

博士論文

ヒト免疫不全ウイルス感染における
細胞性免疫応答とウイルス変異の解析

加藤 次朗

本博士論文「ヒト免疫不全ウイルス感染における細胞性免疫応答とウイルス変異の解析」に含まれるデータの一部は、2016年3月8日に PLoS One 誌にて刊行された論文 “Rapid HIV-1 Disease Progression in Individuals Infected with a Virus Adapted to Its Host Population” 中に含まれる一部データと同一である。

【文献情報】

Katoh J, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, et al. Rapid HIV-1 Disease Progression in Individuals Infected with a Virus Adapted to Its Host Population. *PLoS ONE* 2016; 11(3): e0150397.

論文の内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染において、細胞傷害性 T 細胞(CTL)がウイルス抑制に重要な役割を果たす一方、HIVはその易変異性により CTL から逃避する。CTL に対する抗原提示分子であるヒト白血球型抗原(HLA)は日本において多様性が低く、特に HLA-A*24:02 は日本人の約 60% が保有する対立遺伝子である。HLA-A*24:02 陽性者頻度の高さから、HIV は日本への伝播以降 HLA-A*24:02 拘束性 CTL からの逃避変異を蓄積している。HLA-A*24:02 陽性者の 8 割で観察される、Nef タンパク質 135 位のチロシン(Y)からフェニルアラニン(F)への変異(Y135F 変異)は、野生型 (Y135)ウイルスに感染した約 8 割の HLA-A24 陽性者体内で 1 年以内に生じること、国内の HLA-A24 陰性者においても約 3 割の感染者で観察され、国内でこの変異を持つウイルスが流行していることなどが報告されている。また、Y135F 変異と関連した HLA-A*24:02 拘束性抗原決定基(エピトープ)として 10 残基の Nef134-10(wt) (RYPLTFGWCF)と 8 残基の Nef134-8(wt) (RYPLTFGW)が同定されている。Nef134-10 については Y135F 変異選択への寄与が示唆されているが、1) Nef134-8 の Y135F 変異選択への寄与については不明である。また、2) 変異型ウイルス感染者の予後についても不明な点が多い。本研究ではこれらを、ウイルス学的・免疫学的・臨床的側面から解析した。

§ 1 Nef134-8 による Y135F 変異選択圧の解析

まず、医科研附属病院に通院中の HIV-1 感染者の中から、1) B 亜型ウイルスに感染、2) 未治療あるいは治療中断中、3) HLA-A*24:02 陽性の 31 名を無作為に選び、保存検体中の血漿中ウイルスを直接シーケンスした。結果、血漿 Y135 ウイルス陽性者は 7 名(23%)、血漿 135F ウイルス陽性者は 23 名(74%)、血漿 135W ウイルス陽性者は 1 名(3%)で、これまでの報告通り Los Alamos HIV database 登録のデータと有意差があった($p < 0.0001$, Fisher's exact test)。血漿 Y135 陽性者のうち、野生型の配列を持つものは 2 名のみで、Nef134-10 と Nef134-8 で共有される L137I 変異が 1 名、T138C 変異が 2 名、Nef134-8 領域外だが Nef134-10 領域には含まれる C142P 変異および F143Y 変異がそれぞれ 1 名で観察された。この 31 名について、四量体化ペプチド-HLA 複合体(テトラマー)を用いてエピトープ特異的 CTL の解析を行った。末梢血単核球(PBMC)を Nef134-10(wt)あるいは Nef134-8(wt)ペプチドで刺激後 2 週間培養し、抗 CD8 抗体、Nef134-10(wt)/A*24:02 テトラマー(Tet-10(wt))および Nef134-8(wt) /A*24:02 テトラマー(Tet-8(wt))で二重染色してフローサイトメトリーにより解析した。血漿 Y135 陽性者では、Nef134-10 領域だけに変異のある C142P・F143Y 感染者 2 名(29%)のみが Tet-10(wt)+ T 細胞陰性で、Tet-8(wt)+ T 細胞陰性者はいなかった(0%)。一方、血漿 135F/W 陽性者 24 名では、Tet-10(wt)+ T 細胞陰性は特徴的な HLA 又は特殊な変異を有する 4 名(17%)のみであるのに対し、Tet-8(wt)+ T 細胞陰性は 12 名(50%)で有意な差があった($p = 0.0305$, Fisher's exact test)。以上の結果から、Nef134-8 CTL の誘導と Y135F 変異には関連があると考えられる。

次に、Nef134-8 CTL のみが誘導されていた血漿 Y135 陽性者 2 名について経時観察した所、135F 変異体が選択された事から、Nef134-8 CTL の Y135F 変異選択圧への寄与が実証された。

さらに、Nef134-8 CTL が変異選択圧となる機構について解析を行った。Y135F 変異は、Nef134-10 および Nef134-8 の HLA-A*24:02 に対する結合アンカーである 2Y を 2F へと変異さ

せる事から、Y135F 変異はペプチド-HLA 間結合力を変化させると考えられる。そこで T2-A24 stabilization assay により、ペプチド-HLA 間結合力を確認した。結果、Nef134-8 の最大結合量は Nef134-10 の 7 割程度しかなく、また Nef134-8 の半量結合濃度は 2F 変異により 30 倍以上増加し、 $1\mu\text{M}$ をはるかに超えていた。故に、Y135F 変異はペプチド-HLA 間結合力依存的に Nef134-8 抗原提示を低下させると考えた。そこで Y135F 変異による抗原提示量の低下を解析するため、ミニジーンによりエピトープ蛋白質を発現させた HLA-A*24:02 安定導入 293FT 細胞を抗原提示細胞として準備し、野生型エピトープと変異型エピトープを同程度認識可能な dual-tropic CTL クローンによる IFN- γ 産生量を検討した。その結果、Nef134-10 と Nef134-8 の双方のエピトープで Y135F 変異により IFN- γ 産生が減少したが、Nef134-10 では IFN- γ 産生が約 20% 残るのに対し、Nef134-8 は陰性対照と同等の IFN- γ 量であった (One-way ANOVA (有意水準 5%) における Tukey 事後テスト)。この結果は、Y135F 変異により Nef134-8 の抗原提示がほぼ消失する事を示唆している。

以上の結果から、Nef134-8 CTL による Y135F 変異選択圧は 2F 抗原提示の消失によるものである事が示唆され、血漿 Y135 陽性者-血漿 135F/W 陽性者間で CTL 誘導が異なる理由も明らかになった。一方、Nef134-10 は抗原提示が完全には消失せず、特殊な条件下にない血漿 135F 陽性者全員で Nef134-10 CTL が誘導されていた。この CTL の特徴を解析するため、13 名の Tet-10(wt)+ TCR レポートリー解析を行った。結果、血漿 Y135 陽性者 2 名では、Nef134-10 wt/2F dual-tropic CTL に特徴的な TRBV4-1 クローンがわずかで、TRBV4-1 クローン頻度が感染者間で大きく異なる血漿 135F 陽性者と対照的であった。そして、Nef134-8 CTL 陽性者と陰性者の比較では、TRBV4-1 クローン頻度に差が無かった ($p=0.9427$, Mann-Whitney test)。

§ 2 逃避変異ウイルスへの初感染による臨床病態変化の解析

血漿 135F ウイルス陽性者には、Y135 野生型ウイルスで初感染したのち変異が選択された個体と、135F 変異型ウイルスによって初感染した個体の 2 群があると考えられるため、初感染ウイルス特定の手法を考える必要がある。まず、Nef134-8(2F) 抗原提示の消失から、Nef134-8 CTL 誘導の有無は初感染ウイルスの種類を推測する材料となり得る。さらに私は、血漿 135F ウイルス陽性者における初感染ウイルスを特定するため、初診時に近い日付の PBMC 中プロウイルスを次世代シーケンサーで解析し、野生型ウイルスの痕跡である Y135 プロウイルス(Y-prov)の検出を試みた。血漿 135F 感染者 18 名中 16 名から出力データが得られ、Nef134-10 領域に塩基挿入/欠失がない配列を抽出した所、中央値で 1571 リード(606 - 14011 リード)を得た。解析の結果、Y-prov 陽性者が 6 名、陰性者が 10 名であった。この 2 群についてプロウイルス解析時点の感染時点からの時間経過について差が無い事を確認するため、まずカルテ調査を行った所、顕著な記載の差はなく、またプロウイルス解析時点の初診時からの期間を比較すると、Y-prov 陽性群(中央値 0 週, 最長 31 週)と陰性群(中央値 0 週, 最長 58 週)の間に有意差は無かった ($p = 0.4683$, Mann-Whitney test)。そして、感染成立からのプロウイルス解析までの期間の差を推測するため、*nef* プロウイルス quasi-species の各遺伝子配列間の遺伝的距離の統計を取った。PCR 増幅領域全長が読み取れた塩基配列のみを抽出すると中央値で 1257 リード(496 - 11771 リード)が得られ、これを基に全配列ペアの遺伝的距離を算出した。遺伝的距離の 25 パーセンタイル点を Y135 プロウイルス陽性群と陰性群で比較したところ有意差が無かった ($p = 0.7812$, Mann-Whitney test) 事から、感染成立時点からプロウイルス解析時点までの期間の偏りは大きくないと考えた。

Y-provの有無と Nef134-8 CTLの有無を対応させたところ、Nef134-8 CTL陽性者8名のうち4名がY-prov陰性、Nef134-8 CTL陰性者8名のうち6名がY-prov陰性で、これらの分類法に対応関係は無かった($p = 0.6084$, Fisher's exact test)。そこで、Y-provの有無と Nef134-8 CTLの有無とを組み合わせ、血漿 135F陽性者を4群に分類する事にした。そして、Y-prov陽性/Nef134-8 CTL陽性をY135初感染、Y-prov陰性/Nef134-8 CTL陰性を135F初感染と推定した。

次に Tet-10(wt)⁺ TCR レポートリーについて、血漿ウイルス・プロウイルス Y135陽性群－血漿 135F陽性/Y-prov陰性群間で比較したところ、血漿 135F陽性/Y-prov陰性者群で TRBV4-1頻度が有意に高く($p = 0.0492$, Mann-Whitney test)、かつレポートリー多様度が低い傾向($p = 0.0727$, Mann-Whitney test)にあった。135F初感染の場合、Nef134-10 wt single-specific CTLは誘導されず、TRBV4-1クローンを中心とした Nef134-10 dual-specific CTLのみが誘導されると考えられる事から、Y-provの有無の判定はある程度初感染ウイルスを反映している事が示唆された。さらに、Y-prov陽性/Nef134-8 CTL陰性者2名は TRBV4-1クローンが全く観察されず、Y135に初感染したと推定された。しかしながら、Y-prov陰性/Nef134-8 CTL陽性者1名は TRBV4-1クローンが94%を占め、判断材料に欠ける事から、この群に含まれる感染者を以降の解析から除外した。

最後に、初感染ウイルスが Y135野生型か 135F変異型かにより臨床経過がどのような影響を受けるか、解析した。そこで、血漿 Y135陽性者7名および血漿 135F陽性/Y-prov陽性者6名を含む Y135初感染群13名と、血漿 135F陽性/Y-prov陰性/Nef134-8 CTL陰性である 135F初感染群6名について、血中ウイルス量および血中 CD4細胞数を初診時から250週まで経過観察した。結果、全期間のウイルス量および初診時 CD4細胞数に差は見られなかったものの、初診後50週ごとの CD4細胞数中央値については 135F初感染群が全期間において有意に低く、CD4細胞数 350 cells/ μ L以下で推移した。(初診時 CD4の $p=0.0832$ 、50週毎の比較では、それぞれ $p = 0.0097$, 0.0074, 0.0070, 0.0091, 0.0126 (いずれも Mann-Whitney test))。以上から、HLA-A*24:02適応変異を遂げた 135Fウイルスに初感染した HLA-A*24:02陽性者では、ウイルス量とは関係なく病態進行が速い事が示唆された。

本研究の結果から、1) Nef134-10と同様、Nef134-8も Y135F変異選択圧に寄与し、その機序はペプチド－HLA間結合力の極度な低下による抗原提示の消失である事、2) Y135プロウイルス陰性かつ Nef134-8 CTL陰性の感染者は、135Fウイルスへの初感染が強く推認される事、3) HLA適応変異を獲得した HIVが、同じ HLAを持つ新規感染者に伝播する際には、ウイルス量に影響を及ぼすことなく早期から病態を悪化させる事、以上3点が明らかとなった。本研究は特に、遺伝的多様性が低い地域・民族におけるウイルス適応変異の伝播がウイルス新規感染者の予後を悪化させ、その人口集団に対する選択圧となる事を実際に示した、初めての報告であると思われる。

日本では近年 HIV感染者の早期受診が勧奨されているが、HLA-A*24:02適応変異ウイルスの国内流行により、早期治療が必要な新規 HIV感染者が増加する恐れがある。本研究の成果は、早期発見・早期治療の重要性を示唆するメッセージである。またワクチン開発に於いては、Nef134-10(2F)の様な、抗原提示が残るタイプの逃避変異型エピトープ特異的 CTLを誘導し、野生型ウイルスだけでなく適応変異ウイルスに対する防御効果も付与するなど、適応変異ウイルスの新規感染による早期からの病態悪化を防ぐ戦略を練る必要がある。本研究の成果を基にした治療方針の策定、予防法・治療法の開発など、今後の動向に期待したい。

【目次】

・ 論文の内容の要旨	2
・ 目次	5
・ 用語・略語集	6
I. 序論	10
II. Nef134-10 および Nef134-8 による Y135F 変異選択の解析	
2-1 緒論	23
2-2 材料と方法	24
2-3 結果	43
2-4 考察	56
III. HIV の HLA 適応変異による予後の変動に関する解析	
3-1 緒論	61
3-2 材料と方法	66
3-3 結果	72
3-4 考察	84
IV. 総括	92
・ 謝辞	95
・ 参考文献	96
・ 補遺：本研究における全データ概要	105

【用語・略語集】

略語（正式名）：日本語訳[括弧つきは意訳]

AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) :後天性免疫不全症候群

APC (allophycocyanin): アロフィコシアニン

B-LCL (B-lymphoblastoid line): B リンパ芽球細胞株

bp (base pair): 塩基対

CCR5 (C-C chemokine receptor 5): CC 型ケモカイン受容体 5

CD4 (3, 8) (cluster of differentiation-4 (-3, -8)): [リンパ球表面抗原 4 (3, 8)]

cDNA (complementary DNA): 相補的 DNA

CDR (complementarity determining region): 相補性決定領域

CTL (cytotoxic T-lymphocyte): 細胞傷害性 T 細胞

CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4): CXC 型ケモカイン受容体 4

ddH₂O (deionized-distilled water): [超純水]

DMSO (dimethyl sulfoxide): ジメチルスルフォキシド

DNA (deoxiribonucleic acid): デオキシリボ核酸

dual-tropic: 両指向性

EBV (Epstein-Barr virus): エプステイン・バールウイルス

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): エチレンジアミン四酢酸

EGFP (enhanced green fluorescent protein): 高感度緑色蛍光タンパク質

Env / *env* (envelope): エンベロープ

epitope: エピトープ（抗原決定基）

FACS (fluorescence-activated cell sorter): 蛍光活性化セルソーター

FCS (fetal calf albumin): ウシ胎児血清

FITC (fluorescein isothiocyanate): イソチオシアン酸フルオレセイン

FSC-A (forward scatter - Area): 直方散乱光シグナル面積
FSC-H (forward scatter - Height): 直方散乱光シグナル高
FSC-W (forward scatter - Width): 直方散乱光シグナル幅
Gag / *gag* (group-specific antigen): [ウイルスコア蛋白/遺伝子]
GS-FLX (Genome Sequencer FLX): ゲノムシーケンサー-FLX
GSI_x (Genome Similarity Index-x): ゲノム相同性指数-x
HAART (highly active antiretroviral therapy)
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HIV (human immunodeficiency virus): ヒト免疫不全ウイルス
HLA (human leukocyte antigen): ヒト白血球型抗原
hRluc (humanized Renilla luciferase): ヒト化ウミシイタケルシフェラーゼ
IFN- γ (interferon-gamma): インターフェロンガンマ
IL-2 (interleukin-2): インターロイキン-2
IMGT (the international ImMunoGeneTics information system)
in/del (insertion/deletion): 挿入/欠失
IPTG (isopropylthiogalactoside): イソプロピルチオガラクトシド
MACS (magnetic-activated cell sorting): 磁気細胞分離
MFI (mean fluorescence intensity): 平均蛍光強度
MID (Multiplex Identifier): [インデックスタグ配列]
Nef / *nef* (negative factor): [感染抑制因子]
OLP (overlapping peptide): オーバーラップペプチド
PBMC (peripheral blood mononuclear cell): 末梢血単核球
PBS (phosphate buffer saline): リン酸緩衝液
PCR (polymerase chain reaction): ポリメラーゼ連鎖反応
PE (phycoerythrin): フィコエリスリン

PerCP (Peridinin chlorophyll): ペリディニクロロフィル

PFA (paraformaldehyde): パラホルムアルデヒド

PHA (phytohemagglutinin): フィトヘマグルチニン

pHLA (peptide-HLA complex): ペプチド-HLA 複合体

PI (propidium iodide): ヨウ化プロピジウム

Pol / *pol* (DNA polymerase): ポリメラーゼ

Pt (patient): HIV 感染者

rhIL-2 (recombinant human IL-2): 組換えヒト IL-2

Q₂₅ (25 percentile / lower quartile): 25 パーセンタイル点 / 下位四分位点

RLU (relative light unit): 相対発光強度

RNA (ribonucleic acid): リボ核酸

RNase (ribonuclease): リボ核酸分解酵素

RT (reverse transcription / reverse transcriptase): 逆転写 / 逆転写酵素

SIV (simian immunodeficiency virus): サル免疫不全ウイルス

SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript)

SSC-A (side scatter - Area): 側方散乱光シグナル面積

SSC-H (side scatter - Height): 側方散乱光シグナル高

SSC-W (side scatter - Width): 側方散乱光シグナル幅

TAP (transporter associated with antigen processing)

Tet (pHLA tetramer): ペプチド-HLA 四量体

TCR (T-cell receptor): T 細胞受容体

TRAC / C_α (TCR alpha chain constant (C) region): TCR α鎖定常部

TRAJ / J_α (TCR alpha chain joining (J) segment): TCR α鎖可変部 J 領域

TRAV / V_α (TCR alpha chain variable (V) segment): TCR α鎖可変部 V 領域

TRBC / C_β (TCR beta chain constant (C) region): TCR β鎖定常部

TRBD / D_β (TCR beta chain diversity (D) segment): TCR β鎖可変部 D 領域

TRBJ / J_β (TCR beta chain joining (J) segment): TCR β鎖可変部 J 領域

TRBV / V_β (TCR beta chain variable (V) segment): TCR β鎖可変部 V 領域

TRDV / V_δ (TCR delta chain variable (V) segment): TCR δ鎖可変部 V 領域

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

Y-prov (Y135 provirus): Y135 プロウイルス

I . 序論

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、Retrovirus 科 lentivirus 亜科に属する、約 10,000 塩基の(+)鎖 RNA をゲノムとするエンベロープウイルスである。HIV はヒトを唯一の宿主とし、慢性持続性感染を呈する (Fig 1A)。HIV は自身の RNA ゲノムをヒトゲノムに組み込む際、逆転写酵素により相補的 DNA ゲノムを生成する (Fig 2) が、逆転写の不正確性により容易に変異を獲得し、quasi-species(準種)の集団を形成する。結果、HIV は宿主免疫や抗レトロウイルス薬から容易に逃避する。また、HIV は感染のためのウイルス受容体として CD4 分子およびケモカイン受容体である CCR5 あるいは CXCR4 を用いるため、HIV はヘルパーT 細胞、単球、樹状細胞など、免疫の枢軸を担う細胞群に感染し増殖する。そしてこれらの細胞群を数年から数十年かけて傷害し続け減少させる事により、感染者は最終的に後天性免疫不全症候群(AIDS)を発症する (Fig 1A)。

抗 HIV 免疫応答において、細胞傷害性 T 細胞(CTL) が関与する細胞性免疫応答はウイルス抑制に重要である¹ (Fig 1B)。この見解を裏付ける現象の例として、例えば HIV 感染急性期において抗体誘導より早く CTL が誘導され、それに伴いウイルス量が低下する現象²、あるいは CTL に対する抗原提示分子で

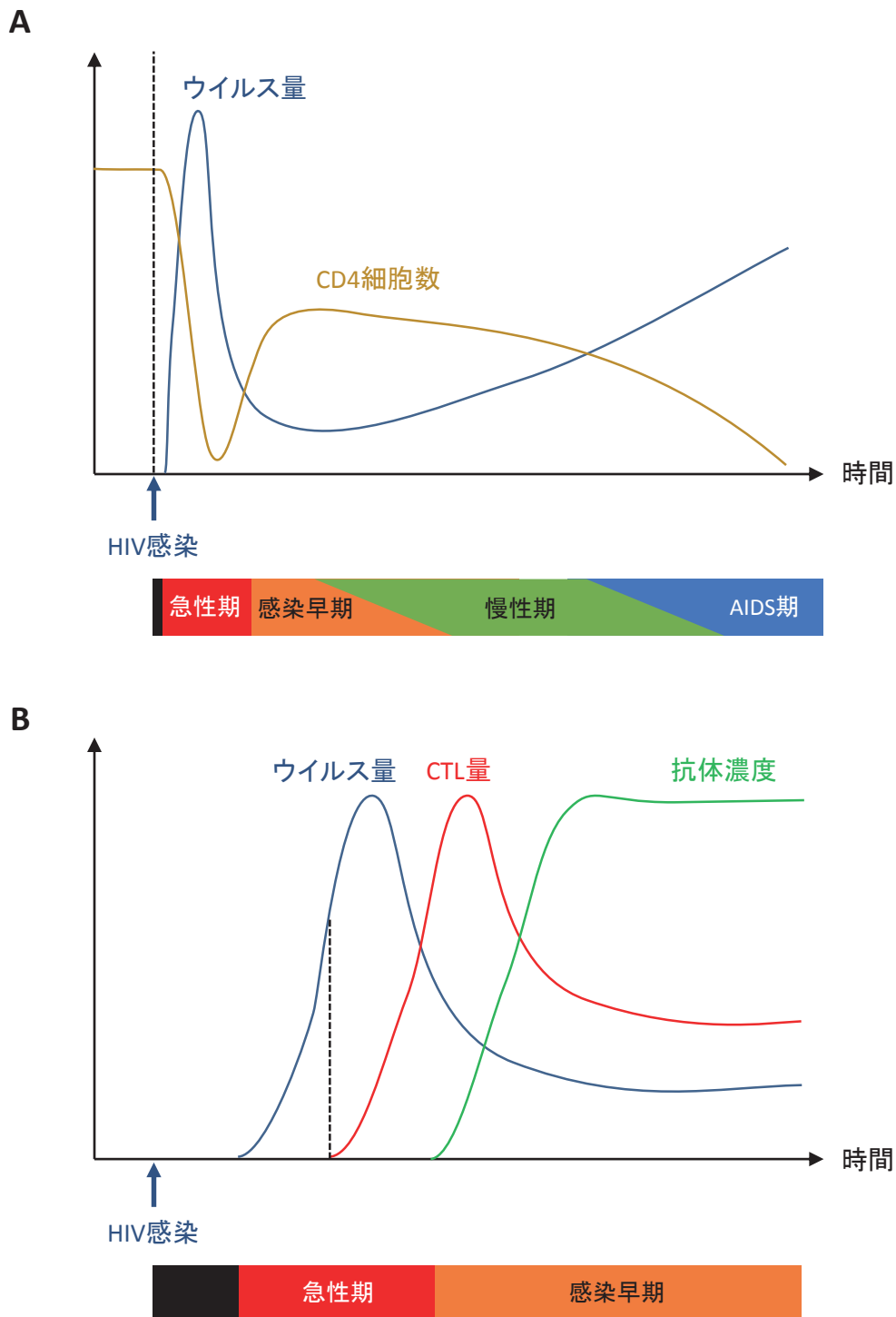


Fig 1. HIV感染者における病態進行とHIV特異的免疫応答。(A) HIV 感染時のウイルス量と末梢血中CD4細胞数の推移。(B) HIV 感染後の免疫動態とウイルス量の推移。HIV感染直後はウイルスが検出できないが、ウイルスは免疫による排除を受ける事無く階段状に増加する。急性期には、ウイルスは指数関数的に増殖し、感染ターゲットであるCD4陽性細胞を急激に減少させる。ウイルス増殖中に細胞傷害性T細胞(CTL)が誘導され、ウイルス複製を強力に抑制し、ウイルス量を劇的に減少させる。さらにその後、抗HIV抗体が誘導され、遊離ウイルスを不活化する。免疫系によるHIV抑制が機能する様になると、CD4細胞数は徐々に回復する。

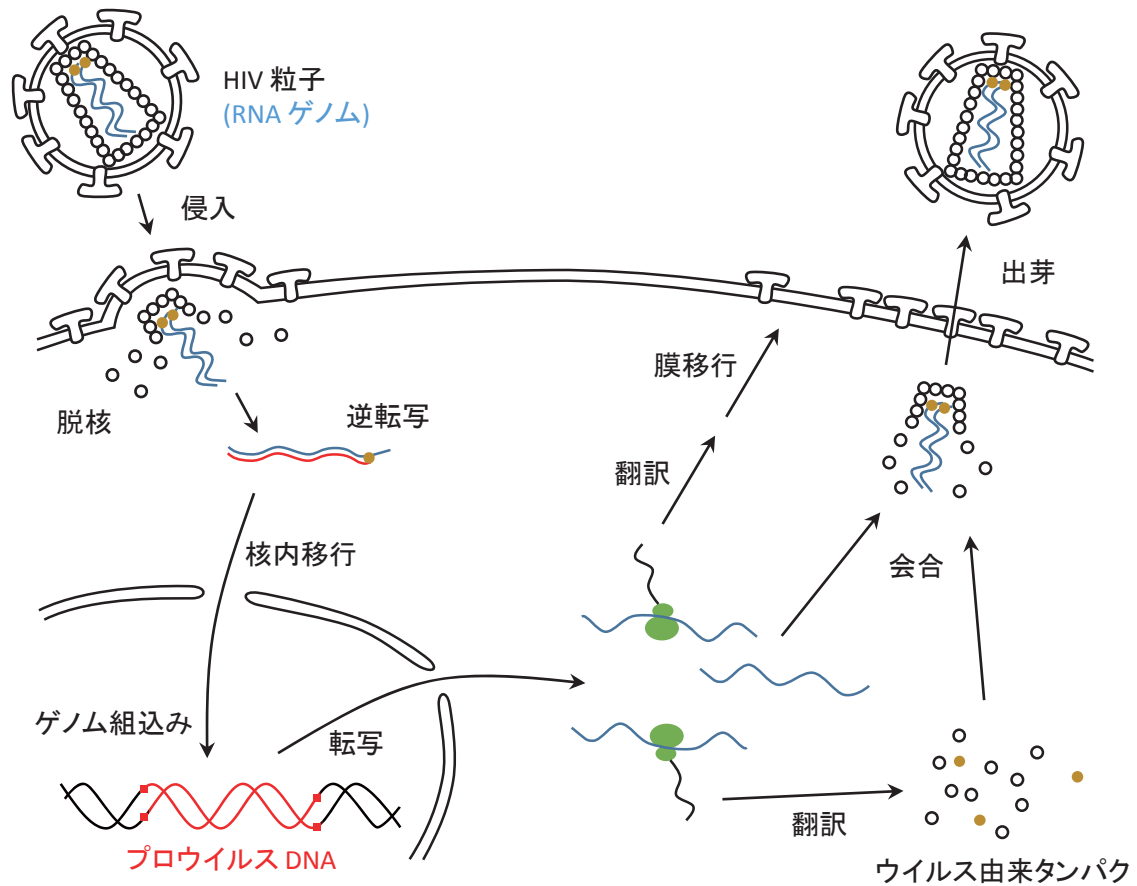


Fig 2. HIV の生活環。HIV は CD4 陽性細胞への侵入・脱核後、ゲノム RNA(青) が逆転写酵素(黄)により逆転写されて cDNA(赤)となり、核内移行複合体を形成したのち核内移行する。核内では、ウイルスゲノムがインテグラーゼにより宿主ゲノムに組み込まれ、プロウイルス(赤)となる。プロウイルスはウイルスゲノム本体である mRNA へと転写され、一部はスプライシングされてウイルスタンパクへと翻訳される。mRNA は各種構造タンパクと会合して細胞膜表面に集まり、出芽する。

あるヒト白血球型抗原クラス I (HLA class I) の多型がウイルス量および感染者予後と関連する現象³⁻⁵などが挙げられる。この様な CTL によるウイルス抑制にもかかわらず、HIV はその易変異性により生じた多様な quasi-species の中から、宿主免疫による認識を逃れた逃避変異ウイルスが選択的に増殖する。また HIV は抗ウイルス薬からも容易に逃避する事から、AIDS 予防のための抗ウイルス療法には 3 剤以上を用いた多剤併用療法 (HAART と呼ばれる) が必要である。HAART は服薬量が多く、副作用発現も多い上、服薬率 95% 以上を保つ事が薬剤耐性獲得の防止に必要、かつ治療を開始したら一生涯 HAART を続けなければならない、薬価も高い事から、HAART を受ける HIV 感染者の身体的・精神的・金銭的負担は大きく、これに代わる代替療法が模索されている。その候補として、CTL を活性化する事による抗 HIV 療法、例えばワクチン、樹状細胞療法、CTL 療法などが考案されているが、有効性が確認され臨床応用されているものは未だ存在しない。これらの治療法の更なる発展のためには、HIV および CTL に関してより多くの知見を集積する必要がある。

CTL による HIV 抑制機構は、HIV 感染細胞の特異的認識とそれに続く細胞傷害からなる (Fig 3)。ウイルス感染細胞においては、細胞内で発現するウイ

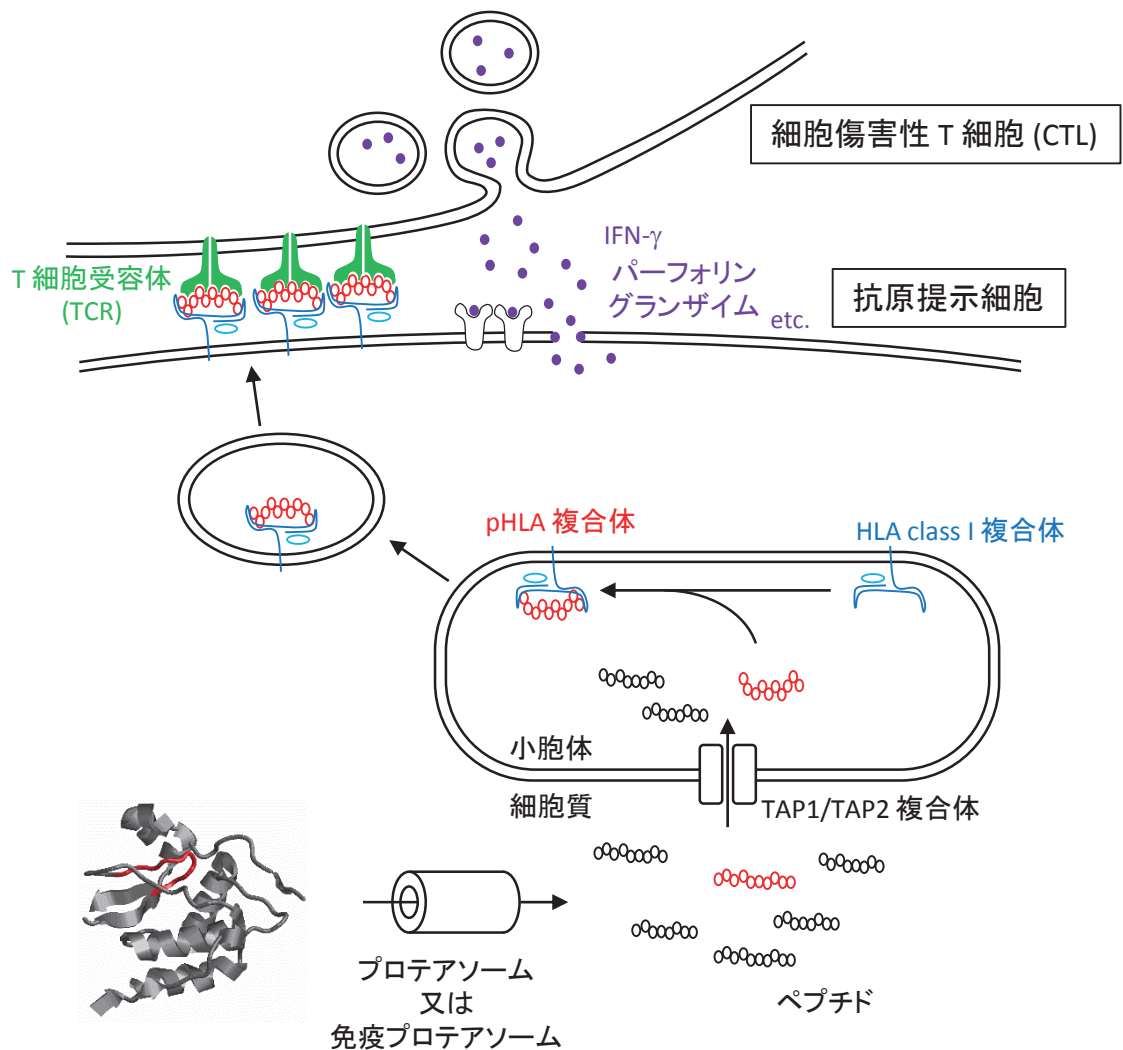


Fig 3. 細胞質タンパク由来ペプチドのHLA class I 拘束性抗原提示とCTLによる認識。細胞質中で発現したタンパク質は、ユビキチン依存性／非依存性にプロテアソームによる分解を受け、ペプチド断片となる。ペプチド断片のうち、TAPトランスポーターの基質として認識された分子は、TAPにより小胞体内に輸送される。小胞体内には各種シャペロンにより構造を維持したHLA class I/ β_2 ミクログロブリン複合体(青)が存在する。HLAはペプチド収容溝を開放した状態になっており、特定のモチーフ配列を有するペプチド(赤)が収容溝に入り込むと、ペプチド収容溝が閉じてシャペロン分子群から解離する。その後ペプチド HLA 複合体 (pHLA) は、トランスゴルジネットワークを通じて細胞表面へと提示される。細胞表面に提示された pHLA は CTL の抗原決定基(エピトープ)として機能し、エピトープ特異的 CTL が発現するT細胞受容体 (TCR: 緑) により認識される。TCR 認識の際、pHLA は同時に CTL の CD3, CD8 分子等とも相互作用し、CTL はその刺激を引き金として IFN- γ などの炎症性サイトカインや、パーフォリン、グランザイムなどの細胞傷害性分子(いずれも紫)を指向性に放出する。

ルスタンパク質がプロテアソームにより断片化されペプチドとなり、HLA class I を含む小胞体内にペプチドトランスポーターである transporter associated with antigen processing (TAP)を介して取り込まれ、HLA class I 分子と結合してペプチド-HLA 複合体(pHLA)となり、細胞表面に提示される。ウイルス特異的 CTL は T 細胞受容体(TCR)を介して抗原決定基(エピトープ)である pHLA を認識し、抗ウイルス因子であるインターフェロン(IFN)- γ や、細胞傷害活性を有するパーフォリン、グランザイム Bなどを指向性に放出、ウイルス感染細胞を選択的に傷害する。HIV についてもこれと同様である。こと HIV 感染においては CTL がウイルス抑制に重要である事から、これまで多くの研究で HLA 多型と予後についての解析がなされ、数多くの HLA class I 拘束性エピトープが同定され、さらに各エピトープの詳細な特徴について解析されてきた⁶。

上記の通り、抗原提示されたエピトープは、そのエピトープに対応する特異的 TCR を介して CTL に認識される (Fig 4)。TCR は、HLA に提示される多様なエピトープに対応するため、成熟の過程で遺伝子再編成を起こし、個々の CTL が異なる TCR を発現する事で多様性を獲得する。TCR は β 鎖と α 鎖のヘテロダイマーであり、それぞれ定常部(C)と可変部から構成される。可変部はさらに、 β 鎖の場合は Variable (V)、Diversity (D) および Joining (J)の3領域、 α

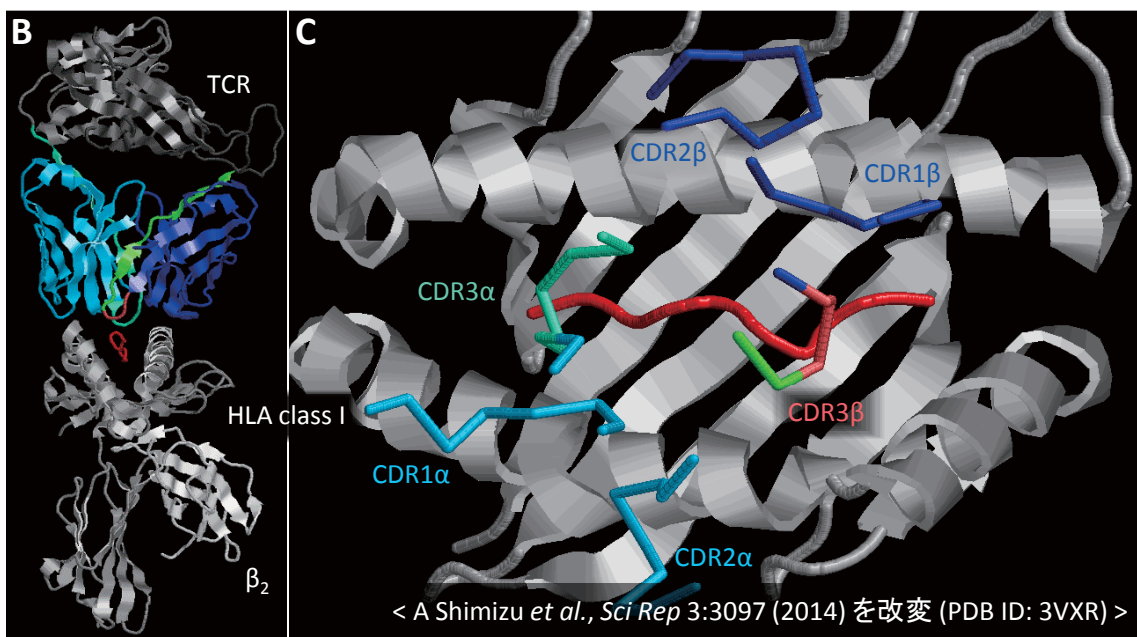
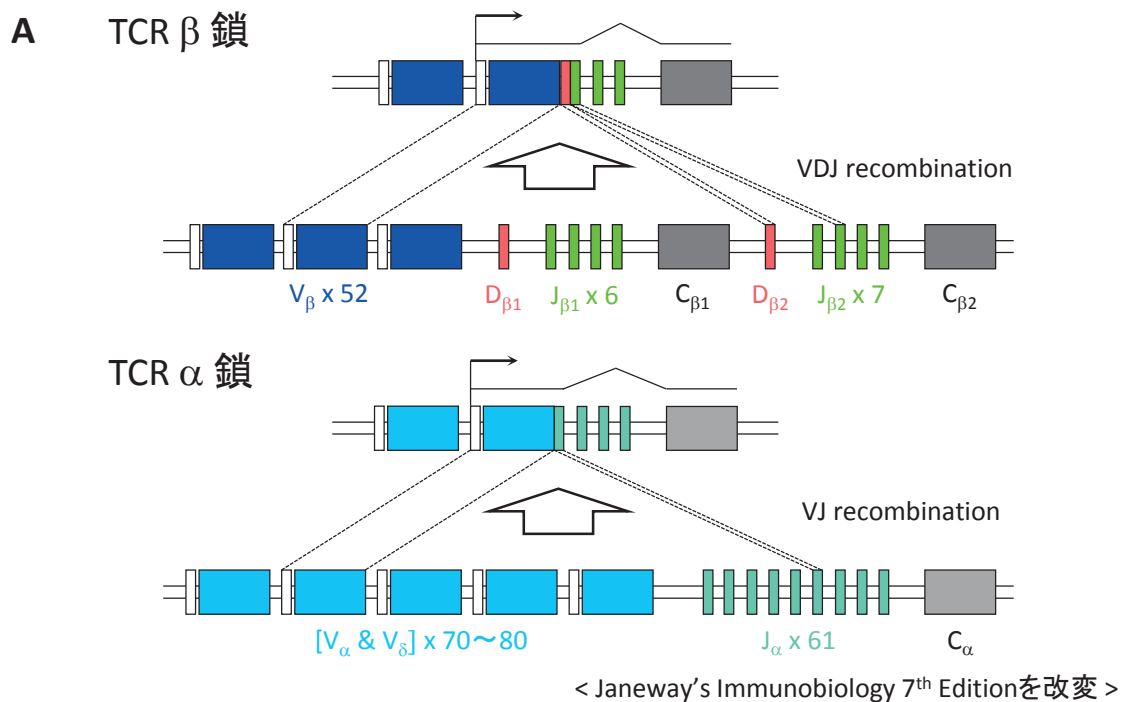


Fig 4. TCRによるエピトープ認識のゲノム科学的背景(A)および構造科学的背景(B,C)。(A) TCR 遺伝子のV(D)J再編成。(B) pHLA/TCR複合体の立体構造(側面)。(C) pHLA-TCR接触面をTCR側から見た図。

鎖の場合は V および J の 2 領域で構成される。TCR 遺伝子は胸腺における成熟の過程で、ランダムな V(D)J 遺伝子再編成により各領域が組み換えられ (Fig 4A)、自己 HLA を弱く認識可能だが自己 pHLA を認識しない T 細胞のみが生存する。そして末梢において、CTL が異物由来 pHLA を認識すると、その pHLA を提示する細胞を傷害する。この pHLA 認識に関与するのが、ループ状の構造を持つ相補性決定領域(CDR)である (Fig 4B,C)。TCR はβ鎖α鎖共に 3 つの CDR ループを有し、一般論として、V 領域にコードされる CDR1 および 2 は主に HLA のαヘリックスを認識し、ランダムで多様性に富む V(D)J 結合部に位置する CDR3 は主にペプチド収容溝に収まったペプチドを認識する (Fig 4C)。そのため、pHLA に対する認識特異性は、TCR の V 遺伝子と CDR3 領域の配列が規定すると言える。そして、各エピトープに対応する TCR を発現する CTL 集団は固有のレパートリーを作り、そのエピトープが提示された細胞を特異的に傷害する。

しかしながら先に述べた通り、HIV は CTL からの逃避変異を果たす。その機序としてよく知られるのは、ウイルス感染細胞側の抗原提示量の変化、および CTL 側の TCR による認識からの逃避である。抗原提示量の変化に関与するのは主に、プロテアソーム切断部位周辺の変異による抗原断片化効率の変化⁷、TAP によるペプチドの小胞体内取り込み効率の変化⁷、およびペプチドの HLA

アンカー部位の変異による HLA 結合能の変化である⁸⁻¹¹。ウイルス逃避変異はこれらの抗原提示側の要因と CTL 側の要因が絡み合い、場合によっては単一の機序で、また別の場合には複数の機序の相乗効果で選択圧となる。そのためウイルス変異機構の解析には、各エピトープの特徴を理解した上で個々の要因を精査する必要がある。

我々の研究室では CTL エピトープとウイルス変異の解析を行い、中でも HLA class I アリルの一つである HLA-A*24:02 に焦点を当ててきた。HLA-A*24:02 は東アジアを含む環太平洋地域において頻度が高く、特に遺伝的多様性の低い日本においては人口集団の約 60%がこのアリルを保有している¹²⁻¹⁴ (Fig 5)。そのため、HLA-A*24:02 拘束性エピトープの解析は多くの日本人 HIV 感染者に適応可能な知見をもたらさう。さらに、日本は他国と比較して HLA の多様性が低い事から、HIV は日本において主要な HLA に適応した変異を蓄積するなど、特徴的な現象が観察される^{10,15,16}。以上の様な観点から、我々は HLA-A*24:02 拘束性エピトープについての詳細な解析を行ってきた。

HLA-A*24:02 拘束性エピトープの中でも特に我々が注目しているのが、HIV Nef 領域に存在する 2 種類のエピトープ、Nef134-10 (RYPLTFGWCF)^{6,9,17-29}

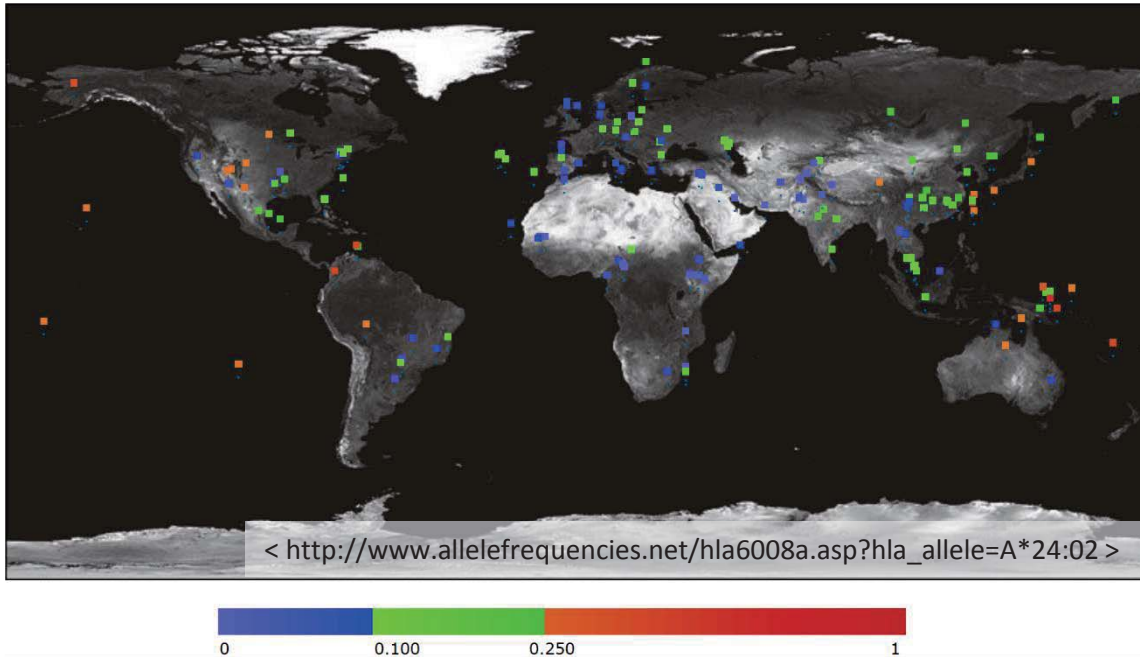
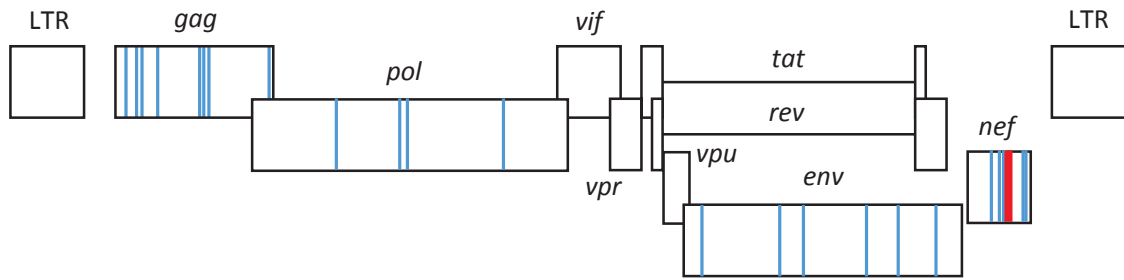


Fig 5. HLA-A*24:02 の地理的分布 (The Allele Frequency Net Database より)。 各点およびその色は、各地域におけるアレル頻度を示す。HLA-A24は東アジア、東南アジア、オセアニア、アメリカ西海岸など、環太平洋地域で高頻度に観察される。特に島嶼では地理的隔絶のため、民族間の遺伝子交雑が起こりにくく、世代を経るうちに何らかの要因で HLA-A*24:02 が選択されたと考えられる。日本は比較的大陸に近いものの、大陸民族との遺伝子交雑の頻度は低い。日本におけるHLA-A*24:02 アレル頻度は、The Allele Frequency Net Database では 36 ~ 38%、HLA 研究所では 36% とされており、60% 前後の日本人が HLA-A*24:02 陽性という事になる。

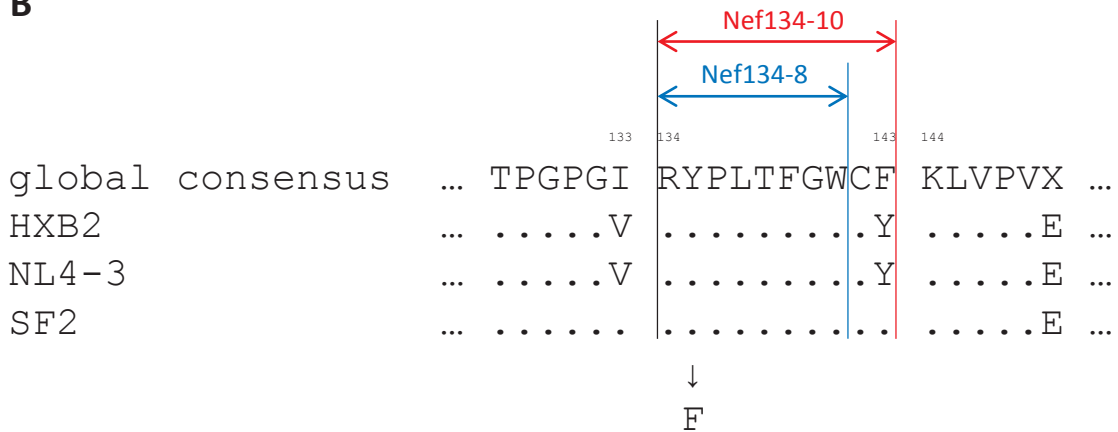
および Nef134-8 (RYPLTFGW)^{3,22,28-36} である (Fig 6)。これらのエピトープは Nef タンパク質の同一領域から切り出され、8 アミノ酸長 (Nef134-8 の全長) にわたり同一である。また Nef134-10 および Nef134-8 に対する CTL 応答は、8 割^{17,22} および 6 割^{22,33-35} と多くの HLA-A*24:02 陽性者で観察される事から、HLA-A*24:02 拘束性免疫応答のなかでも重要である。Nef134-10 と Nef134-8 において特異的 CTL 応答が観察される感染者の割合が異なる理由について、これらのエピトープ間の抗原提示の差異に起因するのか、エピトープ特異的 CTL の質的・量的差異によるものなのか、未だ明らかでない。

そして、これらのエピトープとの関連が示唆されている逃避変異の一つに、Nef Y135F 変異が挙げられる^{9,18-20,24,26,27,36-39} (Fig 6B)。この変異は、Nef134-10 および Nef134-8 のアンカー部位である 2Y をフェニルアラニンへと変異(2F 変異)させるものであり、ペプチド-HLA 間結合親和性を変化させる^{9,22,26} と同時に、エピトープ構造をわずかに変化させる¹⁹。我々は先行研究において、Y135F 変異が HLA-A*24:02 陽性感染者の 8 割において 1 年以内に達成される事を明らかにし¹⁹、国内 HLA-A*24:02 陰性者においても海外と比べて高頻度に Y135F 変異が観察される事、すなわち Y135F 変異が日本において蓄積している事を明らかにした^{9,19}。そして HLA-A*24:02 陰性者では比較的速やかに F to Y 復帰変異が選択される事も知られている³⁶。これらの研究結果は、

A



B



C

アミノ酸	相対結合能	
	Position 2	C-terminus
Y	1.0	0.012
W	0.93	0.66
F	0.83	1.0

< J. Sidney et al., Immunogenetics, 57: 393-408 (2005) >

Fig 6. HLA-A*24 拘束性エピトープと Nef134-10 および Nef134-8。 (A) HIV のゲノム構成と HLA-A24 拘束性 CTL エピトープ。 HIV は構造タンパクである Gag, Pol, Env の他、 Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu, Nef と いったアクセサリータンパクから成る。 HLA class I 拘束性エピトープは全領域で観察され、 Los Alamos 研究所が提供する HIV Database ではエピトープマップが公開されている。 図中青線は HLA-A*24 拘束性エピトープの位置を示し、 赤線の領域に Nef134-10 および Nef134-8 が存在する。(B) Nef134-10 および Nef134-8 近傍のアミノ酸配列。 Nef134-10 (赤: RYPLTFGWCF) は Nef 134 位を N 末端とした10mer からなるエピトープで、 2Y と 10F が HLA-A24 への結合アンカーとして用いられる。 Nef134-8 (青: RYPLTFGW) も同じく Nef 134 位を N 末端とするが 8mer から成り、 Nef134-10 と比較し 2アミノ酸 短い。 Nef134-8 のアンカー部位は 2Y および 8W である。 Nef Y135F 変異は、 これらのエピトープの アンカー部位である 2Y を 2F 変異させる。(C) エピトープの HLA-A*24:02 アンカー残基の相対結合能。 2Y エピトープの 2F 変異は、 ペプチド-HLA 間結合を弱める。 C 末端 F は Y への変異により著しく結 合力が低下する。 C 末端 W のエピトープは、 C 末端 F のエピトープより結合力が弱い。

Y135F 変異の HLA-A*24:02 拘束性エピトープとの関連を明確に示唆している。そして複数の先行研究により、Nef134-10 の 2F 変異は、抗原提示量の低下^{9,26}、特異的 TCR レパートリーの変化¹⁸、CTL によるウイルス複製抑制の減弱^{22,26}などを引き起こす事が明らかとなっており、Nef134-10 は複合機序により Y135F 変異の原動力となる事が示唆されている。しかしながら Nef134-8 もまた Y135F 変異選択に寄与するか、また Nef134-8 がどのような機構で変異選択に寄与するか、明らかでない。そして、HLA-A*24:02 適応変異の日本国内における蓄積が日本人新規 HIV 感染者の予後に及ぼす影響についても不明である。

私は本研究において、Nef134-10 および Nef134-8 と Y135F 変異の関連性についてウイルス学的、免疫学的、および臨床的側面から多角的に解析し、1) Nef134-8 特異的 CTL の免疫選択圧への関与、2) 135F 変異ウイルス初感染者における臨床予後、以上 2 点について検討した。

II .Nef134-10 および Nef134-8 による Y135F 変異選択の解析

2-1 緒論

日本国内において流行している Nef Y135F 変異は HLA-A*24:02 関連変異であり、その原因として 2 種類の HLA-A*24:02 拘束性エピトープ、Nef134-10 および Nef134-8 による変異選択が考えられている。これらのエピトープ領域は重複しており、Y135F 変異はこれらのエピトープの 2Y アンカーを 2F 変異させる。Nef134-10 の選択圧への寄与は、ペプチド-HLA 間結合親和性の解析^{9,22,26}、CTL クローンによる抗原提示細胞に対する免疫応答の解析^{9,19,26}、TCR レポートリーの解析¹⁸、TCR-pHLA 複合体の X 線構造解析¹⁹、ウイルス増殖抑制試験²⁶などの状況証拠から示唆されている。一方で、Nef134-8 についてはこれまで十分に解析されておらず、また X Sun らによる先行研究では、Nef134-8 CTL によるウイルス増殖抑制は Nef134-10 CTL と比較し弱い事が示唆されている²²。

本研究では、HIV 感染者のウイルス解析および CTL 解析により、Nef134-8 CTL 単独による Y135F 変異選択圧の直接観察に成功した。また、部分的ながら Y135F 変異選択の機序を解明する事ができた。以下詳述する。

2-2 材料と方法

・ HIV 感染者

東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科を受診し、書面による研究への同意が得られた HIV 感染者の内、HIV-1 subtype B に感染した、未治療または治療中断中の HLA-A*24:02 陽性者 31 名を無作為に抽出した。なお本研究は東京大学医科学研究所 倫理審査委員会により、「HIV 感染者における HIV に関する研究」（倫理番号：20-31-1120）、および「HIV 感染症における免疫応答の研究」（倫理番号：20-47-210521）として承認を受けている。

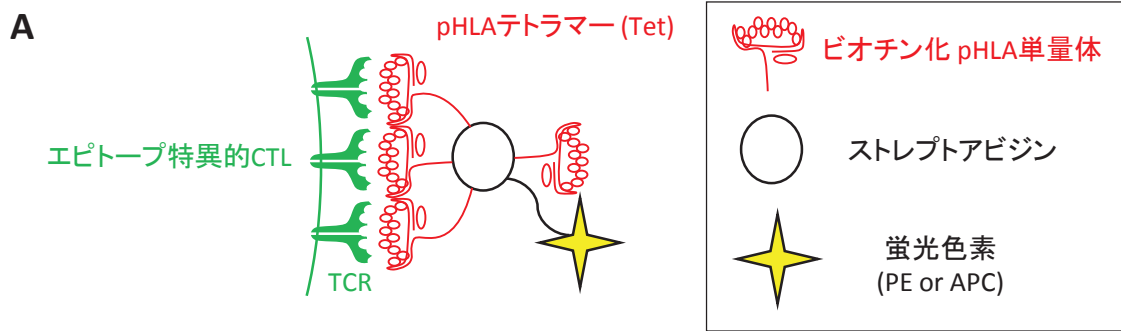
・ 培地と試薬

末梢血単核球 (PBMC) 分離のため、R(-)培地を以下の様に調製した：
RPMI1640 培地に、100 U/mL ペニシリン / 100 µg/mL ストレプトマイシン、
2 mM L-グルタミンおよび 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-
sulfonic acid (HEPES) を添加した。PBMC および CTL 培養のための R10 培地
を、R(-)培地に 10% 非働化ウシ胎児血清 (FCS) (GIBCO; 現在は Thermo
Fisher Scientific に併合; Waltham, MA, USA) を添加して調製した。さらに細
胞へのインターロイキン (IL)-2 刺激のため、R10 培地に 50 U/mL rhIL-2 (R&D

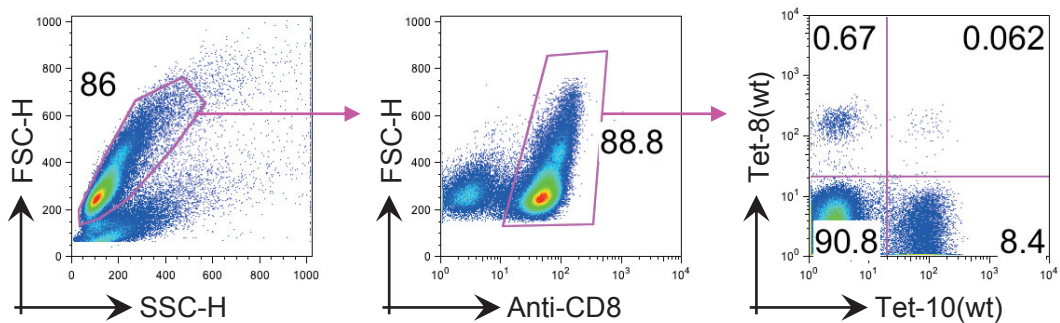
Systems, Minneapolis, MN, USA)を加える事で R10/50 培地とした。293FT 細胞
および HLA-A*24:02 を導入した 293FT-A24DRm-CY5 細胞の培養のための
D10 培地を、Dulbecco's modified Eagle medium に 10% FCS を添加して調製
した。フローサイトメトリーの際に用いる緩衝液(FACS Buffer)には、リン酸
緩衝液(PBS)に 2% FCS および 0.02% アジ化ナトリウム(NaN_3) (和光純薬工業、
大阪、日本)を添加して使用した。蛍光活性化セルソーター(FACS)で細胞をソ
ートする場合、FACS Buffer の代わりに R2 培地(2% FCS 添加 R(-)培地)を用い
た。注記の無い培地・試薬は全て Sigma (St Louis, MO, USA)から購入した。

以下の合成ペプチドを、いずれも Sigma-Genosys(石狩、北海道)から購入し
た : Nef134-10(wt) (RYPLTFGWCF)、Nef134-10(2F) (REPLTFGWCF)、
Nef134-8(wt) (RYPLTFGW)、Nef134-8(2F) (REPLTFGW) ; および陰性対照と
して、HIV *pol* 由来 HLA-B*35 拘束性エペトープ、B35-14 (NPDIYIYQY)。粉
末状のペプチドをまず dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、ペプチド終濃度
2 mM、DMSO 終濃度 5 v/v% となる様 ddH₂O で希釈した。

Nef134-10 特異的 CTL および Nef134-8 特異的 CTL の染色のため、エペト
ープ特異的 TCR への特異的結合・染色が可能な蛍光標識四量体化 pHLA 複合
体 (テトラマー : Fig 7A) を、先行研究と同様の方法で調製した¹⁸⁻²¹ (HLA



B (IMS0526)



C (IMS0892)

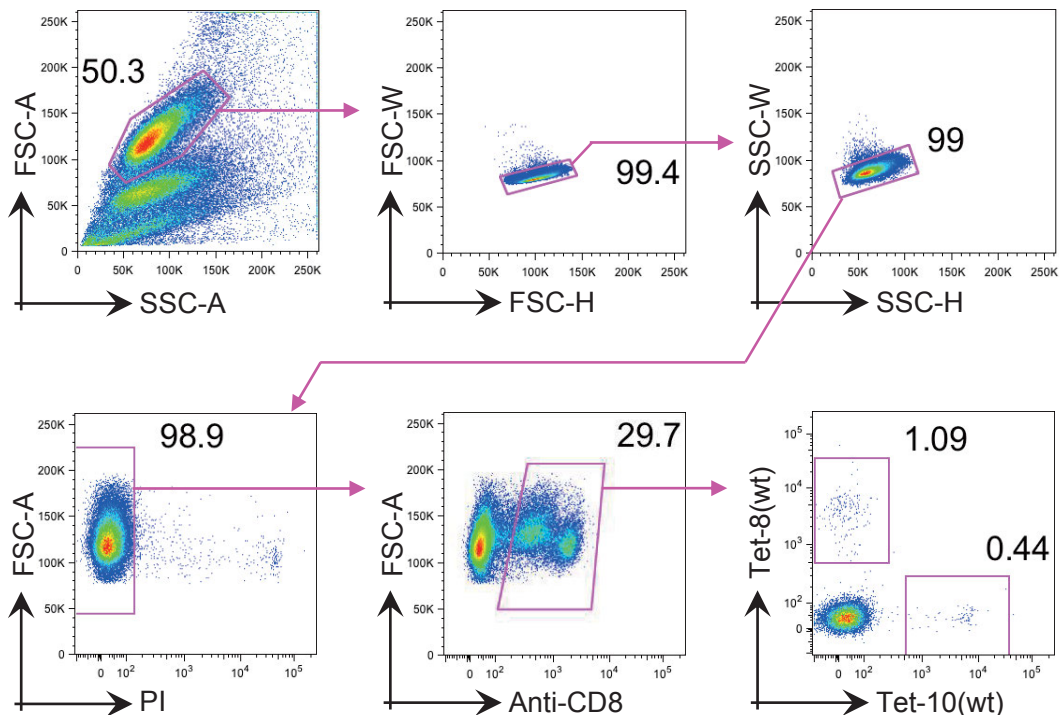


Fig 7. Nef134 特異的 CTL のテトラマー解析およびソーティング。 (A) pHLA テトラマー模式図。pHLA 単量体はエピトープ特異的 TCR と結合するが、結合力が比較的に弱いので細胞染色には用いることができない。pHLA テトラマーは、複数の pHLA が TCR と結合するため結合力が強く、エピトープ特異的 CTL を染色可能である。(B) フローサイトメトリー解析例。CD8 陽性生細胞ゲートを2種類のテトラマーで展開した。(C) FACS ソーティングのゲーティング。散乱光 (FSC, SSC) のシグナル高 (H) およびシグナル幅 (W) を用いたゲーティングを行う事で、複数細胞が単一液滴に含まれる際のシグナルの乱れを検知し、Single cell ソーティングを行えるようにした。

が HLA-A*24:02 で、ペプチドが Nef134-10(wt)、Nef134-10(2F)、Nef134-8(wt) あるいは Nef134-8(2F)のいずれかのテトラマーを、それぞれ Tet-10(wt)、Tet-10(2F)、Tet-8(wt)および Tet-8(2F)と呼ぶ事とする)。

・末梢血からの血漿および末梢血単核球の分離

ヘパリン採血管および EDTA 採血管により採血された末梢血から、以下の様に血漿と PBMC を分離・保存した。まず、約 10 mL の血液が入った採血管を 1500 rpm で 10 分間遠心分離し、上層の血漿を 2 本の 2 mL 保存チューブに分注した後、 -80°C で解析時まで保存した。下層の血球は R(-)培地で希釈して約 20 mL とし、4 mL の Ficoll Paque PLUS (GE healthcare)の上に血球 10 mL を静かに重層、2000 rpm で 20 分間、ブレーキ・オフで遠心分離した。遠心操作後、Ficoll 層の上面に集まった PBMC をスポイトまたはピペットで採取し、R(-)培地で 2 度洗浄後、7 mL の R(-)培地で再懸濁、細胞数を計測した。その後再び遠心分離して上清を取り除き、セルバンカー(十慈フィールド、東京、日本)中に再懸濁、2 mL 凍結保存用チューブに移し、バイセル(日本フリーザー、東京、日本)中で -80°C まで徐冷、その後液体窒素中に保存した。

・ 血漿ウイルス遺伝子の **direct sequence**

血漿ウイルスの Nef 領域の遺伝子配列を先行研究と同様に解析した^{9,20}。まず血漿中からのウイルス RNA 抽出を以下の様に行った: EDTA 採血の場合は、血漿 140 μ L から QIAamp viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) により RNA を精製し、60 μ L Buffer AVE で RNA を溶出した; ヘパリン採血の場合は、血漿 200 μ L から High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Basel, Switzerland) により RNA を精製し、50 μ L Elution Buffer で RNA を溶出した。抽出した RNA 4 μ L を鋳型とした 50 μ L の系による 1-step RT-PCR を、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen; 現在は Thermo Fisher Scientific に併合)を用いて、以下の温度条件で行った: 50°C 30 分; 94°C 2 分; 94°C 15 秒、55°C 30 秒、68°C 1 分の 3 ステップを 35~40 サイクル; 68°C 5 分。Nested-PCR のため、1-step RT-PCR 産物 2 μ L を鋳型とした増幅を、Takara *ExTaq* Hot Start version (タカラバイオ、大津、日本) 50 μ L の系で、以下の条件で行った: 94°C 2 分; 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分の 3 ステップを 35 サイクル; 72°C 7 分。One-step RT-PCR ではプライマー組として Nef-1F および Nef-1R を用い、2nd-PCR では Nef-2F および Nef-2R を用いた (Table 1)。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)による精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit およ

RT-PCR

Nef-1F: 5'-GTAGCTGAGGGGACAGATAGGGTTAT-3' (nt 8,688 - 8,731)

Nef-1R: 5'-GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC-3' (nt 9,632 - 9,607)

2nd PCR

Nef-2F: 5'-CGTCTAGAACATACCTAGAAGAATAAGACAGG-3' (nt 8,746 - 8,777)

Nef-2R: 5'-CGGAATCCGTCCCCGCGGAAAGTCCCTTGTA-3' (nt 9,477 - 9,444)

シーケンス

n226p: 5'-CTCAGGTACCTTTAAGACCAATG-3' (nt 9028 - 9050)

n296p: 5'-GGGACTGGAAGGGCTAATTTGGT-3' (nt 9098 - 9120)

n564m: 5'-GAAATGCTAGTTTGCTGTCAAAC-3' (nt 9387 - 9365)

n650m: 5'-GAAAGTCCCCAGCGGAAAGTCCC-3' (nt 9474 - 9452)

Table 1. 血漿ウイルス解析において使用したプライマーのリスト

び ABI3130xl (Life Technologies) により直接シーケンスした。シーケンスプライマーは、n226p、n296p、n564m、n650m を使用した (Table 1)。

・エピトープ特異的 CTL の *in vitro* 増幅

PBMC 中に含まれるエピトープ特異的 CTL の増幅のため、以下の通りペプチドパルスした¹⁸。まず、凍結保存した PBMC を融解後、 5×10^5 cells の刺激用細胞と 1×10^6 cells のエフェクター細胞に分割した。分取した 5×10^5 cells の刺激用細胞を、 $10 \mu\text{M}$ Nef134-10(wt) ペプチドまたは Nef134-8(wt) ペプチドを添加した R10 培地により 37°C で 1 時間パルスした。刺激用細胞の十分な洗浄後、 1×10^6 cells のエフェクター細胞、およびフィーダー細胞として 4×10^6 cells の健常人 PBMC を γ 線照射(3300rad)したものを添加し、全液量を 5mL として T25 フラスコ中で 4 日間培養した。5 日目、R10 培地を R10/50 培地に置換し、以降 3~4 日毎に R10/50 培地を交換しつつ、必要に応じて培地を増量しながら、14 日目まで培養した。

・テトラマー重染色によるエピトープ特異的 CD8 陽性細胞頻度の解析

エピトープ特異的 CTL の検出のため、ペプチド刺激後 PBMC を抗 CD8 抗体

および 2 種類のテトラマーで重染色し、フローサイトメトリーで解析した¹⁸。

in vitro ペプチド刺激により増幅した培養細胞を FACS Buffer により洗浄した後、10 µg/mL のフィコエリスリン(PE)標識 Tet-10(wt)およびアロフィコシアニン(APC)標識 Tet-8(wt)を添加し、37°C で 15 分間重染色した。染色した細胞を FACS Buffer で洗浄後、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識あるいはペリディニンクロロフィル(PerCP)標識 抗 CD8 抗体(BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA)を添加し、4°C 30 分間染色した。FACS Buffer で 2 度洗浄した後、1% パラホルムアルデヒド(PFA)添加 PBS により室温暗所 20 分間で固定した。固定した細胞を氷上に移動し、FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) によりフローサイトメトリーを行った (Fig 7B)。解析ではまず、直方散乱光(FSC)シグナル高(Height: FSC-H)および側方散乱光(SSC)-H により展開し、リンパ球生細胞にゲートを掛け、次に CD8 陽性細胞にゲートを掛けた。この細胞集団をさらに Tet-10(wt)および Tet-8(wt)で展開し、四分割ゲートにより分画した。エピソード特異的 CD8 陽性細胞の頻度は、以下の計算式により求めた：頻度(%) = [テトラマー陽性 CD8 陽性細胞数] / [全 CD8 陽性細胞数] x 100(%)。カットオフ値は、健常人 5 名におけるテトラマー陽性細胞頻度の平均 + 2 x 標準偏差とした。

・ **T2-A24 stabilization assay** によるペプチド－HLA 間結合親和性解析

HLA-A*24:02 に対するペプチド結合能を解析するため、T2-A24 stabilization assay を以下の通り行った^{9,20}。愛知県がんセンター研究所の葛島清隆博士から分与いただいた、TAP2 欠損 T2 細胞株由来 HLA-A*24:02 発現細胞株、T2-A24 は、0.8 mg/mL G418 (Invitrogen) を添加した R10 培地にて継代培養を行った。T2-A24 stabilization assay は以下の通り、3 回の実験を独立して行った。まず、T2-A24 を 26°C で 16 時間、CO₂ 培養装置内でインキュベートした後、4°C 条件下で 100~0.001 μM ペプチドによるパルスを経験した。その後 37°C で 3 時間培養し、得られた細胞をビオチン標識抗ヒト HLA-A9 モノクローナル抗体 (One Lambda; 現在は Thermo Fisher Scientific に併合) および APC 標識ストレプトアビジン (BD Pharmingen) で染色した。その後、FACS Calibur により染色した細胞の mean fluorescence intensity (MFI) を測定し、以下の計算式によりデータを標準化した： $\% \text{ max MFI} = (\text{MFI}_{\text{Sample}} - \text{MFI}_{\text{background}}) / (\text{MFI}_{\text{Max}} - \text{MFI}_{\text{background}}) \times 100(\%)$ ；ただし MFI_{Max} は、各実験回において最大の MFI とした。

・ CTL クローンの単離と性状評価

野生型および 2F 変異型エピトープを同程度認識可能 (dual-tropic) な Nef134-10 特異的 CTL クローン (C1-28) および Nef134-8 特異的 CTL クローン (T26-102) を、以下の方法で樹立した^{9,19-21}。まず、Nef134-10 および Nef134-8 特異的 CTL の *in vitro* 増幅の項と同様、HLA-A*24:02 陽性 HIV-1 感染者の PBMC を、それぞれ Nef134-10(wt) ペプチドあるいは Nef134-8(wt) ペプチドで刺激した。PBMC をテトラマー染色後、磁気細胞分離 (MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) により濃縮し、得られたテトラマー陽性細胞を限界希釈して 96 ウェルプレートに播種、フィトヘマグルチニン-L (PHA-L) で刺激し、他家 PBMC を γ 線照射 (3300rad) したフィーダー細胞の共存下、R10/50 培地中で拡大培養した。

CTL クローンの特異性の確認は、テトラマー重染色および ⁵¹Cr 遊離試験 (次項) により行った。テトラマー重染色では、C1-28 の場合は Tet-10(wt)-APC および Tet-10(2F)-PE を、T26-102 の場合は Tet-8(wt)-APC および Tet-8(2F)-PE を用いた。

• ⁵¹Cr 遊離試験

EB ウイルス(EBV)により不死化した HLA-A*24:02 陽性 B 細胞株、B-LCL は、R10/50 培地中で継代培養した⁹。⁵¹Cr 遊離試験の前日、B-LCL を R10 培地中に移し替え、一晚培養した。CTL クローンについては刺激後 10~14 日目に用い、B-LCL と同様、使用前日に R10 培地中に移し替え、一晚培養した。

⁵¹Cr 遊離試験は以下の通り行った⁹。2 または 5×10^3 cells/well の B-LCL を遠心チューブに集め、1500 rpm で 5 分間遠心した後、上清を 100 μ L/well Na⁵¹CrO₄ に置換した。2 時間 37°C でインキュベートした後、細胞を R10 で 3 回洗浄し、50 μ L/well R10 に再懸濁後、50 μ L R10/well の Nef134 ペプチド希釈液をあらかじめ分注した 96 well U 底プレートに細胞を加え、1 時間 37°C 刺激した。その後、Effector:Target = 5:1 の比率で CTL クローンを添加 (1×10^4 C1-28 または 2.5×10^4 T26-102/100 μ L R10/well) し、4 時間 37 °C でインキュベートした。その後、細胞を遠心操作により沈殿させ、100 μ L/well の上清を、あらかじめ 100 μ L/well Optiphase SuperMix (PerkinElmer,Waltham, Massachusetts, USA)を分注しておいた 96-well PET microplate (Cat.1450-401, PerkinElmer)に移し、振盪・混合した。液体シンチレーションによる ⁵¹Cr の定量は、1450 MicroBeta TriLux (Perkin Elmer)により行った。自発的 Cr

遊離時のβ線カウント(C_{Spn})および最大 Cr 遊離時のカウント(C_{Max})はそれぞれ、CTL の代わりに R10 培地または 2% Triton-X を添加した際の値を用いた。各サンプルの細胞傷害(specific lysis)は、サンプル上清のβ線カウントの値(C_{Sam})を基に、以下の計算式で算出した： $specific\ lysis\ (\%) = (C_{Sam} - C_{Spn}) / (C_{Max} - C_{Spn}) \times 100$ 。

・ IFN- γ ELISA による内在性抗原提示量の解析

ミニジーン発現ベクター、pmNef(wt)-hRluc-EGFP、pmNef(135F)-hRluc-EGFP および pmGag-hRluc-EGFP は、野生型または 135F 変異型の *nef* ミニジーン(SF2 Nef123-153)、もしくは *gag* ミニジーン(SF2 Gag18-46)が N 末端側に融合したウミシイタケルシフェラーゼを発現する²⁰。

CTL クローンによる、ミニジーン発現 A*24:02 陽性細胞に対する免疫応答の解析を、以下の通り行った²⁰。1 日目、80%コンフルエントの 293FT-A24DRm-CY5 または 293FT 細胞をトリプシン処理により回収し、96 well 平底プレートおよびルシフェラーゼ測定用オプティカルプレート(Cat. 165306, Thermo Fisher Scientific)に 2×10^4 cells/well 播種した。2 日目、5mL ポリプロピレンチューブに OptiMEM (GIBCO) を 20 μ L/well 加えベクターを 100ng/well

添加し、Fugene HD (Promega, Madison, Wisconsin, USA)を 0.3 μ L/well 添加した後、軽くボルテックスした。15 分間室温で放置した後、ベクター溶液を各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cの CO₂培養装置の中で 24 時間培養した。また、あらかじめ凍結保存した CTL クローンを 2 日目に融解し、R10 培地で洗浄した後、37 $^{\circ}$ Cで培養した。3 日目、遺伝子導入効率の確認を、蛍光顕微鏡下における目視と、*Renilla*-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用いたルシフェラーゼ活性の測定により行った。遺伝子導入の確認の後、CTL クローンを 5 - 7.5 x 10³ cells/well 加え、24 時間共培養した。4 日目、培養上清を軽くピペッティングした後、1500 rpm で 5 分間遠心操作した。培養上清 180 μ L/well を新たな 96 well プレートに移し替え、パラフィルムで側面に封をした後、-80 $^{\circ}$ C中に保存した。保存した培養上清は 1 週間以内に、Opti-EIA Human IFN- γ ELISA kit (Beckton Dickinson)を用いて、プロトコル通りに IFN- γ を定量した。

実験は 3 回独立に行い、各実験回ごとに同一条件の共培養を 3 well/condition で行った。IFN- γ ELISA では、共培養した各 well の上清を Assay Diluent により 3 倍または 21 倍希釈して 210 μ L とし、それぞれ 100 μ L/well x 2 well で測定を行った。ELISA の定量値はいずれも、標準物質により作成した検量線の測定範囲内に収まるいずれかの希釈段階のものを用いた。IFN- γ 量が 0 以下と算出された場合、その値には 0 を代入した。データの標準化は、各実験回ごと

に独立して、以下の様に行った：まず各実験回の、pmNef(wt)-hRluc-EGFP 導入細胞に対する IFN- γ 産生量の平均 (Nef(wt) response) を計算した；次に、各サンプルの IFN- γ 量をその実験回の Nef(wt) response で除算し、%表示とした (% Nef(wt) response)。

・エпитープ特異的 CTL の TCR レポートリー解析

エпитープ特異的 TCR レポートリーの解析のため、先行研究と同様、テトラマー陽性 CD8 陽性生細胞を FACS にてソートした後、mRNA を基に TCR 遺伝子の解析を行った^{18,29}。

ペプチド刺激 PBMC をそのまま、あるいは一度凍結保存を経た後、テトラマーによる重染色を行った。テトラマー重染色は先述の方法とほぼ同様に、FACS Buffer の代わりに R2 培地を使用して、使用する抗 CD8 抗体は FITC 標識を選択し、1% PFA による固定をせずに行った。染色した細胞を氷上に移動し、ソートを行う直前にヨウ化プロピジウム (PI) を 1/500 容量添加した後、FACS Aria によるソートを行った。Tet⁺ CD8⁺ 生細胞をソートするため、以下のゲーティングを行った (Fig 7C)。まず FSC シグナル面積 (Area: FSC-A) および SSC-A によりリンパ球生細胞にゲートを掛け、ダブレット (2 個以上の細胞を含む単

一の液滴) 除去のため、FSC-H と FSC シグナル幅(Width: FSC-W)の組み合わせ、および SSC-H と SSC-W の組み合わせでゲートを掛けた。単一細胞の含まれるシングレットからさらに、PI 陰性集団を生細胞としてゲートを掛け、次に CD8 陽性細胞にゲートを掛けた。この細胞集団をさらに Tet-10(wt)および Tet-8(wt)で展開し、Tet-10(wt)⁺ Tet-8(wt)⁻集団および Tet-10(wt)⁻ Tet-8(wt)⁺ 集団にゲートを掛けた。以上のゲートにより Tet⁺ CD8⁺ 生細胞のソートを行った後、R2 培地中に回収した細胞をすぐに遠心操作により回収し、RNeasy Micro Kit(QIAGEN)に添付の Buffer RLT によりホモジナイズした後、-80°Cに凍結保存した。

Buffer RLT に溶解した total RNA を、RNeasy Micro Kit によりプロトコル通りに抽出した。抽出した RNA 12 μL を鋳型とし、5'-RACE 変法である SMART 法(Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript technology)による逆転写を行った。SMART 法のため、Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, 現在はタカラバイオと併合)に PrimeScript RT(タカラバイオ)と RNase OUT(Invitrogen)を組み合わせ用いた。逆転写のためのプライマー、および Template Switch のためのオリゴヌクレオチドの配列は、Table 2 の通りである。得られた total cDNA は NucleoSpin Extract (Clontech)により精製された。精製 cDNA 全量を鋳型とした 1st PCR による非特異的増幅は、

RT

SMART IIA Oligonucleotide: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'

3' SMART CDS Primer IIA: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₃₀N₋₁N-3'

1st PCR

5' PCR Primer IIA: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

2nd PCR

(TCR 共通) 5'-SMA: 5'-CAACGCAGAGTACGCGGG-3'

(TCR α 鎖) 3'-TRAC: 5'-GGCAGACAGACTTGTCCTGGATTTAGAG-3'

(TCR β 鎖) 3'-TRBC: 5'-TGACCCCACTGTGCACCTC-3'

Colony direct PCR

(pGEM-T easy) T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

(pGEM-T easy) Rev: 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

(TCR α 鎖) 3'-TRAC (上記)

(TCR β 鎖) 3'-TRBC (上記)

Table 2. TCR レパートリー解析において使用したプライマーのリスト

Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech)、および Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit に添付のプライマー (Table 2) を使用して、以下の温度条件で行った：95°C 1 分；95°C 5 秒、65°C 5 秒、68°C 3 分の 3 ステップを 15 サイクル；68°C 10 分。非特異的に増幅した 1st PCR 産物 5 μ L を鋳型とした TCR 特異的 2nd PCR を、Takara *ExTaq* Hot Start Version (タカラバイオ) を用いて、以下の温度条件で行った：94°C 1 分；94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分の 3 ステップを 25 サイクル；72°C 7 分：ただし、目的遺伝子の増幅が悪い場合は 5 サイクル追加した。2nd PCR のプライマー組として、5'-側アダプター配列特異的プライマーおよび TCR 定常領域特異的プライマーを用いた：TCR β 鎖増幅の場合は 5'-SMA および 3'-TRBC を、 α 鎖増幅の場合は 5'-SMA および 3'-TRAC を用いた (Table 2)。2nd PCR 産物はその後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) による精製および／もしくは QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) による 500~800bp バンドの切り出し・精製を行い、すぐに pGEM-T easy vector (Promega) による TA クローニングに供した。ベクターを大腸菌 JM109 株にヒートショック法を用いて遺伝子導入し、イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) および 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド (X-Gal) を添加したアンピシリン添加 LB 寒天培地に播種、37°C 16 時間培養した。得られた白コロニーから釣菌し、20 μ L の KOD-plus (東洋紡、大阪、日本)

の系による直接コロニーPCRを、以下の温度条件で行った：94℃2分；94℃15秒、55℃30秒、68℃75秒の3ステップを27サイクル；68℃7分。使用するプライマーは、TCR遺伝子以外が増幅しない様にTCR特異的プライマー1種(3'-TRBCまたは3'-TRAC)と、pGEM-T easy特異的プライマー2種(T7およびRev)を用いた2通りの組み合わせを試みた (Table 2)。コロニーPCR産物を電気泳動により確認し、目的バンドが観察されたコロニーPCR産物をExoSAP-IT (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA)で精製した。精製したPCR産物のシーケンスはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)およびABI3130xl (Life Technologies)により行い、得られたシーケンスデータをSequencher 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA)により解析した。TCR遺伝子のアノテーションは、the international ImMunoGeneTics information system (IMGT)ホームページ⁴⁰にて提供されているIMGT/HighV-QUESTツール⁴¹を用いて行った。得られたアノテーションデータを基にMicrosoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)を用いてTCRレパトリーの表を作成した。さらに、V. Venturiらが先行文献で示した方法⁴²によりSimpson多様度指数を算出するため、Microsoft Excel VBAで記述した自作マクロを用いて、作成した表を元に演算を行った。なお、Simpson多様度指数(D)は以下の式により求められる： $D = 1 - \sum_{i=1}^c \frac{n_i(n_i-1)}{n(n-1)}$ (ただし、 i : クロノタイプ、 n : レポート

リー中の全クローン数、 n_i : クロノタイプ i のクローン数。 $0 \leq D < 1$ 。 $D = 0$

は均一なレパートリー、 $D \approx 1$ は多様なレパートリーを示す)。

- 統計解析

統計解析および図表作成のため、 GraphPad Prims 5 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) を使用した。

2-3 結果

・ HLA-A*24:02 陽性 HIV 感染者の血漿ウイルス解析

まず、無作為に選んだ未治療あるいは治療中断中の HLA-A*24:02 陽性 HIV-1 subtype B 慢性感染者 31 名を対象とし、Nef 134-143 領域に存在するウイルス変異を解析した。血漿ウイルスの直接シーケンスの結果、血漿 Y135 陽性者は 7 名、血漿 135F 陽性者は 23 名、血漿 135W 陽性者は 1 名であり (Fig 8A)、変異型ウイルス陽性者頻度は先行研究¹⁹と同様であった (Fig 8B; $p=0.1241$, Fisher's exact test)。また、Los Alamos 研究所が提供する HIV データベース⁴³と比較したところ、本研究の HLA-A*24:02 陽性者における Y135F 変異頻度は有意に高かった ($p<0.0001$, χ^2 test)。血漿 Y135 陽性者の内、エピトープ領域が完全に野生型である感染者は 2 名のみであった (Fig 8A)。

・ 野生型(Y135)エピトープ特異的 CTL 応答

次に、野生型エピトープ特異的 CTL の誘導がエピトープ変異とどの様に関連するか解析する事とした。そのために、血漿ウイルス解析を行った 31 名の PBMC を用い、野生型エピトープペプチドで刺激した PBMC をテトラマー重染色し、野生型テトラマー陽性 CD8 陽性細胞の頻度を解析した (Fig 7B, Fig

感染者 ID	HLA		Nef134-10 sequence 血漿ウイルス		Tetramer ⁺ CD8 ⁺ cells			
	HLA-A	HLA-B	週数	RYPLTFGWCF	週数	Tet-10(wt) 頻度 (%)	週数	Tet-8(wt) 頻度 (%)
IMS0738	24:02/33:03	40:02/44:03	18	-----	28	3.8	28	6.5
IMS0671	24:02/33:03	40:06/44:03	11	-----	11	10.5	11	28.0
IMS0509	24:02/11:01	07:02/15:01	0	---I-----	58	2.0	58	3.2
IMS0638	24:02/11:01	15:11/52:01	0	----C-----	0	8.5	0	14.8
IMS0506	24:02/11:01	07:02/55:02	194	----C-----	0	25.9	0	52.2
IMS0632	24:02/31:01	51:01/52:01	0	-F-----	195	1.6	195	0.9
IMS0725	24:02	52:01/54:01	269	-F-----	194	5.3	194	2.0
IMS0892	24:02/02:01	15:18/52:01	31	-F-----	38	1.3	31	11.5
IMS0367	24:02	52:01	80	-F-----	80	6.3	80	1.2
IMS0765	24:02/26:01	35:01/52:01	10	-F-----	46	1.2	65	0.3
IMS0526	24:02/02:06	48:01/51:01	0	-F-----	245	8.4	245	0.4
IMS0827	24:02/31:01	07:02/40:02	4	-F-----	4	1.5	4	1.0
IMS0593	24:02/11:01	07:02/67:01	0	-F-----	17	0.4	17	0.3
IMS0539	24:02/11:01	54:01/56:03	23	-F-----	42	1.6	42	3.4
IMS0955	24:02/11:01	15:01/52:01	14	-F-----	57	0.7	57	0.5
IMS0850	24:02/02:06	35:01/52:01	66	-F-----	134	8.4	134	0.35 [†]
IMS0748	24:02/31:01	39:01/51:01	1	-F-----	24	5.4	24	0.07
IMS0653	24:02/33:03	07:02/44:03	72	-F-----	32	0.5	32	0.02
IMS0849	24:02/02:01	48:01/52:01	7	-F-----	65	13.0	65	0.05
IMS0758	24:02/02:10	40:06/52:01	27	-F-----	27	1.0	27	0.02
IMS0601	24:02/24:20	15:07/40:01	0	-F-----	80	0.6	80	0.13
IMS0541	24:02/11:01	07:02/51:01	0	-F-----	253	11.5	253	0.05
IMS0649	24:02/26:01	40:02/52:01	30	-F-----	30	3.1	30	0.10
IMS0573	24:02	40:06/52:01	13	-F-----	61	0.7	61	0.02
IMS0543	24:02/26:01	40:01/55:02	70	-F-----	70	2.3	70	0.09
IMS0735	24:02	52:01	3	-----P-	3	0.2	3	7.0
IMS0525	24:02/31:01	15:01/51:01	67	-----Y	129	0.05	129	12.8
IMS0871	24:02/26:01	35:01/52:01	0	-F-----Y	55	0.01	55	0.3
IMS0801	24:02/33:03	40:06/52:01	99	-F-----	99	0	99	0.07
IMS0692	24:02/02:06	51:01/52:01	21	-F--C-----	56	0.04	56	0.05
IMS0617	24:02/26:01	40:02/52:01	28	-W-----	130	0.08	130	0.15 [†]

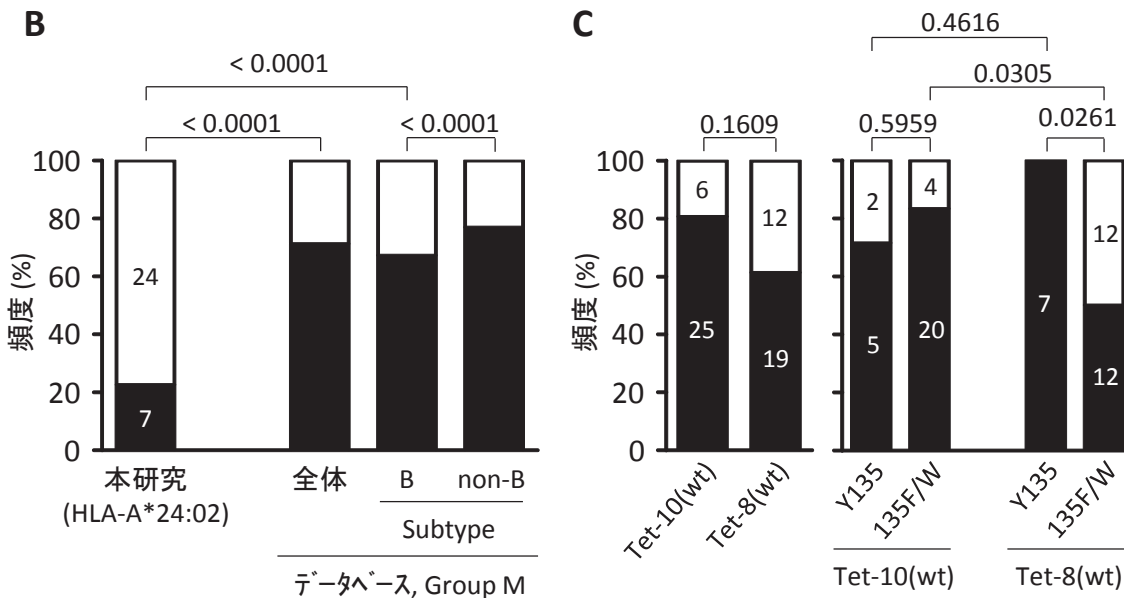


Fig 8. HLA-A*24:02 陽性者31名の血漿ウイルス解析およびテトラマー解析の結果。(A) 各感染者の Nef134-10 領域の血漿ウイルス直接シーケンス、およびテトラマー重染色によるフローサイトメトリー解析の結果。赤字は特徴的な HLA およびウイルス変異。テトラマー解析の背景色は、細胞頻度と対応している。†: サンプル不足のため、Nef134-10(wt)ペプチド刺激におけるTet-8(wt)⁺ CD8⁺ 細胞頻度を適用した。(B) Y135野生型(黒)／Y135F/W変異型(白)頻度。棒グラフ中の値は人数。P値はχ²検定により算出した。(C) 各群のテトラマー陽性者頻度。黒:テトラマー陽性者、白:テトラマー陰性者。棒グラフ中の値は人数。P値は Fisher's exact test により算出した。

8A)。Tet-10(wt)⁺ CD8⁺ 細胞がカットオフ値以上の HIV 感染者 (10CTL(+) Pt) は 25 名 (81%)、Tet-8(wt)⁺ CD8⁺ 細胞がカットオフ値以上の HIV 感染者 (8CTL(+) Pt) は 19 名 (61%) であった (Fig 8C)。また、10CTL(+)8CTL(+) Pts は 16 名、10CTL(+)8CTL(-) Pts は 9 名、10CTL(-)8CTL(+) Pts は 3 名、10CTL(-)8CTL(-) Pts は 3 名であった (Fig 8A)。

以上の結果を血漿ウイルス解析の結果と照らし合わせたところ、10CTL(+) Pts 頻度に血漿 Y135F/W 変異による差は無かった ($p=0.5959$, Fisher's exact test)。一方で、8CTL(+) Pts 頻度は血漿 Y135 陽性者では 100% であったのに対し、血漿 Y135F/W 陽性者は 50% のみで、有意に頻度が低かった (Fig 8C; $p=0.0261$, Fisher's exact test)。言い換えれば、Nef134-10 CTL は Y135F 変異とは無関係に誘導されるのに対し、Nef134-8 CTL 誘導は Y135F 変異と何らかの関連があると考えられる。

・ Nef134-8 特異的 CTL 単独による Nef Y135F 変異選択の観察

血漿ウイルス解析とテトラマー解析の結果から、Nef134-8 CTL 誘導は Y135F 変異と関連があると考えられる。そこで、未だ解明されていない Nef134-8 特異的 CTL の Y135F 免疫選択圧を検討する事とした。Nef134-8 CTL

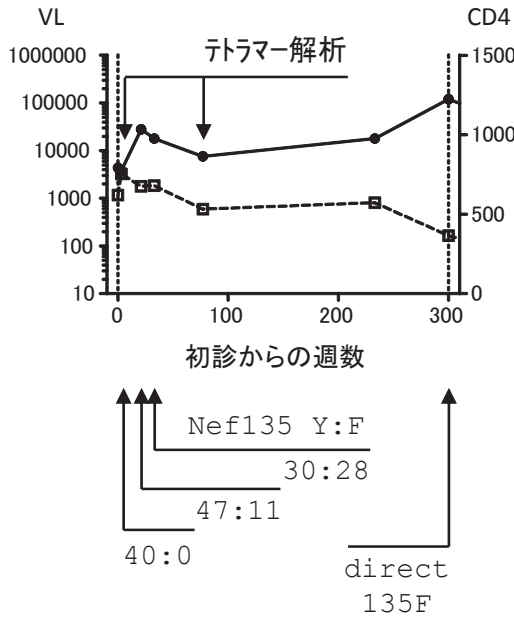
のみが誘導されていた感染者の内 2 名(IMS0735 および IMS0525)は、Nef134-10 領域内だが Nef134-8 領域外の C142P あるいは F143Y 変異を有する血漿 Y135 陽性者であった(Fig 8A)。そこでこの 2 名に焦点を当て、Nef134-8 特異的 CTL 単独による Y135F 変異選択の経時観察を行った (Fig 9)。

まず C142P 変異を有する IMS0735 について、血漿ウイルスの直接シーケンスおよびクローニングシーケンスの結果と、テトラマー解析の結果について照らし合わせた (Fig 9A)。初診後 3 週の時点において、クローニングシーケンスの結果は全て Y135 であり⁴⁴、またこの時点のテトラマー解析の結果は 10CTL(-)8CTL(+)であった。しかし 21 週におけるクローニングシーケンスの結果、135F ウイルスが 58 クローン中 11 クローン存在し、さらに 33 週時点では 59 クローン中 28 クローンと明らかに増加傾向にあった⁴⁴。その後 77 週時点でテトラマー解析をしたところ、3 週時点と同様 10CTL(-)8CTL(+)であり、さらに 300 週においては血漿直接シーケンスの結果が 135F へと変化した。

F143Y 変異を有する IMS0525 の解析も同様に行った (Fig 9B)。初診から 130 週の時点のテトラマー解析の結果、10CTL(-)8CTL(+)である事が確認され、血漿ウイルスの直接シーケンスを行った所、68 週時点では Y135 であったのに対し、254 週時点では 135F 変異体が選択されていた。

●— ウイルス量(VL) (copies/ml)
 -□- CD4細胞数 (cells/μl)

A. IMS0735



B. IMS0525

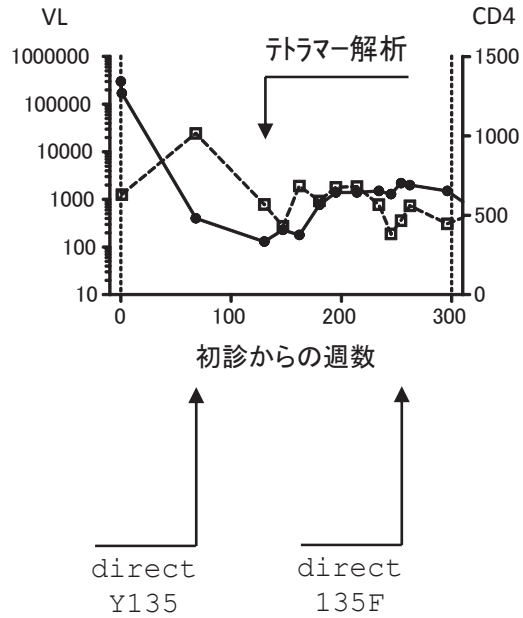


Fig 9. Nef134-8 CTL 単独による Nef Y135F 変異選択圧。(A, B) Nef134-10 領域に 9P 変異および 10Y 変異を有する IMS0735(A) および IMS0525(B) の臨床経過と血漿ウイルス解析、テトラマー解析のグラフ。●実線と左 Y 軸: ウイルス量(VL) (copies/ml)、○破線と右 Y 軸: CD4 細胞数 (cells/μL)。矢印は解析時点を示す。なお、血漿ウイルス解析データのうち、クローニングシーケンスの結果は渡邊紗也香氏の修士論文より引用した。

以上の結果から、Nef134-8 CTL は単独で Y135F 変異選択圧に寄与している事が明らかとなった。

・ T2-A24 stabilization assay によるペプチド-HLA 間結合親和性の解析

次に、Nef134-10 および Nef134-8 が Y135F 変異を選択する機序を解明する事とした。Y135F 変異はアンカー変異であり、抗原提示量に影響を与えると考えた我々は、ペプチド-HLA 間結合親和性に焦点を当て、T2-A24 stabilization assay によりこれを解析した (Fig 10)。結果、いずれのエピトープも 2F 変異によりペプチド-HLA 間結合親和性が低下する事が明らかとなったが、エピトープ間でその程度に差が見られた。Nef134-10 では 2F 変異による半数結合濃度(SD₅₀)上昇が 4 倍程度であり、先行研究と同様、ペプチド-HLA 間結合親和性の低下は穏やかであった 9.26 のに対し、Nef134-8 の 2F 変異によるペプチド-HLA 間結合親和性の低下は大きく、Nef134-8(2F)の SD₅₀ は 1 μM を大きく超えていた。また、Nef134-8 ペプチドの最大結合量については、野生型の場合でも Nef134-10 の 7 割程度しかなかった。以上より、Nef134-10(2F)ペプチドは一定程度 HLA-A*24:02 に結合するのに対し、Nef134-8(2F)ペプチドは著しく結合しにくいと考えられる。

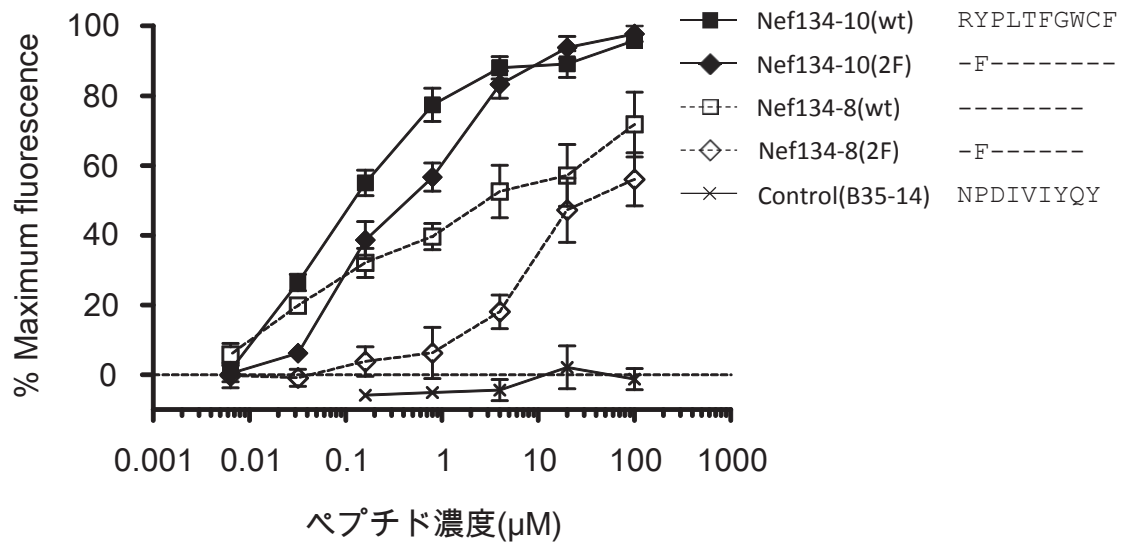


Fig 10. T2-A24 stabilization assay によるペプチド-HLA 間結合親和性の解析。Mean Fluorescent Intensity (MFI) を測定し、3 回の独立した実験において、各回の最大 MFI に対する MFI の比を取り % Maximum fluorescence とした。黒印実線: Nef134-10、白印破線: Nef134-8、正方形: 野生型 (wt)、菱形: 2F変異型、罰印実線: コントロールペプチド(B35-14)。印とエラーバーは 3 回の平均±標準偏差を示す。

・ 内在性発現ペプチドの抗原提示量解析

さらに、これらのエピトープの 2F 変異による抗原提示量の低下を検討した。方法として、野生型エピトープと 2F 変異型エピトープを交差認識する dual-tropic CTL クローンを用いて、*nef* ミニジーン発現ベクターを導入した HLA-A*24:02 陽性 293FT 細胞株に対する免疫応答を IFN- γ ELISA により定量し、変異型エピトープの抗原提示を野生型エピトープと比較した (Fig 11)。

まず、使用する CTL クローンの性状解析を行った (Fig 11A-D)。Nef134-10 特異的 CTL クローンである C1-28 は、Tet-10(wt)および Tet-10(2F)による重染色により同程度染色され (Fig 11A)、またクロム遊離試験により特異性を確認しても、Nef134-10(wt)と Nef134-10(2F)を同程度認識可能である事が示された (Fig 11C)。一方、Nef134-8 特異的 CTL クローンである T26-102 もまた、Tet-8(wt)と Tet-8(2F)による重染色で同程度染色された (Fig 11B)。クロム遊離試験では、Nef134-8(2F)の方が 10 倍程度 SD_{50} が高かったが、この認識の差はペプチド-HLA 間結合力の差によるものと考えられる (Fig 10, Fig 11D)。また、T26-102 の反応曲線は、C1-28 の 1/10 のペプチド濃度で立ち上がっていた (Fig 11C,D)。よって C1-28 および T26-102 は、それぞれ Nef134-10 およ

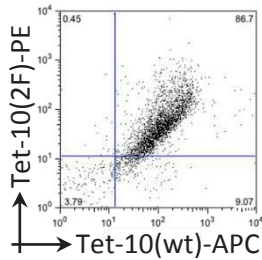
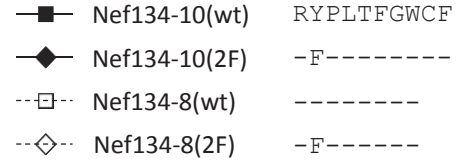
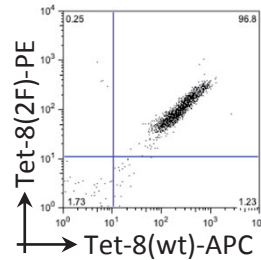
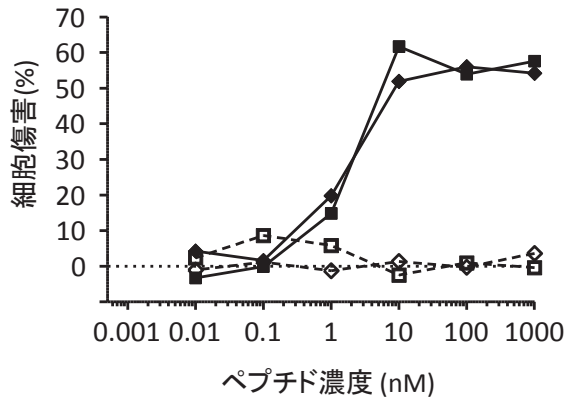
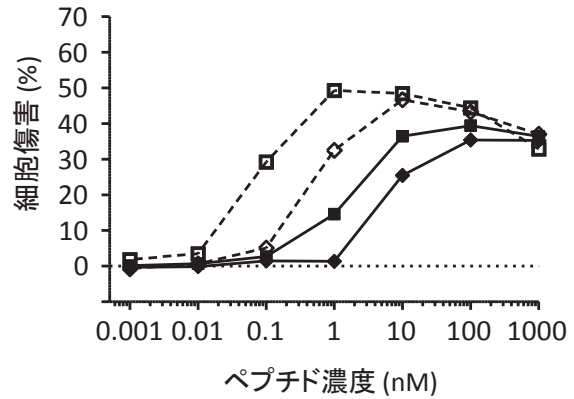
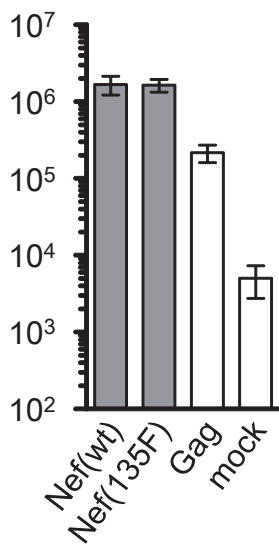
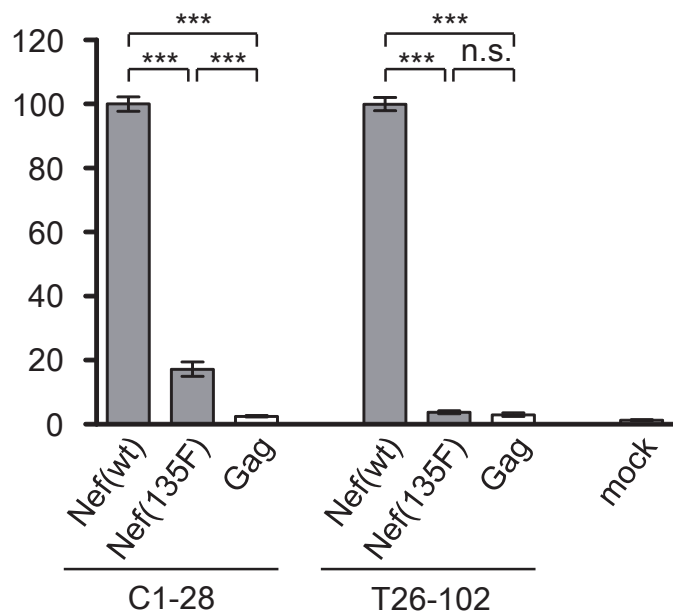
A: C1-28**B: T26-102****C: C1-28****D: T26-102****E****F**

Fig 11. 内在性抗原提示の確認試験。(A,B) Nef134-10 特異的 C1-28 (A) および Nef134-8 特異的 T26-102 (B) のテトラマー重染色。横軸: 野生型テトラマー、縦軸: 2F変異型テトラマー。(C,D) C1-28(C) および T26-102 (D) のクロム遊離試験による特異性解析。黒印実線: Nef134-10、白印破線: Nef134-8、正方形: 野生型(wt)、菱形: 2F変異型。単回の実験結果を示す。(E) ルシフェラーゼ活性測定によるミニジーン発現量の定量。3回の独立実験において3wellずつ発現量解析を行った。棒グラフおよびエラーバーは9回の平均および標準偏差を示す。(F) IFN- γ ELISAによるエピトープ提示量の解析。各回の実験において、Nef(wt) 特異的応答のIFN- γ 産生量の平均を100%として標準化を行った。実験は3回独立して行い、各実験回とも共培養を triplicateし、各ウェルの上清を duplicateしてELISAで測定した。棒グラフおよびエラーバーは18回の平均および標準誤差を示す。P値はクローン毎に、有意水準5%の一元配置分散分析後、Tukey事後テストにより算出した(***: $p < 0.001$, n.s.: 有意差なし)。

び Nef134-8 の 2F 変異による抗原提示量変化の解析に適していると考えられる。

以上の CTL クローン 2 種を用いて、ミニジーン発現細胞に対する免疫応答を解析した (Fig 11E,F)。結果、ミニジーン発現量は野生型と 135F 変異型で同程度であったにも関わらず (Fig 11E)、いずれの CTL クローンを用いた場合でも、Nef(135F)ミニジーン発現細胞に対する IFN- γ 産生量は野生型と比較して減少していた (Fig 11F)。ただし、C1-28 による Nef134-10(2F) 提示細胞に対する IFN- γ 産生は 20% 程度残存した一方で、Nef134-8(2F) 発現細胞に対する T26-102 による IFN- γ 産生は陰性対照と同等であった。すなわち、Nef134-10(2F) は抗原提示されるが Nef134-8(2F) は抗原提示されない事が示唆された。

ここまでの結果から、Nef134-8 は 2F 変異に伴うペプチド-HLA 間結合親和性の著しい低下による抗原提示の消失を主な駆動力として Y135F 変異選択に寄与する事が明らかとなった。

・ Nef134-10 特異的 CTL の TCR レパートリー解析

Nef134-10 について、2F 抗原提示が低下はするものの完全には消失しない事から、Y135F 変異選択に CTL 側の要素も関与する可能性がある。そこで、135F

変異ウイルスが観察された感染者においてどのような野生型エピトープ特異的 CTL が誘導されているか、解析した。そのため、ペプチド刺激後 PBMC を Tet-10(wt)と Tet-8(wt)で重染色し、ソートした Tet-10(wt)+CD8⁺細胞の TCR レパートリーを 50 クローン前後ずつ解析した (Fig 7C,12,13)。血漿 Y135 陽性者 2 名では、先行研究¹⁸において主要な Nef134-10 dual-tropic TCR として同定された TRBV4-1 クローンの頻度は 5%以下であった (Fig 12, Fig 13A,D)。

一方の血漿 135F 陽性者 11 名のレパートリーは個人間で大きく異なり、TRBV4-1 クローンの頻度は中央値 47.4%、範囲は 0% (2 名) ~ 93.9%であった (Fig 12, Fig 13D)。このことから、TRBV4-1⁺ Nef134-10 CTL の誘導と血漿ウイルス解析の結果は何かしらの相関があると考えられる。ここで、Nef134-10 wt single-specific CTL と Nef134-8 CTL はいずれも、Y135 ウイルス感作が無ければ誘導されないと考えられる事から、感染者を 8CTL(+) Pts 7 名と 8CTL(-) Pts 6 名の 2 群に分け、レパートリーの TRBV4-1 頻度 (Fig 13D) や Simpson 多様度指数 (Fig 13E) を比較したが、これらの群間に差は認められなかった。

さらに、10CTL(+)8CTL(-) Pts の一部では TRBV4-1 クローンが全く検出されない、また別の感染者では TRBV4-1 クローンが 93.9%も検出された事から、F to Y 復帰変異の抑制は Nef134-10 wt single-specific CTL 単独あるいは dual-tropic CTL 単独で可能である可能性が示唆された。

Plasma Y135/8CTL(+) Pts					Plasma 135F/8CTL(+) Pts					Plasma 135F/8CTL(-) Pts				
Pt	TRBV	CDR3	TRBJ	頻度	Pt	TRBV	CDR3	TRBJ	頻度	Pt	TRBV	CDR3	TRBJ	頻度
IMS0738(#54)	27	CASSTGNEQFF	2-1	59.26%	7-9	CASSPWDTEGELFF	2-2	22.92%	28	CASSPAPGKGIEKLF	1-4	26.32%		
	28	CASNSFSRGTDIYF	1-3	14.81%	6-1	CASSDYGTGAVEQYF	2-7	10.42%	6-1	CASDDYQGQTEAFF	1-1	21.05%		
	27	CASRGGAYEQYF	2-7	9.26%	7-9	CASSPGLTGELFF	2-2	10.42%	19	CASSSFGTGVAEAF	1-1	17.54%		
	25-1	CASSEIAGGRNTGELFF	2-2	7.41%	27	CASFGGARHEQFF	2-1	6.25%	12-3	CASVIRSPLHF	1-6	7.02%		
	30	CAWTLPGSEQYF	2-7	3.70%	27	CASRTGGYEQYF	2-7	6.25%	27	CASSGASHEQYF	2-7	7.02%		
	5-1	CASSLDVFRERAYF	2-5	1.85%	28	CASSFWAGYEQYF	2-7	4.17%	27	CASRTGGYEQYF	2-7	5.26%		
IMS0509(#56)	5-1	CASSIAGVGEQYF	2-7	1.85%	30	CAWAPPIGRQNTGELFF	2-2	4.17%	10-3	CAISESWATSGSRTGELFF	2-2	5.26%		
	5-6	CASSLQGEAQPHF	1-5	1.85%	30	CAWSQRPQGIDIEQYF	2-7	4.17%	30	CAWSTGGGLAYEQYF	2-7	5.26%		
	5-1	CASRKPGRTWGETQYF	2-5	41.07%	4-1	CASSHTSGGTIEQYF	2-7	4.17%	7-9	CASSAWDTAEQYF	2-7	3.51%		
	20	CAWSVPNNKGFYEQYF	2-7	21.43%	5-1	CASSLDTGELTDTQYF	2-3	4.17%	28	CASSLSVGRGLYGYTF	1-2	1.75%		
	20-1	CSAPSGQGVYEQYF	2-7	8.93%	11-2	CASSVTPQGGLNYGYTF	1-2	2.08%	4-3	CASSPTSGIYEQYF	2-7	45.83%		
	4-3	CASSQDRFNQPQHF	1-5	7.14%	27	CASRNILNEQFF	2-1	2.08%	15	CATSRRSGGTYEQYF	2-7	35.42%		
IMS0765(#66)	6-1	CASSDFSRGNVLTFF	2-6	7.14%	27	CASRSTGELFF	2-2	2.08%	10-3	CAISEVHWGRDYTF	1-2	10.42%		
	4-1	CASSHSSGVYEQYF	2-7	3.57%	28	CASSFSTGRGVGELFF	2-2	2.08%	30	CAWSRKSGTYEQYF	2-7	4.17%		
	4-3	CASSHPGLTEKLF	1-4	3.57%	4-1	CASSPGQGIYEQYF	2-7	2.08%	7-3	CASSLTGRDTEAFF	1-1	4.17%		
	7-9	CASSPWDTEGELFF	2-2	1.79%	6-1	CASSDVQGALEQYF	2-7	2.08%	4-1	CASSQTSGGVYEQYF	2-7	58.93%		
	27	CASSSGYEQYF	2-7	1.79%	6-1	CASSEVLGATYEQYF	2-7	2.08%	4-2	CASRTGRTAEAFF	1-1	23.21%		
	30	CAWNPQGDQKLF	1-4	1.79%	6-5	CASSYQQATNEKLF	1-4	2.08%	14	CASSPGQGNNSPLHF	1-6	7.14%		
IMS0892(#51)	6-1	CASSEPGQPEAFF	1-1	1.79%	7-6	CASSLAMARGLSDTQYF	2-3	2.08%	27	CASSTRTSFDAETQYF	2-5	7.14%		
					7-9	CASSPWRRAEQFF	2-1	2.08%	27	CASSLRVGVDAEKLF	1-4	3.57%		
					9	CASSGSGEAETQYF	2-5	2.08%	4-1	CASMQETQYF	2-5	26.00%		
					20-1	CSARASPSSGVPTQYF	2-3	56.25%	4-1	CASSPTSGGIYEQYF	2-7	26.00%		
					27	CASSHPQRGYTF	1-2	14.58%	4-1	CASSPTSGGLYEQYF	2-7	14.00%		
					4-1	CASSPTSGIYEQYF	2-7	10.42%	20-1	CSARDLWGPQHF	1-5	10.00%		
IMS0632(#48)					5-1	CASSSDRLGLAGIAKNIQYF	2-4	6.25%	6-4	CASDTRAGGFYEQFF	2-1	10.00%		
					9	CASSAEDTYF	1-3	6.25%	5-1	CASSWDRGGNTGELFF	2-2	4.00%		
					6-1	CATLRETGELFF	2-2	4.17%	4-1	CASSPGQGIYEQYF	2-7	2.00%		
					4-1	CASSPSSGSYEQYF	2-7	2.08%	27	CASSRLADVDEQFF	2-1	2.00%		
					4-1	CASSPGQGVYEQYF	2-7	39.22%	4-1	CASSQGVSGGTIEQYF	2-7	2.00%		
					27	CASRGSLEGLFF	2-1	15.69%	4-1	CASSSGQGIYEQYF	2-7	2.00%		
IMS0725(#48)					12-4	CASSPAGRNQPQHF	1-5	7.84%	7-9	CASPGEAGNTIYF	1-3	2.00%		
					27	CASSTQTYPYEQYF	2-7	7.84%	7-9	CASSPGSGGAHPLGEQFF	2-1	60.32%		
					4-1	CASSSPQGLAGSYEQYF	2-7	7.84%	6-1	CASSGSPQGGINIYGYTF	1-2	15.87%		
					13	CASSLVRAGGTIEQYF	2-7	5.88%	27	CASSTRTSGGASDTQYF	2-3	7.94%		
					21-1	CASSKVFKNYGYTF	1-2	3.92%	11-2	CASSPAGESLNEQFF	2-1	4.76%		
					4-1	CASSHTSGGTIEQYF	2-7	1.96%	20-1	GGPPFHSYEQYF	2-7	4.76%		
IMS0892(#51)					4-1	CASSPGQGIYEQYF	2-7	1.96%	4-1	CASSPTGGSYEQYF	2-7	3.17%		
					19	CASSTPSGRTHNEQFF	2-1	1.96%	4-1	CASSPGQGVYEQYF	2-7	1.59%		
					4-1	CASSQVSGGSYEQYF	2-7	1.96%	18	CASSPPLAGPGDQYF	2-3	1.59%		
					4-1	CASSQVSGGTIEQYF	2-7	1.96%	4-1	CASSQTSGDSYEQYF	2-7	70.69%		
					7-8	CASSHTGYGPEAFF	1-1	1.96%	20-1	CSAKYSGGIEQFF	2-1	8.62%		
					4-1	CASSQDKRTQYF	2-5	24.56%	6-1	CASSDFGQASAFF	1-1	8.62%		
IMS0892(#51)					20-1	CSARVLGLAGIGITDTQYF	2-3	17.54%	4-1	CASSPTGGVYEQYF	2-7	6.90%		
					4-1	CASSPTSGIYEQYF	2-7	14.04%	11-2	CASSPKGDEQFF	2-1	5.17%		
					13	CASSLQRETSQYEQYF	2-7	12.28%						
					2	CASREGTEAFF	1-1	8.77%						
					11-2	CASSRMSGGFYEQYF	2-7	5.26%						
					4-1	CASSQTSGGYEQYF	2-7	5.26%						
IMS0367(#57)					7-9	CASSSWAETKRGSPLHF	1-6	5.26%						
					15	CATSSYRPPNYGYTF	1-2	1.75%						
					4-1	CASSPFYSPLHF	1-6	1.75%						
					4-1	CASSRGLKQFF	2-1	1.75%						
					6-1	CASSDFGLGETQYF	2-5	1.75%						
					4-1	CASSPGQGIYEQYF	2-7	74.24%						
IMS0765(#66)					4-1	CASSAFYSPLHF	1-6	19.70%						
					27	CASSPWNDSPLHF	1-6	3.03%						
					20-1	CSAAKDRVGEQYF	2-7	1.52%						
					6-6	CASSYSDTIYF	1-3	1.52%						

Fig 12. Tet-10(wt)⁺ CD8⁺ 細胞の TCR β鎖 レポートリー。感染者IDに添記されている '#' は、各感染者の解析クローン数を示す。頻度は、各感染者における各クローンタイプの頻度を示す。複数の感染者で共通に観察されたクローンタイプは同じ色のハイライトで示した。

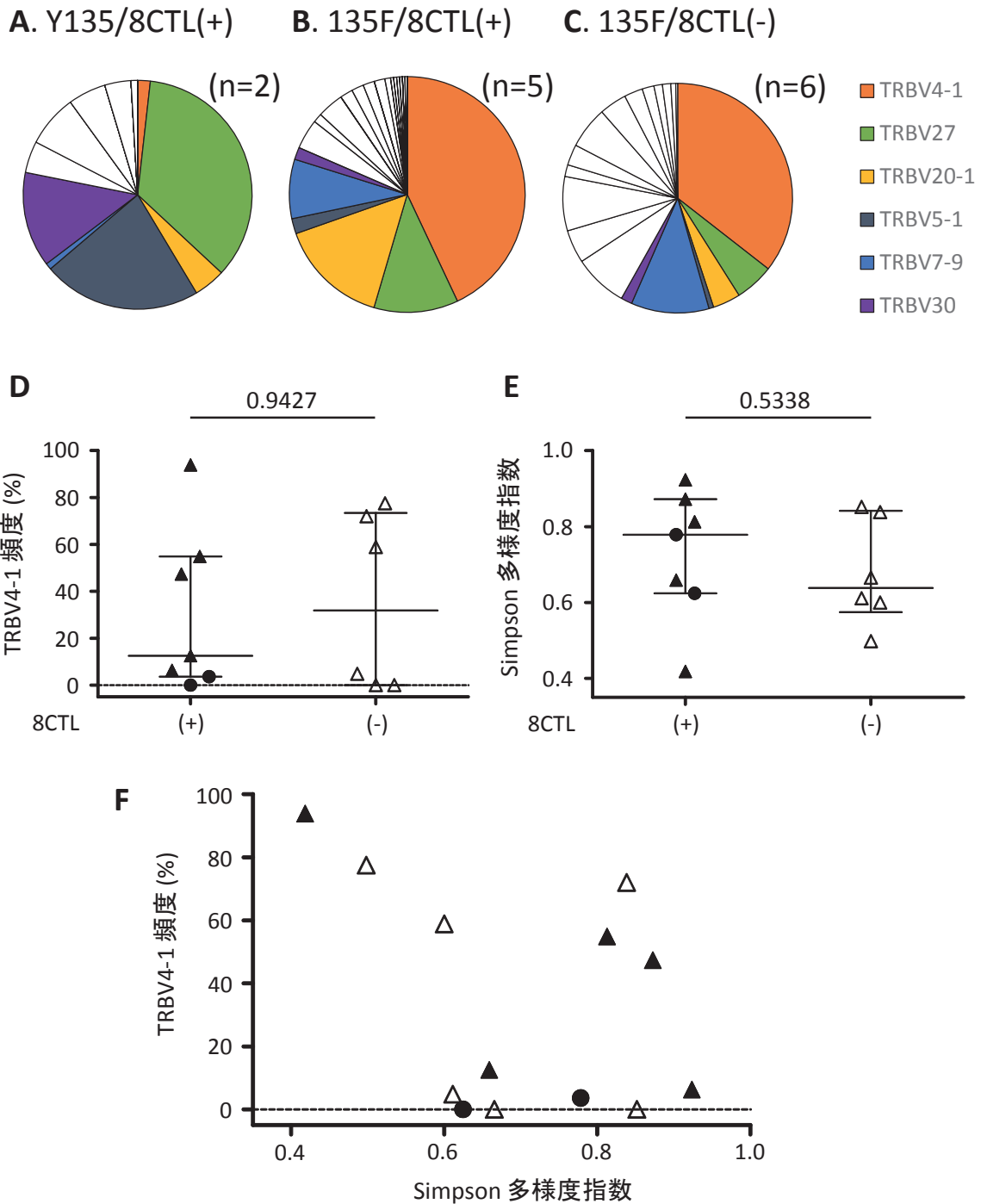


Fig 13. Tet-10(wt)⁺ CD8⁺ T細胞のTCRレパトリーと、8CTLの有無。(A-C) 血漿Y135/8CTL(+) Pts (A), 血漿135F/8CTL(+) Pts (B) および 血漿135F/8CTL(-) Pts (C) における TRBV 遺伝子使用頻度。クロナタイプ頻度ではなく、クローン頻度で算出した。(D,E) TRBV4-1 クローン頻度 (D) および標準化 Simpson 多様度指数 (E) の群間比較。●: 血漿Y135/8CTL(+) Pts、▲: 血漿135F/8CTL(+) Pts、△: 血漿135F/8CTL(-) Pts。P値は Mann-Whitney 検定により算出した。(F) TRBV4-1 頻度と標準化 Simpson 多様度指数による2次元プロット。印の意味は (D) と同様。

2-4 考察

先行研究では、Nef134-10 が Y135F 変異選択圧に寄与している事、その機序としてエピトープの 2F 変異によるペプチド-HLA 間結合力の低下²⁶、および対応する TCR レパートリーの変化¹⁸などが明らかとなっており、また Y135F 変異体のプロテアソームによる断片化パターンの変化^{9,20}も示唆されていた。本研究では、Nef134-10 と領域が重複する Nef134-8 について詳細に解析し、Nef134-8 CTL もまた Y135F 変異選択圧に寄与する事、その機序の一つとしてペプチド-HLA 間結合親和性の著しい低下による 2F 抗原提示の消失が挙げられる事、以上 2 点を明らかにした。

Nef134-10 と Nef134-8 はいずれも支配的であり、多くの Y135 感染者で両方の CTL が誘導される事から、片方のエピトープ特異的 CTL 単独による変異選択圧の解析は困難であった。今回の研究では、Nef134-8 CTL のみが誘導された血漿 Y135 陽性者に着目する事で、Nef134-8 単独による変異選択を直接的に観察する事ができた (Fig 9)。一方の Nef134-10 については、Nef134-10 CTL のみ誘導される感染者はいずれも 135F 陽性者であった事から、Y135F 変異選択の直接的な観察は不可能であった (Fig 8)。しかしながら、これらの感染者

においては F to Y 復帰変異が抑制されていると考えられる事から、Nef134-10 CTL は Y135F 変異選択に寄与するとの先行研究を支持している。なお、TCR レポートリー解析の結果、F to Y 復帰変異抑制は Nef134-10 wt single-specific CTL 単独でも wt/2F dual-specific CTL 単独でも起こる可能性が示された (Fig 8A, Fig 12) が、TCR レポートリー解析の網羅性の問題から、別の実験系でも同様の検証を行う必要がある。

また本研究では、Nef134-8 による Y135F 変異選択機構についても明らかにした。T2-A24 stabilization assay の結果、Nef134-8(2F)の結合親和性は $SD_{50} > 1\mu M$ と著しく低い事が明らかとなった (Fig 10)。複数の先行研究により、エピトープとして適切に抗原提示されるためのペプチド-HLA 間結合親和性の指標は $SD_{50} < \text{約 } 500nM$ とされている⁴⁵⁻⁵⁰ 事から、Nef134-8(2F)は生理的条件下において適切に抗原提示できないと考えられる。Nef134-8-HLA-A*24:02 間結合力が低い理由は、C 末端アンカーの差と考えられる。Nef134-8 の 8W アンカーは Nef134-10 の 10F と比較して結合力が弱いため⁵¹ (Fig 6B,C)、相乗効果で 2F 変異による結合力低下が著しかったと考えられる。

Nef134-8 の HLA-A*24:02 に対する結合力の低下は、比較的高い親和性を有

する T26-102 クローンによっても認識不可能なまでに抗原提示を低下させた (Fig 11)。今回の実験ではミニジーンを用いたが、実際の HIV 感染では Nef タンパク質による HLA 発現低下⁵²⁻⁵⁵が起こるため、Nef134-8(2F)は HIV 感染細胞でほぼ全く抗原提示されず、CTL による認識が不可能と考えられる。

なお、T26-102 の TCR クロノタイプは、検討した 7 名ほぼ全員の Tet-8(wt)+ TCR レポートリーで観察されたモチーフに合致する事も追記しておく。この TCR モチーフは、β鎖は TRBV7-9/TRBJ2-5 CDR3: CASSX_BRDRVPETQYF (X_B=L, Y, F, H, V, D, I)、α鎖は TRAV8-3/TRAJ10 CDR3: CAVX_AFTGGGNKLT (X_A=G, A, V)であり²⁹、T26-102 は X_B=Y、X_A=A である。このモチーフに該当する TCR を発現する CTL クローンを、T26-102 を含め 4 クローン解析したところ、全クローンが Nef134-8(wt)と Nef134-8(2F)を T26-102 と同程度認識した (Data Not Shown)。高度に保存された、かつ wt/2F dual-tropic と疑わしき TCR モチーフを有しながら、血漿 Y135 陽性者では全員で Nef134-8 CTL が誘導され、血漿 135F 陽性者では約半数で誘導されないのは、やはり Nef134-8(2F)抗原提示が CTL 誘導に不十分なためと思われる。

一方の Nef134-10 については先行研究⁹と同様、2F 変異で抗原提示量は減少

するが消失はしない事が確認された事から、CTL 側にも焦点を当てた。機序は異なるが、Nef134-10 wt single-specific CTL と Nef134-8 CTL は 2F 変異型エピトープを認識できない点で類似しており、変異型ウイルスで感染成立した感染者では誘導されないと考えられる。一方、TRBV4-1⁺ CTL に代表される Nef134-10 dual-tropic CTL は野生型、変異型ウイルスいずれのウイルスで感染成立した感染者でも誘導され得る¹⁸。そこで本研究では、TRBV4-1 クローン頻度を群間比較した。結果、血漿 Y135 陽性者では TRBV4-1 頻度が低い事が明らかになった一方で、8CTL(+)⁺ Pts-8CTL(-)⁻ Pts 間では TRBV4-1 頻度に差が無かった。これが意味するのは、Nef134-10 TCR レポートリーは感染成立時点のウイルスの変異を反映する可能性がある、という事である。しかしながら、観察された Nef134-10 wt single-specific CTL と Nef134-8 CTL の間には、一対一の対応関係が無かった。これには複数の理由、例えば TCR レポートリー解析の網羅性の問題、Nef134-8 CTL が誘導されない感染者の存在、CTL の経時的減少などが考えられる。本研究第Ⅲ章では初感染ウイルスの推定を試みたが、初感染ウイルスを特定するなら、別の手法と組み合わせる必要がある。

そして、Nef134-10 および Nef134-8 による変異選択の各機序の寄与度を推察するのは困難である。また、Nef134 を含めた広範なエピトープにおいて、TCR レポートリーの多様度とウイルス抑制への寄与、あるいは病態進行との関

連性が明らかではない。しかしながら Nef134-10 においては、wt/2F dual-tropic CTL が Y135F 変異後もウイルス抑制に寄与する可能性が高い。故に、Nef134-10 の 2F 変異による抗原提示量の低下と、エピトープ構造の微細な変化に伴う TCR レパートリーの変化は、Y135F 変異選択に一定程度寄与すると考えられるが、抗原提示が消失する Nef134-8 と比べて選択圧が弱いと思われる。

以上、本章において私は、Nef134-8 CTL 誘導と Y135F 変異の相関を起点に、2F 抗原提示の消失を駆動力とした Nef134-8 CTL 免疫圧の消失による Y135F 変異選択について明らかにし、Nef134-10 との差異を明確にした。そして、Y135F 変異が高頻度かつ速やかに起こる原因が、二つのエピトープに対する CTL 選択圧の相乗効果である事が実証された。

Ⅲ. HIV の HLA 適応変異による予後の変動に関する解析

3-1 緒論

人口集団内の HLA-A*24:02 陽性者が 60%を占める日本国内において、HLA-A*24:02 関連変異である Nef Y135F 変異ウイルスの蓄積が示唆されている。変異の蓄積の原因として、HLA-A*24:02 陽性者の体内で二つのエピトープに対する CTL 選択圧により Y135F 変異が選択され、それが人口集団内で伝播するためであると考えられる⁹。しかしながら、人口集団内で選択された HLA 関連変異がその人口集団に与える影響について解析された例は多くない^{10,56,57}。というのも、HLA 頻度が低いと HLA 適応変異の人口集団内における蓄積が遅く、かつ適応変異ウイルスがその HLA を持つ者に新規感染する確率も低い事、および初感染ウイルスの同定が困難である事、等が挙げられる。

感染成立時点のウイルス、すなわち初感染ウイルス同定が困難である理由は、以下の通りである。前向き研究を設計する場合、稀に生じる新規 HIV 感染というイベントを拾うため、非常に大規模なコホートを設定する必要がある。一方の後向き研究では、感染初期・感染早期の HIV 感染者を同定する事が困難で、感染時期の推定も困難、かつ初診時の検体を用いても感染初期の情報を得られ

ない。こと Nef Y135F 変異においては、感染成立から 1 年以内に、80%の HLA-A*24:02 陽性者において達せられる事から、感染早期のウイルスを解析したとしても感染成立時のウイルスを反映するとは限らない¹⁹。以上の理由から、何らかの工夫をしない限り、初感染ウイルスを推定する事ができない。

そこで本研究では、*in vitro* 刺激後の CTL 解析、およびプロウイルスの次世代シーケンス解析を行う事で、初感染ウイルスの推定を試みた。

CTL は末梢にて一度抗原刺激を受けた後、大部分はエフェクターとしてウイルス感染細胞の除去に動員され、ごく一部はメモリーとして長期間維持される。ペプチド刺激せずに CTL の検出を試みた場合、観察される CTL は主にエフェクター、すなわち検体採取時点に動員され、抗 HIV 効果を発揮している細胞集団である。しかし本研究第 II 章では、ペプチド刺激を行った後に CTL の検出を行った事から、観察された CTL は主にメモリーであったと考えられる。故に、ペプチド刺激後 PBMC 中に観察された、野生型エピソードのみを認識可能な CTL は、血漿 135F 変異型ウイルス陽性者における Y135 野生型ウイルス感作の痕跡であったと考えられる。しかしながら、単に Nef134-8 CTL 誘導の有無のみを比較する方法では初感染ウイルスの推定には至らず、初感染ウイルスの

同定のためには別の手法と組み合わせる必要がある。

そこで、Nef134-8 CTL の解析に加えて我々は、プロウイルスの次世代シーケンス解析により Y135 初感染の痕跡の検出を試みた (Fig 14)。プロウイルスは、宿主ゲノムに取り込まれた HIV ゲノムの逆転写産物、すなわち DNA である。多くの HIV 感染細胞は、HIV の複製サイクルが正しく回ると、ウイルス粒子を放出しながら死滅する。しかしながら、一部の感染細胞ではウイルス複製を著しく阻害する変異のため、あるいはエピジェネティックな制御による HIV ゲノムの不活性化^{58,59}のため、感染細胞が殺傷される事なく長期間残存する⁶⁰。そのため、末梢中 CD4 陽性細胞中には感染初期のプロウイルスが保持されている可能性が高い。次世代シーケンサーは DNA 混合物の配列を 1 分子単位で解読できる事から、実際にこれまで複数の研究グループがウイルスの「アーカイブ」探索、すなわちプロウイルスの次世代シーケンス解析を行ってきた⁶¹⁻⁶⁷。我々も同様に、135F 変異型プロウイルス中に極わずかに混在する Y135 野生型プロウイルスの検出を試みた。

さらに、HIV ゲノムの次世代シーケンス解析結果を系統樹解析する事により、感染成立から検体採取時点までの期間を推定・比較する事が可能である (Fig

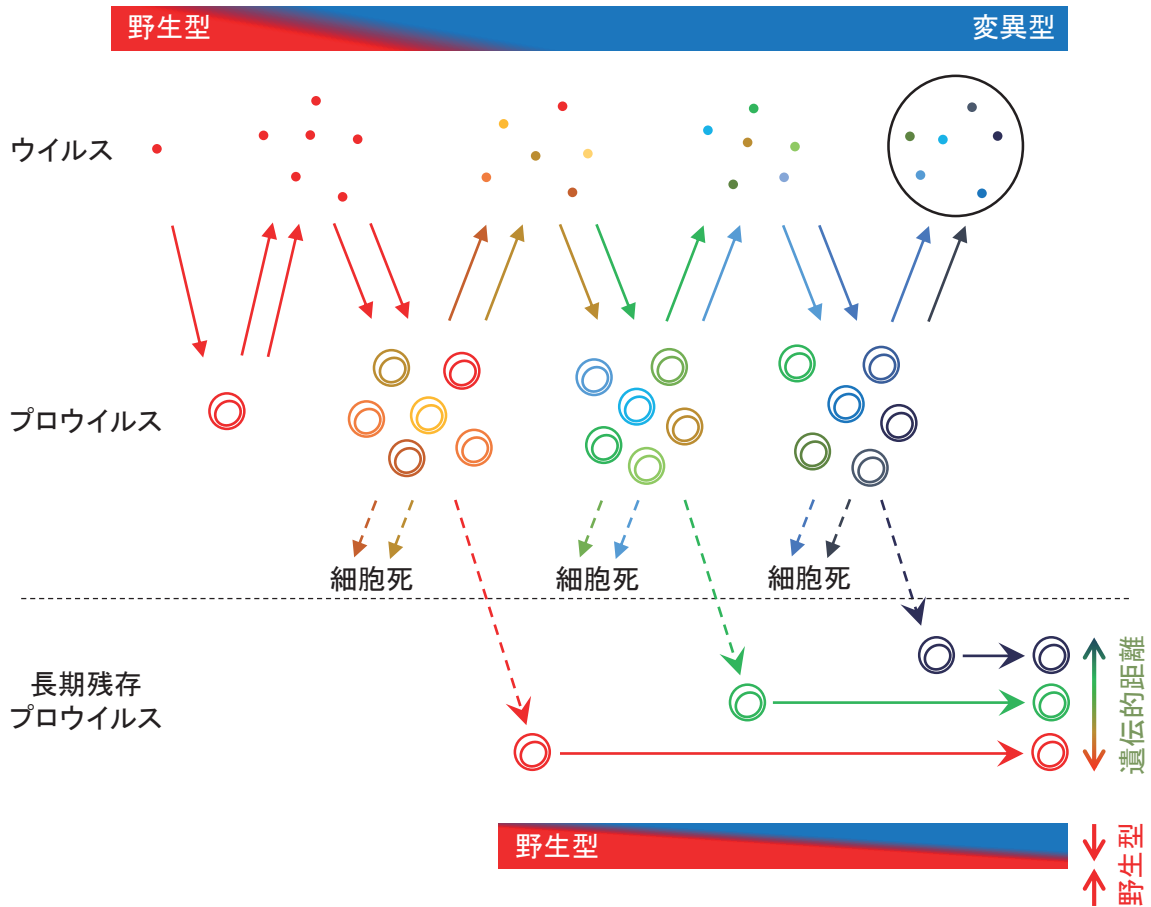


Fig 14. ウイルス解析とプロウイルス解析の意義、および遺伝的距離の経時変化。血漿ウイルスの直接シーケンスは、解析時点のウイルス変異の情報しか得られない。プロウイルスの次世代シーケンス解析は、ウイルス変異の情報を遡って得る事ができる。また、遺伝的距離の統計を取る事により感染時期の推定も可能である。

14)。実際に進化生物学の分野では、複数生物間の遺伝的距離は分子時計として取り扱われ、共通祖先から分化した年代の推定などに応用されている。HIV は経粘膜感染の場合、ウイルス 1 粒子で感染成立する事が多い⁶⁸⁻⁷⁰ 事から、HIV quasi-species を対象として遺伝的距離を計算する事により、共通祖先すなわち初感染ウイルスの存在した時期を推定可能であると考えられる。そして Sung Yong Park らは 2014 年、HIV 感染者から得られた血漿ウイルス RNA のエンベロープ(*env*)領域を Roche 社 Genome Sequencer FLX (GS-FLX)で解析し、感染者体内に存在する HIV quasi-species の遺伝的距離の統計を取る事で、感染成立から 1 年以内の感染者とそれ以降の感染者を極めて高い精度で分離する事に成功したと発表した⁷¹。私はこの知見を、HIV *nef*領域プロウイルスの次世代シーケンス解析結果に応用した。

以上の方法、つまりペプチド刺激後 PBMC のテトラマー解析、およびプロウイルスの次世代シーケンス解析を組み合わせる事で、初感染ウイルスの推定が可能であると考えた。この推定結果を基に、135F 初感染者における臨床経過の差異を解き明かす事とした。

3-2 材料と方法

・ HIV 感染者

第 II 章にて選択された、書面により同意の得られた HLA-A*24:02 陽性者 31 名の内、Y135 ウイルス感染が明らかな血漿 Y135 陽性者 7 名、および血漿ウイルスの変異が 135F のみ、かつ Tet-10(wt)+CD8⁺細胞陽性、かつプロウイルス解析用検体が得られた 18 名、以上 25 名を対象とした。本研究も第 II 章と同様、東京大学医科学研究所 倫理審査委員会により、「HIV 感染者における HIV に関する研究」（倫理番号：20-31-1120）、および「HIV 感染症における免疫応答の研究」（倫理番号：20-47-210521）として承認を受けている。

・ 末梢血単核球中プロウイルスの deep sequence

血漿 135F 陽性者について、初診日または初診日に近い時点の PBMC を用いて、以下の様に解析を行った。

プロウイルスを含むヒトゲノム DNA を抽出するため、感染者由来 PBMC を融解、R(-)培地で洗浄し計数した後、PBS に最懸濁し、QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) による抽出を行った。DNA 溶出は 2 段階に分けて行い、1 回目の溶出は 100 μ L Buffer AE で 5 分間インキュベートした後の遠心操作により、

2 回目は 80 μ L Buffer AE により同様に行った。溶出した DNA の濃度は、NanoDrop (Thermo Scientific)により測定した。

溶出した DNA 2 μ g を鋳型とした nested-PCR を、Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) により行った。Nef-2F および Nef-2R (Table 3) をプライマー組として用いた 1st-PCR を、50 μ L/tube x 2 tubes の系で、以下の温度条件で行った：94 $^{\circ}$ C 2 分；94 $^{\circ}$ C 15 秒、57 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分の 3 ステップを 25 サイクル；68 $^{\circ}$ C 5 分。アダプター付加のための 2nd-PCR を、10 μ L を鋳型とした 50 μ L の系を二つに分けた上で、以下の温度条件で行った：94 $^{\circ}$ C 2 分；94 $^{\circ}$ C 15 秒、46 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分の 3 ステップを 17~20 サイクル；68 $^{\circ}$ C 5 分。使用したアダプター付きプライマーは、5'-側は [A-adaptor] + [MID (Multiplex Identifier)]⁷² + [n226p]、3'-側は [B-adaptor] + [n564m] で構成される (Table 3)。QIAquick PCR Purification Kit または QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) による精製後、DNA 濃度を NanoDrop (Thermo Scientific)および電気泳動により確認した。DNA を、分子数を基準に等量ずつ混合し、北海道システムサイエンス社に送付、Roche GS-FLX によるデータ取得を依頼した。簡潔に述べると、同社ではまずゲル切り出しにより 400~550 bp のバンドの精製を行い、Titanium kits (Roche Applied Science)によるエマルジョン PCR を行った。その後ビーズを 16 region gasket に導入、GS-FLX に

1st PCR

Nef-2F: 5'-CGTCTAGAACATACCTAGAAGAATAAGACAGG-3' (nt 8,746 - 8,777)

Nef-2R: 5'-CGGAATCCGTCCCCGCGGAAAGTCCCTTGTA-3' (nt 9,477 - 9,444)

2nd PCR

A-primer 構成 : 5'- [A-adaptor] + [MID] + [n226p] -3'

[A-adaptor]: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3'

[MID]: MID-1: 5'-ACGAGTGCCT-3'

MID-22: 5'-TACGAGTATG-3'

MID-23: 5'-TACTCTCGTG-3'

MID-24: 5'-TAGAGACGAG-3'

MID-25: 5'-TCGTCGCTCG-3'

MID-26: 5'-ACATACGCGT-3'

MID-27: 5'-ACGCGAGTAT-3'

MID-28: 5'-ACTACTATGT-3'

MID-29: 5'-ACTGTACAGT-3'

MID-30: 5'-AGACTATACT-3'

MID-31: 5'-AGCGTCGTCT-3'

MID-32: 5'-AGTACGCTAT-3'

MID-33: 5'-ATAGAGTACT-3'

MID-34: 5'-CACGCTACGT-3'

MID-35: 5'-CAGTAGACGT-3'

MID-36: 5'-CGACGTGACT-3'

MID-37: 5'-TACACACACT-3'

MID-38: 5'-TACACGTGAT-3'

MID-39: 5'-TACAGATCGT-3'

MID-40: 5'-TACGCTGTCT-3'

MID-41: 5'-TAGTGTAGAT-3'

MID-42: 5'-TCGATCACGT-3'

[n226p]: 5'-CTCAGGTACCTTTAAGACCAATG-3' (nt 9028 - 9050)

B-primer 構成 : 5'- [B-adaptor] + [n564m] -3'

[B-adaptor]: 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3'

[n564m]: 5'-GAAATGCTAGTTTGCTGTCAAAC-3' (nt 9387 - 9365)

Table 3. プロウイルス次世代シーケンス解析において使用したプライマーのリスト

A-adaptor: シーケンス用アダプター

MID (Multiplex Identifier): インデックス配列。

B-adaptor: ビーズ結合用アダプター

よるシーケンスを行い、配列データを取得した。得られた出力データは以下の通り、**Quality Filter**により加工された：まず、**GS-FLX** シーケンス用アダプターに予め付与されている、読み始めの 4 塩基の配列(**Key Sequence**)が正しく認識されたリード(**Key-Passed reads**)をフィルターにより選別し、通過させた；**Key-Passed reads** のフィルタリングを、以下の 4 つの基準、すなわち 1) 試薬／基質を所定のフロー数流してもシグナルが出ないリードを排除、2) 複数の塩基のシグナルが一緒に出ているリードを排除、3) ホモポリマーで、**n-mer** か**(n+1)-mer** の判定が困難なシグナルが閾値を下回るまで、リードの 3'末端からトリミング、4) 40 塩基の平均エラー率が 1%を下回るまで、3'末端からトリミング、という基準により行った。**Quality Filter**により加工されたデータは、我々の元に送付された。

・ **Deep sequence** データの解析

Quality Filter を通過した配列は、ActivePerl 5.14.4 (ActiveState Software) でコンパイル可能な自作の Perl プログラム、および MEGA 6.06⁷³ を用い、以下の様に解析した。

まず、**Y135** 野生型プロウイルス頻度を以下の様に解析した。**SF2** 株

Nef134-143 領域の塩基配列を基にした参照配列(5'-MGATATCCACTGACC
TTTGGATGGTGCTTC-3' (nt 9213 - 9242); M は A 又は C を意味する; MGA
はアルギニン(R)をコードする)と、次世代シーケンスで得られた塩基配列をペ
アワイズアラインメントし、この領域に挿入/欠失 (in/del) が含まれない配列
のみを抽出、nt 9242 を 3'-末端としてトリミングした。次に、抽出されたシー
ケンスファイルに全く同一の配列が複数含まれる場合には、配列を一つに圧縮
し、配列名にリード数を添記した。さらに、Nef135 位のアミノ酸を解析し、
配列名に添記した。このデータを基に、Y135 プロウイルス頻度を算出した。

さらに、感染者体内のプロウイルス quasi-species における、遺伝的距離の
一種である不一致塩基数(Hamming Distance)の算出のため、自作の Perl プロ
グラムと MEGA 6.06 を用いて以下の様に解析した。まず、Quality Filter 通過
後の配列データから 5'-プライマー領域を削除し、次に 3'-プライマー領域が開
始される手前の 15 塩基(5'-AGTGTTAGTGTGGAG-3' (nt 9350 - 9364))をロー
カルアラインメントにより検出して 3'-末端をトリミングするか、この 15 塩基
が検出できない場合は当該シーケンスを解析から除去した。さらに、全領域(nt
9051 - 9364)を SF2 とローカルアラインメントし、ホモロジーが 70%以下の配
列を除去した。得られた配列データを、Y135 プロウイルス頻度解析と同様に
圧縮した後、MEGA 6.06 に実装されている MUSCLE⁷⁴ アルゴリズムにより、

既定の設定条件でマルチプルアラインメントした。アラインメントしたデータを
を基に、MEGA 6.06 の“Compute Pairwise Distances” メニューから、以下の
オプションにより Hamming Distance のマトリックスを作成した：Variance
Estimation Method = [Analytical method], Substitution Type = [Nucleotide],
Model/Method = [No. of differences], Substitutions to Include = [d:
Transitions and Transversions], Gaps/Missing Data Treatment = [Partial
deletion], Site Coverage Cutoff (%) = [80]。得られたマトリックスファイルを
CSV 形式でエクスポートし、自作の Perl プログラムによってデータ圧縮前の
マトリックスに変換すると同時に、ヒストグラムへの変換を行った。このヒス
トグラムを元に、Hamming Distance の 25 パーセンタイル点(Q25)を算出した。
さらに、Hamming Distance の累積度数、すなわち Genome Similarity Index-x
(GSI_x)についても算出した。

3-3 結果

・ PBMC 中プロウイルスの次世代シーケンス解析

私はまず、変異型ウイルスが主要である慢性感染者から野生型ウイルス感染の痕跡を探索するため、次世代シーケンスによる Y135 プロウイルス (Y-prov) の検出を試みた。そのため、第 II 章で取り扱った HLA-A*24:02 陽性 HIV-1 subtype B 慢性感染者の内、血漿ウイルスの変異が 135F のみ、かつ Nef134-10 CTL 陽性である感染者を選択し、初診日またはそれに近いサンプルが入手可能であった 18 名の PBMC から DNA を抽出、PCR 増幅後に Roche GS-FLX で解析を行った。また、Y135 プロウイルス解析の妥当性を検討するため、Y135 初感染、かつ経過観察により Y135F 変異が観察された感染者 1 名 (IMS0509) の初診後 12 年目の検体、および第 II 章では解析しなかったが同様の感染者 1 名 (IMS0414) の 3 時点の検体も同様に解析した。得られた出力データから Nef134-143 に該当する遺伝子領域に挿入／欠失 (in/del) の含まれない塩基配列のみを抽出し、Y-prov の頻度を計算した。血漿 135F 陽性者 18 名中 2 名で PCR 増幅が成功せず、解析から除外した。残り 16 名の感染者から、中央値 1705 リード (範囲 : 676~15381 リード) の GS-FLX 出力データが得られ、そのうち中央値 1571 リード (範囲 : 606~14011 リード) を解析に供した。結果、Y-prov

は、血漿 135F 感染者 16 名の内 6 名で検出され、10 名で検出されなかった (Fig 15)。また、Y135 初感染者 IMS0509 の 12 年目の検体を解析したところ、Y-prov が 2.75%の頻度で観察された。

しかしながら、Y135 初感染者 IMS0414 の経時観察では、Y-prov は経時的減少を示し、最終時点である初診後 254 週では検出されなくなった。そのため、Y-prov 未検出という結果について、感染成立時点からの長期経過による Y-prov の遁減が影響している可能性が否定できない。そこでまず、初診日からプロウウイルス解析までの週数を群間で比較したところ、Y-prov(+)群で中央値 0 週(最長 31 週)、Y-prov(-)群で中央値 0 週(最長 58 週)であり、有意差は無かった ($p=0.4683$, Mann-Whitney test)。また、医科学研究所附属病院 感染免疫内科の中村仁美医師に御協力いただきカルテ情報を確認したところ、一部の感染者で凡その感染時期が特定でき、群間に顕著な記載の差が無い事が確認できた。

さらに、プロウウイルスの次世代シーケンス解析データを基に各個人のプロウウイルス quasi-species の遺伝的距離の統計をとり、統計値に大きな差が無い事を示す事で、検体採取までの経過期間に偏りが無い事を示そうとした (Fig 16)。そのため、プライマー領域を除く PCR amplicon 全長が読めた配列のみを抽出し、各塩基配列ペアの不一致塩基数(Hamming distance)を算出、先行研究と同

感染者 ID	Nef134-10			Tetramer ⁺ CD8 ⁺ cells		凡例
	血漿ウイルス RYPLTFGWCF	Y135 プロウイルス 週数	頻度 (%)	Tet-10(wt) 頻度 (%)	Tet-8(wt) 頻度 (%)	
IMS0509	---I-----	628	2.75	2.0	3.2	●
IMS0632	-F-----	0	37.49	1.6	0.9	●
IMS0725	-F-----	0	2.30	5.3	2.0	
IMS0892	-F-----	31	0.19	1.3	11.5	
IMS0367	-F-----	0	0.13	6.3	1.2	
IMS0765	-F-----	0	0.00	1.2	0.3	●
IMS0526	-F-----	0	0.00	8.4	0.4	
IMS0827	-F-----	27	0.00	1.5	1.0	
IMS0593	-F-----	0	0.00	0.4	0.3	
IMS0539	-F-----	23	NA	1.6	3.4	
IMS0955	-F-----	5	NA	0.7	0.5	
IMS0748	-F-----	0	11.31	5.4	0.07	●
IMS0653	-F-----	0	0.17	0.5	0.02	
IMS0849	-F-----	58	0.00	13.0	0.05	●
IMS0758	-F-----	5	0.00	1.0	0.02	
IMS0601	-F-----	2	0.00	0.6	0.13	
IMS0541	-F-----	0	0.00	11.5	0.05	
IMS0649	-F-----	0	0.00	3.1	0.10	
IMS0573	-F-----	0	0.00	0.7	0.02	
IMS0414	8wk ----L----	65	1.06			
	↓ ↓	141	0.51			●
	65wk -F-----	254	0.00			●

Fig 15. HIV感染者20名の血漿ウイルス配列、Y135プロウイルス頻度およびテトラマー陽性細胞頻度。この表は、Fig 12A に Y135 プロウイルス頻度を追記したものである。本章におけるプロウイルス解析には、なるべく初診に近い検体を使用した。解析対象の感染者は、第 II 章で解析した慢性 HIV 感染者31名のうち血漿 135F / 10CTL(+) Pts を選別し、サンプルの得られた18名の他、初診時は血漿 Y135 陽性であったが58週までに Y135F 変異が観察されたIMS0509 の長期経過後サンプル、および第 II 章では解析に含めなかったが観察期間中に Y135F 変異が選択された IMS0414 の複数時点のサンプル、以上20名分とした。NA: Not Amplified。
 なお以後の Fig では、感染者の Y135 プロウイルス (Y-prov) (+/-) および8CTL (+/-) により血漿 135F 陽性者を群分けし、各々、以下のカラーコードで表す。ピンク: Y-prov(+)/8CTL(+) Pts、黄色: Y-prov(-)/8CTL(+) Pts、緑: Y-prov(+)/8CTL(-) Pts、濃青: Y-prov(-)/8CTL(-) Pts。その他、血漿 Y135 陽性者 (IMS0509) は赤で、経時的なプロウイルスの変化を追った IMS0414 は黒～灰色で示す。

様、統計値として Hamming distance の 25 パーセンタイル点(Q₂₅)(Fig 16C)、および Genome Similarity Index-5(GSI₅)すなわち Hamming distance ≤ 5 の累積度数 (Fig 16B) を算出した⁷¹。中央値 1257 リード (範囲 : 496 ~ 11771 リード) の抽出データを解析した結果、Y-prov(+)群 - Y-prov(-)群間の各統計値には差の傾向すら無かった。このことから、感染成立時点からプロウイルス解析時点までの時間的バイアスは、群間で大差がないと考えられる。また、3 時点の解析を行った感染者(IMS0414)では、時系列順に Q₂₅ の上昇と GSI₅ の低下を示し、初診後 12 年目の検体を用いた感染者(IMS0509)は最大の Q₂₅ および最小の GSI₅ を示した (Fig 16D)。そして、経時解析を行った感染者(IMS0414)の 3 年目のプロットより時間が経過していると思われるのは、Y-prov(+) Pts 2 名と Y-prov(-) Pts 2 名のみであった (Fig 16D)。

以上の結果を総合して、初診日付近のプロウイルス解析によって、時間的なバイアス無く Y-prov(+)群と Y-prov(-)群に分ける事ができたと私は考えた。

・テトラマー解析結果と Y135 プロウイルス解析結果との比較

初感染ウイルスが 135F である感染者においては Nef134-8 CTL が誘導されない、すなわち、Nef134-8 CTL が誘導されている感染者は初感染ウイルスが

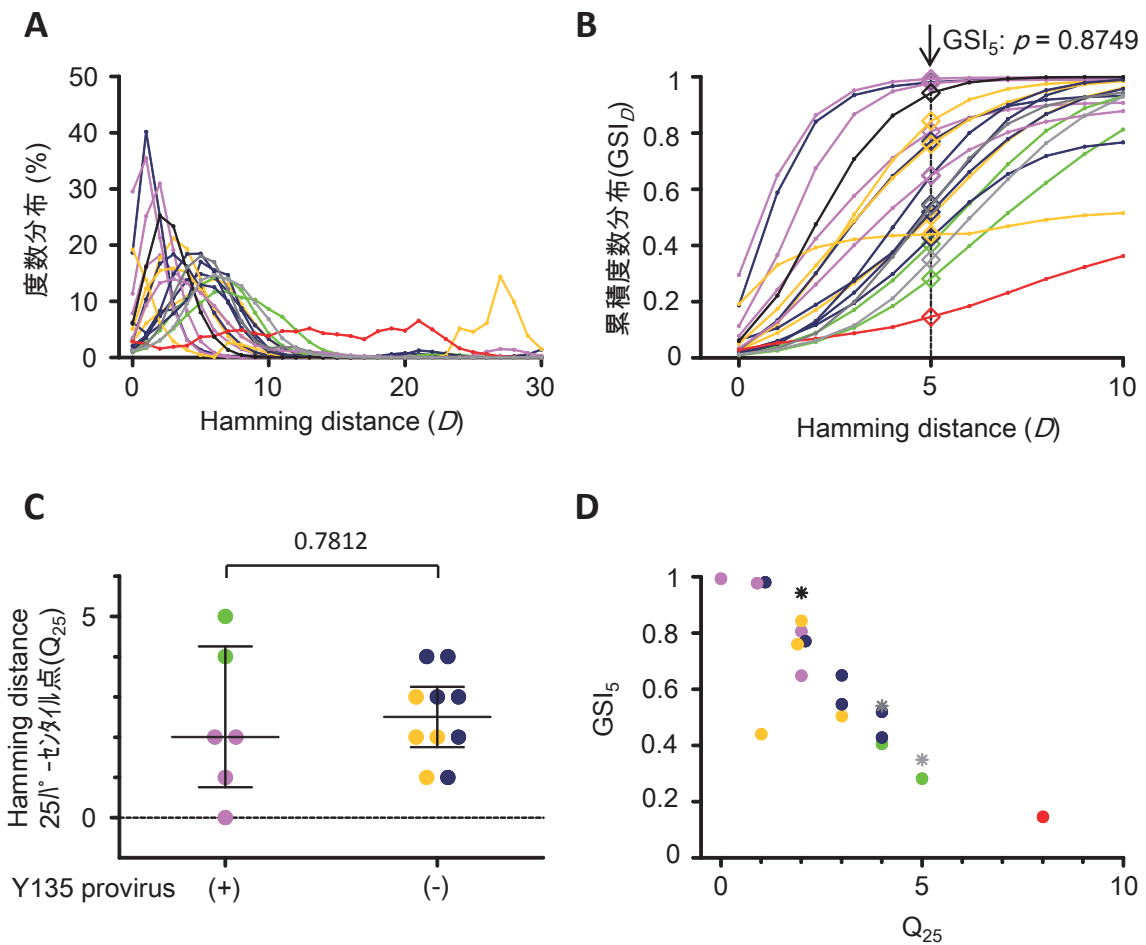


Fig 16. プロウイルス quasi-species の遺伝的距離(Hamming distance)。 Nt 9051 – 9364 の全長が読み取れたシーケンスを解析に用いた。色は Fig 15 凡例の通り。(A) 遺伝的距離のヒストグラム。(B) 遺伝的距離の累積度数分布。Hamming distance が 5 以下の累積度数、すなわち Genome Similarity Index - 5 (GSI_5) を比較対象とした。群間比較は Y-prov(+) 群 (ピンク、緑) と Y-prov(-) 群 (黄、青) の間で行った。P 値の算出には Mann-Whitney 検定を用いた。(C) Hamming distance の 25 パーセンタイル点 (Q_{25})。P 値の算出には Mann-Whitney 検定を用いた。(d) Q_{25} と GSI_5 による二次元プロット。SY Park らの先行研究では、左上の感染者ほど感染からの期間が短く、時間が経過するにつれ右下に移動するとされている。

Y135 である可能性が示唆されたことから、第 II 章のテトラマー解析の結果と前項の Y-prov 解析の結果を組み合わせ、135F 初感染者の推定を試みた。

Nef134-8 CTL の有無と Y-prov の有無により血漿 135F 陽性者を 4 群に分けたところ、Y-prov(+)/8CTL(+)群(ピンク)は 4 名、Y-prov(+)/8CTL(-)群(緑)は 2 名、Y-prov(-)/8CTL(+)群(黄色)は 4 名、Y-prov(-)/8CTL(-)群(濃青)は 6 名となった(Fig 17A)。この分類を基に 2x2 分布表による統計解析を行ったが、Nef134-8 CTL の有無と Y-prov の有無に相関関係は認められなかった(p=0.6084, Fisher's exact test)事から、これらの分類法の間には一対一の対応関係が無いと言える。しかしながら、Y-prov(+)/8CTL(+)群は Y135 初感染が、Y-prov(-)/8CTL(-)群は 135F 初感染が強く示唆される。そして、Y-prov(+)/8CTL(-)群 2 名と Y-prov(-)/8CTL(+)群 4 名について、野生型と変異型どちらに初感染したと考えるのが妥当か、検討する必要がある。

・ Nef134-10 TCR レポートリーと Y135 プロウイルス解析結果との比較

ここで私は、第 II 章で解析した Nef134-10 TCR レポートリーに着目し、Y-prov(-)群と、血漿 Y135 および Y-prov(+)群との間で TRBV4-1 クローン頻度と Simpson 多様度指数を比較した。結果、Y-prov(-)群は血漿 Y135 および

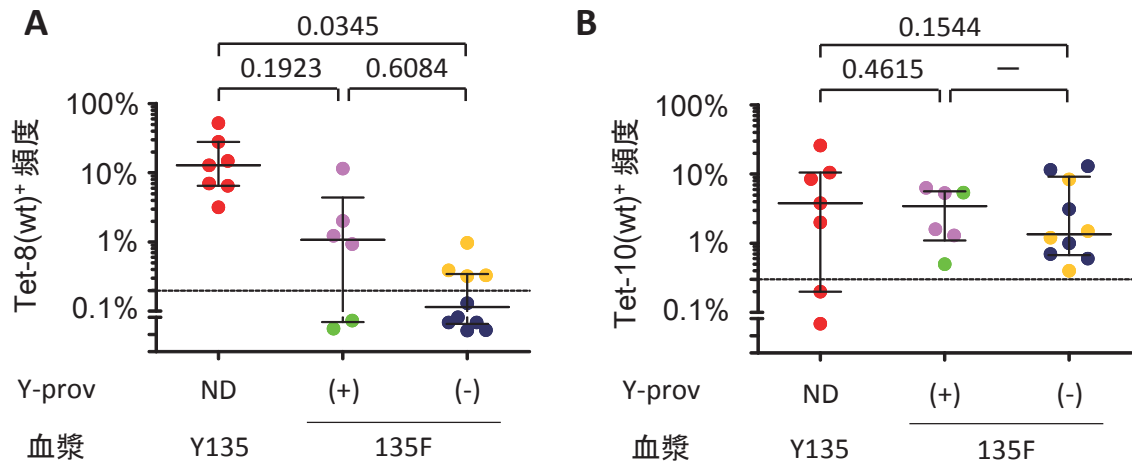


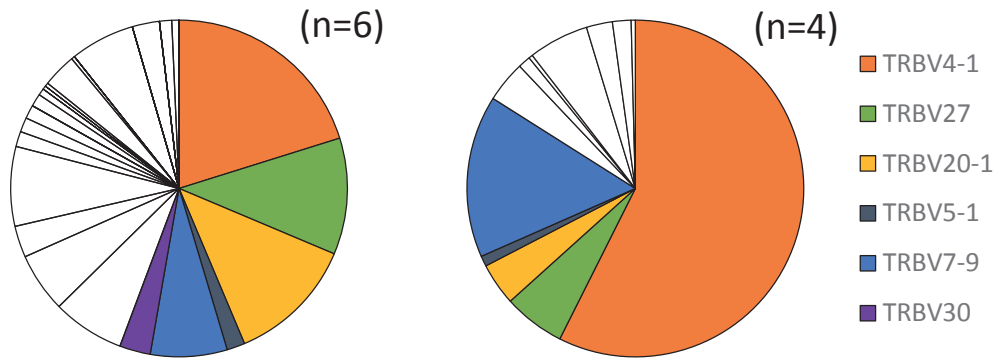
Fig 17. テトラマー陽性細胞頻度および血漿ウイルス・プロウイルス解析結果。(A) Tet-8(wt)⁺ 細胞頻度。(B) Tet-10(wt)⁺ 細胞頻度。テトラマー陽性細胞頻度は、[Tetramer⁺ CD8⁺ 細胞数 / CD8⁺ 細胞数] の式で算出した。破線はカットオフ値(健常人5名の平均 + 2 x 標準偏差)を示す。ND: Not Determined。凡例は Fig 15 の通り。P値の算出にはFisher's exact test を用いた(-:計算不能)。

Y-prov(+)群と比較して TRBV4-1 頻度が有意に高い事 (Fig 18A-C)、また多様
度指数が低い傾向にある事 (Fig 18D) が明らかとなった。また、TRBV4-1 ク
ローン頻度と多様度指数で 2 次元プロットすると、これらの群は 2 つのクラス
ターに分離する事ができた (Fig 18E)。

さらに、Nef134-8 CTL および Y-prov の有無で分類した際に検討が必要と考
えられた群について、Nef134-10 TCR レポートリーの結果を照らし合わせた。
まず、Y-prov(+)/8CTL(-)群に分類された感染者 2 名はいずれも、TCR レパー
トリー中に TRBV4-1 クローンを全く含まない事から、レポートリー中のほと
んどのクローンは Nef134-10 wt single-specific CTL である可能性がある。従
って、これらの感染者はいずれも野生型ウイルスに初感染したが、Nef134-8
CTL を保有しない体質であったか、または長期経過により Nef134-8 メモリー
が減少したと考えられる。故に、Y-prov(+)/8CTL(-)群は初感染ウイルスが
Y135 と推認した。また、Y-prov(-)/8CTL(+)群については 1 名しか TCR レパ
ートリーを解析できなかったが、この感染者の TCR レポートリーは TRBV4-1
クローンが 94%を占め、かつレポートリー多様度も低かった事から、本来多様
なはずの wt single-specific CTL がほとんど誘導できなかった、すなわち 135F
変異ウイルスに初感染した可能性がある。しかし一方で Nef134-8 CTL は誘導
されており、Y135 野生型ウイルスへの初感染も否定できない。故に、Y-prov(-)

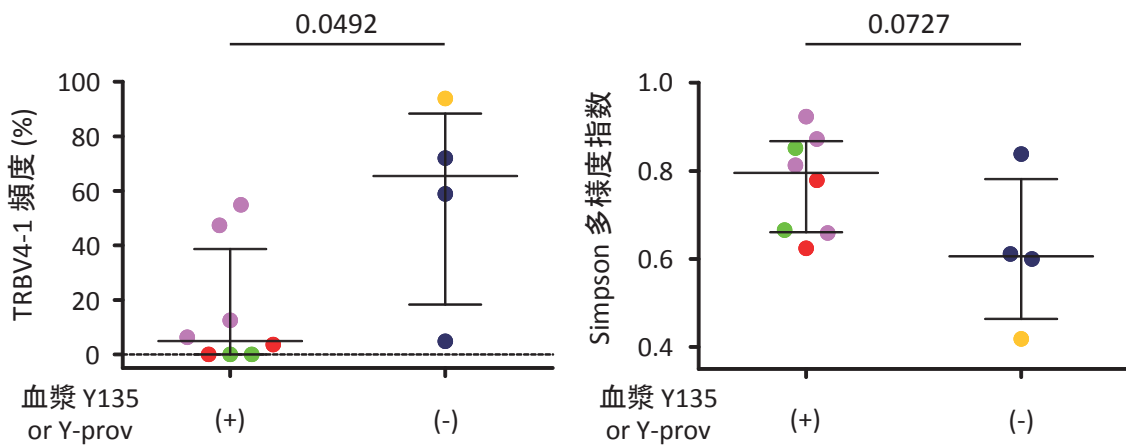
A. 血漿135F/Y-prov(+) Pts

B. 血漿135F/Y-prov(-) Pts



C

D



E

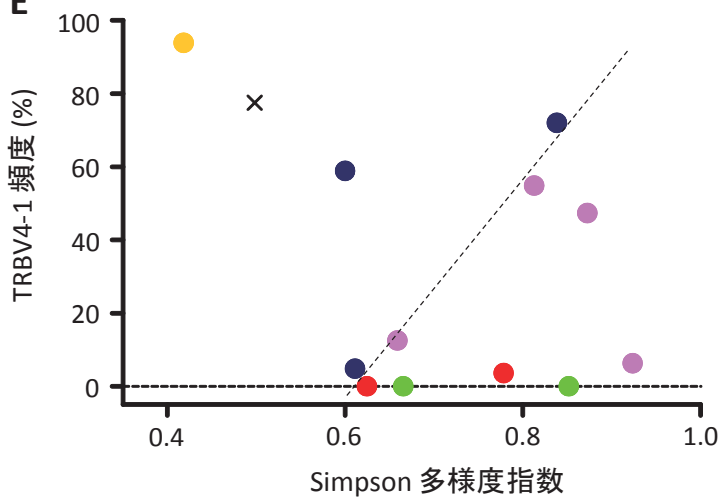


Fig 18. Tet-10(wt)⁺ CD8⁺ T細胞のTCRレパートリーとY135 ウイルスプロウイルスの有無。(A,B) 血漿 135F/Y-prov(+) Pts (A) および 血漿 135F/Y-prov(-) Pts (B) における TRBV 遺伝子使用頻度。クロナイトプ頻度ではなく、クローン頻度で算出した。(C,D) TRBV4-1 クローン頻度 (C) および標準化 Simpson 多様度指数 (D) の群間比較。凡例は Fig 15 の通り。P値は Mann-Whitney 検定により算出した。(E) TRBV4-1 頻度と標準化 Simpson 多様度指数による2次元プロット。×がプロウイルス解析を行わなかった感染者 (IMS0543) である事を除き、凡例は Fig 22 の通り。斜め破線は血漿 Y135 陽性者および Y-prov(+) Pts と、血漿 135F/Y-prov(-) Ptsとの境界を示す。

／8CTL(+)群の4名については初感染ウイルスの推定は困難と判断した。

先行研究では、TRBV4-1以外のNef134-10 dual-tropic TCRが観察されており、またTCRレパートリーの全体像について網羅的には把握されていない。これらの点を考慮すると、Nef134-10 TCRレパートリーは初感染ウイルスの推定のための明確な基準とはならないと考えられる。しかしながら本解析の結果から、Nef134-10 TCRレパートリーは初感染ウイルスの種類をある程度反映し、部分的には初感染ウイルスの推定に用いる事が可能と考えられる

・推定された初感染ウイルスの種類による臨床経過の比較

以上の結果を踏まえ私は、初感染ウイルスがY135野生型か135F変異型か、Nef134-8 CTLの有無とY-provの有無により推定し、感染者の臨床経過を比較する事とした。まず、Y-prov(-)/8CTL(-)群について、135F初感染と推定した。Y-prov(-)/8CTL(+)群は本解析から除外し、残りのY-prov(+)群をY135初感染と推定した。また、第II章で解析を行った血漿Y135陽性者7名についてもY135初感染群に含めた。これらの感染者のウイルス量(VL) (Fig 19A) とCD4細胞数 (Fig 19B) の経過観察結果を基に、1-50週、51-100週、101-150週、151-200週、および201-250週の各期間の値の中央値を求め、初診時および期間ごとに

VL (Fig 19C) と CD4 細胞数 (Fig 19D) の群間比較を行った。結果、VL については初診時およびいずれの期間においても有意差が認められなかった (Fig 19C)。しかしながら CD4 については、初診時には有意差が無かったものの、その後の各期間については全期間とも、135F 初感染群において有意に低く推移した (Fig 19D)。さらに言えば、135F 初感染群は初診後早期に治療介入されるか、あるいは過去に積極的治療基準であった $CD4 < 350 \text{ cells}/\mu\text{L}$ で推移した (Fig 19B,D)。

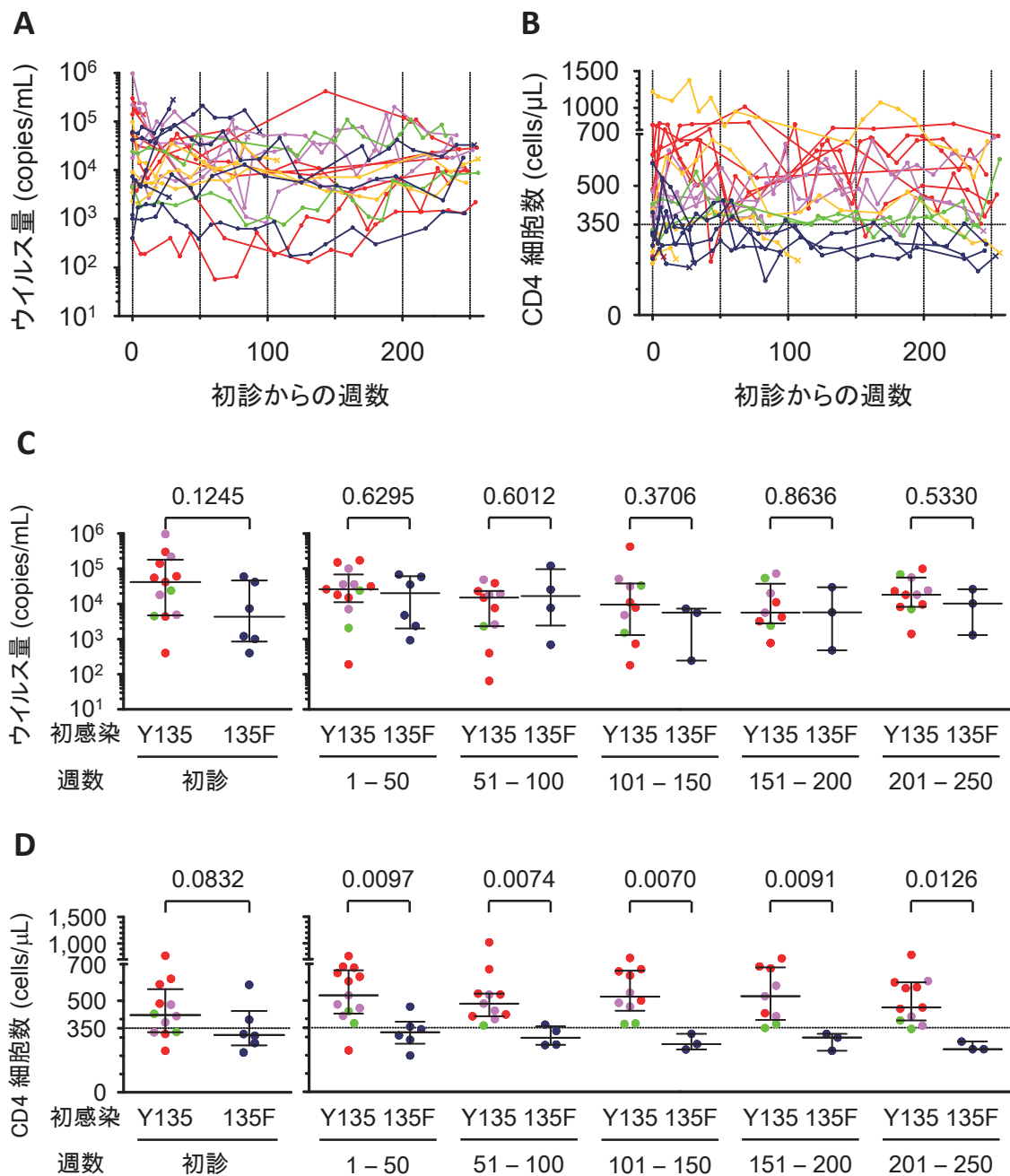


Fig 19. 臨床検査値の推移。凡例は Fig 15 の通り。(A,B) 250 週までのウイルス量 (copies/mL) (A) および CD4細胞数 (cells/μL) (B) の推移。(C,D) 初診時および 50週ごとのウイルス量 (C) および CD4 細胞数 (D) の中央値。Y135 初感染と推定した群には、血漿 Y135 Pts (赤)、血漿 135F/Y-prov(+) Pts (ピンクおよび緑) が含まれる。135F 初感染と推定した群には、血漿 135F/Y-prov(-)/8CTL(-) Pts (濃青) が含まれる。血漿 135F/Y-prov(-)/8CTL(+) Pts (黄色) は本解析から除外した。バーおよびエラーバーは各感染者中央値の中央値および四分位区間を示す。P値はいずれも Mann-Whitney 検定により算出した。

3-4 考察

これまでは、HIV 慢性感染者における初感染ウイルスの推定は困難であり、その同定に成功した先行研究は、大規模な前向きコホート研究⁷⁵、あるいは誰から誰に感染したかが明らかな感染者ペアに関する研究^{76,77}であった。そしてこれらの先行研究により、同一 HLA を有する宿主間での HIV 伝播は、ドナー個体により選択された複数の HLA 関連変異のレシピエントへの受け渡しを意味し、レシピエントの病態進行を加速させる事が示唆されていた⁷⁵。また別の研究では、HIV 感染者の HLA 適応変異の数が多いほど病態が悪化する事も示唆されていた^{38,78}。しかしながら、人口集団内において支配的な HLA に対して適応変異したウイルスが、その人口集団の主要 HLA 保因者に対する選択圧になるか、これまで明らかとなっていなかった。私は本研究において、これまで困難であった慢性感染者における初感染ウイルスの HLA 関連変異の推定を試みた。本研究第 II 章において、Nef134-8 CTL 誘導の有無が初感染ウイルス推定のための指標の一つである事を示し、本章においてプロウイルスの次世代シーケンス解析を組み合わせる事で、初感染ウイルスを推定した。そして、初感染ウイルスが HLA 適応変異を有する場合、ウイルス量には影響がないが、CD4 細胞数が低値で推移し、予後を悪化させる事を明らかにした。

本解析において最も重要かつ困難であったのは、血漿 135F 感染者を、Y135 初感染後に変異を獲得した感染者と、最初から 135F ウイルスに感染した者とを区別する事であった。しかし近年のシーケンス技術の発展による DNA の 1 分子解析はウイルス *quasi-species* の詳細な解析を容易にし、極わずかに存在するウイルスの検出を可能とした。Gabriella Rozera らは 2009 年、世界に先駆けて次世代シーケンサー GS-FLX を用いたプロウイルス解析を行い、HIV *env* 領域の「アーカイブ」を観察した⁶²。我々はこの解析法をプロウイルス *nef* 領域に適用し、採血時点から遡ったウイルス変異の遍歴を観察する事で、一部の感染者において Y135 ウイルスが体内に存在した痕跡を検出した。

ただ、プロウイルス解析では、初期に存在したプロウイルスの痕跡が経時的に減少し、検出限界以下になる可能性も考慮する必要があった。なぜならば、感染成立からの期間が判断できなければ、たとえ Y135 プロウイルス陰性者間の臨床予後の悪化が確認されても、単に病期が進んだ事による影響と考え得るためである。だが次世代シーケンス解析は、感染時期の推定を可能とした。感染成立時期の推定法の開発は複数の研究グループによって行われ、*quasi-species* の多様性を、遺伝子配列ベースあるいは PCR 産物の熱力学的特

性ベースで解析する事で成し遂げられた^{71,79-83}。ただし、ウイルス変異の速度はウイルス量と相関する可能性があり、ウイルス量と *quasi-species* の多様性に相関があるとする報告⁸⁴⁻⁸⁶と、相関が無いとする報告⁸⁷⁻⁸⁹とが存在した。だが SY Park らや MM Cousin らは、感染者の層別化の際にはウイルス量を考慮する必要が無かったと記述している^{71,80,83} 事から、私は、遺伝的距離はウイルス量とは無関係に、感染からの期間と相関する、との仮説に従った。今回私は、遺伝子配列ベースで解析可能、かつ計算機による演算コストの低い SY Park らの方法を参考に、感染成立時点から採血時点までの時間経過の比較を試みた結果、Y135 プロウイルス陽性群と陰性群の間の時間的バイアスは大きくない事が示され、CD4 細胞数の群間有意差の意義が担保された。

Y135 プロウイルス解析の結果は、Nef134-8 CTL の有無とは強い関連が見られなかったが、一方で、第 II 章で解析した TCR レパートリーについて興味深い結果をもたらした。Y135 プロウイルスの検出・未検出で群を分けて比較すると、Y135 プロウイルス陰性群で TRBV4-1 TCR の頻度が有意に高く、かつレパートリー多様度が低い傾向にあった。これが意味するのは、Y135 プロウイルス陰性群は 135F ウイルスに初感染した可能性があるため、Nef134-10 wt

single-specific CTL が誘導されず、wt/2F dual-tropic CTL が選択的に誘導される一方で、Y135 初感染と推定される Y135 プロウイルス陽性群は、wt single-specific CTL と dual-tropic CTL が両方誘導された、という可能性である。以上から、Y135 プロウイルス解析にはある程度の妥当性があると解釈できる。そして、本研究では行わなかったが、Nef134-10 特異的 CTL について Tet-10(wt)および Tet-10(2F)による重染色で解析を行う事で、初感染ウイルスの推定に利用可能かもしれない。

なお、Y-prov(-)/8CTL(+)の感染者 1 名(IMS0765)については多様な解析の結果、不可解な現象が観察された。この感染者は、初診 35 日前に発熱が見られたために初診 29 日前に検査を行った所、抗 HIV 抗体陰性、HIV RNA 陽性で、感染急性期が疑われた。初診時の採血を基にプロウイルス解析を行った所、Y135 プロウイルスは陰性であり (Fig 15)、Hamming distance の $Q_{25} = 1$ (Fig 16C) であるため確かに急性感染であった。しかしながら、15 か月後の採血を基に CTL の解析を行った所、Nef134-8 CTL は誘導され (Fig 8A)、その主要 TCR もモチーフに合致したクロノタイプであった (未発表) 一方で、Nef134-10 TCR レパートリーは TRBV4-1 クロオンが 94%である (Fig 12, Fig 18E) など、

Y135 初感染か 135F 初感染か明確でなかった。この感染者は CD4 数 < 400 cells/ μ L で推移し、初診後 2 年強で HAART 適応となった (Fig 19A,B)。多様な Nef134-10 wt single-specific CTL は、Y135 初感染ならほぼ確実に誘導されるはずであるが、そうではなかった事、そして、急性期にもかかわらず Y135 プロウイルスが検出されなかった事から、私は 135F 初感染を疑った。では、Nef134-8 CTL が誘導されている事は、どう解釈すべきであろうか。可能性としては、Nef134-8(2F)も極わずかに抗原提示される可能性、そして、135F 初感染であってもごく小規模に F to Y 復帰変異が起こり、抗原提示が十分なされる Y135 ウイルスはすぐさま排除されて痕跡をほとんど残さない可能性、2 点を考えた。いずれの仮説も確率論的に稀な事象であるため、通常の実験系ではこれらを解析するのは困難であり、今後更なる解析が必要である。

さて、IMS0765 については 135F 初感染と考察したが、他の Y-prov(-)/8CTL(+) Pts についても同様とは限らない。というのも、これらの感染者では Y135 野生型ウイルスに感染した直後に急速に変異を獲得し、Y135 プロウイルスが残らなかった可能性も残るためである。これらを総合すると、Y-prov(-)/8CTL(+)群の初感染ウイルスを推定するのは困難、という事であり、本研究においてはこれらの感染者を臨床経過の解析から除外した。

以上の準備を経て、Nef134-8 CTL の検出と Y135 プロウイルスの検出を Y135 初感染の指標として感染者を群分けすると、ウイルス量に差は無かったものの CD4 細胞数に有意差が見られた。血中ウイルス量は、検査直近のウイルスの fitness (ある特定環境下における、免疫系によるウイルス抑制や薬剤投与も考慮した上でのウイルス複製能) を反映したものであるため、直近の主要ウイルスが 135F 変異体であれば、ウイルス量は変異選択が感染前か感染後か関係なく同等であると考えられる。そして多くの先行研究では、ウイルス量を基に病原性について議論しているが、しかしながらウイルス量は必ずしも予後と関連しない。一方の CD4 細胞数については、複数の変動要因が存在するため詳細が明らかでないが、AIDS の本態は CD4 細胞数の減少による免疫不全であるので、CD4 細胞数こそ HIV 感染における病態悪化を示す指標である。よって本研究は、日本国内の主要集団により選択された HLA-A*24:02 関連変異が、HLA-A*24:02 陽性新規感染者の CD4 減少を介して予後悪化に直接的に影響するとした、世界で初めての報告である。

なお、本研究では Nef Y135F 変異に焦点を当てたが、それ以外の様々な HLA-A*24:02 関連変異が CD4 低値に寄与している可能性が高い。そもそも初

感染ウイルスにおける Nef Y135F 変異の同定は、HLA-A*24:02 関連変異の伝播を観察するための一要素にすぎない。先行研究で ZL Brumme らは、感染個体への HLA 適応変異の数が多いほど CD4 細胞数が低い事を明らかにしている^{38,78}。本研究の結果は、HLA-A*24:02 を有する感染者体内において様々な HLA-A*24:02 適応変異が選択され、それが当該アレルを有する新規感染者の CD4 低値を誘発したと考えるのが適当と思われる。

さらに傍証として、親子間の垂直感染についても触れたい。子供は、父親から半分、母親から半分の HLA class I 遺伝子を受け継ぐ。母親が HIV に感染している場合、HIV は母親由来 HLA への適応変異を獲得していると考えられ、子供は感染時点で既に半分の HLA 拘束性免疫応答が誘導できない状況となる⁷⁶。そのため、HLA 適応変異の蓄積は人口集団内での水平伝播だけでなく、親子間の垂直伝播でも病態進行を加速させる可能性が高い。

本研究は、「人口集団内主要 HLA による HLA 適応変異の蓄積は、当該 HLA 陽性新規感染者の予後を悪化させる」事を、世界で初めて直接的に示した。本研究成果は、国内の HIV 感染ハイリスク群に対して早期受診を勧めるための非常に強いメッセージとなるばかりでなく、初診直後のモニタリングの重要性も

示唆している。さらにワクチン開発においては、日本国内で流行する、HLA-A*24:02 や HLA-B*51 などに適応変異したウイルスへの対処を十分に考える必要がある^{9,10,16}。例えば Nef134-8 CTL や Nef134-10 wt single-specific CTL は変異型エピトープを認識不可能なため、HLA 適応変異ウイルスに対して有効でない。しかしながら、Nef134-10 dual-tropic CTL や、Y135F 変異により新たに出現するエピトープ、Nef126-10(10F)に対する CTL を誘導する事は、変異型ウイルスに対する防御として有効であると考えられる。野生型、変異型いずれのウイルスにも対処可能な宿主免疫を誘導するためのワクチン株の最適化や、多価ワクチンの開発などが、適応変異を蓄積しつつある HIV に対する感染防御として重要であると考えられる。

IV. 総括

本研究では、日本人で高頻度に観察される Nef Y135F 変異、および関連するエピトープの詳細な解析を端緒として、病原体とヒト集団の共進化について意義深い知見を得る事ができた。

レトロウイルスは多様化の程度が著しいため、サル免疫不全ウイルス(SIV)は種の壁を乗り越え、ヒトに感染する HIV となった。HIV は感染個体内で免疫系からの逃避を重ねて多様化し、さらにそれが多様な免疫学的背景を有するヒト集団内で循環する事で、多彩なヒト免疫圧に対する更なる適応を遂げつつある。そして高度にヒトに適応した HIV への新規感染は、感染者予後を早期から悪化させる。特に本研究では、宿主多様性が低い民族、地域での水平伝播に焦点を当て、人口主要集団により選択されたウイルスが人口主要集団に対する選択圧となる事を示した。ウイルスの多様化戦略はヒトの多様化戦略を上回り、抗 HIV 薬やワクチンの不能にも結びつく。そのため、HIV の多様性を念頭に入れたワクチン開発戦略を練る必要がある。

HIV は今後も多様化すると考えられる事から、今現在のウイルス変異の蓄積が将来どの程度まで進展するか、考慮する必要がある。ウイルス変異は、HLA 不一致ペアの間で伝播した際、復帰変異する可能性がある事が知られている。

HLA が多様な人口集団で変異の蓄積が起こるのは、復帰変異が起こりにくい逃避変異であると考えられる。一方で、本研究で扱った Nef Y135F 変異は復帰変異が起こりやすいが、日本の人口主要集団で選択されたために蓄積が起こり、かつ同一 HLA 間での伝播も起こりやすい。これらを勘案すると、1) 復帰変異を起こしにくい変異に対する防御効果、2) 人口主要集団で選択される変異に対する防御効果、以上 2 点をワクチンに付与すべきである。また当然ではあるが、3) 野生型ウイルスに対する防御効果も不可欠である。単一のワクチン株では、野生型と変異型の両方に対する防御効果を付与するのは容易でない。そこで私は、多価ワクチンの開発を推奨したい。

ただ、闇雲に変異型ウイルスを模したワクチン株を作成しようとしても、無意味な場合がある。本研究の例では、Nef134-8 特異的 CTL は 2F 変異型エピトープを認識できなかった。一方で、変異型 Nef134-10 は抗原提示され、一部の Nef134-10 特異的 CTL により認識される。また、変異により新たにエピトープが出現する場合も存在し、Nef Y135F 変異の場合は Nef126-10 がそれに該当する。つまり、蓄積が確認されている、あるいは予測されている変異のうち、エピトープ特異的 CTL 応答を惹起できるものはワクチンとして有効であろう。

本研究は元々、単に 2 種類の HIV エピトープと逃避変異についての解析という限定的な内容であったが、逃避変異の伝播と蓄積に関して非常に有意義な、将来のワクチン開発につながる知見を得る事ができた。今後、本研究の成果が抗 HIV 療法やワクチンの開発につながる事を期待したい。

【謝辞】

本研究にあたり、5年間にわたって御指導御鞭撻を賜りました岩本 愛吉教授に篤く御礼申し上げます。本研究の公表に向けて御意見を賜りました、Faculty of Health Sciences, Simon Fraser University の Zabrina L. Brumme 准教授、及び中国科学院 微生物研究所の高 福 (George F. Gao) 教授に御礼申し上げます。議論や研究の相談のみならず、日常生活でもお世話になりました東京大学医科学研究所 感染症分野・感染免疫内科の皆様、及び OB の皆様に御礼申し上げます。自身の HIV 感染に苦しみながらも研究に御協力いただいた HIV 感染者の皆様、そして採血、臨床検査に携わられた東京大学医科学研究所附属病院の先生方に御礼申し上げます。次世代シーケンス解析に御協力いただいた北海道システム・サイエンス株式会社の皆様に御礼申し上げます。

学部生時代に落ちこぼれた私に道を示し、導いて下さった東京理科大学薬学部の海保 房夫 元准教授に篤く御礼申し上げます。30年もの間、不出来な私の面倒をここまで見てくれた家族に感謝いたします。毎日疲れて家に帰る私を癒してくれた、3匹（今は2匹になりましたが）の猫に感謝いたします。

【参考文献】

1. McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annual review of immunology* 1997; **15**: 271-96.
2. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; **68**(7): 4650-5.
3. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 2004; **432**(7018): 769-75.
4. Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, et al. HLA class I-mediated control of HIV-1 in the Japanese population, in which the protective HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles are absent. *J Virol* 2012; **86**(19): 10870-2.
5. Leslie A, Matthews PC, Listgarten J, et al. Additive contribution of HLA class I alleles in the immune control of HIV-1 infection. *J Virol* 2010; **84**(19): 9879-88.
6. Theoretical Biology & Biophysics LANL. HIV Molecular Immunology: Maps of CTL/CD8+ Epitope Locations Plotted by Protein. 2013.
7. Tenzer S, Wee E, Burgevin A, et al. Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol* 2009; **10**(6): 636-46.
8. Schneidewind A, Brockman MA, Sidney J, et al. Structural and functional constraints limit options for cytotoxic T-lymphocyte escape in the immunodominant HLA-B27-restricted epitope in human immunodeficiency virus type 1 capsid. *J Virol* 2008; **82**(11): 5594-605.
9. Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, et al. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol* 2004; **78**(16): 8437-45.
10. Kawashima Y, Pfafferoth K, Frater J, et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 2009; **458**(7238): 641-5.
11. Carlson JM, Brumme CJ, Martin E, et al. Correlates of protective cellular immunity revealed by analysis of population-level immune escape pathways in HIV-1. *J Virol* 2012; **86**(24): 13202-16.
12. Tokunaga K, Ishikawa Y, Ogawa A, et al. Sequence-based association

- analysis of HLA class I and II alleles in Japanese supports conservation of common haplotypes. *Immunogenetics* 1997; **46**(3): 199-205.
13. HLA 研究所. アリル頻度検索. http://www.hla.or.jp/haplo/frequency_search/haplo_search.php?type=aril&loci=A&lang=en.
 14. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic acids research* 2011; **39**(Database issue): D913-9.
 15. Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, et al. Significant reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan. *J Virol* 2013; **87**(3): 1465-76.
 16. Koga M, Kawana-Tachikawa A, Heckerman D, et al. Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiology and immunology* 2010; **54**(4): 196-205.
 17. Ikeda-Moore Y, Tomiyama H, Miwa K, et al. Identification and characterization of multiple HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes: strong epitopes are derived from V regions of HIV-1. *J Immunol* 1997; **159**(12): 6242-52.
 18. Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, et al. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS* 2009; **23**(6): 651-60.
 19. Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, et al. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Scientific reports* 2013; **3**: 3097.
 20. Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, et al. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology* 2014; **11**: 38.
 21. Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, et al. An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes. *J Virol* 2002; **76**(23): 11982-8.
 22. Sun X, Fujiwara M, Shi Y, et al. Superimposed epitopes restricted by the same HLA molecule drive distinct HIV-specific CD8+ T cell repertoires. *J Immunol* 2014; **193**(1): 77-84.

23. Gahery-Segard H, Pialoux G, Figueiredo S, et al. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8⁺-T-cell epitopes recognized. *J Virol* 2003; **77**(20): 11220-31.
24. Sanchez-Merino V, Nie S, Luzuriaga K. HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses and viral evolution in women and infants. *J Immunol* 2005; **175**(10): 6976-86.
25. Choppin J, Cohen W, Bianco A, et al. Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8⁺ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation. *J Immunol* 2001; **166**(10): 6164-9.
26. Fujiwara M, Tanuma J, Koizumi H, et al. Different abilities of escape mutant-specific cytotoxic T cells to suppress replication of escape mutant and wild-type human immunodeficiency virus type 1 in new hosts. *J Virol* 2008; **82**(1): 138-47.
27. Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, et al. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2008; **10**(6): 689-98.
28. Anuska Llano A, Alex Olvera, Sandra Silva-Arrieta, Christian Brander. Best-Characterized HIV-1 CTL Epitopes: The 2013 Update.
29. 加藤次朗. HIV-1 Nef138 特異的 CD8 陽性 T 細胞の T 細胞受容体レパトリーの解析 (未公表) . 東京大学大学院 2012; 修士論文.
30. Goulder PJ, Edwards A, Phillips RE, McMichael AJ. Identification of a novel HLA-A24-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope within HIV-1 Nef. *AIDS* 1997; **11**(15): 1883-4.
31. Frahm N, Yusim K, Suscovich TJ, et al. Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. *European journal of immunology* 2007; **37**(9): 2419-33.
32. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature medicine* 2007; **13**(1): 46-53.
33. Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, et al. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 2001; **193**(2): 169-80.
34. Bihl F, Frahm N, Di Giammarino L, et al. Impact of HLA-B alleles,

- epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J Immunol* 2006; **176**(7): 4094-101.
35. Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, et al. HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* 2006; **3**(10): e403.
 36. Brumme ZL, Brumme CJ, Carlson J, et al. Marked epitope- and allele-specific differences in rates of mutation in human immunodeficiency type 1 (HIV-1) Gag, Pol, and Nef cytotoxic T-lymphocyte epitopes in acute/early HIV-1 infection. *J Virol* 2008; **82**(18): 9216-27.
 37. Cotton LA, Kuang XT, Le AQ, et al. Genotypic and functional impact of HIV-1 adaptation to its host population during the North American epidemic. *PLoS genetics* 2014; **10**(4): e1004295.
 38. Brumme ZL, Brumme CJ, Heckerman D, et al. Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS pathogens* 2007; **3**(7): e94.
 39. Martin E, Carlson JM, Le AQ, et al. Early immune adaptation in HIV-1 revealed by population-level approaches. *Retrovirology* 2014; **11**(1): 64.
 40. Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic acids research* 2009; **37**(Database issue): D1006-12.
 41. Li S, Lefranc MP, Miles JJ, et al. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nature communications* 2013; **4**: 2333.
 42. Venturi V, Kedzierska K, Turner SJ, Doherty PC, Davenport MP. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *J Immunol Methods* 2007; **321**(1-2): 182-95.
 43. LosAlamosNationalLaboratory. HIV database. <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>.
 44. 渡邊紗也香. HIV 伝播が確認された感染者間における HIV の遺伝子解析. 信州大学大学院 2007; 修士論文.
 45. Kondo A, Sidney J, Southwood S, et al. Prominent roles of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A24 human class I molecules. *J Immunol* 1995; **155**(9): 4307-12.
 46. Sette A, Sidney J, del Guercio MF, et al. Peptide binding to the most

- frequent HLA-A class I alleles measured by quantitative molecular binding assays. *Molecular immunology* 1994; **31**(11): 813-22.
47. Sette A, Vitiello A, Reherman B, et al. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 1994; **153**(12): 5586-92.
 48. Keogh E, Fikes J, Southwood S, Celis E, Chesnut R, Sette A. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity. *J Immunol* 2001; **167**(2): 787-96.
 49. Lund O, Nascimento EJ, Maciel M, Jr., et al. Human leukocyte antigen (HLA) class I restricted epitope discovery in yellow fever and dengue viruses: importance of HLA binding strength. *PloS one* 2011; **6**(10): e26494.
 50. Paul S, Weiskopf D, Angelo MA, Sidney J, Peters B, Sette A. HLA class I alleles are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and immunogenicity. *J Immunol* 2013; **191**(12): 5831-9.
 51. Sidney J, Southwood S, Sette A. Classification of A1- and A24-supertype molecules by analysis of their MHC-peptide binding repertoires. *Immunogenetics* 2005; **57**(6): 393-408.
 52. Lewis MJ, Lee P, Ng HL, Yang OO. Immune selection in vitro reveals human immunodeficiency virus type 1 Nef sequence motifs important for its immune evasion function in vivo. *J Virol* 2012; **86**(13): 7126-35.
 53. Kuang XT, Li X, Anmole G, et al. Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia. *J Virol* 2014; **88**(17): 10200-13.
 54. Jia X, Singh R, Homann S, Yang H, Guatelli J, Xiong Y. Structural basis of evasion of cellular adaptive immunity by HIV-1 Nef. *Nature structural & molecular biology* 2012; **19**(7): 701-6.
 55. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature medicine* 1996; **2**(3): 338-42.
 56. Chikata T, Carlson JM, Tamura Y, et al. Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population. *J Virol* 2014; **88**(9): 4764-75.
 57. Payne R, Muenchhoff M, Mann J, et al. Impact of HLA-driven HIV adaptation on virulence in populations of high HIV seroprevalence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014.

58. Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T. 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology* 2006; **3**: 69.
59. Pearson R, Kim YK, Hokello J, et al. Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency. *J Virol* 2008; **82**(24): 12291-303.
60. Buzon MJ, Sun H, Li C, et al. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nature medicine* 2014; **20**(2): 139-42.
61. Rozera G, Abbate I, Giombini E, et al. Evolution of HIV-1 tropism at quasispecies level after 5 years of combination antiretroviral therapy in patients always suppressed or experiencing episodes of virological failure. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014; **69**(11): 3085-94.
62. Rozera G, Abbate I, Bruselles A, et al. Massively parallel pyrosequencing highlights minority variants in the HIV-1 env quasispecies deriving from lymphomonocyte sub-populations. *Retrovirology* 2009; **6**: 15.
63. Swenson LC, Moores A, Low AJ, et al. Improved detection of CXCR4-using HIV by V3 genotyping: application of population-based and "deep" sequencing to plasma RNA and proviral DNA. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2010; **54**(5): 506-10.
64. Bansode V, McCormack GP, Crampin AC, et al. Characterizing the emergence and persistence of drug resistant mutations in HIV-1 subtype C infections using 454 ultra deep pyrosequencing. *BMC infectious diseases* 2013; **13**: 52.
65. Papuchon J, Pinson P, Lazaro E, et al. Resistance mutations and CTL epitopes in archived HIV-1 DNA of patients on antiviral treatment: toward a new concept of vaccine. *PloS one* 2013; **8**(7): e69029.
66. Pessoa R, Watanabe JT, Calabria P, et al. Enhanced detection of viral diversity using partial and near full-length genomes of human immunodeficiency virus Type 1 provirus deep sequencing data from recently infected donors at four blood centers in Brazil. *Transfusion* 2014.
67. Abbate I, Vlasi C, Rozera G, et al. Detection of quasispecies variants predicted to use CXCR4 by ultra-deep pyrosequencing during early HIV

- infection. *AIDS* 2011; **25**(5): 611-7.
68. Salazar-Gonzalez JF, Bailes E, Pham KT, et al. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J Virol* 2008; **82**(8): 3952-70.
69. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(21): 7552-7.
70. Keele BF, Estes JD. Barriers to mucosal transmission of immunodeficiency viruses. *Blood* 2011; **118**(4): 839-46.
71. Park SY, Goeken N, Lee HJ, Bolan R, Dube MP, Lee HY. Developing high-throughput HIV incidence assay with pyrosequencing platform. *J Virol* 2014; **88**(5): 2977-90.
72. Lank SM, Wiseman RW, Dudley DM, O'Connor DH. A novel single cDNA amplicon pyrosequencing method for high-throughput, cost-effective sequence-based HLA class I genotyping. *Human immunology* 2010; **71**(10): 1011-7.
73. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 2013; **30**(12): 2725-9.
74. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 2004; **32**(5): 1792-7.
75. Crawford H, Lumm W, Leslie A, et al. Evolution of HLA-B*5703 HIV-1 escape mutations in HLA-B*5703-positive individuals and their transmission recipients. *J Exp Med* 2009; **206**(4): 909-21.
76. Goulder PJ, Brander C, Tang Y, et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 2001; **412**(6844): 334-8.
77. Schneidewind A, Tang Y, Brockman MA, et al. Maternal transmission of human immunodeficiency virus escape mutations subverts HLA-B57 immunodominance but facilitates viral control in the haploidentical infant. *J Virol* 2009; **83**(17): 8616-27.
78. Brumme ZL, Tao I, Szeto S, et al. Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection. *AIDS* 2008; **22**(11): 1277-86.

79. Kouyos RD, von Wyl V, Yerly S, et al. Ambiguous nucleotide calls from population-based sequencing of HIV-1 are a marker for viral diversity and the age of infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; **52**(4): 532-9.
80. Cousins MM, Konikoff J, Sabin D, et al. A comparison of two measures of HIV diversity in multi-assay algorithms for HIV incidence estimation. *PloS one* 2014; **9**(6): e101043.
81. Andersson E, Shao W, Bontell I, et al. Evaluation of sequence ambiguities of the HIV-1 pol gene as a method to identify recent HIV-1 infection in transmitted drug resistance surveys. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2013; **18**: 125-31.
82. Poon AF, McGovern RA, Mo T, et al. Dates of HIV infection can be estimated for seroprevalent patients by coalescent analysis of serial next-generation sequencing data. *AIDS* 2011; **25**(16): 2019-26.
83. Park SY, Love TM, Nelson J, Thurston SW, Perelson AS, Lee HY. Designing a genome-based HIV incidence assay with high sensitivity and specificity. *AIDS* 2011; **25**(16): F13-9.
84. Mens H, Kearney M, Wiegand A, et al. HIV-1 continues to replicate and evolve in patients with natural control of HIV infection. *J Virol* 2010; **84**(24): 12971-81.
85. Perez-Losada M, Jobes DV, Sinangil F, Crandall KA, Posada D, Berman PW. Phylodynamics of HIV-1 from a phase-III AIDS vaccine trial in North America. *Molecular biology and evolution* 2010; **27**(2): 417-25.
86. Vardhanabhuti S, Taiwo B, Kuritzkes DR, Eron JJ, Jr., Bosch RJ. Phylogenetic evidence of HIV-1 sequence evolution in subjects with persistent low-level viremia. *Antiviral therapy* 2014.
87. Bello G, Casado C, Garcia S, et al. Plasma RNA viral load is not associated with inpatient quasispecies heterogeneity in HIV-1 infection. *Archives of virology* 2004; **149**(9): 1761-71.
88. Rieder P, Joos B, Scherrer AU, et al. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) diversity and tropism in 145 patients with primary HIV-1 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; **53**(12): 1271-9.

89. Chen I, Khaki L, Lindsey JC, et al. Association of pol diversity with antiretroviral treatment outcomes among HIV-infected African children. *PloS one* 2013; **8**(11): e81213.

補遺：本研究における全データ概要

患者ID	HLA		血液ウイルス		Tel-5(wt)		Tel-10(wt)		プロウイルス			臨床マーカー					治療開始			
	A	B	NeF134-10 RFLPTGECF	週数	細菌頻度 (%)	細菌割合 (%)	Tel-5(wt) 多様性指数	Tel-10(wt) 多様性指数	Y135 頻度 (%)	O ₂₈	GS%	ウイルス量 (copies/mL)		CD4細胞数 (cells/μL)					週数	治療
												初診	1-50	51-100	101-150	151-200	201-250			
IMS0738	A*2402/3303	B*4403/4402	18	28	3.8	0.625	0.0%	ND	ND	ND	485	650	537	659	686	589	438	未治療		
IMS0671	A*2402/3303	B*4006/4403	11	28.0	10.5	ND†	ND	ND	ND	ND	6100	15000	23000	42000	90000	443	443	TDF/FTC DRV(800QD)/rv		
IMS0509	A*1101/2402	B*0702/1501	0	58	2.0	0.779	3.6%	ND	0.146	0.146	55000	26000	15000	685.5	423.5	636	461	TDF/FTC DRV(800QD)/rv		
IMS0638	A*1101/2402	B*5201/1511	0	0	8.5	ND	ND	ND	ND	ND	42000	31000	38500	770	759	671	783	TDF/FTC EVG/COBI		
IMS0506	A*1101/2402	B*0702/5502	194	0	25.9	ND	ND	ND	ND	ND	140000	150000	141††	Tx	Tx	Tx	10	AZT/3TC RTV/IDV		
IMS0632	A*2402/3303	B*5101/15201	195	195	0.9	0.924	6.3%	0	0.978	0.978	4900	7100	2600	4750	5600	606	606	未治療		
IMS0748	A*2402/3303	B*5201/15401	269	194	5.3	0.659	12.5%	0	0.993	0.993	220000	36000	48500	51000	72000	542	379	TDF/FTC RPV		
IMS0892	A*2402/3303	B*1518/5201	31	31	11.5	0.813	54.9%	2	0.649	0.649	970000	100000	19000	31500	20000	24000	256	256	d4T/3TC NRV	
IMS0387	A*2402	B*5201	80	80	1.2	0.873	47.4%	0	0.807	0.807	18000	35900	16000	Tx	Tx	Tx	87	未治療		
IMS0765	A*2402/2801	B*4801/15101	65	65	0.3	0.419	93.9%	0	0.440	0.440	98000	15000	15000	16000	Tx	Tx	Tx	115	TDF/FTC FPV/rv	
IMS0526	A*2402/2402	B*4801/15101	0	245	8.4	ND	ND	0	0.00%	0	9100	5100	6300	7200	9600	405	288	TDF/FTC ATV/rv		
IMS0827	A*2402/3303	B*0702/4002	4	4	1.5	ND	ND	27	0.780	0.780	3500	7200	14000	3700	3200	666	649	未治療		
IMS0593	A*1101/2402	B*0702/15101	17	17	0.3	0.4	ND	ND	0.844	0.844	2300	2650	Tx	Tx	Tx	22	22	AZT/3TC EFV		
IMS0539	A*1101/2402	B*5401/15603	23	42	3.4	ND	ND	23	NA†	NA	98000	43000	39000	29000	NV	NV	276	ABC/3TC LPV/rv		
IMS0955	A*1101/2402	B*1501/15201	14	57	0.5	0.7	ND	5	NA	NA	28000	21500	24000	Tx	Tx	Tx	59	TDF/FTC RAL		
IMS0850	A*2062/402	B*3501/15201	66	134	0.35*	0.8	ND	ND	ND	ND	14000	7200	10350	1650	2800	401	332	未治療		
IMS0748	A*2402/3303	B*3901/15101	1	24	0.07	0.852	0.0%	0	0.282	0.282	24000	24000	NV	33000	54000	329	296	TDF/FTC DRV(800QD)/rv		
IMS0653	A*2402/3303	B*0702/4403	72	32	0.02	0.666	0.0%	0	0.405	0.405	4500	2050	2300	1500	2400	349	344	TDF/FTC DRV(800QD)/rv		
IMS0849	A*0201/2402	B*4801/15201	7	65	0.05	0.800	58.9%	58	0.649	0.649	1000	920	690	245	480	309	274	TDF/FTC COBI/EVG		
IMS0758	A*0210/2402	B*5201/4006	27	27	1.0	0.838	72.0%	5	0.429	0.429	7400	4700	Tx	Tx	Tx	Tx	31	TDF/FTC FPV/rv (15days)		
IMS0601	A*2402/2420	B*4001/1507	80	80	0.6	0.611	4.8%	2	0.00%	0	1200	35000	25500	7300	5700	397	233	TDF/FTC ATV/rv		
IMS0541	A*1101/2402	B*0702/5101	0	253	11.5	ND	ND	0	0.547	0.547	400	2360	7600	5600	29500	26000	233	263	TDF/FTC EFV	
IMS0649	A*2402/2801	B*5201/4002	30	30	0.10	0.31	ND	0	0.00%	0	60000	67500	Tx	Tx	Tx	Tx	34	TDF 3TC EFV		
IMS0573	A*2402	B*5201/4006	13	61	0.02	0.7	ND	0	0.520	0.520	42000	58000	120000	Tx	Tx	Tx	100	TDF 3TC EFV		
IMS0543	A*2402/2801	B*5502/4001	70	70	0.09	0.468	77.6%	0	ND	ND	28000	49000	127500	Tx	Tx	Tx	105	AZT/3TC EFV		
IMS0735	A*2402	B*5201	3	3	7.0	0.2	ND	ND	ND	ND	4400	18000	7600	NV	NV	572	363	ABC/3TC RAL		
IMS0525	A*2402/3303	B*5101/15101	67	129	12.8	0.05	ND	ND	ND	ND	300000	170000	400	180	770	1400	420	TDF/FTC RAL		
IMS0871	A*2402/2801	B*3501/15201	0	55	0.3	0.01	ND	ND	ND	ND	29000	17000	20500	8000	10300	317	175	TDF/FTC DRV(800QD)/rv		
IMS0801	A*2402/3303	B*4006/15201	99	99	0	ND	ND	ND	ND	ND	1400	130	580	1600	480	1500	844	未治療		
IMS0692	A*0206/2402	B*5101/15201	21	56	0.05	0.04	ND	ND	ND	ND	140000	230000	160000	Tx	Tx	Tx	89	AZT/3TC LPV/rv		
IMS0617	A*2402/2801	B*5201/4002	28	130	0.15*	0.08	ND	ND	ND	ND	1200	1700	760	400	340	500	572	未治療		
Cut Off値					0.302															
IMS0414			8	65	1.98			65	1.06%	2	0.944						3		AZT 3TC IDV	
			254	254				141	0.51%	4	0.541									
								254	0.00%	5	0.350									

*: NeF134-10(wt)ペプチド刺激時のデータを使用した。

†: ND: 解析を行わなかった(not determined)。

‡: PCR 増幅が成功しなかった(not amplified)。

***: NV: 期間中、検査を行わなかった(no visit)。

††: Tx: 治療開始により解析から除外した(treatment)。

†††: 治療経過番号以下に示す

核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI): AZT = ジドブジン, 3TC = ラミブジン, FTC = エムトリシタビン, ABC = アバカビル, TDF = テノホビル。

プロテアーゼ阻害剤(P): IDV = インザビル, RTV = リトナビル, NEV = ネルフィナビル。

インテグラーゼ阻害剤(IN): RAL = ラルテグラビル, EVG = エルビナグラビル。

CYP3A4阻害剤: COBI = コピシスタット。