

博士論文

論文題目 自然免疫に関わる遺伝子群の遺伝子多型と
先天性サイトメガロウイルス感染・感染症発症の相関

氏名 谷口 留美

目次

略語集	5
要旨	6
1. 序文	7
1-1. サイトメガロウイルス(CMV)について	7
1-2. 先天性 CMV 感染について	8
1-3. 新生児 CMV スクリーニング調査について	11
1-4. 先天性 CMV 感染・感染症の危険因子	12
1-5. Toll 様受容体(TLR)と CMV	13
1-6. ナチュラルキラー(natural killer (NK))細胞の標的細胞認識について	15
1-6-1. NK 細胞と活性化受容体 NKG2D	15
1-6-2. CMV の免疫逃避機構と NKG2D のリガンド MICA	18
1-7. 本研究の目的	19
2. 方法	20
2-1. 対象	20
2-2. 臨床評価	20
2-3. DNA サンプルの抽出	22
2-4. 一塩基多型(SNP)の選択	23
2-5. <i>TLR2</i> ・ <i>TLR4</i> ・ <i>TLR9</i> ・ <i>NKG2D</i> の SNP の解析	24
2-6. 塩基配列解析法	27
2-7. MICA の解析	28
2-8. SNP rs2255336 が AA 遺伝子型もしくは GG 遺伝子型の NKG2D の cDNA の作製	29
2-9. Halo タグ付き分泌型 MICA(Halo-MICA)の作製	29
2-10. 細胞培養	30
2-11. 培養細胞へのプラスミドの導入	30
2-12. Halo タグ付き分泌型 MICA の産生確認	31
2-13. 共培養	32

2-14. フローサイトメトリー	32
2-15. NKG2D の SNP による PI3K-Akt シグナル経路への影響の解析	34
2-15-1. 細胞刺激	34
2-15-2. 細胞溶解物の作製	35
2-15-3. 免疫沈降と SDS-PAGE サンプルの調製	35
2-15-4. ウェスタンブロッティング	35
2-16. 統計解析	36
2-17. 研究倫理	37
2-18. 研究内容の公表と共同研究者からの同意	38
3. 結果	39
3-1. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染または感染症の関係	39
3-1-1. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係	39
3-1-2. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症との関係	41
3-2. NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染・ 感染症の相関	45
3-2-1. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G) と先天性 CMV 感染または感染症の関係	45
3-2-1-1. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G) と先天性 CMV 感染の関係	45
3-2-1-2. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G) と先天性 CMV 感染症の関係	47
3-2-2. MICA 遺伝子のアレルと先天性 CMV 感染症との関係	48
3-2-3. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)により起こる NK 細胞機能への影響	51
3-2-3-1. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)により 起こる NKG2D への MICA の結合に対する影響	51
3-2-3-2. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)により 起こる PI3K-Akt シグナル経路への影響	52
4. 考察	54

4-1. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染・感染症との相関	54
4-2. NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染症の 相関	57
4-3. 今後の展望と課題	59
謝辞	61
引用文献	62

略語集

Akt	the serine/threonine kinase, 別名 PKB(protein kinase B)
cDNA	complementary DNA
CMV	cytomegalovirus
CT	computed tomography
DAP10	DNAX-activating protein of 10 kDa 〈NKG2D のアダプター分子〉
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FBS	fetal bovine serum
FGR	fetal growth retardation
Grb2	growth factor receptor-bound 2
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
IL	interleukin
IRF	interferon regulatory factor
JAK2	Janus kinase 2
MEK	MAPK(Mitogen-activated Protein Kinase)/ERK kinase
MHC	major histocompatibility complex: 主要組織適合遺伝子複合体
MICA	MHC(major histocompatibility complex) class I -related chain A 〈NKG2D のリガンドの一つ〉
MRI	magnetic resonance imaging
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK	natural killer (cell)
NKG2D	〈NK 細胞などに発現する活性化レセプターの一つ〉
PBS	phosphate buffered saline: リン酸緩衝生理食塩水
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS Poly-acrylamide gel electrophoresis
SNP	single nucleotide polymorphism: 一塩基多型
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
TLR	Toll-like receptor: Toll 様受容体
TNF	tumor necrosis factor
ULBP	UL16-binding protein 〈NKG2D のリガンドの一つ〉
VSD	ventricular septal defect: 心室中隔欠損症

要旨

CMV は先天性ウイルス感染の中で最多の原因ウイルスである。しかし、胎内感染や臨床経過に関わる危険因子は明らかでない。本研究では、87 人の先天性 CMV 感染児について、自然免疫に関わる Toll 様受容体(TLR)や NK 細胞受容体 NKG2D の一塩基多型 (SNP)、及び NKG2D のリガンド MICA の遺伝子アレルを調べ、*TLR2* や *NKG2D* の SNP と感染・感染症の相関が判明した。*NKG2D* の非同義置換 SNP について、MICA との結合やシグナル伝達への影響も解析したが、遺伝子型による有意差はなかった。これらの SNP の機能への影響はさらなる解析が必要だが、SNP が感染や臨床経過を推測する一助になり得る。

1. 序文[1]

1-1. サイトメガロウイルス(cytomegalovirus, CMV)について

ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科に属する DNA ウイルスの総称であり、潜伏感染、再活性化といった共通した生物学的特徴を持つ。ウイルス粒子は、内側からコア、カプシド、テグメント、エンベロープから成り、コアに二本鎖 DNA 分子のウイルスゲノムがある。エンベロープには、複数のウイルス糖蛋白質を含む。

ヒトを宿主とするヘルペスウイルスとして 8 種類が知られており、 α 、 β 、 γ の 3 種の亜科に分類される。CMV はそのうちのひとつで、ヒトヘルペスウイルス 5 とも呼ばれ、 β ヘルペスウイルス亜科に属している。 β ヘルペスウイルスは宿主域が狭く、培養細胞での増殖が遅いといった特徴を持つ。生体内では、リンパ球、マクロファージなどに潜伏感染を起こす。

CMV は、多くの場合、幼小児期に症状のない不顕性感染(自然感染)を成立させ、生涯宿主の体内に潜伏する。乳幼児の感染経路は唾液、尿、母乳が主である。その他、産道、輸血、性行為によっても CMV の感染は起こる。母乳感染や水平感染で初感染を受けたほとんどの乳幼児において、CMV 感染は不顕性であるが、初感染後数年にわたり感染者の尿及び唾液中にウイルスが排出される。尿中の CMV は常温で数日は安定に存在する。従って、保育園などで子供同士の密接な接触やウイルスを含む尿との接触により感染が成立する。

健常者における感染は疾病につながらないが、免疫抑制下の移植患者や human immunodeficiency virus (HIV)感染者においては再活性化し、肺炎、脳炎、網膜症などを含め重篤な病態を引き起こす。より深刻な問題は、妊婦の初感染

に伴う胎児への先天性感染である。

1-2. 先天性 CMV 感染について

風疹が制御され、HIV に対しては抗ウイルス療法行われるようになった先進国では、CMV は、最も多い先天性ウイルス感染の原因ウイルスとなっている [2]。

日本においては、従来、大半の人が幼児期に感染を受けている状態が続いていたが、核家族化・出産年齢の高齢化・少子化など社会の変化、生活習慣や衛生環境の変化により、現在日本での妊婦の CMV に対する抗体保有率は約 70% まで減少してきている (図 1) [3]。

抗体を持っていない 30%の妊婦のうち、0.5-1%が妊娠中に初感染を起こす [4]。感染経路は、兄弟など初感染を起こした子供の唾液や尿を介してが多い。動物モデルを用いた研究から胎盤が感染防御に一定の役割を果たすことが知られているものの [5]、母体が初感染を起こすと、14-52%で、胎盤の感染を介して胎児に感染が起こる (経胎盤感染) [6-8]。その一部は流産、死産となるが、10-15%が、肝脾腫、血小板減少、胎児発育不全(fetal growth restriction, FGR)、黄疸、肺炎などの症状がある顕性感染児として出生する(図 2, 3, 表 1)[8-10]。先天性感染で異常を起こす理由としては、胎児は獲得免疫が弱いこと、胎児の natural killer (NK)細胞による免疫応答が不十分であることなどが考えられる[11]。

一方、残りの 85-90%は出生時不顕性である [8]。しかし、出生時不顕性であっても、感音性難聴や発達遅滞のような遅発性の神経学的障害が起こることが

ある。具体的には、感音性難聴は出生時顕性感染児の 25-50%に、不顕性感染児の 7-15%に起こる[10, 12]。脳室帯及び脳室下帯の神経幹細胞・神経前駆体細胞の増殖・移動・分化により胎児期に大脳皮質が形成されるが、CMV は神経幹細胞・神経前駆体細胞に感染し、大脳皮質の正常な発達を阻害するため、神経学的障害が起こると考えられている[1]。しかしながら、出生時に症状が出る場合と遅発性に症状が出る場合の差が何によるのかの理由は明らかでない。

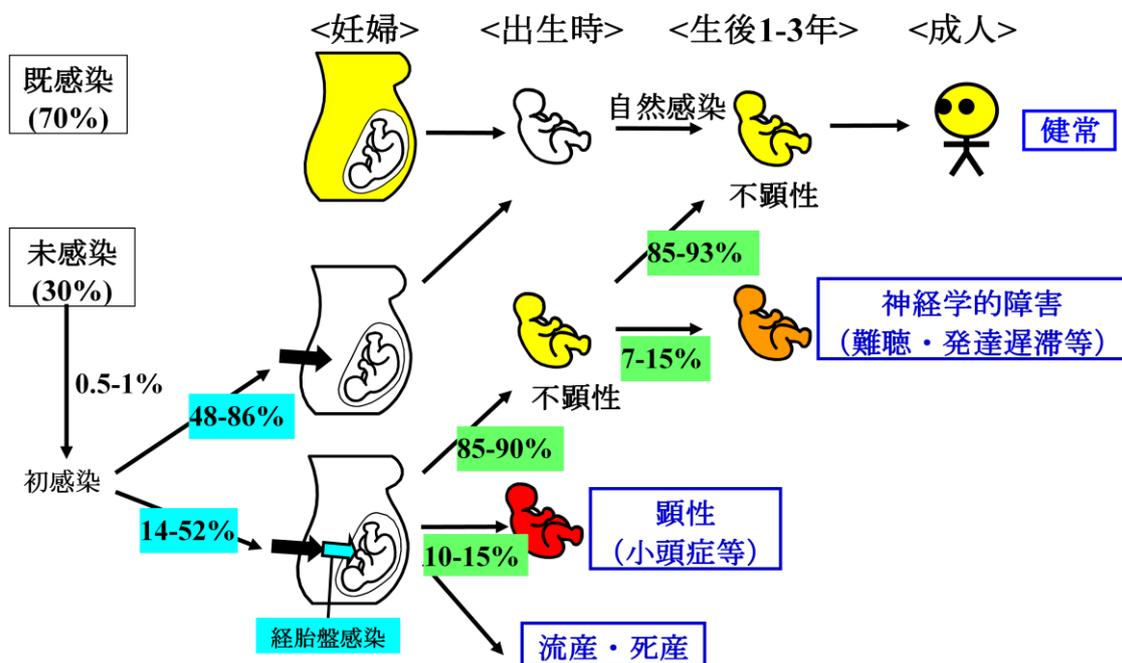


図 1 先天性 CMV 感染の概要

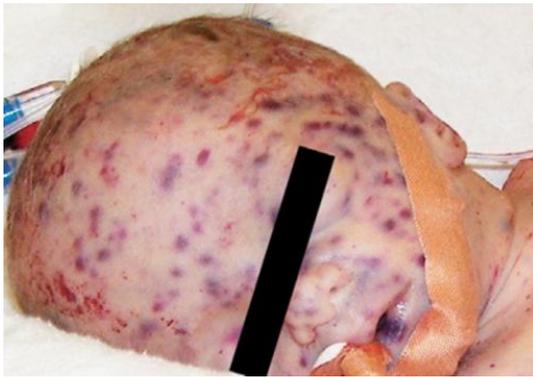


図2 生後5日死亡例の点状出血[9]



図3 奇形・脳内石灰化症例
(旭川医大 古谷野先生より提供)

表1 出生時顕性感染の症状
(米国先天性CMV感染症レジストリー786 患児情報[10])

症状	患者数 (%)
点状出血または紫斑	417 (54)
血小板減少症	392 (54)
肝腫大	360 (47)
脾腫	336 (44)
黄疸	272 (36)
周産期発育遅延	362 (47)
溶血性貧血	83 (13)
肺炎	77 (11)
脳内石灰化	288 (43)
小頭症	301 (40)
聴覚障害	213 (41)
脈絡網膜炎	67 (11)
てんかん	59 (8)
神経学的異常	197 (28)
ビリルビン値異常 (胆嚢障害)	274 (40)
ALT値異常 (肝臓障害)	175 (30)

1-3. 新生児 CMV スクリーニング調査について

2008 年以降、厚生労働省研究班として、国立感染症研究所を中心に全国 6 地域 25 施設において、先天性 CMV 感染及びその感染症の頻度を把握すること、難聴や発達遅滞に対し早期に介入することを目的に、新生児 CMV スクリーニング調査を行ってきた。

スクリーニングの方法としては、オムツに特殊濾紙を挟み、尿を浸み込ませ、その濾紙片を用いて、リアルタイム PCR (polymerase chain reaction)を行った。陰性の場合、1 ヶ月健診で両親に結果を伝え、陽性の場合、児に対しては、臨床症状の確認及び採血、採尿を施行し、ウイルス分離・株の同定、ウイルス量の定量をして、総合的に確定診断した。確定診断された場合は、聴力検査及び頭部 CT (computed tomography)または頭部 MRI(magnetic resonance imaging)を追加した(図 4)。

スクリーニング調査の結果、21272 人の新生児のうち 66 人(0.31%)が先天性 CMV 感染と確定診断され、その 30%に典型的な臨床症状もしくは頭部画像異常を認めた[13]。

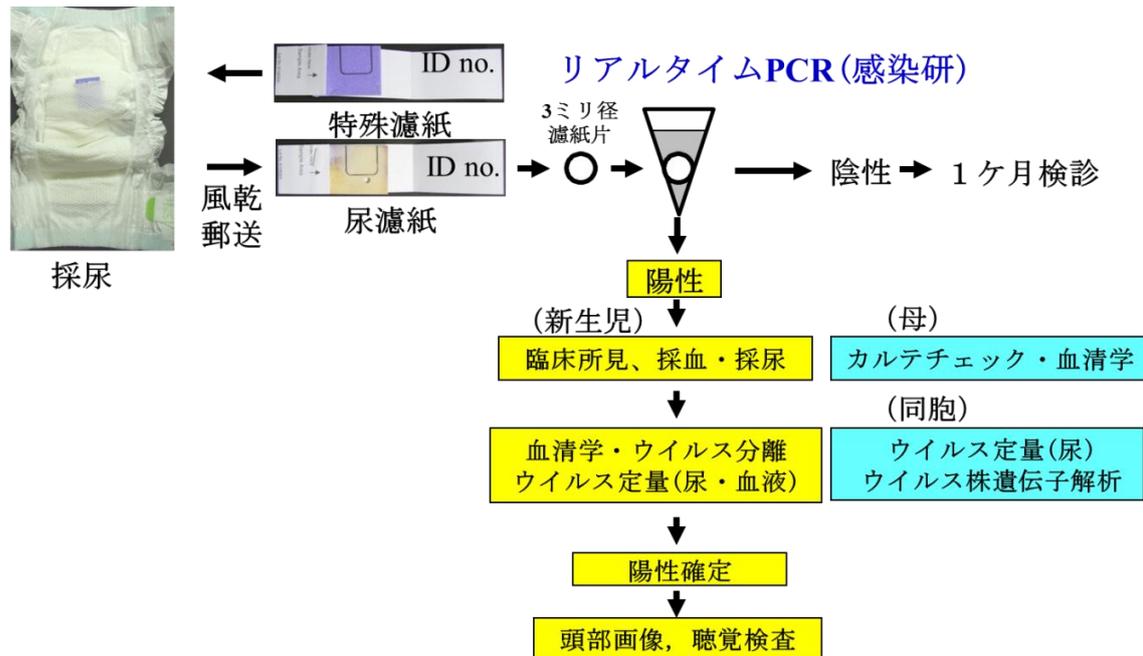


図4 新生児CMVスクリーニング調査概要

オムツに特殊濾紙を挟み、尿を浸み込ませ、その濾紙片を用いて、リアルタイムPCRを行った。陰性の場合、1ヶ月健診で両親に結果を伝え、陽性の場合、児に対しては、臨床症状の確認及び採血、採尿を施行し、ウイルス分離・株の同定、ウイルス量の定量をして、総合的に確定診断した。確定診断された場合は、聴力検査、頭部画像検査を追加した。

1-4. 先天性CMV感染・感染症の危険因子

先天性CMV感染や感染症は、CMVに感染した妊婦から生まれる全ての児に起こる訳ではなく、感染成立や感染症発症に関わるいくつかの危険因子がある。

感染成立や感染症発症に関わる危険因子には、大きく分けてウイルス側の因子と宿主側（母体及び胎児）の因子があるが、ウイルス側の因子としては、ウイルス量とウイルスの遺伝子型が考えられる。顕性感染の新生児では不顕性感染の新生児に比べ、血中のウイルス量が多いことが分かっており、ウイルス

量は危険因子となるが、ウイルスの遺伝子型は関係しない[14-17]。しかし、聴覚障害の発症については、血中ウイルス量との相関はないとの報告もある[16]。

宿主側の因子としては、妊婦の CMV-IgG avidity が関係していることが分かっている[18, 19]。妊婦の CMV-IgG avidity が低い場合、妊婦が CMV の初感染を起こしてから 4 カ月以内である可能性が高く、胎児への感染が危惧される。臨床的な指標としては、胎児超音波検査での FGR やその他の特徴的な所見の存在、小頭症や脳内石灰化含め頭部 CT 画像異常の存在、播種性血管内凝固の発症が死亡や重篤な後遺症といった予後不良因子と関連しているが、中でも FGR は有意に予後不良因子となっている[20]。免疫グロブリンの使用も予後不良因子と報告されているが[20]、同等の重症度の感染児に対して、免疫グロブリンの使用と不使用を比較していないため、免疫グロブリンの使用が求められた患者が重篤であった可能性は否定できない。また、主に不顕性の先天性 CMV 感染児を対象にした研究で、コントロールに比べ、CD8 陽性 T 細胞の分化や増殖が多く見られたとの報告があり、CD8 陽性 T 細胞も先天性 CMV 感染や感染症に関わっている可能性がある[21]。しかし、胎児の自然免疫についてはまだあまり研究がされていない[22]。胎児や新生児は獲得免疫が弱いため、自然免疫が重要な役割を果たしている可能性がある[21, 23]。

1-5. Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)と CMV

Toll 様受容体(TLR)は、自然免疫に関わる膜タンパク受容体である。免疫細胞を含めあらゆる細胞に発現し、病原体共通パターン分子に対するパターン認

識受容体として、転写因子である interferon regulatory factor (IRF)-3、IRF-5、IRF-7、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)を活性化し、サイトカインなどの生体防御遺伝子群を発現させる(図 5)[24]。

CMV に関係する TLR として、TLR2、TLR4、TLR9 が報告されている。TLR2 については、CMV の糖蛋白 B や糖蛋白 H が TLR2 のシグナル伝達系を刺激し、NF- κ B の活性化と炎症性サイトカインの産生が起こると報告されている[25, 26]。TLR4 は CMV の認識には直接関わっていないが、TLR4 のリガンドであるリポ多糖によって刺激された樹状細胞が CMV 特異的 CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞の応答を高めると言われている[27]。TLR9 は CMV の感染制御に極めて重要である。TLR9 のリガンドであるシトシン-リン酸-グアニン-オリゴデオキシヌクレオチドに不応となる TLR9 遺伝子の変異を持ったマウスでは、CMV 感染が起こりやすくなり、感染が誘発するインターフェロン α/β の産生や NK 活性も低下する[28, 29]。

近年、TLR 遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)が、様々なウイルスに対する、感受性や感染後の臨床経過に関係するという報告が増えている[30, 31]。CMV に関しては、肝臓移植後のウイルス量の増加や CMV 感染症の発症に TLR2 遺伝子の SNP rs5743708 (Arg753Gln)が関係しているという報告や、同種幹細胞移植患者のウイルス性肺炎の発症に TLR9 遺伝子の SNP rs5743836 (T-1237C)が関係しているという報告がある[32, 33]。しかし、これらの SNP は日本人に存在しないため、日本人に関しては CMV と TLR 遺伝子の SNP の関連性を調べた報告はない。

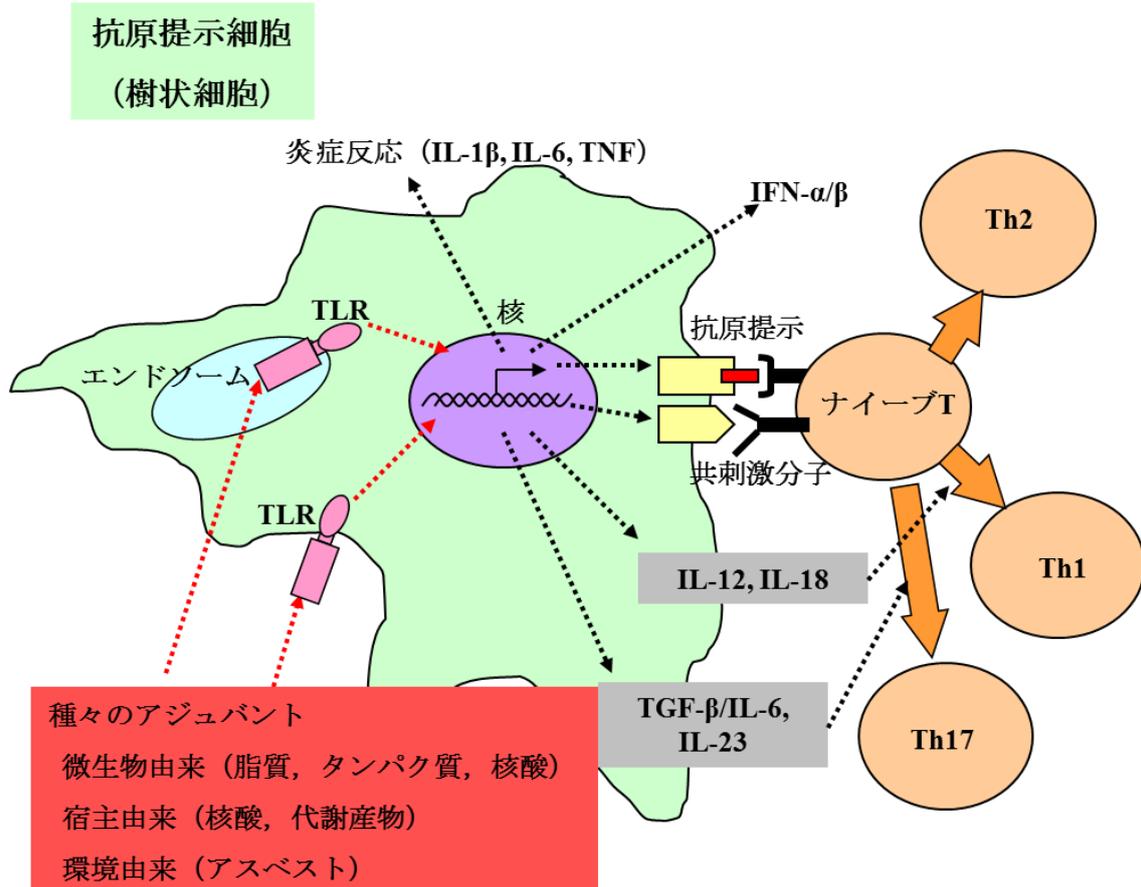


図5 Toll様受容体(TLR)の働き

TLRは自然免疫に関わる膜タンパク受容体で、免疫細胞を含めあらゆる細胞に発現し、病原体共通パターン分子を認識して、転写因子である IRF-3、IRF-5、IRF-7、NF- κ B を活性化し、サイトカインなどの生体防御遺伝子群を発現させる。

1-6. ナチュラルキラー(natural killer, NK)細胞の標的細胞認識について

1-6-1. NK 細胞と活性化受容体 NKG2D

NK 細胞は、ウイルス感染や腫瘍化などにより主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス I 分子の発現が低下した異常細胞を認識して細胞傷害活性を示すリンパ球の一つで、CMV 感染の制御に重要な役割を果たしていることが知られている[34, 35]。NK 細胞の細胞傷害活性は、活性

化及び抑制化受容体のシグナルのバランスによって制御される(図 6)[36]。

NKG2D は NK 細胞受容体の中でも重要な活性化受容体であり、MHC class I-related chains (MIC) A (MICA)、MICB、UL16-binding protein (ULBP) をリガンドとし[37-40]、細胞膜上でアダプター分子 DNAX-activating protein of 10 kDa (DAP10) と会合して、全ての抑制化シグナルを抑え活性化シグナルを伝達する[36, 41]。DAP10 に Phosphoinositide 3 (PI3) キナーゼ (PI3K) の p85 と Grb2 という分子が結合するが、結合部位が重なっているため、同時に両方は結合できない(図 7)[36]。さらに PI3K と Grb2 どちらかの結合が阻害されると、正常な細胞傷害活性は起こらない[36]。ヒト NK 細胞培養系においては、NKG2D リガンドの一つである ULBP により NKG2D が刺激されると、Akt、MEK1/2、ERK、JAK2、STAT5 のリン酸化が起こることが分かっている[42]。しかし、JAK2→STAT5 が PI3K を介した経路と Grb2 を介した経路のどちらで起こるのか、あるいはどちらでも起こるのか、Grb2 を介した経路も MEK1/2→ERK のリン酸化に関わるのか、PI3K の活性化がどのような機序でカルシウムの流入を起こすのかなど、NKG2D が DAP10 を介して伝達するシグナルについては分かっていない部分も多い[36, 43]。

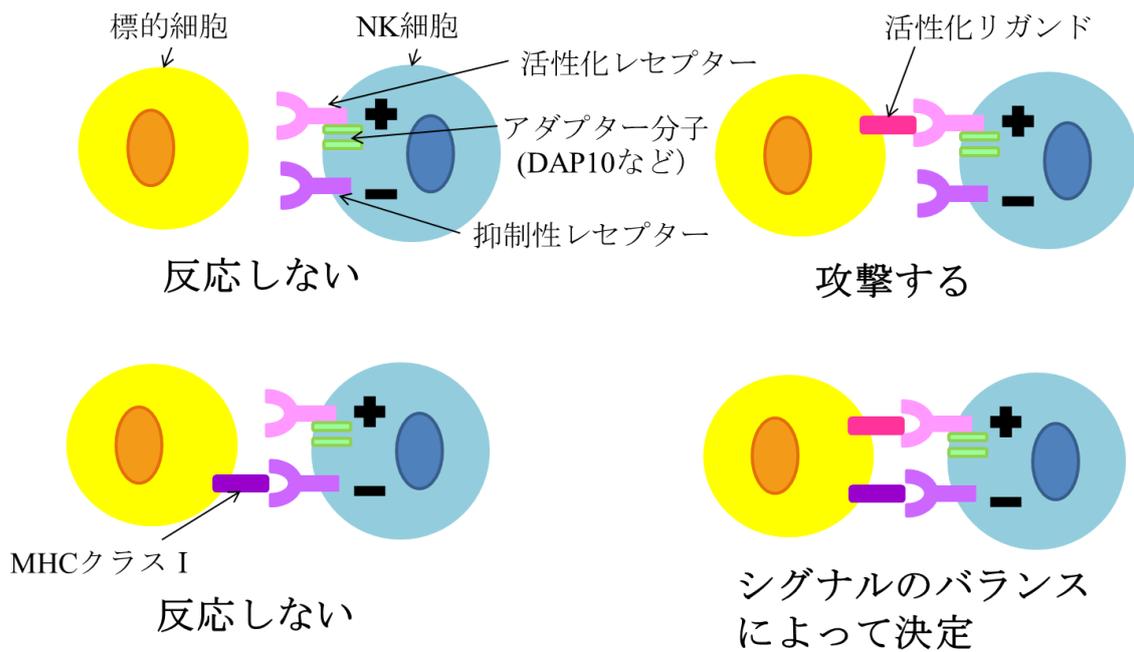


図6 NK細胞の標的細胞認識機構

NK細胞は、ウイルス感染や腫瘍化などによりMHCクラスI分子の発現が低下した異常細胞を認識して細胞傷害活性を示す。活性化及び抑制化受容体を有し、それらのシグナルのバランスによって細胞傷害活性が制御される。

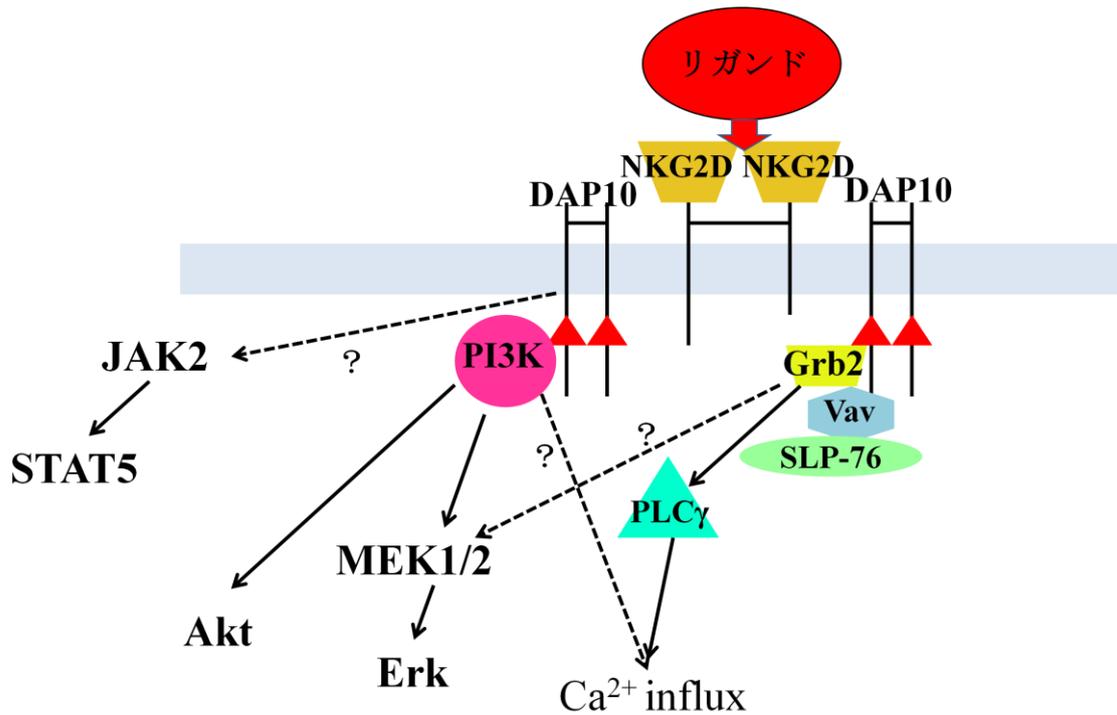


図7 NKG2D のシグナル伝達

NKG2D は細胞膜上でアダプター分子 DAP10 と会合し、活性化シグナルを伝える。DAP10 には PI3K と Grb2 が結合する。(Upshaw 2006[43]を改変)

1-6-2. CMV の免疫逃避機構と NKG2D のリガンド MICA

CMV は NK 細胞からの攻撃を逃れるいくつかの機構を持つ。具体的には、以下である：①CMV 感染細胞において、抑制化 NK 受容体 NKG2A に認識されるヒト白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA) -E の発現を誘導する。②ウイルス MHC クラス I 様分子により攻撃を回避する。③活性化リガンドの発現を抑制する[44]。活性化リガンドの発現抑制について、具体的には、CMV 感染細胞では MICA の細胞表面発現が起こり、NK 細胞上の NKG2D が刺激される。一方で、CMV の UL142 は MICA の発現を抑制し、NKG2D からのシグナルを介した NK

細胞の細胞傷害を阻止しようとする。しかし、MICA のアレル*008 では、MICA の細胞表面発現が抑制されない[45]。

1-7. 本研究の目的

本研究では、CMV の先天性感染における自然免疫の重要性に注目した。先天性 CMV 感染児について、CMV に関係する TLR2、TLR4、TLR9、NKG2D の SNP、及び MICA の遺伝子アレルを調べ、遺伝子多型と先天性 CMV 感染や感染症との相関を検討することを目的とした。

2. 方法

2-1. 対象

本研究は、2006年12月から2010年7月に下記の方法で診断された先天性CMV感染児87人を対象として行った。その内訳は、①全国スクリーニング調査でCMV感染と確定診断された66人のうち、血液検体が利用できた児48人(9人は出生時顕性、39人は不顕性であり、後者のうち4人に遅発症状を認めた) (「1-3. 新生児CMVスクリーニング調査について」の項を参照)、②発達遅滞または難聴を主訴とし、乾燥臍帯を用いたCMV-PCRにて後方視的に先天性CMV感染と確定診断された児21人(21人中15人は出生時不顕性であった)、③出生前または出生時に先天性CMV感染が疑われ、生後3週間以内の尿検体のPCRまたはウイルス分離によってCMVが同定され、先天性CMV感染と確定診断された児18人(18人中3人は出生時不顕性であり、そのうち2人に遅発症状を認めた)である。

倫理審査の上で健常児を解析できなかつたため、コントロールとして、SNPのrs番号、遺伝子型を解析した人種・人数、遺伝子型の頻度が掲載されているデータベース(the National Center for Biotechnology Information dbSNP and HapMap databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/))の一般日本人の情報を利用した。

2-2. 臨床評価(図8)

全対象者の臨床症状、在胎週数、出生時体重、聴力検査及び頭部画像検査の結果の情報はカルテから得た。出生時に診断された児のフォローアップは外

来にておこない、フォローアップ期間は 5.25 ± 1.08 年(3.9-7.6 年)であった。聴力検査は聴性脳幹反応もしくは聴性定常反応を用いておこない、頭部画像検査は CT もしくは MRI を用いた。全対象者に対し、聴力検査及び頭部画像検査をおこなった。

対象は、大きく、①出生時顕性か、不顕性か、②遅発症状（感音性難聴・発達遅滞）の有無、③遅発症状を含めた症状の有無で分類した。「出生時顕性」児（D 群、図 8）は、小頭症、脈絡網膜炎、感音性難聴、あるいは点状出血・肝脾腫・黄疸のうち複数を含むものなど、出生時に先天性 CMV 感染に特徴的な臨床所見を持つ児と定義した。FGR 単独や不整脈・心室中隔欠損症(ventricular septal defect, VSD)といった非特異的な所見のみの児は、D 群から除外した。出生時顕性と不顕性での比較において統計学的に評価するため、D 群には出生時に確定診断された児だけでなく、後方視的に診断された児も含めた。「CMV 感染に係る何らかの臨床的特徴あり」の群(H 群)には、①「出生時顕性」児(D 群)、②脳内石灰化、水頭症、白質異常など CMV 感染関連の頭部画像異常がある児、③遅発症状（感音性難聴・発達遅滞）が出た児を入れた。「CMV 感染に係る臨床的特徴なし」の児(G 群)は、フォローアップ期間内に H 群に分類されなかった児と定義した。全く何の症状もなかった児に加え、FGR のみの 4 例、VSD のみの 1 例、不整脈のみの 2 例が G 群に分類された。

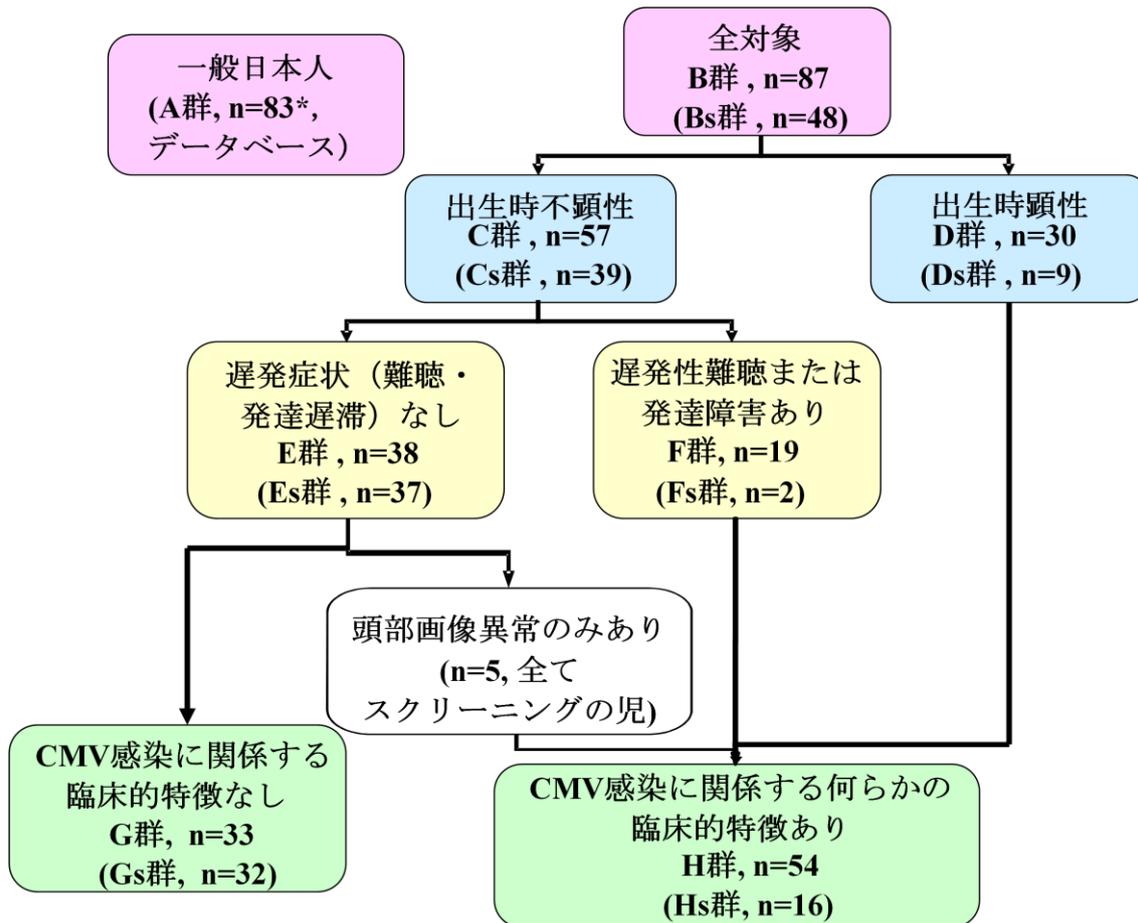


図8 対象の分類

SNP やアレルと先天性 CMV 感染・感染症の相関を解析するため、対象を図に示すような群に分類した。群名は表でも使用する。スクリーニング調査で診断された児の群は「Bs 群」など群名に小文字の「s」を付けた。

*TLR2 の SNP rs3804100 のデータベースにおける人数を記載した。他の SNP における人数は、本文中に記載した。

2-3. DNA サンプルの抽出

先天性感染児の末梢血単核球または感染児の自宅で保管してあった乾燥臍帯から、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)または Maxwell 16 DNA Purification Kit (Promega)を用いて DNA の抽出をおこなった[46]。抽出した DNA の質・定量は、ヒトアルブミン遺伝子を標的とした定量 PCR を実施し、末梢血単核球の細

胞数または乾燥臍帯の乾重量から想定されるコピー数との一致で確認した。

2-4. SNP の選択

一般日本人（A 群、図 8、TLR2・TLR9・NKG2D 遺伝子は n=83-86、TLR4 遺伝子は n=42、）の SNP の情報は、「2-1. 対象」の項に記載したデータベースより得た。

TLR 遺伝子の SNP の選択は下記の 2 つの条件を両方満たすものとした：① TLR2、TLR4、TLR9 遺伝子上に存在し、「2-1. 対象」の項に記載したデータベース上一般日本人でマイナー遺伝子型が 5%以上（対象の人数から統計解析が可能と考えられる割合）である。②ウイルス感染症の重篤度やウイルス感染の罹患に関わることが報告されている[47-51]。その結果、①を満たす SNP は、TLR2 遺伝子では 5 つ、TLR4 遺伝子では 9 つ、TLR9 遺伝子では 4 つであり、全てイントロン、非翻訳領域に存在するか、翻訳領域中の同義置換 SNP であった。この中で②を満たす、TLR2 遺伝子上の SNP rs1898830 (イントロン 1)、rs3804100 (エクソン 3、同義置換)、TLR4 遺伝子上の SNP rs11536889 (非翻訳領域)、TLR9 遺伝子上の SNP rs352139 (イントロン 1)、rs352140 (エクソン 2、同義置換)、計 5 つを TLR 遺伝子の解析 SNP として最終的に選択した。

NKG2D 遺伝子の SNP の選択は下記の 2 つの条件を満たすものとした：① データベース上一般日本人で SNP が存在する、②非同義置換 SNP である。その結果、A から G に置換することにより、72 位のアミノ酸が Thr から Ala に置換する SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G)を解析した。

2-5. *TLR2*・*TLR4*・*TLR9*・*NKG2D* の SNP の解析

SNP の解析は、TaqMan allelic discrimination 法にておこなった。原理は以下の通りである (図 9)。リアルタイム PCR のプローブを 2 種類用意し、各プローブに多型に対応する一塩基配列を含ませる。各プローブには消光物質と異なった 2 つの蛍光色素が標識されているが、両方がある状態では、蛍光は検出されない。プライマー伸長反応が起こると、蛍光色素が遊離し、消光物質の影響がなくなるため、蛍光を発する。アニーリング温度の差により、特異的配列のプローブの方がゲノム DNA に結合しやすいため、違う蛍光色素が発光し、どちらの型かが識別できる。図 10 に解析例を示した。縦軸、横軸はそれぞれのアレルのコピー数を反映する。青とピンクのマークはメジャーアレル・マイナーアレルの同型接合のコントロールで、それぞれ反応当りのコピー数が 10^3 、 10^4 、 10^5 になっており、理想的にはこれらが直線状に並ぶ。異型接合の場合はメジャーアレルとマイナーアレルの同型接合の間に出てくるため、サンプルの遺伝子型を決定することができる。

プローブとプライマーは TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) のものを使用した。プローブの塩基配列は以下の通りである (多型の部位は[]で示した): *TLR2* の rs1898830→ATAGTAAAATAAATCCAGAGAAATC [A/G] GAACAGGGGAAATAATAATATAAGA、*TLR2* の rs3804100→ACTTATCCAG CACACGAATACACAG[C/T]GTAACAGGCTGCATTCCCAAGACAC、*TLR4* の rs11536889→ATGCTCCTTGACCACATTTTGGGAA[C/G]AGTGGATGTTATCA TTGAGAAAACA、*TLR9* の rs352139→TGTGTGAGTGGCCGGCCCCCAGCTC [C/T]ACCTCCACCCACTCCACTTCATGGG、*TLR9* の rs352140→TTTAGGAATA

CAGCACTCCATATTG[C/T]TAC CATAATAATGAAACGGATTCCC、*NKG2D* の rs2255336→TTTAGGAATACAGCACTCCATATTG[C/T]TACCATAATAATGAAAC GGATTCCC (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=ABGKeywordSearch>)。プライマーの塩基配列は、非公表となっていた。

サーマルサイクリングの条件は、50°C2 分間、95°C10 分間、92°C15 秒間の後 60°C1 分間を 40 回とした。

遺伝子型決定の正確性はコントロールプラスミドで確認した。コントロールプラスミドは以下のように作製した。該当 SNP を含んだ 0.8-1.3kb の DNA 断片を PCR にて増幅させ、QIAEX II (Qiagen)を用いて精製した後、pBluescript SK II (+)プラスミドベクターに組み込み、クローニングした。SNP を含んだコントロールプラスミドは、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、点変異を含むプライマーからの DNA 伸長により作製した。メジャーアレル、マイナーアレルを含んだコントロールプラスミドについて、その塩基配列を確認した(「2-6. 塩基配列解析法」の項を参照)。

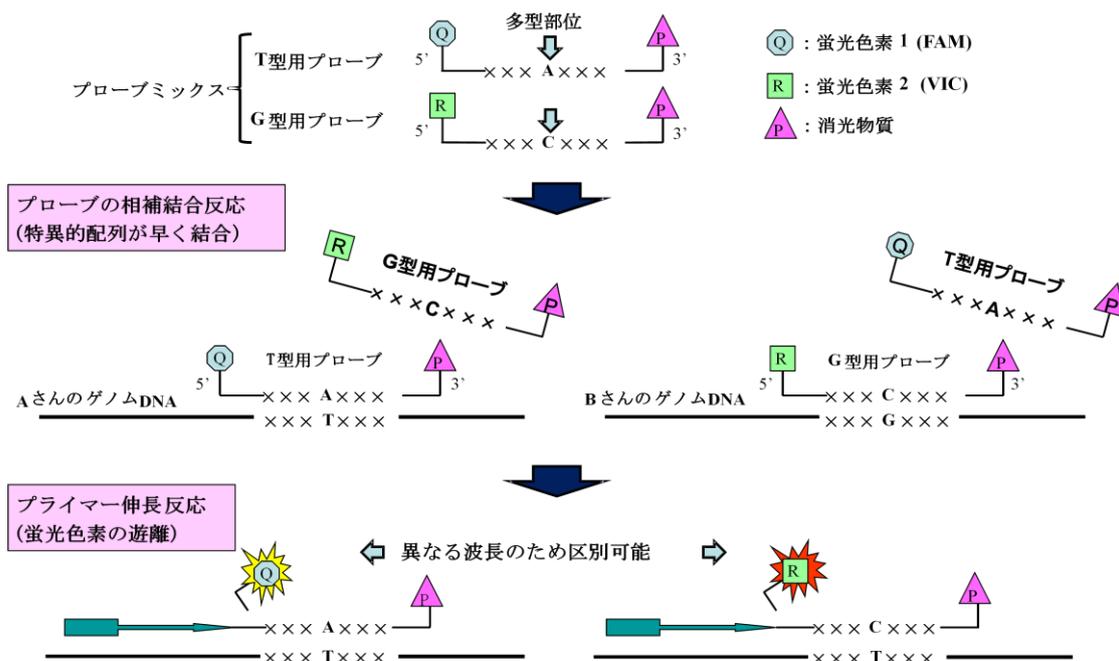


図9 TaqMan allelic discrimination 法による SNP 解析

原理としては、リアルタイム PCR のプローブを 2 種類用意し、各プローブに多型に対応する一塩基配列を含ませる。各プローブには消光物質と異なった 2 つの蛍光色素が標識されているが、両方がある状態では、蛍光は検出されない。プライマー伸長反応が起こると、蛍光色素が遊離し、消光物質の影響がなくなるため、蛍光を発する。アニーリング温度の差により、特異的配列のプローブの方がゲノム DNA に結合しやすいため、鋳型配列に応じて違う蛍光色素が発光し、どちらの型かが認識できる。

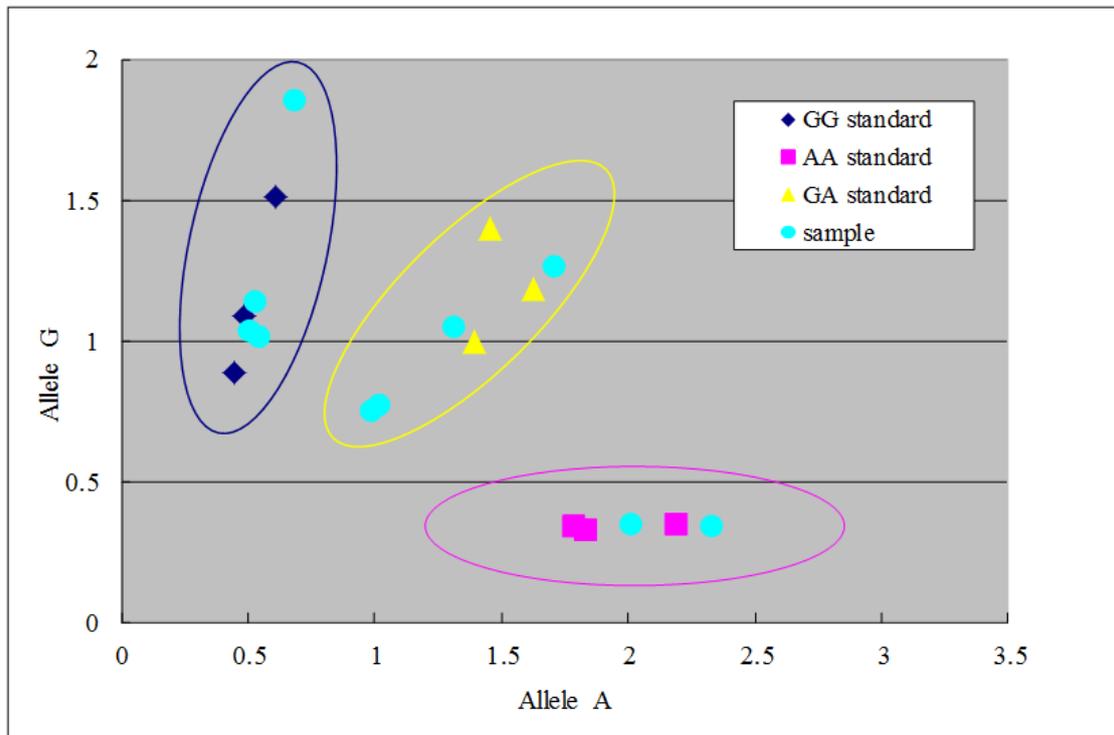


図 10 TaqMan allelic discrimination 法の SNP 解析例

縦軸、横軸はそれぞれのアレルのコピー数の相対値を反映する。青とピンクのマークはメジャーアレル・マイナーアレルの同型接合のコントロールで、それぞれコピー数が 10^3 、 10^4 、 10^5 になっており、理想的にはこれらが直線状に並ぶ。異型接合の場合はメジャーアレルとマイナーアレルの同型接合の間に出てくるため、サンプルの遺伝子型を決定することができる。

2-6. 塩基配列解析法

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)に付属のバッファーとプレミックス、解析したい領域を増幅するためのプライマーを解析する DNA に加え、PCR 反応液を調整した。プライマーには、クローニング領域の外側に当たるベクター配列、5'-TCACACAGG AAACAGCTATGAC-3'及び 5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'を用いた。96°C5 分間、96°C30 秒間→50°C1 分間→60°C4 分間を 25 回のサーマルサイクリングで解析領域を増幅させた後、サンプルを精製し、ABI PRISM3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

で塩基配列を解析した。

2-7. MICA の解析

日本人に存在する MICA のアレルは*002、*004、*007、*008、*009、*010、*012、*019 であり、エクソン 2 及び 3 の一部を解析することでアレル決定できる[52, 53]。そのため、エクソン 2 及び 3 の一部を Nested PCR にて増幅後 DNA 断片の調製を行い、塩基配列解析することでアレルを決定した（「2-6. 塩基配列解析法」の項参照）。エクソン 2 の DNA 断片調製のための PCR 用プライマーには、5'-GCACCTGGCCTACAAGTTTGC-3'及び 5'-ATTCCTCACCCCCAGCCTG-3'を、Nested PCR 用プライマーには、5'GTTCTTGTCCTTTGCCCGTGT-3'及び 5'-CTGGAAAAGGCCTCTCCAGTC-3'を、エクソン 3 の DNA 断片調製のための PCR 用プライマーには、5'-AGGAGGGCCAGGGAGGCATAC-3'及び 5'-AGGGAGGGTTTCCCTGGACACAT-3'を、Nested PCR 用プライマーには、5'-GGTGATGGGTTCGGGAATGG-3'及び 5'-GAGGTGAGGCAACTCTAGCAG-3'を用いた。PCR 条件は、94°C5 分間の後、94°C45 秒間、65°C45 秒間、72°C {0.12 × 標的配列の塩基数} 秒間を 45 回、72°C10 分間とした。エクソン 2 の塩基配列解析用プライマーには、5'-GTTCTTGTCCTTTGCCCGTGT-3'及び 5'-CTGGAAAAGGCCTCTCCAGTC-3'を、エクソン 3 の塩基配列解析用プライマーには、5'-GGTGATGGGTTCGGGAATGG-3'及び 5'-CTCTAGCAGAATTGGAGGGAGAGG-3'を用いた。

2-8. SNP rs2255336 が AA 遺伝子型もしくは GG 遺伝子型の NKG2D の cDNA の作製

NKG2D の cDNA (商品番号 : SC322611)は ORIGENE 社より購入した。購入した cDNA は、GG 遺伝子型だった (http://www.origene.com/human_cdna/NM_007360/SC322611/KLRK1.aspx)。SNP rs2255336 が AA 遺伝子型の NKG2D cDNA プラスミドは、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、点変異を含むプライマーからの DNA 伸長により作製した。塩基配列は、ORIGENE 社より購入した NKG2D の cDNA に付属していたプライマーを用いて確認した(「2-6. 塩基配列解析法」)。プライマーの塩基配列は非公表となっていた。

2-9. Halo タグ付き分泌型 MICA(Halo-MICA)の作製

日本人に最も多いアレルである*008 の MICA の cDNA(商品番号:SC328538)は ORIGENE 社より購入した[52]。MICA の cDNA をテンプレートとして、PCR を用い、分泌型 MICA を増幅させた。プライマーは、5'-GGGGTACCACCATGGGGCTGGGCCCCGGTC-3'及び 5'-CGGGATCCTTTCCCAGAGGGCACAGGGTGAG-3'を用いた[54]。

一方、pH6HTC His₆HaloTag[®]T7 Vector (Promega)の Halo タグを含む部分を 5'-CGGGATCCGAAATCGGTACTGGCTTTCCATTCG-3'及び 5'-ATTGCGGCCGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGAC-3'をプライマーとして用い、PCR で増幅させた。PCR 産物を BamHI と NotI で切断し、同酵素で切断し

た pcDNA3 ベクターに導入した(pcDNA-Halo)。

分泌型 MICA の PCR 産物を制限酵素 KpnI、BamHI で切断した後、同酵素で切断した pcDNA-Halo に導入して、Halo タグ付き分泌型 MICA (Halo-MICA) を作製した。

2-10. 細胞培養

本研究ではヒト胎児腎細胞 (293T 細胞、David W. Russell (ワシントン大学) より提供)を使用した[55]。培養液には、10%ウシ胎児血清 (FBS) (Hyclone)とペニシリン-ストレプトマイシン(ペニシリン 10000 U/ml, ストレプトマイシン 10000 μ g/ml) (GIBCO)を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO)を使用した。細胞数は、6 穴プレートの場合は 1 穴あたり 8.0×10^5 個/well、24 穴プレートの場合は 1.0×10^5 個/well となるように調整し細胞を播いた。

2-11. 培養細胞へのプラスミドの導入

NKG2D の cDNA プラスミド、DAP10 の cDNA プラスミド (ORIGENE、商品番号 : SC321835)、Halo-MICA のプラスミドはリン酸カルシウム法を用いて培養細胞に導入した。同系列の実験の場合、コントロール DNA である pcDNA3 ベクターを用いて導入する DNA が等量となるように調整した。例えば、DAP10 の有無で NKG2D の細胞表面発現が変わるか解析する場合、DAP10 の cDNA を導入しないプレートには、導入するプレートに加える DAP10 の cDNA と等量の

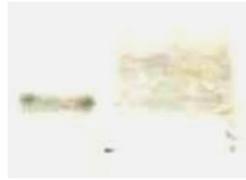
pcDNA3 ベクターを加えた。

2-12. Halo タグ付き分泌型 MICA の産生確認

Halo-MICA 蛋白産生確認のため、24 穴プレートに 293T 細胞を播き、3 時間培養後、1 μg /well の Halo-MICA のプラスミド DNA を導入した。遺伝子導入から 24 時間後に培養液で 1000 倍希釈した HaloTag[®] TMRDirect[™] Ligand (Promega) を添加し、37°C で一晩培養した。培養上清は、2-mercaptoethanol (最終濃度 5%) を添加した 2×Leammler 溶液(0.1 M Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、20% glycerol、0.2% bromophenol blue)を加え、電気泳動サンプルとした。培養細胞は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)で洗浄後、プレートに 2-mercaptoethanol (最終濃度 5%)を添加した 2×Leammler 溶液を加え、セルスクレイパーで回収し、氷中で 20 秒間 3 回超音波処理した。溶解物を 4°C で 10 分間 14000×g で遠心し、細胞沈殿物を除去し、電気泳動サンプルとした。

9%ポリアクリルアミドゲル(9% acrylamide、375 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS、0.1% ammonium persulfate、0.1% tetramethylethylenediamine)を作製し、細胞上清及び培養細胞の電気泳動サンプルを泳動バッファー(25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS)の中で、100 V 定電圧の条件で 1-2 時間電気泳動した。

電気泳動後のゲルを、532 nm レーザー及び 580/30 バンドパス発光フィルターを用いた Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare)、fluorescence モードでスキャンした。HaloTag[®] TMRDirect[™] Ligand の発光を検出することで、培養細胞サンプル及び細胞上清サンプルでの Halo-MICA 蛋白の産生を確認した (図 11)。



細胞 上清

図 11 Halo-MICA 蛋白の産生確認

Halo-MICA の DNA を導入した 293T 細胞に HaloTag[®] TMRDirect[™] Ligand を添加、培養することで、Halo-MICA 蛋白を蛍光標識した。培養細胞の溶解物及び培養上清のサンプルを電気泳動し、泳動後のゲルを Typhoon FLA 7000 を用いて蛍光イメージング分析することで、Halo-MICA 蛋白の産生を確認した。

2-13. 共培養

NKG2D に MICA を結合させ、細胞刺激を与えるための方法として、共培養を用いた。Halo-MICA を発現した 293T 細胞を培養プレートからはがし、遠心分離した後、上清を吸引し、細胞を培養液で再懸濁した。NKG2D と DAP10 を発現した細胞の培養プレートを PBS で洗浄後、プレートに Halo-MICA を発現した細胞の懸濁液を加えた。培養方法は、実験により異なるため、「2-13. フローサイトメトリー」及び「2-14-1. 細胞刺激」の項に記載した。

2-14. フローサイトメトリー(図 12)

NKG2D 遺伝子の SNP による NKG2D と MICA の結合の差を解析するため、フローサイトメトリーを行った。

24 穴プレートに 293T 細胞を播き、3 時間培養後、0.5 μg /well の NKG2D の

cDNA プラスミド(SNP rs2255336 が AA 遺伝子型もしくは GG 遺伝子型)及び 0.5 μg の DAP10 の cDNA プラスミドを導入した。別の 24 穴プレートに播いた 293T 細胞には、3 時間培養後、1 μg /well の Halo-MICA の DNA プラスミドを導入した。遺伝子導入から 24 時間後に Halo-MICA を発現した細胞を NKG2D と DAP10 を発現した細胞と共培養し、1000 倍希釈した HaloTag[®] TMRDirect[™] Ligand を培養液に加えた。共培養は、Halo-MICA を発現した細胞を培養プレートからはがし、遠心分離した後、上清を吸引し、細胞を 24 時間後、培養細胞をセルスクレイパーで回収し、10 μg の anti-human NKG2D-Alexa Fluor[®] 488 (R&D systems)を加え、室温で 30 分放置した。その後、細胞を洗浄し、 $0.5\text{-}1 \times 10^6$ 個/ml になるよう再懸濁し、Guava EasyCyte Mini (Millipore)でソーティングした。前述の 2 色の蛍光色素を用いて、細胞数計測を行い、解析した。

尚、293T 細胞に NKG2D が発現していないことは、anti-human NKG2D-Alexa Fluor[®] 488 を用いてフローサイトメトリーを行い、遺伝子導入を行わなかった 293T 細胞や DAP10 の cDNA のみを導入した 293T 細胞をソーティングした場合に陽性細胞が検出されないことで確認した。293T 細胞に DAP10 が発現していないことは、anti-human NKG2D-Alexa Fluor[®] 488 を用いてフローサイトメトリーを行い、NKG2D の cDNA と DAP10 の cDNA を導入した 293T 細胞をソーティングした場合には陽性細胞が検出されるが、NKG2D の cDNA のみを遺伝子導入した 293T 細胞をソーティングした場合には陽性細胞が検出されないことで確認した。

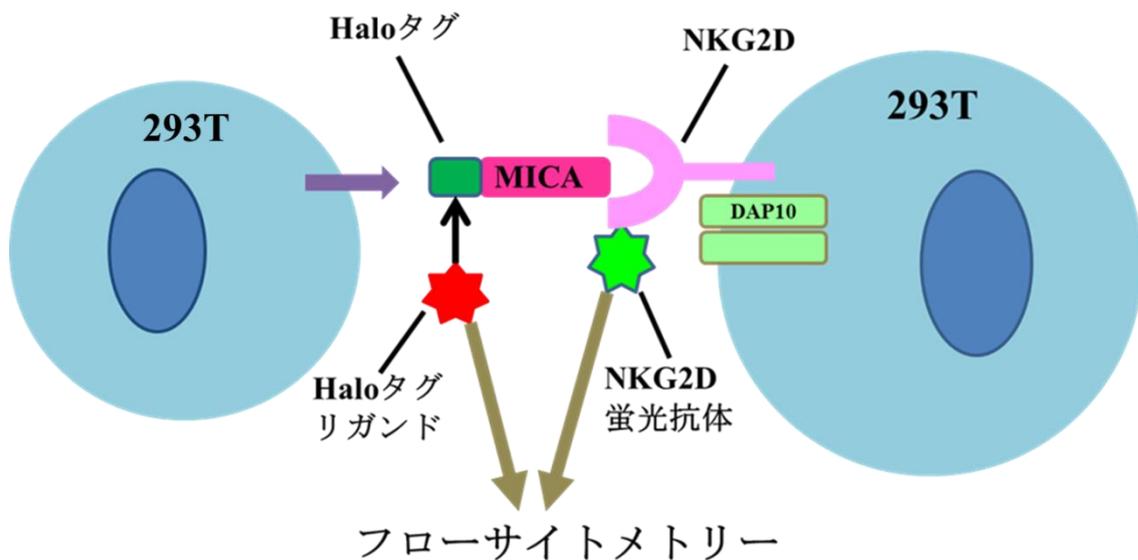


図 12 フローサイトメトリーの概略図
 蛍光リガンドで標識した分泌型 MICA を NKG2D と DAP10 を発現させた 293T 細胞に加え、フローサイトメトリーを行った。

2-15. NKG2D の SNP による PI3K-Akt シグナル経路への影響の解析

2-15-1. 細胞刺激

6 穴プレートに 293T 細胞を播き、3 時間培養後、2 $\mu\text{g}/\text{well}$ の NKG2D の cDNA (SNP rs2255336 が AA 遺伝子型もしくは GG 遺伝子型) 及び 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ の DAP10 の cDNA、または 4 $\mu\text{g}/\text{well}$ の Halo-MICA の各プラスミド DNA を導入した (「2-12. フローサイトメトリー」の項参照)。遺伝子導入から 48 時間後、FBS を添加しない DMEM に培養液を交換し、さらに 18 時間培養した。その後、MICA で細胞刺激するため、Halo-MICA を発現した細胞を NKG2D と DAP10 を発現した細胞と 30 分間共培養した。

2-15-2. 細胞溶解物の作製

細胞刺激後、冷却した PBS で細胞を洗浄し、細胞溶解液(20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1% Triton X-100、137 mM NaCl、2 mM EDTA (pH 8.0)、1 mM Na₃VO₄)に溶解した。氷上に 5 分間置いた後、細胞をセルスクレイパーで回収し、氷中で 20 秒間 3 回超音波処理した。溶解物を 4°C で 10 分間 14000 ×g で遠心し、細胞沈殿物を除去した。

2-15-3. 免疫沈降と SDS-PAGE サンプルの調製

200 μl の細胞溶解物に 10 μl の Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (Sepharose Bead Conjugate) (Cell Signaling Technology)を加え、4°Cで一晩緩やかに混和した。その後、ビーズを溶解液 (「2-11-2. 細胞溶解物の作製」の項参照)で 5 回洗浄し、2 ×Leammler 溶液を加えて、95°Cで 5 分間加熱した。加熱後の溶液を 14000×g で 1 分間遠心し、上清に 2-mercaptoethanol (最終濃度 5%)を加えて、再度 95°Cで 5 分間加熱し、電気泳動のサンプルとした。

2-15-4. ウェスタンブロッティング

12%ポリアクリルアミドゲル(12% acrylamide、375 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS、0.1% ammonium persulfate、0.1% tetramethylethylenediamine)を作製し、前項で作製したサンプルを泳動バッファーの中で、100 V 定電圧の条件で 1-2 時間電気泳動した。

電気泳動後、泳動タンパクを PVDF 膜に転写した。転写溶液(20% methanol、25 mM Tris、192 mM glycine、0.05% SDS)中で、100 V 定電圧で 1 時間転写をおこなった。

転写後、PVDF 膜を 5% skim milk の中で 4°C 一晩、ブロッキングした。

ブロッキング後、Akt のリン酸化をみるために、5% skim milk で 400 倍に希釈した Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb もしくは Phospho-Akt (Ser473) (193H12) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) を一次抗体として 37°C で 1-2 時間反応させた後、PBST (PBS+0.1% Tween 20) で 3 回洗浄した。二次抗体として、5% skim milk で 1000 倍希釈した Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG を 37°C で 30 分-1 時間反応させた後、PBST で 3 回洗浄し、ECL select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で 1-5 分間反応させ、発光検出装置(ChemiDoc XRS, Bio-RAD)で検出した。

解析は Quantity One ソフトウェア(Bio-RAD)を用いて行った。検出された各バンドで(発光強度×面積)を算出し、phospho-Akt/ Akt(pan)比にて、リン酸化を比較した。

2-16. 統計解析

SNP 解析については、SNPStats software (http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats_web)を用いて、ハーディ・ワインベルグ平衡分析、連鎖不均衡解析及びハプロタイプ分析を行った。対立遺伝子モデル、優性遺伝モデル、劣性遺伝モデルに分け、それぞれオッズ比、95%信頼区間、P 値を算出し、多型と感染・

感染症のリスクの相関を推測した。対立遺伝子モデルとは、遺伝形質がアレルの所有本数に比例して発生するという考え方に基づいた遺伝モデルである。優性遺伝モデルは、マイナーアレルが疾患など遺伝形質につながると考えた場合に、遺伝形質が優性遺伝するという考え方に基づいた遺伝モデルである。例えば、G アレルがマイナーアレル、A アレルがメジャーアレルの場合、優性遺伝モデルにおいては、GG 遺伝子型でも GA 遺伝子型でも遺伝形質が発生することになるため、AA 遺伝子型と「AG 遺伝子型+GG 遺伝子型」に分けて、遺伝子型頻度を評価する。劣性遺伝モデルは、マイナーアレルが疾患など遺伝形質につながると考えた場合に、遺伝形質が劣性遺伝するという考え方に基づいた遺伝モデルである。オッズ比と 95%信頼区間は、優位アレルの同型接合遺伝子型を基準に計算した。P 値は 2×2 または 2×3 のカイ二乗検定、両側検定で算出し、 $P<0.05$ を統計学的に有意とした。多重比較には、Bonferroni 補正を加味して検定を行った。

2-17. 研究倫理

本研究は、東京大学医学部附属病院、旭川医科大学附属病院、福島県立医科大学附属病院、国立成育医療センター、神戸大学医学部附属病院にて集めた検体を用いて、主に国立感染症研究所ウイルス 1 部にておこなった。対象者の両親（対象は未成年のため）より研究参加への同意を得た上で、研究内容について各施設の倫理委員会より承認を得て研究をおこなった。（承認番号：東京大学 G3517、旭川医科大学 984、福島県立医科大学 719、国立成育医療センター

551、神戸大学 1231、国立感染症研究所 327)

2-18. 研究内容の公表と共同研究者からの同意

本研究に関する内容の一部は、"International Journal of Infectious Diseases"に "Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease"のタイトルにて既に公表済みである [56]。尚、本研究論文に同内容を引用することについても全ての共同研究者より同意を得ている。

3. 結果

3-1. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染または感染症の関係[56]

3-1-1. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係(表 2)

TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係について調べるため、一般日本人(A 群、各 SNP により n が異なるため、n は表 2 に記載)と先天性 CMV 感染児(B 群、n=87)で遺伝子型の頻度を比較した。

TLR2 遺伝子の SNP rs3804100 は、一般日本人に比べ、先天性 CMV 感染児で有意に CC 遺伝子型の割合が多かった(対立遺伝子モデルにおいてオッズ比 11.7、95%信頼区間 1.42-96.3、 $p=0.015$)。また、TLR2 遺伝子の SNP rs1898830 は、対立遺伝子モデルでの解析において、一般日本人に比べ、先天性感染児で AG 遺伝子型の割合が少なく、AA 遺伝子型の割合が多い傾向にあった(オッズ比 0.43、95%信頼区間 0.21-0.88)。SNP rs1898830 の遺伝子型の頻度を優性遺伝モデルで解析すると、一般日本人に比べ、先天性感染児で G アレルが有意に少なかった(オッズ比 0.43、95%信頼区間 0.23-0.93、 $p=0.030$)。後方視的診断で先天性 CMV 感染と確定診断された児を加えてデータを解析したことにより選択バイアスが発生する可能性があるため、同定された 48 人の先天性 CMV 感染児のみで解析これら 2 つの SNP について、スクリーニング調査で診断された 48 人の先天性感染児に絞って同様の解析を行っても同じ結果が得られた(表 3)。

TLR4 遺伝子の SNP rs11536889、TLR9 遺伝子の SNP rs352139、SNP rs352140 では、A 群と B 群の間で遺伝子型の頻度の統計学的有意差は見られなかった。

表 2 TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係

遺伝子	rs番号 ¹ (位置) (A群の人数)	遺伝モデル	遺伝子型	一般日本人(A ²)または 先天性CMV感染児(B ²)			P ³		
				A(%)	B(%)	オッズ比 (95%信頼区間)			
TLR2	rs1898830 (イントロン1) (n=86)	対立遺伝子	AA	17 (19.7)	30 (34.5)	1	NS ⁴		
			AG	54 (62.8)	41 (47.1)	0.43 (0.21-0.88)			
			GG	15 (17.4)	16 (18.4)	0.60 (0.24-1.52)			
		優性遺伝	AA	17 (19.7)	30 (34.5)	1	0.030		
			AG+GG	69 (80.2)	57 (65.5)	0.47 (0.23-0.93)			
			劣性遺伝	AA+AG	71 (82.6)	71 (81.6)		1	NS
			GG	15 (17.4)	16 (18.4)	1.07 (0.49-2.32)			
			rs3804100 (エクソン3) 同義置換 (n=83)	対立遺伝子	TT	48 (57.8)	37 (42.5)	1	0.015*
					TC	34 (41.0)	41 (47.1)	1.56 (0.84-2.92)	
	CC	1 (1.2)			9 (10.3)	11.7 (1.42-96.3)			
	優性遺伝	TT	48 (57.8)	37 (42.5)	1	0.046			
		TC+CC	35 (42.2)	50 (57.5)	1.85 (1.01-3.41)				
		劣性遺伝	TT+TC	82 (98.8)	78 (89.7)		1	0.011	
		CC	1 (1.2)	9 (10.3)	9.46 (1.17-76.4)				
		TLR4	rs11536889 (非翻訳領域) (n=42)	対立遺伝子	GG	24 (57.1)	45 (51.7)	1	NS
					GC	15 (35.7)	35 (40.2)	1.24 (0.57-2.72)	
CC	3 (7.1)				7 (8.0)	1.24 (0.29-5.25)			
優性遺伝	GG				24 (57.1)	45 (51.7)	1	NS	
		GC+CC	18 (42.9)	42 (48.3)	1.24 (0.59-2.61)				
		劣性遺伝	GG+GC	39 (92.9)	80 (92.0)	1	NS		
			CC	3 (7.1)	7 (8.0)	1.14 (0.28-4.64)			
TLR9	rs352139 (イントロン1) (n=86)	対立遺伝子	AA	25 (29.1)	22 (25.3)	1	NS		
			AG	37 (43.0)	47 (54.0)	1.44 (0.70-2.96)			
			GG	24 (27.9)	18 (20.7)	0.85 (0.37-1.97)			
		優性遺伝	AA	25 (29.1)	22 (25.3)	1	NS		
			AG+GG	61 (70.9)	65 (74.7)	1.21 (0.62-2.37)			
			劣性遺伝	AA+AG	62 (72.1)	69 (79.3)		1	NS
			GG	24 (27.9)	18 (20.7)	0.67 (0.33-1.36)			
			rs352140 (エクソン2) 同義置換 (n=86)	対立遺伝子	GG	25 (29.1)	22 (25.3)	1	NS
					GA	37 (43.0)	47 (54.0)	1.44 (0.70-2.96)	
	AA	24 (27.9)			18 (20.7)	0.85 (0.37-1.97)			
	優性遺伝	GG	25 (29.1)	22 (25.3)	1	NS			
		GA+AA	61 (70.9)	65 (74.7)	1.21 (0.62-2.37)				
		劣性遺伝	GG+GA	62 (72.1)	69 (79.3)		1	NS	
		AA	24 (27.9)	18 (20.7)	0.67 (0.33-1.36)				

1 公式データベース(dbSNP)のリファレンス番号。

2 各群の詳細は図 8 に示した。

3 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

4 NS: not significant

*Bonferroni 補正を行った多重比較検定後 p=0.045。

表 3 スクリーニング調査で診断された児に限定し解析した TLR2 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係

rs 番号 ¹ (位置) (A群の人数)	遺伝モデル	遺伝子型	一般日本人(A ²)または スクリーニングで診断された先天性CMV感染児(Bs)			
			A(%)	Bs (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P ³
rs1898830 (イントロン1) (n=86)	対立遺伝子	AA	17 (19.7)	19 (39.6)	1	NS ⁴
		AG	54 (62.8)	19 (39.6)	0.32 (0.14-0.73)	
		GG	15 (17.4)	10 (20.8)	0.60 (0.21-1.68)	
	優性遺伝	AA	17 (19.7)	19 (39.6)	1	0.013
		AG+GG	69 (80.2)	29 (60.4)	0.38 (0.17-0.82)	
	劣性遺伝	AA+AG	71 (82.6)	38 (79.2)	1	NS
GG		15 (17.4)	10 (20.8)	1.25 (0.51-3.04)		
rs3804100 (エクソン3) 同義置換 (n=83)	対立遺伝子	TT	48 (57.8)	17 (35.4)	1	0.013*
		TC	34 (41.0)	27 (56.3)	2.24 (1.06-4.74)	
		CC	1 (1.2)	4 (8.3)	11.3 (1.17-108)	
	優性遺伝	TT	48 (57.8)	17 (35.4)	1	0.013
		TC+CC	35 (42.2)	31 (64.6)	2.50 (1.19-5.21)	
	劣性遺伝	TT+TC	82 (98.8)	44 (91.7)	1	0.040
CC		1 (1.2)	4 (8.3)	7.45 (0.81-68.8)		

1 公式データベース(dbSNP)のリファレンス番号。

2 A 群の詳細は図 8 に示した。

3 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

4 NS: not significant

* Bonferroni 補正を行った多重比較検定後 p=0.039。

3-1-2. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症の関係(表 4)

TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症の関係について調べるため、以下の群で遺伝子型の頻度を比較した：①「出生時不顕性(C 群、n=57)」対「出生時顕性(D 群、n=30)」、②「遅発症状なし(E 群、n=38)」対「遅発症状あり(F 群、n=19)」、③「CMV 感染に関係する臨床的特徴なし(G 群、n=33)」対「CMV 感染に関係する何らかの臨床的特徴あり(H 群、n=54)」。しかし、いずれの群間の比較でも統計学的に有意差はなかった。FGR や非特異的な一症状を持つ児を D 群や H 群に

含めても、結果は同じであった。また、ハプロタイプと先天性 CMV 感染症との相関も見られなかった。尚、全経過を通じて G 群と H 群のフォローアップ期間に有意差はなかった。後方視的診断で先天性 CMV 感染と確定診断された児を加えてデータを解析したことにより選択バイアスが発生する可能性があるため、スクリーニング調査で診断された 48 人の先天感染児に絞った解析も行ったが、いずれの群間の比較でも統計学的に有意差はなかった(表 5)。

表 4 TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症の関係

遺伝子	rs番号 ¹ (位置)	遺伝モデル	遺伝子型	出生時不顕性(C ²) または顕性(D ²)			遅発症状なし(E ²) またはあり(F ²)			臨床的特徴なし(G ²) またはあり(H ²)			
				C%	D%	オッズ比 (95%CI)	E%	F%	オッズ比 (95%CI)	G%	H%	オッズ比 (95%CI)	
TLR2	rs1898830 (イントロン1)	対立遺伝子	AA	31.6	40	1	34.2	26.3	1	30.3	37	1	
			AG	47.4	46.7	0.78 (0.29-2.06)	42.1	57.9	1.79 (0.49-6.47)	42.4	50	0.96 (0.36-2.61)	
			GG	21.1	13.3	0.50 (0.13-1.92)	23.7	15.8	0.87 (0.16-4.58)	27.3	13	0.39 (0.11-1.35)	
	優性遺伝	AA	31.6	40	1	34.2	26.3	1	30.3	37	1		
		AG+GG	68.4	60	0.69 (0.28-1.74)	65.8	73.7	1.46 (0.43-4.94)	69.7	63	0.74 (0.29-1.86)		
		劣性遺伝	AA+AG	79	86.7	1	76.3	84.2	1	72.7	87	1	
	劣性遺伝	GG	21.1	13.3	0.58 (0.17-1.97)	23.7	15.8	0.60 (0.14-2.56)	27.3	13	0.40 (0.13-1.20)		
		rs3804100 (エクソン3)	対立遺伝子	TT	36.8	53.3	1	39.5	31.6	1	45.5	40.7	1
				TC	54.4	33.3	0.42 (0.16-1.11)	52.6	57.9	1.37 (0.41-4.56)	48.5	46.3	1.07 (0.43-2.64)
	同義置換	優性遺伝	CC	8.8	13.3	1.05 (0.24-4.55)	7.9	10.5	1.67 (0.22-12.62)	6.1	13	2.39 (0.43-13.10)	
TT			36.8	53.3	1	39.5	31.6	1	45.5	40.7	1		
TC+CC			63.2	46.7	0.51 (0.21-1.25)	60.5	68.4	1.41 (0.44-4.53)	54.5	59.3	1.21 (0.51-2.91)		
劣性遺伝	TT+TC	91.2	86.7	1	92.1	89.5	1	93.9	87	1			
	CC	8.8	13.3	1.60 (0.40-6.47)	7.9	10.5	1.37 (0.21-9.00)	6.1	13	2.31 (0.45-11.85)			
	TLR4	rs11536889 (非翻訳領域)	対立遺伝子	GG	56.1	43.3	1	60.5	47.4	1	60.6	46.3	1
GC				35.1	50	1.85 (0.73-4.68)	28.9	47.4	2.09 (0.65-6.74)	30.3	46.3	2.00 (0.78-5.12)	
CC				8.8	6.7	0.98 (0.17-5.73)	10.5	5.3	0.64 (0.06-6.52)	9.1	7.4	1.07 (0.21-5.33)	
優性遺伝		GG	56.1	43.3	1	60.5	47.4	1	60.6	46.3	1		
		GC+CC	43.9	56.7	1.67 (0.69-4.08)	39.5	52.6	1.70 (0.56-5.17)	39.4	53.7	1.78 (0.74-4.30)		
		劣性遺伝	GG+GC	91.2	93.3	1	89.5	94.7	1	90.9	92.6	1	
劣性遺伝	CC	8.8	6.7	0.74 (0.14-4.08)	10.5	5.3	0.47 (0.05-4.55)	9.1	7.4	0.80 (0.17-3.82)			
	TLR9	rs352139 (イントロン1)	対立遺伝子	AA	24.6	26.7	1	21.1	31.6	1	18.2	29.6	1
				AG	54.4	53.3	0.90 (0.31-2.60)	63.2	36.8	0.39 (0.10-1.50)	63.6	48.1	0.46 (0.15-1.40)
GG				21.1	20	0.88 (0.24-3.24)	15.8	31.6	1.33 (0.28-6.28)	18.2	22.2	0.75 (0.19-2.91)	
優性遺伝		AA	24.6	26.7	1	21.1	31.6	1	18.2	29.6	1		
		AG+GG	75.4	73.3	0.90 (0.33-2.46)	79	68.4	0.58 (0.17-2.00)	81.8	70.4	0.53 (0.18-1.52)		
		劣性遺伝	AA+AG	79	80	1	84.2	68.4	1	81.8	77.8	1	
劣性遺伝	GG	21.1	20	0.94 (0.31-2.81)	15.8	31.6	2.46 (0.67-9.05)	18.2	22.2	1.29 (0.43-3.83)			
	rs352140 (エクソン2)	対立遺伝子	GG	24.6	26.7	1	21.1	31.6	1	18.2	29.6	1	
			GA	54.4	53.3	0.90 (0.31-2.60)	63.2	36.8	0.39 (0.10-1.50)	63.6	48.1	0.46 (0.15-1.40)	
同義置換	優性遺伝	AA	21.1	20	0.88 (0.24-3.24)	15.8	31.6	1.33 (0.28-6.28)	18.2	22.2	0.75 (0.19-2.91)		
		GG	24.6	26.7	1	21.1	31.6	1	18.2	29.6	1		
		GA+AA	75.4	73.3	0.90 (0.33-2.46)	79	68.4	0.58 (0.17-2.00)	81.8	70.4	0.53 (0.18-1.52)		
劣性遺伝	GG+GA	79	80	1	84.2	68.4	1	81.8	77.8	1			
	AA	21.1	20	0.94 (0.31-2.81)	15.8	31.6	2.46 (0.67-9.05)	18.2	22.2	1.29 (0.43-3.83)			

注釈：全て p>0.05 であり、統計学的に有意ではなかった。

1 公式データベース(dbSNP)のリファレンス番号。

2 各群の詳細は図 8 に示した。

表 5 スクリーニング調査で診断された児に限定し解析した TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症の関係

遺伝子	rs番号 ¹ (位置)	遺伝モデル	遺伝子型	出生時不顕性(C ² s) または顕性(D ²)			遅発症状なし(E ² s) またはあり(F ² s)			臨床的特徴なし(G ² s) またはあり(H ² s)		
				Cs%	Ds%	オッズ比 (95%CI)	Es%	Fs%	オッズ比 (95%CI)	Gs%	Hs%	オッズ比 (95%CI)
TLR2	rs1898830 (イントロン1)	対立遺伝子	AA	35.9	55.6	1	35.1	50	1	31.2	56.2	1
			AG	41	33.3	0.52 (0.11-2.60)	40.5	50	0.87 (0.05-15.28)	40.6	37.5	0.51 (0.14-1.92)
			GG	23.1	11.1	0.31 (0.03-3.12)	23.4	0	0.00 (0.00-NA)	28.1	6.2	0.12 (0.01-1.18)
	優性遺伝	AA	35.9	55.6	1	35.1	50	1	31.2	56.2	1	
		AG+GG	64.1	44.4	0.45 (0.10-1.95)	64.9	50	0.54 (0.03-9.39)	68.8	43.8	0.35 (0.10-1.22)	
		劣性遺伝	AA+AG	76.9	88.9	1	75.7	100	1	71.9	93.8	1
TLR2	rs3804100 (エクソン3)	対立遺伝子	TT	35.9	33.3	1	37.8	0	1	43.8	18.8	1
			TC	56.4	66.7	1.27 (0.27-5.93)	54	100	NA (0.00-NA)	50	75	3.50 (0.82-14.99)
			CC	7.7	0	0.00 (0.00-NA)	8.1	0	1.00 (0.00-NA)	6.2	6.2	2.33 (0.16-34.90)
	優性遺伝	TT	35.9	33.3	1	37.8	0	1	43.8	18.8	1	
		TC+CC	64.1	66.7	1.12 (0.24-5.19)	62.2	100	NA (0.00-NA)	56.2	81.2	3.37 (0.80-14.18)	
		劣性遺伝	TT+TC	92.3	100	1	91.9	100	1	93.8	93.8	1
TLR4	rs11536889 (非翻訳領域)	対立遺伝子	GG	59	55.6	1	62.2	0	1	62.5	50	1
			GC	33.3	33.3	1.06 (0.22-5.18)	29.7	100	NA (0.00-NA)	31.2	37.5	1.50 (0.41-5.52)
			CC	7.7	11.1	1.53 (0.13-17.97)	8.1	0	1.00 (0.00-NA)	6.2	12.5	2.50 (0.30-20.92)
	優性遺伝	GG	59	55.6	1	62.2	0	1	62.5	50	1	
		GC+CC	41	44.4	1.15 (0.27-4.96)	37.8	100	NA (0.00-NA)	37.5	50	1.67 (0.50-5.61)	
		劣性遺伝	GG+GC	92.3	88.9	1	91.9	100	1	93.8	87.5	1
TLR9	rs352139 (イントロン1)	対立遺伝子	AA	23.1	11.1	1	21.6	50	1	18.8	25	1
			AG	61.5	66.7	2.25 (0.24-21.37)	62.2	50	0.35 (0.02-6.24)	62.5	62.5	0.75 (0.17-3.28)
			GG	15.4	22.2	3.00 (0.22-40.93)	16.2	0	0.00 (0.00-NA)	18.8	12.5	0.50 (0.07-3.85)
	優性遺伝	AA	23.1	11.1	1	21.6	50	1	18.8	25	1	
		AG+GG	76.9	88.9	2.40 (0.26-21.84)	78.4	50	0.28 (0.02-4.92)	81.2	75	0.69 (0.16-2.92)	
		劣性遺伝	AA+AG	84.6	77.8	1	83.8	100	1	81.2	87.5	1
TLR9	rs352140 (エクソン2)	対立遺伝子	GG	23.1	11.1	1	21.6	50	1	18.8	25	1
			GA	61.5	66.7	2.25 (0.24-21.37)	62.2	50	0.35 (0.02-6.24)	62.5	62.5	0.75 (0.17-3.28)
			AA	15.4	22.2	3.00 (0.22-40.93)	16.2	0	0.00 (0.00-NA)	18.8	12.5	0.50 (0.07-3.85)
	優性遺伝	GG	23.1	11.1	1	21.6	50	1	18.8	25	1	
		GA+AA	76.9	88.9	2.40 (0.26-21.84)	78.4	50	0.28 (0.02-4.92)	81.2	75	0.69 (0.16-2.92)	
		劣性遺伝	GG+GA	84.6	77.8	1	83.8	100	1	81.2	87.5	1
TLR9	rs352140 (エクソン2)	同義置換	AA	15.4	22.2	1.57 (0.26-9.47)	16.2	0	0.00 (0.00-NA)	18.8	12.5	0.62 (0.11-3.48)
			AA	15.4	22.2	1.57 (0.26-9.47)	16.2	0	0.00 (0.00-NA)	18.8	12.5	0.62 (0.11-3.48)

注釈：全て p>0.05 であり、統計学的に有意ではなかった。

1 公式データベース(dbSNP)のリファレンス番号。

2 各群の詳細は図 8 に示した。

3-2. NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染・感染症の 相関

3-2-1. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G)と先天性 CMV 感染 または感染症の関係

3-2-1-1. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G)と先天性 CMV 感 染の関係(表 6)

NKG2D の SNP rs2255336 と先天性 CMV 感染の関係について調べるため、一般日本人(A 群、n=86)と先天性 CMV 感染児(B 群、n=87)で遺伝子型の頻度を比較したが、統計学的に有意差はなかった。後方視的診断で先天性 CMV 感染と確定診断された児を加えてデータを解析したことにより選択バイアスが発生する可能性があるため、スクリーニング調査で診断された 48 人の先天感染児に絞った解析も行ったが、一般日本人と先天性 CMV 感染児で遺伝子型の頻度に統計学的有意差はなかった(表 7)。

表 6 NKG2D 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係

遺伝モデル	遺伝子型	一般日本人 (A ¹) または 先天性 CMV 感染児 (B ¹)			
		A(%)	B(%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P ²
対立遺伝子	GG	58 (67.4)	62 (71.3)	1	NS ³
	GA	21 (24.4)	21 (24.1)	0.94 (0.46-1.89)	
	AA	7 (8.1)	4 (4.7)	0.53 (0.15-1.92)	
優性遺伝	GG	58 (67.4)	62 (71.3)	1	NS
	GA+AA	28 (32.6)	25 (28.7)	0.84 (0.44-1.60)	
劣性遺伝	GG+GA	79 (91.9)	83 (95.4)	1	NS
	AA	7 (8.1)	4 (4.7)	0.54 (0.15-1.93)	

1 各群の詳細は図 8 に示した。

2 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

3 NS: not significant

表 7 スクリーニング調査で同定された児に限定し解析した NKG2D 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染の関係

遺伝モデル	遺伝子型	一般日本人(A ¹) または スクリーニングで診断された先天性CMV感染児(Bs)			
		A(%)	Bs(%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P ²
対立遺伝子	GG	58 (67.4)	36 (75)	1	NS ³
	GA	21 (24.4)	9 (18.8)	0.69 (0.29-1.67)	
	AA	7 (8.1)	3 (6.3)	0.69 (0.17-2.84)	
優性遺伝	GG	58 (67.4)	36 (75)	1	NS
	GA+AA	28 (32.6)	12 (25)	0.69 (0.31-1.53)	
劣性遺伝	GG+GA	79 (91.9)	45 (93.8)	1	NS
	AA	7 (8.1)	3 (6.3)	0.75 (0.19-3.05)	

1 群の詳細は図 8 に示した。

2 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

3 NS: not significant

3-2-1-2. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G)と先天性 CMV 感染症の関係(表 8)

NKG2D の SNP rs2255336 と先天性 CMV 感染症の関係について調べるため、以下の群で比較した：①「出生時不顕性(C 群、n=57)」対「出生時顕性(D 群、n=30)」、②「遅発症状なし(E 群、n=38)」対「遅発症状あり(F 群、n=19)」、③「CMV 感染に関する臨床的特徴なし(G 群、n=33)」対「CMV 感染に関する何らかの臨床的特徴あり(H 群、n=54)」。その結果、出生時不顕性児に比べ、顕性児で A (Thr)アレルが有意に多かった(優性遺伝モデルにおいてオッズ比 3.06、95%信頼区間 1.15-8.16、 $p=0.024$)。E 群と F 群、G 群と H 群の比較では、SNP と先天性 CMV 感染症との間に統計学的有意差はなかった。尚、全経過を通じて G 群と H 群のフォローアップ期間に有意差はなかった。後方視的診断で先天性 CMV 感染と確定診断された児を加えてデータを解析したことにより選択バイアスが発生する可能性があるため、スクリーニング調査で診断された 48 人の先天感染児で解析を行うと、対象人数が少ないため、若干結果が異なるものの、C 群と D 群の比較では、顕性児で AA 遺伝子型が多い傾向であった(表 9)。

表 8 NKG2D 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症の関係

遺伝モデル	遺伝子型	出生時不顕性(C') または顕性(D')				遅発症状なし(E') またはあり(F')				臨床的特徴なし(G') またはあり(H')			
		C (%)	D (%)	オッズ比 (95%CI)	P ²	E (%)	F (%)	オッズ比 (95%CI)	P	G (%)	H (%)	オッズ比 (95%CI)	P
対立遺伝子	GG	45 (79)	17 (56.7)	1	0.055	29 (76.3)	16 (84.2)	1	NS ³	26 (78.8)	36 (66.7)	1	NS
	GA	11 (19.3)	10 (33.3)	2.61 (0.92-7.44)		8 (21.1)	3 (15.8)	0.68 (0.16-2.93)		6 (18.2)	15 (27.8)	1.81 (0.62-5.28)	
	AA	1 (1.8)	3 (10)	7.20 (0.69-74.98)		1 (2.6)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		1 (3)	3 (5.6)	2.17 (0.21-22.02)	
優性遺伝	GG	45 (79)	17 (56.7)	1	0.024	29 (76.3)	16 (84.2)	1	NS	26 (78.8)	36 (66.7)	1	NS
	GA+AA	12 (21.1)	13 (43.3)	3.06 (1.15-8.16)		9 (23.7)	3 (15.8)	0.60 (0.14-2.56)		7 (21.2)	18 (33.3)	1.86 (0.68-5.09)	
劣性遺伝	GG+GA	56 (98.2)	27 (90)	1	NS	37 (97.4)	19 (100)	1	NS	32 (97)	51 (94.4)	1	NS
	AA	1 (1.8)	3 (10)	5.70 (0.56-58.16)		1 (2.6)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		1 (3)	3 (5.6)	1.88 (0.19-18.89)	

1 各群の詳細は図 8 に示した。

2 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

3 NS: not significant

表 9 スクリーニング調査で診断された児に限定し解析した NKG2D 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染症の関係

遺伝モデル	遺伝子型	出生時不顕性(C's) または顕性(D's)				遅発症状なし(E's) またはあり(F's)				臨床的特徴なし(G's) またはあり(H's)			
		Cs (%)	Ds (%)	オッズ比 (95%CI)	P ²	Es (%)	Fs (%)	オッズ比 (95%CI)	P	Gs (%)	Hs (%)	オッズ比 (95%CI)	P
対立遺伝子	GG	29 (74.4)	7 (77.8)	1	0.03	28 (75.7)	1 (50)	1	NS ³	25 (78.1)	11 (68.8)	1	NS
	GA	9 (23.1)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		8 (21.6)	1 (50)	3.50 (0.20-62.42)		6 (18.8)	3 (18.8)	1.14 (0.24-5.39)	
	AA	1 (2.6)	2 (22.2)	8.29 (0.65-104.90)		1 (2.7)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		1 (3.1)	2 (12.5)	4.55 (0.37-55.54)	
優性遺伝	GG	29 (74.4)	7 (77.8)	1	NS	28 (75.7)	1 (50)	1	NS	25 (78.1)	11 (68.8)	1	NS
	GA+AA	10 (25.6)	2 (22.2)	0.83 (0.15-4.66)		9 (24.3)	1 (50)	3.11 (0.18-54.97)		7 (21.9)	5 (31.2)	1.62 (0.42-6.26)	
劣性遺伝	GG+GA	38 (97.4)	7 (22.2)	1	0.058	36 (97.3)	2 (100)	1	NS	31 (96.9)	14 (87.5)	1	NS
	AA	1 (2.6)	3 (10)	10.86 (0.86-136.60)		1 (2.7)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		1 (3.1)	2 (12.5)	4.43 (0.37-52.99)	

1 各群の詳細は図 8 に示した。

2 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

3 NS: not significant

3-2-2. MICA 遺伝子のアレルと先天性 CMV 感染症との関係(表 10)

MICA 遺伝子のアレルと先天性 CMV 感染症の関係について調べるため、以下の群で比較した:①「出生時不顕性(C 群、n=57)」対「出生時顕性(D 群、n=30)」、②「遅発症状なし(E 群、n=38)」対「遅発症状あり(F 群、n=19)」、③「CMV 感染に関係する臨床的特徴なし(G 群、n=33)」対「CMV 感染に関係する何らかの臨床的特徴あり(H 群、n=54)」。しかし、いずれの群間の比較でもアレルの頻度に統計学的有意差は見られなかった。スクリーニング調査で診断された 48 人の先天感染児に絞った解析も行ったが、いずれの群間の比較でもアレルの頻度に統計学的有意差は見られなかった(表 11)。

表 10 MICA 遺伝子のアレルと先天性 CMV 感染症の関係

アレル	アレルの有無 ¹	出生時不顕性(C ²) または顕性(D ²)			遅発症状なし(E ²) またはあり(F ²)			臨床的特徴なし(G ²) またはあり(H ²)		
		C (%)	D (%)	P ³	E (%)	F (%)	P	G (%)	H (%)	P
*002	+	9 (16.1)	9 (30)	NS ⁴	7 (18.4)	2 (11.1)	NS	7 (21.2)	11 (20.8)	NS
	-	47 (83.9)	21 (70)		31 (81.6)	16 (88.9)		26 (78.8)	42 (79.2)	
*004	+	6 (10.7)	3 (10)	NS	2 (5.1)	3 (17.6)	NS	2 (5.9)	7 (13.5)	NS
	-	50 (89.3)	27 (90)		37 (94.9)	14 (82.4)		32 (94.1)	45 (86.5)	
*007	+	1 (1.8)	0 (0)	NS	1 (2.6)	0 (0)	NS	1 (2.9)	0 (0)	NS
	-	55 (98.2)	30 (100)		38 (97.4)	17 (100)		33 (97.1)	52 (100)	
*008	+	25 (44.6)	12 (40)	NS	16 (41.0)	9 (52.9)	NS	15 (44.1)	22 (42.3)	NS
	-	31 (55.4)	18 (60)		23 (59.0)	8 (47.1)		19 (55.9)	30 (57.7)	
*009	+	6 (10.7)	1 (14.3)	NS	4 (10.3)	2 (11.8)	NS	3 (8.8)	4 (7.7)	NS
	-	50 (89.3)	6 (85.7)		35 (89.7)	15 (88.2)		31 (91.2)	48 (92.3)	
*010	+	20 (35.7)	8 (26.7)	NS	11 (28.9)	9 (50)	NS	10 (30.3)	18 (34.0)	NS
	-	36 (64.3)	22 (73.3)		27 (71.1)	9 (50)		23 (69.7)	35 (66.0)	
*012	+	8 (14.3)	5 (16.7)	NS	7 (17.9)	1 (5.9)	NS	6 (17.6)	7 (13.5)	NS
	-	48 (85.7)	25 (83.3)		32 (82.1)	16 (94.1)		28 (82.4)	45 (86.5)	

1 アレルが存在するものは+, 存在しないものは-とした。例: アレル*002 の場合、*002/*002→+, *002/*008→+, *008/*008→-となる。

2 各群の詳細は図 8 に示した。

3 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

4 NS: not significant

表 11 スクリーニング調査で診断された児に限定し解析した MICA 遺伝子のアレルと先天性 CMV 感染症の関係

アレル	アレルの有無 ¹	出生時不顕性(C ² s) または顕性(D ² s)			遅発症状なし(E ² s) またはあり(F ² s)			臨床的特徴なし(G ² s) またはあり(H ² s)		
		Cs (%)	Ds (%)	P ³	Es (%)	Fs (%)	P	Gs (%)	Hs (%)	P
*002	+	8 (20.5)	2 (22.2)	NS ⁴	7 (18.9)	1 (50)	NS	7 (21.9)	3 (18.8)	NS
	-	31 (79.5)	7 (77.8)		30 (81.1)	1 (50)		25 (78.1)	13 (81.3)	
*004	+	2 (5.1)	1 (11.1)	NS	2 (5.3)	0 (0)	NS	2 (6.1)	1 (6.7)	NS
	-	37 (94.9)	8 (88.9)		36 (94.7)	1 (100)		31 (93.9)	14 (93.3)	
*007	+	0 (0)	0 (0)	NS	0 (0)	0 (0)	NS	0 (0)	0 (0)	NS
	-	39 (100)	9 (100)		38 (100)	1 (100)		33 (100)	15 (100)	
*008	+	18 (46.2)	4 (44.4)	NS	17 (44.7)	1 (100)	NS	15 (45.5)	7 (46.7)	NS
	-	21 (53.8)	5 (55.6)		21 (55.3)	0 (0)		18 (54.5)	8 (53.3)	
*009	+	4 (10.3)	0 (0)	NS	4 (10.5)	0 (0)	NS	3 (9.1)	1 (6.7)	NS
	-	35 (89.7)	9 (100)		34 (89.5)	1 (100)		30 (90.9)	14 (93.3)	
*010	+	12 (30.8)	0 (0)	NS	10 (27.0)	2 (100)	NS	9 (28.1)	3 (18.8)	NS
	-	27 (69.2)	9 (100)		27 (73.0)	0 (0)		23 (71.9)	13 (81.3)	
*012	+	7 (17.9)	3 (33.3)	NS	8 (21.1)	0 (0)	NS	6 (18.2)	4 (26.7)	NS
	-	32 (82.1)	6 (66.7)		30 (78.9)	1 (100)		27 (81.8)	11 (73.3)	

1 アレルが存在するものは+, 存在しないものは-とした。例: アレル*002 の場合、*002/*002→+, *002/*008→+, *008/*008→-となる。

2 各群の詳細は図 8 に示した。

3 P 値はカイ二乗検定で算出し、P<0.05 を統計学的に有意とした。

4 NS: not significant

3-2-3. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)により起こる NK 細胞機能への影響

3-2-3-1. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)により起こる

NKG2D への MICA の結合に対する影響

NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)と先天性 CMV 感染症の間に相関が見られたため、フローサイトメトリーによって、本 SNP が NKG2D への MICA の結合に対し影響及ぼすか検討した。抗 NKG2D 抗体が陽性の細胞

(NKG2D を細胞表面に発現している細胞) でゲーティングを行い、Halo-MICA に結合する蛍光リガンドが陽性の細胞 (MICA が結合している細胞) の割合を測定した。GG (Ala/Ala) 遺伝子型と AA (Thr/Thr) 遺伝子型を比較したところ、NKG2D 陽性細胞の中で MICA 陽性である細胞の割合は、52%と 51%であり、有意差はなかった。

3-2-3-2. NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)により起こる

PI3K-Akt シグナル経路への影響

NKG2D 遺伝子の SNP rs2255336(Thr72Ala, c214.A>G)と先天性 CMV 感染症の間に相関が見られたため、免疫沈降、ウェスタンブロッティングを用いて、本 SNP が PI3K-Akt シグナル伝達経路に対し影響を及ぼすか検討した。コントロール実験として、MICA 刺激でリン酸化が増えるかを確認するため、MICA の有無で比較したところ、MICA 刺激によりリン酸化された Akt が 1.3 倍程度増加した。GG (Ala/Ala) 遺伝子型と AA (Thr/Thr) 遺伝子型を比較したところ、Akt のリン酸化に有意差はなかった(図 13)。同様の実験を 3 回繰り返したが、GG 遺伝子型と AA 遺伝子型で Akt のリン酸化に有意差はなかった(図 14)。

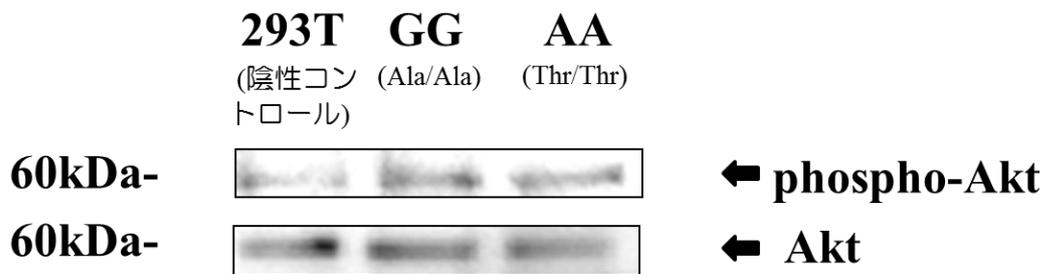


図 13 NKG2D 遺伝子の SNP による PI3K-Akt シグナル経路に対する影響
293T 細胞に NKG2D の cDNA (SNP rs2255336 が GG 遺伝子型もしくは AA 遺伝子型) 及び DAP10 の cDNA を導入した。また別の 293T 細胞に Halo-MICA を導入した。遺伝子導入から 48 時間後、FBS を抜いた DMEM に培養液を交換し、さらに 18 時間培養した。Halo-MICA を発現した細胞を NKG2D と DAP10 を発現した細胞と 30 分間共培養した後に回収した溶解物を用いて、抗 Akt 抗体付きビーズを用いて、免疫沈降をおこなった。免疫沈降後のサンプルを 12%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE をおこなった後で PVDF 膜に転写し、抗 Akt 抗体もしくは抗リン酸化 Akt 抗体でウェスタンブロッティング検出をおこなってリン酸化を比較した。

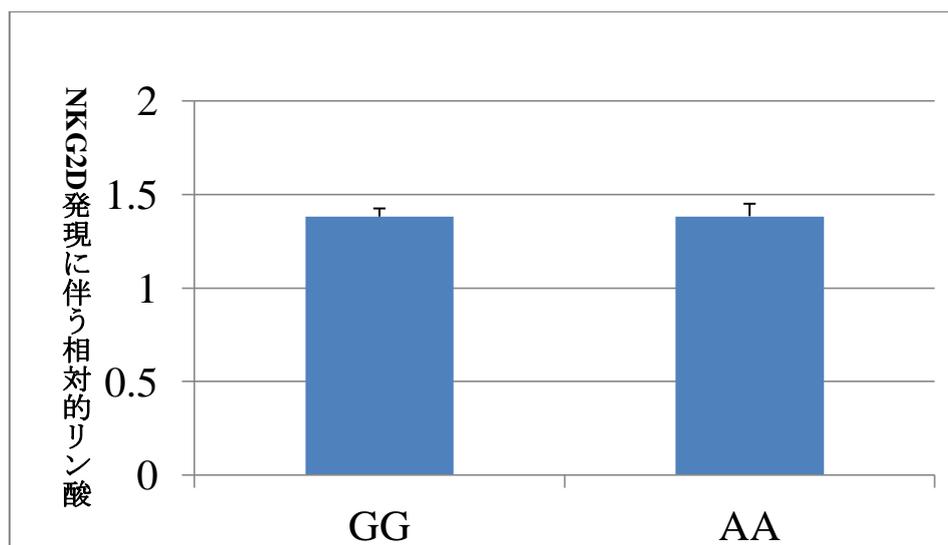


図 14 ウェスタンブロッティングによる GG 遺伝子型と AA 遺伝子型の Akt のリン酸化の比較

陰性コントロール及び各遺伝子型で、{phospho-Akt のバンドの(発光強度×面積)}/{Akt(pan)のバンドの(発光強度×面積)}を算出し、陰性コントロールの値を 1 として、各遺伝子型の NKG2D 発現に伴う相対的リン酸化率を求めた。3 回の実験の平均値±標準誤差を図に示した。

4. 考察

4-1. TLR 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染・感染症との相関[56]

近年、TLR 遺伝子の SNP が、様々なウイルスに対する感受性や感染後の臨床経過に関係するという報告が増えているが、先天性 CMV 感染及び感染症と TLR 遺伝子の相関を研究した報告はまだなく、本研究が初めてである。

今回、TLR2 遺伝子の SNP rs3804100 及び rs1898830 の頻度が先天性 CMV 感染児と一般日本人で異なっていることが明らかになった。一方、先天性 CMV 感染症の発症は、今回解析した TLR 遺伝子のいずれの SNP とも有意な相関が見られなかった。後方視的診断で顕性感染児を加えて 87 人のデータを解析したことにより何らかの選択バイアスが発生する可能性は、排除できない。しかし、新生児 CMV スクリーニング調査は一般日本人を反映しており[13]、そこで同定された 48 人の先天性 CMV 感染児のみで解析しても同様の結果が得られていることから、後方視的診断で同定した顕性感染児を解析に加えても、そうした影響はないと言える。本研究の限界としては、倫理審査の上で遺伝的解析が先天感染症例に制限されたため、先天感染症例に完全に一致した一般人口のコントロールの SNP を解析できていないことである。今回の結果をさらに確固たるものにするには、TLR2 遺伝子の他の SNP も解析することが重要であろう。本研究のもう一つの限界点としては、頭部画像検査の時期や種類が一定でないことである。そのことが今回の解析結果にどの程度影響を与えるかは定かではないが、影響が出るとすれば、E 群と F 群、G 群と H 群の比較解析であり、少なくとも TLR2 遺伝子の SNP 頻度が先天性 CMV 感染児と日本人一般人口で異なっているという結果には影響を与えない。

母体の CMV 感染は必ずしも胎児の感染を引き起こす訳ではない。母体の再感染や再活性化の場合の経胎盤感染率は明らかになっていないが、初感染を起こした場合、経胎盤感染率は約 40%と考えられている[8]。従って、今回の結果から、TLR2 遺伝子の遺伝子多型が、少なくとも初感染の母体から胎児へのウイルス伝播の危険因子になっている可能性は十分ある。しかし、他の病原体を含め先天性感染と母体の TLR の SNP との相関を解析した報告はないものの、母体の遺伝子多型が関わっている可能性はある。母体の遺伝子多型の解析も試みたかったが、統計学的に解析可能な検体数を得ていなかったため、本研究では解析を行わなかった。また、TLR2 は胎盤にも発現しており[57]、合胞体栄養膜細胞を用いた細胞培養モデルで、CMV によって刺激された TLR2 のシグナルが炎症性サイトカインの分泌を増加させたという報告もある[58]。従って、胎盤の TLR2 の遺伝子多型の関与も考えられるだろう。

本研究で CC 遺伝子型が先天性 CMV 感染児に有意に多く見られた TLR2 遺伝子の rs3804100 (エクソン 3、同義置換)については、B 型肝炎ワクチンを 3 セット 2 回接種しても抗体価が 10 mIU/ml 以下の抗体非獲得者に比べ、抗体獲得者で TT 遺伝子型が有意に多かったという報告がある[47]。同 SNP は、麻疹ワクチンに関しても、TT 遺伝子型を有する人が TC 遺伝子型や CC 遺伝子型の人に比べ、抗体価が高かった[48]。すなわち、C アレルの保有がウイルス感染に対する免疫応答を低下させるという点で本研究の結果と一致している。G アレルが先天性 CMV 感染児に少ない傾向にあった TLR2 遺伝子の rs1898830 (イントロン 1)については、細菌由来リポ蛋白質の刺激による末梢血中の腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α やインターロイキン(interleukin, IL)-8 の産生が G アレルで

有意に増加したと報告がある[59, 60]。従って、先天性 CMV 感染においても、G アレルの欠如が、結果として、TNF- α や IL-8 の産生を低下させ、CMV への感染を助長する可能性がある。本研究で解析したこれら 2 つの TLR2 遺伝子の SNP によるアミノ酸配列の変化はない。SNP が TLR2 遺伝子自体にどういった影響を与えるか解析を行った報告はないが、SNP によって TLR2 の発現が低下し、感染制御のためのサイトカインの産生が減少するなどの可能性が考えられるだろう。実際、翻訳領域の外に位置する SNP や同義置換 SNP と疾患の関連性の報告例は多数あり、同義置換 SNP がスプライシングや翻訳効率、mRNA の安定性、タンパク質の折り畳み構造に影響を与えるとも報告されている[61-66]。しかし、本研究で遺伝子型頻度に有意差が見られた 2 つの TLR2 遺伝子の SNP が他の遺伝子多型とリンクし、リンクした遺伝子多型が感染伝播の直接の危険因子になっている可能性は否定できない。本研究で判明した SNP と先天性 CMV 感染との関連を確実にするには、同義置換 SNP の生物学的重要性に関するさらなる研究が必要である。

TLR4 遺伝子の SNP rs11536889 は、肝移植後の B 型肝炎ウイルス感染の再発防御との関連が言われ、TLR4 遺伝子の他の SNP は、腎移植レシピエントの CMV 感染症と関係していると報告されている[31, 50]。TLR9 遺伝子に関しては、SNP rs352139 と rs352140 のハプロタイプは HIV の母子感染に影響を与え、また、他の SNP は、同種造血幹細胞移植患者において CMV 感染症発症と関係しているという報告がある[33, 51]。しかし、本研究では TLR4 遺伝子と TLR9 遺伝子の SNP と先天性 CMV 感染及び感染症との相関は見られなかった。

4-2. NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染症の相関

NK 細胞は、腫瘍化した、もしくはウイルス感染を起こした細胞に細胞傷害活性を示す。NK 細胞に関わる遺伝子多型とウイルス感染の関連性を調べた報告は少ない[67-69]。特に CMV 感染・感染症との関連についての報告は、CMV 感染細胞の排除において NK 細胞が重要な役割を果たすにも関わらず、MICA のアレルと HIV 患者における CMV 再活性化の関連を報告した 1 つだけである[70]。

①NK 細胞の活性化レセプター NKG2D のリガンドである MICA のアレルによっては、CMV による MICA の細胞表面発現の抑制を回避すること[45]、②NKG2D は NK 細胞の標的細胞認識において鍵となる活性化レセプターであること[36, 71]から、本研究では、NKG2D の SNP や MICA のアレルと先天性 CMV 感染症との相関について解析した。

今回、NKG2D 遺伝子の非同義置換 SNP rs2255336(Thr72Ala)の頻度が出生時顕性感染児と不顕性感染児で有意に異なっていることが明らかになった。一方、遅発症状の出現などに関しては、同 SNP との関連は認められなかった。また、MICA のアレルによって CMV 感染に対する応答が変化する[45]という報告があったが、今回の解析では MICA のアレルと先天性 CMV 感染症の相関は見られなかった。

本研究ではさらに、有意差のあった NKG2D 遺伝子の SNP により、①NKG2D と MICA の結合への影響、②シグナル伝達への影響が認められるかも検討したが、今回解析した範囲では、多型による差は見られなかった。

本研究の限界としては、NKG2D 遺伝子の該当 SNP だけ遺伝子型が異なり、その他の遺伝的背景が同一の NK 細胞を用意することが実際的に不可能である

ことから、NK 細胞ではなく、上皮系の細胞を使用して検討を行ったことにある。そのため、用いた細胞系では実際のシグナル伝達系が反映されていない可能性も否定はできない。しかし、293T 細胞を用いて PI3K-Akt シグナル経路の解析を行った報告はある[72]。

また、本研究では、分泌型 MICA を用いて全ての機能解析をおこなったが、分泌型 MICA がシグナル解析の上で最適でなかった可能性もある。しかし、融合タンパク質は異なるものの、過去の研究で NKG2D 受容体のシグナル解析に分泌型 MICA を用いており、分泌型を使用したことによる影響の可能性は低いと考えられる[42]。ただし、日本人に最も多い MICA のアレルを選択したものの、その選択が適当でなかった可能性はある。

NKG2D に関する報告はないものの、先天性 CMV 感染児の NK 細胞では活性化レセプター NKG2C の発現が増加するという報告はあり[73]、NKG2C と同様に NKG2D も先天性 CMV 感染に関わっている可能性は十分に考えられる。今回の機能解析では、有意な影響は確認できなかったものの、NKG2D の SNP rs2255336(Thr72Ala)は、NKG2D 受容体の膜貫通部分にあたり、DAP10 アダプター分子と水素結合する 66位の膜貫通アルギニンのごく近傍に位置している[74]。従って、この変異は NKG2D がリガンドと結合した後の細胞内シグナルを変化させ得る。

PI3K-Akt 経路のシグナルに有意な多型の影響は見られなかったものの、PI3K を介した他の経路や DAP10 に結合するもう一つのタンパク質 Grb2 以下のシグナルに影響を及ぼす可能性が考えられる。MICA の刺激により NKG2D 受容体が DAP10 を介して伝達するシグナルについてはまだ分かっていない部分が多

く、本 SNP のシグナル伝達への影響をさらに追究するにはその点をまず明らかにすることが必要であろう。

4-3. 今後の展望と課題

これまで行ってきた新生児 CMV 感染スクリーニング調査で先天性 CMV 感染が新生児の 0.31% に発生しており、感染児の 20% が難聴などを含む顕性感染児であること、また 15% に頭部画像所見に異常が認められ、両者を合わせ 30% の感染児が先天性 CMV 感染に伴う障害・異常を示すことが判明している[13]。従って、ダウン症候群に匹敵する 1000 人に 1 人の頻度で、先天性 CMV 感染の影響が表れていることになる。さらに、出生時不顕性の約 1 割以上が数年のうちに難聴などの神経学的障害を発症する。抗ウイルス薬の副作用の問題があり、先天性 CMV 感染症に対する治療は確立していないが、ガンシクロビルやガンシクロビルのプロドラッグであるバラガンシクロビルが聴力を改善したり、正常聴力を保ったり、聴力の悪化を防止したりするという報告もある[75, 76]。薬の副作用のため、治療を選択しない場合でも、少なくとも難聴や発達遅滞などに対し、早期介入することは重要であり、早期発見の意義は大きい。しかし、現時点では、胎児への感染や発症、症状の重篤度を左右する要因が何であるかについては不明の部分が多い。

胎児や新生児は獲得免疫が弱いことを考慮し、本研究では自然免疫に注目した。その結果、TLR2 遺伝子の SNP が経胎盤感染の危険因子になっている可能性があること、NK 細胞の活性化受容体 NKG2D 遺伝子の SNP が出生時顕性感

染の危険因子になっている可能性があることが判明した。遅発症状の出現などが遺伝子多型によって違うことが証明されれば、治療の選択肢を与えたり、早期介入を行う上での一助になり得たが、本研究ではその成果は得られなかった。

本研究では、自然免疫に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染及び感染症との相関が示されたが、それらの遺伝子多型が TLR や NK 細胞の機能に対し、具体的にどのような変化をもたらすかまでは解明できなかった。その点が解明できれば、先天性 CMV 感染及び感染症発症の機序につながる可能性があり、その対策に資することができると考えられる。そのためには、同義置換 SNP の生物学的重要性に関するさらなる研究、NKG2D 受容体から伝わるシグナルについての研究などが今後の課題と考えられる。

謝辞

本論文の作成にあたり、貴重なご指導とご助言を賜りました岐阜薬科大学（前・国立感染症研究所）・井上直樹先生に深く感謝の意を表します。また、研究にご協力頂きました国立感染症研究所ウイルス1部4室の皆様にも心より感謝いたします。共同研究者として、検体の採取及び症例のフォローをおこなっていただいた、神奈川県立保健福祉大学（前・旭川医科大学）・古谷野伸先生、福島県立医科大学・錫谷達夫先生、国立成育医療センター（前・東京大学）・五石圭司先生、国立成育医療センター・伊藤裕司先生、中村浩幸先生、神戸大学・森岡一朗先生、山田秀人先生に深く感謝いたします。最後に、本研究の機会を与えてくださった国立成育医療センター（前・東京大学）・五十嵐隆先生、研究の機会を与えて下さり、症例のフォロー及び貴重なご指導とご助言を賜りました東京大学・岡明先生に深く感謝の意を表します。

引用文献

1. Yamada, S., Taniguchi, R., Kosugi, I. & Inoue, N. in *Neuroviral Infections ~General Principles and DNA Viruses~* (eds Singh, S. K. & Ruzek, D.) 273-312 (CRC Press, 2013).
2. Cannon, M. J. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J. Clin. Virol.* **46 Suppl 4**, S6-10 (2009).
3. 東, 寛 *et al.* 1996年から2009年の間における妊婦のサイトメガロウイルス抗体保有率の推移について. *日本周産期・新生児医学会雑誌 = Journal of Japan Society of Perinatal and Neonatal Medicine* **46**, 1273-1279 (2010).
4. 千場勉. in *母子感染* (ed 川名尚; 小島俊行) 208-211 (金原出版, 2011).
5. Bia, F. J., Griffith, B. P., Fong, C. K. & Hsiung, G. D. Cytomegaloviral infections in the guinea pig: experimental models for human disease. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 177-195 (1983).
6. Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E. & Pereira, L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J. Virol.* **74**, 6808-6820 (2000).
7. Kenneson, A. & Cannon, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* **17**, 253-276 (2007).
8. Revello, M. G. & Gerna, G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 680-715 (2002).
9. Abdel-Latif, M. & Sugo, E. Images in clinical medicine. Congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* **362**, 833 (2010).
10. Ista, A. S., Demmler, G. J., Dobbins, J. G. & Stewart, J. A. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 665-670 (1995).
11. Schleiss, M. R. Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of infection and protection. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 501801 (2013).
12. Fowler, K. B. *et al.* Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* **130**, 624-630 (1997).
13. Koyano, S. *et al.* Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open* **1**, e000118-2011-000118 (2011).

14. Inoue, N. & Koyano, S. Evaluation of screening tests for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 182-184 (2008).
15. Yan, H. *et al.* Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch. Virol.* **153**, 667-674 (2008).
16. Ross, S. A. *et al.* Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, 588-592 (2009).
17. Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G. & Landini, M. P. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev. Med. Virol.* **14**, 383-410 (2004).
18. Munro, S. C. *et al.* Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4713-4718 (2005).
19. Nozawa, N., Fang-Hoover, J., Tabata, T., Maidji, E. & Pereira, L. Cytomegalovirus-specific, high-avidity IgG with neutralizing activity in maternal circulation enriched in the fetal bloodstream. *J. Clin. Virol.* **46 Suppl 4**, S58-63 (2009).
20. Ito, Y. *et al.* Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr. Int.* **55**, 566-571 (2013).
21. Pedron, B. *et al.* Comparison of CD8+ T Cell responses to cytomegalovirus between human fetuses and their transmitter mothers. *J. Infect. Dis.* **196**, 1033-1043 (2007).
22. Szala, A. *et al.* Mannan-binding lectin-2 (MBL2) gene polymorphisms in prenatal and perinatal cytomegalovirus infections. *Mol. Immunol.* **48**, 2203-2206 (2011).
23. Marchant, A. *et al.* Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J. Clin. Invest.* **111**, 1747-1755 (2003).
24. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373-384 (2010).
25. Boehme, K. W., Guerrero, M. & Compton, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.* **177**, 7094-7102 (2006).
26. Compton, T. *et al.* Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **77**, 4588-4596 (2003).
27. Lore, K. *et al.* Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J. Immunol.* **171**, 4320-4328 (2003).

28. Bozza, S. *et al.* Thymosin alpha1 activates the TLR9/MyD88/IRF7-dependent murine cytomegalovirus sensing for induction of anti-viral responses in vivo. *Int. Immunol.* **19**, 1261-1270 (2007).
29. Tabeta, K. *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3516-3521 (2004).
30. Schroder, N. W. & Schumann, R. R. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 156-164 (2005).
31. Ducloux, D. *et al.* Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int.* **67**, 2454-2461 (2005).
32. Kijpittayarit, S., Eid, A. J., Brown, R. A., Paya, C. V. & Razonable, R. R. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 1315-1320 (2007).
33. Carvalho, A. *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **37**, 1022-1029 (2009).
34. Biron, C. A., Byron, K. S. & Sullivan, J. L. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1731-1735 (1989).
35. Farrell, H. E., Degli-Esposti, M. A. & Davis-Poynter, N. J. Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses. *Immunol. Rev.* **168**, 187-197 (1999).
36. Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495-502 (2008).
37. Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-729 (1999).
38. Wu, J. *et al.* An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* **285**, 730-732 (1999).
39. Cosman, D. *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-133 (2001).
40. Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., Lawrence, W. A., Rein-Weston, A. & Cosman, D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 129-135 (2003).
41. Obeidy, P. & Sharland, A. F. NKG2D and its ligands. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2364-2367 (2009).

42. Sutherland, C. L. *et al.* UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J. Immunol.* **168**, 671-679 (2002).
43. Upshaw, J. L. & Leibson, P. J. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin. Immunol.* **18**, 167-175 (2006).
44. Wilkinson, G. W. *et al.* Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* **41**, 206-212 (2008).
45. Chalupny, N. J., Rein-Weston, A., Dosch, S. & Cosman, D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 175-181 (2006).
46. Ogawa, H. *et al.* Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J. Infect. Dis.* **195**, 782-788 (2007).
47. Chen, J. *et al.* Toll-like receptors and cytokines/cytokine receptors polymorphisms associate with non-response to hepatitis B vaccine. *Vaccine* **29**, 706-711 (2011).
48. Ovsyannikova, I. G. *et al.* The role of polymorphisms in Toll-like receptors and their associated intracellular signaling genes in measles vaccine immunity. *Hum. Genet.* **130**, 547-561 (2011).
49. Bochud, P. Y., Magaret, A. S., Koelle, D. M., Aderem, A. & Wald, A. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *J. Infect. Dis.* **196**, 505-509 (2007).
50. Zhou, L. *et al.* Polymorphism in 3'-untranslated region of toll-like receptor 4 gene is associated with protection from hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **13**, 250-258 (2011).
51. Ricci, E. *et al.* Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Transl. Med.* **8**, 49-5876-8-49 (2010).
52. Katsuyama, Y. *et al.* Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* **54**, 178-184 (1999).
53. Zhang, Y., Lazaro, A. M., Lavingia, B. & Stastny, P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum. Immunol.* **62**, 620-631 (2001).
54. Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734-738 (2002).

55. Inoue, N. & Russell, D. W. Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **72**, 7024-7031 (1998).
56. Taniguchi, R. *et al.* Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e1092-7 (2013).
57. Hayati, A. R., Mohamed, A. E. & Tan, G. C. An immunohistochemical study of Toll-like receptors 2 and 4 in placenta with and without infection. *Malays. J. Pathol.* **32**, 13-19 (2010).
58. Chan, G. & Guilbert, L. J. Ultraviolet-inactivated human cytomegalovirus induces placental syncytiotrophoblast apoptosis in a Toll-like receptor-2 and tumour necrosis factor-alpha dependent manner. *J. Pathol.* **210**, 111-120 (2006).
59. Chen, K. H. *et al.* Identification of haplotype tag SNPs within the entire TLR2 gene and their clinical relevance in patients with major trauma. *Shock* **35**, 35-41 (2011).
60. Taylor, B. D. *et al.* Cross-sectional analysis of Toll-like receptor variants and bacterial vaginosis in African-American women with pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.* **90**, 563-566 (2014).
61. Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 285-298 (2002).
62. Pagani, F. & Baralle, F. E. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 389-396 (2004).
63. Brest, P. *et al.* A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* **43**, 242-245 (2011).
64. Duan, J. *et al.* Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 205-216 (2003).
65. Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D. & Plotkin, J. B. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* **324**, 255-258 (2009).
66. Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 683-691 (2011).
67. Tong, H. V. *et al.* Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: functional roles of MICA variants. *J. Viral Hepat.* **20**, 687-698 (2013).
68. Keane, C. *et al.* Variation in both IL28B and KIR2DS3 genes influence pegylated interferon and ribavirin hepatitis C treatment outcome in HIV-1 co-infection. *PLoS One* **8**, e66831 (2013).

69. Brown, B. K. *et al.* The role of natural killer (NK) cells and NK cell receptor polymorphisms in the assessment of HIV-1 neutralization. *PLoS One* **7**, e29454 (2012).
70. Moenkemeyer, M., Heiken, H., Schmidt, R. E. & Witte, T. Higher risk of cytomegalovirus reactivation in human immunodeficiency virus-1-infected patients homozygous for MICA5.1. *Hum. Immunol.* **70**, 175-178 (2009).
71. Ogasawara, K. & Lanier, L. L. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J. Clin. Immunol.* **25**, 534-540 (2005).
72. Tumorhhu, M., Saitoh, M., Takita, J., Mizuno, Y. & Mizuguchi, M. A novel SOS1 mutation in Costello/CFC syndrome affects signaling in both RAS and PI3K pathways. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **33**, 124-128 (2013).
73. Noyola, D. E. *et al.* Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3256-3266 (2012).
74. Garrity, D., Call, M. E., Feng, J. & Wucherpfennig, K. W. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7641-7646 (2005).
75. Amir, J., Wolf, D. G. & Levy, I. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long-term oral valganciclovir. *Eur. J. Pediatr.* **169**, 1061-1067 (2010).
76. Kimberlin, D. W. *et al.* Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J. Pediatr.* **143**, 16-25 (2003).