

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトサイトメガロウイルスの母子感染における妊婦の血清学的抗体検査と T 細胞のクローナリティおよび遺伝子発現特性との関連の検討

氏名 三角 史

【序文】

ヒトサイトメガロウイルス (Human Cytomegalovirus; CMV) は母子感染症の主要原因となるウイルスである。母体が初感染を受けた場合、または既往感染の妊婦が再感染や再活性化を生じた場合に先天性 CMV 感染症が発生するリスクがある。しかし、妊娠中の母体 CMV 感染の確実な検出法は確立していない。従来から行われている特異的血清抗体検査では、初感染の検出においては CMV-IgM の persistent IgM の現象や偽陽性が問題となり確実な感染時期の特定が難しい。それに対して感染時期のより正確な把握を目的として、CMV IgG-AI (Avidity Index) 測定があり、感染時期に近いほど CMV IgG-AI が低値となり感染後の時間経過とともに値が上昇する。しかし、CMV IgG-AI の測定法は標準化されておらず、これを用いた感染母体検出のためのプロトコールは確立していない。さらに、感染既往の妊婦において、再感染あるいは再活性化による先天感染を妊娠中に把握するためのアプローチも未解決課題である。

CMV 感染時の宿主の抗ウイルス免疫機構では細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) は中心的な役割を担う。日和見感染が問題となる造血幹細胞移植時の CMV 感染では、CMV 抗原タンパク質の pp65 に対して特異的に反応する CTL に関する研究が多く行われてきた。しかし、妊娠中の CMV 感染母体における CTL が関わる免疫反応についての知見は乏しい。

本研究は、先天性 CMV 感染症の発生過程において母体の CMV 感染を検出するために有効な検査法および臨床的プロトコール確立のための基盤的な知見を得ることを目的として、以下の 2 つの研究課題について検討を行った。

- 課題 1. 母体の血清学的検査において感染時期特定のための CMV IgG-AI を組み入れた臨床的アプローチの有用性の検討
- 課題 2. 母体の CMV 感染を把握する新たな検査法開発を目指した、CMV 感染時に特異的な反応を示す CTL 集団に関する検討

【方法】

課題 1

- 1-1. 東京大学医学部附属病院で管理を行った分娩症例の中で、妊娠初期 (妊娠 16 週以前) に抗 CMV-IgG, -IgM 抗体価のスクリーニング検査を行った 3122 例のコホート集団を対象として、妊娠初期の抗 CMV 抗体の結果と先天感染の関係性を調べた。
- 1-2. 1-1 と同じ期間に同院で出生した児のうち、新生児期に尿 PCR 検査による先天感染

の有無の確定診断が行われた 545 例を対象として後方視的に解析を行い、CMV-IgM と CMV IgG-AI のそれぞれについて先天感染ハイリスク集団を抽出するための有用性に関して検討した。

課題 2

2-1. 妊娠初期の血清抗体検査において CMV-IgG、-IgM および CMV IgG-AI に関して異なる特性を持つ集団について血液検体の採取を行った。HLA-A 型が 24:02*または 02:01*の血液から分離した PBMC(末梢血単核球)を、それらの HLA-A 型拘束性の CMV pp65 tetramer で染色しフローサイトメトリーで CMV 抗原認識 CTL を同定した。また、HLA-A 拘束性 CMV pp65 peptide で PBMC を刺激し、pp65 特異的に IFN γ を産生する CTL の割合をフローサイトメトリーで解析した。

2-2. CMV 未感染妊婦 2 例、既往感染妊婦 2 例、CMV IgM 陽性妊婦 2 例 (High AI 1 例、Low AI 1 例) の合計 6 例から得られた PBMC から、フローサイトメトリーを用いて CMV pp65 tetramer 反応性 CTL をセルソーティングして抽出した。抽出した CTL について T 細胞受容体(T cell receptor; TCR)レパトア解析を行い、CMV 反応性 CTL のクローン多様性について解析した。

2-3. CMV 感染に関する臨床背景が異なる妊婦 5 症例 (CMV 未感染妊婦 1 例、既往感染妊婦 2 例、IgM 陽性, High AI 1 例、IgM 陽性, Low AI 1 例) の血液から PBMC を抽出して、CMV 反応性 CTL のシングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) を行った。遺伝子発現をもとに CMV 反応性 CTL について UMAP クラスタリングを行い分類された個々の CTL クラスターの細胞特性について検討した。

【結果】

課題 1

1-1. 妊娠初期に CMV 特異的抗体検査を実施した 3122 例の中で、CMV IgG 陰性は 1059 例(33.9%)、CMV IgG 陽性 IgM 陽性は 113 例(3.6%)、CMV IgG 陽性 IgM \pm は 203 例 (6.5%)であり、このうち 102 例で CMV IgG AI を測定し、High AI が 77 例(75.5%)、Low AI が 25 例(25.4%)であった。Low AI の 25 例中 2 例は新生児尿 PCR 検査陽性で先天感染が確認されたのに対して、High AI の 77 例では、先天感染例はなかった。

1-2. 先天感染の有無の確定検査を実施した 545 例中、先天感染が 16 例に確認された。CMV IgG-AI を実施した 119 例の中で、Low AI 58 例中 10 例、High AI 61 例中 1 例に先天感染が確認され、先天感染の検出における CMV IgG AI の感度は 0.91、特異度は 0.56、陽性的中率は 0.17、陰性的中率は 0.98 であった。

課題 2

2-1. 全 CTL 中で pp65 tetramer 陽性の CMV 抗原認識 CTL の割合の平均は、未感染妊婦 (CMV IgG 陰性)で 0.01%、CMV IgM 陽性かつ CMV IgG-AI 低値の妊婦 (Low AI 妊婦) では 0.91%、CMV IgM 陽性かつ CMV IgG-AI 高値の妊婦 (High AI 妊婦) では 0.32%、既往感染妊婦(CMV IgG 陽性、IgM 陰性)では 0.22%、既往感染非妊婦では 1.07%であっ

た。既往感染妊婦に対し Low AI 妊婦は有意に CMV 抗原認識 CTL の割合が高く、Low AI 妊婦の中でも先天感染が生じた妊婦では CMV 抗原認識 CTL の比率が高かった。また、既往感染非妊婦は既往感染妊婦や High AI 妊婦に比し有意に CMV 抗原認識 CTL の割合が高かった。

CMV pp65 抗原刺激後に IFN γ を産生する CTL(反応性 IFN γ 産生 CTL)の割合の平均値は、未感染妊婦で 0.11%、Low AI 妊婦で 0.40%、High AI 妊婦で 0.20%、既往感染妊婦で 0.23%、既往感染非妊婦で 1.02%であった。Low AI 妊婦では未感染妊婦($p=0.0142$)および High AI($p=0.0434$)の妊婦に対し有意に反応性 IFN γ 産生 CTL の割合が高かった。また、既往感染非妊婦は他のいずれの血清抗体価パターンの妊婦よりも CMV 反応性 IFN γ 産生 CTL の比率が有意に高かった。CMV 抗原認識 CTL の割合と CMV 反応性 IFN γ 産生 CTL の割合は互いに正の相関を認めた($R^2=0.302$, $P<0.0001$)。

2-2. CMV 抗原認識 CTL の TCR レパトア解析を実施した結果、CMV IgG 陽性の 4 例中でポリクローナルパターンとオリゴクローナルパターンを 2 例ずつみとめた。解析した CMV IgG 陽性例の中で IgM 陽性の 2 例では、Low AI 妊婦はオリゴクローナルであり、High AI 妊婦はポリクローナルであった。

2-3. CMV 抗原特異的 CTL の scRNA-seq では、既往感染の妊婦 2 例では CMV 抗原特異的 CTL のクラスター分布と遺伝子発現パターンが互いに類似性が高かった。また、クラスター 3 として同定された CMV 抗原特異的 CTL 集団は、Low AI 妊婦から得た検体のみで検出され、このクラスター 3 では免疫寛容に深く関与する LAIR2 遺伝子が高発現であった。High AI 妊婦では、エフェクター T 細胞を誘導する JUN, FOS 遺伝子が高発現しているクラスター 6 の比率が高いことが特徴的であった。

【考察】

母体血清 CMV 特異的 IgM 抗体に CMV IgG-AI を併用した場合には、CMV 特異的 IgM 陽性単独の判断と比較して、先天感染ハイリスク集団を 4 分の 1 程度までしぼりこむことができた。そのため、CMV IgG-AI の導入は母体の初感染後に生じる先天感染のハイリスク群を抽出するための有用なアプローチと考えられた。ただし、CMV IgG-AI においても感染後の AI 値の上昇の個人差が大きく、感染から長い期間を経過しても Low AI が持続している例もあり、陽性的中率の面では血清学的検査で妊娠中の感染の確実な判断には課題が残る。

CMV 抗原認識 CTL および反応性 IFN γ 産生 CTL の CTL 全体に占める割合は、CMV 感染に関わる臨床背景と関係が深いことが示された。特に、Low AI 例では High AI 例よりも割合が高く、特に先天感染例では特に高値であったことから、感染時期および感染母体の先天感染発生リスクの推定のために、この CMV 特異的 CTL 集団に着目したアプローチが有用な可能性がある。更に、非妊娠女性では妊娠女性よりもこれらの CMV 反応性 CTL の比率が高かったことは、妊娠に伴う母体の抗ウイルス免疫の低下に関連した現象の可能性もある。加えて、観察された妊娠に伴う CMV 抗原認識 CTL の減少が、既往のあ

る妊婦において再感染や再活性化により先天性 CMV 感染症が発生する場合の要因となっているという仮説も考えられる。

ウイルス感染症に関する T 細胞受容体レパトア解析について、一般的には感染急性期にはポリクローナルパターンを呈して時間経過とともに抗ウイルス免疫性の強いいくつかの CTL に収束してオリゴクローナルパターンへ移行することが知られている。本研究では、CMV 抗原認識 CTL のクローナリティと感染時期を推定する臨床情報の間に明らかな関連を特定することができなかった。ただし、CMV-IgM 陽性 2 例の中で Low AI 妊婦ではポリクローナルパターン、High AI 妊婦ではオリゴクローナルパターンであったことは既存の知見と一致していた。

CMV 抗原認識 CTL のシングルセル解析では、感染に関する臨床情報とクラスター分布状態の間に関連性が確認され、CMV 抗原認識 CTL クラスター内で高発現の遺伝子内容から個々のクラスターを形成する CTL 細胞の特性を推定することができた。Low AI 妊婦に特徴的な存在が見られたクラスター 3 で高発現の LAIR2 遺伝子は免疫の抑制的な制御に関わる遺伝子で CTL の exhaustion マーカーとの報告もある。妊娠中の CMV 感染では CTL が抗原を認識して病原体排除する反応だけでなく感染細胞に対する免疫寛容の方向の反応が生じており、Low AI 妊婦において、感染後比較的早期から免疫寛容が誘導されるためにウイルスが排除できず感染が成立している可能性が示唆された。

一方で、クラスター 6 において高発現であった JUN, FOS 遺伝子はエフェクター T 細胞を誘導するとされており CTL の活性化を示す。このことはクラスター 6 が感染から時間経過後に High AI を示す症例で確認された結果に合理的であった。感染時期が古いにもかかわらず IgM 陽性が持続して CMV IgG-AI では高値を示す Persistent IgM の妊婦では、臨床的には IgG 陽性 IgM 陰性の既往感染パターンの妊婦と同等にみなされる。しかし、今回の結果からは、Persistent IgM 妊婦では、CMV 抗原認識 CTL の慢性的な活性化生じており、既往感染パターンの妊婦とは異なり持続的な IgM 陽性を導く何らかの免疫学的要因が存在する可能性が考えられた。

【結語】

本研究から、妊娠初期の血清学的検査において CMV 特異的抗体検査に CMV IgG-AI を組み合わせるアプローチは、CMV IgM 陽性例の中から先天感染の懸念がない集団を除外するために有用であった。一方で、陽性的中率を向上できるさらなる検査法開発の必要性が示唆された。CMV 抗原認識 CTL の比率の変化や、CTL 集団内の遺伝子発現パターンから母体の CMV 感染時期や持続感染の状態を反映した情報を得ることができることが示された。そのため、CMV 抗原認識 CTL の細胞特性に着目することで妊婦の CMV 感染状態を精密に把握する検査法開発につながる可能性がある。