

博士論文

抗 HIV 薬投与下のウイルス特異的  
CD8 陽性 T 細胞誘導効果に関する研究

中村 碧

# 抗 HIV 薬投与下のウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導効果 に関する研究

新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻  
指導教員 俣野哲朗  
中村 碧

## 目次

1. 序論.....	3
2. 材料と方法.....	10
2-1. 動物実験.....	10
2-2. 抗 HIV 薬含有飼料の作製.....	11
2-3. 末梢血単核球および血漿の分離.....	11
2-4. 血漿中ウイルス量の定量.....	12
2-5. SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度の測定.....	12
2-6. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の測定.....	14
2-7. 血漿中および培養上清中 SIV ゲノムの塩基配列の解析.....	15
2-8. 統計解析.....	16
3. 結果.....	17
3-1. SIV 感染後の血漿中ウイルス量の解析.....	17
3-2. SIV 各抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の解析.....	18
3-3. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の解析.....	19
3-4. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関解 析.....	21
3-5. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と投薬中止後の血漿中ウイルス量との相関解析 .....	22
3-6. 血漿中および VSA 培養上清中に含まれる SIV ゲノム塩基配列の解析.....	23
4. 考察.....	26
5. 総括.....	35
6. 謝辞.....	36

7. 図表	37
図 1. HIV 感染後の血中ウイルス量の変化と HIV/SIV のウイルスゲノム(シェーマ)	37
表 1. MHC-I ハプロタイプ E・W・S を構成する Mamu-A・Mamu-B アレル	38
図 2. 治療ワクチン実験のプロトコル	39
図 3. SIV 感染後の血漿中ウイルス量の変化	40
図 4. 非接種群の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応	41
図 5. 治療ワクチン接種群の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応	42
図 6. Viral suppression assay (VSA) の模式図	43
図 7. 投薬前の標的 (SIV <sub>pre</sub> ) に対する各 CD8 陽性細胞の複製抑制能	44
図 8. 投薬中止後の標的 (SIV <sub>post</sub> ) に対する各 CD8 陽性細胞の複製抑制能	45
図 9. 治療ワクチン接種群における投薬下治療ワクチン接種後 (感染 27 週目) の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と 27 週目の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関解析	46
図 10. 治療ワクチン接種群における投薬中止後 (感染 34 週目) の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と 34 週目の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関解析	47
図 11. 治療ワクチン接種群における 27 週目あるいは 34 週目の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と 36 週目の血漿中ウイルス量との相関解析	48
図 12. VSA 培養上清および血漿中 SIV のゲノム解析	49
図 13-1. SIV <i>gag</i> ・ <i>vif</i> 変異 (非接種群・MHC-I ハプロタイプ E 陽性サル)	50
図 13-2. SIV <i>gag</i> ・ <i>vif</i> 変異 (非接種群・MHC-I ハプロタイプ W/S 陽性サル)	51
図 13-3. SIV <i>gag</i> ・ <i>vif</i> 変異 (治療ワクチン接種群・E 陽性サル)	52
図 13-4. SIV <i>gag</i> ・ <i>vif</i> 変異 (治療ワクチン接種群・W/S 陽性サル)	53
8. 参考文献	54

## 1. 序論

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) はヒト CD4 陽性細胞を主標的として感染するレトロウイルスである。HIV 感染者において、体内ウイルス量は感染後 1-2 ヶ月間の急性期にピークを示し、その後低下するものの一定量は維持され、慢性持続感染が成立して、一般的には 5 年間以上の経過を経てエイズ (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) 発症に至る (図 1A)。2013 年の国連エイズ合同計画 (Joint United Nations Program on HIV and AIDS; UNAIDS) によると、2012 年末の時点で世界の HIV 感染者数は 3530 万人、新規 HIV 感染者数は年間 230 万人、エイズによる死亡者数は年間 160 万人と推定されている<sup>1)</sup>。HIV 感染者総数は増え続けており、HIV 感染拡大阻止のため、早期診断・早期治療に加え、ワクチン開発が急務とされている一方、HIV 感染からの治癒に結び付く治療法の開発も望まれている。

現在、HIV 感染者には、抗 HIV 薬治療 (antiretroviral therapy; ART) が行われている。これは逆転写酵素阻害剤 (reverse transcriptase inhibitor; RTI) やプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor; PI) など HIV の複製過程を阻害する複数の薬剤を組み合わせることによって HIV の複製を抑制するものであり、この投薬治療によって HIV の複製を検出限界以下に抑制することが可能である (図 1B)<sup>2)</sup>。ART に用いられる薬剤は、阻害する HIV の複製過程によって大きく数種類に分類される。RTI は逆転写過程を阻害する薬剤であり、作用機序の違いによってジドブジン (AZT) やテノホビル (TDF)

などの核酸系逆転写酵素阻害剤（NRTI）と、ネビラピン（NVP）やエファビレンツ（EFV）などの非核酸系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）に分けられる。PI は HIV プロテアーゼによるウイルス Gag 蛋白質のプロセッシングを阻害する薬剤であり、代表的なものとしてロピナビル（LPV/r）やダルナビル（DRV）などがある。この他に、ラルテグラビル（RAL）やドルテグラビル（DTG）など、宿主染色体へのウイルス DNA の組み込みを阻害するインテグラーゼ阻害剤（integrase strand transfer inhibitor; INSTI）や、HIV の標的細胞受容体への結合を阻害するマラビロク（MVC）などの侵入阻害剤が近年導入され、薬剤の選択肢の幅が広がるとともに、感染者への負担がより少ない薬剤治療が進展しつつある<sup>3),4)</sup>。

このように種々の抗 HIV 薬が開発されつつあるが、これらの投与により感染者体内からウイルスが完全に排除されるわけではなく、投薬を中止すると再び血中にウイルスが認められるようになる<sup>5)</sup>。このため、HIV 感染者はエイズ発症を回避するために投薬治療を半永久的に継続する必要がある。このような長期にわたる投薬により、副作用や薬剤耐性株出現に結び付くだけでなく、医療費高騰の問題も生じている。例えば脂質代謝異常、糖代謝異常などは、それぞれ NNRTI および PI、あるいは NRTI や PI の服用に関連すると考えられている副作用であり、近年では初期の抗 HIV 薬に比べてより副作用の少ない薬剤が開発されているとはいえ、長期毒性が未だ不明なものも多い<sup>6),7),8)</sup>。さらに近年、長期投薬 HIV 感染者において心血管障害や骨粗鬆症などの発生率が健常者に比べて高いことが報告されている<sup>9),10)</sup>。これらの中には抗 HIV

薬の副作用によるものも含まれているとは考えられているが、投薬下における検出限界以下のレベルでの HIV 複製に基づく上記のような非エイズ疾患の促進機序が示唆されており、HIV 感染者の予後への関与という視点に加え、さらなる医療費高騰にも直結するという視点においても大きな問題となっている<sup>11)</sup>。こうした種々の問題から、投薬下の HIV 複製抑制をより安定なものとする治療法、さらには抗 HIV 薬継続を不要とする治癒に結びつける治療法の開発が望まれている。

抗 HIV 薬による HIV 感染症の治療について研究が進められる一方、宿主免疫応答、特にウイルス感染後に誘導される獲得免疫応答の HIV 感染症への関与についても研究がなされてきている。獲得免疫応答において、液性免疫の中心的エフェクターは抗体であり、細胞性免疫の中心的エフェクターは細胞傷害性 T リンパ球（CD8 陽性 T 細胞）である。前者の抗体のうち、ウイルス粒子上の抗原に結合して感染を阻止する抗体を中和抗体と呼ぶが、インフルエンザウイルスなど多くのウイルス感染症において、中和抗体はウイルス複製抑制に重要な役割を担い、その誘導によってウイルス複製の制御に至ることが知られている。しかし HIV 感染症においては、一般的に中和抗体が産生されにくいことが報告されており、このことは、慢性持続感染成立の一因となっている可能性がある<sup>12), 13), 14), 15)</sup>。サルエイズモデルにおいて、ウイルス曝露前の中和抗体受動免疫が感染成立阻止に結び付く結果が得られたことから、中和抗体誘導は予防 HIV ワクチン開発における重要戦略の一つである<sup>16), 17), 18)</sup>。一方、感染成立後の受動免疫実験では、近年、極めて中和能の高い抗体を用いた実験で効果が認めら

れているものの、持続的なウイルス複製阻止には至っておらず、現状では中和抗体投与のみによる治癒は困難と考えられている<sup>19), 20), 21), 22)</sup>。

一方、HIV 感染症における細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞反応については、HIV 感染者の感染急性期の解析結果や、サルエイズモデルにおける CD8 陽性細胞枯渇実験の結果から、ウイルス複製抑制に中心的な役割を担っていることが示されている<sup>23), 24), 25), 26), 27), 28)</sup>。しかし、一般の HIV 感染症においては、CD8 陽性 T 細胞によってもウイルス複製は充分には制御されず慢性持続感染が成立する。この強い CD8 陽性 T 細胞による抑制圧のもと、その認識を逃れる逃避変異を有するウイルスの選択が頻繁に認められ、感染慢性期には持続的な抗原刺激に基づく HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の消耗が生じることも知られている<sup>29), 30), 31), 32), 33), 34), 35), 36), 37)</sup>。抗 HIV 薬治療下でも、HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応がウイルス複製抑制に寄与していることを示す結果が報告されているが、治療に基づくウイルス複製制御により抗原量が減少するため、HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応レベルが低下することも知られている<sup>38), 39), 40), 41)</sup>。したがって、抗 HIV 薬治療下において CD8 陽性 T 細胞反応を誘導・増強することは、より安定なウイルス複製抑制をもたらすことが期待されるものの、そのような効果は未だ確認はされていない<sup>42), 43), 44)</sup>。

所属研究室では、ヒト HIV 感染症を最もよく反映する動物モデルと考えられているサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus; SIV) 感染サルエイズモデルを用いた研究を行ってきた。このサルエイズモデルにおいてもヒト HIV 感染症と同

様、慢性持続感染を呈し、ウイルス複製抑制に CD8 陽性 T 細胞反応が中心的役割を担っていることが知られている<sup>45), 46), 47), 48)</sup>。そこで本研究では、サルエイズモデルにおいて、抗 HIV 薬治療下でウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導することを試み、ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導効果について検討することとした。

ウイルス感染細胞では、発現されたウイルス抗原由来の 8-11 mer ペプチド (エピトープ) が、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) (ヒトではヒト白血球抗原[human leukocyte antigen; HLA]) クラス I 分子と結合して細胞表面に提示される。ウイルスエピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞は、そのエピトープ・MHC-I 複合体と T 細胞受容体との相互作用により感染細胞を特異的に認識する。MHC-I の遺伝子型は多様であることが知られており、その遺伝子型の違いは、CD8 陽性 T 細胞の標的の違いに基づくウイルス複製抑制能の違いに結びつく可能性が考えられている。HIV・SIV 感染症では、MHC-I の遺伝子型が病態進行に大きく影響することが知られており、その多くは CD8 陽性 T 細胞のウイルス複製抑制能の違いによるものと考えられている。例えば、HLA-B\*51:01 や HLA-B\*57:01 を有する HIV 感染者では、病態進行が遅れることが知られており、これら HLA 拘束性エピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の病態進行抑制への寄与が示されている<sup>49), 50), 51), 52), 53), 54)</sup>。また、SIV 感染サルエイズモデルでは、アカゲサルの Mamu-A\*01 や Mamu-B\*08 などの MHC-I 遺伝子型が病態進行の遅延に関連することが明らかにされている<sup>47), 55), 56), 57), 58)</sup>。一方、HLA-B\*18:01 や HLA-B\*35:02/35:03 を有する HIV 感染者は、これらを有していない感

染者と比較して有意に高い血中ウイルス量ならびに早い病態進行を示すことが知られている<sup>59), 60), 61)</sup>。したがって、SIV 感染サルエイズモデルにおける CD8 陽性 T 細胞反応誘導効果の検討においても、MHC-I 遺伝子型に留意した解析が必要である。所属研究室では、MHC-I ハプロタイプを共有する複数のビルマ産アカゲサル群を用いた SIV 感染エイズモデルを樹立していることから、本研究では、これらのうち MHC-I ハプロタイプ *90-120-Ie* (E)、*89-075-Iw* (W) あるいは *91-010-Is* (S) を共有する群を用いて検討した (表 1)。

HIV・SIV のゲノムは、構造蛋白質である Gag、Pol および Env、調節蛋白質である Tat および Rev、アクセサリ蛋白質である Vif、Nefなどをそれぞれコードする遺伝子を有している (図 1B)。これまでの研究から、Gag 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を示す群では反応を示さない群に比べて有意に血中ウイルス量が低いという報告や、Gag エピトープを標的とする CD8 陽性 T 細胞が高いウイルス複製抑制能を持つという報告などがなされており、HIV・SIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の中でも Gag 抗原を標的とする CD8 陽性 T 細胞は HIV・SIV 複製抑制への寄与が大きいことが示されてきた<sup>62), 63), 64), 65), 66)</sup>。また、Vif 抗原を標的とする CD8 陽性 T 細胞の SIV の複製抑制への寄与を示唆する報告もある<sup>67)</sup>。

これまでに所属研究室ではサルエイズモデルにおいて、SIV 抗原発現センダイウイルスベクターを用いた予防エイズワクチン開発を目指した研究を進めてきた。SIV 感染前のサルに対して予防ワクチンとして SIV 抗原発現センダイウイルスベクターを

接種し、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の誘導効果について解析した結果、高い CD8 陽性 T 細胞反応の誘導効果と、ベクター接種によって誘導された Gag あるいは Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が SIV 曝露後のウイルス複製抑制に寄与しうることを示した<sup>48), 66), 67)</sup>。しかし SIV 曝露後のセンダイウイルスベクター接種による CD8 陽性 T 細胞反応誘導効果については、予防ワクチン接種とは異なると考えられる。SIV 感染サルでは、既に SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞メモリーが誘導されており、また、MHC-I の遺伝子型によって抗原優位性が異なるため、SIV 感染後 Gag や Vif 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導するものがある一方で、その他の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導するものも存在する。このように、SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞のプライミングがなされている状況でのベクター接種がどのような免疫を誘導することができるか、またベクター接種後の CD8 陽性細胞のウイルス複製抑制能がどのように変化するかということは不明であった。そこで本研究では、抗 HIV 薬治療下において、Gag および Vif を標的抗原とする CD8 陽性 T 細胞反応の誘導効果を検討した。サルエイズモデルにおいて抗 HIV 薬治療下で SIV Gag 発現・Vif 発現センダイウイルスベクターの接種を行い、CD8 陽性 T 細胞反応の抗原優位性を変えうること、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を増強しうること、そして SIV 複製抑制能が Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度と相関を示すという結果を得た。これらの結果から、投薬下の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導は CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の増強に寄与しうることを示された。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 動物実験

全ての動物実験は、京都大学ウイルス研究所において、京都大学ウイルス研究所および国立感染症研究所の動物実験委員会の承認のもと、京都大学ウイルス研究所三浦智行准教授らにより実施された。血液採取、ウイルスチャレンジおよびワクチン・抗体接種はケタミン麻酔下で行われた。

MHC-I ハプロタイプ *90-120-Ie* (E)、*89-075-Iw* (W) あるいは *91-010-Is* (S) を共有するビルマ産アカゲサル 12 頭 (E 陽性サル 6 頭 [R-501、R-510、R-514、R-522、R-529、R-532]、W 陽性サル 4 頭 [R-499、R-511、R-518、R-528]、S 陽性サル 2 頭 [R-512、R-533]) を用いた (表 1・図 2A)。MHC-I ハプロタイプは、東京医科歯科大学難治疾患研究所木村彰方教授らにより決定された<sup>48), 69)</sup>。これら 12 頭のサルに、1,000 TCID<sub>50</sub> の SIVmac239 を経静脈接種した。感染後 12 週目より 32 週目まで、図 2B に示す 3 種類の抗 HIV 薬 (ジドブジン/ラミブジン [AZT/3TC]、テノホビル [TDF]、ロピナビル/リトナビル [LPV/r]) を含む飼料を投与した。MHC-I ハプロタイプ E 陽性サル 3 頭 (R-514、R-529、R-532)、W 陽性サル 2 頭 (R-518、R-528)、S 陽性サル 1 頭 (R-533) (治療ワクチン接種群) には、感染後 26 週目に SIVmac239 Gag あるいは Vif を発現するセンダイウイルスベクター (SeV-Gag・SeV-Vif) を治療ワクチンとして、それぞれ  $6 \times 10^9$  CIU 経鼻接種した。各 SeV ベクターはディナベック株式会社より供与され

たものである。感染後32週目には、治療ワクチン接種群の6頭に再びSeV-Gag・SeV-Vifを経鼻接種し、その2日後にワクチン接種を行っていない残りの6頭（治療ワクチン非接種群）を含めた全頭の抗HIV薬投与を中止した。治療ワクチン接種群の6頭および非接種群のうちの2頭（R-501、R-499）には、投薬中止の2日前および4日後に、抗SIVmac239中和活性を示した感染サル慢性期の血漿より精製したポリクローナルIgG 172mgを経静脈接種した。

## 2-2. 抗HIV薬含有飼料の作製

抗HIV薬含有試料の作製にあたっては、先行研究および事前の実験を参考に各薬剤の投与量・投与回数を決定した<sup>70)</sup>。一日あたりの各薬剤の投与量は、NRTIの2剤（AZT/3TC、TDF）は日本人成人投与量の1/4量（コンビビル[GlaxoSmithKline]としてAZT 600 mg、3TC 300 mg、ビリアード[日本たばこ]としてTDF 300 mg）、PIの1剤（LPV/r）は日本人成人投与量の1/2量（カレトラ[Abott]としてLPV 800 mg、RTV 200 mg）とした。コンビビル、ビリアード、カレトラの各錠剤を粉碎し、同じく粉碎した固形飼料（LabDiet 5048 [PMI Nutrition International]）35 gと混合し、バナナを加えて練って成型した（-30°Cで凍結保存）。

## 2-3. 末梢血単核球および血漿の分離

SIVmac239感染前より経時的に採取された血液を用いた。遠心分離法にて血漿分画、

buffy coat (緩衝層)、赤血球分画に分離し、上層の血漿分画を回収した。次いで buffy coat を回収し、Ficoll-Paque plus (GE Healthcare) を用いて密度勾配遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を分離、回収した。

#### 2-4. 血漿中ウイルス量の定量

血漿中ウイルス量は SIVmac239 gag 領域特異的プライマーを用いた RT-PCR による end-point determination により定量した<sup>71)</sup>。分離した血漿分画から、High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics) を用いてウイルス RNA を抽出し、5 倍希釈による段階希釈を行って、逆転写反応、nested PCR 法により cDNA 増幅のエンドポイントを決定した。PCR には SIVmac239 gag 領域に相補的なプライマーを用いた (逆転写反応および第一段階 PCR: 5'-<sup>1318</sup>AGA AAC TCC GTC TTG TCA GG<sup>1337</sup>-3' / 5'-<sup>1918</sup>TGA TAA TCT GCA TAG CCG C<sup>1900</sup>-3'、第二段階 PCR: 5'-<sup>1442</sup>GAT TAG CAG AAA GCC TGT TGG<sup>1462</sup>-3' / 5'-<sup>1852</sup>TGC AAC CTT CTG ACA GTG C<sup>1834</sup>-3')。スタンダードを利用し、陽性率から Reed-Muench 法によって血漿中ウイルス RNA コピー数を算出した。なお、RNA 検出限界値は約  $4 \times 10^2$  RNA コピー数/ml であった。

#### 2-5. SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度の測定

SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度の解析には、分離した PBMC 中の SIV ペプチド抗原刺激特異的に IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞数を、フローサイトメトリーを

用いて検出することで測定した<sup>72)</sup>。各個体の PBMC に herpesvirus papio を感染させ、不死化した自家 B リンパ芽球細胞株 (B lymphoblastoid cell line; B-LCL) を樹立し、抗原刺激のための抗原提示細胞に用いた。SIVmac239 各抗原 (Gag、Pol、Vif、Vpx、Vpr、Env、Tat、Rev、Nef) のオーバーラッピングペプチドプールを用いて抗原ごとに B-LCL を刺激した。各ペプチドは 15~22 アミノ酸残基からなる。ペプチドを抗原ごと (Gag、Pol、Env は N 末端側と C 末端側の 2 つに分割した) に混合してペプチドプールを作製し、これを刺激に用いた。ネガティブコントロールには抗原刺激を行っていない B-LCL を用いた。抗原刺激を行った B-LCL と PBMC を Golgi Stop (Becton Dickinson) および 20 U/ml インターロイキン-2 (IL-2、Roche Diagnostics) 存在下で、37°C で 6 時間共培養した。共培養終了後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD4 抗体 (clone M-T477、Becton Dickinson)、allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD3 抗体 (clone SP34-2、Becton Dickinson)、peridinin-chlorophyl protein (PerCP) 標識抗ヒト CD8 抗体 (clone SK1、Becton Dickinson) により表面染色を行った。次いで Cytotfix-Cytoperm Kit (Becton Dickinson) を用いて細胞の固定および膜透過処理を行った後、phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト IFN- $\gamma$  抗体 (clone 4S.B3、BioLegend) を用いて細胞内サイトカイン染色 (intracellular cytokine staining; ICS) を行った。FACS Canto II フローサイトメーター (Becton Dickinson) により測定し、FlowJo software version 9.2 を用いて解析した。各ペプチド抗原特異的刺激後の IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞頻度から、抗原刺激を行っていない B-LCL との共培養後の IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞頻度を差し

引いて、各抗原特異的 CD8 陽性細胞頻度を算出した。

## 2-6. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の測定

PBMC 由来 CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能については、SIV 感染サル PBMC 由来 CD8 陰性細胞との共培養を行い、培養上清中に含まれる SIV Gag CA (p27) 量を測定することにより解析した<sup>73)</sup>。SIV 感染後投薬前(感染後 10 週目[および 12 週目])、投薬下 (感染後 27 週目[および 28 週目])、投薬中止後 (感染後 34 週目[および 33 週目])の PBMC を用いた。それぞれ原則として 10 週目、27 週目あるいは 34 週目の PBMC のみを用い、細胞数が不足した場合には 12 週目、28 週目あるいは 33 週目の PBMC を加えた。各 PBMC を Macs ヒト CD8 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて磁気標識した後、セパレーターへ設置した MS カラム (Miltenyi Biotec) へ通した。カラムを複数回洗浄した後セパレーターから外し、磁気標識されていた CD8 陽性細胞分画を溶出した。また、セパレーター設置時の溶出液をさらに LD カラム (Miltenyi Biotec) へ通し、磁気標識されていない CD8 陰性細胞分画を溶出した。分離した CD8 陰性細胞分画は PHA-L、20 U/ml IL-2 存在下で、CD8 陽性細胞分画は 20 U/ml IL-2 存在下でそれぞれ 2 日間培養した。その後 CD8 陽性細胞  $5 \times 10^4$  個と CD8 陰性細胞  $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$  個の共培養を IL-2 20 U/ml 存在下で行った。共培養にあたっては CD8 陰性細胞から産生されるウイルス量が過剰、あるいは過少とならないように CD8 陽性細胞に対する CD8 陰性細胞の割合を変えることとし、各 CD8 陰性細胞の由来する週におけ

る血漿中ウイルス量を踏まえて、ウイルス量が  $10^5$  コピー数/ml 以上のものは  $5 \times 10^4$  個あるいは  $1 \times 10^5$  個の CD8 陰性細胞を用い、ウイルス量が  $10^5$  コピー数/ml 未満のものは  $2 \times 10^5$  個の CD8 陰性細胞を用いた。培養開始後 4、6、8 日後の培養上清を回収し、上清中のウイルス量を測定した。上清中のウイルス量の測定においては、まず逆転写活性の測定を行って培養上清中のウイルス量のピークの時期を確認し、それから SIV Gag CA (p27) 量の測定を行った。前者については、放射性同位体 Thymidine 5'-triphosphate ( $\alpha$ - $^{32}$ P、PerkinElmer) を用いて上清中の SIV に  $\alpha$ - $^{32}$ P を逆転写反応過程で取り込ませ、培養上清の放射活性をシンチレーションカウンターによって測定した (RT assay)<sup>74)</sup>。後者の p27 量の定量には、SIV p27 Antigen Capture Assay ELISA (ABL) を用いた。CD8 陽性細胞存在下の培養上清中 p27 量 (p27[E+]) および CD8 陽性細胞非存在下での培養上清中 p27 量 (p27[E-]) をもとに CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能 (reduction fold = p27[E-]/p27[E+]) を算出した。

## 2-7. 血漿中および培養上清中 SIV ゲノムの塩基配列の解析

SIV ゲノムの塩基配列は、血漿もしくは SIV 複製抑制能測定時の細胞培養上清より抽出したウイルス RNA をテンプレートとして nested RT-PCR にて cDNA を増幅後、dye terminator 法を用いて解析した。PCR に用いたプライマーは SIVmac239 ゲノムの抗原コード領域全長を 5 つの領域に分けるよう設計されたものであり、gag 領域および vif 領域の塩基配列の解析のため、それぞれ SIVmac239 ゲノム (GenBank accession

number: M33262) の 1,231~2,958 番および 4,829~7,000 番の塩基配列を増幅するものを使用した。精製した PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いて標識し、DNA シークエンサーABI3500 にて配列を解析した。シーケンスデータの波形を元に野生型と変異型の存在比を求め、変異型の存在比率が野生型の 1/2 倍以上のものと 2 倍以上のものを各々示した。

## 2-8. 統計解析

統計解析には GraphPad Prism ver. 6.0d を用いた。ウイルス複製抑制能と CD8 陽性 T 細胞頻度との相関など、相関解析には Spearman test を用いた。

### 3. 結果

#### 3-1. SIV 感染後の血漿中ウイルス量の解析

12 頭のビルマ産アカゲサル（MHC-I ハプロタイプ E 陽性サル 6 頭、W 陽性サル 4 頭、S 陽性サル 2 頭）に SIVmac239 を経静脈接種し、接種後 12 週目から 32 週目まで抗 HIV 薬を投与した（図 2）。治療ワクチン接種群 6 頭（E 陽性サル 3 頭、W 陽性サル 2 頭、S 陽性サル 1 頭）には、感染後 26 週目と 32 週目に SIV Gag 発現センダイウイルス（SeV-Gag）ベクターおよび Vif 発現センダイウイルス（SeV-Vif）ベクターを治療ワクチンとして経鼻接種した。

SIV 感染後の血漿中ウイルス量の推移を図 3 に示す。全 12 頭で、SIV 慢性持続感染が成立し、12 週目の投薬開始以降はウイルス量の低下が確認された。治療ワクチン非接種群の 1 頭（R-501）では、投薬下で血漿中ウイルス量は低下したものの検出下限（400 コピー/ml）を下回らなかった。32 週目に投薬を中止した後、全 12 頭でウイルス血症の再出現が認められた。非接種群の投薬中止後のウイルス量は投薬前と同等であったが、治療ワクチン接種群では 6 頭中 2 頭（R-529, R-518）の投薬中止後のウイルス量が低値を示した。また、非接種群のうち中和抗体の受動免疫を行った 2 個体（R-501、R-499）の投薬中止後のウイルス量は、他の非接種群と比較して特に違いは認められなかった。

### 3-2. SIV 各抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の解析

投薬下の治療ワクチン接種による CD8 陽性 T 細胞反応誘導を調べる目的で、SIV 感染後投薬開始前（感染後 2・6 週目、12 週目）、投薬下（感染後 26 週目）、ワクチン接種後（感染後 27 週目、32 週目）、投薬中止後（感染後 34 週目、38 週目）の SIV 各抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を、overlapping peptide pool を抗原刺激に用いた ICS 法により解析した。図 4 には治療ワクチン非接種群における CD8 陽性 T 細胞反応を、図 5 には治療ワクチン接種群における CD8 陽性 T 細胞反応をそれぞれ示す。SIV 感染後投薬開始前には、非接種群・接種群のいずれにおいても、MHC-I ハプロタイプ E 陽性サルでは Nef 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が優位に誘導され、MHC-I ハプロタイプ W あるいは S 陽性サルでは Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が優位に誘導されていた。

治療ワクチン非接種群では、投薬開始後 CD8 陽性 T 細胞頻度は低下し(26-32 週目)、32 週目の投薬中止後には再び CD8 陽性 T 細胞反応が認められた (34・38 週目)。投薬中止後の抗原優位性は投薬開始前と変わらず、E 陽性サルでは Nef 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応、W/S 陽性サルでは Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応がそれぞれ優位に誘導されていた。一方、治療ワクチン接種群では、感染後 26 週目においては非接種群と同様に CD8 陽性 T 細胞反応の低下が確認されたが、1 度目の治療ワクチン (SeV-Gag・SeV-Vif) 接種後である感染後 27 週目では、E 陽性サルおよび W/S 陽性サルのいずれにおいても Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の誘導が認められ、特

に W/S 陽性サルでは投薬開始前の反応に比べて高い反応が認められた。感染後 32 週目に 2 度目のワクチン接種を行ってから投薬を中止したところ、感染後 34 週目・38 週目のいずれにおいても、Gag/Vif 以外の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応も認められたが、R-514 を除くすべての個体で Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が引き続き優位に誘導されていた。このことから、いずれの MHC-I ハプロタイプを有する群においても、投薬下の治療ワクチン接種によって Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導しうることが示された。

### 3-3. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の解析

投薬下の治療ワクチン接種が各個体の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能に及ぼす効果を調べる目的で、*in vitro* viral suppression assay (VSA)を行って、投薬前・投薬下および投薬中止後における CD8 陽性細胞のウイルス複製抑制能を調べた (図 6)。SIV 感染後 10 週目、27 週目、34 週目の末梢血より分離した PBMC を、抗 CD8 抗体磁気ビーズを用いて CD8 陽性細胞分画 (エフェクター細胞[E]) と CD8 陰性細胞分画 (標的細胞[T]) に分離した。SIV 感染後、各個体内においては CD8 陽性 T 細胞反応を中心とする免疫応答によって SIV ゲノムに変異が生じていると考えられることから、野生型 SIV ではなく、投薬開始前の PBMC 由来の CD8 陰性細胞 (標的細胞) 培養により産生される SIV あるいは投薬終了後の PBMC 由来の CD8 陰性細胞 (標的細胞) 培養により産生される SIV の複製抑制能の検討を行うこととした (図 6A)。図 6B には

各標的細胞とエフェクター細胞の共培養の組み合わせを示す。投薬開始前の感染後 10 週目の標的細胞を  $SIV_{pre}$  産生細胞、投薬中止後の感染後 34 週目の標的細胞を  $SIV_{post}$  産生細胞とし、投薬前、投薬下（感染後 27 週目）および投薬中止後のそれぞれのエフェクター細胞（投薬前： $E_{pre}$ 、投薬下： $E_{art}$ 、投薬中止後： $E_{post}$ ）と共培養を行った。

図 7 には、標的細胞を  $SIV_{pre}$  産生細胞とした時の各個体の培養上清中 p27 定量結果（左）および各エフェクター細胞の SIV 複製抑制能（右）を示す。まず、全頭においてエフェクター細胞非存在下での SIV 産生を確認した。続いて各エフェクター細胞存在下での p27 量 ( $p27[E+]$ ) を、エフェクター非存在下での p27 量 ( $p27[E-]$ ) と比較し、各エフェクター細胞の  $SIV_{pre}$  複製抑制能 ( $\text{reduction fold} = p27[E-]/p27[E+]$ ) を求めて比較した。非接種群の投薬前 CD8 陽性細胞  $E_{pre}$  と投薬中 CD8 陽性細胞  $E_{art}$  の  $SIV_{pre}$  複製抑制能を比較したところ、いずれの個体でも  $E_{art}$  の  $SIV_{pre}$  複製抑制能は  $E_{pre}$  以下であった。一方、治療ワクチン接種群の  $E_{pre}$  と  $E_{art}$  の  $SIV_{pre}$  複製抑制能を比較したところ、6 頭中 4 頭 (R-529, R-532, R-518, R-533) で  $E_{art}$  の  $SIV_{pre}$  複製抑制能は  $E_{pre}$  に比べて上昇していた。このことから、投薬下の治療ワクチン接種によって CD8 陽性細胞の  $SIV_{pre}$  複製抑制能は増強されることが示された。次に、投薬前 CD8 陽性細胞  $E_{pre}$  と投薬中止後 CD8 陽性細胞  $E_{post}$  の  $SIV_{pre}$  複製抑制能を比較したところ、治療ワクチン接種群と非接種群の大部分で、 $E_{post}$  は  $E_{pre}$  より高い  $SIV_{pre}$  複製抑制能を示した。この結果は、投薬中止後ウイルス複製が再開されたことによる SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応増強を反映していると考えられた。

投薬中止後の SIV ( $SIV_{post}$ ) 産生細胞を標的細胞とした共培養の上清中 p27 量および各エフェクター細胞の  $SIV_{post}$  複製抑制能を図 8 に示す。まず、全頭においてエフェクター細胞非存在下での SIV 産生を確認した。続いて、投薬前 CD8 陽性細胞  $E_{pre}$  と投薬中 CD8 陽性細胞  $E_{art}$  の  $SIV_{post}$  複製抑制能を比較したところ、非接種群では、 $SIV_{pre}$  複製抑制能と同様、 $E_{art}$  の  $SIV_{post}$  複製抑制能は  $E_{pre}$  に比べて低下していた。一方、治療ワクチン接種群では、 $E_{art}$  の  $SIV_{post}$  複製抑制能は  $E_{pre}$  と比べて 6 頭中 4 頭 (R-529, R-532, R-518, R-533) で上昇していた。このことから、投薬下の治療ワクチン接種による CD8 陽性細胞の  $SIV_{post}$  複製抑制能の増強効果が確認された。また、投薬前 CD8 陽性細胞  $E_{pre}$  と投薬中止後 CD8 陽性細胞  $E_{post}$  の  $SIV_{post}$  複製抑制能を比較したところ、 $SIV_{pre}$  複製抑制能と同様、 $E_{post}$  の  $SIV_{post}$  複製抑制能は  $E_{pre}$  に比べて上昇していた。

#### 3-4. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関解析

治療ワクチン接種群に関して、VSA により測定した CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と *in vivo* での抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応との関連を調べる目的で、感染後 27 週目の CD8 陽性細胞  $E_{art}$  あるいは感染後 34 週目の CD8 陽性細胞  $E_{post}$  の SIV 複製抑制能と、感染後 27 週目あるいは 34 週目における Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応頻度との相関解析を行った。なお、非接種群については、投薬中の 27 週目には Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応がほとんど検出感度以下であり、解析を行わなかった。投薬下治療ワクチン接種後の感染後 27 週目の CD8 陽性細胞 ( $E_{art}$ ) の  $SIV_{pre}$  複製抑制

能は、27 週目の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度と正の相関を示したが、Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関は示さなかった (図 9)。一方、感染後 27 週目の CD8 陽性細胞 ( $E_{art}$ ) の  $SIV_{post}$  複製抑制能については、Gag および Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度のいずれとも相関を示さなかった (図 9)。

治療ワクチン接種群の投薬中止後の感染後 34 週目における CD8 陽性細胞 ( $E_{post}$ ) の  $SIV_{pre}$  複製抑制能については、34 週目の Gag および Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度のいずれとの間にも相関は認められなかった (図 10)。一方、34 週目の CD8 陽性細胞 ( $E_{post}$ ) の  $SIV_{post}$  複製抑制能については、34 週目の Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関は示さなかったものの、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度と正の相関を示した (図 10)。

以上のように、治療ワクチン接種群では、投薬下の治療ワクチン接種後の感染後 27 週目の CD8 陽性細胞 ( $E_{art}$ ) の  $SIV_{pre}$  複製抑制能と Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関、ならびに投薬終了後の感染後 34 週目の CD8 陽性細胞 ( $E_{post}$ ) の  $SIV_{post}$  複製抑制能と Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関が認められた。これらの結果は、治療ワクチン接種による Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導が CD8 陽性細胞の  $SIV$  複製抑制能の増強に寄与することを示唆するものである。

### 3-5. CD8 陽性細胞の $SIV$ 複製抑制能と投薬中止後の血漿中ウイルス量との相関解析

さらに、治療ワクチン接種群の感染後 27 週目あるいは 34 週目の CD8 陽性細胞の

SIV 複製抑制能と、投薬中止後の感染後 36 週目の血漿中ウイルス量との関連を検討した。投薬下治療ワクチン接種後の感染後 27 週目 CD8 陽性細胞 ( $E_{art}$ ) および投薬中止後の感染後 34 週目 CD8 陽性細胞 ( $E_{post}$ ) の投薬前  $SIV_{pre}$  に対する複製抑制能については、血漿中ウイルス量との間に相関は認められなかった (図 11)。一方、これらの CD8 陽性細胞の投薬中止後  $SIV_{post}$  に対する複製抑制能について解析したところ、 $E_{art} \cdot E_{post}$  のいずれの  $SIV_{post}$  複製抑制能も、投薬中止後の感染後 36 週目の血漿中ウイルス量との間に逆相関を示した (図 11)。この結果は、治療ワクチン接種後の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制への寄与を示唆している。

### 3-6. 血漿中および VSA 培養上清中に含まれる SIV ゲノム塩基配列の解析

SIV ゲノムにおける変異の選択はウイルス抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞によるウイルス複製抑制圧をある程度反映することから、各個体の投薬前あるいは投薬中止後の血漿由来 SIV ならびに VSA における  $SIV_{pre}$  産生細胞あるいは  $SIV_{post}$  産生細胞と CD8 陽性細胞との共培養の上清由来 SIV のゲノム *gag*・*vif* cDNA の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって解析した (図 12)。なお、サル R-529 の投薬中止後の標的細胞 ( $SIV_{post}$  産生細胞) と投薬下 CD8 陽性細胞 ( $E_{art}$ ) の共培養、およびサル R-518 の投薬中止後の標的細胞 ( $SIV_{post}$  産生細胞) と投薬下・投薬中止後 CD8 陽性細胞 ( $E_{art} \cdot E_{post}$ ) の共培養では、SIV 複製がほぼ完全に阻止されていたと考えられ、共培養上清からの SIV ゲノム cDNA 増幅ができなかった。図 13-1 に非接種群のうち MHC-I ハブ

ロタイプ E 陽性サル (R-510、R-522、R-501)、図 13-2 に非接種群のうち MHC-I ハプロタイプ W/S 陽性サル (R-511、R-499、R-512)、図 13-3 に治療ワクチン接種群のうち MHC-I ハプロタイプ E 陽性サル (R-514、R-529、R-532)、図 13-4 に治療ワクチン接種群のうち MHC-I ハプロタイプ W/S 陽性サル (R-518、R-528、R-533) の解析結果を示す。

まず各個体の血漿由来 SIV ゲノム cDNA について、共有する MHC-I ハプロタイプごとに比較した。MHC-I ハプロタイプ E 陽性サルでは、*gag* に変異が確認されたものは、R-510 と R-522 の 2 頭のみであり、他の E 陽性サルの血漿中ウイルスゲノムにはアミノ酸置換を伴う変異は確認されなかった (図 13-1、図 13-3)。また、*vif* については、R-510、R-522、R-514 の 3 頭でアミノ酸置換を伴う変異が確認された。これらの結果は、Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が優位には誘導されない E 陽性サルにおいて、*gag*・*vif* には逃避変異の選択が生じにくいことを反映していると考えうる。*vif* の変異のうち、175 番目のアミノ酸置換を生ずる変異が R-510 と R-514 に共通して認められたが、この他には複数の個体に共通して存在するアミノ酸置換は認められず、MHC-I ハプロタイプ E 由来 MHC-I 関連変異と推定されるものは認められなかった。

MHC-I ハプロタイプ W/S 陽性サルでは、*gag* の変異は 6 頭中 R-518、R-528 を除く 4 頭、*vif* の変異は全頭で確認された (図 13-2、図 13-4)。特に、W 陽性サルでは R-518 を除く 3 頭で Vif 66 番目のアミノ酸置換が認められ、S 陽性サルでは R-512 と R-533 の両方で Gag 28 番目のアミノ酸置換と Vif 115 番目のアミノ酸置換にいたる変異が選

扱われていた。これらは、それぞれ MHC-I ハプロタイプ W あるいは S 由来の MHC-I 関連変異である可能性が考えられる。

サル R-533 の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能は、標的の違いによって大きく異なっており、SIV<sub>pre</sub> に対しては高い複製抑制能を示したものの、SIV<sub>post</sub> に対する複製抑制能は大きく低下していた。(図 7B、図 8B)。このサルの VSA 培養上清由来 SIV cDNA の塩基配列解析では、Gag 28 番目のアミノ酸置換を生ずる変異が、SIV<sub>pre</sub> では投薬中止後の CD8 陽性細胞 (E<sub>post</sub>) 共培養時にしか認められないのに対し、SIV<sub>post</sub> においては CD8 陽性細胞非存在下で既に存在していた。感染後 34 週目には、血漿中ウイルスゲノムにこの変異は認められず、血漿中ウイルス量は  $10^4$  コピー数/ml 程度であったが、感染後 38 週目では、血漿中ウイルスゲノムにこの変異が選択されており、血漿中ウイルス量は  $10^6$  コピー数/ml 程度まで上昇していた (図 3)。前述のように、この変異はもう一頭の MHC-I ハプロタイプ S 陽性サル R-512 でも選択されており、S 由来 MHC-I 関連変異である可能性が考えられる。以上の結果より、サル R-533 では Gag 28 番目アミノ酸をエピトープに含む抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞が高い SIV<sub>pre</sub> 複製抑制能に寄与し、Gag 28 番目アミノ酸置換に結びつく変異が選択されていない感染後 34 週目では血漿中ウイルス量が比較的低値に留まったものの、この変異が選択された後、血漿中ウイルス量の上昇に至った可能性が考えられる。

## 4. 考察

HIV 感染症において、抗 HIV 薬治療は血漿中のウイルスを検出限界以下に抑えることが可能である一方、ウイルスを完全に排除することはできず、検出できないレベルでの HIV 複製が持続していると考えられ、ART 下の HIV 複製制御をより安定化することが求められている。HIV 感染症において宿主免疫応答による複製抑制に中心的役割を担っている CD8 陽性 T 細胞反応は、抗 HIV 薬治療下ではウイルス抗原が減少するために低下する。そこで本研究では、投薬下の治療ワクチン接種によって CD8 陽性 T 細胞反応を誘導することでどのような効果が認められるかについて、サルエイズモデルを用いて検討を行った。投薬下で治療ワクチン SIV Gag 発現・Vif 発現セグメントウイルス (SeV) ベクター接種を行い、投薬開始前の抗原優位性によらず Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導し、CD8 陽性 T 細胞反応の抗原優位性を変えうることを明らかにした。また、投薬下の治療ワクチン接種によって CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を増強しうることを示した。さらに CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能が Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度と相関していることを明らかにし、これらの結果から、投薬治療下の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導は、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の増強に寄与しうるということを示した。

所属研究室では SeV ベクターを用いた予防エイズワクチン開発の研究を進めており、これまでに SIV 感染前の SIV 抗原発現 SeV ベクター接種によって抗原特異的 CD8

陽性 T 細胞反応を誘導できることを明らかにしている。しかし、SIV 感染成立後、投薬下でウイルス複製が抑制されている状態における治療ワクチンとしての SeV ベクター接種効果については明らかとされていなかった。本研究では、SIVmac239 感染後、投薬開始前には、MHC-I ハプロタイプ E 陽性サルは Nef 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の優位な誘導を示し、W/S 陽性サルは Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の優位な誘導を示した。投薬開始後には、これらの CD8 陽性 T 細胞反応はいずれも低下した。治療ワクチン接種群では、投薬下の治療ワクチン接種後、Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が誘導され、投薬下の SeV ベクター接種によって抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導できることが確認された。さらに感染後 32 週目で治療ワクチン接種群に対して再びワクチンを接種するとともに投薬を中止したところ、非接種群・治療ワクチン接種群のいずれにおいても SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導・増強が確認された。非接種群では、投薬前と比べて CD8 陽性 T 細胞反応の抗原優位性に変化は認められなかった。一方、治療ワクチン接種群では、E 陽性サル・W/S 陽性サルのいずれでも Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が引き続き優位に誘導されており、特に E 陽性サルについては投薬下の治療ワクチン接種によって CD8 陽性 T 細胞反応の抗原優位性を変えうるということが明らかとなった。E 陽性サルでは元々 Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の誘導が優位には認められていなかったことから、E 陽性サルで治療ワクチン接種後に誘導された Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応は、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からプライムされたものが主であると考えられる。一方、

W/S 陽性サルでは投薬開始前より Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が優位に誘導されており、W/S 陽性サルで治療ワクチン接種後に誘導された Gag/Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応はメモリーCD8 陽性 T 細胞からの誘導が主であると考えられる。HIV 感染症においてはすべての HIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応がウイルス複製抑制に寄与するわけではなく、CD8 陽性 T 細胞は標的とする抗原エピトープによってウイルス複製抑制能が異なることから、特にワクチンによって抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を誘導する場合には、どのような抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を誘導できるかということが重要となる。本研究で示されたように、投薬下の治療ワクチン接種によって CD8 陽性 T 細胞反応の抗原優位性を変えうるということから、投薬下あるいは投薬中止後のウイルス複製抑制に向け、ワクチン抗原の最適化によって MHC-I 遺伝子型にかかわらず、より有効な CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導しうることが期待される。

各個体の血漿中ウイルス量を測定したところ、全ての個体で SIV 感染の成立と投薬開始後のウイルス量の低下を認めることができたが、12 頭中 4 頭では投薬下における検出限界以下のウイルス量 (400 コピー数/ml) の維持には至らなかった。本研究で用いた薬剤は HIV を標的とするものであることから、SIV に対して *in vivo* でどの程度作用するかということは厳密には明らかとなっていない。また、薬剤を粉碎し、固形飼料と混合したものを餌として投与したことから、薬剤血中濃度が一定に維持されていない可能性もある。

本研究では、投薬中止前の感染後 32 週に、治療ワクチン接種群の全 6 頭と、非接種群のうちの 2 頭に対して抗 SIVmac239 ポリクローナル中和抗体の受動免疫を行った。これは、治療ワクチン接種によって CD8 陽性 T 細胞反応の誘導と同時に活性化されうる SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞が SIV 感染標的となりうることを考慮し、その SIV 感染を防ぐことを主旨としたものである。投薬中止後は全 12 頭でウイルス血症の再出現が確認されたが、非接種群では中和抗体の受動免疫を行った個体 (R-501、R-499) と他の 4 頭にウイルス量の差は認められず、投薬中止後のウイルス複製への中和抗体受動免疫の影響は認められなかった。一方、治療ワクチン接種群のうち R-529 と R-518 の 2 頭は、投薬中止後のウイルス量が低値を維持していた。これら 2 頭と他の 4 個体の差を明らかにすることで、より安定なウイルス複製抑制に繋がる可能性が期待される。

本研究ではさらに、投薬下の治療ワクチン接種によって誘導された CD8 陽性 T 細胞がウイルス複製抑制に寄与しうる能力を有するかどうかを検討するため、VSA によって CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の評価を行った。VSA の標的には投薬前後の末梢血 PBMC より分離した CD8 陰性細胞から産生される SIV を用いた。標的 CD8 陰性細胞の何%が SIV を産生するのかということや産生される SIV の増殖能 (fitness) が、CD8 陽性細胞非存在下の標的 CD8 陰性細胞のウイルス産生量の差に繋がると考えられるが、本研究ではこれらの個体内における影響に留意した CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の評価につながりうる。この VSA によって CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能

の評価を行った結果、投薬下の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能は、非接種群においては投薬前の SIV 複製抑制能に比べて低下するが、治療ワクチン接種群では 6 頭中 4 頭で投薬前の SIV 複製抑制能と比べて増強されていることが確認された。この結果は、投薬下の治療ワクチン接種が CD8 陽性細胞のウイルス複製抑制能を増強しうることを示している。

治療ワクチン接種群では、投薬下の感染後 27 週目 CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と投薬中止後の感染後 34 週目 CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能は、それぞれ感染後 27 週目と 34 週目の Gag 特異的 CD8 陽性細胞頻度と相関していた。したがって、CD8 陽性細胞による SIV 複製抑制には、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が寄与していると考えられた。

Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応と CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関については、投薬下の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応と相関していたのは投薬前の SIV を標的とした複製抑制能であり、投薬中止後の SIV を標的とした複製抑制能は相関を示さなかった。また、投薬中止後の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応と相関していたのは投薬中止後の SIV を標的とした複製抑制能であり、同様に投薬前の SIV を標的とした複製抑制能は Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応頻度との間に相関を示さなかった。これらのことから、投薬前と投薬中止後で SIV ゲノムに変異が入ったか、ワクチン接種によって投薬下で誘導された CD8 陽性 T 細胞反応と、2 度目のワクチン接種によって投薬中止後に誘導された CD8 陽性 T 細胞反応が、エピトープレベルでの標的抗原

等、何らかの点において異なっていた可能性が考えられる。治療ワクチン接種群の投薬前感染後 12 週目と、投薬中止後感染後 33 週目から 35 週目にかけての血漿中 SIV ゲノムを比較すると、投薬前と投薬中止後でゲノムに大きな変化はどの個体でも認められなかった。一方で、投薬前、あるいは投薬中止後の SIV (SIV<sub>pre</sub>/SIV<sub>post</sub>) 産生細胞を標的とした VSA 培養上清由来 SIV のゲノムを比較すると、一部の個体では、SIV<sub>pre</sub> で認められる変異のうち、SIV<sub>post</sub> では認められなくなっている変異が存在した。同一の CD8 陽性細胞を用いておりながら、投薬前の SIV<sub>pre</sub> では CD8 陽性 T 細胞反応による複製抑制圧からの逃避が起きた一方で、投薬中止後の SIV<sub>post</sub> では CD8 陽性 T 細胞反応による複製抑制圧からの逃避が起きなかった可能性を示唆していると考えられる。ART 治療を行っている HIV 感染者体内で、HIV が CD8 陽性 T 細胞反応の抑制圧から逃避していることがこれまでに報告されていることを踏まえると、本研究では各サル個体において投薬下で宿主免疫応答によるウイルスへの複製抑制圧がかかり、結果としてゲノム解析において顕著に確認できる程度ではないものの投薬前後の SIV が異なったために、各 CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制の寄与がそれぞれ異なると推測される<sup>38), 39)</sup>。

投薬前の SIV に対する複製抑制能はウイルス量との間に相関を示さなかったが、投薬中止後の SIV に対する複製抑制能は感染後 36 週目の血漿中ウイルス量との間に逆相関を示した。CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能に Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が寄与していると考えられることから、投薬中止後のウイルス複製抑制には、治療ワク

チン接種によって誘導された Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が寄与している可能性が考えられる。

MHC-I ハプロタイプ W 陽性サルでは、Vif 66 番目のアミノ酸置換を生じる変異が W 由来 MHC-I 関連変異である可能性が高いが、この変異は R-518 を除く 3 個体では投薬開始前に既に選択されていた。一方、投薬中止後に低ウイルス量を示した R-518 では、Vif 66 番目のアミノ酸置換を生じる変異は選択されていなかった。また、MHC-I ハプロタイプ S 由来 MHC-I 関連変異の可能性のある Vif 125 番目のアミノ酸置換を生じる変異は、R-512 と R-533 のいずれの個体でも投薬開始前に選択されていた。これらの変異選択は、Vif を標的とする CD8 陽性 T 細胞のウイルス複製抑制能へ影響を及ぼしていると考えられる。特に R-518 では Vif 66 番目のアミノ酸置換を生じる変異が選択されておらず、投薬中止後の経過が比較的良好であったことから、Vif 66 番目アミノ酸を含むエピトープを標的抗原とする Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が誘導されており、R-518 では変異型ウイルスの選択が進んでいなかったために、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応と同時に Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応もウイルス複製抑制へ寄与した可能性が考えられる。このことは変異が選択されていない状態で投薬治療を開始し、ウイルス複製が抑制されている状態で有効な CD8 陽性 T 細胞反応を誘導することで、よりよい制御に結びつく可能性があることを示唆している。実際、ヒト HIV 感染症では、セットポイントは  $10^4$  コピー数/ml 程度であることが多く、本研究で用いたサルエイズモデルでのセットポイントに比べて 1 log 程度低いことから、同

時期に治療を開始した場合には、変異選択がより進んでいない可能性が考えられる。

したがって早期に抗 HIV 薬治療を開始し、治療下で有効な抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を誘導することは、治療下のウイルス複製抑制をより安定なものとすることに寄与しうることが期待される。

サルエイズモデルを用いた投薬治療下の治療ワクチン Gag 発現・Vif 発現 SeV ベクター接種によって、投薬開始前の抗原優位性に関わらずワクチン抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞反応を誘導しうることが明らかとなり、特に治療ワクチン接種によって誘導された Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応がウイルス複製抑制に寄与しうることが本研究から示唆された。投薬治療によって HIV 感染者の血漿中ウイルス量は検出限界以下に抑制されているが、なおウイルス複製は持続していると考えられることから、投薬下の治療ワクチン接種による HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の誘導によって、投薬下のウイルス複製をより安定に制御することが期待される。一方、本研究では、治療ワクチン接種群においても投薬中止後にウイルス血症の再出現が認められたことから、本研究の治療ワクチン接種による CD8 陽性 T 細胞反応誘導だけでは、投薬中止後のウイルス複製抑制には不十分であると考えられる。HIV 感染症の cure に向けては、CD8 陽性 T 細胞標的の最適化ならびに誘導効率の向上、さらには別の戦略との併用が必要かもしれないと考えている。今後、特に本研究において投薬中止後の血漿中ウイルス量が投薬前より低値を示した個体についてさらに解析を進め、ワクチン抗原の最適化や接種時期・回数の検討等を重ねることで、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞

反応誘導の最適化と、より安定な投薬下のウイルス複製制御法の構築や、投薬治療によらない治療法の開発へ結びつけることが期待される。

## 5. 総括

HIV 感染者における抗 HIV 薬治療下の CD8 陽性 T 細胞増強が HIV 複製抑制に寄与しうるかどうかを知る目的で、SIV 感染サルエイズモデルにおいて、抗 HIV 薬治療下の治療ワクチン接種による抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応誘導効果を解析した。その結果、投薬下の Gag 発現 SeV ベクターおよび Vif 発現 SeV ベクター接種によって、Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を優位に誘導・増強しうることを明らかにした。また、この優位な Gag・Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応は、投薬中止後も維持されることを確認した。一方、治療ワクチン接種によって CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を増強しうることを示された。治療ワクチン接種群では、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能は、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度と正の相関を示し、投薬中止後の血漿中ウイルス量と逆相関することが示されたことから、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導が SIV 複製抑制に寄与しうると思われた。投薬開始前および投薬中止後のウイルスゲノム cDNA の塩基配列解析からは、*gag* 変異が CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能低下に結びつく可能性が示唆された。本研究結果は、抗 HIV 薬治療下の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の増強が HIV 複製抑制に寄与しうることを示すものである。今後、抗原の最適化ならびに CD8 陽性 T 細胞反応誘導効率の向上により、抗 HIV 薬治療下の安定なウイルス複製制御法の構築に結び付くことが期待される。

## 6. 謝辞

本研究における動物実験は、京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センターにて実施されました。サル個体の MHC-I ハプロタイプ同定に関しては、東京医科歯科大学難治疾患研究所にて解析していただきました。また、センダイウイルスベクターの作製については、ディナベック株式会社にご協力いただきました。

本研究にご協力いただいた国立感染症研究所エイズ研究センターの松岡佐織先生、高原悠佑先生、武田明子先生、石井洋先生、京都大学ウイルス研究所の五十嵐樹彦先生、三浦智行先生、阪脇廣美先生、堀池麻里子先生、東京医科歯科大学の木村彰方先生、成瀬妙子先生、ディナベック株式会社の井上誠先生、飯田章博先生、原裕人先生、朱亜峰先生、長谷川護先生に心より感謝いたします。

最後に、修士課程より 5 年間にわたってご指導くださった、指導教員の俣野哲朗先生に篤く御礼申し上げます。

## 7. 図表

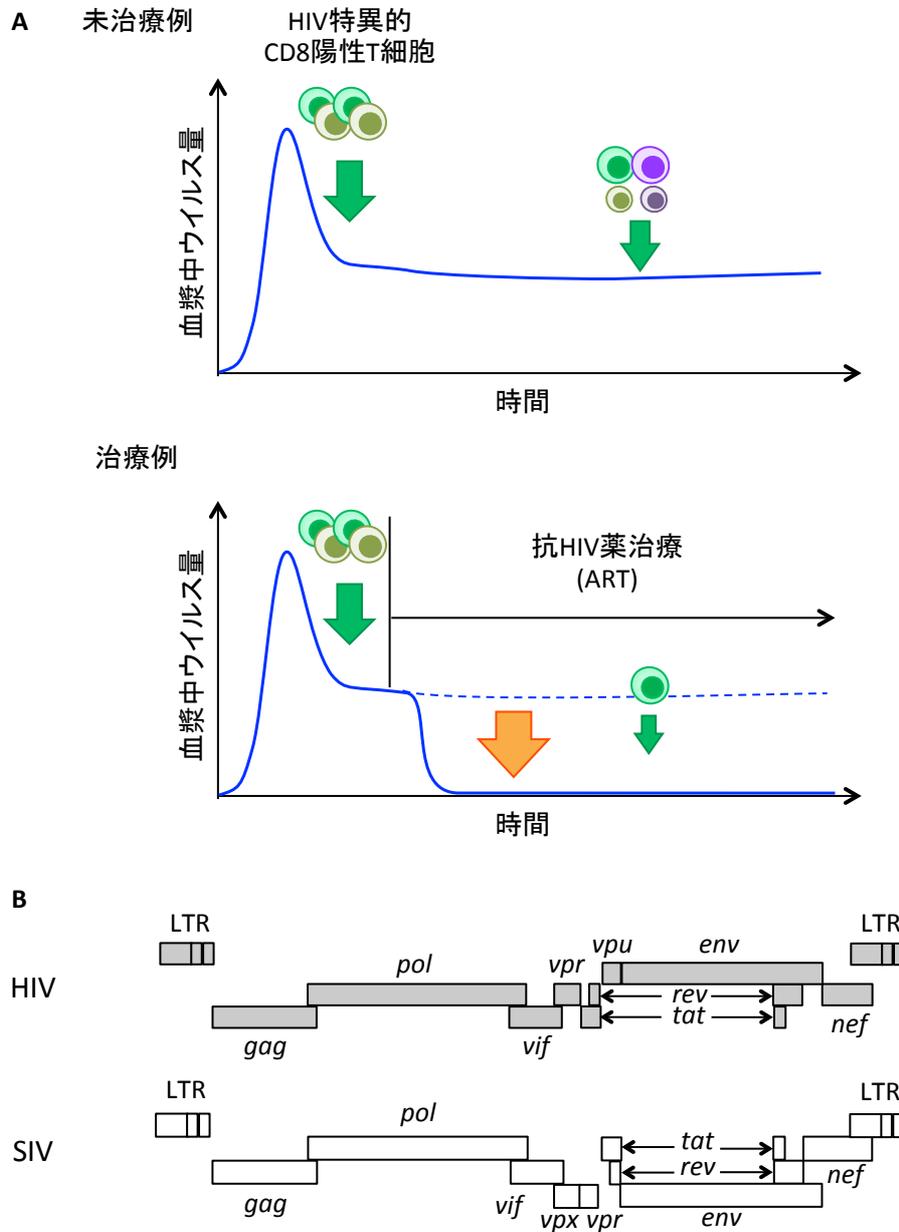


図 1. HIV 感染後の血中ウイルス量の変化と HIV/SIV のウイルスゲノム (シェーマ)

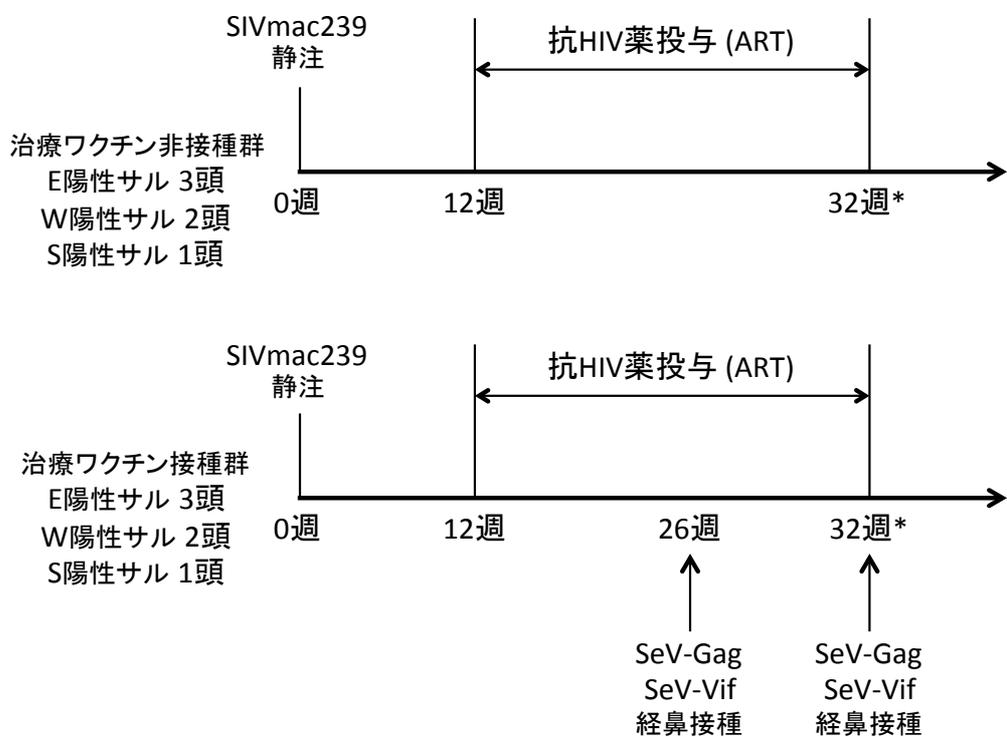
A. HIV 感染者の血漿中ウイルス量の変移を示す。未治療下では慢性持続感染を示す(上)。抗 HIV 薬治療により HIV 複製は制御される(下)。

B. HIV および SIV のウイルスゲノム構造を示す。

表 1. MHC-I ハプロタイプ E・W・S を構成する Mamu-A・Mamu-B アレル  
(確認されたもの)<sup>68)</sup>

MHC-I ハプロタイプ	Mamu-A	Mamu-B
<i>90-010-le</i> (E)	A1*066:01	B*005:02, B*040:01:01
<i>89-075-lw</i> (W)	A1*022:03, A4*01:02:02	B*001:01:02, B*007:02, B*017:03
<i>91-010-ls</i> (S)	A1*003:08	B*023:01

## A 動物実験プロトコル



## B 抗HIV薬治療プロトコル

商品名	薬剤		投薬量 (/回)	投薬頻度 (/日)
	一般名 (略称)	種類		
コンビビル	ジドブジン/ラミブジン (AZT/3TC)	NRTI	75mg/37.5mg	2回
ビリアード	テノホビル (TDF)	NRTI	75mg	1回
カレトラ	ロピナビル/リトナビル (LPV/r)	PI	200mg/50mg	2回

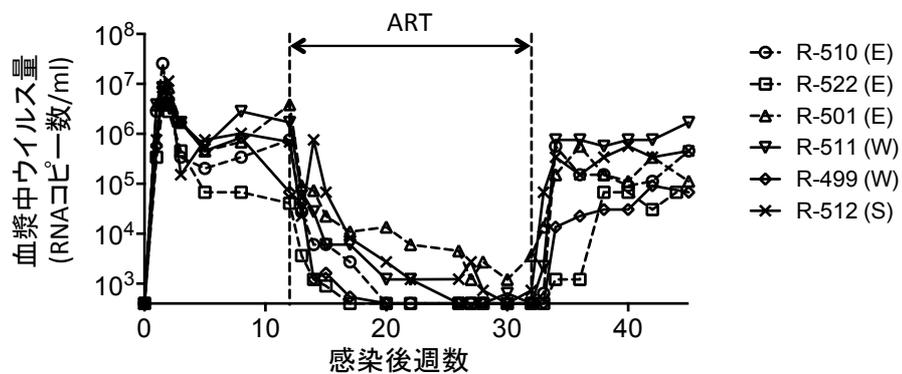
図2. 治療ワクチン実験のプロトコル

### A. 動物実験のプロトコル。

\*: 治療ワクチン接種群 6頭と非接種群のうち2頭に対して、抗 SIVmac239 ポリクローナル IgG の受動免疫を行った。

### B. 抗 HIV 薬治療プロトコル。

**A 非接種群**



**B 治療ワクチン接種群**

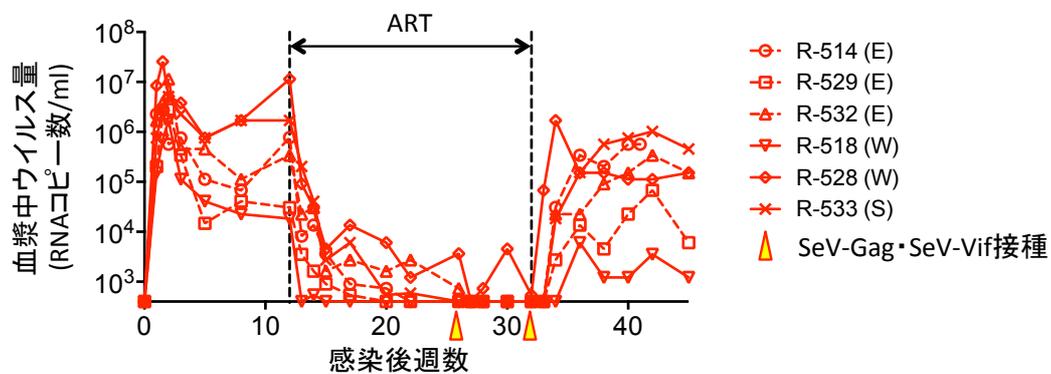


図3. SIV 感染後の血漿中ウイルス量の変化

A. 治療ワクチン非接種群。

B. 治療ワクチン接種群。

非接種群

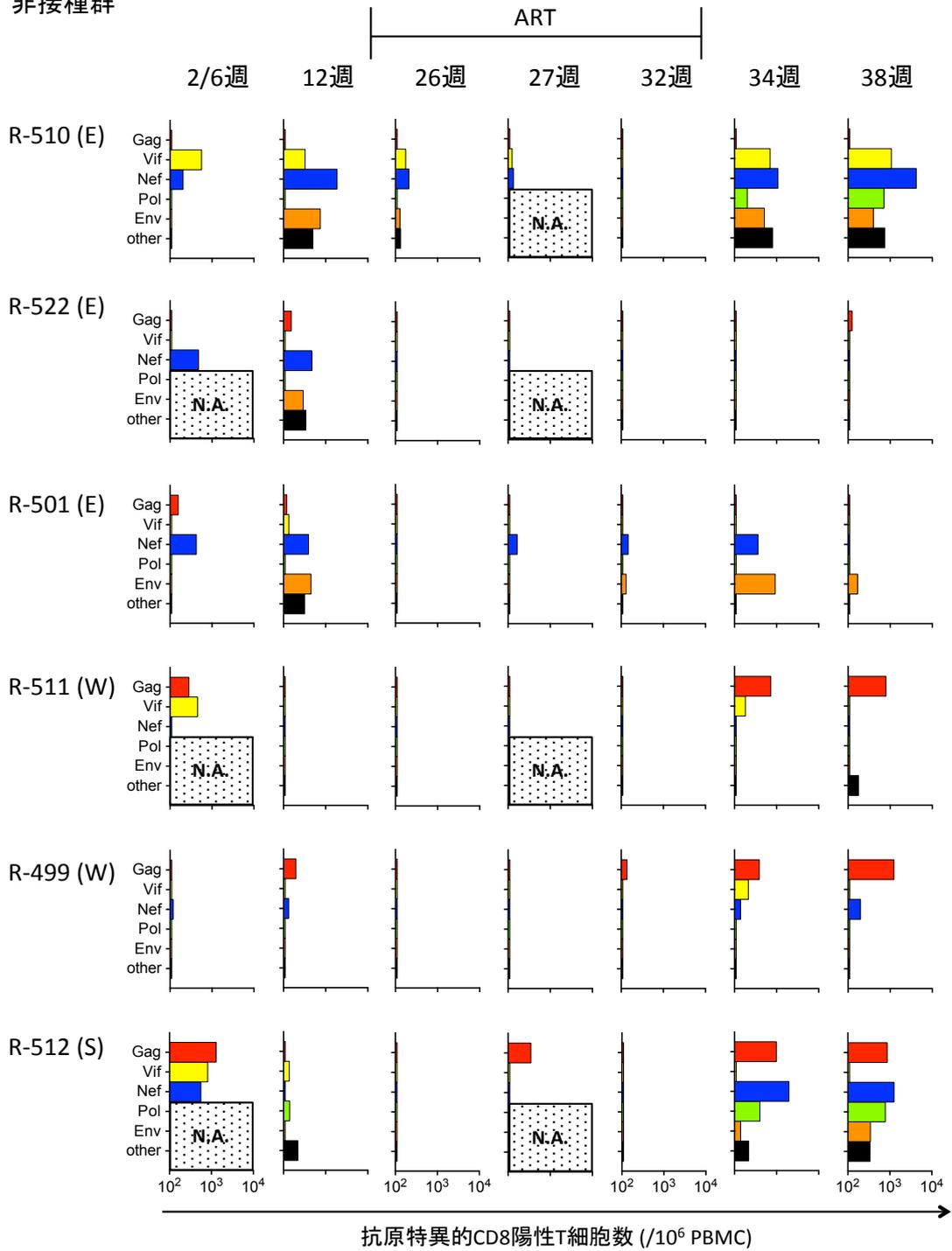


図4. 非接種群の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応

N.A.: Not Assessed.

治療ワクチン(▽)接種群

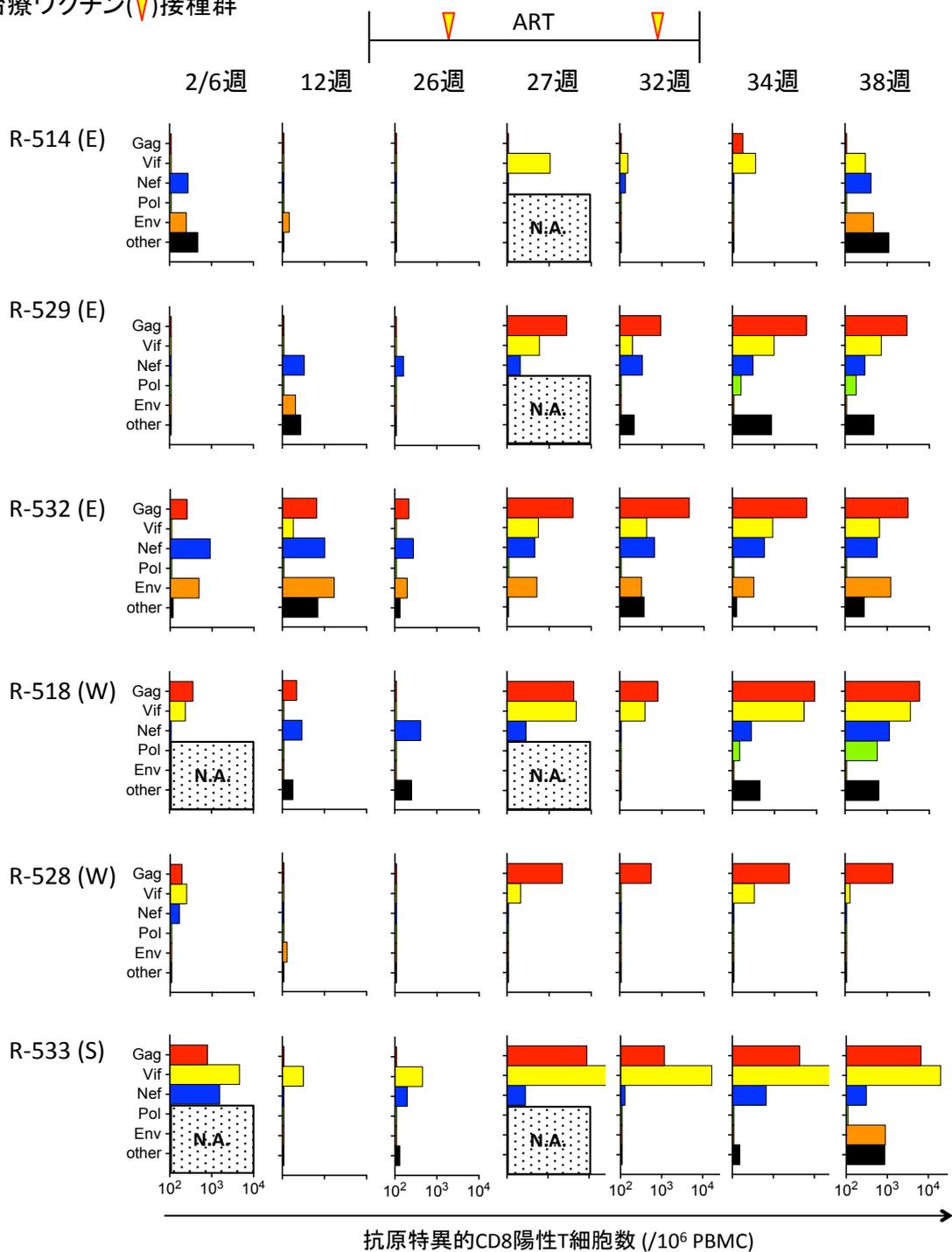


図 5. 治療ワクチン接種群の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応

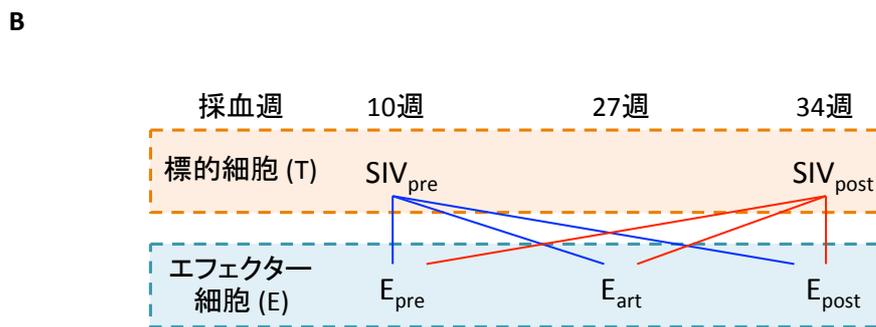
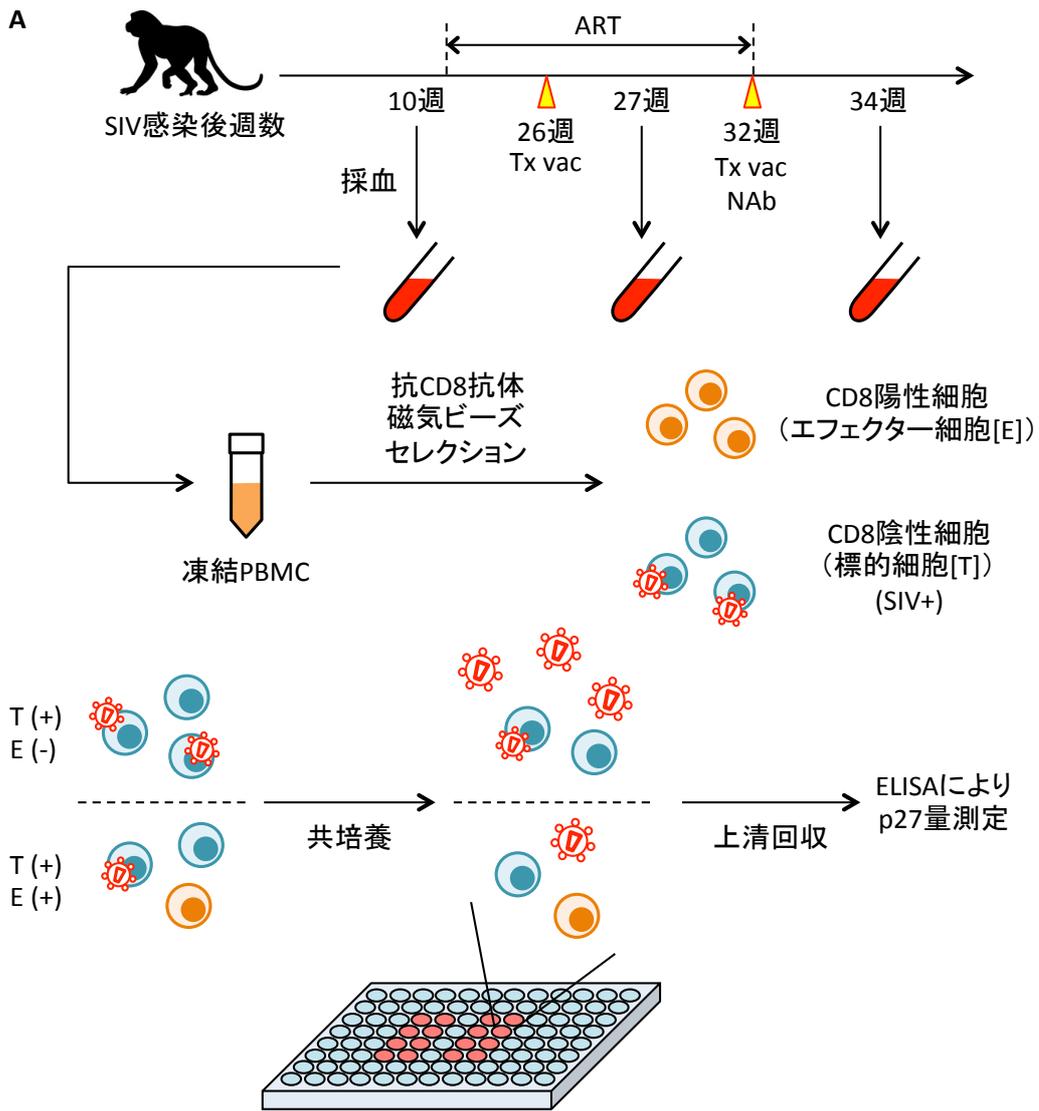
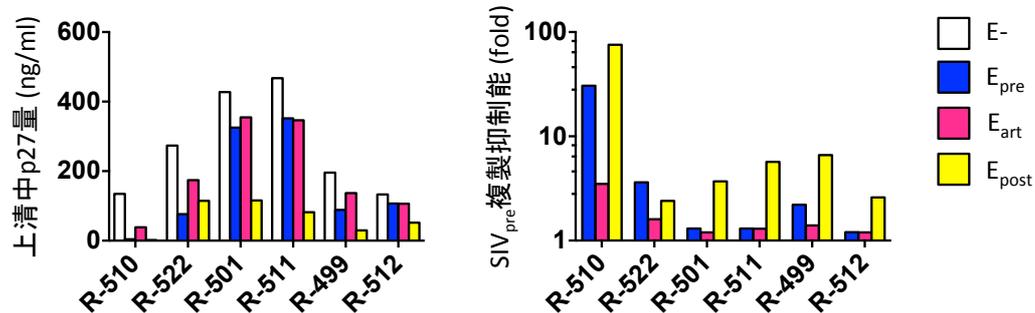


図 6. Viral suppression assay (VSA)の模式図

A. VSA のプロトコル概要。

B. 培養に用いた細胞の組み合わせ。

**A 非接種群**



**B 治療ワクチン接種群**

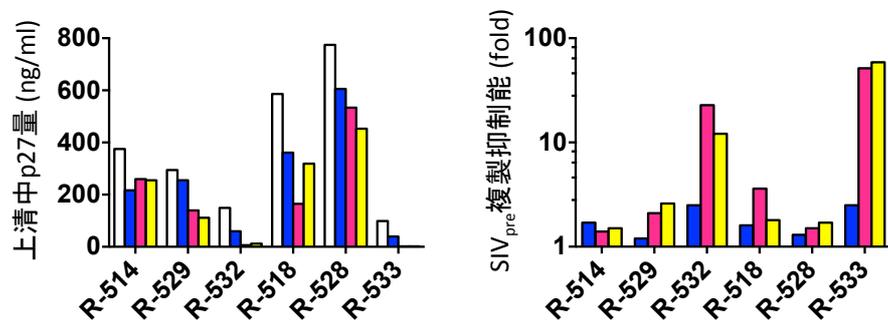


図 7. 投薬前の標的 ( $SIV_{pre}$ ) に対する各 CD8 陽性細胞の複製抑制能

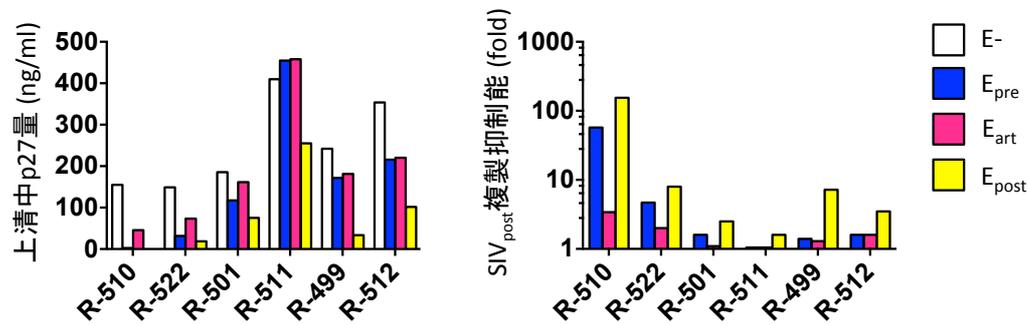
A. 非接種群。

B. 治療ワクチン接種群。

左：VSA 共培養時の上清中 p27 量。

右： $SIV_{pre}$  複製抑制能 (reduction fold)

**A 非接種群**



**B 治療ワクチン接種群**

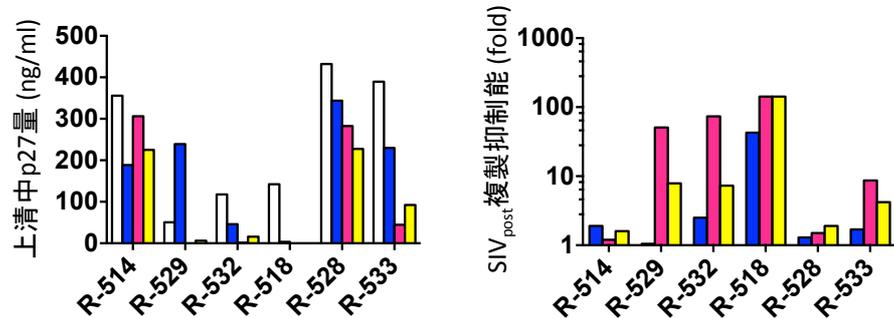


図 8. 投薬中止後の標的 (SIV<sub>post</sub>) に対する各 CD8 陽性細胞の複製抑制能

A. 非接種群。

B. 治療ワクチン接種群。

左 : VSA 共培養時の上清中 p27 量。

右 : SIV<sub>post</sub> 複製抑制能 (reduction fold)

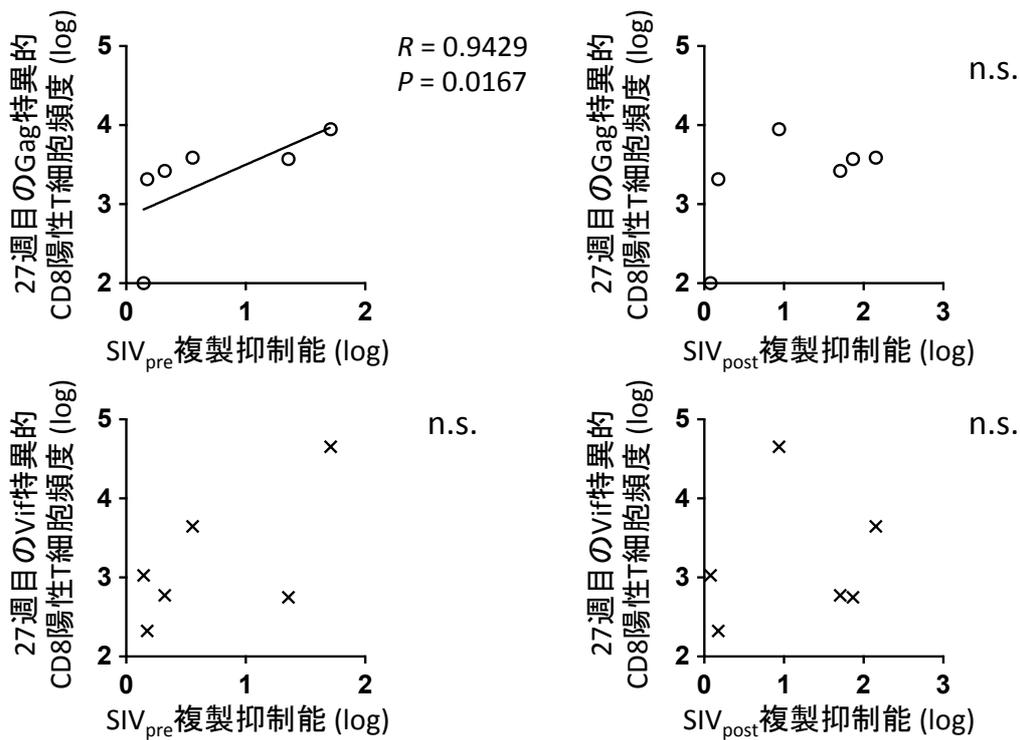


図9. 治療ワクチン接種群における投薬下治療ワクチン接種後(感染27週目)のCD8陽性細胞のSIV複製抑制能と27週目の抗原特異的CD8陽性T細胞頻度との相関解析  
 左図横軸: 27週目CD8陽性細胞の投薬前標的(SIV<sub>pre</sub>)に対する抑制能  
 右図横軸: 27週目CD8陽性細胞の投薬中止後標的(SIV<sub>post</sub>)に対する抑制能  
 上図縦軸: 27週目のGag特異的CD8陽性T細胞頻度  
 下図縦軸: 27週目のVif特異的CD8陽性T細胞頻度

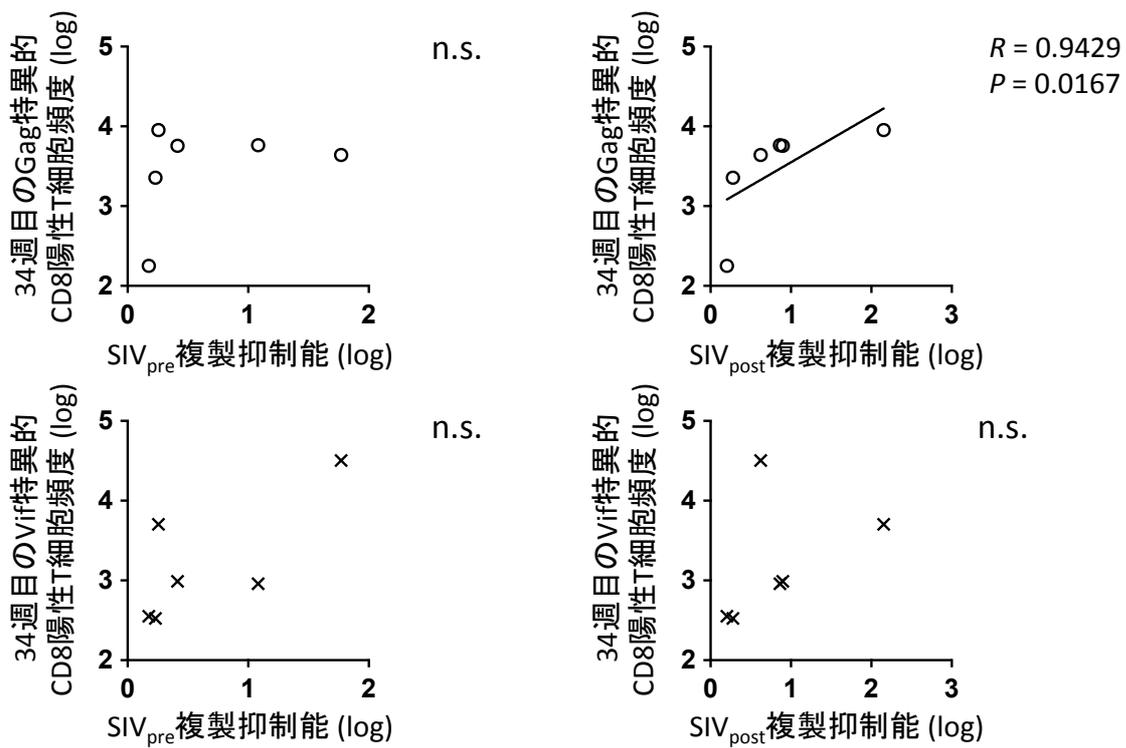
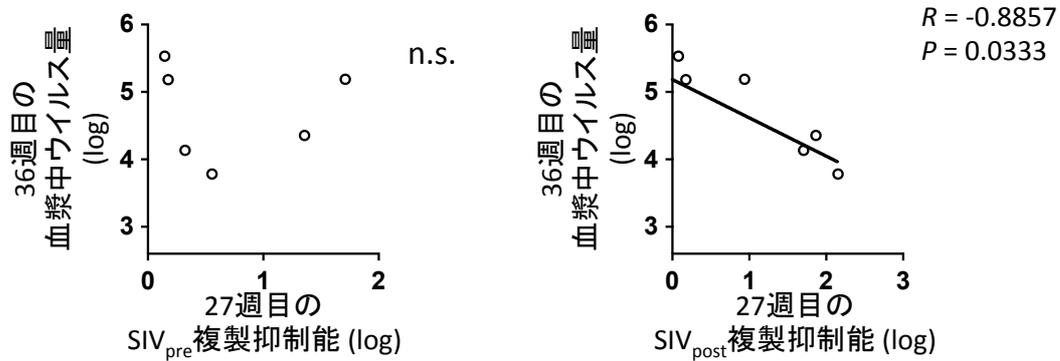


図 10. 治療ワクチン接種群における投薬中止後（感染 34 週目）の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と 34 週目の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度との相関解析  
 左図横軸：34 週目 CD8 陽性細胞の投薬前標的（SIV<sub>pre</sub>）に対する抑制能  
 右図横軸：34 週目 CD8 陽性細胞の投薬中止後標的（SIV<sub>post</sub>）に対する抑制能  
 上図縦軸：34 週目の Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度  
 下図縦軸：34 週目の Vif 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度

**A**



**B**

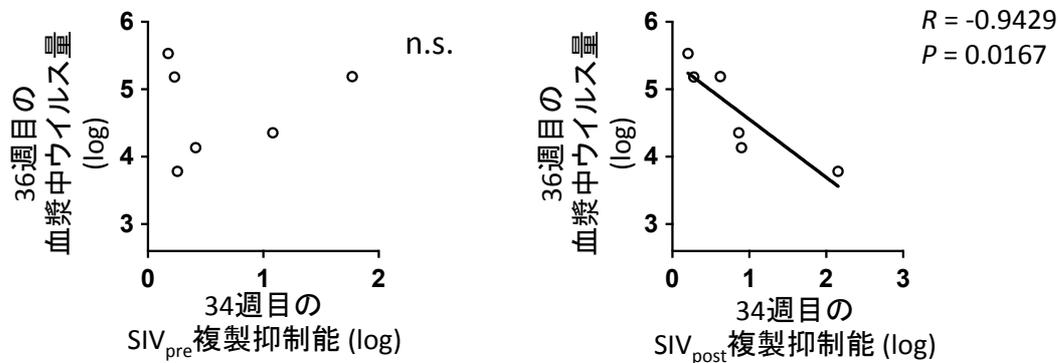
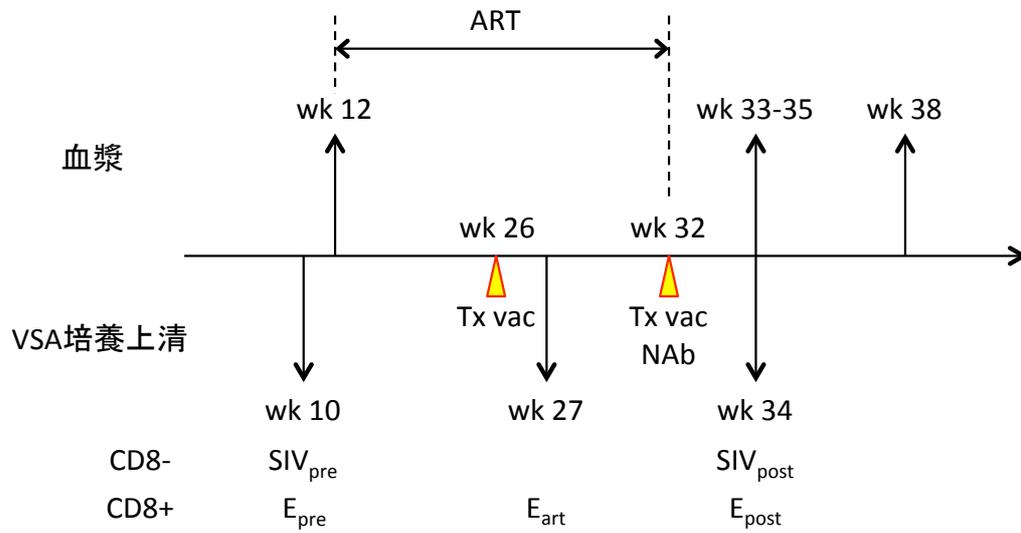


図 11. 治療ワクチン接種群における 27 週目あるいは 34 週目の CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と 36 週目の血漿中ウイルス量との相関解析

A. 投薬下治療ワクチン接種後の感染 27 週目 CD8 陽性細胞 ( $E_{art}$ ) の SIV 複製抑制能。

B. 投薬中止後の感染 34 週目 CD8 陽性細胞 ( $E_{post}$ ) の SIV 複製抑制能。

A



B

SIV <sub>pre</sub>	CD8-	CD8+	SIV <sub>post</sub>	CD8-	CD8+
E-	wk 10	-	E-	wk 34	-
E <sub>pre</sub>	wk 10	wk 10	E <sub>pre</sub>	wk 34	wk 10
E <sub>art</sub>	wk 10	wk 27	E <sub>art</sub>	wk 34	wk 27
E <sub>post</sub>	wk 10	wk 34	E <sub>post</sub>	wk 34	wk 34

図 12. VSA 培養上清および血漿中 SIV のゲノム解析

A. ゲノム解析に用いたサンプルの採材週。

B. VSA の培養上清に含まれる細胞。

R-510			Gag		Vif					
A.A. number			3	175	181	193	194	197	201	
SIVmac239			V	N	M	G	G	P	A	
wk12 血漿			A	S						V*
SIVpre	E- (1) 培養上清							S		
	Epre (1) 培養上清									V*
	Eart (1) 培養上清							S		V*
	Epost (1) 培養上清			L						V*
wk34 血漿				S				S		T*
SIVpost	E- (1) 培養上清		S							T*
	E- (2) 培養上清		A	S			D			T*
	Epre (1) 培養上清		A		L					V*
	Epre (2) 培養上清		A		L					V
	Eart (1) 培養上清			S		S				
	Eart (2) 培養上清			S	L					V*
	Epost (1) 培養上清		A	S				S		
Epost (2) 培養上清			S				S		T*	
wk38 血漿			A	S	L			S		V*

R-522			Gag				Vif
A.A. number			373	375	388	468	160
SIVmac239			A	V	R	D	R
wk12 血漿			T				N*
SIVpre	E- (1) 培養上清						N*
	Epre (1) 培養上清		T				N*
	Eart (1) 培養上清						N*
	Epost (1) 培養上清						N*
wk35 血漿			T	A			N
SIVpost	E- (1) 培養上清		T				N*
	Epre (1) 培養上清		T		K		N*
	Eart (1) 培養上清			A			N*
	Epost (1) 培養上清		T				N*
wk38 血漿			T	A			

R-501			Gag	Vif
A.A. number			,	,
SIVmac239			-	-
wk12 血漿				
SIVpre	E- (1) 培養上清			
	E- (2) 培養上清			
	Epre (1) 培養上清			
	Epre (2) 培養上清			
	Eart (1) 培養上清			
	Eart (2) 培養上清			
	Epost (1) 培養上清			
	Epost (2) 培養上清			
wk34 血漿				
SIVpost	E- (1) 培養上清			
	E- (2) 培養上清			
	Epre (1) 培養上清			
	Epre (2) 培養上清			
	Eart (1) 培養上清			
	Eart (2) 培養上清			
	Epost (1) 培養上清			
	Epost (2) 培養上清			
wk38 血漿				

図 13-1. SIV gag・vif 変異 (非接種群・MHC-I ハプロタイプ E 陽性サル)

VSA を duplicate で行ったものは一方を(2)として示す。変異体の存在比率が野生型の 1/2 以上のもののアミノ酸置換を示し、2 倍以上のものは濃い青で示す。

\*: 複数の変異が存在することを示す。

R-511			Gag		Vif	
A.A. number			68	333	66	163
SIVmac239			V	L	H	G
wk12 血漿				I	Y*	
SIVpre	E- (1)	培養上清			Y*	
	E- (2)	培養上清			Y*	
	Epre (1)	培養上清			Y*	
	Epre (2)	培養上清			Y*	
	Eart (1)	培養上清			Y*	
	Eart (2)	培養上清			Y*	
	Epost (1)	培養上清			Y*	
	Epost (2)	培養上清			Y*	
wk33 血漿				I	Y*	
SIVpost	E- (1)	培養上清		I	Y*	
	E- (2)	培養上清		I	Y*	
	Epre (1)	培養上清		I	Y*	
	Epre (2)	培養上清		I	Y*	R
	Eart (1)	培養上清		I	Y*	R
	Eart (2)	培養上清		I	Y*	R
	Epost (1)	培養上清		I	Y*	
	Epost (2)	培養上清		I	Y*	R
wk38 血漿			M	I	Y*	

R-499			Gag			Vif	
A.A. number			13	20	103	66	94
SIVmac239			A	R	I	H	K
wk12 血漿					M	R	
SIVpre	E- (1)	培養上清				R	
	Epre (1)	培養上清				R	
	Eart (1)	培養上清				R	
	Epost (1)	培養上清				R	
wk34 血漿					M	R	
SIVpost	E- (1)	培養上清			M	R	
	E- (2)	培養上清				R*	
	Epre (1)	培養上清			M	R	
	Epre (2)	培養上清			M	R	
	Eart (1)	培養上清				R	
	Eart (2)	培養上清			M	R	
	Epost (1)	培養上清	T		M	R	E
	Epost (2)	培養上清			M	R	
wk38 血漿				K	M	R	

R-512			Gag			Vif
A.A. number			3	28	81	115
SIVmac239			V	K	T	P
wk12 血漿						T
SIVpre	E- (1)	培養上清				T
	Epre (1)	培養上清				T
	Eart (1)	培養上清				T
	Epost (1)	培養上清				T
wk33 血漿					I	T
SIVpost	E- (1)	培養上清			I	T
	Epre (1)	培養上清			I	T
	Eart (1)	培養上清			I	T
	Epost (1)	培養上清			I	T
wk38 血漿			A	R		T

図 13-2. SIV gag・vif 変異 (非接種群・MHC-I ハプロタイプ W/S 陽性サル)

R-514			Gag	Vif
A.A. number			.	175 177
SIVmac239			-	N R
wk12		血漿		D* G
SIVpre	E- (1)	培養上清		S G
	E- (2)	培養上清		S G
	Epre (1)	培養上清		S G
	Epre (2)	培養上清		S G
	Eart (1)	培養上清		S G
	Eart (2)	培養上清		S G
	Epost (1)	培養上清		S G
	Epost (2)	培養上清		S G
wk34		血漿		G
SIVpost	E- (1)	培養上清		G
	Epre (1)	培養上清		G
	Eart (1)	培養上清		G
	Epost (1)	培養上清		G
wk38		血漿		G

R-529			Gag	Vif
A.A. number			.	.
SIVmac239			-	-
wk12		血漿		
SIVpre	E- (1)	培養上清		
	Epre (1)	培養上清		
	Eart (1)	培養上清		
	Epost (1)	培養上清		
wk34		血漿		
SIVpost	E- (1)	培養上清		
	Epre (1)	培養上清		
	Epost (1)	培養上清		
wk38		血漿		

R-532			Gag	Vif
A.A. number			.	.
SIVmac239			-	-
wk12		血漿		
SIVpre	E- (1)	培養上清		
	Epre (1)	培養上清		
	Eart (1)	培養上清		
	Epost (1)	培養上清		
wk34		血漿		
SIVpost	E- (1)	培養上清		
	Epre (1)	培養上清		
	Eart (1)	培養上清		
	Epost (1)	培養上清		
wk38		血漿		

図 13-3. SIV gag・vif 変異 (治療ワクチン接種群・E 陽性サル)

R-518			Gag			Vif			
A.A. number			270	430	432	139	143	202	214
SIVmac239			G	R	A	R	Y	N	A
wk12 血漿							C*		
SIVpre	E- (1)	培養上清				T	C		
	Epre (1)	培養上清			V	T	C		
	Eart (1)	培養上清		K	V	T	C		
	Epost (1)	培養上清				T	C		
wk35 血漿							H		V
SIVpost	E- (1)	培養上清							
	Epre (1)	培養上清							
wk38 血漿			R				C*		D

R-528			Gag		Vif	
A.A. number			457	65	66	
SIVmac239			M	S	H	
wk12 血漿						R
SIVpre	E- (1)	培養上清				R
	E- (2)	培養上清				R
	Epre (1)	培養上清				R
	Epre (2)	培養上清				R
	Eart (1)	培養上清				R
	Eart (2)	培養上清				R
	Epost (1)	培養上清				R
	Epost (2)	培養上清				R
wk33 血漿				N	R	
SIVpost	E- (1)	培養上清	V	N		
	E- (2)	培養上清	V	N		
	Epre (1)	培養上清		N		
	Epre (2)	培養上清	V	N		
	Eart (1)	培養上清		N		
	Eart (2)	培養上清		N		
	Epost (1)	培養上清		N		
	Epost (2)	培養上清		N		
wk38 血漿						R*

R-533			Gag			Vif	
A.A. number			28	125	432	84	115
SIVmac239			K	T	A	T	P
wk12 血漿							S
SIVpre	E- (1)	培養上清					S
	E- (2)	培養上清					S
	Epre (1)	培養上清				A	S
	Eart (1)	培養上清			V		S
	Epost (1)	培養上清	R				S*
wk34 血漿				I			S
SIVpost	E- (1)	培養上清	R				S
	Epre (1)	培養上清	R				S
	Eart (1)	培養上清	R				S
	Epost (1)	培養上清	R		V		S
wk38 血漿			R				S

図 13-4. SIV gag・vif 変異 (治療ワクチン接種群・W/S 陽性サル)

## 8. 参考文献

1) 2013 UNAIDS Report on the global AIDS epidemic

2) Kaufmann GR & Cooper DA. Antiretroviral therapy of HIV-1 infection: established treatment strategies and new therapeutic options. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 508-14 (2000)

3) Fätkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AI, Saag MS, Goebel FD, Rockstroh JK, Dezube BJ, Jenkins TM, Medhurst C, Sullivan JF, Ridgway C, Abel S, James IT, Youle M & van der Ryst E. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nature Medicine* **11**, 1170-2 (2005)

4) Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY, Kovacs CM, Steigbigel RT, Cooper DA, Liporace R, Schwartz R, Isaacs R, Gilde LR, Wenning L, Zhao J & Teppler H. Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-1-infected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **43**, 509-15 (2006)

5) Chun TW, Justement JS, Murray D, Hallahan CW, Maenza J, Collier AC, Sheth PM, Kaul R, Ostrowski M, Moir S, Kovacs C & Fauci AS. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS* **24**, 2803-8 (2010)

- 6) Grinspoon S & Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *New England Journal of Medicine* **352**, 48-62 (2005)
- 7) Goicoechea M, Liu S, Best B, Jain S, Kemper C, Witt M, Diamond C, Haubrich R, Louie S; California Collaborative Treatment Group 578 Team. Greater tenofovir-associated renal function decline with protease inhibitor-based versus nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based therapy. *Journal of Infectious Diseases* **197**, 102-8 (2008)
- 8) Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S & Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *Clinical Infectious Diseases* **45**, 1230-7 (2007)
- 9) Ferry T, Raffi F, Collin-Filleul F, Dupon M, Dellamonica P, Waldner A, Strady C, Chene G, Leport C, Moing VL; ANRS CO8 (APROCO-COPILOTE) Study Group. Uncontrolled viral replication as a risk factor for non-AIDS severe clinical events in HIV-infected patients on long-term antiretroviral therapy: APROCO/COPILOTE (ANRS CO8) cohort study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **51**, 407-415 (2009)
- 10) Cazanave C, Dupon M, Lavignolle-Aurillac V, Barthe N, Lawson-Ayayi S, Mehsen N, Mercié P, Morlat P, Thiébaud R, Dabis F; Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine. Reduced bone mineral density in HIV-infected patients: prevalence and associated factors. *AIDS* **22**, 395-402 (2008)

- 11) Hasse B, Ledergerber B, Furrer H, Battegay M, Hirschel B, Cavassini M, Bertisch B, Bernasconi E, Weber R; Swiss HIV Cohort Study. Morbidity and aging in HIV-infected persons: the Swiss HIV cohort study. *Clinical Infectious Diseases* **53**, 1130-9 (2011)
- 12) Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Katinger H, Parren PW, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson WA & Arthos J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-82 (2002)
- 13) Richman DD, Wrin T, Little SJ & Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4144-9 (2003)
- 14) Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD & Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-12 (2003)
- 15) Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, Leseka N, Treurnicht F, Mlisana K, Shaw GM, Karim SS, Williamson C, Morris L; CAPRISA 002 Study Team. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *Journal of Virology* **81**, 6187-96 (2007)
- 16) Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, Harris D, VanCott TC, Hayes D, Louder MK, Brown CR, Sapan CV, Frankel SS, Lu Y, Robb ML, Katinger H & Birx DL. Protection of Macaques

against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *Journal of Virology* **73**, 4009-18 (1999)

17) Shibata R, Igarashi T, Haigwood N, Buckler-White A, Ogert R, Ross W, Willey R, Cho MW & Martin MA. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nature Medicine* **5**, 204-10 (1999)

18) Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, Beary H, Hayes D, Frankel SS, Birx DL & Lewis MG. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Medicine* **6**, 207-10 (2000)

19) Pognard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE & Burton DR. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* **10**, 431-8 (1999)

20) Nishimura Y, Igarashi T, Haigwood NL, Sadjadpour R, Donau OK, Buckler C, Plishka RJ, Buckler-White A & Martin MA. Transfer of neutralizing IgG to macaques 6 h but not 24 h after SHIV infection confers sterilizing protection: implications for HIV-1 vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15131-6 (2003)

21) Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, Stephenson KE, Chang HW, Shekhar K, Gupta S, Nkolola JP, Seaman MS, Smith KM, Borducchi EN, Cabral C,

Smith JY, Blackmore S, Sanisetty S, Perry JR, Beck M, Lewis MG, Rinaldi W, Chakraborty AK, Poignard P, Nussenzweig MC & Burton DR. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* **503**, 224-8 (2013)

22) Shingai M, Nishimura Y, Klein F, Mouquet H, Donau OK, Plishka R, Buckler-White A, Seaman M, Piatak M Jr, Lifson JD, Dimitrov DS, Nussenzweig MC & Martin MA. Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* **503**, 277-80 (2013)

23) Walker CM, Moody DJ, Stites DP & Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* **234**, 1563-6 (1986)

24) Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C & Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology* **68**, 4650-5 (1994)

25) Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* **68**, 6103-10 (1994)

26) Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC & Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *Journal of Virology*

72, 164-9 (1998)

27) Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL & Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Science* **283**, 857-60 (1999)

28) Streeck H, Jolin JS, Qi Y, Yassine-Diab B, Johnson RC, Kwon DS, Addo MM, Brumme C, Routy JP, Little S, Jessen HK, Kelleher AD, Hecht FM, Sekaly RP, Rosenberg ES, Walker BD, Carrington M & Altfeld M. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Virology* **83**, 7641-8 (2009)

29) Goulder PJ, Altfeld MA, Rosenberg ES, Nguyen T, Tang Y, Eldridge RL, Addo MM, He S, Muckerjee JS, Phillips MN, Bunce M, Kalams SA, Sekaly RP, Walker BD & Brander C. Substantial differences in specificity of HIV-specific cytotoxic T cells in acute and chronic HIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **193**, 181-94 (2001)

30) Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphaël M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM & Debré P. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* **328**, 348-51 (1987)

31) Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS & Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* **328**, 345-8 (1987)

- 32) Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB & Shaw GM. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine* **3**, 205-11 (1997)
- 33) Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ & Rowland-Jones S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nature Medicine* **3**, 212-7 (1997)
- 34) Vanderford TH, Bleckwehl C, Engram JC, Dunham RM, Klatt NR, Feinberg MB, Garber DA, Betts MR & Silvestri G. Viral CTL escape mutants are generated in lymph nodes and subsequently become fixed in plasma and rectal mucosa during acute SIV infection of macaques. *PLoS pathogens* **7**, e1002048 (2011)
- 35) Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK & Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* **12**, 1198-202 (2006)
- 36) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ & Walker BD. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350-4 (2006)

- 37) Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, Cohen KW, Jolin JS, Meier A, Brumme CJ, Rosenberg ES, Alter G, Allen TM, Walker BD & Altfeld M. Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *PLoS Medicine* **5**, e100 (2008)
- 38) Van Rompay KK, Singh RP, Pahar B, Sodora DL, Wingfield C, Lawson JR, Marthas ML, Bischofberger N. CD8<sup>+</sup>-cell-mediated suppression of virulent simian immunodeficiency virus during tenofovir treatment. *Journal of Virology* **78**, 5324-37 (2004)
- 39) Casazza JP, Betts MR, Hill BJ, Brenchley JM, Price DA, Douek DC & Koup RA. Immunologic pressure within class I-restricted cognate human immunodeficiency virus epitopes during highly active antiretroviral therapy. *Journal of Virology* **79**, 3653-63 (2005)
- 40) Mollet L, Li TS, Samri A, Tournay C, Tubiana R, Calvez V, Debré P, Katlama C & Autran B. Dynamics of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes with change in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups. *Journal of Immunology* **165**, 1692-704 (2000)
- 41) Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS & Walker BD. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *Journal of Virology* **73**, 6721-8 (1999)
- 42) Kloverpris H, Karlsson I, Bonde J, Thorn M, Vinner L, Pedersen AE, Hentze JL, Andresen BS, Svane IM, Gerstoft J, Kronborg G & Fomesgaard A. Induction of novel CD8<sup>+</sup> T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with

subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *AIDS* **23**, 1329-40 (2009)

43) Papagno L, Alter G, Assoumou L, Murphy RL, Garcia F, Clotet B, Larsen M, Braibant M, Marcelin AG, Costagliola D, Altfeld M, Katlama C, Autran B; ORVACS Study Group. Comprehensive analysis of virus-specific T-cells provides clues for the failure of therapeutic immunization with ALVAC-HIV vaccine. *AIDS* **25**, 27-36 (2011)

44) Casazza JP, Bowman KA, Adzaku S, Smith EC, Enama ME, Bailer RT, Price DA, Gostick E, Gordon IJ, Ambrozak DR, Nason MC, Roederer M, Andrews CA, Maldarelli FM, Wiegand A, Kearney MF, Persaud D, Ziemniak C, Gottardo R, Ledgerwood JE, Graham BS, Koup RA; VRC 101 Study Team. Therapeutic vaccination expands and improves the function of the HIV-specific memory T-cell repertoire. *Journal of Infectious Diseases* **207**, 1829-40 (2013)

45) Animal models for HIV infection and AIDS: memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization* **66**, 561-74 (1988)

46) Naidu YM, Kestler HW 3rd, Li Y, Butler CV, Silva DP, Schmidt DK, Troup CD, Sehgal PK, Sonigo P, Daniel MD & Desrosiers RC. Characterization of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac) and human immunodeficiency virus type 2: Persistent infection of rhesus monkeys with molecularly cloned SIVmac. *Journal of Virology* **62**, 4691-6 (1988)

47) O'Connor DH, Mothe BR, Weinfurter JT, Fuenger S, Rehauer WM, Jing P, Rudersdorf RR, Liebl ME, Krebs K, Vasquez J, Dodds E, Loffredo J, Martin S, McDermott AB, Allen T

M, Wang C, Doxiadis GG, Montefiori DC, Hughes A, Burton DR, Allison DB, Wolinsky SM, Bontrop R, Picker LJ & Watkins DI. Major histocompatibility complex class I alleles associated with slow simian immunodeficiency virus disease progression bind epitopes recognized by dominant acute-phase cytotoxic-T-lymphocyte responses. *Journal of Virology* **77**, 9029-40 (2003)

48) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI & Nagai Y. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 1709-18 (2004)

49) Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H & Mann DL. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Medicine* **2**, 405-11 (1996)

50) O'Brien SJ, Gao X & Carrington M. HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends in Molecular Medicine* **7**, 379-81 (2001)

51) Tomiyama H, Fujiwara M, Oka S & Takiguchi M. Cutting Edge: Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. *Journal of Immunology* **174**, 36-40 (2005)

52) Goulder PJ, Bunce M, Krausa P, McIntyre K, Crowley S, Morgan B, Edwards A,

Giangrande P, Phillips RE & McMichael AJ. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Research Human Retroviruses* **12**, 1691-8 (1996)

53) Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J & Connors M. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2709-14 (2000)

54) Klein MR, van der Burg SH, Hovenkamp E, Holwerda AM, Drijfhout JW, Melief CJ & Miedema F. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of General virology* **79**, 2191-201 (1998)

55) Mothé BR, Weinfurter J, Wang C, Rehrauer W, Wilson N, Allen TM, Allison DB & Watkins DI. Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A\*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *Journal of Virology* **77**, 2736-40 (2003)

56) Pal R, Venzon D, Letvin NL, Santra S, Montefiori DC, Miller NR, Trynieszewska E, Lewis MG, VanCott TC, Hirsch V, Woodward R, Gibson A, Grace M, Dobratz E, Markham PD, Hel Z, Nacsa J, Klein M, Tartaglia J & Franchini G. ALVAC-SIV-gag-pol-env-based vaccination and macaque major histocompatibility complex class I (A\*01) delay simian immunodeficiency virus SIVmac-induced immunodeficiency. *Journal of Virology* **76**, 292-302

(2002)

57) Loffredo JT, Friedrich TC, León EJ, Stephany JJ, Rodrigues DS, Spencer SP, Bean AT, Beal DR, Burwitz BJ, Rudersdorf RA, Wallace LT, Piaskowski SM, May GE, Sidney J, Gostick E, Wilson NA, Price DA, Kallas EG, Piontkivska H, Hughes AL, Sette A & Watkins DI. CD8<sup>+</sup> T cells from SIV elite controller macaques recognize Mamu-B\*08-bound epitopes and select for widespread viral variation. *PLoS One* **14**, e1152 (2007)

58) Loffredo JT, Bean AT, Beal DR, León EJ, May GE, Piaskowski SM, Furlott JR, Reed J, Musani SK, Rakasz EG, Friedrich TC, Wilson NA, Allison DB & Watkins DI. Patterns of CD8<sup>+</sup> immunodominance may influence the ability of Mamu-B\*08-positive macaques to naturally control simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *Journal of Virology* **82**, 1723-38 (2008)

59) Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barbar LD, Szinger J, Day C, Klenerman P, Mullins J, Korber B, Coovadia HM, Walker BD & Goulder PJ. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**, 769-75 (2004)

60) Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K & O'Brien SJ. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* **283**, 1748-52 (1999)

61) Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, Goedert JJ, Buchbinder S,

Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ & Carrington M. Effects of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *New England Journal of Medicine* **344**, 1668-75 (2001)

62) Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8<sup>+</sup> T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *Journal of Virology* **76**, 2298-305 (2002)

63) Zuñiga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J & Brander C. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *Journal of Virology* **80**, 3122-5 (2006)

64) Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD & Goulder P. CD8<sup>+</sup> T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature Medicine* **13**, 46-53 (2007)

65) Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, Bean AT, Lee W, Burwitz BJ, Stephany JJ, Loffredo JT, Allison DB, Adnan S, Hoji A, Wilson NA, Friedrich TC, Lifson JD, Yang OO & Watkins DI. Gag-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *Journal of Immunology* **178**, 2746-54

(2007)

66) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H & Matano T. Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *Journal of Virology* **82**, 10199-206 (2008)

67) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A & Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Virology* **88**, 425-33 (2014)

68) Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T & Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* **62**, 601-11 (2010)

69) Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y & Kimura A. Reference strand-mediated conformation analysis-based typing of multiple alleles in the rhesus macaques MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis* **28**, 918-24 (2007)

70) Horiike M, Iwami S, Kodama M, Sato A, Watanabe Y, Yasui M, Ishida Y, Kobayashi T, Miura T & Igarashi T. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology* **423**, 107-18 (2012)

71) Shibata R, Maldarelli F, Siemon C, Matano T, Parta M, Miller G, Fredrickson T & Martin MA. Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *Journal of Infectious Diseases* **176**, 362-73 (1997)

72) Lamoreaux L, Roederer M & Koup R. Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. *Nature Protocols* **1**, 1507-16 (2006)

73) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H & Matano T. Broadening of CD8<sup>+</sup> cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* **24**, 2777-87 (2010)

74) Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500 (1984)