

サル MHC・MHC 関連分子およびそのレセプター遺伝子群の多型解析

分担研究者 木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所教授

研究要旨

HIV ワクチン開発研究に用いられているアカゲザル集団について MHC クラス I 遺伝子群の多様性を遺伝子配列レベルで解析し、ハプロタイプごとに発現する遺伝子数が異なることを確認した。また、代表的なハプロタイプについて、特徴的なアシル配列を明らかにした。また、アカゲザルとヒトはそれぞれ特定の SIV あるいは HIV のエピトープを提示するが、一部のエピトープはアカゲザルとヒトで共通しており、その拘束分子である MHC クラス I 分子にはペプチド結合ドメインに構造的な類似性があることを明確にした。一方、アカゲザルの RAET1/ULBP 領域遺伝子群を検討したところ、アカゲザルではこの領域が重複していることが判明した。これとは別に、ヒトで HIV 感染感受性に関わるとされている CCL3L1 遺伝子コピー数を検討したところ、アカゲザルでも CCL3L1 遺伝子数は個体ごとに異なっており、平均コピー数は 5 であった。また、HIV 感染後長期経過観察者では健常者に比較して CCL3L1 コピー数が平均 2 程度少ないが、AIDS 長期未発症者と発症者との間には相違がないことから、CCL3L1 コピー数は HIV 感染と関連するが AIDS 発症までの経過との関連は少ないと考えられた。さらに、アカゲザルでは TIM1 遺伝子の mucin 結合ドメインに著明な多様性があることを見出したが、予備的な解析で TIM1 多型と抗体産生量との関連が示唆された。

A. 研究目的

ヒトを始めとする高等動物では外来抗原に対する免疫応答性に個体差があり、このためウイルス感染に対する感受性・抵抗性やワクチン接種効果が個体によって異なっている。このような免疫応答の個体差は生体の発達過程で形成されるが、そこには遺伝的背景が強く関与する。すなわち、免疫応答性は T 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞、B 細胞などの協調によって形成されるが、これらの細胞間の機能連関には種々の分子に関わり、中でも MHC 分子群、MHC 関連分子群、NK レセプター群などの免疫応答関連分子群には個体差（遺伝的多型性ないしゲノム多様性）が存在し、このゲノム多様性が免疫応答性の個体差の形成に重要な機能を発揮する。従って、個体レベルでより有効なワクチンを開発する上では、このような免疫応答に関わるゲノム多様性の関与を理解し、その知見を生かすことが必要である。

HIV ワクチン開発においてはヒトを対象とした実験が困難であることから動物モデルが用いられるが、マウスやラットなどは免疫応答関連分子群の構成自体がヒトとは大きく異なるためその知見をヒトに直接生かす上では制約がある。一方、チンパンジーなどの高等霊長類では MHC 遺伝子群の構成はヒトと類似しているが、その多様性がかなり限られていることが知られており、これもモデル動物としての有用性には限界がある。一方、これまでのアカゲザルを用いた研究で MHC 分子、特に MHC クラス I 分子の多様性が CTL 誘導ワクチンの有効性と直接関連することが判明しているが、その他の分子群の多様性の関与については不明な点が多い。また、ヒトの HIV 感染においては血中ウイルス量、AIDS 発症までの経過などが HLA（ヒト MHC）のゲノム多様性のみならず NK レセプター（KIR）の多様性とも密接に関連していることが判明している。

ワクチンの *in vivo* での効果を最大限に発揮させるためには、多種多様な免疫応答関連分子群のうち特にどの分子の機能的多様性に注目すべきかを明らかにすることが不可欠であるが、ヒトを用いた研究には制限があるため、まずアカゲザルを対象としたワクチン開発系での解析を通じて情報を得、その情報をヒト HIV ワクチン開発に応用することが有効な手法である。また、ワクチン接種後に SIV 感染が生じた場合のサル個体の臨床予後と免疫応答関連分子群のゲノム多様性との関連を検討することで、ヒト HIV 感染予後を規定するゲノム多様性に関する有用な情報が得られる。

そこで本研究では、アカゲザルやカニクイザルを対象として、MHC 分子群、MHC 関連分子群、NK レセプター群などの免疫応答関連分子群のゲノム多様性を検討し、これと CTL 誘導型ワクチンによる SIV ウイルス感染制御効果との関連を評価しつつ、新たなワクチン開発戦略を得ることを目的とする。

B. 研究方法

(1) MHC クラス I 遺伝子群多型の解析：これまでに RSCA 法による MHC-A, B タイピング法を開発し、これを用いた解析でアカゲザルでは著明な遺伝子増幅が生じていることを明らかにした。そこで、代表的なハプロタイプについて、Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子について、抗原提示ドメインをコードする exon2 および exon3 に対応する cDNA 領域をクローニングし、30-60 クローンの塩基配列を決定した。さらに、配列情報をもとにクラスタリングを行い、個体ごとに代表的な発現遺伝子アリルを決定した。

(2) RAET1/ULBP 領域多型の解析：RAET1/ULBP 領域には MHC クラス I 様分子をコードする遺伝子群が存在する。そこで、アカゲザルおよびヒトを対象にして、RAET1/ULBP 領域内に設定したマイクロサテライトマーカーを用いて、RAET1/ULBP のゲノム多様性構造を検討した。また、RAET1/ULBP 遺伝子群の塩基配列を解析した。

(3) CCL3L1 遺伝子領域多型の解析：CCL3L1 (LD78) は HIV レセプターである CCR5 のリガン

ドであるが、CCL3L1 には遺伝子コピー数多型があり、これが HIV 感染感受性と関連することが最近報告された。そこでアカゲザルおよびヒトを対象にして、CCL3L1 コピー数多型を簡便に解析するための方法論を開発した。また、これを用いて、HIV 感染後 AIDS 長期未発症と CCL3L1 コピー数多型との関連を検討した。

(4) TIM1 遺伝子領域多型の解析：T 細上に発現し、Th1/Th2 バランス制御に関わると推定されている TIM1 遺伝子について、アカゲザルを対象とした構造解析を行った。また、SIV ワクチン後のアカゲザル個体について産生された抗体価を無産生（検出感度以下）群と産生群の 2 群に分類し、TIM1 多型アリル分布頻度との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれるが、以下のとおり東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を申請し、審査を受けた後、研究機関長による実施承認を受けている。研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」（実施責任者 木村彰方）（平成 18 年 7 月 6 日付承認）

C. 研究結果

(1) MHC クラス I 遺伝子群多型の解析：ワクチン実験に用いたアカゲザル 48 個体について、Mamu-A 遺伝子 cDNA をクローニングした。うち 30 個体については Mamu-B 遺伝子 cDNA についてもクローニングした。各ローカスごとに 30-60 クローンを選択し、塩基配列解析を実施している。これまでに 14 個体の Mamu-A 遺伝子配列、4 個体の Mamu-B 配列の比較を行ったが、その結果、以下のことが判明している。各個体の Mamu-A アリルはおおむね 3-8 群に、Mamu-B は 5-10 群にクラスタリングされるため、アカゲザル個体は複数の異なるアリル群を発現することが確定した。また、決定した配列のうちデータベースに登録されているアリルと配列が一致するものは 20%程度に過ぎず、大多数は新規アリルであった。例えば、a ハプロタイプ、h ハプロタイプは

それぞれ A1*4301、A*1403 アリルを発現するが、p ハプロタイプ、g ハプロタイプはそれぞれ A1*1802 と 99% 相同な新規アリル、A*06 と 97% 相同な新規アリルを発現していた。一方、俣野らとの共同研究で CTL エピトープ Gag241-249 の拘束分子は Mamu-A90120-5 であることを明らかにした。ヒトでは HLA-B*5701 が類似エピトープを提示することが知られているが、Mamu-A90120-5 と B*5701 の構造は全体としては相同性が低かった。しかしながら、抗原ペプチド結合ドメインのみの構造比較から、ペプチド結合に関わる位置のアミノ酸配列は相同性が高いことが判明した。なお、Mamu-A90120-5 は Mamu-A*11 と約 95% の相同性を有する新規アリルであった。

(2) RAET1/ULBP 領域多型の解析：アカゲザルおよびヒトについて RAET1/ULBP 領域遺伝子群の構造解析を実施している。アカゲザルについては、以下のことが判明した。1) ULBP1 遺伝子、ULBP2 遺伝子はヒト、チンパンジーとはかなり異なっているが、アカゲザル集団内での多様性は検出されなかった、2) ULBP3 遺伝子もヒト、チンパンジーとはかなり異なる上にアカゲザル個体間で多様性が存在する、3) アカゲザルの ULBP4 遺伝子は複数存在する。また、データベース解析からアカゲザルの RAET1/ULBP 領域にはヒトとは異なる遺伝子重複が生じていた (図 1)。

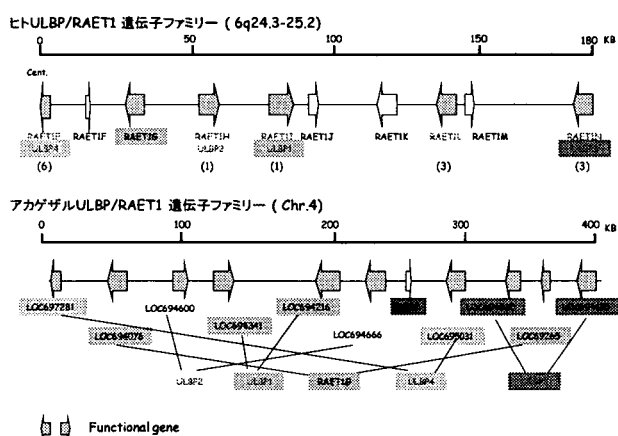


図 1. ヒト (上段) とアカゲザル (下段) の RAET/ULBP 領域遺伝子構造比較

(3) CCL3L1 遺伝子領域多型の解析：CCL3L1(LD78)は CCR5 のリガンドであるが、我々

は以前に CCL3L1 遺伝子座には遺伝子コピー数に個体差が存在することを報告した (Hirashima M, et al: DNA Sequence 3: 203-212, 1992) が、最近 CCL3L1 コピー数多型が HIV 感染感受性と関連することが明らかにされている。コピー数の測定には TaqMan 法や DNA chip 法が用いられるが、いずれも高価である。そこで本研究では、real-time PCR 法を用いた簡便で高精度のコピー数多型測定法 (図 2) を開発した。

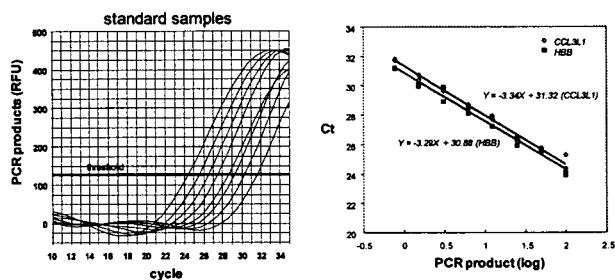


図 2. Real-time PCR 法を用いた CCL3L1 コピー数測定

ついでこの手法を用いて検討したところ、日本人一般集団の平均コピー数は 5.0 ± 0.2 であるのに対し、チンパンジーは 10.0 ± 2.7 とコピー数が多く、これに対してアカゲザルやカニクイザルでは 5.1 ± 1.6 とコピー数はヒトに近いが個体差が大きいことが判明した (図 3)。また、日本人 HIV 感染者は 3.4 ± 0.2 であり、一般集団に比較して有意にコピー数が少なかったが、感染後に AIDS をゆっくり発症した群 (3.0 ± 0.3) と 10 数年に渡って未治療でも発症しない群 (3.7 ± 0.4) では有意な相違はなかった (図 3)。

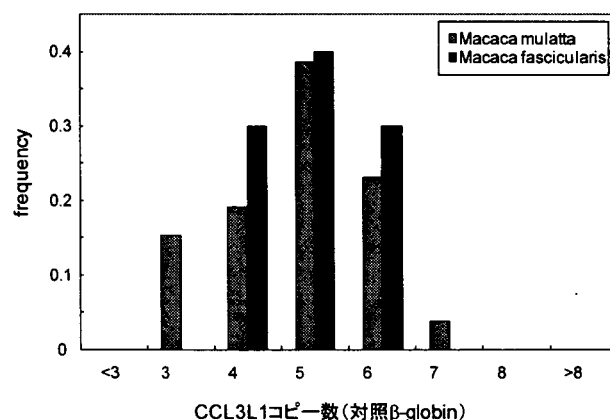


図 3. 旧世界ザル (アカゲおよびカニクイ) の CCL3L1 コピー数の分布

なお、予備的な検討であるが、ワクチン接種後アカゲザルにおける中和抗体産生と CCL3L1 コピー数との間には関連は認められなかった。

(4) TIM1 遺伝子領域多型の解析：有効なワクチン効果の発揮には、CTL の効率的な誘導と中和抗体の産生が関与するが、ワクチン効果には個体差がある。CTL 誘導性の個体差には主に MHC クラス I の多様性、抗体先生の個体差には MHC クラス II の多様性が関わるが、このような免疫応答の個体差には MHC 以外の多様性も関与すると考えられる。そこで本年度 Th1/Th2 バランス制御に関わる TIM1 遺伝子の多様性を検討した。アカゲザルやカニクイザルを対象として TIM1 遺伝子解析を行ったところ、mucin 様構造部分に著明な多様性が存在することが判明した。この領域はヒトでも多様性が存在するが、アカゲザルやカニクイザルにおける多様性はヒトよりはるかに高度であり、mucin 様構造のリピート数多型であった (図 4)。

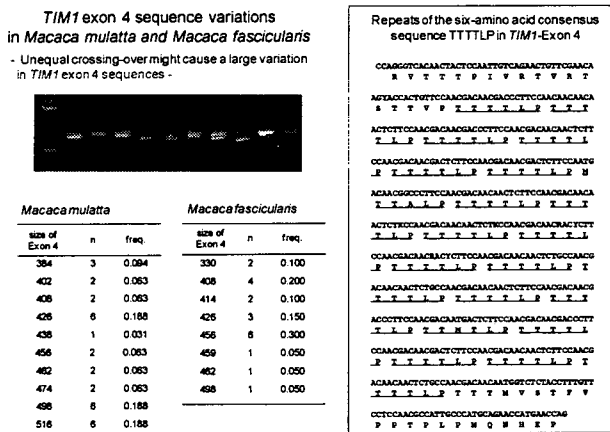


図 4. アカゲザルおよびカニクイザルにおける TIM1 遺伝子の多様性

ついで予備的な検討として、ワクチン接種後に中和抗体価を測定しなかった群 (n=13) を対照として、中和抗体測定群 (n=12) のうち無産生群 (n=6) と産生群 (n=6) に分類して TIM1 リピート数多型との関連を検討した。その結果、抗体無産生群では対照と多型分布に有意な相違はなかったが、抗体産生群では対照群と比較してリピート数が少ない個体が有意 (p=0.001) に多かった。また、この相違は無産生群と比較しても有意 (p=0.006) であった。

D. 考察

ワクチン開発において主に使用しているアカゲザル集団について、MHC ハプロタイプごとに発現する Mamu-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA の配列解析を

行った結果、個体ごとに発現するアレル数が異なることが確認された。また、同一ハプロタイプ上の Mamu アレルは異なるハプロタイプ上の Mamu アレルと同程度に配列が異なっていた。このことは、Mamu ハプロタイプの成立は Mamu アレルの分岐と同様に古いことを示唆する。また、決定したアレルの大半はデータベースに登録されていない新規アレルであったことから今後さらに Mamu-A, Mamu-B アレルの構造を決定し、詳細なハプロタイプ解析を行うことが必要である。

一方、T 細胞や NK 細胞に広く発現する活性型 NK レセプター NKG2D のリガンドである RAET/ULBP 遺伝子群の解析を行った。ヒトでは一部の ULBP 遺伝子にのみ多型が存在するが、アカゲザルにおいても同様であり、MHC 分子と比較して RAET/ULBP 分子の多様性は小さかった。しかしながら、アカゲザル RAET/ULBP 領域はヒトとは異なった遺伝子重複を来しており、より複雑な構造をとっていることから、多様性をさらに詳細に解析する必要がある。

これらとは別に、HIV ウイルスあるいは SIV ウイルスに対する感染感受性や免疫応答性を規定する遺伝要因の検索を行っている。本年度は CCL3L1 と TIM1 についての解析結果が得られたが、予備的な実験から TIM1 の多様性はワクチン接種後の中和抗体産生との関連が示唆された。今後中和抗体測定集団数を増やしての解析を行うのみならず、mucin 用ドメインの機能的意義の検討と、ヒト HIV 感染性や AIDS 発症感受性との関連を検討する予定である。

E. 結論

アカゲザルにおける SIV ワクチン接種後の CTL 免疫応答の個体差形成に関わる MHC クラス I 遺伝子群の多様性を遺伝子配列レベルで解明した。今後さらに実験個体群の MHC クラス I 遺伝子群の多様性を解明することで、提示するペプチド抗原との対応関係をより詳細に検討することを可能となる。また、NKG2D レセプターのリガンドである MHC クラス I 様分子をコードする RAET/ULBP 領域遺伝子群の解析は免疫応答性の個体差における NK 細胞レセプターの意義の解明につながると考えられる。さ

らに、本研究で示したように、MHCあるいはMHC用分子以外にも免疫応答の個体差形成に関わる遺伝的要因をさらに検討することで、より有効なワクチン効果をもたらすための戦略が得られる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Nakajima T, Ohtani H, Naruse T, Shibata H, Mimaya J, Terunuma H, Kimura A: Copy number variations of CCL3L1 and long-term prognosis of HIV-1 infection in asymptomatic HIV-infected Japanese with hemophilia. *Immunogenetics* 2007; 59(10): 793-798.
- (2) Shichi D, Matsuzawa Y, Ota M, Katsuyama Y, Matsumori A, Takahashi M, Naruse TK, Inoko H, Kimura A: HLA-DP beta chain may confer the susceptibility to hepatitis C virus-associated hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Immunogenet* 2008; 35(1): 37-43.
- (3) Tsukamoto T, Dohki S, Akahoshi, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T: Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS*, In Press

2 学会発表

- (1) Naruse T, Terunuma H, Mimaya J, Kimura A: Polymorphisms in the loci for NKG2 receptors and their ligands in HIV/AIDS. The 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity. Awaji, September 1-5, 2007.
- (2) 中島敏晶, 大谷仁志, 成瀬妙子, 三間屋純一, 照沼裕, 木村彰方: HIV感染とAIDSの進行におけるCCL3L1遺伝子コピー数の関連. 第16回

日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日.

- (3) 成瀬妙子, 照沼裕, 三間屋純一, 木村彰方: 血友病患者のHIV感染制御個体差とNK細胞機能関連の免疫応答遺伝子群多型性. 第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日.
- (4) 志知大輔, 成瀬妙子, 日野原邦彦, 森一泰, 俣野哲郎, 本多三男, 保富康広, 宮澤正顕, 木村彰方: エイズウイルスワクチンに対する免疫応答に関わるMamu-B遺伝子多型の探索. 第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日.
- (5) 志知大輔, 松森昭, 高橋めぐみ, 成瀬妙子, 猪子英俊, 木村彰方: HLA-DP遺伝子はC型肝炎ウイルス陽性肥大型心筋症と関連する. 第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日.
- (6) 中島敏晶, 大谷仁志, 成瀬妙子, 柴田宏樹, 三間屋純一, 照沼裕, 木村彰方: HIV感染とAIDSの進行におけるCCL3L1遺伝子コピー数の関連. 日本人類遺伝学会第52回大会, 東京, 2007年9月12-15日.
- (7) 成瀬妙子, 俣野哲郎, 森一泰, 本多三男, 保富康広, 宮澤正顕, 木村彰方: ヒトおよび実験動物サルにおけるNKG2Dレセプター関連遺伝子多型性解析. 日本人類遺伝学会第52回大会, 東京, 2007年9月12-15日.
- (8) Naruse T, Kimura A, Terunuma H, Mimaya J: Polymorphisms in the loci for NKG2 receptors and their ligands in HIV/AIDS. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007年11月20-22日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

センダイウイルスベクターを用いた CTL 誘導法に関する研究

分担研究者 朱 亜峰 ディナベック株式会社事業開発本部長

研究要旨

SIVmac239 の epitope-deleted Gag 発現 F 遺伝子欠損型センダイウイルスベクターについて、ベクター調製と大量生産を実施した。精製後、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験を行ない、in vivo 用に供給した。

A. 研究目的

センダイウイルス (SeV) ベクターは、一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA ベクターであり、その全生活環において DNA への変換がなく、転写ならびにゲノムの複製は細胞質内で、自前の RNA ポリメラーゼ (P および L 蛋白質) を利用して行われる。すなわち、治療用遺伝子を核内に挿入し染色体遺伝子に組み込むことなく、細胞質において直接発現することができる特徴があり、「細胞質型 RNA ベクター」と呼ばれている。このような特徴のあるベクターの開発にあたって、宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質 F 遺伝子を欠失させることにより、二次感染性のない、非伝播型ベクターへ改良することに成功している (SeV/ Δ F)。この F 遺伝子欠失については、in vivo 実験が十分可能な、あるいは臨床適用にも応用可能なクオリティを有する、大量生産システムを既に構築している。この大量生産システムを用いてベクターの大量生産を行ない、治療理論確立のための解析用ベクターとして、エピトープ部分を欠失した SIVmac239 の gag 蛋白 (epitope-deleted Gag) を発現するベクターを、クオリティの高いベクターとして大量に供給することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ベクター大量生産

ベクターの増殖および生産には F 蛋白質を持続発現するパッケージング細胞株を利用し、温度 35.5°C での大量生産を実施した。2L スケールは、T225cm² フラスコで 34 枚に相当する。

(3) ベクター大量精製

フィルターろ過による細胞残渣除去、カラムクロマトグラフィー、濃縮の過程を組み合わせることで、ベクターの精製を行った。

(4) ベクターの品質検査

力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を設定し、実施した。

(倫理面への配慮)

SeV は実験室飼育下のネズミから単離されたパラインフルエンザウイルスであり、ヒトへの病原性は知られていない。野生型ウイルスでも文部科学省の指針ではバイオハザードレベル P2 であり、通常の実験室で使用でき、非常に安全なウイルスと考えられている。さらに実験に使用するベクターは、ウイルスの感染融合に必須の F 蛋白質遺伝子をゲノムから欠損しているため、非伝播型に改良されており、理論的にも実験的にも伝播性が無いことが証明されている。この様に実験動物および環境等に与える影響は最小限にとどめる。なお当分担研究では動物等への投与実験は厳選して限定されたものとし、その際には動物愛護の基準に

従うものとする。

C. 研究結果

目的のベクターについて、SeV/Δ F を骨格としたベクター大量生産を実施した。最終的には、PBS 溶液に置換し、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を実施し、in vivo 試験に十分使用可能なクオリティーでの調製に成功した。また、それぞれの QC 項目の結果を付記した。

1) SeV18+SIVgag4/ΔF

- 力価 1.1 x10¹⁰ CIU/ml
- 無菌試験(TG 培地/SCD 培地) 適合
- マイコプラズマ否定試験(PCR 法) 適合
- エンドトキシン試験 0.48EU/ml 未満
- タンパク質濃度 347.28 μg/ml
- 電気泳動 下記参照

1 2 3 4

1. Molecular marker
2. Control vector
(SeV/ΔF dF-003)
3. SeV18+SIVgag4/ΔF
4. Molecular marker

D. 考察

ベクターの大量生産で問題なく実施可能であった。

E. 結論

「SIVmac239 の epitope-deleted Gag 発現 F 遺伝子欠損型 センダイウイルスベクター (SeV18+SIVgag4/ΔF)」の大量生産を実施した。精製後、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC

試験項目を実施し、治療理論確立のための解析用ベクターとして、クオリティーの高いベクターを供給した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagai Y, Inoue M, Iida A, Zhu YF, Hasegawa M, Kato A, Matano T. Sendai virus engineering: From reverse genetics to vector development. *Virus Expression Vectors*, 2007; 123-146

2. 学会発表

第 55 回日本ウイルス学会 (Oct 21-23, 2007)

(1) 抗原特異的細胞性免疫誘導に必要なセンダイウイルスベクターワクチン接種量の解析: 守屋智草、井上 誠、飯田章博、朱 亜峰、長谷川護、俣野哲郎

第 55 回日本ウイルス学会 (Oct 21-23, 2007)

(2) センダイウイルスベクターエイズワクチンの免疫誘導効率に対する抗ベクター抗体の影響の解析: 守屋智草、井上 誠、飯田章博、朱 亜峰、長谷川護、俣野哲郎

第 11 回日本ワクチン学会 (Dec 8-9, 2007)

(3) 抗ベクター抗体存在下におけるセンダイウイルスベクターエイズワクチンの CTL 誘導能の解析: 守屋智草、堀場 聡、井上 誠、飯田章博、朱 亜峰、長谷川護、俣野哲郎

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今期なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SIV 複製に関与する宿主因子に関する研究

分担研究者 明里 宏文（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）

研究協力者 武内 寛明（東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター）

研究要旨

ヒトエイズ発症機序解明および発症阻止に向けたワクチン戦略や抗エイズ薬開発において、個体（動物）エイズモデルを確立することが必須事項となっている。現在のところ、SIV 感染アカゲザルモデルがその最適モデルであるが、ウイルス複製制御に関与する宿主因子の個体情報が不足していることより、サルエイズモデルから得られた情報が、どの程度ヒトエイズを反映しているかを見極めることは困難である。そこで本研究では、SIV 複製に関与するサル宿主因子を、培養細胞レベルで検索同定およびその個体レベルへの還元を目的として、アカゲザルおよび同属であるカニクイザル、ブタオザル由来の3種類の T 細胞株を用いて、ウイルス増殖複製に関わるサル宿主因子の解析を行った。これまでの我々の研究により、SIV がヒトへ感染伝播する際に影響を及ぼす、抗 SIV ヒト宿主制御因子：Cyclophilin A (CypA) を同定している。そこで、サル T 細胞株群においても、その宿主因子の存在有無を確認する為、CypA の遺伝子解析を行った。その結果、今回用いた T 細胞株群には、全てサル CypA が存在しており、そのアミノ酸配列は、ヒトと同一のものであることが判明した。そこで、サル T 細胞株群における野生型 SIV 株のウイルス増殖能に対して、その機能阻害剤 (Cyclosporine A; CsA) 存在下で感染実験を行った結果、SIV 感染増殖効率が顕著に低下する結果を得た。本研究成果から、サル Cyclophilin A は、SIV 増殖複製に必要なサル宿主因子であると考えられる。

A. 研究目的

HIV 感染増殖において、ヒト細胞内には、それを促進する宿主因子と抑制する宿主因子とが混在している。具体的には、cytidine-deaminase family の一つである Apobec 分子は、HIV 感染増殖に対する抑制因子であり、chaperon family の一つである CypA は、それを促進する宿主因子であることが、既に報告されている。一方、これらの宿主因子に対するウイルス側の因子として、Apobec family の機能を抑

制するのは、アクセサリ蛋白の一つである Vif 蛋白であり、CypA の HIV 感染増殖促進機能は、Gag 領域内のキャプシド (CA) 蛋白との相互作用によって発揮されることが明らかとなっている。我々のこれまでの研究により、SIV がヒトへ感染伝播する際に、Apobec および CypA が SIV 増殖抑制因子として作用するが、SIV Vif 蛋白が双方の機能を抑制することを明らかにしている。そこで、サル T 細胞群における上述のヒト宿主因子にあたるサル宿主因子の機能

を解析することを目的とし、まずはサル CypA の遺伝子解析およびその機能解析を行うこととした。

今年度（平成 19 年度）は、サルエイズモデルで用いられるマカク属のアカゲザル、カニクイザル、およびブタオザル由来の T 細胞株群の CypA 遺伝子解析を行った。次に、CypA の機能阻害剤である CsA を用いて、試験管内における SIV 感染増殖効率の解析を行った。

B. 研究方法

(1) サル T 細胞株の樹立：アカゲザル、カニクイザルおよびブタオザルの末梢血リンパ球を材料とし、Herpesvirus saimiri (HVS) 感染により transform させた。その後、IL-2 存在下で増殖した細胞膜表面上の CD3 および CD4 分子の発現パターンを、フローサイトメーターを用いて細胞集団のクローン状況を確認することで、T 細胞株樹立を確認した。

(2) CypA 遺伝子解析：アカゲザル由来（HSR-5.4）、カニクイザル由来（HSC-F）、ブタオザル由来（HSMn-3942）の各 T 細胞群から、細胞由来の RNA を抽出した。そして、データベース上に公開されているサルゲノム情報を基に、CypA と思われる配列を検索し、その配列の mRNA に含まれる coding 領域外にプライマーを設定した。その後、このプライマーを用いて、RT-PCR を行い、得られた PCR 産物を pGEM-T ベクター（promega）に組み込んで、その塩基配列を決定した。

(3) SIV 作製：SIV 分子クローンである、pSIVmac239 およびアフリカミドリザル由来の pSIVagm とを、HeLa 細胞へ遺伝子導入し、48 時間後に各 SIV 粒子が含まれる培養上清を回収し、SIV キャプシド(p27)抗原量および逆転写酵素（RT）活性を測定した上で、感染実験用のウイルスストックとした。

(4) SIV 感染実験：樹立した T 細胞株群；HSC-F、HSR-5.4、HSMn-3942 に、SIVmac239 および SIVagm を感染させた。この際、CsA 存在（0.5、2.5 μ M）および非存在下でのウイルス増殖効率を見極めるために、経時的に培養上清を回収し、RT 活性を測定した。

C. 研究結果

(1) サル T 細胞株の樹立：HSR-5.4、HSC-F、HSMn-3942 の各 T 細胞株が樹立出来、この細胞は、IL-2 存在下で効率よく増殖することが出来た。

(2) CypA 遺伝子解析：各 T 細胞株由来の RNA から得られた遺伝子配列を解析した結果、ヒト CypA と同じアミノ酸配列を持つサル CypA が存在していることが明らかとなった。その結果を図 1 に示す。

(3) SIV 作製：SIV 分子クローンからの SIV 作製は HeLa 細胞を用いることで、SIVmac239 および SIVagm ともに高力価のウイルスストックが得られた。

(4) SIV 感染実験：HSR-5.4、HSC-F、Mn-3942 の各 T 細胞株を用いた感染実験で、CsA 存在下における SIVmac239 および SIVagm の感染増殖効率を見極めた結果、両方の SIV 共に、CsA 依存的なウイルス増殖効率の低下が判明した。その結果を図 2 に示す。

D. 考察

CypA 遺伝子解析により、マカク属 3 種のサルには、全て CypA 遺伝子が保有されており、これらは、ヒト CypA と同じアミノ酸配列を持つことが分かった。更に、CypA 機能阻害剤である CsA を SIV 感染実験に用いることで、SIV 感染増殖効率が低下することから、サル CypA は、SIV 感染に必要な宿主因子であることが示唆された。また、マカク属由来ではない SIVagm の感染増殖にも、この CypA は必須であることから、サル属間に依存しない、SIV 感染に普遍的な宿主因

子であることが考えられる。この結果は、既に明らかとなっている、ヒト CypA が HIV 感染に必須な宿主因子であることを考慮すると、同種間におけるエイズウイルス感染には、CypA は必須な宿主因子であることが考えられる。このことは、サルエイズモデルから得られた宿主因子情報にヒトへのフィードバックが可能であることを示唆しており、エイズモデル評価系として更に有用であると考えられる。現在、サル CypA と SIV との相互作用について、更なる詳細な機能解析を、HIV とヒト CypA との相互作用と比較することで、種間差異の有無を検討している。

E. 結論

本年度は、SIV 複製に必須なサル宿主因子として、CypA を同定した。そして、この CypA は、SIV 感染において、サル属種によらない、普遍的な宿主因子であること示唆する結果を得た。本研究成果は、サルエイズモデルがヒトエイズの評価系として更なる有

用性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S: Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. **Blood** 111, 243-250, 2008.

2 学会発表

なし。

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

Human	1	MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGS	60
HSC-F (Cynomolgus)	1	MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGS	60
HSR5.4 (rhesus)	1	MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGS	60
Mn-3942 (pig-tail)	1	MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGS	60

human	61	MCQGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTE	120
HSC-F	61	MCQGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTE	120
HSR5.4	61	MCQGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTE	120
Mn-3942	61	MCQGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTE	120

human	121	WLDGKHVVFGKVKEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE	165
HSC-F	121	WLDGKHVVFGKVKEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE	165
HSR5.4	121	WLDGKHVVFGKVKEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE	165
Mn-3942	121	WLDGKHVVFGKVKEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE	165

図 1. ヒトおよびサル (Macaca 属) 由来の CypA アミノ酸配列比較

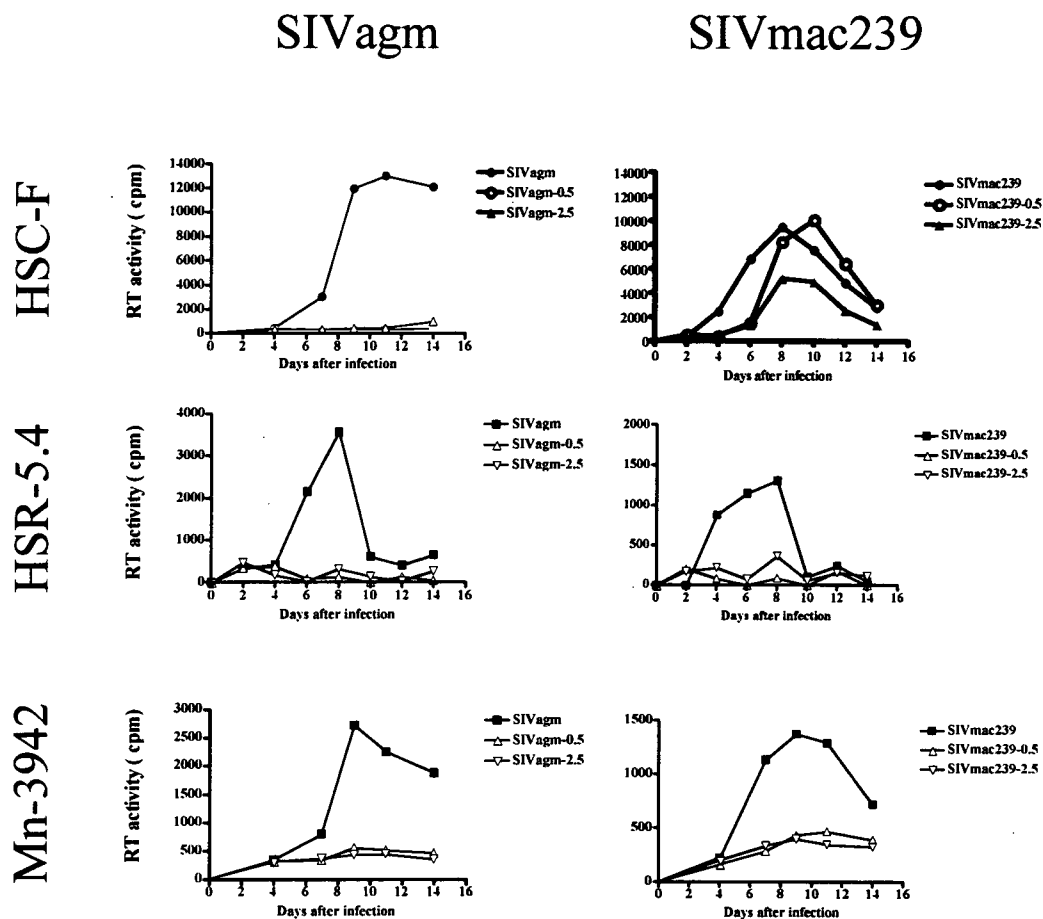


図2. マカク属3種のT細胞株を用いたSIV感染実験

SIVagm (右側) およびSIVmac239 (左側) をHSC-F (上段)、HSR-5.4 (中段)、HSMn-3942 (下段) T細胞株に感染させ、2日毎の培養上清中のRT活性を経時的に測定した結果を示す。各曲線は、0: CsA(-)、0.5: CsA (0.5 μM)、2.5: CsA (2.5 μM) 存在下でのSIV増殖曲線を示している。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nagai Y, Inoue M, Iida A, <u>Zhu Y-F</u> , Hasegawa M, Kato A, <u>Matano T.</u>	Sendai virus engineering: From reverse genetics to vector development.	Hefferon KL	Virus Expression Vectors	Trasworld Research Network	USA	2007	123-146

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, <u>Matano T.</u>	Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4+ T-cell preservation after non-sterile protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine.	J Virol	81	5202-5211	2007
Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, <u>Matano T.</u>	Post-infection immunodeficiency virus control by neutralizing antibodies.	PLoS ONE	2	e540	2007
Morikawa Y, Goto T, Yasuoka D, Momose F, <u>Matano T.</u>	Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	J Virol	81	9911-9921	2007
Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, <u>Matano T.</u>	Induction of CD8+ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques.	J Virol	81	11640-11649	2007
Takeda A, <u>Matano T.</u>	Inhibition of infectious murine leukemia virus production by Fv-4 env gene products exerting dominant negative effect on viral envelope glycoprotein.	Microbes Infect	9	1590-1596	2007
Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, <u>Shu T</u> , Hasegawa M, Nagai Y, <u>Matano T.</u>	Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences.	Microbes Infect		in press	

Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, <u>Kimura A</u> , Takiguchi M, <u>Matano T</u> .	Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope.	AIDS		in press	
Takeuchi H, <u>Matano T</u> .	Host factors involved in resistance to retroviral infection.	Microbiol Immunol		in press	
Nakajima T, Ohtani H, Naruse T, Shibata H, Mimaya J, Terunuma H, <u>Kimura A</u> .	Copy number variations of CCL3L1 and long-term prognosis of HIV-1 infection in asymptomatic HIV-infected Japanese with hemophilia.	Immunogenetics	59	793-798	2007
Shichi D, Matsuzawa Y, Ota M, Katsuyama Y, Matsumori A, Takahashi M, Naruse TK, Inoko H, <u>Kimura A</u> .	HLA-DP beta chain may confer the susceptibility to hepatitis C virus-associated hypertrophic cardiomyopathy.	Int J Immunogenet	35	37-43	2008
Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, <u>Akari H</u> , Motoyoshi K, Okada S.	Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor.	Blood	111	243-250	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Long-Term Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication with Central Memory CD4⁺ T-Cell Preservation after Nonsterile Protection by a Cytotoxic T-Lymphocyte-Based Vaccine[▽]

Miki Kawada,^{1,2} Tetsuo Tsukamoto,^{1,3} Hiroyuki Yamamoto,^{1,3} Akiko Takeda,¹ Hiroko Igarashi,³ David I. Watkins,⁴ and Tetsuro Matano^{1,3,5*}

International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan¹; Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan²; Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan³; Wisconsin National Primate Research Center, University of Wisconsin—Madison, 555 Science Drive, Madison, Wisconsin 53711⁴; and AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan⁵

Received 30 December 2006/Accepted 25 February 2007

Induction of virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses is a promising strategy for AIDS vaccine development. However, it has remained unclear if or how long-term viral containment and disease control are attainable by CTL-based nonsterile protection. Here, we present three rhesus macaques that successfully maintained Env-independent vaccine-based control of simian immunodeficiency virus (SIV) mac239 replication without disease progression for more than 3 years. SIV-specific neutralizing antibody induction was inefficient in these controllers. Vaccine-induced Gag-specific CTLs were crucial for the chronic as well as the primary viral control in one of them, whereas those Gag-specific CTL responses became undetectable and CTLs specific for SIV antigens other than Gag, instead, became predominant in the chronic phase in the other two controllers. A transient CD8⁺ cell depletion experiment 3 years postinfection resulted in transient reappearance of plasma viremia in these two animals, suggesting involvement of the SIV non-Gag-specific CTLs in the chronic SIV control. This sustained, neutralizing antibody-independent viral control was accompanied with preservation of central memory CD4⁺ T cells in the chronic phase. Our results suggest that prophylactic CTL vaccine-based nonsterile protection can result in long-term viral containment by adapted CTL responses for AIDS prevention.

Human immunodeficiency virus (HIV) and simian immunodeficiency virus (SIV) infections induce acute, massive depletion of CCR5⁺ CD4⁺ effector memory T cells from mucosal effector sites. This is followed by chronic immune activation with gradual immune disruption leading to AIDS (7, 15, 20, 25, 26, 33, 34). Acute depletion has an impact on disease course but does not dictate everything that happens in the chronic phase (7, 26). It has also been suggested that persistent viral replication-associated chronic immune activation may be critical for AIDS progression.

Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses are crucial for control of HIV and SIV replication (3, 8, 12, 18, 24, 29). Several vaccine regimens eliciting virus-specific CTL responses have been developed and evaluated in macaque AIDS models (6, 21). Some of them have shown protective efficacies leading to viremia control in a model of X4-tropic simian-human immunodeficiency virus (SHIV) infections (1, 16, 22, 23, 28, 31). However, assessment of the ability of vaccines to ameliorate disease progression requires analysis in macaque models of R5-tropic SIV infection (5).

Although most CTL-based vaccine trials using rigorous SIV challenges in Indian rhesus macaques have failed, some of them have shown amelioration of acute memory CD4⁺ T-cell depletion in the vaccinated animals with reduction in viral loads out to a year postinfection (4, 13, 19, 35). These findings have suggested that there may be a clinical benefit conferred by CTL-based AIDS vaccines. Unfortunately, it is still unclear as to how nonsterile protection conferred by prophylactic CTL-based vaccines can result in long-term viral containment and disease control.

We have previously developed a CTL-eliciting AIDS vaccine regimen using a DNA-prime/Gag-expressing Sendai virus (SeV-Gag) vector-boost (16, 32). Our regimen does not utilize Env immunogen that may induce neutralizing antibodies, although this antigen has been used in most of the vaccines except for a few cases (16, 31, 35). We have evaluated efficacy of this Env-independent vaccine against SIVmac239 challenge in Burmese rhesus macaques and found neutralizing antibody-independent, CTL-based control of primary SIV replication in five of eight vaccinees (17). In the present study, we followed these macaques to examine if long-term viral containment without disease progression is possible by prophylactic CTL-based AIDS vaccines.

MATERIALS AND METHODS

Animal experiments. Twelve Burmese rhesus macaques (*Macaca mulatta*) used in our previous SIVmac239 challenge experiment (17) were followed in the

* Corresponding author. Mailing address: International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Phone: 81-3-6409-2078. Fax: 81-3-6409-2076. E-mail: matano@m.u-tokyo.ac.jp.

[▽] Published ahead of print on 7 March 2007.

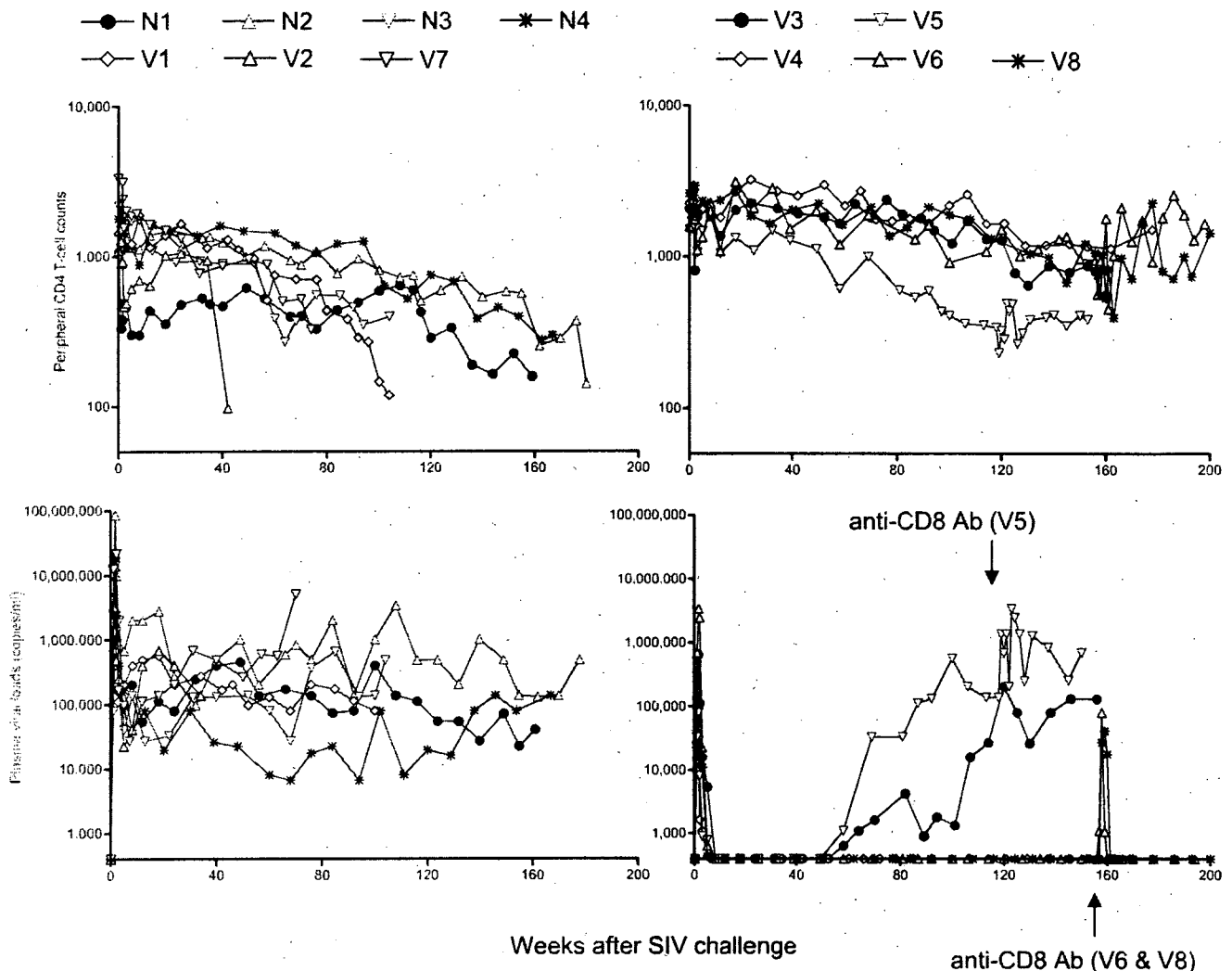


FIG. 1. Follow-up of the macaques after SIVmac239 challenge. Upper panels, peripheral CD4⁺ T-cell counts (cells/ μ l); lower panels, plasma viral loads (viral RNA copies/ml plasma); left panels, the seven noncontrollers; right panels, the five controllers. All seven noncontrollers developed AIDS and were euthanized during the observation period (Table 1). Macaques V5, V6, and V8 received anti-CD8 antibody treatment starting from week 118, week 156, and week 156, respectively.

present study. These macaques were maintained in accordance with the Guideline for Laboratory Animals of the National Institute of Infectious Diseases and the National Institute of Biomedical Innovation. Four of them were naive, whereas the other eight macaques received a DNA vaccine followed by a single boost with SeV-Gag before an intravenous SIVmac239 challenge. The DNA, CMV-SHIVdEN, used for the vaccination was constructed from an *env*- and *nef*-deleted SHIV_{MD1438} molecular clone DNA (30) and has the genes encoding SIVmac239 Gag, Pol, Vif, and Vps, SIVmac239-HIV-1_{DF12} chimeric Vpr, and HIV-1_{DF12} Tat and Rev as described previously (17). At the DNA vaccination, animals received 5 mg of CMV-SHIVdEN DNA intramuscularly. Six weeks after the DNA prime, animals intranasally received a single boost with 1×10^8 cell infectious units of replication-competent SeV-Gag (V1, V2, V3, and V4) or 6×10^7 cell infectious units of F-deleted replication-defective F(-)SeV-Gag (9, 14, 32). Approximately 3 months after the boost, animals were challenged intravenously with 1,000 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) of SIVmac239 (11).

For CD8⁺ cell depletion, animals received a single intramuscular inoculation of 10 mg/kg of body weight of monoclonal anti-CD8 antibody (cM-T807) provided by Centocor (Malvern, PA) followed by three intravenous inoculations of 5 mg/kg cM-T807 on days 3, 7, and 10 after the first inoculation. The anti-CD8 antibody administration started at week 118 in macaque V5 and at week 156 in macaques V6 and V8. CD8⁺ T-cell depletion in peripheral blood was confirmed

by immunostaining using fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-human CD8 antibody (DK25; Dako, Kyoto, Japan).

All the noncontrollers were euthanized when they showed typical signs of AIDS, such as reduction in peripheral CD4⁺ T-cell counts, loss of body weight, diarrhea, and general weakness. Autopsy revealed lymphoatrophy or post-persistent generalized lymphadenopathy conditions consistent with AIDS.

Quantitation of plasma viral loads. Plasma RNA was extracted using the High Pure viral RNA kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). Serial fivefold dilutions of RNA samples were amplified in quadruplicate by reverse transcription and nested PCR using SIV gag-specific primers to determine the endpoint. Plasma SIV RNA levels were calculated according to the Reed-Muench method as described previously (17). The lower limit of detection is approximately 4×10^2 copies/ml.

Measurement of virus-specific neutralizing titers. Serial twofold dilutions of heat-inactivated plasma were prepared in duplicate and mixed with 10 TCID₅₀ of SIVmac239. In each mixture, 5 μ l of diluted plasma was incubated with 5 μ l of virus. After a 45-min incubation at room temperature, each 10- μ l mixture was added to 5×10^4 MT4 cells in a well of a 96-well plate. After 12 days of culture, supernatants were harvested. Progeny virus production in the supernatants was examined by enzyme-linked immunosorbent assay for detection of SIV p27 core antigen (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan) to determine the 100% neutralizing endpoint. The lower limit of detection is a titer of 1:2.

TABLE 1. Summary of responses in macaques challenged with SIVmac239

Macaque group and no.	MHC-I haplotype ^a	VL		Status ^c	CD4 count ^d at euthanasia	Opportunistic infection at autopsy ^e
		Set point ^b	After wk 60			
Unvaccinated noncontrollers						
N1	90-088-Ij	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 161	158	
N2	90-120-Ia	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 180	141	PCP
N3	90-122-Ie	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 104	393	
N4	90-010-Id	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 167	296	CMV
Vaccinated noncontrollers						
V1	90-088-Ij	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 105	119	
V2	90-120-Ib	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 42	97	PCP
V7	90-122-Ie	>10 ⁴	>10 ⁴	Euthanized at wk 77	323	
Vaccinated transient controllers						
V3	90-120-Ia	<400	>10 ³	Alive >3 yr		
V5	90-120-Ia	<400	>10 ⁴	Euthanized at wk 154*	384	
Vaccinated sustained controllers						
V4	90-120-Ia	<400	<400	Alive >3 yr		
V6	90-122-Ie	<400	<400	Alive >3 yr*		
V8	90-010-Id	<400	<400	Alive >3 yr*		

^a MHC-I haplotype was determined by reference strand-mediated conformation analysis as described previously (2, 17). MHC class I haplotypes 90-120-Ia and 90-120-Ib are derived from breeder R-90-120, 90-122-Ie is from R-90-122, 90-010-Id is from R-90-010, and 90-088-Ij is from R-90-088.

^b Plasma viral load (VL, in RNA copies/ml plasma) around week 12.

^c All seven noncontrollers exhibited reduction in peripheral CD4 T-cell count, loss of body weight, and general weakness and were euthanized and subjected to autopsy to be confirmed as AIDS. Macaques V5, V6, and V8 (indicated by asterisks) were administered an anti-CD8 antibody for CD8 cell depletion at weeks 118, 156, and 156, respectively.

^d Peripheral CD4 T-cell counts.

^e PCP, pneumocystis pneumonia; CMV, cytomegalovirus infection.

Measurement of virus-specific CTL responses. We measured virus-specific CD8⁺ T-cell levels by flow cytometric analysis of gamma interferon (IFN- γ) induction after specific stimulation as described previously (17). In brief, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cocultured with autologous herpesvirus papio-immortalized B-lymphoblastoid cell lines infected with a vaccinia virus vector expressing SIVmac239 Gag for Gag-specific stimulation or a vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G)-pseudotyped SIVGPI for SIV-specific stimulation. The pseudotyped virus was obtained by cotransfection of COS-1 cells with a VSV-G expression plasmid and the SIVGPI DNA, an *env*- and *nef*-deleted SIV molecular clone DNA. Intracellular IFN- γ staining was performed using a Cytolfix/Cytoperm kit (Becton Dickinson, Tokyo, Japan). Peridinin chlorophyll protein-conjugated anti-human CD8, allophycocyanin-conjugated anti-human CD3, and phycoerythrin-conjugated anti-human IFN- γ antibodies (Becton Dickinson) were used. Specific T-cell levels were calculated by subtracting nonspecific IFN- γ ⁺ T-cell frequencies from those after Gag-specific or SIV-specific stimulation. Specific T-cell levels less than 100 cells per million PBMCs are considered negative.

Immunostaining of CD4⁺ T-cell memory subsets. Frozen stocks of PBMCs were thawed and subjected to immunofluorescent staining by using fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-human CD28, phycoerythrin-conjugated anti-human CD95, peridinin chlorophyll-conjugated anti-human CD4, and allophycocyanin-conjugated anti-human CD3 monoclonal antibodies (Becton Dickinson). Memory and central memory subsets of CD4⁺ T cells were delineated by CD95⁺ and CD28⁺ CD95⁺ phenotypes, respectively, as described previously (27).

Statistical analysis. Central memory CD4⁺ T-cell counts just before SIV challenge (at week zero) were not significantly different between the noncontrollers ($n = 7$) and the controllers ($n = 5$) by unpaired t test. We calculated ratios of the counts at week 12 to week 0, week 70 to week 0, and week 70 to week 12 in each animal and performed an unpaired t test and nonparametric Mann-Whitney U-test between the noncontrollers and the controllers by using Prism software version 4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

RESULTS

Long-term viral containment without disease progression in the sustained controllers. We followed up on our vaccinated Burmese rhesus macaques used in the previous trial (17).

These macaques were vaccinated using a DNA prime-ScV-Gag boost, and they were challenged with SIVmac239. Five of eight vaccinees controlled viral replication and had undetectable plasma viremia at week 8 postchallenge. The remaining three vaccinees (V1, V2, and V7) and all four unvaccinated macaques (N1, N2, N3, and N4) failed to control viral replication. Of the five controllers, two macaques V3 and V5 (referred to as transient controllers) exhibited viremia reappearance around week 60, but the other three, V4, V6, and V8 (referred to as sustained controllers), maintained viral control (10).

In the present follow-up study, all seven noncontrollers, including three vaccinees and four unvaccinated controls, exhibited persistent viremia and a gradual decline in peripheral CD4⁺ T-cell counts (Fig. 1). All of them finally developed AIDS and were euthanized at week 42 to 180 postchallenge (Table 1), confirming that failure in control of SIVmac239 replication results in AIDS progression even in Burmese rhesus macaques. In contrast, all three sustained controllers maintained viral control and preserved peripheral CD4⁺ T cells without disease progression for more than 3 years (Fig. 1).

We then examined SIVmac239-specific neutralizing antibody responses by determining the end point plasma titers for killing 10-TCID₅₀ virus replication on MT4 cells (Fig. 2). Our vaccine regimens did not utilize Env as an immunogen, and no neutralizing antibody responses were induced before challenge in any of the vaccinees. Even after challenge, none of the SIVmac239-challenged macaques showed detectable neutralizing antibody responses until 6 months. After that, neutralizing antibody responses became detectable in some of the noncontrollers. In contrast, no or little neutralizing antibody

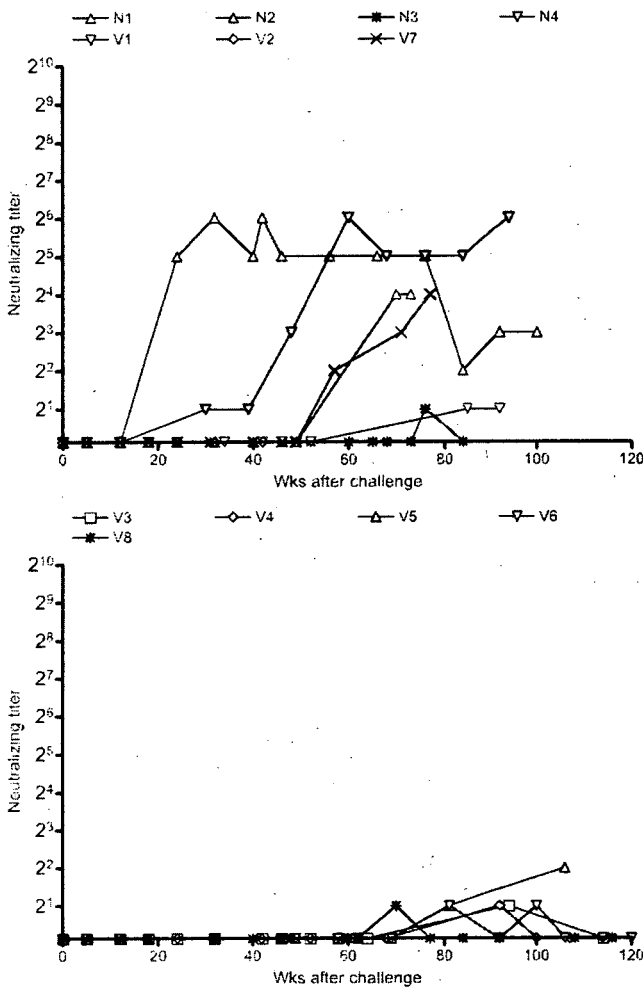


FIG. 2. SIVmac239-specific neutralizing antibody levels in plasma. Plasma titers for killing 10-TCID₅₀ SIVmac239 replication in the non-controllers (top panel), including unvaccinated control animals, and in the controllers (bottom panel) are shown.

responses were induced in the controllers, even in the chronic phase.

Shift of antigens targeted by CTLs during the period of viral control. CTLs from all five controllers selected Gag CTL escape mutations soon after infection, indicating that vaccine-induced Gag-specific CTL responses were crucial for viral control in the early phase of SIV infection (17). In one sustained controller, macaque V4, possessing major histocompatibility complex class I haplotype *90-120-Ia*, Gag₂₀₆₋₂₁₆ (HNEEAADWDL) epitope-specific CTLs and Gag₂₄₁₋₂₄₉ (SSVDEQIQW) epitope-specific CTL responses likely played a central role in control of viral replication in the chronic phase (10). We also analyzed virus-specific CTL responses in the remaining two sustained controllers, V6 and V8, to determine if vaccine-induced Gag-specific CTL responses played a role in control of viral replication in the chronic phase.

We measured Gag-specific and SIV-specific CTL frequencies in macaques V6 and V8 (Fig. 3). In both macaques, Gag-specific CTL frequencies were high around 2 months postchallenge but then decreased to below detection levels around 1

year postchallenge. In contrast, SIV-specific CTL responses against epitopes in other SIV proteins were still detectable 3 years postchallenge. These results suggest that the vaccine-induced Gag-specific CTL responses were diminished soon after challenge and that there was then a predominance of CTLs specific for SIV-derived antigens other than Gag in the chronic phase in both of the sustained controllers, V6 and V8.

Viremia reappearance by CD8⁺ cell depletion in the sustained controllers. In the sustained controllers, V6 and V8, vaccine-induced Gag-specific CTLs involved in viremia control in the early phase became undetectable after approximately 6 months. CTLs specific for SIV-derived antigens other than Gag (referred to as SIV non-Gag-specific CTLs) were elicited or expanded after challenge, and these became predominant in the chronic phase. We then performed CD8⁺ cell depletion experiments to examine if these SIV non-Gag-specific CTL responses played a role in the maintenance of viremia control in the chronic phase. Administration of the monoclonal anti-CD8 antibody, cM-T807, to macaques V6 and V8 at week 156 postchallenge resulted in transient depletion of peripheral CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 4A). In both macaques, plasma viremia reemerged in 1 or 2 weeks after the initial anti-CD8 antibody treatment and disappeared simultaneously with recovery of peripheral CD8⁺ T lymphocytes in both of them (Fig. 4B). These results support the notion that, in the sustained controllers V6 and V8, these SIV non-Gag-specific CTL responses, rather than vaccine-induced Gag-specific CTL, played a crucial role in the control of SIV replication in the chronic phase. Analysis of the returning wave of virus-specific CTL responses revealed a predominance of SIV non-Gag-specific CTLs (Fig. 4C).

We also administered the anti-CD8 antibody to macaque V5, a transient controller, at week 118. In this macaque, accumulation of multiple Gag CTL escape mutations resulted in reappearance of plasma viremia around week 60. Transient CD8⁺ cell depletion by the anti-CD8 antibody treatment resulted in a 1-log increase in plasma viral loads (Fig. 1), suggesting that CTLs still exerted pressure on the replication of the escaped viruses at week 118 in this animal.

Long-term central memory CD4⁺ T-cell preservation in the sustained controllers. It has recently been suggested that vaccine-based transient control of viral replication can ameliorate central memory CD4⁺ T-cell loss in the early phase of SIV infections. However, it is unclear if CTL-based sustained control of viral replication can contribute to memory CD4⁺ T-cell preservation in the chronic phase. We, therefore, compared peripheral memory CD4⁺ T-cell counts at several time points, prechallenge and around weeks 2, 12, 70, and 120 postchallenge, in the noncontrollers and the controllers (Fig. 5). All the noncontrollers showed significant but partial recovery of peripheral memory CD4⁺ T-cell counts around week 12 after transient loss during the acute phase. However, memory CD4⁺ T-cell counts, especially central memory CD4⁺ T-cell counts at week 12, were lower than prechallenge levels in the noncontrollers. By contrast, such a reduction was not observed in the controllers, suggesting protection from acute memory CD4⁺ T-cell depletion.

A continuous reduction in memory CD4⁺ T-cell counts was observed in the noncontrollers. The controllers, however, showed no such reduction in memory CD4⁺ T-cell counts out