

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

研究分担者 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

アカゲザルの MHC クラス I 遺伝子である Mamu-A 遺伝子の多様性を遺伝子配列レベルで解析し、個体ごとに発現する遺伝子数が異なること、一般的には各ハプロタイプには高発現 Mamu-A (Mamu-A1) が 1 個と低発現 Mamu-A (Mamu-A2~A7) が複数個存在することを確認した。しかしながら、Mamu-A2 遺伝子アレルの一部は Mamu-A1 と同程度に高発現することを見出した。また、系統樹解析から新しい低発現遺伝子 (Mamu-A8) の存在が示唆された。さらに、霊長類間での比較ゲノム解析から、TLR4 遺伝子の細胞外ドメインの一部が旧世界ザル以降に進化速度が速くなっていることを見出した。当該細胞外ドメインはレトロウイルスや LPS に対する反応性を規定する領域であることから、旧世界ザル以降の霊長類の進化にはウイルスや細菌が主要な正の選択圧であったことを示唆する。一方、TLR7 および MyD88 の細胞内ドメインは特異的に進化速度が遅いこと、すなわち負の選択圧がかかった領域であると推定された。比較ゲノムによる遺伝子進化と進化圧関連領域の推定は HIV/AIDS 抵抗性に関わる遺伝子の候補を選択する有効な手段になると考えられた。

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関連には種々の分子、ことに 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が関わるが、これらの分子群には個体差（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、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っており、その知見をヒトに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多様性が限られており、また希少種であることから、モデル動物としての有用性には限界がある。これに対して、アカゲザルを用いた研究は、これまでに 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を明らかにしたが、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。

ワクチンの *in vivo* 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、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約があるため、まずは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て、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と考えられる。

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：昨年度に引き続きアカゲザルワクチン実験個体について、Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子 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、配列情報をもとに系統樹解析を行うと共に、個体ごとに代表的な発現アレルを決定した。

(2) 比較ゲノム解析による遺伝子進化の解析：霊長類 7 種について TLR とその関連遺伝子群の配列を決定し、オルソログの配列比較から DnaSP を用いて Ks/Ka を算出した。系統樹分岐における Ka/Ks 比の推定は Bn-Bs プログラムを用いた。また、600 塩基ずつのウィンドウについて、30 塩基ずつのスライディング比較を行い、選択圧のかかった領域を推定した。

(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個体について、昨年度に引き続き Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子の

cDNA をクローニングした。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た。また、アカゲザル個体の家系情報を合わせて解析することで、ハプロタイプ上の Mamu-A 遺伝子構造を推定した(表 1)。すなわち、塩基配列を決定した cDNA の約 2/3 がこれまでに報告のない新規アレルであり、各ハプロタイプは、基本的には 1 個の高発現遺伝子 (Mamu-A1) と、複数の比較的発現の低い遺伝子群 (minor Mamu-A) とで構成されていた。

系統	種別	haplotype	B/C-A-A	cloned A	Major A (A1)	Minor A	その他
90-120	マンマール	B	3	2	A1_4301	A2_0904	A1_8501
90-010	マンマール	d	2	1	A1_1902N		
90-030	マンマール	e	3	2	A1_8401N	A2_0911	
90-088	マンマール	h	1	1	A1_2204N	A4_1403	
89-002	クオス	f	2-4	3	A1_1806N	A2_0918N	
91-010F1		g	2-3	1	A1_1607N	A4_1403	A2_0931N
95-014F1		h	3	2	A1_0308	A2_0910	A4_1410N
89-003		89003-1	3	1	A1_1104N		
89-003		89003-2	1	1	A1_2302N		
89-003		89003-2	1	1	A1_5602		

表 1. アカゲザル Mamu-A ハプロタイプ構成

一方、系統樹解析を行うと、Mamu-A1 の多様性が極めて大きいこと、minor Mamu-A のアレルはクラスターを成していることが判明した(図 1)。

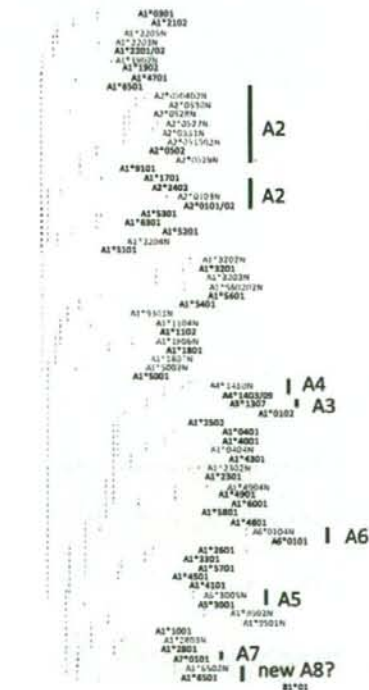


図 1. Mamu-A 遺伝子アレルの系統樹

また、図1および表2にあるように、これまでに報告されていた A2-A7 の minor Mamu-A 遺伝子とは異なるクラスターとして新たな mino Mamu-A 遺伝子 (Mamu-A8) の存在が示唆された。



表 2. アカゲザル個体の Mamu-A 遺伝子構成

(2) 比較ゲノム解析による霊長類遺伝子の解析：進化学的な観点から HIV/AIDS 関連遺伝子の同定を行うことを企図しているが、その前段階として、霊長類における免疫関連遺伝子における進化的選択圧がかかるドメインを特定する方法論を検討することとした。このため、自然免疫系に係る TLR 遺伝子群 (TLR1~TLR10) および関連遺伝子群 (MYD88, TILAP, TICAM1, TICAM2, MD2 および CD14) について、ヒト、チンパンジー、ボノボ、ゴリラ、オランウータン、カニクイザル、アカゲザルの遺伝子配列を決定した。ついで、Bn-Bs プログラムを用いてこれらの配列間の比較を行い、進化選択圧の有無を検討したところ、これらの遺伝子はいずれも $\Sigma bn / \Sigma bs < 1$ であることから負の選択圧がかかっていると考えられた。さらに、ウィンドウスライディング法を用いて、自然選択圧がかかる領域を推定した (図2)。

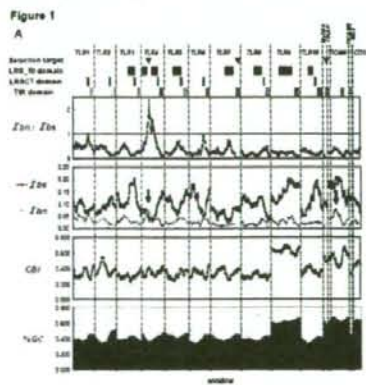


図2. TLR 関連遺伝子群における自然選択圧領域の推定

その結果、TLR4 の細胞外ドメインには正の選択圧 (アミノ酸置換を伴う塩基変異が多い) があり、これに対して、TLR7 の細胞内領域と MYD88 には負の選択圧 (アミノ酸置換を伴う塩基変異が極めて少ない) が判明した。すなわち、正の選択圧がかかる領域はアミノ酸置換変異を有することが進化的上有利であったことを示し、負の選択圧がかかる領域ではアミノ酸置換を生じることが不利であることを示唆する。なお、正の選択圧が働いたと推定される領域は、レトロウイルスや LPS に対する TLR4 を介する反応性に関わる領域であることから、この領域の多型がウイルスないし細菌への感染防御に重要な役割を果たすことが示唆される。

TLR4 の細胞外ドメインへの進化圧が霊長類の進化のどの時点で生じたのかを推定する目的で、原猿類、新世界ザルを含めて合計 25 種の霊長類について TLR4 の選択圧関連領域の塩基配列を決定して比較した。その結果、図3に示すように、正の選択圧は旧世界ザル以降に生じたものと考えられた。さらに、TLR4 のゲノム多様性を検討したところ、チンパンジーはヒトよりも多様性が小さいことが判明した。これらのことは、HIV のオリジンである SIV が旧世界ザルにおいて発生したこと、チンパンジーでは SIV による selective sweep が生じたことと推定されることを合わせて考えると興味深い知見であると言える。

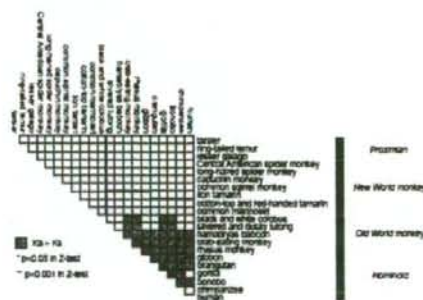


図3. 霊長類における TLR4 細胞外ドメインの進化

D. 考察

ワクチン開発に使用しているアカゲザル集団について、昨年度に引き続き 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リル数が異なることが確認された。また、決定したアリルの 2/3 はデータベースに登録されていない新規アリルであった。我々が解析対象としたアカゲザルはミャンマー産またはラオス産であるが、これらから得られた既知のアリルはインド産あるいは中国産のアカゲザルと同程度に一致していた。このことは、これらの地域のアカゲザルはもともと同一集団から派生したが、長期間地理的に隔離されて独自の集団を形成したことを示唆する。すなわち、遺伝的にはある程度異なった集団であると考えられ、免疫応答の個体差形成に係るゲノム多様性にも相違が存在すると思われる。なお、インド産アカゲザルを用いた研究からエリートコントローラーとされる Mamu-A*01 および Mamu-B*17 はいずれもミャンマー産、ラオス産アカゲザルには認められなかったことから、従来報告されているアリルとは全く異なるエリートコントローラーが発見されるものと思われる。今後さらに Mamu-A, Mamu-B アリルの構造を決定し、詳細なハプロタイプ解析を行う予定である。

一方、進化遺伝学的な観点からの比較ゲノム解析によって HIV/AIDS 関連遺伝子の候補を選択する試みを実施した。すなわち、霊長類において (1) 正の自然選択を受け、(2) アカゲザルを含む旧世界ザル以降に多様性を増加し、(3) ヒトやアカゲザルと比較してチンパンジーでのゲノム多様性が小さい、の 3 条件を満たす遺伝子を選択すれば、それらが HIV/AIDS 関連遺伝子の候補となる。本研究では TLR および関連遺伝子を対象とした解析を実施したが、TLR4 遺伝子の細胞外ドメインはこれらの条件を満たしており、今後 TLR4 遺伝子のゲノム多様性とヒト HIV/AIDS および SIV ワクチン効果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 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、研究で示したように、進化遺伝学的な観点からのアプローチによって免疫応答の個体差形成に関わる遺伝的要因を検討することで、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) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T: Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 2008; 22(8): 993-994.
- (2) Nakajima T, Kimura A: Genetic factors which confer sensitivity to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected subjects: implication of a benefit of an earlier initiation of HAART in HIV therapy. *Pharmacogenomics* 2008; 9(9): 1347-1351.
- (3) Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 2008; 60(12): 727-735.
- (4) Nakajima T, Kaur G, Mehra NK, Kimura A: HIV-1/AIDS susceptibility and copy number variation in CCL3L1, a gene encoding a natural ligand for HIV-1 co-receptor CCR5. *Cytogenet Genome Res*, In Press

2 学会発表

- (1) 中島敏晶、大谷仁志、堀田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方：霊長類における Toll-like receptor(TLR)関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 10 回日本進化学会 ワークショップ、東京、2008 年 8 月
- (2) 中島敏晶、大谷仁志、堀田葉子、宇野泰広、明

- 里宏文、石田貴文、木村彰方：霊長類における Toll-like receptor (TLR)関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 17 回日本組織適合性学会、大阪、2008 年 9 月
- (3) 中島敏晶、大谷仁志、颯田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方：霊長類における Toll-like receptor (TLR)関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、2008 年 9 月
- (4) Naruse T, Chen Z, Yanagida R, Hinohara K, Mori K, Matano T, Miyazawa M, Kimura A: Diversity of MHC class I-A genes in rhesus macaque. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、2008 年 9 月.
- (5) 成瀬妙子、柳田梨紗、俣野哲朗、森 一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方：ヒトおよびアカゲザルにおける NKG2D レセプター関連遺伝子の多型解析. 第 17 回日本組織適合性学会大会、大阪、2008 年 9 月.
- (6) 成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC-A (Mamu-A) 遺伝子群の多様性. 日本人類遺伝学会第 53 回大会、横浜、2008 年 9 月.
- (7) Naruse T, Kimura A: Immunogenetics of MHC in susceptibility to infectious disease. 11th Cardiovascular Genetics and Atherosclerosis Symposium Satellite Meeting, Seoul, Korea, Nov. 2008.
- (8) 成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC-A(Mamu-A) 遺伝子群の多様性.BMB2008(第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会)、神戸、2008 年 12 月
- 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

研究分担者 朱 亜峰 ディナベック株式会社事業開発本部長（常務取締役）

研究要旨

HIV の 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 試験項目を行ない、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ーを有する、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、治療用ベクターを想定した評価のために、HIV の gag 蛋白を発現するベクターを、クオリティー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。

(2) 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

によって、ベクターの精製を行った。

(3) 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。

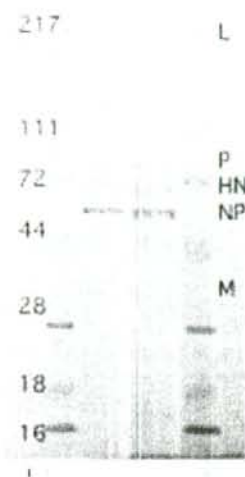
C. 研究結果

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+HIVgag/ Δ F

- 力価 1.8×10^{10} 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 278.4 μg/ml
- 電気泳動下記参照



その他、比較対象となる、SIV-Gag 発現 F 遺伝子欠損型センダイウイルスベクター (SeV18+HIVgag/ΔF)、コントロールベクターとしてのマーカー遺伝子搭載 F 遺伝子欠損型センダイウイルスベクター等も大量調製し、供給した。

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

「HIV Gag 発現 F 遺伝子欠損型センダイウイルスベクター (SeV18+HIVgag/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. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Moriya C, Igarashi H, Shu T, Matano T, et al., Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T-lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences. *Microbes Infect.* 2008;10(3):285-92.
- (2) Moriya C, Horiba S, Shu T, Matano T, et al., Development of immunostimulatory virotherapy using non-transmissible Sendai virus-activated dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(1):129-35.
- (3) Yu S, Feng X, Shu T, Matano T, et al., Potent specific immune responses induced by prime-boost-boost strategies based on DNA, adenovirus, and Sendai virus vectors expressing gag gene of Chinese HIV-1 subtype B. *Vaccine.* 2008;26(48):6124-31.
- (4) Takeda A, Igarashi H, Shu T, Matano T, et al., Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines in macaques. *Vaccine.* 2008;26(52):6839-43.

2 学会発表

第 56 回日本ウイルス学会 (Oct 26-28, 2008)

- (1) サルエイズモデルにおける宿主 MHC 遺伝子多型の細胞性免疫誘導ワクチン効果への影響の解析: 桑野哲矢、川田真幹、塚本徹雄、岩本南、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗
- (2) CTL エピトープのみ発現する予防エイズワクチンの検討: 塚本徹雄、川田真幹、岩本南、桑野哲矢、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗
- (3) 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既存抗体の影響の解析: 守屋智草、堀場聡、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

SIV 複製に関与する宿主因子に関する研究

研究分担者 明里 宏文 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター室長
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助教

研究要旨

抗ヒトエイズウイルスワクチン開発においては、これまでの多くのウイルス感染症と異なり通常のウイルス抗原に対する免疫だけでは有効なエイズ発症、HIV-1 感染防御能が誘導されない。従って、その原因を明らかにし効果的なワクチン戦略を検討することが求められる。本研究では、エイズウイルス複製増殖に関わる宿主因子の同定とその機能的意義を明らかにすることを目的とする。本年度はこれまでに同定された SIV 複製に必須なサル宿主因子である Cyclophilin A (CypA) の SIV 複製過程、特に逆転写過程への影響についての解析を行ない、その結果サル CypA は、サル細胞内の SIV 複製過程において、逆転写過程に影響を及ぼしている可能性が示唆され、ヒトエイズウイルスに対するヒト CypA の機能と同様であることが示された。次に CTL によるエイズウイルス認識の回避に寄与する Nef 蛋白について、これまでの我々の知見を基に、特に MHC-I 発現制御機能領域のアミノ酸変異体とその宿主因子である AP-1 の mu1A 鎖との相互作用に関して解析を行なった。その結果、Nef M20A, W13A, V16E 変異体は野生型 Nef と異なり mu1A 鎖との共局在が殆ど認められず、同時に MHC-I 発現も保持されていた。これら変異体 Nef は CD4 発現や局在には全く影響を与えなかった。以上のことより、新たに発見された Nef WVM motif は mu1A 鎖との特異的相互作用により MHC-I 発現制御に寄与しているものと考えられた。

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。chaperon family の一つである CypA は、それを促進する宿主因子であり、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ウイルス粒子内に取りこまれた CypA と、感染標的細胞内の CypA が脱殻後の CA 蛋白と相互作用すること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、CypA が SIV 増殖抑制因子として作用しており、SIV Vif 蛋白がその機能を抑制してい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 CypA の機能を解析することを目的とした。平成 19 年度は、サルエイズモデルで使用さ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 遺伝子解析を行うと共に、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結果、サル CypA はヒト CypA と同じアミノ酸配列であり、その機能は SIV 複製に必須で

あることが示唆された。そこで平成 20 年度は、SIV 複製過程における CypA の影響を解析した。

ところでアクセサリ遺伝子産物の一つである Nef 蛋白は宿主免疫の制御機能を司っていることが知られており、ウイルス感染細胞における MHC class-I 発現を抑制することで CTL による抗原認識を回避する。このような Nef 機能は HIV, SIV 共に認められ、霊長類エイズウイルスの長期持続感染における免疫回避能を担っている。現在我々はサル指向性 HIV-1 のサル感染実験を進めており、将来的には本モデルを用いた抗 HIV-1 ワクチンの評価研究が可能になるものと期待される。我々のこれまでの研究により、HIV-1 Nef N 末端領域の Met20、Trp13、Val16 が MHC-I 発現抑制に寄与していることを見出した。これらのアミノ酸残基は相互作用シミュレーションの結果、機能発現に関わる宿主因子 AP-1 mu1A 鎖との相互作用部位である可能性が示唆された。今回は、これらの結果をふまえ、Nef 変異体、mu1A 鎖、および MHC-I の細胞内動態に関して解析を行った。

B. 研究方法

(1) CypA の機能的解析

- ウイルス DNA を定量するリアルタイム PCR 法：SIV_{vagm} および SIV_{mac239} 株各々の gag 領域に特異的なプライマーおよび蛍光プローブを作製した。定量する際に用いるウイルス DNA スタンダードとして、段階希釈した既知量の SIV 分子クローンを含む非感染細胞ゲノム DNA を用いた。

- SIV ストックの作製：HSC-F 細胞から産生された SIV_{vagm} および SIV_{mac239} を、SIV 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析に用いた。その際、ウイルス産生細胞として、CsA 存在 (2.5 μM)

および非存在下の HSC-F 細胞を用いた。

- SIV 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析：SIV_{vagm} および SIV_{mac239} 株を、HSC-F 細胞に感染させ、24 時間後の感染細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量を、リアルタイム PCR 法にて測定した。

- SIV 増殖能の解析：HSC-F 細胞に、SIV_{mac239} および CTL エスケープ変異 SIV 株を感染させた。この際、CsA 存在 (0.5 μM) 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。

(2) Nef、mu1A 鎖、MHC-I の細胞内動態解析

- HIV-1 Nef N 末端領域変異体の発現解析：nef 遺伝子あるいは変異体を導入した env 欠損型 HIV-1 分子クローン pNL43 Δenv と VSV-G 発現ベクターを 293T 細胞へ共導入し、48 時間後に細胞培養上清 (ウイルス) と細胞ライセートを回収し、laemmili buffer を加えサンプルを調整した。各ライセート中の p24 蛋白量を測定し、同量を SDS-PAGE しウェスタンブロットにて各 Nef 変異体の細胞内発現量を比較した。

- Nef と mu1A、MHC-I の細胞内局在解析：細胞株 T 細胞の Jurkat に nef 遺伝子もしくは変異体を含むウイルスを感染させ、MHC-I 発現抑制が起こる感染後 24 時間で上記三分子の免疫染色を行い、細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。

C. 研究結果

(1) CypA の機能的解析

SIV 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析：SIV_{vagm} および SIV_{mac239} を HSC-F 細胞に感

染させ、24 時間後に感染細胞からゲノムを含む Total DNA を抽出し、ウイルス逆転写反応から得られたウイルス DNA 合成量を定量した。その結果を図 2 に示す。まず、ウイルス粒子内に取り込まれた CypA とウイルス感染標的細胞内の CypA の、ウイルス感染におよぼす影響を解析するために、通常のウイルスを産生する HSC-F 細胞から得られる SIV 粒子と、その細胞に CsA (2.5 μ M) を処理することにより CypA を含まない SIV とを作製した (図 1)。またウイルス感染標的となる HSC-F 細胞内の CypA の影響を解析するために、通常の HSC-F 細胞と、ウイルス感染前に CsA (2.5 μ M) を処理することで CypA の機能を抑制した細胞とを用いた。その後、SIV 粒子と感染標的細胞との組み合わせによって、サル CypA のウイルス感染に対する影響を、感染細胞内のウイルス DNA 合成量を、比較することによって行った。その結果、ウイルス粒子内の CypA だけでなく感染標的細胞内の CypA も、SIV 感染後のウイルス DNA 合成効率を維持するのに必要であることが示唆された (図 2 の 1 と 4、および 5 と 8 との比較)。

(2) Nef, mu1A 鎖、MHC-I の細胞内動態解析

細胞ライセートサンプルでは全ての変異体で野生型 Nef と同程度の発現が認められた。Nef の発現に対する変異の影響はほとんど無いと考えられる。また、ウイルス粒子中の Nef 蛋白パッケージング量についても野生型と変異体はほぼ同じであった。

そこで Jurkat 細胞に nef 遺伝子もしくは変異体を含むウイルスを感染させ、MHC-I 発現抑制が起こる感染後 24 時間で上記三分子の免疫染色を行い、細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて解

析した。野生型 Nef を発現させた場合、Nef, mu1A 鎖及び MHC-I 分子が細胞内のエンドソームもしくはライソソームで共局在していることが認められた。一方で、MHC-I 発現抑制機能が著しく低下した変異体 W13A, V16E, V16R では MHC-I 発現は細胞表面において高率に認められ、また三分子の共局在が殆ど見られなかったのに対し、比較的機能が残存していた W13Y, V16A では共局在が認められた。

D. 考察

本年度は、CypA の機能阻害剤である CsA を用いることで、サル CypA と SIV との相互作用の更なる詳細な機能解析を行った。SIV 感染サル細胞から産生される SIV 粒子は、CsA によって、そのウイルス粒子内への CypA 取り込み効率が低下することが認められたことから、HIV とヒト CypA に対する CsA の効果と同様であることが示された。更には、CsA 存在下における SIV 感染標的細胞側だけでなく CsA 存在下で産生されたウイルス粒子側も、CsA の SIV 感染に対する抑制効果すなわち逆転写反応効率の低下に対する影響を受けることから、サル CypA は、SIV 複製機構全体に必要なサル宿主因子であることが示唆された。このことは、ヒト CypA が HIV 複製におよぼす影響と同様であると考えられる。しかし、HIV 感染標的ヒト細胞内の CypA が、ウイルス粒子内の CypA よりも、HIV 感染性に大きく寄与していることと本研究の結果を比較すると、CsA のウイルス感染に対する影響は、サルとヒトとで異なる可能性も考えられる。

Nef 蛋白による MHC class-I 発現抑制機能は HIV, SIV 共に認められ、霊長類エイズウイルスの長期持続感染における免疫回避能を担っている。我々

のこれまでの研究により、HIV-1 Nef N 末端領域の Met20、Trp13、Val16 が MHC-I 発現抑制に寄与していることを見出した。これらのアミノ酸残基は相互作用シミュレーションの結果、機能発現に関わる宿主因子 AP-1 mu1A 鎖との相互作用部位である可能性が示唆されたことから、今回この可能性を実証する目的で各分子の細胞内動態を解析した。野生型 Nef を発現させた場合、三つの分子は少なくとも共局在していることが確認された一方で、機能低下した変異体ではいずれも共局在が認められなかった。従って、新たに発見された Nef WVM motif は mu1A 鎖との特異的相互作用により MHC-I 発現制御に寄与しているものと考えられた。トリプトファンをベースとしたいわゆる「タイロシンモチーフ」およびメチオニン側鎖構造との分子間相互作用が mu1A 鎖との特異的結合を規定しているという知見を最終的に証明するため、免疫沈降法を用いて各蛋白間結合を現在最終確認中である。

B. 結論

本年度は、SIV 複製過程におけるサル CypA が影響をおよぼす過程は、ウイルス感染後の逆転写反応過程であることが示され、HIV 感染におよぼすヒト CypA の作用機序と同様であることが示された。また Nef WVM motif は mu1A 鎖との特異的相互作用により MHC-I 発現制御に寄与しているものと考えられた。

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.

Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T: Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model. **Journal of Virology** 82, 10199-10206, 2008.

Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. **Retrovirology** 6, 1, 2009.

2) 学会発表

Takeuchi H, Inagaki N, Ishii H, Kuwano T, Akari H, Matano T: Cyclophilin A affects SIV replication positively in monkey but negatively in human cells. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses. New York, May 2008.

武内寛明、石井洋、桑野哲夫、稲垣奈都子、明里宏文、俣野哲朗:Cyclophilin A はサルエイズウイルスの宿主域を規定する細胞性因子である。第56回日本ウイルス学会学術集会(岡山市)平成20年10月

飯島沙幸, 李永仲、明里 宏文: HIV-1 Nef の
MHC-I 発現抑制機能: AP-1A mu subunit との相互
作用と機能発現。第 22 回日本エイズ学会学術集
会 (大阪) 平成 20 年 11 月

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

HSC-F cells

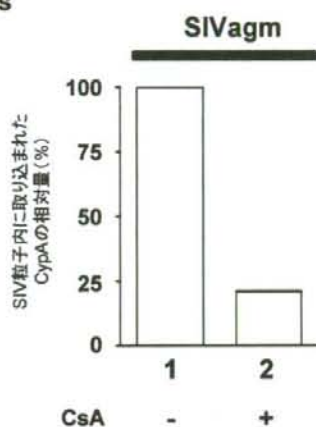


図 1. サル T 細胞株 (HSC-F) から産生された SIV 粒子内の CypA の相対量

CsA 非存在下における SIVagm 粒子内に取り込まれた CypA (lane 1) と、CsA 存在下 (2.5 μ M) における SIV 粒子内に取り込まれた CypA (lane 2) とを、SIV キャプシド蛋白量にて補正している。

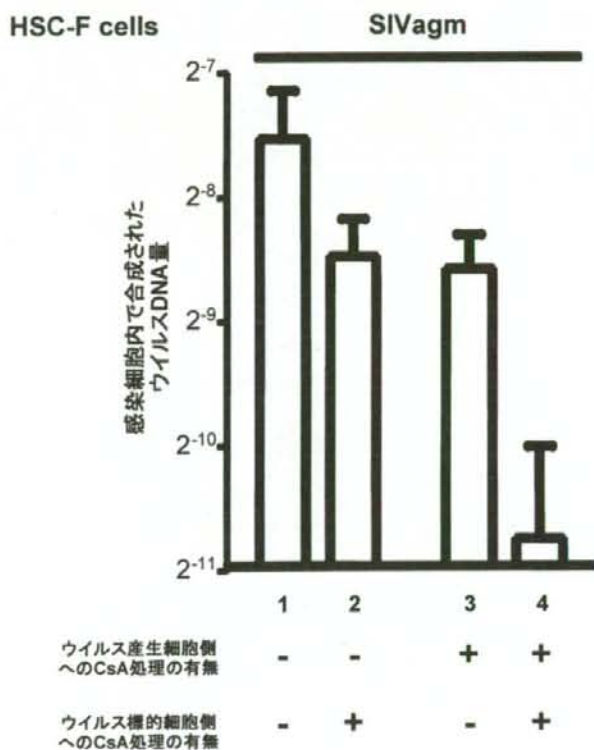


図2. SIV 感染標的サル細胞 (HSC-F) 内におけるウイルス DNA 合成量の比較

SIV 感染 24 時間後の感染細胞内にて合成されたウイルス DNA を、リアルタイム PCR 法にて測定した結果を示す。CsA 処理は、CsA を 2.5 μ M の濃度で処理していることを示している。

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

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
Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, <u>Matano T</u>	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	5093-5098	2008
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	22	993-994	2008
Moriya C, Horiba S, Inoue M, Iida A, Hara H, <u>Shu T</u> , Hasegawa M, <u>Matano T</u>	Antigen-specific T-cell induction by vaccination with a recombinant Sendai virus vector even in the presence of vector-specific neutralizing antibodies in rhesus macaques.	Biochem Biophys Res Commun	371	850-854	2008
Takeuchi H, <u>Matano T</u> .	Host factors involved in resistance to retroviral infection.	Microbiol Immunol	52	318-325	2008
Yamamoto H, <u>Matano T</u> .	Anti-HIV adaptive immunity: determinants for viral persistence.	Rev Med Virol	18	293-303	2008
Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, <u>Akari H</u> , <u>Matano T</u>	Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial.	J Virol	82	10199-10206	2008
Takeda A, Igarashi H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, <u>Shu T</u> , Hasegawa M, <u>Matano T</u>	Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines in macaques.	Vaccine	26	6839-6843	2008

Nakajima T, <u>Kimura A</u>	Genetic factors which confer sensitivity to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected subjects: implication of a benefit of an earlier initiation of HAART in HIV therapy.	Pharmacogenomics	9	1347-1351	2008
Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, <u>Akari H</u> , Ishida T, <u>Kimura A</u>	Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution.	Immunogenetics	60	727-735	2008
Nakajima T, Kaur G, Mehra NK, <u>Kimura A</u>	HIV-1/AIDS susceptibility and copy number variation in CCL3L1, a gene encoding a natural ligand for HIV-1 co-receptor CCR5.	Cytogenet Genome Res		in press	
Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, <u>Akari H</u> , Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T.	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif.	Retrovirology	6	1	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Transmission of Simian Immunodeficiency Virus Carrying Multiple Cytotoxic T-Lymphocyte Escape Mutations with Diminished Replicative Ability Can Result in AIDS Progression in Rhesus Macaques[†]

Sayuri Seki,¹ Miki Kawada,^{1,2,3} Akiko Takeda,¹ Hiroko Igarashi,²
Tetsutaro Sata,⁴ and Tetsuro Matano^{1,2,5,6*}

International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-Ku, Tokyo 108-8639, Japan¹; Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-0033, Japan²; Japanese Foundation for AIDS Prevention, 1-3-12 Misaki-cho, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-0061, Japan³; Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan⁴; AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan⁵; and Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, 1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan⁶

Received 7 December 2007/Accepted 3 March 2008

Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses frequently select for immunodeficiency virus mutations that result in escape from CTL recognition with viral fitness costs. The replication in vivo of such viruses carrying not single but multiple escape mutations in the absence of the CTL pressure has remained undetermined. Here, we have examined the replication of simian immunodeficiency virus (SIV) with five *gag* mutations selected in a macaque possessing the major histocompatibility complex haplotype 90-120-1a after its transmission into 90-120-1a-negative macaques. Our results showed that even such a “crippled” SIV infection can result in persistent viral replication, multiple reversions, and AIDS progression.

Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses exert a suppressive effect on human immunodeficiency virus (HIV) and simian immunodeficiency virus (SIV) replication (1, 10, 15, 21, 27). Under the CTL pressure, viral mutations resulting in viral escape from CTL recognition are frequently selected for, with viral fitness costs (2, 5, 8, 9, 12, 16, 19, 20, 24, 25, 26, 28). The transmission of the virus carrying a CTL escape mutation with lower viral fitness between major histocompatibility complex class I (MHC-I)-mismatched individuals can result in reversion of the mutation due to the absence of the CTL pressure (7, 14, 16, 17, 18). Such CTL escape mutations and their reversions have been suggested to be involved in viral evolution (3, 11, 13, 23).

We have developed a prophylactic vaccine using a Sendai virus vector expressing SIVmac239 *Gag* and shown its protective efficacy against SIVmac239 challenge in a group of Burmese rhesus macaques (*Macaca mulatta*) possessing MHC-I haplotype 90-120-1a (20). In these vaccinated macaques that are controlling SIVmac239 replication, *Gag*_{206–216} epitope-specific CTL responses exerted strong selective pressure on the virus, and rapid selection of a mutant escaping from this CTL was observed at week 5 postchallenge. The virus, SIVmac239Gag216S, with this CTL escape mutation, *Gag*L216S, leading to a substitution from leucine (L) to serine (S) at amino acid (aa) 216 in *Gag* showed lower replicative ability than the wild type (14, 20). Two of these vaccinees (macaques V3 and

V5) showed an accumulation of additional viral CTL escape mutations in *gag* during the period of viral control and then the reappearance of plasma viremia around week 60 after SIVmac239 challenge (12). The SIV carrying these multiple CTL escape mutations showed lower replicative ability in vitro than the SIV carrying the single *Gag*L216S mutation.

How such viruses with multiple CTL escape mutations replicate and evolve in the absence of the CTL pressure has not yet been well determined, while the reversion of CTL escape mutations has previously been shown by the transmission of viruses with single escape mutations (7, 14, 18). In the present study, we have examined the replication, in the absence of the CTL pressure in 90-120-1a-negative macaques, of the SIV with multiple *gag* CTL escape mutations that were accumulated in a 90-120-1a-positive macaque.

The induction of *Gag*_{206–216}-specific CTL, *Gag*_{241–249}-specific CTL, and *Gag*_{373–380}-specific CTL responses has previously been observed after SIVmac239 challenge in 90-120-1a-positive macaques (12). The 90-120-1a-positive vaccinees V5 and V3 showed rapid selection of the *Gag*L216S mutation (*Gag*_{206–216} CTL escape mutation) and then of an additional two mutations resulting in escape from *Gag*_{241–249}-specific CTL and *Gag*_{373–380}-specific CTL recognition, respectively, during the period of viral control. These were a *Gag*_{241–249} CTL escape mutation leading to a *Gag*D244E (aspartic acid [D] to glutamic acid [E] at aa 244 in *Gag*) substitution and a *Gag*_{373–380} CTL escape mutation leading to *Gag*A373T (alanine [A] to threonine [T] at aa 373) in vaccinee V5 or *Gag*V375A (valine [V] to A at aa 375) or *Gag*P376S (proline [P] to S at aa 376) in vaccinee V3. Viruses at the reappearance of viremia had one or two additional mutations in *gag*, *Gag*I247L (isoleucine [I] to L at aa 247) and *Gag*A312V (A to V at aa

* 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 12 March 2008.

312) in vaccinee V5 or GagP172S (P to S at aa 172) or GagV145A (V to A at aa 145) in vaccinee V3. All of these mutations except for the Gag₃₇₃₋₃₈₀ CTL escape mutations resulted in amino acid changes in the Gag CA. We constructed molecular clones of SIVs with these gag mutations (12). The SIVs with three CTL escape mutations (Gag_{216S}, Gag₂₄₁₋₂₄₉, and Gag₃₇₃₋₃₈₀ CTL escape mutations) were referred to as group Q SIV mutants, and the SIVs with four or five gag mutations selected at the reappearance of viremia as group R SIV mutants. These group Q and R SIV mutants both showed lower replicative ability *in vitro* than SIVmac239Gag216S, while in the competition assay between groups Q and R, the viral replicative ability was not significantly affected by the GagP172S or GagV145A mutation but was reduced by the addition of the GagI247L and GagA312V mutations (12). These results do not support the possibility of compensation for loss of viral fitness from these mutations (4, 6). In the present study, we have examined the *in vivo* replication of the SIV carrying five gag mutations, GagL216S, GagD244E, GagI247L, GagA312V, and GagA373T, selected in macaque V5 at the reappearance of viremia, which was assumed to show the lowest replicative ability among group Q and R SIV mutants. The macaques were maintained in accordance with the guidelines for animal experiments performed at the National Institute of Infectious Diseases (22).

We first compared the *in vivo* replication abilities of the SIV with a single GagL216S mutation and the SIVs with multiple CTL escape mutations in 90-120-*Ia*-negative macaques (Fig. 1). In the competition between SIVmac239Gag216S and group Q SIV mutants, macaque R02-017 was coinoculated intramuscularly with molecular-clone DNAs of SIVmac239Gag216S and SIVmac239Gag216S244E373T and macaque R05-002 with molecular-clone DNAs of SIVmac239Gag216S and all three group Q SIV mutants. The results of the analysis of plasma viral gag genome sequences (Fig. 2) showed selection of SIVmac239Gag216S; i.e., all the mutations other than GagL216S became undetectable in 3 weeks postinoculation, indicating lower replicative abilities *in vivo* of group Q SIV mutants than of SIVmac239Gag216S, as indicated previously by *in vitro* competition (12). Further analysis revealed reversion of the selected GagL216S mutation to the wild-type sequence in a few months.

In the competition between SIVmac239Gag216S and group R SIV mutants, macaque R02-023, coinoculated with molecular clone DNAs of SIVmac239Gag216S and SIVmac239Gag216S244E247L312V373T, showed selection of the former (Fig. 2). This macaque was euthanized at week 6 before exhibiting reversion of the GagL216S mutation. In macaque R02-022, coinoculated with molecular clone DNAs of SIVmac239Gag216S and all three group R SIV mutants, almost all mutations other than GagL216S became undetectable rapidly but the GagV145A mutation was detected even at week 14. The GagL216S mutation was still dominant without reversion at week 14, and plasma viremia became undetectable after week 14 in this macaque. Both cases indicated a lower replicative ability *in vivo* of SIVmac239Gag216S244E247L312V373T than of SIVmac239Gag216S.

Additionally, macaque R03-022, coinoculated with the molecular-clone DNAs of SIVmac239Gag216S244E373T and SIVmac239Gag216S244E247L312V373T, showed selection of the

- ▲ R02-017 SIVmac239Gag216S
SIVmac239Gag216S244E373T (Q1)
- ▼ R05-002 SIVmac239Gag216S
SIVmac239Gag216S244E373T (Q1)
SIVmac239Gag216S244E375A (Q2)
SIVmac239Gag216S244E376S (Q3)
- △ R02-023 SIVmac239Gag216S
SIVmac239Gag216S244E247L312V373T (R1)
- ▽ R02-022 SIVmac239Gag216S
SIVmac239Gag216S244E247L312V373T (R1)
SIVmac239Gag172S216S244E375A (R2)
SIVmac239Gag145A216S244E376S (R3)
- R03-022 SIVmac239Gag216S244E373T (Q1)
SIVmac239Gag216S244E247L312V373T (R1)

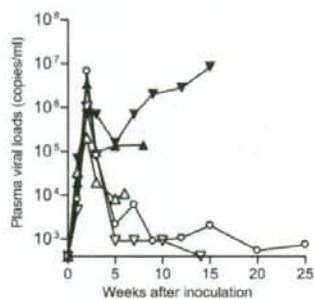


FIG. 1. Plasma viral loads of macaques used in *in vivo* competition assay (SIV gag RNA copies/ml plasma) after inoculation with SIV molecular-clone DNAs. Animals received 10 mg in total of DNAs consisting of an equal amount of each DNA; i.e., macaques R02-017, R02-023, and R03-022 were inoculated with 5 mg of each DNA, and macaques R05-002 and R02-022 with 2.5 mg of each DNA. Plasma viral loads were determined as described previously (20).

former (Fig. 2), indicating a lower replicative ability *in vivo* of SIVmac239Gag216S244E247L312V373T than of SIVmac239Gag216S244E373T. In this macaque, reversion of the GagL216S mutation was observed in 6 months, while the GagD244E and GagA373T mutations were still dominant without reversion.

Next, we inoculated 90-120-*Ia*-negative macaques with the SIV carrying multiple gag CTL escape mutations that was selected in 90-120-*Ia*-positive macaque V5 (Fig. 3). The SIV carrying five gag mutations, GagL216S, GagD244E, GagI247L, GagA312V, and GagA373T, that was dominant at the reappearance of viremia in macaque V5, was propagated on rhesus macaque peripheral blood mononuclear cells to prepare the SIVmac239Gag216S244E247L312V373T challenge stock for macaques R05-001 and R06-016. Sequencing analysis confirmed no gag mutation except for the five mutations in the challenge virus. These two macaques were challenged intravenously with 1,000 50% tissue culture infective dose of SIVmac239Gag216S244E247L312V373T. Both of them showed persistent viremia, although the levels of set-point plasma viral loads were low in macaque R06-016. Macaque R05-001, maintaining high viral loads, showed typical signs of AIDS, such as a reduction in peripheral CD4⁺ T-cell counts, diarrhea, and general weakness, and was euthanized approximately 2 years postchallenge. Autopsy revealed postpersistent generalized