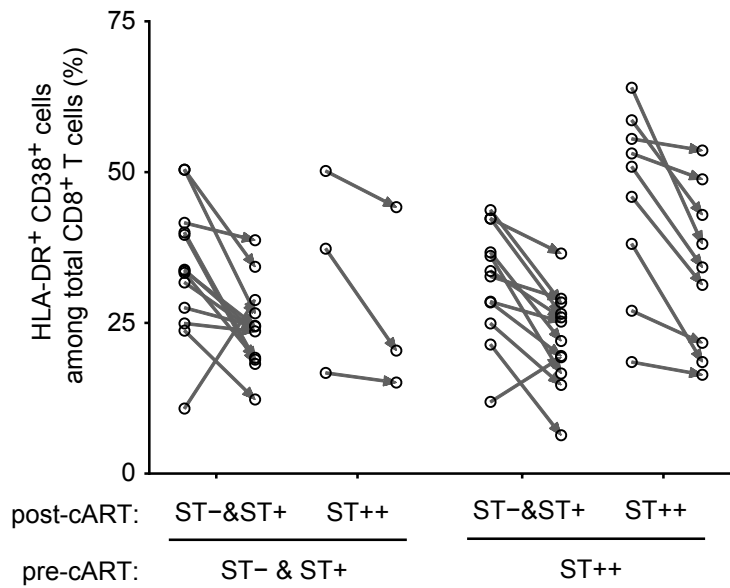
水平線は中央値と四分位値を示す. 2 群間差は Mann-Whitney U test, 相関は Spearman test を用いた.

ST- : ST 陰性群, ST+ : STs が $< 1.5 \times 10^4$ copies/10⁶ PBMCs の ST 弱陽性群, ST++ : STs が $\geq 1.5 \times 10^4$ copies/10⁶ PBMCs の ST 強陽性群 (ST++).

ART 導入前に T 細胞の活性化が高い症例では, ART による STs の陰転化が障害される

有効な ART により T 細胞の持続的な活性化や ST 定量値の低下が期待されるにもかかわらず, 治療群の HIV 感染者の半数以上で T 細胞の持続的な活性化と STs 定量値との正の相関が示された. 次に, ART の導入がそれらに与えた影響を評価するため, 治療群 54 例の内, ART が導入される直前 1 年間の PBMC が保存され, STs と CD8 陽性 T 細胞の活性化の評価が可能であった 37 例で, STs と CD8 陽性 T 細胞の活性化の解析を行った. ART 導入前後の CD8 陽性 T 細胞の活性化の動態を STs 群間ごとに示す (図 21A). 37 例中 35 例 (94.6%) で ART 導入により CD8 陽性 T 細胞の活性化は低下している (図 21A). 群間で比較すると, 特に, 治療前に STs 強陽性かつ治療後にも STs 強陽性であった群で, 治療前の CD8 陽性 T 細胞の活性化が高かった (図 21B). ART 導入前に T 細胞の活性化が高い症例では, ART による STs の陰転化が障害される可能性を示唆している.

A



B

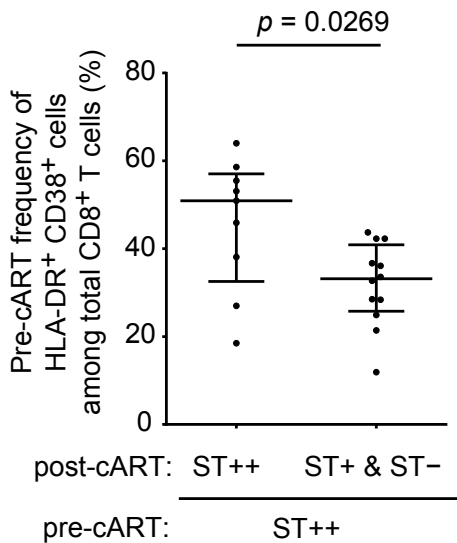


図 21. ST 群間ごとの ART 導入前後の CD8 陽性 T 細胞の活性化の動態.

治療前後の検体が利用でき, 治療後によりウイルス量の検出限界以下を達成できた 37 例における ART 導入前 (pre-ART) から導入後 (post-ART) の CD8 陽性 T 細胞の活性化の動態 (A). STs 群毎の治療前の CD8 陽性 T 細胞の活性化の群間比較 (B).

水平線は中央値と四分位値を示す. 2 群間差は Mann-Whitney U test を用いた.

pre-ART : ART 導入前, post-ART : 導入後, ST- : ST 陰性群, ST+ : STs が $< 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 弱陽性群, ST++ : STs が $\geq 1.5 \times 10^4$ copies/ 10^6 PBMCs の ST 強陽性群 (ST++).

考察

既報、および共同研究者による患者検体を用いた事前の検討より、STs は、CD4 数と関連のある、ウイルス・リザーバーのマーカーとなり得ることが示されていた。本研究では、さらに有効な ART が導入されウイルス量が検出限界以下となった HIV 感染者において、T 細胞の持続的な活性化・疲弊・老化と STs との関係を検討し、STs が CD8 陽性 T 細胞の HLA-DR, CD38 陽性比率と正の相関を示すことを明らかにした。また、ART 導入前に T 細胞の活性化が高い症例では、ART による STs の陰転化が障害される可能性を示した。

本研究は、STs が、リザーバー細胞というウイルス学的、かつ、T 細胞活性化による転写という免疫学的な要素を包含した、transcriptional activity のマーカーであることが強く支持するものである。また、ART 中の HIV 感染者の一部において、HIV 複製が原因で T 細胞の持続的な活性化を来すことを示唆している。本研究の小集団では証明が困難であるが、治療中の STs 陽性患者では non-AIDS イベントや生命予後が不良な可能性がある。

ART 導入前に T 細胞の活性化が高く、かつ、STs 強陽性である症例の一部で、ART 導入後も両者の回復がみられていない患者は、ART では回復できないウイルス学的、免疫学的な病態にあることが示唆される。今後、ART 導入 HIV 感染者の予後改善を目指す際に、ハイリスク患者群の同定や介入の効果を評価するマーカーとして STs は

有用と考えられた.

まとめ

本研究では、最近注目されている HIV 感染者の免疫系の持続的な活性化と老化について、臨床検体を用いて T 細胞に注目して研究した。第 1 部では、HIV 感染者の CD8 陽性 Naive T 細胞における OX40 の異常発現と免疫老化の関連を示し、第 2 部では、ART によりウイルスが抑制されている HIV 感染者でも、一部で不完全な HIV 複製による T 細胞の持続的な活性化とを来していることを transcriptional activity との関連で示した。

今後、第 1 部の発展として、概ね 35 歳以下の若年 HIV 感染者で免疫老化が強い患者と、健常若年者、健常高齢者の CD8 陽性 Naive T 細胞をマイクロアレイや次世代シーケンサーによる網羅的な解析を行い比較することで、(1) HIV 感染による免疫老化の機序、や (2) 免疫老化が CD8 陽性 Naive T 細胞の機能やその後の分化に与える影響、また、(3) HIV 感染が原因の免疫老化と加齢が原因の免疫老化の相違点を明らかにすることが期待される (図 22)。免疫老化の機序を同定した場合、それを標的とした阻害薬を探索し、あるいは、健常高齢者へも応用できるかもしれない。老化に関連した経路として mTOR 経路が良く知られている。幼少期より感染症を繰り返す家系で PI3K-Akt-mTOR 経路の機能獲得型変異と持続活性化があり、HIV 感染者と類似した T 細胞の老化を認め、mTOR 阻害薬により免疫老化が改善した報告⁹⁴がある。mTOR

阻害薬が, 現在のアスピリンやスタチンの様に免疫系を介した作用で老化に関連した疾患の予防に使われるかもしれない.

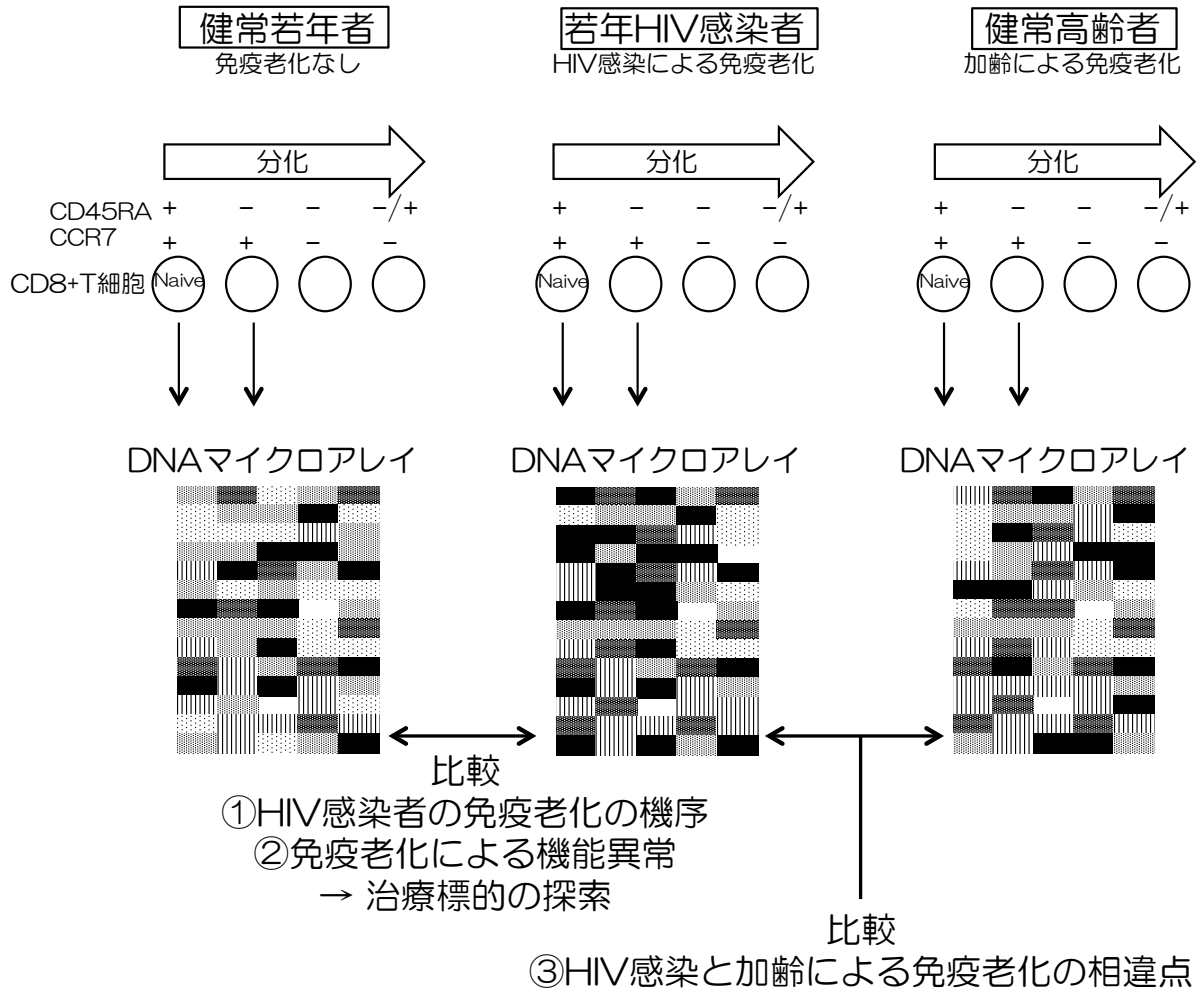


図 22. 若年 HIV 感染者，健常若年者，健常高齢者の CD8 陽性 Naive T 細胞を網羅的に解析し比較する構想. 申請者作成.

謝辞

医学の発展を期し、本研究のために検体を提供して頂いた、東京大学医科学研究所附属病院の患者に敬意と心より感謝を申し上げます。

本研究のご指導と学生の身分のご支持を賜りました、東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野および同附属病院感染免疫内科の岩本愛吉教授（現日本医療研究開発機構）、東京大学大学院医学系研究科生体防御感染症学および同附属病院感染症内科の四柳宏准教授に心より感謝を申し上げます。

日々の研究活動や実際の研究手技などを一からご指導頂きました、東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野の立川（川名）愛准教授（現国立感染症研究所）に心より感謝を申し上げます。

第2部で共同研究を行い、ウイルス学的な知見をご教示頂いた微生物化学研究所の水谷壮利博士、石坂彩博士に心より感謝を申し上げます。

全ての臨床業務から開放し自由に研究をさせて頂き、また、多忙な臨床の時間を割いてインフォームド・コンセント、検体の収集などにご協力いただきました東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科の藤井毅先生（現東京医科大学）、鯉渕智彦先生、中村仁美先生、古賀道子先生、清水少一先生、菊地正先生、安達英輔先生、初期・後

期研修医の先生方に感謝を申し上げます.

日々の研究生活でお世話になりました東京大学医科学研究所感染症分野のスタッフ, 学生, また, 研究にご協力頂いた東京大学医科学研究所附属病院のスタッフに感謝を申し上げます.

佐藤秀憲

引用文献

1. Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, (Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia, PA, 2010).
2. Fauci, A.S., Pantaleo, G., Stanley, S. & Weissman, D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* **124**, 654-663 (1996).
3. UNAIDS. Fact sheet: 2014 statistics. (UNAIDS, Geneva, 2015).
4. Palella, F.J., Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J. & Holmberg, S.D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**, 853-860 (1998).
5. Hogg, R.S., O'Shaughnessy, M.V., Gataric, N., Yip, B., Craib, K., Schechter, M.T. & Montaner, J.S. Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals. *Lancet* **349**, 1294 (1997).
6. Wong, K.H., Chan, K.C. & Lee, S.S. Delayed progression to death and to AIDS in a Hong Kong cohort of patients with advanced HIV type 1 disease during the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **39**, 853-860 (2004).
7. Crum, N.F., Riffenburgh, R.H., Wegner, S., Agan, B.K., Tasker, S.A., Spooner, K.M., Armstrong, A.W., Fraser, S., Wallace, M.R. & Triservice, A.C.C. Comparisons of causes of death and mortality rates among HIV-infected persons: analysis of the pre-, early, and late HAART (highly active antiretroviral therapy) eras. *J Acquir Immune Defic Syndr* **41**, 194-200 (2006).
8. Ortiz, G.M., Wellons, M., Brancato, J., Vo, H.T., Zinn, R.L., Clarkson, D.E., Van Loon, K., Bonhoeffer, S., Miralles, G.D., Montefiori, D., Bartlett, J.A. & Nixon, D.F. Structured antiretroviral treatment interruptions in chronically HIV-1-infected subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13288-13293 (2001).
9. Grunfeld, C., Delaney, J.A., Wanke, C., Currier, J.S., Scherzer, R., Biggs, M.L., Tien, P.C., Shlipak, M.G., Sidney, S., Polak, J.F., O'Leary, D., Bacchetti, P. & Kronmal, R.A. Preclinical atherosclerosis due to HIV infection: carotid intima-medial thickness measurements from the FRAM study. *AIDS* **23**, 1841-1849 (2009).
10. Lo, J., Abbara, S., Shturman, L., Soni, A., Wei, J., Rocha-Filho, J.A., Nasir, K. &

- Grinspoon, S.K. Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS* **24**, 243-253 (2010).
11. Currier, J.S., Lundgren, J.D., Carr, A., Klein, D., Sabin, C.A., Sax, P.E., Schouten, J.T., Smieja, M. & Working, G. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation* **118**, e29-35 (2008).
 12. Triant, V.A., Lee, H., Hadigan, C. & Grinspoon, S.K. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2506-2512 (2007).
 13. Freiberg, M.S., Chang, C.C., Kuller, L.H., Skanderson, M., Lowy, E., Kraemer, K.L., Butt, A.A., Bidwell Goetz, M., Leaf, D., Oursler, K.A., Rimland, D., Rodriguez Barradas, M., Brown, S., Gibert, C., McGinnis, K., Crothers, K., Sico, J., Crane, H., Warner, A., Gottlieb, S., Gottdiener, J., Tracy, R.P., Budoff, M., Watson, C., Armah, K.A., Doebler, D., Bryant, K. & Justice, A.C. HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA Intern Med* **173**, 614-622 (2013).
 14. Paisible, A.L., Chang, C.C., So-Armah, K.A., Butt, A.A., Leaf, D.A., Budoff, M., Rimland, D., Bedimo, R., Goetz, M.B., Rodriguez-Barradas, M.C., Crane, H.M., Gibert, C.L., Brown, S.T., Tindle, H.A., Warner, A.L., Alcorn, C., Skanderson, M., Justice, A.C. & Freiberg, M.S. HIV infection, cardiovascular disease risk factor profile, and risk for acute myocardial infarction. *J Acquir Immune Defic Syndr* **68**, 209-216 (2015).
 15. Monforte, A., Abrams, D., Pradier, C., Weber, R., Reiss, P., Bonnet, F., Kirk, O., Law, M., De Wit, S., Friis-Moller, N., Phillips, A.N., Sabin, C.A., Lundgren, J.D. & Data Collection on Adverse Events of Anti, H.I.V.D.S.G. HIV-induced immunodeficiency and mortality from AIDS-defining and non-AIDS-defining malignancies. *AIDS* **22**, 2143-2153 (2008).
 16. Grulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O. & Vajdic, C.M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* **370**, 59-67 (2007).
 17. Choi, A.I., Shlipak, M.G., Hunt, P.W., Martin, J.N. & Deeks, S.G. HIV-infected persons continue to lose kidney function despite successful antiretroviral therapy. *AIDS* **23**, 2143-2149 (2009).
 18. Crothers, K., Butt, A.A., Gibert, C.L., Rodriguez-Barradas, M.C., Crystal, S., Justice,

- A.C. & Veterans Aging Cohort 5 Project, T. Increased COPD among HIV-positive compared to HIV-negative veterans. *Chest* **130**, 1326-1333 (2006).
19. Puoti, M., Torti, C., Bruno, R., Filice, G. & Carosi, G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. *J Hepatol* **44**, S65-70 (2006).
 20. Puoti, M., Bruno, R., Soriano, V., Donato, F., Gaeta, G.B., Quinzan, G.P., Precone, D., Gelatti, U., Asensi, V., Vaccher, E. & Group, H.H.C.I.-S. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *AIDS* **18**, 2285-2293 (2004).
 21. Brown, T.T. & Qaqish, R.B. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS* **20**, 2165-2174 (2006).
 22. Robertson, K.R., Smurzynski, M., Parsons, T.D., Wu, K., Bosch, R.J., Wu, J., McArthur, J.C., Collier, A.C., Evans, S.R. & Ellis, R.J. The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. *AIDS* **21**, 1915-1921 (2007).
 23. Brothers, T.D., Kirkland, S., Guaraldi, G., Falutz, J., Theou, O., Johnston, B.L. & Rockwood, K. Frailty in people aging with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J Infect Dis* **210**, 1170-1179 (2014).
 24. Antiretroviral Therapy Cohort, C. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* **372**, 293-299 (2008).
 25. May, M., Gompels, M., Delpech, V., Porter, K., Post, F., Johnson, M., Dunn, D., Palfreeman, A., Gilson, R., Gazzard, B., Hill, T., Walsh, J., Fisher, M., Orkin, C., Ainsworth, J., Bansi, L., Phillips, A., Leen, C., Nelson, M., Anderson, J. & Sabin, C. Impact of late diagnosis and treatment on life expectancy in people with HIV-1: UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. *BMJ* **343**, d6016 (2011).
 26. Kalayjian, R.C., Lau, B., Mechekano, R.N., Crane, H.M., Rodriguez, B., Salata, R.A., Krishnasami, Z., Willig, J.H., Martin, J.N., Moore, R.D., Eron, J.J. & Kitahata, M.M. Risk factors for chronic kidney disease in a large cohort of HIV-1 infected individuals initiating antiretroviral therapy in routine care. *AIDS* **26**, 1907-1915 (2012).
 27. Scherzer, R., Estrella, M., Li, Y., Choi, A.I., Deeks, S.G., Grunfeld, C. & Shlipak, M.G. Association of tenofovir exposure with kidney disease risk in HIV infection. *AIDS* **26**, 867-875 (2012).
 28. Helleberg, M., Afzal, S., Kronborg, G., Larsen, C.S., Pedersen, G., Pedersen, C., Gerstoft, J., Nordestgaard, B.G. & Obel, N. Mortality attributable to smoking among HIV-1-infected individuals: a nationwide, population-based cohort study. *Clin Infect*

- Dis* **56**, 727-734 (2013).
29. Hoffmann, C.J., Seaberg, E.C., Young, S., Witt, M.D., D'Acuntono, K., Phair, J. & Thio, C.L. Hepatitis B and long-term HIV outcomes in coinfecting HAART recipients. *AIDS* **23**, 1881-1889 (2009).
 30. Deeks, S.G., Lewin, S.R. & Havlir, D.V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* **382**, 1525-1533 (2013).
 31. Deeks, S.G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* **62**, 141-155 (2011).
 32. Neuhaus, J., Jacobs, D.R., Jr., Baker, J.V., Calmy, A., Duprez, D., La Rosa, A., Kuller, L.H., Pett, S.L., Ristola, M., Ross, M.J., Shlipak, M.G., Tracy, R. & Neaton, J.D. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis* **201**, 1788-1795 (2010).
 33. Hunt, P.W., Martin, J.N., Sinclair, E., Brecht, B., Hagos, E., Lampiris, H. & Deeks, S.G. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **187**, 1534-1543 (2003).
 34. Kuller, L.H., Tracy, R., Bellosso, W., De Wit, S., Drummond, F., Lane, H.C., Ledergerber, B., Lundgren, J., Neuhaus, J., Nixon, D., Paton, N.I., Neaton, J.D. & Group, I.S.S. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* **5**, e203 (2008).
 35. Postler, T.S. & Desrosiers, R.C. The cytoplasmic domain of the HIV-1 glycoprotein gp41 induces NF-kappaB activation through TGF-beta-activated kinase 1. *Cell Host Microbe* **11**, 181-193 (2012).
 36. Eggena, M.P., Barugahare, B., Jones, N., Okello, M., Mutalya, S., Kityo, C., Mugenyi, P. & Cao, H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* **174**, 4407-4414 (2005).
 37. Hunt, P.W., Sinclair, E., Rodriguez, B., Shive, C., Clagett, B., Funderburg, N., Robinson, J., Huang, Y., Epling, L., Martin, J.N., Deeks, S.G., Meinert, C.L., Van Natta, M.L., Jabs, D.A. & Lederman, M.M. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis* **210**, 1228-1238 (2014).
 38. Sandler, N.G., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M.C., Nixon, D.E., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S.R., Emery, S., Neaton, J.D., Brenchley, J.M., Deeks, S.G., Sereti, I., Douek, D.C. & Group, I.S.S. Plasma levels of soluble CD14

- independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* **203**, 780-790 (2011).
39. Wittkop, L., Bitard, J., Lazaro, E., Neau, D., Bonnet, F., Mercie, P., Dupon, M., Hessamfar, M., Ventura, M., Malvy, D., Dabis, F., Pellegrin, J.L., Moreau, J.F., Thiebaut, R., Pellegrin, I. & Groupe d'Epidemiologie Clinique du, S.e.A. Effect of cytomegalovirus-induced immune response, self antigen-induced immune response, and microbial translocation on chronic immune activation in successfully treated HIV type 1-infected patients: the ANRS CO3 Aquitaine Cohort. *J Infect Dis* **207**, 622-627 (2013).
 40. Osborn, O. & Olefsky, J.M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* **18**, 363-374 (2012).
 41. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867 (2006).
 42. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126 (1999).
 43. Hunt, P.W., Cao, H.L., Muzoora, C., Ssewanyana, I., Bennett, J., Emenyonu, N., Kembabazi, A., Neilands, T.B., Bangsberg, D.R., Deeks, S.G. & Martin, J.N. Impact of CD8+ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *AIDS* **25**, 2123-2131 (2011).
 44. Kaplan, R.C., Sinclair, E., Landay, A.L., Lurain, N., Sharrett, A.R., Gange, S.J., Xue, X., Hunt, P., Karim, R., Kern, D.M., Hodis, H.N. & Deeks, S.G. T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *J Infect Dis* **203**, 452-463 (2011).
 45. Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D.C. & Koup, R.A. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* **101**, 2711-2720 (2003).
 46. Kalayjian, R.C., Landay, A., Pollard, R.B., Taub, D.D., Gross, B.H., Francis, I.R., Sevin, A., Pu, M., Spritzler, J., Chernoff, M., Namkung, A., Fox, L., Martinez, A., Waterman, K., Fiscus, S.A., Sha, B., Johnson, D., Slater, S., Rousseau, F., Lederman, M.M., Adult, A.C.T.G.P.T. & Adult, A.C.T.G.P.T. Age-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus (HIV) disease: association of age and HIV infection with naive CD8+ cell depletion, reduced expression of CD28 on CD8+ cells, and reduced thymic volumes. *J Infect Dis* **187**, 1924-1933 (2003).
 47. Serrano-Villar, S., Sainz, T., Lee, S.A., Hunt, P.W., Sinclair, E., Shacklett, B.L., Ferre,

- A.L., Hayes, T.L., Somsouk, M., Hsue, P.Y., Van Natta, M.L., Meinert, C.L., Lederman, M.M., Hatano, H., Jain, V., Huang, Y., Hecht, F.M., Martin, J.N., McCune, J.M., Moreno, S. & Deeks, S.G. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog* **10**, e1004078 (2014).
48. Ramirez, L.A., Daniel, A., Frank, I., Tebas, P. & Boyer, J.D. Seroprotection of HIV-infected subjects after influenza A(H1N1) vaccination is directly associated with baseline frequency of naive T cells. *J Infect Dis* **210**, 646-650 (2014).
 49. Lee, S.A., Sinclair, E., Jain, V., Huang, Y., Epling, L., Van Natta, M., Meinert, C.L., Martin, J.N., McCune, J.M., Deeks, S.G., Lederman, M.M., Hecht, F.M. & Hunt, P.W. Low proportions of CD28- CD8+ T cells expressing CD57 can be reversed by early ART initiation and predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis* **210**, 374-382 (2014).
 50. Rajasuriar, R., Booth, D., Solomon, A., Chua, K., Spelman, T., Gouillou, M., Schlub, T.E., Davenport, M., Crowe, S., Elliott, J., Hoy, J., Fairley, C., Stewart, G., Cameron, P. & Lewin, S.R. Biological determinants of immune reconstitution in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor alpha and microbial translocation. *J Infect Dis* **202**, 1254-1264 (2010).
 51. Hunt, P.W., Landay, A.L., Sinclair, E., Martinson, J.A., Hatano, H., Emu, B., Norris, P.J., Busch, M.P., Martin, J.N., Brooks, C., McCune, J.M. & Deeks, S.G. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS One* **6**, e15924 (2011).
 52. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. *Department of Health and Human Services.*, H-12-16 (Last updated April 8, 2015).
 53. Geiger, H., Denking, M. & Schirmbeck, R. Hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol* **29**, 86-92 (2014).
 54. Aspinall, R., Pitts, D., Lapenna, A. & Mitchell, W. Immunity in the elderly: the role of the thymus. *J Comp Pathol* **142 Suppl 1**, S111-115 (2010).
 55. Pfister, G., Weiskopf, D., Lazuardi, L., Kovaiou, R.D., Cioca, D.P., Keller, M., Lorberg, B., Parson, W. & Grubeck-Loebenstien, B. Naive T cells in the elderly: are they still there? *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 152-157 (2006).
 56. Strindhall, J., Nilsson, B.O., Lofgren, S., Ernerudh, J., Pawelec, G., Johansson, B. &

- Wikby, A. No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *Exp Gerontol* **42**, 753-761 (2007).
57. Effros, R.B. The role of CD8 T cell replicative senescence in human aging. *Discov Med* **5**, 293-297 (2005).
 58. Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M. & Nourhashemi, F. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc* **14**, 877-882 (2013).
 59. Wang, G.C., Kao, W.H., Murakami, P., Xue, Q.L., Chiou, R.B., Detrick, B., McDyer, J.F., Semba, R.D., Casolaro, V., Walston, J.D. & Fried, L.P. Cytomegalovirus infection and the risk of mortality and frailty in older women: a prospective observational cohort study. *Am J Epidemiol* **171**, 1144-1152 (2010).
 60. Hadrup, S.R., Strindhall, J., Kollgaard, T., Seremet, T., Johansson, B., Pawelec, G., thor Straten, P. & Wikby, A. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol* **176**, 2645-2653 (2006).
 61. Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L.B., Machala, M. & Mysliwski, A. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine* **21**, 3826-3836 (2003).
 62. Appay, V., van Lier, R.A., Sallusto, F. & Roederer, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* **73**, 975-983 (2008).
 63. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*, (Garland Science, New York, 2012).
 64. Croft, M., So, T., Duan, W. & Soroosh, P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev* **229**, 173-191 (2009).
 65. Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P. & Sugamura, K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol* **105**, 63-98 (2010).
 66. Sugamura, K., Ishii, N. & Weinberg, A.D. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol* **4**, 420-431 (2004).
 67. Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K. & Roederer, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**, 648-655 (2004).

68. Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. & Lusso, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815 (1995).
69. Tanaka, R., Takahashi, Y., Kodama, A., Saito, M., Ansari, A.A. & Tanaka, Y. Suppression of CCR5-tropic HIV type 1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of beta-chemokines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**, 1147-1154 (2010).
70. Murata, K., Nose, M., Ndhlovu, L.C., Sato, T., Sugamura, K. & Ishii, N. Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J Immunol* **169**, 4628-4636 (2002).
71. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K. & Ishii, N. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J Immunol* **176**, 5975-5987 (2006).
72. Byun, M., Ma, C.S., Akcay, A., Pedergnana, V., Palendira, U., Myoung, J., Avery, D.T., Liu, Y., Abhyankar, A., Lorenzo, L., Schmidt, M., Lim, H.K., Cassar, O., Migaud, M., Rozenberg, F., Canpolat, N., Aydogan, G., Fleckenstein, B., Bustamante, J., Picard, C., Gessain, A., Jouanguy, E., Cesarman, E., Olivier, M., Gros, P., Abel, L., Croft, M., Tangye, S.G. & Casanova, J.L. Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. *J Exp Med* **210**, 1743-1759 (2013).
73. Bastidas, S., Graw, F., Smith, M.Z., Kuster, H., Gunthard, H.F. & Oxenius, A. CD8+ T cells are activated in an antigen-independent manner in HIV-infected individuals. *J Immunol* **192**, 1732-1744 (2014).
74. Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D.C., Price, D.A., June, C.H., Marincola, F.M., Roederer, M. & Restifo, N.P. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* **17**, 1290-1297 (2011).
75. Larbi, A. & Fulop, T. From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A* **85**, 25-35 (2014).
76. Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S.R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* **384**, 258-271 (2014).
77. Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., Routy, J.P., Haddad, E.K. & Sekaly, R.P. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **12**, 1198-1202 (2006).
78. Zeng, M., Southern, P.J., Reilly, C.S., Beilman, G.J., Chipman, J.G., Schacker, T.W.

- & Haase, A.T. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naive T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* **8**, e1002437 (2012).
79. Balagopal, A., Philp, F.H., Astemborski, J., Block, T.M., Mehta, A., Long, R., Kirk, G.D., Mehta, S.H., Cox, A.L., Thomas, D.L. & Ray, S.C. Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C. *Gastroenterology* **135**, 226-233 (2008).
80. Buzon, M.J., Massanella, M., Llibre, J.M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M.C., Gatell, J.M., Domingo, P., Paredes, R., Sharkey, M., Palmer, S., Stevenson, M., Clotet, B., Blanco, J. & Martinez-Picado, J. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* **16**, 460-465 (2010).
81. Eriksson, S., Graf, E.H., Dahl, V., Strain, M.C., Yukl, S.A., Lysenko, E.S., Bosch, R.J., Lai, J., Chioma, S., Emad, F., Abdel-Mohsen, M., Hoh, R., Hecht, F., Hunt, P., Somsouk, M., Wong, J., Johnston, R., Siliciano, R.F., Richman, D.D., O'Doherty, U., Palmer, S., Deeks, S.G. & Siliciano, J.D. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog* **9**, e1003174 (2013).
82. Adams, M., Sharmeen, L., Kimpton, J., Romeo, J.M., Garcia, J.V., Peterlin, B.M., Groudine, M. & Emerman, M. Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3862-3866 (1994).
83. Palangat, M., Meier, T.I., Keene, R.G. & Landick, R. Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol Cell* **1**, 1033-1042 (1998).
84. Mizutani, T., Ishizaka, A., Suzuki, Y. & Iba, H. 7SK small nuclear ribonucleoprotein complex is recruited to the HIV-1 promoter via short viral transcripts. *FEBS Lett* **588**, 1630-1636 (2014).
85. Verdin, E. DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **65**, 6790-6799 (1991).
86. Verdin, E., Paras, P., Jr. & Van Lint, C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J* **12**, 3249-3259 (1993).
87. Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M. & Verdin, E. Transcriptional activation and

- chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J* **15**, 1112-1120 (1996).
88. Henderson, A., Holloway, A., Reeves, R. & Tremethick, D.J. Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol* **24**, 389-397 (2004).
 89. Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R.G., Kauder, S.E., Verrijzer, C.P., Ott, M. & Verdin, E. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem* **281**, 19960-19968 (2006).
 90. He, G. & Margolis, D.M. Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol* **22**, 2965-2973 (2002).
 91. Mizutani, T., Ishizaka, A., Tomizawa, M., Okazaki, T., Yamamichi, N., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A. & Iba, H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. *J Virol* **83**, 11569-11580 (2009).
 92. Garcia-Rodriguez, C. & Rao, A. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med* **187**, 2031-2036 (1998).
 93. Ishizaka, A., Mizutani, T., Kobayashi, K., Tando, T., Sakurai, K., Fujiwara, T. & Iba, H. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF-kappaB RelA/p50 heterodimer. *J Biol Chem* **287**, 11924-11933 (2012).
 94. Lucas, C.L., Kuehn, H.S., Zhao, F., Niemela, J.E., Deenick, E.K., Palendira, U., Avery, D.T., Moens, L., Cannons, J.L., Biancalana, M., Stoddard, J., Ouyang, W., Frucht, D.M., Rao, V.K., Atkinson, T.P., Agharahami, A., Hussey, A.A., Folio, L.R., Olivier, K.N., Fleisher, T.A., Pittaluga, S., Holland, S.M., Cohen, J.I., Oliveira, J.B., Tangye, S.G., Schwartzberg, P.L., Lenardo, M.J. & Uzel, G. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol* **15**, 88-97 (2014).