

論文の内容の要旨

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

【背景・目的】

20 年以上前までは、ほとんどの妊婦がサイトメガロウイルス(CMV)に対する抗体を持っていたが、現在日本における妊婦の抗体保有率は約 70%である。血清学的に見て感染歴のない妊婦が CMV の初感染を起こした場合、約 40%で経胎盤感染が起こる。

2008 年以降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 感染の割合を把握すること、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 スリーニング調査を行ってきた。その結果、正常出生児 300 人に 1 人に感染が判明し、その 30%に典型的な症状または頭部画像所見の異常を認めることが分かった。

CMV は先天性ウイルス感染の中で最多の原因ウイルスとなっているが、初感染した妊婦の全てで胎内感染が起こる訳ではないこと、一部の感染児のみ出生時顕性であること、出生時不顕性児の一部に遅発性の神経学的障害が発症することなど、臨床経過は多様であり、胎内感染、出生時及び遅発性の感染症発症に関わる危険因子は明らかでない。胎児や新生児は獲得免疫が弱く、自然免疫が先天性感染において重要な役割を果たしている可能性がある。また、近年、自然免疫に関わる遺伝子の多型が、様々なウイルスへの感受性や臨床経過に関係するという報告が増えている。

そこで、本研究では、自然免疫に関わる Toll 様受容体(TLR)、Natural killer(NK)細胞の活性化受容体 NKG2D をコードする遺伝子の一塩基多型(SNP)や、CMV 感染により細胞表面での発現が制御を受ける、NKG2D のリガンド MICA の遺伝子アレルが、先天性 CMV 感染及び感染症発症と相関を有するかを解析した。さらに NKG2D 遺伝子上の非同義置換 SNP により NKG2D のリガンドとの結合やその結果としてのシグナル伝達に差が見られるかを検討した。

【方法】

1) 研究対象

対象は①スクリーニング調査で CMV 陽性であった児、②発達遅滞または難聴を主訴とし、後

方視的に先天性 CMV 感染と診断された児、③出生前または出生時に先天性 CMV 感染が疑われ、生後確定診断された児、計 87 人の先天性 CMV 感染児とした。研究内容について各施設の倫理委員会より承認を得た上で、対象者の両親より研究参加への同意を得て研究をおこなった。

2) 臨床評価

臨床症状や聴力検査、頭部画像検査の結果など臨床情報はカルテから得た。出生時顕性児は、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。

3) SNP・アレルの解析

TLR 遺伝子については、CMV に関わる TLR2、4、9 遺伝子上に存在し、日本人においてマイナー遺伝子型が 5%以上であり、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 5 つの SNP を解析した。NKG2D 遺伝子については、日本人に多型が存在する非同義置換 SNP 1 つを解析した。SNP の遺伝子型は、TaqMan allelic discrimination 法を用いて決定した。MICA 遺伝子アレルは Exon 2、3 の一部の塩基配列を解析して決定した。多型と感染・感染症のリスクの相関はオッズ比、95%信頼区間、P 値から推測した。

4) NKG2D 遺伝子上の SNP により起こる、NKG2D の機能への影響の解析

SNP と先天性 CMV 感染症との相関に関する結果に基づき、解析した NKG2D 遺伝子上の SNP により起こる、NKG2D の機能への影響を検討した。

まず、NKG2D と MICA の結合への影響を解析するため、アダプター分子 DAP10 と NKG2D を発現させた 293T 細胞を、蛍光リガンドを加えた MICA 発現 293T 細胞と共培養し、抗 NKG2D 蛍光抗体量と蛍光リガンド量を指標にフローサイトメトリーを行った。

次に、NKG2D のシグナル伝達経路の一つである PI3K-Akt 経路への影響を解析するため、DAP10 と NKG2D を発現させた 293T 細胞と、MICA を発現させた 293T 細胞を共培養した後、Akt 蛋白を免疫沈降し、リン酸化 Akt 特異的抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、遺伝子型によるリン酸化の差を比較した。

【結果】

TLR 遺伝子上の SNP と先天性 CMV 感染の関係について調べるため、一般日本人と先天性 CMV 感染児で遺伝子型の頻度を比較したところ、TLR2 遺伝子の SNP rs3804100 では、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。また、TLR2 遺伝子の SNP rs1898830 では、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。同 SNP 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。TLR4、9 遺伝子の SNP では、相関は見られなかった。

TLR 遺伝上の SNP と先天性 CMV 感染症の関係について調べるため、「出生時不顕性」対「出生時顕性」、「遅発症状なし」対「遅発症状あり」、「CMV に関係する臨床的特徴なし」対「CMV に関係する臨床的特徴あり」の各群で遺伝子型の頻度を比較したが、いずれの群間でも統計学的有意差はなかった。

NKG2D 遺伝子上の SNP rs2255336 (Thr72Ala, c214.A>G)についても、TLR 遺伝子と同様の群間の比較を行い、出生時不顕性感染児に比べ顕性感染児で有意に A アレルが多いことが判明した。その他の群間の比較では、統計学的有意差はなかった。

MICA 遺伝子アレルと先天性 CMV 感染症の関係について調べるため、前述の群間で比較を行ったが、統計学的有意差はなかった。

次に前述した NKG2D 遺伝子上の非同義置換 SNP による NKG2D と MICA の結合への影響を調べたが、GG 遺伝子型と AA 遺伝子型では有意差がなかった。

NKG2D のシグナル伝達の一つ、PI3K-Akt 経路についても多型による影響は見られなかった。

【考察】

TLR 遺伝子上の SNP と先天性 CMV 感染・感染症との相関の解析では、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。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く、母体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。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にある。

先天性 CMV 感染との相関が見られた TLR2 遺伝子の 2 つの SNP は、共にアミノ酸配列に変化はない。しかし、これらの SNP が他のウイルス感染に関わることも報告されており、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。実際、翻訳領域の外に位置する遺伝子多型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たと報告されている。

本研究の限界点としては、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。また、後方的診断での顕性感染児を加えて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、スクリーニング調査は一般日本人を反映しており、そこで同定された 48 人の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、そうした影響はないと言える。

NK 細胞に関わる遺伝子の多型と先天性 CMV 感染・感染症との相関の解析では、NKG2D 遺

伝子の非同義置換 SNP rs2255336 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。さらに、SNP rs2255336 により起こる、NKG2D の機能への影響も検討したが、今回解析した範囲では、多型による NKG2D 機能の差は見られなかった。その原因として、用いた細胞が本来機能を発揮する NK 由来の細胞ではないことも考えられるが、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は現実的には不可能である。実際、上皮系細胞である 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ことから、次善の方法であったと考えられる。

NKG2D の非同義置換 SNP rs2255336 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。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。従って、PI3K-Akt 経路のシグナルに有意な多型の影響は今回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。

【結論】

本研究で、TLR2 遺伝子上の SNP が先天性 CMV 感染の危険因子になっている可能性、NKG2D 遺伝子上の非同義置換 SNP が先天性 CMV 感染症と関係している可能性が示された。今後、こ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のかを解明することにより、先天性 CMV 感染及び感染症発症の機序を明らかにし、その対策に資することができると考えられる。