

博士論文

免疫不全ウイルスの持続感染・伝播における
変異蓄積に関する研究

関 紗由里

免疫不全ウイルスの持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究

所属： 東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 病因・病理学専攻

指導教員： 俣野 哲朗

申請者： 関 紗由里

目次

要旨	1
1 序文	2
2 方法	8
2-1 実験動物および検体処理方法	8
(1) 実験動物	8
(2) ウイルス接種	9
(3) 末梢血単核球 (PBMC) および血漿の分離	9
(4) サルへの SIV 陽性血漿の接種	9
2-2 ウイルス学的解析	10
(1) 血漿中ウイルス RNA 定量	10
(2) 血漿中ウイルス量に関する統計学的解析	11
(3) ウイルスゲノムの塩基配列決定	12
(4) 次世代シーケンサーによる血漿中ウイルスゲノムの 塩基配列解析	14
(5) 血漿中ウイルスの濃縮	17
(6) 血漿由来ウイルスの <i>in vitro</i> 複製能の解析	17
2-3 免疫学的解析	19
3. 結果	21
3-1 サルにおける SIV 伝播実験 (1~3 代目)	21
3-2 伝播 SIV のウイルス学的解析	22
(1) 伝播に伴う <i>gag/vif/nef</i> 非同義変異の蓄積	22

(2) 伝播 SIV の gag cDNA の次世代塩基配列解析に基づく 系統樹解析	28
(3) 伝播 SIV の <i>in vitro</i> 複製能の解析	29
3-3 サルへの 3 代目 SIV の感染実験	31
3-4 サルでの SIV 伝播実験における CTL 反応	34
4 考察	37
5 結論	42
6 謝辞	43
7 参考文献	44
8 図表	51

要旨

本研究では、遺伝的多様性を有する宿主間の HIV 伝播に伴うウイルス変化および個体レベルの増殖能の変化を知る目的で、サルエイズモデルにおいて、異なる MHC-I ハプロタイプを有するアカゲサル群間での SIV 伝播実験を行った。その結果、伝播ごとに SIV ゲノムに変異が蓄積することを明らかにした。変異を蓄積した SIV は *in vitro* 複製能は低いものの、感染個体では野生型 SIV 感染時と同様の血漿中ウイルス量を呈し、特に感染・伝播を一度経由した個体と同じ MHC-I 遺伝子型を有する別の個体に新規感染した際に高いウイルス量を示した。本結果は、MHC-I の遺伝的多様性を有する宿主間の伝播において、HIV がどのような傾向で進化するかを推定するための論理基盤として重要と考えられる。

1 序文

ウイルス感染症において、ウイルスは宿主との相互作用により変化すると考えられる。ヒトでの増殖能を獲得したウイルスは、増殖に必要な宿主因子との相互作用能と抵抗性因子からの逃避能を有すると考えられるが、増殖能獲得後のヒト遺伝子多様性へのさらなる適応についての理解は十分に進んでいない（図1）。本研究は、ウイルスと宿主の相互作用が長期に渡り継続し病態形成にいたるヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus、HIV）慢性持続感染症を対象とし、ウイルス感染・伝播におけるウイルス変化および個体レベルの増殖能の変化を知ることを目的とした。

HIVはヒトCD4陽性T細胞を標的として感染するレトロウイルスである。HIV感染症では、宿主体内で獲得免疫が誘導された後もウイルスが完全には排除されず慢性持続感染が成立し、最終的には後天性免疫不全症候群（エイズ）発症に至る（図2）。HIVやサル免疫不全ウイルス（simian immunodeficiency virus、SIV）のゲノムは、*gag*、*pol*、*env*の構造遺伝子と*vif*、*vpr*、*vpu*（HIV-1/SIVcpz）または*vpx*（HIV-2/SIVmac/SIVsmm）、*tat*、*rev*、*nef*の6個のアクセサリー／調節遺伝子を有している（図3）。

自然経過でのエイズ発症阻止には至らないものの、獲得免疫のうちウイルス特異的細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte、CTL）反応はHIV複製抑制に

中心的な役割を担っていることから (7, 18, 26, 39, 47)、HIV 感染症では CTL の認識から逃れるエスケープ変異を有するウイルスがしばしば選択され、その変異がウイルス複製能の低下に結びつく場合がある (3, 4, 8, 14, 15, 34, 38, 41, 42, 43)。CTL の標的エピトープは、宿主の主要組織適合遺伝子複合体クラス I (major histocompatibility complex class I、MHC-I) 分子によって感染細胞表面に提示されるため、MHC-I 遺伝子型によって異なる。したがって、MHC-I 遺伝子型の異なる個体間を HIV が伝播すると、新たな CTL 標的領域にエスケープ変異が選択されるとともに、伝播前のウイルスに存在したエスケープ変異を含む領域が CTL の標的領域でなくなることから、ウイルスは複製能回復のための復帰変異を起こす可能性がある (27, 29, 30)。このような個体間の伝播に伴う HIV の変化を明らかにするには、ヒト HIV 感染の解析に加え、動物モデルでの解析が必要となる。上記のような復帰変異についても、HIV ゲノム上の特定の変異と感染ヒト集団の HLA 遺伝子型の関連から間接的に示唆されたが (32)、CTL エスケープ変異を獲得したウイルスの、MHC-I 遺伝子型が異なる個体間の伝播による変化を直接確認することはヒトでは困難であるため、アカゲザル個体内で出現した CTL エスケープ変異を有する SIV を MHC-I 遺伝子型の異なる個体に感染させることで、*in vitro* 複製能の低下した CTL エスケープ変異ウイルスの伝播に伴う復帰変異が示された (13, 25)。

MHC-I 遺伝子型の多様性がヒト集団での HIV 伝播に伴うウイルス変化(進化)

に影響を及ぼすことは、調査対象とするヒト集団の HLA 遺伝子型の分布、HIV ゲノムに獲得された CTL エスケープ変異、そして変異 HIV の *in vitro* 複製能と CTL からの逃避能をそれぞれ調べ、相関関係を示すことで間接的に示唆されてきた (9, 19, 21, 24)。しかし、特定のウイルスが複数の特定の個体間伝播を積み重ねた結果を直接的に解析することは、ヒトでは事実上不可能である。また、変異 HIV の *in vitro* 複製能を野生型のウイルスと比較する場合には、同一の実験室株の分子クローンをバックボーンとして感染個体から得られたウイルスの配列を部分的に組み込んだキメラウイルスが使用される (21, 35)。この方法の難点は、変異ウイルスの全配列の影響を反映した複製能を解析できないこと、バックボーンとする分子クローンの選択に解析結果が左右される可能性が否定できないことである。

したがって、MHC-I 遺伝子型の多様な個体間の伝播が免疫不全ウイルスの變化に及ぼす影響を明らかにするには、HIV 感染ヒト集団における解析のみでは、以下の研究が困難であり不十分であった。

①特定の複数個体間におけるウイルス伝播の直接的な追跡

②伝播によって出現した変異ウイルスそのものの *in vitro* 複製能 (ヒト HIV

感染では、各感染者が曝露したウイルスが異なり多様であるため比較の

もととなる対照ウイルスを一つに特定できない。したがって、ヒト HIV

感染では特定の実験室 HIV 株を対照ウイルスとし、*gag* 等の特定の遺伝

子のみ変異ウイルス由来のものに置換したウイルスの複製能を調べてきた。))

③伝播によって出現した変異ウイルスの新規個体における増殖能

これらを調べるためには、動物エイズモデルにおける解析が必要である。ヒト HIV 感染症を反映する動物モデルとしては、臨床経過、血中およびリンパ節中のウイルス特異的免疫反応における共通点から、SIV 感染アカゲサルエイズモデルが最適と考えられている (10, 28, 45)。

所属研究室では、MHC-I 情報の確定したビルマ産アカゲサル群を樹立し、MHC-I ハプロタイプ別の様々な群で SIVmac239 接種実験を行ってきた (36)。このうち、MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia (略称: A) を共有する群では SIV Gag を標的とするウイルス複製抑制能の強い CTL が誘導される。特に感染早期に Gag₂₀₆₋₂₁₆ (IINEEAADWDL) エピトープ特異的 CTL 反応が誘導され (31)、ウイルスはこの CTL 反応からのエスケープ変異である、

- GagL216S 変異 (Gag の 216 番目アミノ酸がロイシン[L]からセリン[S]に置換) を速やかに獲得する。感染 1 年目までには、Gag₂₄₁₋₂₄₉ (SSVDEQIQW) エピトープ特異的 CTL および Gag₃₇₃₋₃₈₀ (APVPIPFA) エピトープ特異的 CTL 反応の誘導がみられ、それぞれの CTL からのエスケープ変異である、

- GagD244E 変異 (Gag の 244 番目アミノ酸がアスパラギン酸[D]からグルタミン酸[E]に置換)

・GagV375A 変異 (Gag の 375 番目アミノ酸がバリン[V]からアラニン[A]に置換)
を含む複数の gag 変異を蓄積したウイルスが選択される (20, 36)。その他、MHC-I
ハプロタイプ A に関連する CTL エピトープとして、Vif₁₁₄₋₁₂₄ (FPCFTAGEVRR)、
Nef₉₋₁₉ (RSRPSGDLRQR)、Nef₈₉₋₉₇ (DIDEEDDDL) および Nef₁₉₃₋₂₀₃
(YLMHPAQT SQW) が同定されており、これらの CTL からのエスケープ変異
として、

- ・ VifP115S 変異 (Vif の 115 番アミノ酸がプロリン[P]からセリン[S]に置換)
- ・ NefP12Q 変異 (Nef の 12 番アミノ酸がプロリン[P]からグルタミン[Q]に置換)
- ・ NefS201Y 変異 (Nef の 201 番アミノ酸がセリン[S]からチロシン[Y]に置換)

等が報告済みである (37)。

GagL216S 変異のみを単独でもつウイルスは野生型よりも *in vitro* 複製能が低
く、Gag₂₀₆₋₂₁₆ エピトープ特異的 CTL 反応を示さない A 陰性個体へ感染性プラス
ミド DNA クローンの形で接種すると、3 か月以内に野生型へ復帰変異を起こし
た (25)。この GagL216S を含む複数の gag 非同義変異を蓄積した SIV の *in vitro*
複製能は GagL216S 変異のみを単独でもつ SIV よりもさらに低下していたが、
複数の gag 非同義変異を有するウイルスの A 陰性アカゲザル群への伝播実験で
も、接種個体は持続的なウイルス血症を示した (48)。感染後 1 年目でも一部の
復帰変異を呈しただけで gag 非同義変異の多くは維持され、さらに複数の新た
な変異の選択も認められた。私が予備解析したこの結果は、複数の CTL エスケ

ープ変異を蓄積した SIV が宿主内で持続的な複製を可能とし、変異を維持したままさらに他個体へと伝播して新たな変異を獲得する可能性を示唆するものである。

そこで本研究では、HIV 伝播に伴うウイルス変化を知る目的で、上記の HIV 感染者の解析だけでは解決できない①～③の 3 点に着目して、サルエイズモデルにおいて単回の伝播ではなく 3 代に渡って SIV を伝播させる実験を行い、ウイルス変化および個体レベルの増殖能の変化を調べることにした。特定の MHC-I ハプロタイプを有するアカゲザル個体内で感染慢性期にウイルスゲノムに複数の変異を蓄積した SIV を含む血漿を、MHC-I ハプロタイプの異なる別のサルに接種し、この操作をさらに 2 回繰り返した。伝播させる個体はすべて MHC-I ハプロタイプを共有しないように選定し、同じ遺伝子型の個体間での伝播は考えにくい実際の HIV 伝播の状況に近く、また個体内でウイルスが獲得した CTL エスケープ変異の伝播による復帰変異の有無が評価できるように設定した。3 代伝播実験におけるウイルスゲノムの変化を調べるとともに、3 代伝播で得られた SIV の *in vitro* 複製能ならびに個体レベルの増殖能を解析し、個体間の伝播を繰り返した免疫不全ウイルスがどのように変化していくかを検討した。

2 方法

本研究では、SIVmac239 接種実験を行ったアカゲザル 1 頭 (36) の感染後 1 年目の血漿をアカゲザル 4 頭に接種することから始め、血漿の伝播を繰り返した。従って、「材料と方法」の項目 2-1(2)で記載する内容は、本研究開始以前に行われたものである。

2-1 実験動物および検体処理方法

(1) 実験動物

動物実験は、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターおよび京都大学ウイルス研究所において、国立感染症研究所、医薬基盤研究所および京都大学ウイルス研究所の動物委員会の承認のもと行った。ビルマ産アカゲザル (rhesus macaques [*Macaca mulatta*]) 18 頭を使用した。血液採取、ウイルス接種などの処理は、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターでは予防衛生協会により、また、京都大学ウイルス研究所では三浦智行准教授らにより、塩酸ケタミン 10 mg/kg 筋肉内注射による全身麻酔下にて行われた。サルの MHC クラス I (MHC-I) ハプロタイプについては、東京医科歯科大学の木

村彰方教授らが、reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) および *Mamu-A*・*Mamu-B* アレルクローニングにより決定した (表 1, 8) (2, 31)。

(2) ウイルス接種

最初にウイルスを接種した 1 頭 (#11) (36) には 1000 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) の SIVmac239 を経静脈接種した (23)。ウイルスストックの感染力価 (TCID₅₀) は、MT4-R5 細胞を用いて測定されたものである (44)。

(3) 末梢血単核球 (PBMC) および血漿の分離

アカゲザルの末梢血は、鼠径部より、クエン酸ナトリウム入り真空採血管に採取した。全血を遠心分離して、上層の血漿を回収した。その後、buffy coat を Ficoll-Paque plus (GE Healthcare) に重層し、密度勾配遠心法により末梢血単核球 (PBMC、peripheral blood mononuclear cell) を分離した。血漿は-80°C超低温フリーザーで凍結保存し、PBMC はセルバンカー (ZENOAQ) に浮遊させた後、-150°C超低温フリーザーで凍結保存した。

(4) サルへの SIV 陽性血漿の接種

最初にウイルスを接種した 1 頭 (36) (1 代目) の接種後 1 年目の血漿を上記 2-1(3)の要領で分離し、200 μ l を新規個体 (2 代目) に経静脈接種した。その感染後 1 年目の血漿を同様に分離し、200 μ l を新規個体 (3 代目) に経静脈接種した。その感染後 1 年目の血漿を同様に分離し、200 μ l を新規個体に経静脈接種した。

2-2 ウイルス学的解析

(1) 血漿中ウイルス RNA 定量

血漿中ウイルス RNA コピー数の定量は、RNA サンプルを段階希釈し、nested RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) で end-point を検出する限界希釈法を用いて行った。

上記 2-1(3)の要領で分離した血漿から High Pure Viral RNA Kit (Roche Applied Science)を用いて抽出したウイルス RNA サンプルを 5 倍ずつ段階希釈していき、それぞれの希釈サンプルをテンプレートとして nested RT-PCR を行った。PrimeScript One Step RT-PCR kit Ver.2 (TaKaRa) を使用して RT-PCR を行った後、Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて 2 回目の PCR を行った。2 回の PCR 反応には、

下記のプライマーセットを使用した。

<ウイルス RNA 定量用プライマー>

[RT-PCR プライマーセット]

5'-¹³¹⁸AGA AAC TCC GTC TTG TCA GG¹³³⁷-3'

5'-¹⁹¹⁸TGA TAA TCT GCA TAG CCG C¹⁹⁰⁰-3'

[第 2 回 PCR プライマーセット]

5'-¹⁴⁴²GAT TAG CAG AAA GCC TGT TGG¹⁴⁶²-3'

5'-¹⁸⁵²TGC AAC CTT CTG ACA GTG C¹⁸³⁴-3'

(プライマーの両端の数値は SIVmac239 の塩基配列番号[GenBank accession number M33262]を表している。)

各希釈段階の RT-PCR の陽性率から Reed-Muench 法に従って、血漿中ウイルス RNA コピー数を計算した (31, 44)。なお、Amplicor HIV-1 Monitor (Roche Diagnostics) で定量した HIV-1 を対照とし HIV-1 *vpu* 特異的プライマーを用いた限界希釈法によって標準化した SHIV ストックを外部標準として、血漿中 SIV (*gag*) RNA コピー数を定量した。

(2) 血漿中ウイルス量に関する統計学的解析

3代伝播 SIV 感染サル の血漿中ウイルス量 (対数值) に関する統計学的解析については、Prism software version 4.03 (GraphPad Software, Inc.) を使用し、unpaired t-test により行った。

(3) ウイルスゲノムの塩基配列決定

血漿中ウイルス RNA については定量の際と同様に抽出を行った (上記 2-2(1) 参照)。PBMC 中プロウイルス DNA は DNeasy (QIAGEN) を用いて抽出した。増幅するゲノム領域に合わせて、下記 3 組の第 1 回 PCR プライマーセットと第 2 回 PCR プライマーセットを用意し、nested RT-PCR あるいは nested PCR によりウイルスゲノム cDNA を増幅した。RT-PCR には PrimeScript One Step RT-PCR kit Ver.2 を用い、PCR には KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO) を使用した。

増幅した DNA 断片を精製した後、dye-terminator 法により塩基配列の解析を行った。増幅領域に応じて下記のプライマーを使用しサイクルシーケンスを行い、その産物をエタノール沈殿し、HiDi Formamide に溶解した後、3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems/ HITACHI) を使用して塩基配列の解析を行った。

<SIVmac239 gag 領域用>

[第1回 PCR プライマーセット]

5'-¹¹⁹⁴GTA CCA GAC GGC GTG AGG¹²¹¹-3'

5'-³⁰¹⁶TTG CCT AAA ACT TCT ATT TCT AC²⁹⁹⁴-3'

[第2回 PCR プライマーセット]

5'-¹²³¹TCC GGT TGC AGG TAA GTG C¹²⁴⁹-3'

5'-²⁹⁵⁸TTC CTC CTA CTA TTT TTG GGG²⁹³⁸-3'

[シーケンス用プライマー]

5'-¹⁷⁶⁰CGA GAA CAT TAA ATG CCT GGG¹⁷⁸⁰-3'

5'-²³¹⁶GGG GCT GGG TGT GAA TCC²³³³-3'

5'-¹⁹⁶⁰GCT GCA AGT CCC AAT CTG C¹⁹⁴²-3'

<SIVmac239 *vif* 領域用>

[第1回 PCR プライマーセット]

5'-⁴⁷⁸⁹TGG AAA AGA TAG AGC CAG CAC⁴⁸⁰⁹-3'

5'-⁷⁰¹²AGT ATC CCT ATT CTT GGT TGC⁶⁹⁹²-3'

[第2回 PCR プライマーセット]

5'-⁴⁸²⁹CCA TAG TAA TGT AAA AGA ATT GG⁴⁸⁵¹-3'

5'-⁷⁰⁰⁰CTT GGT TGC ACA AAA GAG GG⁶⁹⁸¹-3'

[シーケンス用プライマー]

5'-⁵⁹⁸⁶GTT GTT CTC CCC TGA TGG C⁵⁹⁶⁸-3'

5'-⁶⁴⁸⁰TCC AGA ACC TCC ACT ACC C⁶⁴⁶²-3'

<SIVmac239 *nef* 領域用>

[第1回 PCR プライマーセット]

5'-⁸⁶⁵⁹AAA GGA CCA GGC GCA GCT G⁸⁶⁷⁷-3'

5'-¹⁰²³⁸ACT GAA TAC AGA GCG AAA TGC¹⁰²¹⁸-3'

[第2回 PCR プライマーセット]

5'-⁸⁶⁷⁷GAA TGC TTG GGG ATG TGC G⁸⁶⁹⁵-3'

5'-¹⁰¹⁹⁶AAG TGG GCG TTC CCG ACC¹⁰¹⁷⁹-3'

[シーケンス用プライマー]

5'-⁹⁴⁹⁹AGG GAC AGA AAT ACA ATC AGG⁹⁵¹⁹-3'

5'-⁹⁷²³CTT CCA GTC CCC CCT TTT C⁹⁷⁰⁵-3'

(4) 次世代シーケンサーによる血漿中ウイルスゲノムの塩基配列解析

血漿中ウイルス RNA については定量の際と同様に抽出を行った（上記 2-2(1) 参照）。下記の第1回 PCR プライマーセットと第2回 PCR プライマーセットを用意し、nested RT-PCR により、SIV Gag CA（カプシド）N 末端側半分をコード

する領域を増幅した。

[第1回 PCR プライマーセット]

5'-¹¹⁹⁴GTA CCA GAC GGC GTG AGG¹²¹¹-3'

5'-³⁰¹⁶TTG CCT AAA ACT TCT ATT TCT AC²⁹⁹⁴-3'

[第2回 PCR プライマーセット]

5'-¹⁷⁶⁰CGA GAA CAT TAA ATG CCT GGG¹⁷⁸⁰-3'

5'-²⁴⁶³CCT CTG TTG GGC TGC TGC²⁴⁸⁰-3'

増幅した DNA 断片を精製した後、100 ng DNA/16 μ l に調製し、GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche Applied Science) を用いて両端に MID を付加した。MID を付加した PCR 産物は Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) で精製し、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) で MID 付加 PCR 産物の長さや品質を確認した。各サンプルはコピー数を 1×10^7 copies/ μ l に調製したのち等量混合し、GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L) (Roche Applied Science) でエマルジョン PCR を行った。エマルジョン PCR によりキャプチャビーズ上でモノクローナルに増幅された増幅産物は GS Junior Titanium Pico Titer Plate (Roche Applied Science) 上に固定し、GS junior system (Roche Applied Science) によって解析した。得られたリードは GS amplicon

variant analyzer (AVA) software (Roche Applied Science) によって解析し、CA 領域変異の同定とその出現比率の算出及び全リードの fasta file の作成を行った。

作成した fasta file については、SIV Gag CA コード領域内の塩基配列番号 68～482 までの 414bp に配列長を統一しアライメントをかけた。系統樹のレファレンスには、Los Alamos HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) より以下の 19 配列を取得して用いた。

MAC.US.x.239.M33262

MAC.US.x.251_1A11.M76764

MAC.US.x.251_32H_PJ5.D01065

MAC.US.x.251_BK28.M19499

MAC.US.x.81035.AY599200

MAC.US.x.85013.AY611490

MAC.US.x.92050.AY603959

MAC.US.x.93057.AY611492

MAC.US.x.95058.AY611494

MAC.US.x.96072.AY611491

MAC.US.x.96093.AY611489

MAC.US.x.96135.AY607702

MAC.US.x.97009.AY599199

MAC.US.x.97074.AY599198

MAC.US.x.MM142_IVMXX.Y00277

MAC.US.x.r90131.AY576481

MAC.US.x.SMM142_patent.BD131285

MNE.US.82.MNE_8.M32741

MNE.US.x.MNE027.U79412

最尤法による系統樹は、MEGA 6 software (<http://www.megasoftware.net/>) によって gamma distribution と General Time Reversible model に基づいて推定計算を行い作成した。これらの解析は、国立感染症研究所エイズ研究センターの西澤雅子研究員が、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの佐藤裕徳室長・横山勝主任研究官らの協力のもと行った。

(5) 血漿中ウイルスの濃縮

上記 2-1(3)の要領で分離した血漿 700 μ l を 0.45 μ m フィルター (Millipore) で濾過した後、Lenti-X concentrator (TaKaRa/Clontech) と 4°C で 30 分混合し、1,500 \times g、4°C 45 分間の遠心で 120 μ l に濃縮した。

(6) 血漿由来ウイルスの *in vitro* 複製能の解析

上記 2-2(5)の要領で濃縮した血漿 $50 \mu\text{l}$ を 1×10^5 個のサル CD4 陽性 T 細胞株 HSC-F (1) と培養し、2 日毎に培養上清を回収した。培養上清中のウイルス量を SIV Gag p27 検出用 ELISA キット、SIV p27 Antigen Capture Assay (Advanced BioScience Laboratories, Inc.) を用いて測定し、培養上清中へのウイルス産生を確認した。ウイルス RNA コピー数の定量は上記 2-2(1)の要領で行った。培養開始から 6~14 日目の上清サンプルを $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過した後、aliquot に分注し、実験用ウイルスストックとして -80°C 超低温フリーザーで凍結保存した。ウイルスストックに含まれるウイルス RNA の塩基配列は上記 2-2(3)の要領で決定した。

血漿由来のウイルスの *in vitro* 複製能を野生型の SIVmac239 と比較するため、以下に示す方法でコンペティションアッセイを行った。HSC-F で産生された野生型のウイルスを SIV Gag p27 で 0.2ng に相当する分量測り取り、 2×10^5 個の HSC-F に感染させた。同時に、血漿由来ウイルスストック $2 \sim 12 \mu\text{l}$ を 2×10^5 個の HSC-F に感染させた。翌日、各感染細胞を半量ずつ採取して共培養を開始し、以後 2 日毎に培養上清を回収した。またウイルスの複製を維持・促進するため、共培養開始から 10 日後に 1×10^5 個の HSC-F を培養液中に添加した。経時的に回収した培養上清に含まれるウイルス RNA の gag の塩基配列を上記 2-2(3)の要領で解析し、野生型と比べて優位かを調べた。各々の組み合わせについて 2

回ずつ実験を行った。

2-3 免疫学的解析

抗原刺激特異的に interferon- γ (IFN- γ) を産生する CD8 陽性 T リンパ球を細胞内 IFN- γ の免疫染色後フローサイトメトリーで検出することにより、抗原特異的 CTL レベルの測定を行った。

各アカゲザルの PBMC に herpesvirus papio を感染させて autologous B lymphoblastoid cell lines (B-LCL) を樹立し (49)、この B-LCL を抗原刺激用細胞として使用した。ペプチド刺激特異的 CTL レベルを測定するためには、B-LCL にペプチド (Sigma Genosys) をパルスし、細胞内輸送阻害剤 Golgi Stop (Becton Dickinson) 存在下で PBMC と共培養を行った。またペプチドパルスを行わない B-LCL も PBMC と共培養を行いネガティブコントロールとした。FITC 標識抗ヒト CD4 抗体 (Becton Dickinson)、PerCP 標識抗ヒト CD8 抗体 (Becton Dickinson)、APC 標識抗ヒト CD3 抗体 (Becton Dickinson) を用いて細胞表面染色を行い、Cytofix-Cytoperm (Becton Dickinson) で細胞の固定・膜透過処理を行った後、PE 標識抗ヒト IFN- γ 抗体 (BioLegend) を用いて細胞内染色を行った。測定には FACSCantoII flow-cytometry instrument (Becton Dickinson) を用い、データ解析には FlowJo software version 9.2 (FLOWJO, LLC) を使用した。PBMC 1×10^6 個あ

たりの IFN- γ 産生 CD8 陽性 T リンパ球数を求め、ネガティブコントロールの値を
除算することにより抗原特異的 CTL レベルを決定した。PBMC 1×10^6 個あた
りの CTL レベルが 100 未満の場合には特異的反応陰性と解釈した。

3 結果

3-1 サルにおける SIV 伝播実験 (1~3 代目)

本実験では、野生型 SIVmac239 感染アカゲザル#11 (36) の血漿をもとに 3 代の伝播実験を行った。SIVmac239 ウイルスストックを接種したはじめの 1 頭は MHC-I ハプロタイプ *90-120-Ia* (A)、その後の 7 頭はそれぞれ *90-010-Ie* (E) または *89-002-Ip* (P) を有するアカゲザルである (表 1)。一般的には同じ MHC-I 遺伝子型を有する個体間での伝播頻度は低いことをふまえ、複製能低下に結びつく CTL エスケープ変異の伝播による復帰変異が見込まれる条件にするため、伝播させるウイルス提供個体と受容個体は MHC-I ハプロタイプを共有しないように選定した。所属研究室で樹立した MHC-I ハプロタイプ共有アカゲザル群の中で、SIV 感染後早い病態進行あるいは遅い病態進行を示す群ではない MHC-I ハプロタイプ E あるいは P 共有群を用いることとし、その中で MHC-I ハプロタイプ A を有していないサルを使用した。E 陽性サルについては、E に関連する CTL 反応と CTL エスケープ変異の情報を報告済みである (17)。

#11 (A) (1 代目) の感染後 1 年目の血漿を#21 (E)、#22 (E)、#23 (P)、#24 (P) の 4 頭 (2 代目) に伝播させた (図 4)。4 頭の感染後 1 年目の血漿のうち #21 (E) の感染後 1 年目の血漿は#31 (P) へ、#22 (E) の感染後 1 年目の血漿

は#32 (P) へ、#23 (P) の感染後 1 年目の血漿は#33 (E) へ伝播させた。この計 3 頭 (3 代目) の感染後 1 年目の血漿 (3 代目 SIV) が得られるまで観察を行った。A 陽性群から A 陰性群を 2 回伝播させることによって生じるウイルス変化について、A→E→P、A→P→E の 2 系列で実験を行い、再現性のある点を抽出することを試みた。

観察期間中、7 頭中 6 頭が持続性のウイルス血症を示した (図 5)。#24 (P) のみ感染後 3 か月のセットポイント期以降は血漿中ウイルス量が検出限界 (400 コピー/ml) 未満となった。その一方で、#32 (P) では体重減少、下痢、全身衰弱などエイズ発症を示す臨床症状が認められ、感染後半年で安楽殺に至った。

3-2 伝播 SIV のウイルス学的解析

(1) 伝播に伴う *gag/vif/nef* 非同義変異の蓄積

#11 (A) の SIV 感染後 1 年目の血漿中ウイルス (1 代目 SIV) には、CTL エスケープ変異を含む多数の変異が認められた (36)。そこで私は、特異的 CTL 反応が SIV 複製抑制に効果を示しエスケープ変異の報告 (16, 20, 37) もある *gag/vif/nef* に関して 2、3 代目の血漿中 SIV の塩基配列を解析し、ダイレクトシーケンスで信号が野生型よりも優位となる *dominant mutations* をまとめた (表

2～4)。

gag 非同義変異 (表 2) に関しては、A の CTL エスケープ変異であると判明している (22)、

- ・ *Gag*₂₀₆₋₂₁₆ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の *Gag*L216S 変異
- ・ *Gag*₂₄₁₋₂₄₉ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の *Gag*D244E 変異
- ・ *Gag*₃₇₃₋₃₈₀ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の *Gag*V375M 変異
(*Gag* の 375 番目アミノ酸がバリン[V]からメチオニン[M]に置換)

を含む 8 つの変異が 1 代目 SIV で優位となっていた (36)。#21 (E) においては、感染から 3 か月の間にこの 8 つのうち 3 つの変異が復帰変異を起こし、感染後 1 年目 (2 代目 SIV) までにはさらに 1 つの復帰変異と新たに 1 つの変異が加わったので、合計で 5 つの変異が優位となった。復帰した 4 つの変異はいずれも SIV *Gag* CA (*Gag* のアミノ酸 136 番～364 番) の N 末端側の半分をコードする領域に含まれる。このうち 1 つは A のエスケープ変異 *Gag*L216S である。#22 (E)、#23 (P) では感染から 3 か月の間には変化がなかったが、1 年目までに新たに変異が加わった。E 陽性サルでは *Gag*₃₈₅₋₄₀₀ を標的とする CTL 反応の報告があり (17)、#22 の、

- ・ *Gag*P390S 変異 (*Gag* の 390 番目アミノ酸がプロリン[P]からセリン[S]に置換) はそのエスケープ変異である可能性がある。#24 (P) では感染から 3 か月の間に新たに 2 つの変異が加わった。この個体は 3 か月目以降で血漿中のウイルス

量が検出限界以下となり RNA の塩基配列を調べる対象から除外した。

#22 (E) から血漿を伝播させた#32 (P) では、感染から 3 か月の間に復帰変異が 2 つと新たな変異が 1 つ加わり、安楽殺時の感染後 6 か月までには復帰した変異が 1 つ再び優位となった。#21 (E) から血漿を伝播させた#31 (P) では、感染から 3 か月の間に新たに 2 つの変異が加わり、感染後 1 年目 (3 代目 SIV) までにはそのうち 1 つが復帰変異を起こしたがさらに 2 つの新たな変異が加わったので、合計 8 つの変異が優位となった。#23 (P) から血漿を伝播させた#33 (E) では、感染から 3 か月の間に 2 つの変異が復帰変異を起こしたが感染後 1 年目 (3 代目 SIV) までには復帰した変異が 1 つ再び優位となり、新たな変異が 1 つ加わったので合計 13 の変異が優位となった。1 代目 SIV で出現した A のエスケープ変異のうち 3 代目 SIV となるまでに復帰したものは、#21 (E) での GagL216S のみである。

vif 非同義変異 (表 3) に関しては、A で判明した (37) Vif₁₁₄₋₁₂₄ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の VifP115S を含む 2 つの変異が 1 代目 SIV で優位となっていた (36)。

#21 (E) においては、感染から 3 か月の間に dominant mutations に変化はなく、感染後 1 年目までには新たに 1 つの変異が加わった。E 陽性サルでは Vif₆₅₋₇₆ を標的とする CTL 反応の報告があり (17)、#21 の、

・VifH66Y 変異 (Vif の 66 番目アミノ酸がヒスチジン[H]からチロシン[Y]に置換)

はそのエスケープ変異である可能性がある。#22 (E) では感染から 1 年間に dominant mutations に変化はなかった。#23 (P) では感染から 3 か月の間に新たに 1 つの変異が加わり、1 年目までにはさらに 2 つの変異が加わった。#24 (P) では感染から 2 か月の間に変化はなく、感染後 1 年目のデータは gag 同様 PBMC 中プロウイルス DNA の塩基配列で同様に変化はなかった。

#21 (E) から血漿を伝播させた#31 (P) では感染後 3 か月までに新たな変異が 2 つ加わり、感染後 1 年目までそのままであった。#22 (E) から血漿を伝播させた#32 (P) では安楽殺時の感染後 6 か月まで変化はなかった。#23 (P) から血漿を伝播させた#33 (E) では、感染から 3 か月の間に新たな変異が 1 つ加わり、感染後 1 年目までにはさらにもう 1 つ加わった。1 代目 SIV で出現した A のエスケープ変異 VifP115S は 3 代目 SIV まですべての個体で維持された。

nef 非同義変異 (表 4) に関しては、A で判明した (37)、

- Nef₉₋₁₉ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の NefP12Q
- Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の NefS201Y

を含む 5 つの変異が 1 代目 SIV で優位となっていた (36)。

#22 (E) においては、感染から 3 か月の間にこの 5 つのうち 2 つが復帰変異を起こし、1 つはアミノ酸が変化し、新たに 4 つの変異が加わった。感染後 1 年目までには新たな変異のうち 3 つが復帰変異を起こし、新たに 7 つの変異が加わったので、合計 11 の変異が優位となった。この新たな変異のうち、

・ NefL53P 変異 (Nef の 53 番アミノ酸がロイシン[L]からプロリン[P]に置換)

は、E の Nef₄₅₋₅₃ (GLDKGLSSL) エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異であることが判明している (17)。#21 (E)、#23 (P) では 1 代目 SIV の変異をほぼ維持しながら、新たな変異とその復帰変異を経て感染後 1 年目までに優位となる変異が増えた。ウイルスゲノムの変化は感染後 3 か月目にはすでに始まっていた。#21 (E) の感染後 1 年目で出現した、

・ NefL53H 変異 (Nef の 53 番アミノ酸がロイシン[L]からヒスチジン[H]に置換)

は E の Nef₄₅₋₅₃ エピトープ上にあり、エスケープ変異である可能性がある。#24 (P) では感染後 2 か月までに新たな変異が 6 つ加わった。感染後 1 年目のデータは *gag*、*vif* 同様 PBMC 中プロウイルス DNA の塩基配列であり、1 代目 SIV の配列から新たな変異が 1 つ加わったのみであった。

#21 (E) から血漿を伝播させた#31 (P) では感染から 3 か月の間に 2 つの復帰変異が起きたが新たに 11 もの変異が出現した。感染後 1 年目までにはこのうちの 7 つと#21 から引き継いだ 4 つが復帰変異を起こし、新たな変異が 2 つ加わったので、変化は大きかったが優位な変異の個数は最終的に#21 と同じであった。

#22 (E) から血漿を伝播させた#32 (P) では、感染後 3 か月までに 5 つの変異が復帰変異を起こし、#22 の 3 か月目までは優位だった変異が 1 つ再び優位となった。安楽殺時にはさらに 1 つの復帰変異と新しい変異が 2 つ認められた。#23

(P) から血漿を伝播させた#33 (E) では、新たな変異とその復帰変異を経て感

染後 1 年目までに優位となる変異が増えた。ウイルスゲノムの変化は感染後 3 か月目にはすでに始まっていた。このように *nef* では *gag*、*vif* に比べて多様性が大きく、出現後に長く維持される変異は多くないが、1 代目 SIV で出現した MHC-I ハプロタイプ A のエスケープ変異 NefP12Q 変異は #32 (P) を除く 3 代目 SIV まですべての個体で維持された。NefS201Y 変異は、3 代目 SIV では感染後 1 年目の時点で変異先のアミノ酸がすべて Y ではなく H など他のアミノ酸となっていて残っていた。

感染後 1 年目の血漿中ウイルス RNA の *gag*、*vif*、*nef* 塩基配列では、dominant mutations の個数が

1 代目 SIV の #11 (A) で *gag* 8、*vif* 2、*nef* 5

2 代目 SIV の #21 (E) で *gag* 5、*vif* 3、*nef* 13、#22 (E) で *gag* 9、*vif* 3、*nef* 11、

#23 (P) で *gag* 13、*vif* 5、*nef* 9、#24 (P) で *gag* 8、*vif* 3、*nef* 6、

3 代目 SIV の #31 (P) で *gag* 8、*vif* 5、*nef* 13、#33 (E) で *gag* 13、*vif* 7、*nef* 12

である。したがって感染後 1 年目の塩基配列では、#21 の *gag* を除き、変異の個数はすべて伝播後の個体が伝播前の個体以上であった。伝播の順序 (A→E→P または A→P→E) によらず、MHC-I ハプロタイプの異なる個体に伝播した SIV は伝播前の変異の多くを維持し、伝播後の個体で新たな変異を獲得するため、伝播ごとに変異を蓄積していくことが明らかとなった。

(2) 伝播 SIV の gag cDNA の次世代塩基配列解析に基づく系統樹解析

SIVmac239 伝播実験においては伝播ごとに変異が蓄積する傾向が認められたが、#11 (A) から#21 (E) の伝播では、SIV Gag CA の N 末端側コード領域で復帰変異が比較的多く認められた。そこで、#11 (A) →#21 (E) →#31 (P) の伝播について、血漿中ウイルス由来の SIV Gag CA の N 末端側コード領域の塩基配列を次世代シーケンサーで解析し、その配列に基づいた系統樹解析を行った (図 6)。クラスターはアミノ酸配列で表示しているが、解析は同義変異を含めた塩基配列の相違をもとに行ったものである。#11 (A) の感染後 1 年目、#21 (E) の感染後 1 週目および 1 年目、#31 (P) の感染後 1 週目および 1 年目の血漿中ウイルス RNA を解析したところ、系統樹上では#11 (A) の 1 年目が最も野生型から遠く、#21 (E) への伝播 1 週目では#11 の 1 年目と大きな変化はなかった。#21 (E) への伝播後 1 年間で野生型に近づき、#31 (P) の 1 週目では#21 (E) の 1 年目と大きな変化はなく、#31 (P) の 1 年目で野生型から再び離れていた。この結果は、3-2 (1) で数えた非同義変異の個数の伝播に伴う変化と矛盾しなかった (表 2)。

系統樹の位置が近いことから、D244E 変異をもつ#21 (E) の 1 年目の配列は、#11 (A) の 1 年目に少数存在していた、L216S/D244E を有し比較的野生型に近い配列から L216S 変異が復帰変異を起こす形で出現したことが示唆された。ま

た、感染後 1 週目の配列には接種した血漿中の配列と大きな差がないことから、復帰変異や新たな変異は伝播直後に獲得されるのではなく、感染成立後に選択されていくことが明らかとなった。

(3) 伝播 SIV の *in vitro* 複製能の解析

次に、2 代目および 3 代目 SIV の *in vitro* 複製能について検討を行った。伝播で出現したウイルスゲノムの変異が全ゲノム配列で反映されるように、実験室株の分子クローンをバックボーンとして部分的に変異ウイルスの配列を組み込んだキメラウイルスではなく、濃縮した血漿と培養細胞の共培養で得られるウイルスをストックしてアッセイに使用することを試みた。#21 (E)、#31 (P)、#23 (P)、#33 (E) の感染後 1 年目の血漿を濃縮して HSC-F と共培養し、6~14 日間にわたって培養上清を回収した。上清に含まれる SIV Gag p27 量を ELISA で測定したところ (表 5A)、#21 (E)、#31 (P) は培養 10 日目までに 100 ng/ml 近い濃度となったのに対し、#23 (P)、#33 (E) では 14 日間の培養中に 10 ng/ml を超えることはなかった。そこで上清に含まれるウイルス RNA を抽出し定量を行ったところ (表 5B)、#23 (P)、#33 (E) でも #21 (E)、#31 (P) と同等以上のウイルス産生が認められた。抽出した RNA を使用して、これら血漿由来のウイルスの *gag* の塩基配列を解析し、ダイレクトシーケンスで信号が野生型よ

りも優位となる **dominant mutations** をまとめた (表 6)。#23 (P)、#33 (E) においては、SIV Gag CA コード領域内の変異によって ELISA で使用した抗体が結合できないために、ウイルスが検出されなかった可能性が示唆された。*gag* 領域の塩基配列は、もとの血漿中ウイルス RNA より増幅した cDNA の塩基配列と極めて相同性が高かった。

血漿から回収したバルクの変異ウイルスに関しては、ELISA や PCR による定量を用いて *in vitro* 複製能を解析した場合、変異の影響でアッセイに使用する抗体やプライマーへの感受性が野生型ウイルスと異なるため、野生型との比較が正確に行えない可能性が表 5 の結果から示唆された。そこで、感染細胞同士の共培養で上清中に選択されるウイルスの塩基配列を同定することで、感染させたウイルスの *in vitro* 複製能の優劣を判定するコンペティションアッセイを行った。野生型のウイルスを感染させた HSC-F と血漿由来の変異型ウイルスを感染させた HSC-F を共培養し、2 日毎に培養上清を回収した (図 7)。同じ組み合わせについて、2 回ずつ実験を行った。培養上清に含まれるウイルスの RNA を抽出し、ダイレクトシーケンスにおける野生型と変異型の塩基の信号強度比を調べることで、時間経過とともにどちらのウイルスが優位となるかを解析した (表 7)。事前検討を行い、共培養開始 2 日目には野生型と変異型のどちらの信号も検出されるように変異型ウイルスを感染させる量を調節した。その結果、#31 (P)、#23 (P)、#33 (E) では、共培養開始 2 日目の時点では野生型よりも

変異型の方が優位であっても、開始 12 日目までには逆転して野生型の方が優位となった。培養の組み合わせごとにすべての変異の信号強度比の変化が一様であったことから、これは培養中のウイルスの部分的な復帰変異ではなく、変異型ウイルスが野生型ウイルスの増殖速度に追い付かず上清中の割合を減少させたと考えられた。したがって、#31 (P)、#23 (P)、#33 (E) の感染後 1 年目の血漿由来のウイルスは、野生型よりも *in vitro* 複製能が低いことが示された。#21 (E) では、共培養開始 2 日目から 20 日目の信号強度比の変化はわずかではあったが、やはり野生型が優位となる傾向がみられた。以上より、3 代伝播により得られた SIV は野生型よりも低い *in vitro* 複製能を示した。

3-3 サルへの 3 代目 SIV の感染実験

これまでの 3 代伝播で得られた SIV が、個体レベルでどのような変化および増殖能を呈するかを調べるため、A→E→P と伝播した#31 (P) と A→P→E と伝播した#33 (E) の感染後 1 年目の血漿 (3 代目 SIV を含む) を、各々 A 陽性 (E・P 陰性) アカゲザル 2 頭 (計 4 頭) および A・E・P 陰性アカゲザル 3 頭 (計 6 頭) に経静脈接種した (表 8)。この計 10 頭のアカゲザルについて、血漿接種後半年間の観察を行った。

#31 (P) の感染後 1 年目の血漿は#41 (A)、#42 (A)、#43 (non-A/E/P)、#44

(non-A/E/P)、#45 (non-A/E/P) へ、#33 (E) の感染後 1 年目の血漿は#51 (A)、#52 (A)、#53 (non-A/E/P)、#54 (non-A/E/P)、#55 (non-A/E/P) に接種した。

観察期間中、10 頭すべてが持続性のウイルス血症を示した (図 8)。

3 代目 SIV を接種した A 陽性サル 4 頭の感染 6 か月時点での血漿中ウイルス量について、所属研究室の過去の A 陽性サル 6 頭における野生型 SIVmac239 接種実験結果 (36) と比較すると、3 代目 SIV 接種群のウイルス量が有意に高値を示した ($p = 0.0172$ by unpaired t test、図 9)。一方、3 代目 SIV を接種した A 陰性個体 6 頭の感染 6 か月時点での血漿中ウイルス量について、所属研究室の過去の A 陰性サル 10 頭における野生型 SIVmac239 接種実験結果 (36) と比較すると、有意な差は認められなかった。したがって、伝播によって変異を蓄積した SIV は、野生型 SIV と比較して低い *in vitro* 複製能を有するものの、個体レベルでは野生型と同様の持続感染成立能を有し、感染・伝播を一度経由した個体と同じ MHC-I 遺伝子型を有する別の個体に新規感染した際に高いウイルス量を呈する可能性が示された。

結果 3-2(1)に示したように、#31 (P) および#33 (E) の感染後 1 年目の血漿中のウイルス RNA で観察された dominant mutations の個数は(*gag*、*vif*、*nef*)で#31 (8、5、13)、#33 (13、7、12) であった。これらの変異の中には、A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の GagD244E 変異、GagV375M 変異、VifP115S 変異、NefP12Q 変異が#31 (P)、#33 (E) とともに含ま

れ、1代目 SIV で獲得されたまま維持されていた (表 2~4)。NefS201Y は、変異先のアミノ酸がチロシン以外に変わって変異体が維持されているが、これは CTL 反応からのエスケープ変異として機能している可能性がある。#31 (P) ではさらに A の Nef₉₋₁₉ エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の (37)、

- NefS13P 変異 (Nef の 13 番アミノ酸がセリン[S]からプロリン[P]に置換)

がこの個体で獲得されており、P と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異かどうかは不明である。また#33 (E) では、A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の GagL216S 変異も 1代目 SIV で獲得されたまま維持されている。

そこで私は、*gag/vif/nef* に関して 3代目 SIV を接種した個体の血漿中ウイルスの塩基配列を解析して変異の個数を調べ、特に A 陽性サルについては、3代目 SIV まで維持されていた A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異が維持されているか調べた。ダイレクトシーケンスで信号が野生型よりも優位となる *dominant mutations* をまとめた (表 9~11)。

A 陽性サルである#41、#42、#51、#52 では、接種した血漿中のウイルスが有する A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異をすべて、感染から半年間維持していた。さらに、#31 (P) の血漿を接種した個体である#41、#42 では、#31 (P) の血漿中ウイルスにはない A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の GagL216S が感染後 3 か月以内に優位と

なった。また、#33 (E) の血漿を接種した個体である#52 では、#33 (E) の血漿中ウイルスにはない A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異の NefS13P が感染後 3 か月から 6 か月の間に優位となった。

dominant mutations の個数に関しては、接種から 6 か月の時点で gag 非同義変異では#41 (A)、#52 (A)、#54 (non-A/E/P) で接種した血漿中の個数を下回ったが、残りの 7 頭では維持または上回った。vif 非同義変異ではすべての個体で維持または上回った。nef 非同義変異では、感染後 3 か月の時点では#41 (A)、#51 (A)、#55 (non-A/E/P) で一時的に下回ったが、感染後 6 か月ですべての個体で維持または上回った。

3 代目 SIV の接種実験において、接種した 3 代目 SIV よりも数多くの dominant mutations が検出され、非同義変異はこの伝播によってさらに蓄積する傾向が認められた。また、3 代目 SIV まで維持されていた A と関連するエピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異は維持され、A 陽性サルにおけるウイルスの増殖能・病原性に影響を及ぼした可能性が示唆された。

3-4 サルでの SIV 伝播実験における CTL 反応

SIV 伝播実験に用いたサルにおいて、感染後 3 か月目の Gag/Vif/Nef 特異的 CTL 反応の測定を行った。Gag 特異的 CTL 反応は#22 (E)、#24 (P) 以外のすべて

の個体で、Nef 特異的 CTL 反応は#32 (P) 以外のすべての個体で検出された (図 10A)。Vif 特異的 CTL 反応は#21 (E) で検出されたが、他の個体では検出されなかった。ここに含まれる、エスケープ変異選択を引き起こすエピトープ特異的 CTL 反応のレベルは不明だが、これらの結果は伝播実験で特に Gag と Nef で dominant mutations の個数が増えた結果 (表 2~4) と矛盾しない。特に Gag 特異的 CTL 反応の高い#23、#32 はともに P 陽性サルで、GagI140V が出現しており (表 2)、CTL エスケープ変異である可能性がある。Vif でも#21 では感染後 1 年目に VifH66Y が出現しており (表 3)、CTL エスケープ変異である可能性がある。

次に、3 代目 SIV を接種したサルにおいても、感染後 3 か月目の Gag/Vif/Nef 特異的 CTL 反応の測定を行った。Gag 特異的 CTL 反応は#51 (A)、#53 (non-A/E/P)、#55 (non-A/E/P) 以外のすべての個体で検出され、検出されなかった個体はすべて gag 非同義変異の個数がより多い#33 (E) の血漿を接種した 5 頭中の個体であった (図 10B)。Nef 特異的 CTL 反応は#44 (non-A/E/P)、#55 (non-A/E/P) 以外のすべての個体で検出された。#11 の結果が示すように、A 陽性サルでは Gag に対する反応が通常は Nef に対する反応よりも高いが、3 代目 SIV 接種 A 陽性サルでは 4 頭中 3 頭で Nef に対する反応の方が高い傾向が見られた。Vif 特異的 CTL 反応は#43 (non-A/E/P)、#44 (non-A/E/P)、#51 (A)、#52 (A) で検出されたが、他の個体では検出されなかった。感染後 6 か月で#44 では、

・ VifY143H 変異 (Vif の 143 番目アミノ酸がチロシン[Y]からヒスチジン[H]に置

換)

が、#51 では、

- ・VifS65N 変異 (Vif の 65 番目アミノ酸がセリン[S]からアスパラギン[N]に置換)
- ・VifI89V 変異 (Vif の 89 番目アミノ酸がイソロイシン[I]からバリン[V]に置換)

が出現しており (表 10)、それぞれ CTL 反応からのエスケープ変異である可能性がある。

3 代目 SIV 接種 A 陽性サルについては、感染後 1.5 か月と 4 または 5 か月の A と関連するエピトープ Gag₂₀₆₋₂₁₆、Gag₂₄₁₋₂₄₉、Gag₃₇₃₋₃₈₀ (を含む Gag₃₆₇₋₃₈₁) 特異的 CTL レベルの測定を行った (表 13)。GagL216S 変異、GagD244E 変異、GagV375M 変異を有する#33 (E) の血漿を接種した#51、#52 では、どちらのタイムポイントでも特異的反応は検出されなかった。GagD244E 変異、GagV375M 変異を有する#31 (P) の血漿を接種した#41 では 1.5 か月で Gag₂₀₆₋₂₁₆ エピトープ特異的 CTL 反応、4 か月ではそれに加えて Gag₂₄₁₋₂₄₉ エピトープ特異的 CTL 反応も検出された。#42 では 1.5 か月で Gag₂₀₆₋₂₁₆、Gag₂₄₁₋₂₄₉、Gag₃₇₃₋₃₈₀ エピトープ特異的 CTL 反応が検出されたが、これらの反応は 4 か月では消失していた。#41、#42 とも感染後 3 か月の時点で GagL216S 変異が出現しており (表 9)、Gag₂₀₆₋₂₁₆ エピトープ特異的 CTL 反応のためと考えられる。

4 考察

本研究では、MHC-I 遺伝子型の多様な個体間の伝播が免疫不全ウイルスの変化に及ぼす影響について、HIV 感染ヒト集団における解析だけでは明らかにできない以下の3点について解析を行った。

- ① 特定の複数個体間におけるウイルス伝播の直接的な追跡
- ② 伝播によって出現した変異ウイルスそのものの *in vitro* 複製能
- ③ 伝播によって出現した変異ウイルスの新規個体における増殖能

初めに①として、MHC-I ハプロタイプ A 陽性アカゲザル#11 (1代目) に野生型 SIVmac239 を接種した1年目の血漿を A 陰性 E 陽性または A 陰性 P 陽性アカゲザル2頭ずつ (2代目) に接種した。この感染1年後の血漿を A・E 陰性 P 陽性あるいは A・P 陰性 E 陽性アカゲザル (3代目) に接種し、各個体の血漿中のウイルス量とウイルス RNA の塩基配列を、感染1年後の血漿 (3代目 SIV を含む) を得るまで経時的に解析した。その結果、伝播の順序 (A→E→P または A→P→E) によらず、血漿を接種した個体は野生型ウイルス接種群と同様に持続的なウイルス血症を示した (図6)。1代目 SIV にはもともと多数の CTL エスケープ変異を含む非同義変異が認められていたが、その多くが2代目のみならず3代目 SIV でも復帰変異を起こすことなく維持された (表2~4)。さらに2、3代目 SIV でも感染個体の MHC-I 遺伝子型に応じて新たな非同義変異が獲得され、

伝播を重ねることにより変異は蓄積した。

次に②の解析として、伝播で出現した変異が全配列で反映されたウイルスをアッセイに用いるために、実験室株の分子クローンをバックボーンとして部分的に変異ウイルスの配列を組み込んだキメラウイルスではなく、血漿と培養細胞の共培養で得られるウイルスをストックして野生型 SIV と複製能を比較する実験を行った。#21 (E)、#23 (P) の 2 代目 SIV、#31 (P)、#33 (E) の 3 代目 SIV の *in vitro* 複製能をコンペティションアッセイでそれぞれ野生型と比較したところ、2、3 代目 SIV は野生型よりも *in vitro* 複製能が低かった (表 7)。この実験手法で評価できない点として、変異ウイルスをバルクのまま扱うため、変異ウイルスが一様に *in vitro* 複製能が低いのか、高いウイルスと低いウイルスが混在しているかを判断出来ないことが挙げられる。これを補うには、血漿由来のウイルスのクローニングを行い、変異ウイルスクローン各個の *in vitro* 複製能を野生型 SIV と比較すればよい (なお所属研究室で過去に行った、MHC-I ハプロタイプ A 陽性個体の SIV 感染血漿中に観察された変異ウイルスクローンの *in vitro* 複製能解析では、GagL216S、GagD244E の 2 つの変異を有するウイルスの複製能は野生型に比べて低く、Gag 領域にこの他に追加で変異を有するようなウイルスで複製能が野生型と同程度以上となるような例は見つからなかった (20))。しかし、*in vitro* 複製能に差があるウイルスのバルクにおける割合の影響を含めた、バルク変異ウイルスの総和としての *in vitro* 複製能を解析したこと

は、伝播によって出現した変異ウイルスそのものを調べるという点で、クローンウイルスを解析することと同等以上の意義があると考えられる。

ウイルスの複製能が大きく低下しないエスケープ変異に関しては、MHC-I ハプロタイプの異なる個体に伝播しても復帰変異が起こらないという報告 (33) もあるが、複製能低下をもたらすエスケープ変異が直接的な復帰変異を起こさない原因としては、複製能を回復させる補償変異の新規選択の可能性がある (6, 12, 22, 40, 50)。しかし本研究では、複数の変異が復帰せず *in vitro* 複製能が低下したまま伝播が継続していた。

最後に③のために、3代目 SIV のうち#11 (A) →#21 (E) →#31 (P) と伝播した#31 (P) の感染1年目の血漿と、#11 (A) →#23 (P) →#33 (E) と伝播した#33 (E) の感染1年目の血漿をさらに4頭のA陽性アカゲザルと6頭のA陰性アカゲザルに接種して、各個体の血漿中のウイルス量とウイルスRNAの塩基配列を経時的に解析した。その結果、3代目 SIV 接種サルも持続的なウイルス血症を示し、接種した3代目 SIV に認められていた非同義変異の多くが復帰変異を起こすことなく維持され、新たな非同義変異の選択が認められた。特記すべきことに、3代目 SIV を接種したA陽性群では感染後6か月の血漿中ウイルス量が野生型ウイルス接種群に比べて有意に高かった (図9)。Aと関連するGag₂₀₆₋₂₁₆やGag₂₄₁₋₂₄₉ エピトープ等を標的とするCTLが複製抑制に貢献できなかった (表13) ことが、高いウイルス量に結びついたと考えられる。以上のこと

から、免疫不全ウイルスが MHC-I ハプロタイプの異なる複数の個体を伝播するとき、*in vitro* 複製能が一見低下していても必ずしも個体内でのウイルス量は低下せず、特に感染・伝播を一度経由した個体と同じ MHC-I 遺伝子型を有する個体ではウイルス量が高くなる可能性が示された。

本研究は、HIV 伝播に伴うウイルス変化の解析を目指したものであるが、血漿を接種する経路としては経静脈を選択して実験を行っている (2-1 (4))。本研究を発展させる形で、ヒトにおける HIV 伝播の主な感染経路である経粘膜での伝播実験をサルモデルで行うことも意義があると考えられる。また、経粘膜感染実験を行う際には、経静脈感染時に比べ低濃度のウイルスストックを複数回接種することで実際の感染を模倣する方法を用いることとなり (46)、血漿の粘膜接種で感染を成立させる手法は未だ確立されていない。したがって、血漿を用いた伝播実験の第一段階として本研究では先に手法が確立された経静脈接種を行った。

近年、ヒト HIV 感染者の解析で、経時的な HIV の HLA 遺伝子型への適応を示唆する報告がなされてきている (9, 11, 19, 21, 24)。また、集団レベルで変化した HIV の *in vitro* 複製能が野生型と比較して低下したとする報告がある (35)。本研究の①、②の解析結果は、これらの HIV 感染ヒト集団の研究結果を支持し、さらにヒトで実施することが困難な解析についてサルエイズモデルで示したものである。ヒト集団で蔓延している HIV ゲノムの多様性は極めて高く、そもそ

も複製能には差がある。単一の高病原性クローンウイルスから始まった感染が MHC-I 遺伝的多様性を有する複数の個体の伝播によって変化する過程を直接捉え、出現した起源が明確な変異ウイルスの複製能を野生型と比較したという点で、本研究の①、②の解析は新規性を有する。また③のように、伝播の繰り返しのよって変化したウイルスの個体レベルの増殖能について、一度感染・伝播を経由した MHC-I 遺伝子型を有する個体群への感染を初期から定量的に解析する手法は、HIV 感染ヒト集団の研究で用いることが非常に困難であり、本研究でサルエイズモデルを用いて初めて実現したものである。以上より、本研究の結果は、ヒト集団における HIV の変化（進化）を推定するための論理基盤として重要な知見であると考えられる。

5 結論

本研究では、サルエイズモデルでの SIV 感染・伝播実験を行い、多様な MHC-I 遺伝子型を有する宿主間の伝播に伴い、ウイルスゲノムに CTL エスケープ変異を含む変異が蓄積することを明らかにした。さらに、このような変異を蓄積したウイルスは、野生型より低い *in vitro* 複製能を有するが、個体内では野生型と同様なウイルス量を示し、特に感染・伝播を一度経由したサルと同じ MHC-I 遺伝子型を有する個体群では高いウイルス量を示す可能性を見出した。したがって、HIV はヒト集団での伝播の繰り返しの伴い、より高い病原性を示す可能性が示唆された。本研究成果は、これまでの HIV 感染者の解析で得られてきた結果に新たな知見を加えるもので、MHC-I の遺伝的多様性を有する個体間の伝播における HIV の変化（進化）を推定するための論理基盤として重要と考えられる。

6 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました俣野哲朗東京大学医科学研究所教授に心より感謝を申し上げます。また、野村拓志先生、西澤雅子先生をはじめとする国立感染症研究所エイズ研究センターの方々にご協力とご助言を賜りましたことを厚くお礼申し上げます。

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの横山勝先生、佐藤裕徳先生、東京医科歯科大学の成瀬妙子先生、木村彰方先生、京都大学ウイルス研究所の三浦智行先生、小柳義夫先生、予防衛生協会の皆様をはじめ、多くの方々からご協力を頂きましたことに深謝申し上げます。

7 参考文献

- 1 Akari H, Mori K, Terao K, Otani I, Fukasawa M, Mukai R, Yoshikawa Y In vitro immortalization of Old World monkey T lymphocytes with Herpesvirus saimiri: its susceptibility to infection with simian immunodeficiency viruses. *Virology*. 218(2):382-8. 1996
- 2 Argüello JR, Little AM, Pay AL, Gallardo D, Rojas I, Marsh SG, Goldman JM, Madrigal JA. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet*. 18(2):192-4. 1998
- 3 Barouch DH, Kunstman J, Glowczwskie J, Kunstman KJ, Egan MA, Peyerl FW, Santra S, Kuroda MJ, Schmitz JE, Beaudry K, Krivulka GR, Lifton MA, Gorgone DA, Wolinsky SM, Letvin NL. Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J Virol*. 77(13):7367-75. 2003
- 4 Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, Schmitz JE, Santra S, Peyerl FW, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Gorgone DA, Montefiori DC, Lewis MG, Wolinsky SM, Letvin NL. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 415(6869):335-9. 2002
- 5 Barouch DH, Powers J, Truitt DM, Kishko MG, Arthur JC, Peyerl FW, Kuroda MJ, Gorgone DA, Lifton MA, Lord CI, Hirsch VM, Montefiori DC, Carville A, Mansfield KG, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Letvin NL. Dynamic immune responses maintain cytotoxic T lymphocyte epitope mutations in transmitted simian immunodeficiency virus variants. *Nat Immunol*. 6(3):247-52. 2005
- 6 Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, Hammond KB, Newman LP, Bimber BN, Nimiyoungkul FA, Leon EJ, Maness NJ, Friedrich TC, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor DH, Sacha JB. Tertiary mutations stabilize CD8⁺ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. 88(6):3598-604. 2014
- 7 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. *J Virol*. 68(9):6103-10. 1994

- 8 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. *Nat Med.* 3(2):205-11. 1997
- 9 Brander C, Walker BD. Gradual adaptation of HIV to human host populations: good or bad news? *Nat Med.* 9(11):1359-62. 2003
- 10 Desrosiers RC. The simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Immunol.* 8:557-78. 1990
- 11 Frahm N, Kiepiela P, Adams S, Linde CH, Hewitt HS, Sango K, Feeney ME, Addo MM, Lichterfeld M, Lahaie MP, Pae E, Wurcel AG, Roach T, St John MA, Altfeld M, Marincola FM, Moore C, Mallal S, Carrington M, Heckerman D, Allen TM, Mullins JI, Korber BT, Goulder PJ, Walker BD, Brander C. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat Immunol.* 7(2):173-8. 2006.
- 12 Friedrich TC, Frye CA, Yant LJ, O'Connor DH, Kriewaldt NA, Benson M, Vojnov L, Dodds EJ, Cullen C, Rudersdorf R, Hughes AL, Wilson N, Watkins DI. Extraepitopic compensatory substitutions partially restore fitness to simian immunodeficiency virus variants that escape from an immunodominant cytotoxic-T-lymphocyte response. *J Virol.* 78(5):2581-5. 2004
- 13 Friedrich, T. C., E. J. Dodds, L. J. Yant, L. Vojnov, R. Rudersdorf, C. Cullen, D. T. Evans, R. C. Desrosiers, B. R. Mothe, J. Sidney, A. Sette, K. Kunstman, S. Wolinsky, M. Piatak, J. Lifson, A. L. Hughes, N. Wilson, D. H. O'Connor, and D. I. Watkins. Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nat. Med.* 10:275-281. 2004.
- 14 Goulder PJ and Watkins DI. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 4(8):630-40. 2004
- 15 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. *Nat Med.* 3(2):212-7. 1997

- 16 Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Broadening of CD8+ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS*. 24(18):2777-87. 2010
- 17 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+ T cells. *J Virol*. 88(1):425-33. 2014
- 18 Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*. 189(6):991-8. 1999
- 19 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. *Nat Med*. 2(4):405-11. 1996
- 20 Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol*. 80(4):1949-58. 2006
- 21 Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature*. 458(7238):641-5. 2009
- 22 Kelleher AD, Long C, Holmes EC, Allen RL, Wilson J, Conlon C, Workman C, Shaunak S, Olson K, Goulder P, Brander C, Ogg G, Sullivan JS, Dyer W, Jones I, McMichael AJ, Rowland-Jones S, Phillips RE. Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 193(3):375-86. 2001
- 23 Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*. 65(4):651-62. 1991

- 24 Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Hilton L, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barber 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(7018):769-75. 2004
- 25 Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Kato M, Matano T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J Virol*. 79(17):11529-32. 2005
- 26 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. *J Virol*. 68(7):4650-5. 1994
- 27 Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, Tang Y, Holmes EC, Allen T, Prado JG, Altfeld M, Brander C, Dixon C, Ramduth D, Jeena P, Thomas SA, St John A, Roach TA, Kupfer B, Luzzi G, Edwards A, Taylor G, Lyall H, Tudor-Williams G, Novelli V, Martinez-Picado J, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med*. 10(3):282-9. 2004
- 28 Letvin NL. Animal models for AIDS. *Immunol Today*. 11(9):322-6. 1990
- 29 Li B, A. D. Gladden, M. Altfeld, J. M. Kaldor, D. A. Cooper, A. D. Kelleher, and T. M. Allen. Rapid reversion of sequence polymorphisms dominates early human immunodeficiency virus type 1 evolution. *J. Virol*. 81:193-201. 2007.
- 30 Loh L, C. J. Batten, J. Petravic, M. P. Davenport, and S. J. Kent. In vivo fitness costs of different Gag CD8 T-cell escape mutant simian-human immunodeficiency viruses for macaques. *J. Virol*. 81:5418-5422. 2007.
- 31 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. *J Exp Med*. 199(12):1709-18. 2004

- 32 Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*. 296(5572):1439-43. 2002
- 33 Mudd PA, Ericson AJ, Walsh AD, León EJ, Wilson NA, Maness NJ, Friedrich TC, Watkins DI. CD8+ T cell escape mutations in simian immunodeficiency virus SIVmac239 cause fitness defects in vivo, and many revert after transmission. *J Virol*. 85(23):12804-10. 2011
- 34 Nietfield W, Bauer M, Fevrier M, Maier R, Holzwarth B, Frank R, Maier B, Riviere Y, Meyerhans A. Sequence constraints and recognition by CTL of an HLA-B27-restricted HIV-1 gag epitope. *J Immunol*. 154(5):2189-97. 1995
- 35 Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan. *J Virol*. 87(3):1465-76. 2013
- 36 Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in burmese rhesus macaques. *J Virol*. 86(12):6481-90. 2012
- 37 Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochem Biophys Res Commun*. 450(2):942-7. 2014
- 38 O'Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P, DeSouza IP, Dodds E, Dunphy EJ, Melsaether C, Mothé B, Yamamoto H, Horton H, Wilson N, Hughes AL, Watkins DI. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat Med*. 8(5):493-9. 2002
- 39 Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 279(5359):2103-6. 1998

- 40 Peyerl FW, Barouch DH, Yeh WW, Bazick HS, Kunstman J, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Letvin NL. Simian-human immunodeficiency virus escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition at a structurally constrained epitope. *J Virol.* 77(23):12572-8. 2003
- 41 Peyerl FW, Bazick HS, Newberg MH, Barouch DH, Sodroski J, Letvin NL. Fitness costs limit viral escape from cytotoxic T lymphocytes at a structurally constrained epitope. *J Virol.* 78(24):13901-10. 2004
- 42 Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, McMichael AJ. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature.* 354(6353):453-9. 1991
- 43 Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5):1890-5. 1997
- 44 Reed LJ and Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497. 1938
- 45 Reimann KA, Tenner-Racz K, Racz P, Montefiori DC, Yasutomi Y, Lin W, Ransil BJ, Letvin NL. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol.* 68(4):2362-70. 1994
- 46 Roederer M, Keele BF, Schmidt SD, Mason RD, Welles HC, Fischer W, Labranche C, Foulds KE, Louder MK, Yang ZY, Todd JP, Buzby AP, Mach LV, Shen L, Seaton KE, Ward BM, Bailer RT, Gottardo R, Gu W, Ferrari G, Alam SM, Denny TN, Montefiori DC, Tomaras GD, Korber BT, Nason MC, Seder RA, Koup RA, Letvin NL, Rao SS, Nabel GJ, Mascola JR. Immunological and virological mechanisms of vaccine-mediated protection against SIV and HIV. *Nature.* 505(7484):502-8. 2014
- 47 Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallion BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 283(5403):857-60. 1999
- 48 Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic T-lymphocyte escape mutations

with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol.* 82(10):5093-8. 2008

49 Voss G, Nick S, Stahl-Hennig C, Ritter K, Hunsmann G. Generation of macaque B lymphoblastoid cell lines with simian Epstein-Barr-like viruses: transformation procedure, characterization of the cell lines and occurrence of simian foamy virus. *J Virol Methods.* 39(1-2):185-95. 1992

50 Yang OO, Sarkis PT, Ali A, Harlow JD, Brander C, Kalams SA, Walker BD. Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 197(10):1365-75. 2003

8 図表

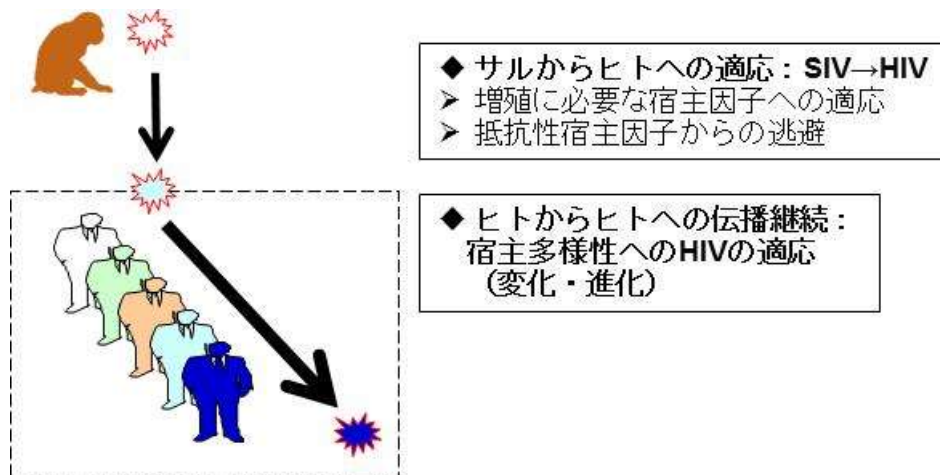


図1. ウイルスの宿主への適応（シェーマ）

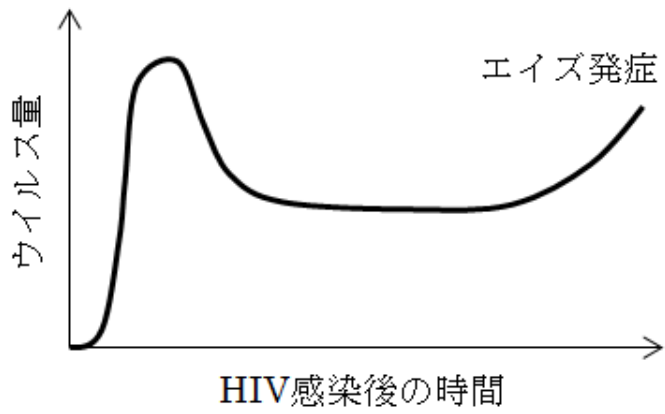
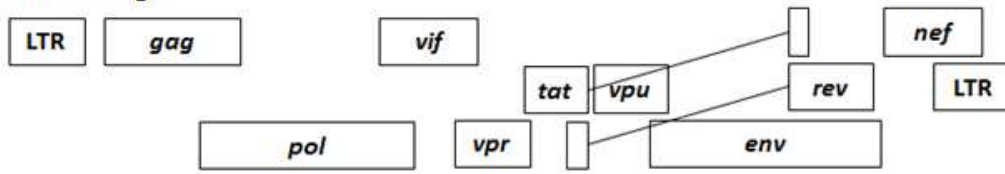


図 2. HIV による慢性持続感染の成立。HIV に感染した宿主体内で誘導される獲得免疫は自然経過でウイルスを完全に排除することが出来ず、エイズ発症に至る。

HIV-1/SIVcpz



HIV-2/SIVmac/SIVsmm

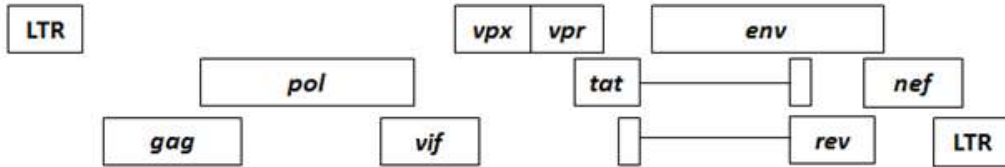


図 3. HIV および SIV のゲノム構造。上が HIV-1/SIVcpz、下が HIV-2/SIVmac/SIVsmm。LTR は転写調節領域で、遺伝子発現を制御している。

表1. SIVmac239伝播実験（1～3代目）に用いたアカゲザルの概要

A. MHC-Iハプロタイプの一覧

MHC-I ハプロタイプ	代表的なアレル	
	<i>Mamu-A</i>	<i>Mamu-B</i>
A (90-120-Ia)	<i>A1*043:01, A1*065:01</i>	<i>B*061:03, B*068:04, B*089:01</i>
E (90-010-Ie)	<i>A1*066:01</i>	<i>B*005:02, B*015:04</i>
P (89-002-Ip)	<i>A1*018:07, A2*001:03 A4*014:03</i>	<i>B*001:01:01, B*007:02</i>

B. 使用したアカゲザルの一覧

サルID	MHC-I ハプロタイプ	接種内容
#11	A	SIVmac239ウイルスストック
#21	E	} #11の感染後1年目の血漿
#22	E	
#23	P	
#24	P	
#31	P	#21の感染後1年目の血漿
#32	P	#22の感染後1年目の血漿
#33	E	#23の感染後1年目の血漿

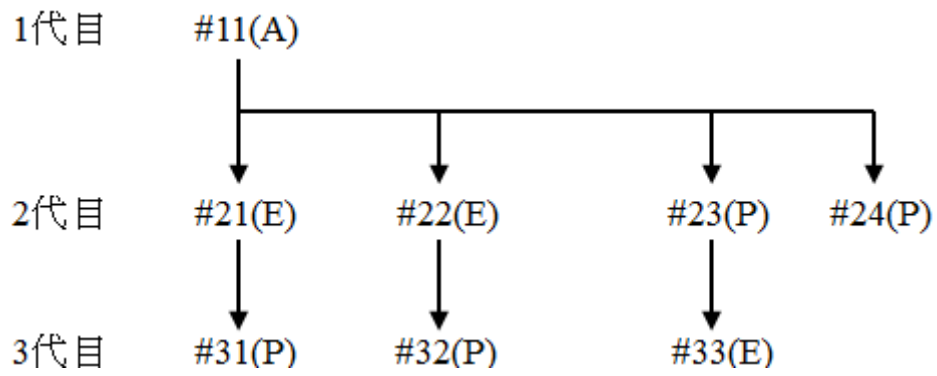


図 4. SIVmac239 感染血漿の伝播の流れ。感染後 1 年目の血漿を次の個体へ伝播させていった。カッコ内はその個体の MHC-I ハプロタイプ名の略称。

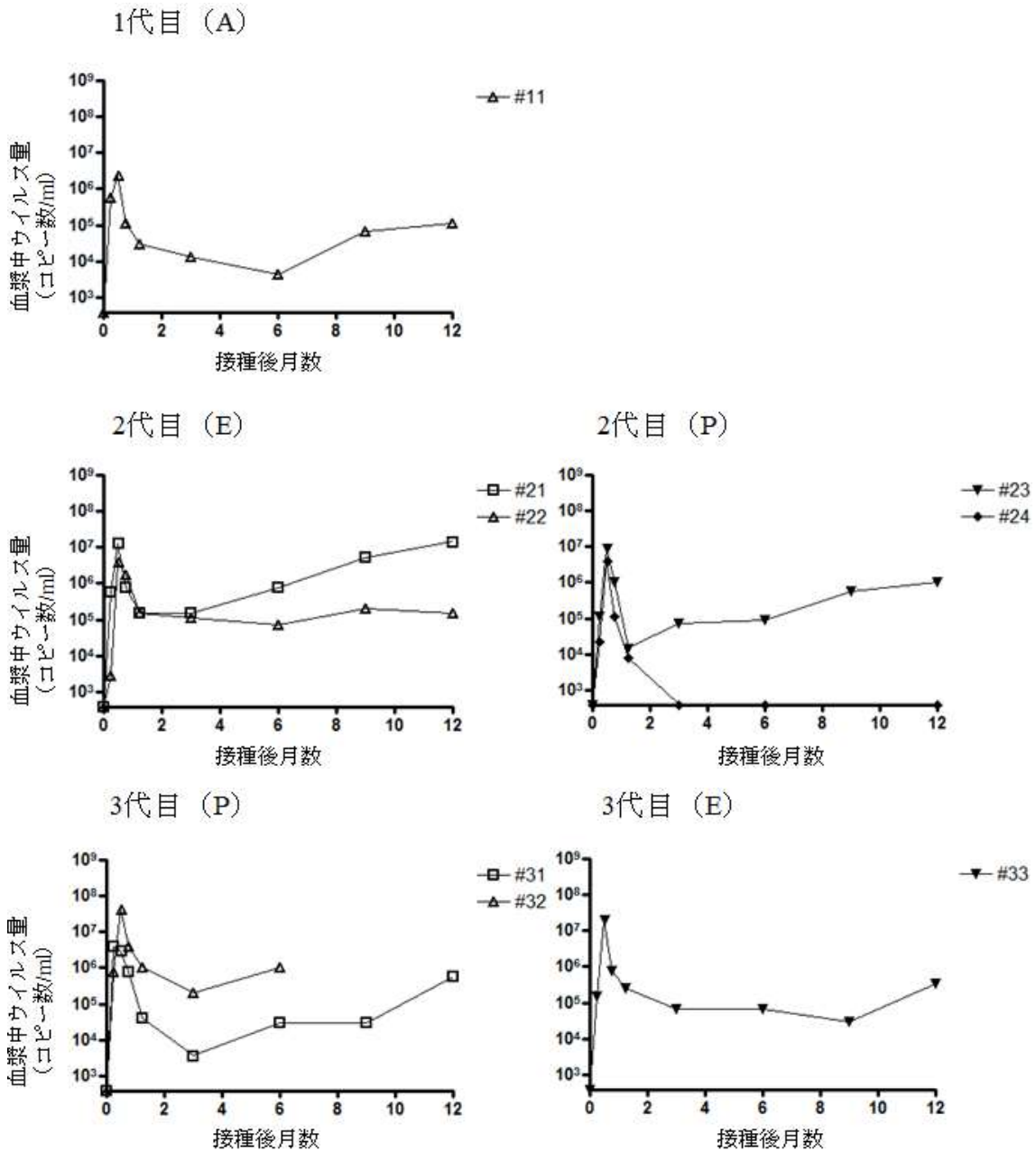


図 5. SIVmac239 ウイルスストックおよび SIV 感染血漿接種後のアカゲザルの血漿中ウイルス量の経過。1 段目が 1 代目、2 段目左が 2 代目のうち E 陽性サル、右が 2 代目のうち P 陽性サル、3 段目左が 3 代目のうち P 陽性サル、右が 3 代目のうち E 陽性サル。観察期間中に #32 はエイズ発症を示し、途中で安楽殺を受けた。#24 は 3 か月目以降、検出限界 (400 コピー/ml) 以下になった。1 代目の結果は(36)より改変。

表2. SIVmac239伝播実験（1～3代目）に用いたアカゲザルで観察されたgag非同義変異^a

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	V3	V68	K101	I140	V145	K165	P172	T182	L216	V243	D244	V375	P390	R404	D429	N472	R481	E489	#	
#11	A	12	A				A		S	I	S	A	E	M								8
#21	E	3	A				A				S		E	M								5
		12	A	M			A						E	M								5
#31	P	3	A	M			A	R					E	M				S				7
		12	A	M			A	R					E	M		K*				K		8
#22	E	3	A				A		S	I	S	A	E	M								8
		12	A				A		S	I	S	A	E	M	S							9
#32	P	3	A			V	A		S		S	A	E	M								8
		6	A			V	A		S		S	A	E	M	S							9
#24	P	3	A	M			A		S	I	S	A	E	M							G	10
		14	A				A		S	I	S	A	E	M								8
#23	P	3	A				A		S	I	S	A	E	M								8
		13	A	M	R	V	A		S	I	S	A	E	M				N		K		13
#33	E	3	A	M		V	A		S	I	S	A	E	M				N				11
		12	A	M		V	A		S	I	S	A	E	M			K	N		K		13

^a 血漿中のウイルス RNA を抽出し、SIVgag を含むゲノム領域を nested RT-PCR によって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。右端列はそのような変異の個数、*は検出された非同義変異が2種類以上であることを示す。#24の14か月のデータのみ、PBMC 中プロウイルスの塩基配列。#11のデータは(36)より改変。

表3. SIVmac239伝播実験（1～3代目）に用いたアカゲザルで観察された*vif*非同義変異^a

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	R14	H66	H74	P115	K169	N175	R180	A201	N202	#
#11	A	12				S*	E					2
#21	E	3				S	E					2
		12	Y			S	E					3
#31	P	3	K	Y	N	S	E					5
		12	K	Y	N	S	E					5
#22	E	3	K			S	E					3
		12	K			S	E					3
#32	P	3	K			S	E					3
		6	K			S	E					3
#24	P	2	K			S	E					3
		14	K			S	E					3
#23	P	3	K			S	E					3
		13	K			S	E		H	D		5
#33	E	3	K			S	E		H	T	D	6
		12	K			S	E	S	H	T	D	7

^a 血漿中のウイルス RNA を抽出し、SIV*vif*を含むゲノム領域を nested RT-PCR によって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。右端列はそのような変異の個数、*は検出された非同義変異が 2 種類以上であることを示す。#24 の 14 か月目のデータのみ、PBMC 中プロウイルスの塩基配列。血漿中ウイルス量が低いため、#24 の 3 か月目の塩基配列は解析できず、代わりに 2 か月目のデータを表示している。#11 のデータは(36)より改変。

表4. SIVmac239伝播実験（1～3代目）に用いたアカゲザルで観察された nef 非同義変異^a

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	M7	P12	S13	T27	Y28	L31	G33	E34	E36	L46	L53	G63	E75	R77	K84	I90	D96	L97	K105	P107	T110
#11	A	12	Q						G						G		V						
#21	E	3	Q		C				G						G		V	S	R	R			
		12	Q	A	S				G		H				G	E	V						
#31	P	3	R	Q	P	C	E	G	S					K	G	E	V				R		A
		12	K	Q	P				G								E	V			R*	R*	A
#22	E	3	Q						G								M	G					
		12	Q						G	P	E						V*				G*	G*	
#32	P	3	Q						G	P	E												L
		6							G	P	E												L
#24	P	2	Q	A					G							G	V	S	R				
		14	Q						G							G	V*	S					
#23	P	3	Q						G								V	S					
		13	Q					E	G								V						P
#33	E	3	K	Q				E	G								V				R		P
		12	K	Q			V	E	G														S
サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	S112	M119	F122	E125	K126	S135	I144	S161	I165	E188	E191	Y193	M195	S201	Q202	G208	V210	A212	K260	#	
#11	A	12														Y							5
#21	E	3														Y							9
		12					N							C	V	H	K						13
#31	P	3	T	Q	R	N								C	V	H	K					R	22
		12	T	L		N											H						13
#22	E	3									K				L	Y							7
		12		A								K	C		H								11
#32	P	3													L	H*							7
		6									K	R*			L	H							8
#24	P	2							L						L	Y	R						11
		14														Y							6
#23	P	3							L							Y							6
		13						L*	A*							Y	R						9
#33	E	3		A		M				K					Y			A	I				13
		12	T	L		M				R*	C		H*										12

^a 血漿中のウイルス RNA を抽出し、SIV nef を含むゲノム領域を nested RT-PCR によって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。下段右端列はそのような変異の個数、*は検出された非同義変異が 2 種類以上であることを示す。#24 の 14 か月目のデータのみ、PBMC 中プロウイルスの塩基配列。血漿中ウイルス量が低いため、#24 の 3 か月目の塩基配列は解析できず、代わりに 2 か月目のデータを表示している。#11 のデータ

は (36) より改変。

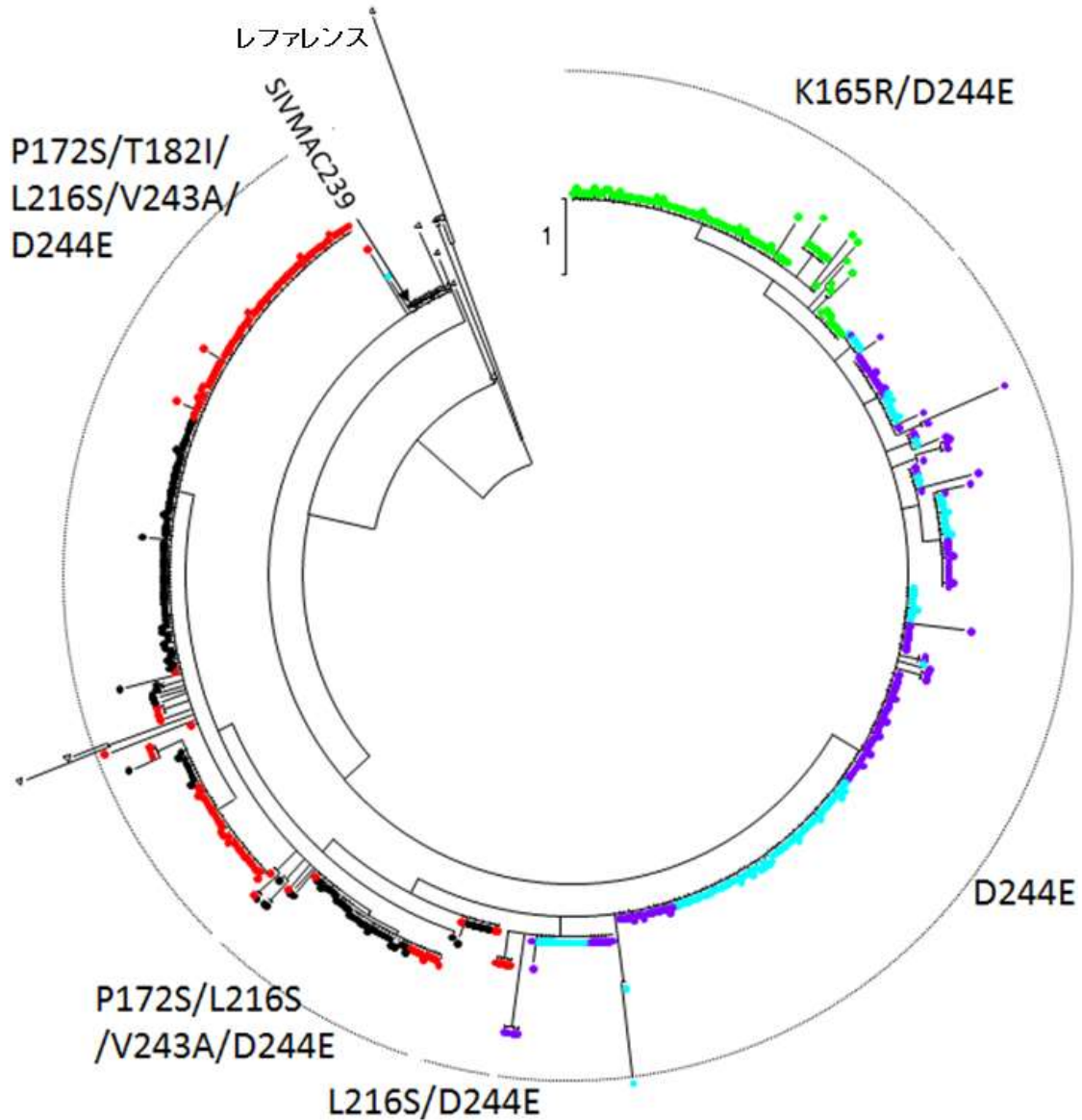


図 6.伝播 SIV の *gag* cDNA の次世代塩基配列解析に基づく系統樹解析。#11 の感染後 1 年目、#21 の感染後 1 週目、1 年目、#31 の感染後 1 週目、1 年目の SIV Gag CA の N 末端側コード領域 (CA 領域内の塩基配列番号 68~482) は MEGA6 software を用いて最尤法により解析された。●:#11 の 1 年目、●:#21 の 1 週目、●:#21 の 1 年目、●:#31 の 1 週目、●:#31 の 1 年目、△:レファレンス配列。見いだされた各変異は系統樹内に記述した。クラスターはアミノ酸配列で表示しているが、解析は同義変異を含めた塩基配列の相違をもとに行われている。

表5. SIVmac239伝播アカゲザルの血漿由来ウイルスの濃度

A. p27 ELISAによる上清中のSIVの定量 (ng/ml)

由来	6日目	10日目	14日目
#21の1年目	122.9	-	-
#31の1年目	検出されず	75.1	-
#23の1年目	検出されず	6.1	1.5
#33の1年目	検出されず	5.1	1.5

B. PCRによる上清中のSIVの定量 (コピー数/ml)

由来	6日目	10日目	14日目
#21の1年目	3.8×10^8	-	-
#31の1年目	-	3.8×10^8	-
#23の1年目	-	-	9.6×10^9
#33の1年目	-	-	2.6×10^9

(A) 感染後1年目の血漿を濃縮し、HSC-Fと共培養した培養上清中のp27量を測定した。(B) Aと同じ培養上清中のウイルスRNAを抽出し、PCRで定量した。-は測定未実施。

表6. SIVmac239伝播アカゲザルの血漿由来ウイルスのgag非同義変異^a

由来 個体	V3	I19	V68	K101	K120	I140	V145	K165	P172	T182	L216	V243	D244	V375	R385	R404	D429	R481	
#21	A	V	M				A						E						
#31	A		M		T		A	R					E	M				K	
#23	A		M	R		V	A		S	I	S	A	E	M				N	K
#33	A		M			V	A		S	I	S	A	E	M	K	K		N	K

^a感染後1年目の血漿をHSC-Fと共培養した上清中に産生されたウイルスRNAの塩基配列。gagを含むゲノム領域をそれぞれnested RT-PCRによって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。

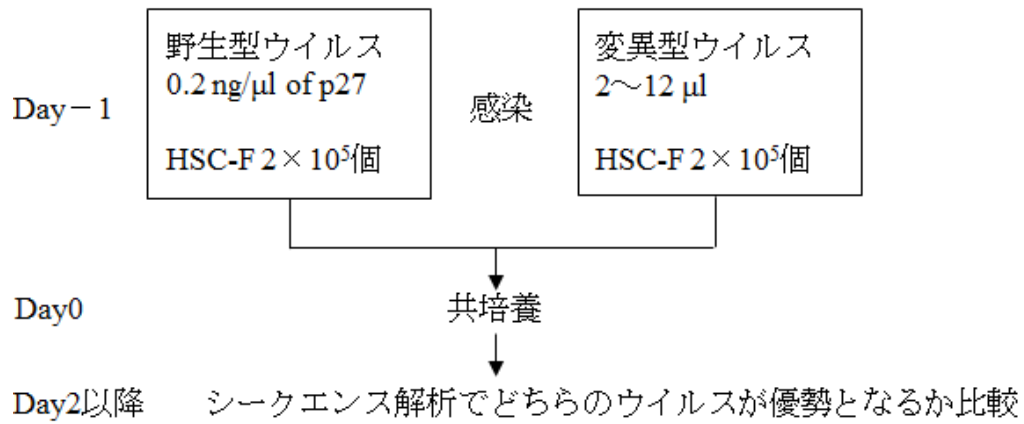
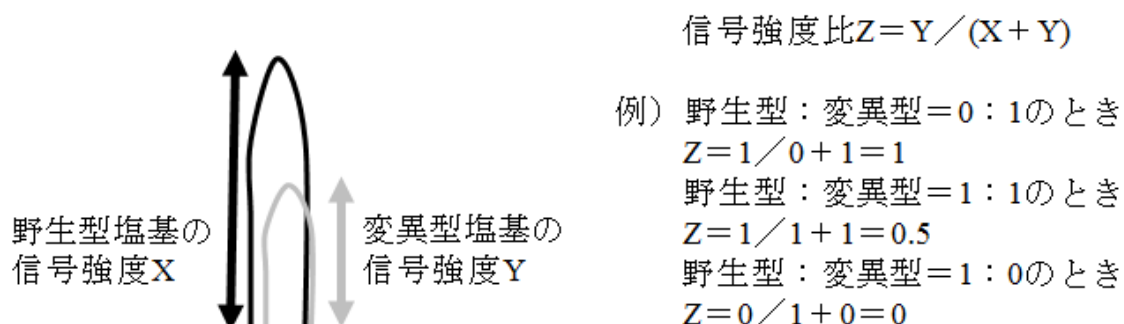


図7 .コンペティションアッセイの概要。野生型のウイルスを SIV Gag p27 で 0.2ng に相当する分量測り取り、 2×10^5 個の HSC-F に感染させた。同時に、血漿由来ウイルスストックを 2×10^5 個の HSC-F に感染させた。翌日、各感染細胞を半量ずつ採取して共培養を開始し、以後 2 日毎に培養上清を回収した。

表7. コンペティションアッセイにおける上清中ウイルスgag非同義変異のダイレクトシーケンスの信号強度比^a



組み 合わせ	回 収 日	V3A	I19V	V68M	K101R	K120T	I140V	V145A	K165R	P172S	T182I	L216S	V243A	D244E	V375M	R385K	R404K	D429N	R481K
#21 × wt①	d2	0.33	0.33	0.4				0.25						0.33					
	d20	0.2	0.25	0.33										0.17					
#21 × wt②	d2	1	1	1				1						1	0.8				
	d20	0.75	0.75	0.83				0.75						0.83	0.75	0.2			
#31 × wt①	d2	0.5		0.5		0.5		0.33	0.5					0.33	0.5				0.5
	d6																		
#31 × wt②	d2	0.67		0.75		0.67		0.67	0.67					0.67	0.75				0.8
	d8	0.25		0.25		0.33		0.17	0.25					0.2	0.33				0.5
#23 × wt①	d2	0.33		0.5	0.4		0.33	0.33		0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5				0.5
	d12			0.17						0.2	0.17								0.17
#23 × wt②	d2	1		1	1		1	1		1	1	1	1	1	1				1
	d12	0.33		0.5	0.33		0.33	0.33		0.5	0.5	0.5	0.5	0.33	0.5				0.5
#33 × wt①	d2	0.67		0.8			0.75	0.67		0.8	0.8	0.8	0.8	0.75	0.8	0.8	0.8	1	1
	d12	0.17		0.25			0.17	0.14		0.25	0.25	0.2	0.25	0.2	0.25	0.17	0.25	0.33	0.33
#33 × wt②	d2	0.5		0.67			0.5	0.5		0.67	0.67	0.5	0.5	0.5	0.67	0.5	0.67	0.67	0.67
	d12	0.13		0.2			0.14	0.11		0.2	0.2	0.17	0.2	0.14	0.2	0.14	0.25	0.25	0.33

^a ダイレクトシーケンスにおける野生型と変異型の信号強度比 Z を計算した。Z=0.5 以上に網掛け、空欄は 0 を示す。野生型ウイルスと変異型ウイルスで塩基配列が異なりアミノ酸が置換されている部分のみを、塩基ではなくアミノ酸の番号と記号で表示している。

表8. 3代目SIVの感染実験に用いたアカゲザルの一覧

サルID	MHC-I ハプロタイプ	接種内容
#41	A	#31の感染後1年目の血漿
#42	A	
#43	non-A/E/P	
#44	non-A/E/P	
#45	non-A/E/P	
#51	A	#33の感染後1年目の血漿
#52	A	
#53	non-A/E/P	
#54	non-A/E/P	
#55	non-A/E/P	

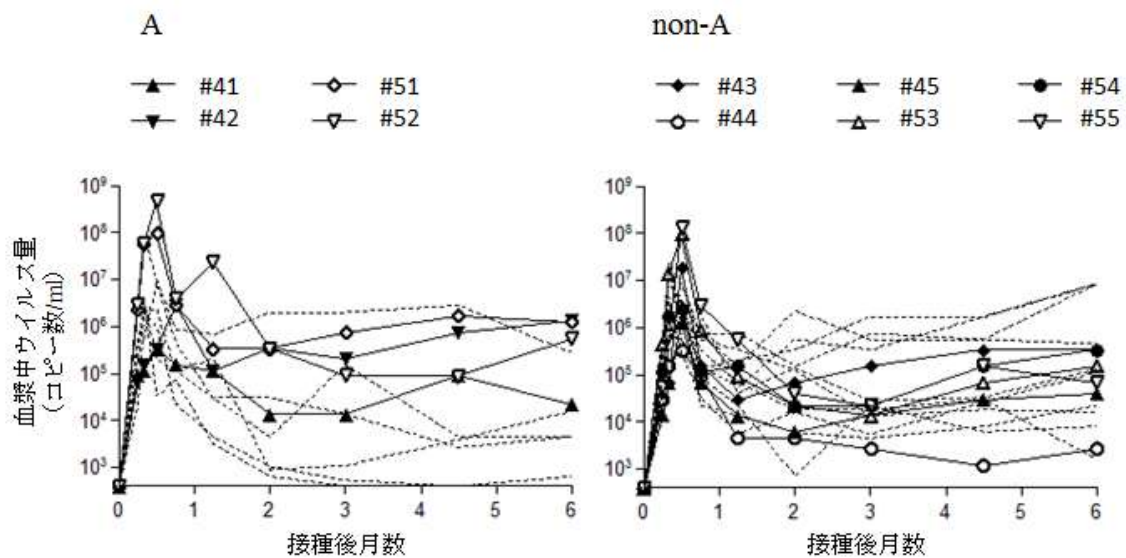


図 8. 3 代目 SIV を接種したアカゲザルの血漿中ウイルス量の経過。左が A 陽性サル、右が non-A サル。点線は野生型 SIVmac239 を接種した個体 (A は 6 頭、non-A は 10 頭) のもので、(36) より改変。

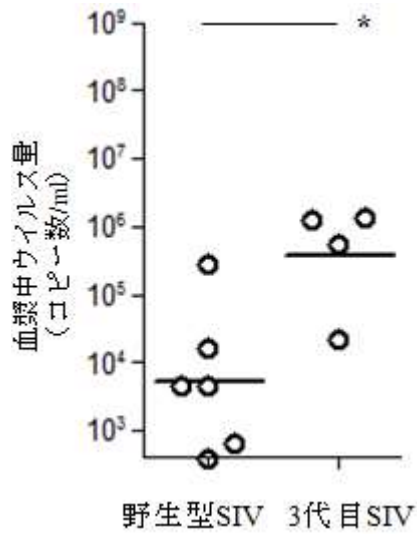


図9. 3代目SIVを接種したA陽性サル4頭における感染後6か月時点の血漿中ウイルス量の、野生型SIV接種A陽性サル6頭(36)との比較。3代目SIVを接種した個体で有意に高い ($P = 0.0172$ by Unpaired t test)。

表9. 3代目SIV感染実験に用いたアカゲザルで観察されたgag非同義変異^a

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	V3	K28	V68	T117	K101	K120	I140	V145	I161	K165	P172	T182	L216	A222	V243	D244	I257	A373	V375	P376	R385	P387	R404	D429	R481	#	
#41	A	3	A	M	I				A	R				S				E			M					E	K	10	
		6	A	M	P				A						S				E			M							7
#42	A	3	A	M	P				A					S				E			M							K	8
		6	A	M	P				A						S				E		T	M						K	9
#43	non- A/E/P	3	A	M	P				A	R								E			M							K	8
		6	A	M	P			V	A	R												M						K	8
#44	non- A/E/P	3	A	M	P				A	V	R							E			M							K	9
		6	A	M	P				A	V	R								E			M						K	9
#45	non- A/E/P	3	A	M			T		A	R					T			E								E	K	9	
		6	A	M			T		A	R					T			E	V		I*					E	K	11	
#51	A	3	A	M	A				V	A				S	I	S		A	E		M	K			K	N	K	15	
		6	A	M					V	A					S	I	S		A	E		M	K			K	N	K	14
#52	A	3	A	M					V	A				S	I	S		A	E		M							K	11
		6	A	R					V	A					S	I	S		A	E		M	K					K	12
#53	non- A/E/P	3	A	M					V	A				S	I	S		A	E		M	K			K	N	K	14	
		6	A	A*	R				V	A					S	I	S		A	E		A*	S	K		N	K	15	
#54	non- A/E/P	3	A	M					V	A					S			A	E		I*	K			K	N	K	12	
		6	A	M					V	A					S	S		A	E					S		N	K	11	
#55	non- A/E/P	3	A	M					V	A					S	I	S		A	E		M	K			K	N	K	14
		6	A	M					V	A					S	I	S		A	E		M	K			K	N	K	14

^a 血漿中のウイルス RNA を抽出し、SIVgag を含むゲノム領域を nested RT-PCR によって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。右端列はそのような変異の個数、*は検出された非同義変異が 2 種類以上であることを示す。

表10. 3代目SIV感染実験に用いたアカゲザルで観察された*vif*非同義変異^a

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	R14	S65	H66	H74	I89	N103	P115	I126	V143	K169	N175	R180	D189	G200	A201	N202	P204	K208	A214	#	
#41	A	3	K	Y	N			S	V		E												6
		6	K	Y	N			S	V		E												
#42	A	3	K	Y	N			S			E												5
		6	K	Y	N			S			E												
#43	non- A/E/P	3	K	Y	N			S			E												5
		6	K	Y	N			S			E												
#44	non- A/E/P	3	K	Y	N			S			E											V	6
		6	K	Y	N			S	H	E												V	7
#45	non- A/E/P	3	K	Y	N			S	V		E												6
		6	K	Y	N			S	H	E													
#51	A	3	K					D	S		E	S	H	N		T	D						9
		6	K	N			V	D	S		E	S	H	N		T	D						
#52	A	3	K					S			E	S	H	N		T	D						8
		6	K					S			E	S	H	N		T	D						
#53	non- A/E/P	3	K					S			E	S	H		R	D	S						8
		6	K		N			S			E	S	H		R	D	E						
#54	non- A/E/P	3	K					S			E	H		R	D								6
		6	K				D	S			E	H		R	D	E							
#55	non- A/E/P	3	K					S			E	S	H	N		T	C						8
		6	K					S			E	S	H	N		T	D						

^a 血漿中のウイルス RNA を抽出し、SIV*vif*を含むゲノム領域を nested RT-PCR によって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。右端列はそのような変異の個数、*は検出された非同義変異が 2 種類以上であることを示す。

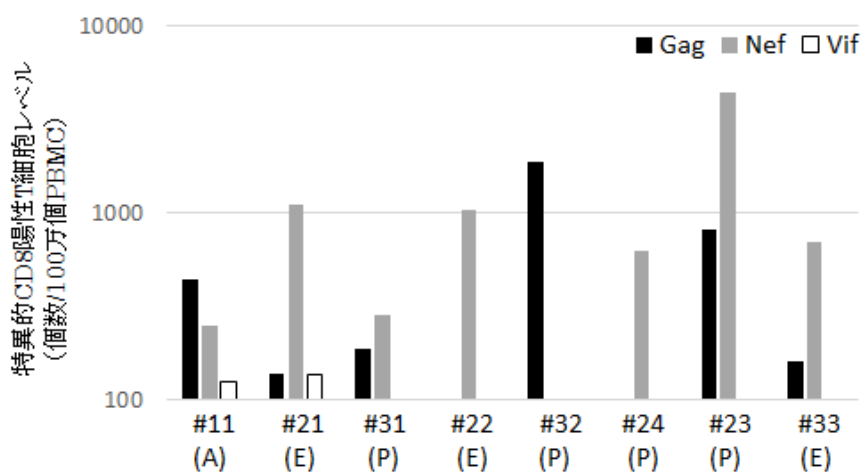
表11. 3代目SIV感染実験に用いたアカゲザルで観察された nef 非同義変異^a

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	M7	R8	P12	S13	T27	Y28	G33	E34	E36	D37	S40	L46	D47	L53	G63	N72	E75	R77	K84	I90	E93	R103	K105
#41	A	3	K		Q	P		C	E	G															V
		6	K		Q	P		C	E	G															
#42	A	3	K		Q	P		C	E	G											G	E	V		E
		6	K		Q	P	S		E	G											E	E	V		E*
#43	non- A/E/P	3	K		Q	P		C	E	G				S			E		G		E	V			
		6	K		Q	P	S*		E	G	G						E		G		E	E	V		R
#44	non- A/E/P	3	K		Q	P		C	E	G			L							K		E	V		
		6	K		Q	P		C	E	G		G	L						D	K		E	V		R
#45	non- A/E/P	3			Q	A	S			G					G						G	E	V	D	R
		6	K	K	Q	P		C													G	E	V	D	K
#51	A	3	K*		Q				E	G															
		6	K*		Q				E	G						P									V*
#52	A	3	K		Q				E	G			S												V
		6	K		Q	P			E	G									G						M
#53	non- A/E/P	3	K		Q				E	G					G						G				
		6	K		Q				E	G					G										
#54	non- A/E/P	3	K		Q				E	G															
		6	K		Q				E	G					G						G				
#55	non- A/E/P	3	K		Q				E	G			S												
		6	K		Q				E	G			S												

サル ID	MHC-I ハプロ タイプ	月 数	F110	S112	I117	M119	F122	I123	S135	A136	I144	E191	Y193	M195	S201	A212	P217	#
#41	A	3				T	L		N						H			11
		6				T	L		N	E					H			13
#42	A	3	A			T	L		N						H			15
		6	A			T	L		N						H*			15
#43	non- A/E/P	3				T	L		N						H			15
		6							N						H			15
#44	non- A/E/P	3				T	L		N						H			14
		6	A			T	L		N						H			18
#45	non- A/E/P	3				T	L		N				C	V	H			16
		6				T	L		N						H			15
#51	A	3	S	T			L			M					H*		S	10
		6	A*	T	V		Y	L	N		M	R		V	Y		S	17
#52	A	3	S*	T	V		Y	L	N			R			H			14
		6	I*	T	V		L*	L	N			R*	C		H*			16
#53	non- A/E/P	3		T			L			M	R*	C	V	H*				13
		6	S*	T			L			M	R	C	V	H*				13
#54	non- A/E/P	3	S	T			L			M	R*	C	V	H			S	13
		6	S	T						M	R*			H*			S	12
#55	non- A/E/P	3		T			L*			M	R				H	V		11
		6	S	T	V		Y	L	N		M	R			H	V		15

^a 血漿中のウイルス RNA を抽出し、SIV_{nef} を含むゲノム領域を nested RT-PCR に よって増幅した後、塩基配列の解析を行った。アミノ酸変異につながる dominant mutations を表示した。下段右端列はそのような変異の個数、*は検出された非同義変異が 2 種類以上であることを示す。

A. SIVmac239伝播実験 (1~3代目)



B. 3代目SIV感染実験

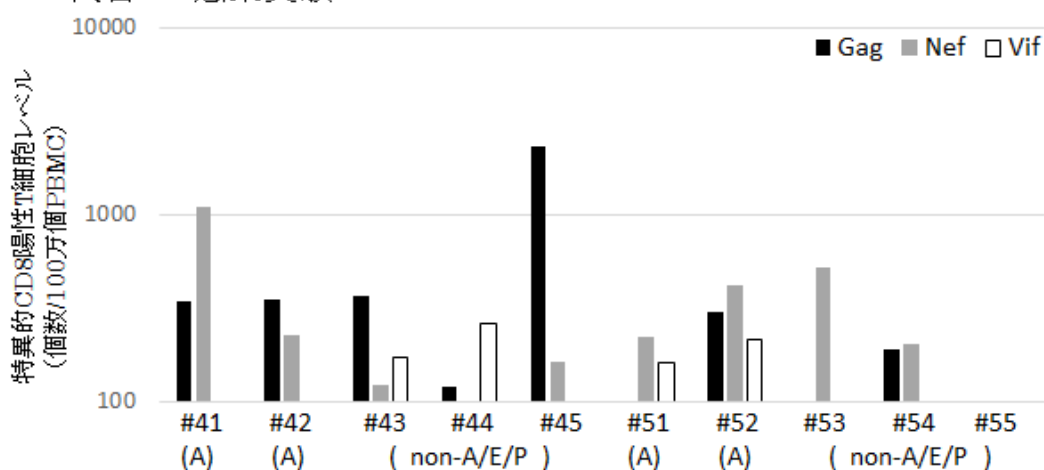


図 10. 感染後 3 か月目の Gag/Vif/Nef 特異的 CD8 陽性 T 細胞レベル。PBMC を、Gag、Vif、Nef のペプチドミックスでパルスした B-LCL を用いて刺激した。A が伝播の最初の個体である #11 と 1、2 代目 SIV を接種した個体、B が 3 代目 SIV を接種した個体。#11 のデータは (36) より改変。ID 下のカッコ内はその個体の MHC-I ハプロタイプ名の略称。

表13. 3代目SIV感染実験でMHC-Iハプロタイプ90-120-Iaを有するアカゲザルにおけるエピトープ特異的CD8陽性T細胞レベル^a

サルID		Gag	Gag	Gag
		206-216	241-249	367-381
#41	1.5か月	180	-	-
	4か月	271	399	-
#42	1.5か月	249	139	143
	4か月	-	-	-
#51	1.5か月	-	-	-
	5か月	-	-	-
#52	1.5か月	-	-	-
	5か月	-	-	-

^a PBMCをGag₂₀₆₋₂₁₆、Gag₂₄₁₋₂₄₉、Gag₃₆₇₋₃₈₁ エピトープペプチドでパルスしたB-LCLを用いて刺激した場合の、PBMC100万個あたりの特異的CD8陽性T細胞の個数をレベルとして示した。－は特異的反応陰性。