

- S. A. Kalams, R. P. Johnson, M. S. Hirsch, R. T. D'Aquila, et al. 1995. Ex vivo expansion of CD4 lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected persons in the presence of combination antiretroviral agents. *J. Infect. Dis.* **172**:88–96.
35. Wong, J. K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina, and D. D. Richman. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**:1291–1295.
36. Yang, O. O., S. A. Kalams, M. Rosenzweig, A. Trocha, N. Jones, M. Koziel, B. D. Walker, and R. P. Johnson. 1996. Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **70**:5799–5806.
37. Yang, O. O., S. A. Kalams, A. Trocha, H. Cao, A. Luster, R. P. Johnson, and B. D. Walker. 1997. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8⁺ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J. Virol.* **71**:3120–3128.
38. Yang, O. O., P. T. Sarkis, A. Trocha, S. A. Kalams, R. P. Johnson, and B. D. Walker. 2003. Impacts of avidity and specificity on the antiviral efficiency of HIV-1-specific CTL. *J. Immunol.* **171**:3718–3724.
39. Zimmerli, S. C., A. Harari, C. Cellera, F. Vallelian, P. A. Bart, and G. Pantaleo. 2005. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:7239–7244.

HLA-Associated Viral Mutations Are Common in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Controllers[†]

Toshiyuki Miura,^{1,2,3*} Chanson J. Brumme,¹ Mark A. Brockman,^{1,2} Zabrina L. Brumme,^{1,2}
Florescia Pereyra,^{1,2} Brian L. Block,² Alicja Trocha,^{1,3} Mina John,⁴ Simon Mallal,⁴
P. Richard Harrigan,^{5,6} and Bruce D. Walker^{1,2,3*}

Ragon Institute (formerly Partners AIDS Research Center), Massachusetts General Hospital, Charlestown, Massachusetts 02129¹;
Division of AIDS, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115²; Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase,
Maryland 20815³; Centre for Clinical Immunology and Biomedical Statistics, Royal Perth Hospital and Murdoch University,
Perth, Australia⁴; British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS, Vancouver, British Columbia, Canada⁵; and
Division of AIDS, Faculty of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada⁶

Received 1 December 2008/Accepted 9 January 2009

Elite controllers (EC) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) maintain viremia below the limit of detection without antiretroviral treatment. Virus-specific cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes are believed to play a crucial role in viral containment, but the degree of immune imprinting and compensatory mutations in EC is unclear. We obtained plasma *gag*, *pol*, and *nef* sequences from HLA-diverse subjects and found that 30 to 40% of the predefined HLA-associated polymorphic sites show evidence of immune selection pressure in EC, compared to approximately 50% of the sites in chronic progressors. These data indicate ongoing viral replication and escape from cytotoxic T lymphocytes are present even in strictly controlled HIV-1 infection.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected persons who control viremia to below the limit of detection (<50 RNA copies/ml plasma) without therapy have been called elite controllers (EC) (3–5, 25, 28). Understanding the mechanisms responsible for successful viral control should contribute greatly to understanding HIV-1 pathogenesis and vaccine development.

Current evidence supports the notion that virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) play a crucial role in controlling AIDS virus replication (1, 17, 18, 20, 27–32). Many studies have indicated that broad Gag-specific CTL responses are associated with lower plasma viral loads and better clinical outcomes (14, 19, 28, 33). However, viral escape from CTLs is commonly seen in AIDS virus infection (1, 10, 15, 21, 29). Recently, we reported that the replication capacity of chimeric viruses encoding *gag-protease* derived from EC was significantly reduced, associated with distinct HLA class I alleles in EC (26), suggesting that escape mutations from alleles enriched in EC diminish viral replicative fitness. However, to date, no population studies have examined the extent to which HLA-associated mutations, indicative of CTL escape mutations, are present in viruses from EC. In this study, we evaluated HLA-associated mutations in HIV-1 protein sequences (54 Gag, 41 reverse transcriptase [RT], and 39 Nef) derived from plasma viruses from EC and compared these to sequences obtained from untreated chronic progressors (CP)

similarly obtained from North America (567 Gag, 392 RT, and 686 Nef) (7, 9). The median plasma viral load of CP was 120,000 (interquartile range, 42,000 to 310,000) RNA copies/ml. These studies were guided by a comprehensive list of HLA-associated polymorphisms in HIV-1 clade B defined in a cohort of more than 1,200 individuals by phylogenetically informed methods (7–9, 16). Our objective was to define the relative extent of polymorphisms in circulating plasma viruses from EC that could be attributed to HLA class I selection pressure, namely, putative CTL-driven mutations. Since there is bias in the distribution of HLA class I alleles between EC and CP (28), we report results in terms of the proportion of HLA-associated polymorphic sites within a given individual's autologous HIV sequence exhibiting the predefined specific HLA-associated polymorphisms. For each subject, the total number of predefined HLA-associated polymorphic sites in autologous viral sequences was determined and divided by the potential number in the context of their specific HLA class I allotype.

As shown in Fig. 1A, the proportion of putative CTL escape sites observed in EC was substantial in the Gag, RT, and Nef proteins (37.5%, 30.8%, and 42.1%, respectively) but still significantly lower than that observed in CP (0.375 versus 0.500 [$P < 0.0001$], 0.308 versus 0.400 [$P < 0.0001$], and 0.421 versus 0.533 [$P < 0.0001$], respectively). The proportion of HLA-associated mutations remained high in EC even after HLA-B*57 subjects were removed (Fig. 1B).

We repeated the analysis limited to HLA-associated sites inside (within ± 3 amino acids [aa]) published (Los Alamos National Database) or predicted (EpiPred tool; Microsoft Research) CTL epitopes. Limiting the analysis to these sites has been used as an indication of mutations that are likely to directly affect escape from CTLs (9, 23), as opposed to compensatory mutations, which are usually observed more distant

* Corresponding author. Present address of Toshiyuki Miura: Division of Infectious Diseases, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan. Phone: 81-3-5449-5338. Fax: 81-3-5449-5427. E-mail: miura523@hotmail.com. Mailing address for Bruce D. Walker: Room 5212, Ragon Institute, Massachusetts General Hospital, 149 13th St., Charlestown, MA 02129. Phone: (617) 724-8332. Fax: (617) 726-4691. E-mail: bwalker@partners.org.

[†] Published ahead of print on 19 January 2009.

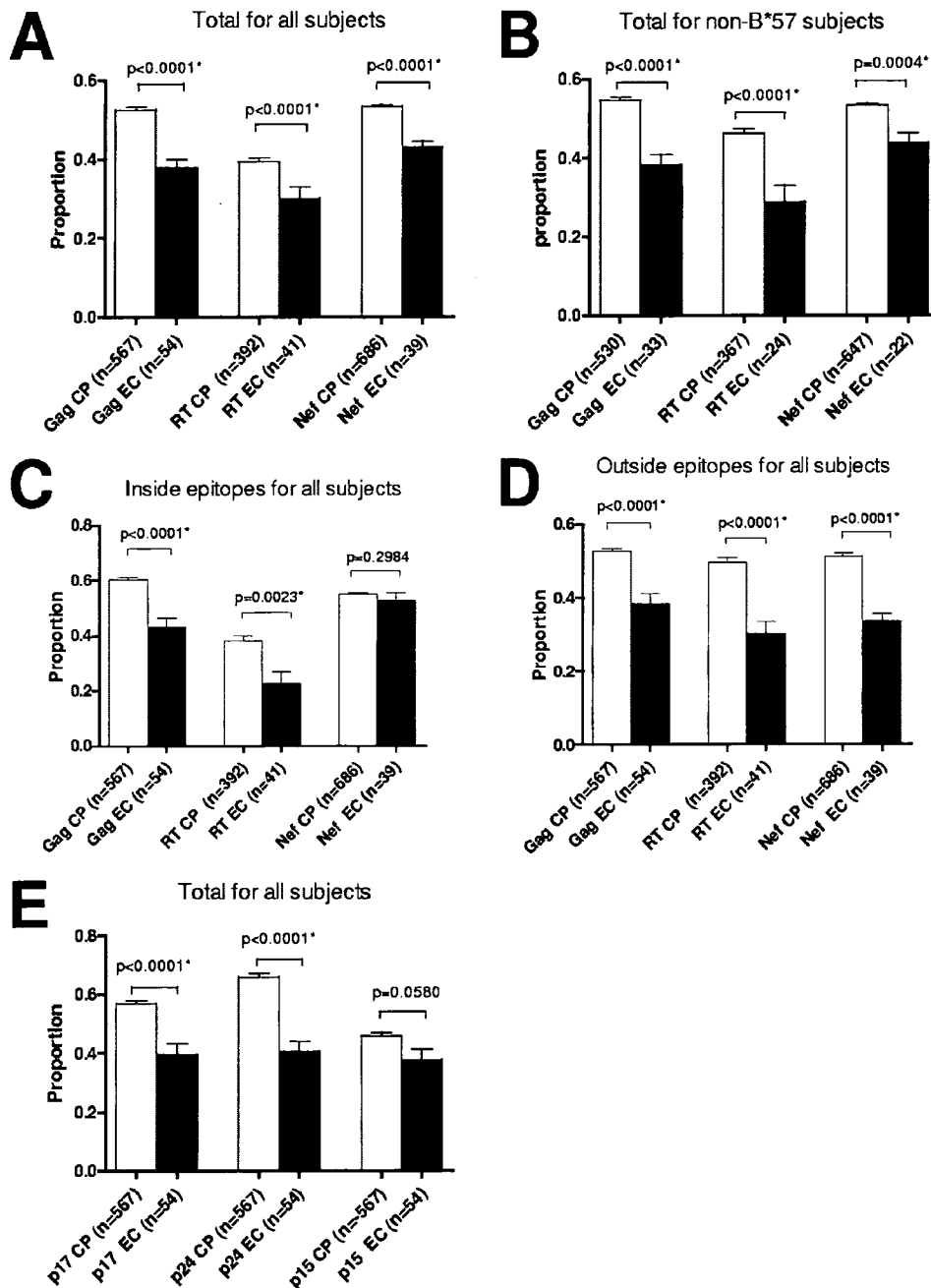


FIG. 1. Comparisons of the proportions of HLA-associated mutations between EC and CP. The mean and standard error of the proportion of sites with defined HLA-associated polymorphisms at which mutations were observed are shown. (A) Proportion of total HLA-associated sites at which mutations were observed in all of the subjects. (B) Proportion of total HLA-associated sites at which mutations were observed in non-B*57 subjects. (C) Proportion of HLA-associated sites falling within predicted CTL epitopes at which mutations were observed (inside epitopes and ± 3 aa) in all subjects. (D) Proportion of HLA-associated sites outside of predicted CTL epitopes (outside of predicted epitopes and ± 3 aa) at which mutations were observed in all subjects. (E) Proportion of total HLA-associated sites at which mutations were observed in Gag subunits in all subjects.

from the epitope (6). In this analysis, the proportion of HLA-associated mutations remained high in EC (Fig. 1C).

Intriguingly, significant differences in HLA-associated polymorphisms between EC and CP were also evident in regions outside of CTL epitopes in all three proteins, with even stronger *P* values (Fig. 1D), which may suggest the presence of fewer compensatory mutations among EC. Thus, accumulation

of compensatory mutations may also characterize disease progression (6). The high proportion of HLA-associated mutations in EC was seen regardless of the Gag subprotein (p17, p24, or p15) (Fig. 1E).

We next compared the proportion of HLA-associated polymorphisms present in the Gag and Nef proteins on an HLA-allele-specific basis. RT was excluded because of the small

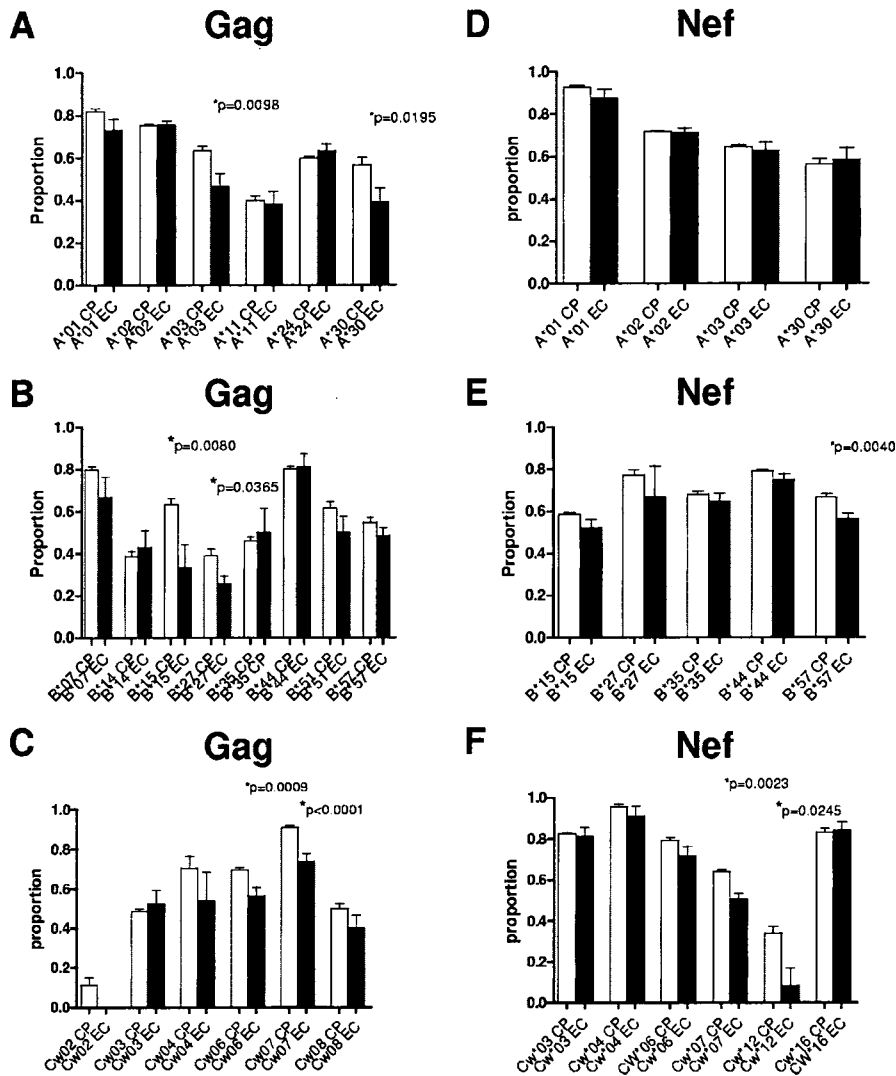


FIG. 2. Proportions of HLA-associated mutations in the Gag and Nef proteins by individual HLA class I alleles. The mean and standard error of the proportion of sites with defined HLA-associated polymorphisms at which mutations were observed are shown. HLA class I alleles present in more than four EC are shown. (A) HLA-A-associated mutations in the Gag protein. (B) HLA-B-associated mutations in the Gag protein. (C) HLA-C-associated mutations in the Gag protein. (D) HLA-A-associated mutations in the Nef protein. (E) HLA-B-associated mutations in the Nef protein. (F) HLA-C-associated mutations in the Nef protein.

numbers of HLA-associated polymorphisms identified. A high proportion of allele-specific mutations were observed in EC regardless of the HLA class I allele type in both the Gag and Nef proteins (Fig. 2). Of importance, for the majority of the alleles, EC viruses carried numbers of allele-specific mutations comparable to those of CP viruses. However, a significantly lower proportion of HLA-associated polymorphisms was observed in EC compared to CP for certain alleles, including HLA-A03, A30, B15, B27, Cw06, and Cw07 in Gag and for HLA-B57, Cw07, and Cw12 in Nef (Fig. 2A to F).

We next repeated this analysis for HLA-B57, which is over-represented in EC and is associated with a large number of HLA allele-specific polymorphisms (28), allowing sufficient numbers to evaluate mutations inside and outside of epitopes separately (Fig. 3). B57 EC viruses tended to encode a smaller proportion of B57-associated changes inside predicted CTL

epitopes in Gag than did B57 CP viruses; however, the difference did not reach statistical significance ($P = 0.0569$) (Fig. 3A). Such a trend was not seen for the Nef protein ($P = 0.3046$). As suggested by our earlier analyses, we observed significant differences in the frequency of B57-associated polymorphisms occurring outside of predicted CTL epitopes between EC and CP for both Gag and Nef ($P = 0.0029$ and $P = 0.0355$, respectively, Fig. 3B). Assuming that B57-associated changes outside of predicted CTL epitopes represent compensatory mutations, these data further indicate that the frequency of compensatory mutations may help to explain significant differences in the clinical disease course between B57 EC and B57 CP and may help explain why simple within-epitope sequence analysis has not shown any association (24). This model is consistent with recent results demonstrating the impact of escape and compensation on viral

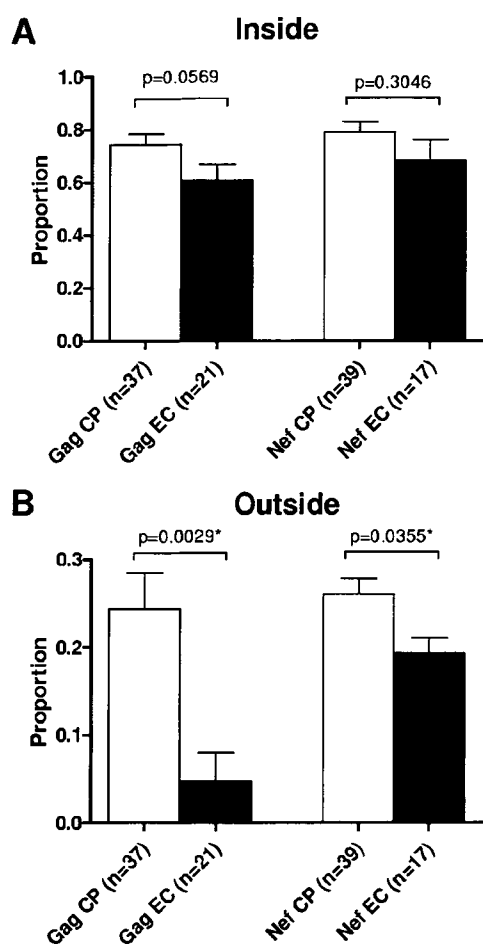


FIG. 3. Comparison of proportions of B*57-associated mutations between EC and CP. The mean and standard error of the proportion of HLA-associated sites at which mutations were observed are shown. (A) Proportion of B*57-associated sites falling within predicted B*57 CTL epitopes (inside epitopes and ± 3 aa) at which mutations were observed in the Gag and Nef proteins. (B) Proportion of B*57-associated sites outside of predicted B*57 CTL epitopes (outside of predicted epitopes and ± 3 aa) at which mutations were observed in the Gag and Nef proteins.

replication capacity for the HLA-B57-restricted Gag epitope TW10 (6).

These results add considerably to currently available data (2, 4) in that they are based upon a substantially larger number of EC viral sequences and include multiple coding regions, they assess putative escape from CTLs in the context of multiple HLA class I alleles, they make direct comparison to CP viruses, and they use EC plasma viral sequences rather than proviral sequences, the latter of which do not represent actively replicating viruses *in vivo* in EC.

Why is it that escape from CTLs occurs in the context of such profound control of viremia? There are several feasible explanations. Firstly, CTLs targeting epitopes without escape may be contributing to the prevention of breakthrough viremia in EC. A few studies have suggested that subdominant CTL responses have an important role in controlling viremia (12, 13). Secondly, impaired viral pathogenicity due to CTL escape mutations may play a major role in controlling viremia. Recent

studies demonstrating reduced viral replication capacity by HLA-B57 CTL escape mutations and recovery by putative compensatory mutations that occur outside of epitopes support this explanation (6, 22). As expected, we saw a stronger difference in the number of B57-associated mutations outside of predicted HLA-B57 epitopes than inside them. The role of compensatory mutations in HIV-1 disease progression remains unclear in non-B57 subjects. However, we also observed greater differences between EC and CP in the proportion of HLA-associated changes outside of CTL epitopes rather than within epitopes in B57-negative subjects (data not shown), suggesting that this mechanism might be applied to patterns of escape and disease progression for non-B57 alleles. Thirdly, *de novo* CTL responses targeting escape variants may contribute to the prevention of breakthrough viremia. Recognition of escape variants by HIV-specific CTLs has been reported (4, 11), yet the association with disease outcome is unknown. Finally, as observed in a different cohort in which individuals who subsequently achieved a low virus set point had experienced high viremia during the acute phase (our unpublished data), there is the possibility that a certain level of escape from CTLs is introduced during acute/early infection regardless of the subsequent viral set point. Similarly, there might be a concern that a longer duration of infection in EC than in CP increased the chance of viral evolution in EC regardless of the cause of viremia control. However, the important finding here is that, despite frequent evidence of escape from CTLs, viremia is still under control in EC. This suggests that escape *per se* is not necessarily detrimental, perhaps because of fitness constraints imposed.

There are limitations to the present study. HLA-associated polymorphisms outside of predicted CTL epitopes may represent false-positive associations, peptide processing mutations, or escape mutations in as-yet-undefined epitopes, so it will be important to investigate these mutations with larger cohorts and improved approaches to differentiate compensatory mutations from CTL escape mutations. Another limitation is that the list of HLA-associated polymorphisms used here was generated based upon viral sequences derived from chronic progressive infection and may have missed unique escape mutations present only in EC, if such mutations occur. Finally, the allele-specific mutations observed here are interpreted to be escape from CTLs, yet this has not been shown experimentally. Indeed, current assays using synthetic peptides to sensitize target cells in order to evaluate escape from CTLs are of limited value, since they do not assess potential impacts on antigen processing and presentation. Since these HLA allele-specific mutations are observed in plasma virus, the most likely interpretation is that they represent escape, but infection of cells with mutated viruses will be required to fully resolve this issue.

In conclusion, despite viral loads of <50 RNA copies/ml, EC plasma viruses display a substantial number of HLA-associated polymorphisms regardless of HLA class I allele types, indicating that viral escape from HIV-specific CTLs is common in EC. Further studies will be important to reveal the mechanisms of viremia control despite apparent escape from CTLs in persons who are able to maintain durable control of HIV infection.

We thank the members of the International HIV Controllers Consortium (www.hivcontrollers.org).

This work was supported by grants AI028568 and AI030914 from the NIAID/NIH, the Howard Hughes Medical Institute, the Harvard University Center for AIDS Research, a gift from the Mark and Lisa Schwartz Foundation, the International AIDS Vaccine Initiative, and the Bill and Melinda Gates Foundation.

REFERENCES

- Allen, T. M., D. H. O'Connor, P. Jing, J. L. Dzuris, B. R. Mothe, T. U. Vogel, E. Dunphy, M. E. Liebl, C. Emerson, N. Wilson, K. J. Kunstman, X. Wang, D. B. Allison, A. L. Hughes, R. C. Desrosiers, J. D. Altman, S. M. Wolinsky, A. Sette, and D. I. Watkins. 2000. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407: 386-390.
- Bailey, J. R., T. P. Brennan, K. A. O'Connell, R. F. Siliciano, and J. N. Blankson. 2009. Evidence of CD8⁺ T-cell-mediated selective pressure on human immunodeficiency virus type 1 *nef* in HLA-B*57⁺ elite suppressors. *J. Virol.* 83:88-97.
- Bailey, J. R., K. G. Lassen, H. C. Yang, T. C. Quinn, S. C. Ray, J. N. Blankson, and R. F. Siliciano. 2006. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 80:4758-4770.
- Bailey, J. R., T. M. Williams, R. F. Siliciano, and J. N. Blankson. 2006. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57⁺ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* 203:1357-1369.
- Blankson, J. N., J. R. Bailey, S. Thayil, H. C. Yang, K. Lassen, J. Lai, S. K. Gandhi, J. D. Siliciano, T. M. Williams, and R. F. Siliciano. 2007. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J. Virol.* 81:2508-2518.
- Brockman, M. A., A. Schneidewind, M. Lahaie, A. Schmidt, T. Miura, I. Desouza, F. Ryvkin, C. A. Derdeyn, S. Allen, E. Hunter, J. Mulenga, P. A. Goepfert, B. D. Walker, and T. M. Allen. 2007. Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A. *J. Virol.* 81:12608-12618.
- Brumme, Z. L., C. J. Brumme, D. Heckerman, B. T. Korber, M. Daniels, J. Carlson, C. Kadie, T. Bhattacharya, C. Chui, J. Szinger, T. Mo, R. S. Hogg, J. S. Montaner, N. Frahm, C. Brander, B. D. Walker, and P. R. Harrigan. 2007. Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS Pathog.* 3:e94.
- Brumme, Z. L., C. J. Brumme, M. John, J. M. Carlson, R. Haubrich, S. Riddler, L. Swenson, I. Tao, S. Szeto, D. Chan, C. Kadie, N. Frahm, C. Brander, B. D. Walker, D. Heckerman, P. R. Harrigan, and S. Mallal. 2008. Relationship between HLA class I-driven evolution in Gag, Pol and Nef and clinical markers of HIV disease: a multi-center collaborative study, abstr. P09-01. *In Abstracts from AIDS Vaccine 2008.* <http://www.liebertonline.com/doi/pdfplus/10.1089/aid.2008.9997a>.
- Brumme, Z. L., I. Tao, S. Szeto, C. J. Brumme, J. M. Carlson, D. Chan, C. Kadie, N. Frahm, C. Brander, B. Walker, D. Heckerman, and P. R. Harrigan. 2008. Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection. *AIDS* 22:1277-1286.
- Draenert, R., S. Le Gall, K. J. Pfafferoth, A. J. Leslie, P. Chetty, C. Brander, E. C. Holmes, S. C. Chang, M. E. Feeney, M. M. Addo, L. Ruiz, D. Ramduth, P. Jeena, M. Altfeld, S. Thomas, Y. Tang, C. L. Verrill, C. Dixon, J. G. Prado, P. Kiepiela, J. Martinez-Picado, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2004. Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 199:905-915.
- Feeney, M. E., Y. Tang, K. Pfafferoth, K. A. Roosevelt, R. Draenert, A. Trocha, X. G. Yu, C. Verrill, T. Allen, C. Moore, S. Mallal, S. Burchett, K. McIntosh, S. I. Pelton, M. A. St John, R. Hazra, P. Klenerman, M. Altfeld, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2005. HIV-1 viral escape in infancy followed by emergence of a variant-specific CTL response. *J. Immunol.* 174:7524-7530.
- Frahm, N., P. Kiepiela, S. Adams, C. H. Linde, H. S. Hewitt, K. Sango, M. E. Feeney, M. M. Addo, M. Lichterfeld, M. P. Lahaie, E. Pae, A. G. Wurcel, T. Roach, M. A. St John, M. Altfeld, F. M. Marincola, C. Moore, S. Mallal, M. Carrington, D. Heckerman, T. M. Allen, J. I. Mullins, B. T. Korber, P. J. Goulder, B. D. Walker, and C. Brander. 2006. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* 7:173-178.
- Friedrich, T. C., L. E. Valentine, L. J. Yant, E. G. Rakasz, S. M. Piaszkowski, J. R. Furlott, K. L. Weisgrau, B. Burwitz, G. E. May, E. J. Leon, T. Soma, G. Napoe, S. V. Capuano III, N. A. Wilson, and D. I. Watkins. 2007. Subdominant CD8⁺ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J. Virol.* 81:3465-3476.
- Geldmacher, C., J. R. Currier, E. Herrmann, A. Haule, E. Kuta, F. McCutchan, L. Njovu, S. Geis, O. Hoffmann, L. Maboko, C. Williamson, D. Birx, A. Meyerhans, J. Cox, and M. Hoelscher. 2007. CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J. Virol.* 81:2440-2448.
- Goulder, P. J., R. E. Phillips, R. A. Colbert, S. McAdam, G. Ogg, M. A. Nowak, P. Giangrande, G. Luzzi, B. Morgan, A. Edwards, A. J. McMichael, and S. Rowland-Jones. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* 3:212-217.
- John, M., D. Heckerman, L. Park, S. Gaudieri, A. Chopra, J. Carlson, I. James, D. Nolan, R. Haubrich, S. Mallal, and A. S. Team. 2008. Genome-wide HLA-associated selection in HIV-1 and protein-specific correlations with viral load: an ACTG 5142 study, paper 312. *In 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection.* <http://www.retroconference.org/2008/PDFs/312.pdf>.
- Kaslow, R. A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Munoz, A. J. Saah, J. J. Goedert, C. Winkler, S. J. O'Brien, C. Rinaldo, R. Detels, W. Blattner, J. Phair, H. Erlich, and D. L. Mann. 1996. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2:405-411.
- Kent, S. J., A. Woodward, and A. Zhao. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cell responses correlate with control of acute HIV-1 infection in macaques. *J. Infect. Dis.* 176:1188-1197.
- Kiepiela, P., K. Ngumbela, C. Thobakgale, D. Ramduth, I. Honeyborne, E. Moodley, S. Reddy, C. de Pierres, Z. Mncube, N. Mkhwanazi, K. Bishop, M. van der Stok, K. Nair, N. Khan, H. Crawford, R. Payne, A. Leslie, J. Prado, A. Prendergast, J. Frater, N. McCarthy, C. Brander, G. H. Learn, D. Nickle, C. Rousseau, H. Coovadia, J. I. Mullins, D. Heckerman, B. D. Walker, and P. Goulder. 2007. CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* 13:46-53.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68:4650-4655.
- Leslie, A. J., K. J. Pfafferoth, P. Chetty, R. Draenert, M. M. Addo, M. Feeney, Y. Tang, E. C. Holmes, T. Allen, J. G. Prado, M. Altfeld, C. Brander, C. Dixon, D. Ramduth, P. Jeena, S. A. Thomas, A. St John, T. A. Roach, B. Kuper, G. Luzzi, A. Edwards, G. Taylor, H. Lyall, G. Tudor-Williams, V. Novelli, J. Martinez-Picado, P. Kiepiela, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2004. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* 10:282-289.
- Martinez-Picado, J., J. G. Prado, E. E. Fry, K. Pfafferoth, A. Leslie, S. Chetty, C. Thobakgale, I. Honeyborne, H. Crawford, P. Matthews, T. Pillay, C. Rousseau, J. I. Mullins, C. Brander, B. D. Walker, D. I. Stuart, P. Kiepiela, and P. Goulder. 2006. Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 80:3617-3623.
- Matthews, P. C., A. Prendergast, A. Leslie, H. Crawford, R. Payne, C. Rousseau, M. Rolland, I. Honeyborne, J. Carlson, C. Kadie, C. Brander, K. Bishop, N. Mlotshwa, J. D. Mullins, H. Coovadia, T. Ndung'u, B. D. Walker, D. Heckerman, and P. J. Goulder. 2008. Central role of reverting mutations in HLA associations with human immunodeficiency virus set point. *J. Virol.* 82:8548-8559.
- Migueles, S. A., A. C. Laborico, H. Imamichi, W. L. Shupert, C. Royce, M. McLaughlin, L. Ehler, J. Metcalf, S. Liu, C. W. Hallahan, and M. Connors. 2003. The differential ability of HLA B*5701⁺ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences. *J. Virol.* 77:6889-6898.
- Miura, T., M. A. Brockman, C. J. Brumme, Z. L. Brumme, J. M. Carlson, F. Pereyra, A. Trocha, M. M. Addo, B. L. Block, A. C. Rothchild, B. M. Baker, T. Flynn, A. Schneidewind, B. Li, Y. E. Wang, D. Heckerman, T. M. Allen, and B. D. Walker. 2008. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J. Virol.* 82:8422-8430.
- Miura, T., M. A. Brockman, Z. L. Brumme, C. J. Brumme, F. Pereyra, A. Trocha, B. L. Block, A. Schneidewind, T. M. Allen, D. Heckerman, and B. D. Walker. 2009. HLA-associated alterations in replication capacity of chimeric N14-3 viruses encoding gag-protease from elite controllers of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 83:140-149.
- Mothé, B. R., J. Weinfurter, C. Wang, W. Rehrauer, N. Wilson, T. M. Allen, D. B. Allison, and D. I. Watkins. 2003. Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J. Virol.* 77:2736-2740.
- Pereyra, F., M. M. Addo, D. E. Kaufmann, Y. Liu, T. Miura, A. Rathod, B. Baker, A. Trocha, R. Rosenberg, E. Mackey, P. Ueda, Z. Lu, D. Cohen, T. Wrin, C. J. Petropoulos, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker. 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197:563-571.
- Price, D. A., P. J. Goulder, P. Klenerman, A. K. Sewell, P. J. Easterbrook, M. Troop, C. R. Bangham, and R. E. Phillips. 1997. Positive selection of HIV-1

- cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1890–1895.
30. Reimann, K. A., K. Tenner-Racz, P. Racz, D. C. Montefiori, Y. Yasutomi, W. Lin, B. J. Ransil, and N. L. Letvin. 1994. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Virol.* **68**:2362–2370.
 31. Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* **283**:857–860.
 32. Yant, L. J., T. C. Friedrich, R. C. Johnson, G. E. May, N. J. Maness, A. M. Enz, J. D. Lifson, D. H. O'Connor, M. Carrington, and D. I. Watkins. 2006. The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J. Virol.* **80**:5074–5077.
 33. Zuñiga, R., A. Lucchetti, P. Galvan, S. Sanchez, C. Sanchez, A. Hernandez, H. Sanchez, N. Frahm, C. H. Linde, H. S. Hewitt, W. Hildebrand, M. Altfeld, T. M. Allen, B. D. Walker, B. T. Korber, T. Leitner, J. Sanchez, and C. Brander. 2006. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J. Virol.* **80**:3122–3125.

HIV Elite Controllers

—HIV感染症の自然制御—

三浦 聡之*

はじめに

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immune Deficiency Syndrome: AIDS) はヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus type 1: HIV-1) の感染によって引き起こされ、1990年代前半までは、HIV感染=AIDS=死というイメージがあった。しかしながら、1996年ごろから利用できるようになった強力な抗ウイルス薬併用療法により、血液中のウイルス量を検出限界以下にまで抑制することが可能になり、AIDSによる死亡数は激減した。しかしながら、これらの抗ウイルス療法によっても、ウイルスを体内から完全に排除することは不可能であり、内服を中断すると再びウイルス量が増加してくる。したがって、感染者は生涯にわたり抗HIV薬を飲み続ける必要があり、長期の副作用が懸念されている。一方で、病気の進行速度は、患者間で大きく異なっており、なかには感染後20数年経過しても免疫力を保ち、抗HIV薬の投与を必要としない患者群も存在する。彼らは、HIV Controllersと呼ばれ、近年、これらにおけるウイルス複製コントロールの機序を解明することが、有効なワクチン開発の鍵となるという考えから、HIV Controllersを対象とした研究が盛んに行われている。ここでは、現在までの知見の一部を紹介する。

I. HIV Elite Controllers

HIV-1は、CD4陽性細胞 (主に、CD4陽性T細胞) に感染し、体内でCD4陽性T細胞が破壊されることにより、(一般的にCD4陽性細胞数が $200/\mu\text{L}$ 未満になると) 感染者は各種の日和見感染症に罹患しやすくなる。かつて、血中のウイルス量の測定が商用ベースでは利用できなかった時代には、感染後7~10年以上を経ても、

CD4数を $500/\mu\text{L}$ 以上 (健常人におけるCD4陽性細胞数は $500\sim 1,000/\mu\text{L}$) に保っている患者群は、長期未発症者 (Long-term non-progressors: LTNP) と呼ばれ、その多くが研究対象とされてきた。しかしながら、彼らの多くは、最終的にはAIDSに進行することがわかってきた¹⁾。

血中ウイルスの定量が可能になってからは、病気の進行速度が、その血中ウイルス量と強く相関することがわかってきたため²⁾、感染期間より、血中ウイルス量そのものが注目されるようになってきた。HIVに感染すると、3~4週の潜伏期の後、人によっては伝染性単核球症様の症状を呈する。この間、血中のウイルス量は、 10^8 RNA copies/mLにも達し、一過性にCD4陽性T細胞数も減少する (図1)。急性期後、数年にわたる無症候期が続く。この間、血中ウイルス量はおおむね一定した量を保っており、この安定したウイルス量のことを「セットポイントウイルス量」と呼んでいる。平均的な未治療のHIV感染者では、この値はおおよそ $30,000$ RNA copies/mL程度である。感染個体内でのウイルス複製の抑制には、HIV特異的細胞障害性T細胞 (CTL) が非常に重要な役割をしていることが示唆されている^{3,4)}。

中和抗体の誘導を目的としたワクチンの開発が、現在までの知見では非常に困難であり、血漿中ウイルス量が低ければ、AIDSになる確率が低く、他の人にウイルスを感染させる可能性も著しく低いことが報告されていることから⁵⁾、多くの研究者がHIV特異的CTLの誘導を目的としたワクチン開発を目指している。自らウイルス複製をこのレベル以下に抑制できるものが、最近、HIV Controllersと呼ばれるようになり、このうち、特に、商用の血中ウイルス定量で、検出限界以下 ($50\sim 75$ RNA copies/mL) にまで、自らコントロールできるものを特に、HIV elite controllers (EC)

* Toshiyuki MIURA 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野/准教授

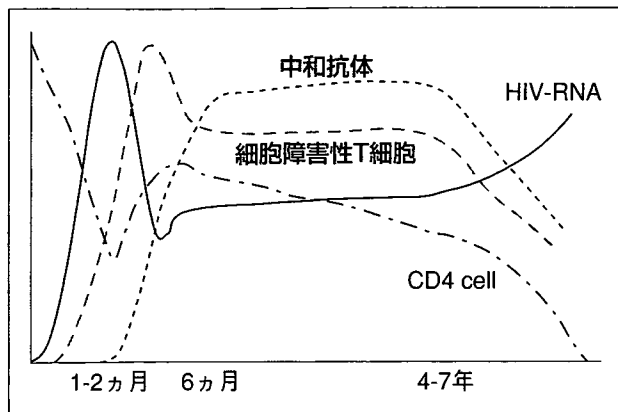


図1 HIV感染症の自然経過

と呼んでおり、その頻度は1%以下であると推察されている¹⁾。

次に要因ごとに、ウイルス因子、宿主遺伝的因子、免疫学的因子、と分けて解説したい。しかしながら、これらの要因は互いに重なりあう部分が多くある。

II. ウイルス因子

ウイルス側の因子として最も知られたものは、アクセサリ遺伝子のひとつである *nef* の欠失(長ささまざま)である。最初、一人のHIV陽性の輸血ドナーとその数名のレシピエントのすべてに、*nef* に大きな欠失が検出された⁶⁾。これらの患者すべてが、いわゆるLTNPであったため、この*nef* 遺伝子の欠失が一躍有名になった。以後も、小規模な研究で同様の報告がいくつか続き、LTNPにおいては、他のアクセサリ遺伝子の欠失などの報告も散見されている。

筆者らは、50人以上のECから、高用量(5~35mL)の血漿からウイルスを超遠心で濃縮し、すべての構造遺伝子の増幅を試みた。その結果、確かに数%のECでは*nef* 遺伝子の欠失を認めたが、それ以外に遺伝子欠失は認められなかった⁷⁾。さらに、ウイルスのアミノ酸配列をコドンレベルで、ECと未治療の高ウイルス血症患者群で比較したところ、elite controlに特異的と考えられるアミノ酸変化も認められなかった。想像に難くないが、ECからのウイルスそのものの分離は非常に難しい。筆者らは、血漿から増幅された*gag-protease* 遺伝子をHIV-1の実験株NL4-3に組み込んだキメラウイルスを作製し、その増殖能を、50名以上のECと同等数の高ウイルス血症患者群の間で比較したところ、EC由来キメラウイルスは、有意に低下した増殖能を示した⁸⁾。

一方で、Lassenらは、7人のEC由来の計36クローン

のenvelopeタンパクの細胞侵入効率が、慢性未治療感染者群に比べ、有意に劣っていることを示した⁹⁾。

未発表のデータであるが、筆者らも50名を超えるEC由来envelopeで、同様な結果を得ている。しかしながら、重要なポイントとして、*gag-protease* およびenvelopeに共通していたことは、進行感染者と比較しても遜色のない機能を持つウイルスに感染しているECが多かったことである。

現時点で言えることは、弱毒株の感染によって説明できる例は多数あると考えられるが、その責任遺伝子は、EC間で共通とはいえない。また、弱毒株の伝播によるのか、または感染後に弱毒化されたのかは明らかにできていないが、少なくとも、*Gag-protease* に関しては後述するように、免疫からの逃避現象として出現している可能性が高いと考えられる。

III. 宿主遺伝的因子

宿主因子として、体内でのウイルス産生量に明らかに関連する因子は、HLAである。驚くべきことに、ECの30~40%は、HLA-B57を発現しており、20%はHLA-B27を発現している¹⁰⁾。この非常に強いHLA分布の偏重は、強く細胞障害性T細胞の関与を支持するものである。これに関連する項目は、次章を参照されたい。一方で、HLA class Iの分布に偏りがあるからといって、必ずしも細胞性免疫だけが関与しているとは限らない。これらの遺伝子と強く連鎖不均衡を持つ他の遺伝子産物が病気の進行に関与している、その結果としてHLAの分布に偏りが出てきている可能性は否定できない。

一般的な慢性HIV感染症患者における研究ではあるが、Fellayらは、whole genome association studyにより、ウイルスセットポイントに強く影響するヒトの遺伝子多型を見つけた¹¹⁾。最も強い関連が認められたのは、HCP5(HLA complex P5)というHLA-Bの近傍にある遺伝子で、ヒトの内因性レトロウイルスエレメント(human retroviral element)の中にあった。しかしながら、この多型は、HLA-B*5701と強い連鎖不均衡があるため、B*5701による効果を見ている可能性が高いが、HCP5遺伝子自体の産物が、レトロウイルスのpol遺伝子に類似することから、アンチセンス機序によるジーンサイレンシングなどが関与している可能性なども指摘されている。また、二番目に強い関連を示した多型は、HLA-C遺伝子の近傍にあり、HLA-Cの発現レベルと強い関連があり、低い血中ウイルス

量と関連するアリルが、HLA-Cの高い発現と関連しているとされる。16名のECで、これら二つの遺伝子多型が見られるかを検討した研究があるが、それぞれ、0/16および4/16と低頻度であった¹²⁾。

HIVがCD4陽性T細胞に感染するときに、co-receptorとして、CCR5またはCXCR4を必要とする。白人では、CCR5遺伝子の32 base pairの欠失が知られている。このCCR5Δ32をホモ接合体として持つ者は、HIV感染に対して感受性が低いことがわかっており、ヘテロ接合体として持つ者も病気の進行が遅いという報告がある¹³⁾。しかしながら、Pereyraらによる検討では、ホモ接合体は一人もおらず、ECでのヘテロ接合体の頻度も進行感染者と比べて違いはなかった¹⁰⁾。Dolanらは、病気の進行に促進的に働くCCR5ハプロタイプを定義づけ、また、リガンドであるMIP1αをコードするCCL3L1遺伝子のコピー数が、病気の進行速度と負の相関があることも報告し、non-detrimentalなCCR5ハプロタイプと高いCCL3L1遺伝子コピー数の組み合わせが、ECで高い頻度で見られることを報告している¹⁴⁾。

IV. 免疫学的因子

1. 適応免疫

1) HIV特異的CD4陽性T細胞

CD4陽性T細胞は、適応免疫のkey regulatorである。以前より、いわゆるLTNPでは、HIV特異的CD4陽性T細胞の増殖能が優れていると報告されていた¹⁵⁾。Pereyraらは、IL-2とインターフェロンガンマをとともに分泌するHIV特異的CD4陽性T細胞の頻度が、ECでは高いことを報告しており¹⁰⁾、ごく最近では、Potterらが、HIV特異的CD4陽性T細胞の増殖能とIL-2分泌の程度が、抗ウイルス療法下の患者群に比べて、ECでは高かったことを報告している¹⁶⁾。また、最近、一般的なHIV感染症では、HIV-1特異的CD4陽性T細胞上で、immunoregulatory moleculesであるCTLA-4およびPD-1の発現が高まっているため、結果として、細胞が疲弊してしまっているとされる^{17, 18)}。ECにおいても、ECのHIV特異的CD4陽性T細胞では、CTLA-4のレベルが有意に低いことが示されており¹⁸⁾、結果として、高い増殖能を保っている可能性がある。

2) CD8陽性T細胞(細胞障害性T細胞)

HIV-1特異的細胞障害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte: CTL)がウイルス量のコントロールに

主要な役割を果たしていることは、ほぼコンセンサスが得られている。ひとつには、図1に示すように、急性感染期において、ピークのウイルス量が低下し始めるとほぼ同時期に、HIV特異的CTLが検出されるようになること³⁾、またサルのエイズウイルス感染モデルでは、抗CD8抗体の投与によりCTLを枯渇させると、血中のウイルス量が増加することが観察されている⁴⁾。一般的な慢性HIV感染症において、その血中ウイルス量と関連する免疫学的パラメーターの探索は非常に多くあり、ここでそれらを紹介する紙面の余裕はない。大雑把にいうと、低い血中ウイルス量、あるいは病気進行の遅延と関連するものとして、①Gag特異的CTLとウイルスフィットネス、②CD8陽性T細胞のクオリティ、等が挙げられる。以下に、実際にECを対象にした研究を紹介する。

①Gag特異的CTLとウイルスフィットネス

HIVタンパクのうち、Gagが最も重要なCTLの標的であることは、多くの論文で明らかにされている¹⁹⁾。ECにおける研究では、二つのグループが同様の結果を報告している^{10, 20)}。ECでは、HLA-B27あるいはB57を発現している者が多く、これらのアリルはGag(特にCapsid)タンパク内にCTLエпитープを持っている^{21, 22)}。しかしながら、この結果はECにおける偏ったHLA分布だけによるわけではないことがわかっている。

HIVの逆転写酵素はエラーが入りやすく、この高い変異率が、HIVの他に類をみない高い多様性の原因ともなっている。HIV特異的免疫によりウイルスに選択圧がかかると、HIVは容易に変異を獲得し、結果としてウイルスが免疫から逃避(エスケープ)する。これらエスケープ変異のなかには、ウイルスの複製能(フィットネス)を低下させるものが報告されている。ECの40%を占めるHLA-B57に拘束されるGagエピトープから、ほぼ普遍的に生じるエスケープ変異の一つは、ウイルスの複製能を低下させることが、試験管レベルでも、臨床上の観察でも認められている^{23, 24)}。

前述したように、EC由来gag-proteaseをもつキメラウイルスは有意に減弱した複製能を示したが、さらなる解析によりこれらは、特にHLA-B57を含めた、病気の進行に対して防御的に働くHLA class Iタイプからの選択圧によってもたらされている可能性が高いことが示された⁸⁾。さらに、HLA-B57患者由来のウイルスのシーケンスを解析すると、多くのECがそのエピトープ内に、高ウイルス血症患者には見られない稀な変異を持っており、ウイルスの複製能を著しく低下

させることが報告された²⁵⁾。それらのECは、エスケープバリエーションを認識する特異的CTLを持っていることが報告されている。この二重の防御機構が、エリートコントロールに寄与している可能性が示された²⁵⁾。一方で、ECに多く認められるHLA-B51はGag内に標的エピトープが存在しないなど、上述した機序がすべてのECにあてはまるわけではないことも記しておく。

②CD8陽性T細胞のクオリティ

二つのグループからIFNガンマ/IL-2をとともに産生するCTLの割合が、ECでは進行感染者群より有意に高かったことを報告されている^{10, 20)}。またBettsらは、ECにおいて、同じHLAによって拘束されるエピトープ特異的なCTLにおいても、ウイルス血症を認める患者群に比べて、多種類のサイトカインを産生するpolyfunctionalなCTLの割合が高かったことを報告している²⁶⁾。Miguelesらは、ECでは刺激に対して、HIV特異的CD8陽性T細胞の増殖能が認められたのに対して、抗ウイルス療法によって、同様に検出限界以下のウイルス量を達成している群では認められなかったことを報告している²⁷⁾。さらに、Saez-Cirionらは、EC由来の未刺激状態のCD8陽性T細胞が、同患者由来のCD4陽性T細胞にウイルスを試験管内で感染させたものに加えたところ、進行感染者群および、抗HIV療法群に比べて、ウイルス増殖をよりコントロールできたことを報告した²⁸⁾。また、非常に最近、Miguelesらは、ECのCD8陽性T細胞では、lytic granuleの量が増加しており、より効率的に感染細胞を殺すことができる可能性を示した²⁹⁾。

CD4陽性細胞の項でも述べたが、HIV特異的CTLでは、PD-1(programmed death-1)分子の発現が高まっており、これが細胞のdysfunctionに関連し、そのレベルは、血中のウイルス量と正の相関があることが示されている³⁰⁾。EC自体のサンプルを使用したデータは、筆者の知る限り一つであるが、進行感染者との差は明らかでなかった。しかしながら、上記すべてを通して、この良質なHIV特異的CD8陽性T細胞が、血中ウイルス量コントロールの原因なのか、その結果を見ているのかは定かでない。

2. 自然免疫

前述したように、感染個体内でのウイルス複製コントロールにCD8陽性T細胞が重要な役割を果たしていると考えられているが、急性感染期において、HIV特異的CTLが検出されるのは、ウイルス量がピークに到達するより若干遅れているとされている³¹⁾。したが

って、自然免疫系が果たしている役割も重要かもしれない。自然免疫を担う細胞のひとつであるNK(Natural Killer)細胞上のレセプターであるKIR(Killer Immunoglobulin-like Receptor)の特定のアリルと病気の進行速度には、関連があることがわかってきている。Activating NK cell receptorであるKIR3DS1アリルと、リガンドとして働く80番目のアミノ酸がイソロイシンであるHLA-Bw4(HLA-Bw4-80I)をとともに持つ患者では、病気の進行が遅く、かつ試験管内では、この組み合わせが、強くHIVの複製を抑制することが証明されている^{32, 33)}。またinhibitory receptorであるKIR3DL1の特定のアリルとHLA-Bw4-80Iをとともに持つ患者の病気の進行も遅いことが報告されている³³⁾。

重要なことに、HLA-Bw4-80Iは、最もprotectiveなHLA-B57を含んでいる。したがって、CTLによる効果に加え、一部のHLA-B57陽性者では、NK細胞による抗ウイルス効果も寄与している可能性がある。ECにおける研究では、20人の黒人ECにおいて、HLA-Bw4-80Iは17人に認められたが、KIR3DS1を持っていた者は2人しかおらず、両方持っていた者は、たったの1人であったことが報告されている³⁴⁾。もとより、KIR3DS1は黒人では稀なアリルであるため評価は難しいが、少なくとも、これらがエリートコントロールに必須でないことは明らかである。しかしながら、急性感染期に起きている現象が、その後のセットポイントウイルス量の決定に深く関与していると考えられているため、今後、自然免疫系の研究が重要となってくるかもしれない。

3. 液性免疫

前述したように、HIV感染症においては、感染個体内のウイルス産生コントロールへの中和抗体の寄与は高くないと考えられている。Pereyraらはheterologous virus由来envelopeを持つpseudovirusの中和抗体価は、ECでは進行感染者に比べて、有意に低かったことを報告している¹⁰⁾。一方、EC由来の血漿が自己ウイルスを効率よく中和するために、ウイルス量がコントロールできているのではないかという疑問も生じる。これについては、数名程度の小規模のデータしか報告されておらず、進行感染者との間で、特に違いは報告されていない³⁵⁾。したがって、現時点での知見では、エリートコントロールに対する中和抗体の寄与は否定的である。

最近、Lambotteらは、recombinant gp120を標的と

したADCC(antibody-dependent cell cytotoxicity)を、10人のコントローラ(<400 RNA/copies/mL)と高ウイルス量群との間で比較したところ、コントローラでは、ADCCが有意に高かったことを報告している³⁶⁾。今後より規模の大きな研究での確認が必要であろう。

まとめ

ここ数年、ECに関して多くの論文が出されているが、解説したように特定の共通した機序は見つかっていない。HLAのバイアスを超えるような因子は見つからない可能性が高く、それぞれのelite controlが違った機序、あるいは複数の機序のコンビネーションの上に成り立っている可能性も高いと考えられる。有効なHIVワクチン開発の鍵が、本当にECに隠されているかは不明であるが、今後もこの領域の研究は継続されていくであろう。

参考文献

- 1) Deeks SG, Walker BD : *Immunity* 2007 ; 27 : 406~416.
- 2) Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. : *Ann Intern Med* 1997 ; 126 : 946~954.
- 3) Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. : *J Virol* 1994 ; 68 : 4650~4655.
- 4) Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. : *Science* 1999 ; 283 : 857~860.
- 5) Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, et al. : *Lancet* 2001 ; 357 : 1149~1153.
- 6) Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, et al. : *Science* 1995 ; 270 : 988~991.
- 7) Miura T, Brockman MA, Brumme CJ, et al. : *J Virol* 2008 ; 82 : 8422~8430.
- 8) Miura T, Brockman MA, Brumme ZL, et al. : *J Virol* 2009 ; 83 : 140~149.
- 9) Lassen KG, Lobritz MA, Bailey JR, et al. : *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000377.
- 10) Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, et al. : *J Infect Dis* 2008 ; 197 : 563~571.
- 11) Fellay J, Shianna KV, Ge D, et al. : *Science* 2007 ; 317 : 944~947.
- 12) Han Y, Lai J, Barditch-Crovo P, et al. : *AIDS* 2008 ; 22 : 541~544.
- 13) Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. : *Science* 1996 ; 273 : 1856~1862.
- 14) Dolan MJ, Kulkarni H, Camargo JF, et al. : *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1324~1336.
- 15) Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al. : *Science* 1997 ; 278 : 1447~1450.
- 16) Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, et al. : *J Virol* 2007 ; 81 : 13904~13915.
- 17) D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, et al. : *J Immunol* 2007 ; 179 : 1979~1987.
- 18) Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, et al. : *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1246~1254.
- 19) Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. : *Nat Med* 2007 ; 13 : 46~53.
- 20) Emu B, Sinclair E, Hatano H, et al. : *J Virol* 2008 ; 82 : 5398~5407.
- 21) Goulder PJ, Brander C, Tang Y, et al. : *Nature* 2001 ; 412 : 334~338.
- 22) Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, et al. : *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 2709~2714.
- 23) Brockman MA, Schneidewind A, Lahaie M, et al. : *J Virol* 2007 ; 81 : 12608~12618.
- 24) Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, et al. : *J Virol* 2006 ; 80 : 3617~3623.
- 25) Miura T, Brockman MA, Schneidewind A, et al. : *J Virol* 2009 ; 83 : 2743~2755.
- 26) Betts MR, Nason MC, West SM, et al. : *Blood* 2006 ; 107 : 4781~4789.
- 27) Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, et al. : *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 1061~1068.
- 28) Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, et al. : *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 6776~6781.
- 29) Migueles SA, Osborne CM, Royce C, et al. : *Immunity* 2008 ; 29 : 1009~1021.
- 30) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. : *Nature* 2006 ; 443 : 350~354.
- 31) Alter G, Altfeld M : *J Intern Med* 2009 ; 265 : 29~42.
- 32) Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. : *Nat Genet* 2002 ; 31 : 429~434.
- 33) Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. : *Nat Genet* 2007 ; 39 : 733~740.
- 34) O'Connell KA, Han Y, Williams TM, et al. : *J Virol* 2009 ; 83 : 5028~5034.
- 35) Bailey JR, Lassen KG, Yang HC, et al. : *J Virol* 2006 ; 80 : 4758~4770.
- 36) Lambotte O, Ferrari G, Moog C, et al. : *AIDS* 2009 ; 23 : 897~906.

