

# 抗原特異的T細胞プロファイリングによる、 妊婦におけるサイトメガロ感染症の免疫動態の解明 と診断法の開発

Elucidation of immunokinetics and development of diagnostic modality  
for congenital cytomegalovirus infection by antigen-specific T cell profiling  
at single cell level

東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科 助教 田口 歩

## 要 旨

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染は、世界的に最も多い先天性感染症であり、感音性難聴や発達遅延の主要な原因である。妊娠中CMV感染症の診断において、初感染でないにも関わらずCMV IgMが陽性となる persistent IgMの存在や、妊娠中のCMV再活性化に伴う母子感染の存在より、正確な診断が困難であった。近年の単一細胞解析技術の発展に伴い、免疫細胞の活性化や認識抗原の特徴が詳細にわかるようになってきた。本研究では、妊娠中のCMV感染症の免疫動態の解明と診断法の開発を目的として、抗CMV CD8 T細胞単一細胞解析を行った。

2019年2月から2021年6月の間に東京大学病院を受診した妊婦を対象とし、妊娠15週から20週間に血液サンプルを採取し、末梢血単核球（PBMC）を分離した。PBMCからCMV-pp65とCMV-IE1に対するCD8 T細胞を単離し、10x単一細胞RNA-sequence解析を実施した。

CMV特異的CD8 T細胞は、既往感染ではメモリーT細胞が主であるのに対して、初感染ではエフェクターT細胞が中心であること、persistent IgM症例でもエフェクターT細胞が存在することがわかった。さらに、初感染症例において、JUN/FOS活性を持つエフェクターT細胞やHLA-Class II発現の高いエフェクターT細胞が増加することが確認できた。さらに認識CMV抗原に注目すると、初感染では複製に関連する蛋白であるIE1に対するCD8 T細胞が主であるのに対して、既往感染ではテグメント蛋白であるpp65に応答するCD8 T細胞が主であることが分かった。

CMV特異的単一細胞解析を行うことで、妊娠中のCMV感染症の細胞性免疫動態が明らかとなった。今後症例数を増やすことで先天性CMV感染症におけるCD8 T細胞の特徴解明に繋がることが期待される。

## 緒 言

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染は、世界的に最も多い先天性感染症であり、感音性難聴や発達遅延の主要な原因である。日本では、新生児の解析から、先天性感染は約300人に1人、症候性先天性感染は約1000人に1人と報告されている<sup>1</sup>。先天性感染のリスクは初感染妊婦で高いが、過去に感染した妊婦でも妊娠中のCMV再感染や再活性化により先天性感染は起こり、先天性CMV感染症の約半数は既往感染妊婦で起こっているといわれている<sup>2</sup>。

妊娠中のCMV感染のスクリーニングには、CMV

IgGとIgMを組み合わせた血清診断が広く用いられている。CMV IgMの存在は、最近の感染または進行中の感染を示唆する。CMV IgM検出の診断感度は初感染の検出には十分であるが、初感染ではないにも関わらずIgM陽性が持続する“persistent IgM”の病態が存在することより、特異度は十分とはいえない。CMVの感染時期の推定には、CMV IgMとIgGの組み合わせに加え、CMV IgG avidity検査が用いられてきた。しかし、IgG avidityアッセイはまだ検討中の検査であり標準化されていない<sup>3</sup>。このように、妊娠中のサイトメガロウイルス感染において、

「IgMが持続する persistent IgMの病態が未解明であること」や、「精度の高い診断法がないこと」など、いくつかの課題が残されている。

妊娠中の免疫の特徴としては、Th1活性が抑制されたTh2優位のサイトカインバランスとなることや制御性T細胞 (Treg) の割合が増加することが知られている。これらの変化は、父親由来の抗原性を持つ胎児を受け入れるために必要であるが、抗ウイルス反応の減弱と関連している<sup>4,5</sup>。したがって、妊娠中のCMV感染の病態を理解するためには、抗CMV細胞性免疫についての理解を深めることが必要である。近年、T細胞受容体 (TCR) のレパトア解析や免疫細胞の単一細胞解析技術の進歩により、CMV感染症に対する理解が進んでいる。特に造血幹細胞移植 (HSCT) の分野での発展は目覚ましい。シングルセルRNAシーケンス (scRNA-seq) 解析により、ドナー由来のT細胞クローンはCMV再活性化に伴い増殖するが、レシピエント由来のクローンも優位性を維持することが明らかとなった。さらに、ドナー由来のCMV反応性クローンのTCRは、レシピエントのTCRと類似していることが報告された<sup>6</sup>。妊婦におけるCMV感染症分野においても、TCR解析や単一細胞解析を用いることで、その病態解明が進むことが期待される。

## 方法

### 1. 妊婦コホートとサンプル処理

本研究におけるすべての手順は、東京大学の施設審査委員会により承認された (承認番号 12017)。患者検体の採取については、各患者から書面でのインフォームドコンセントを得た。さらに、すべての方法は、関連するガイドラインおよび規則に従って実施された。患者コホートには、2019年2月から2021年6月の間に東京大学病院を受診した妊婦を対象とし、CMV抗体価とCMV IgG avidityをもとにCMV感染症状態を診断した。妊娠15週から20週の間血液サンプルを採取し、末梢血単核球 (PBMC) を凍結保存した。

### 2. 10x 単一細胞解析

対象妊婦のうち、HLA-A \*24:02のドナー10名から得た15検体を対象として、CMV抗原認識CTLの分離及びライブラリ調整、scRNA-seqを行った。CMV抗原認識CTLの分離には、A2402 AYAQKIFKI (IE1) ,

A2402 QYDPVAALF (pp65) , A2402 VYALPLKML (pp65) の3種のDextramerと、抗CD8抗体を用いた。scRNA-seqは、10xgenomics社のChromiumControllerを用いて行った。scRNA-seqのデータ解析は滋賀大学データサイエンス学部の協力の下で行った。UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) クラスタリングを行い、細胞集団を12個のクラスターに分類した。各クラスターの発現遺伝子は、シングルセル遺伝子発現データ分析のためのパッケージであるscanpy (<https://scanpy.readthedocs.io/en/stable/index.html>) を用いて他のクラスターに発現する遺伝子に対する相対的な発現量を評価した。

## 結果

単一細胞解析を行った患者一覧を表1にまとめた。初感染が4人、既往感染が2人、Persistent IgM症例が3人、未感染が1人であった。XA0045症例は解析検体のIgG avidityは高いもののIgG値が13週から21週にかけて9.3→17.5と上昇しており、IgM値も13週時点で6.33と高値であったこと、17週から21週にかけてIgG avidityが77%から92.2%と上昇したことから総合的に初感染症例と診断した。またXA0104症例については、IgG avidityは22%と低かったが、妊娠期間を通してIgG avidity低値が持続しており、persistent IgM症例に分類した。未感染の一人からはCMV特異的CD8 T細胞はほとんど採取できなかった。

UMAPで次元削減を行ったところ、12個のクラスターに分かれた (図1)。C12はダブレットが多かったため除いて解析を行った。特徴的なクラスターとしては、C4ではgranzyme K (GZMK) 発現が高くgranzyme B (GZMB) 発現が低くメモリーT細胞であることが考えられた。また、C10もGZMKの発現が高くGZMBやGZMHの発現が低いというメモリー分画の特徴を有しかつ、interleukin 7 receptor (IL7R) やtranscription factor 7 (TCF7) 発現が高くエフェクターT細胞から誘導されたセントラルメモリーであると考えられた。C8についてはGZMKの発現は認めないがGZMKの発現も低くメモリーでもエフェクター分画にも分類されなかった。それ以外のクラスターについては、GZMBやGZMH、Granulysin (GNLY) の発現を有する典型的なエフェクター分画であった。エフェクター分画の中で特徴的なクラスターとしては、C11ではstathmin 1

表1. 症例一覧

症例ID	年齢	妊娠分娩回数	タグ	妊娠週数	CMV IgG	CMV IgM	IgG Avidity	出産週数	CMV-DNA (新生児)	感染症状態
XA0045	38	G2P1	D1-1	21	17.5	2.89	92.2	38	陰性	初感染
			D1-2	36	13.7	1.78	91			
XA0068	33	G2P1	D1-3	13	24.1	0.59	92	38	陰性	既往感染
			D1-4	36	18.8	0.44	88.8			
XA0086	28	G1P0	D1-5	21	27	5.16	2.2	39	陰性	初感染
			D1-6	36			57.4			
XB0031	35	G2P0	D1-7	20	2	0.5		39	陰性	未感染
Me12w	34	G2P1	D1-8	12	13.2	0.31		38	陰性	既往感染
XA0116	34	G5P2	D2-1	19	5.1	1.4	54.5	38	陽性	初感染
			D2-2	28	6.3	0.96	68.9			
XA0119	33	G2P1	D2-3	11	11.4	3.64	7.7	21	陽性	初感染
			D2-4	20			73.2			
XA0104	26	G1P0	D2-5	23	23.5	3.18	22.1	40	陰性	Persistent IgM
XA0109	36	G2P1	D2-6	18	13.1	1.47	79.5	38	陰性	Persistent IgM
XA0108	33	G3P2	D2-7	15	14.7	2.25	88.8	38	陰性	Persistent IgM

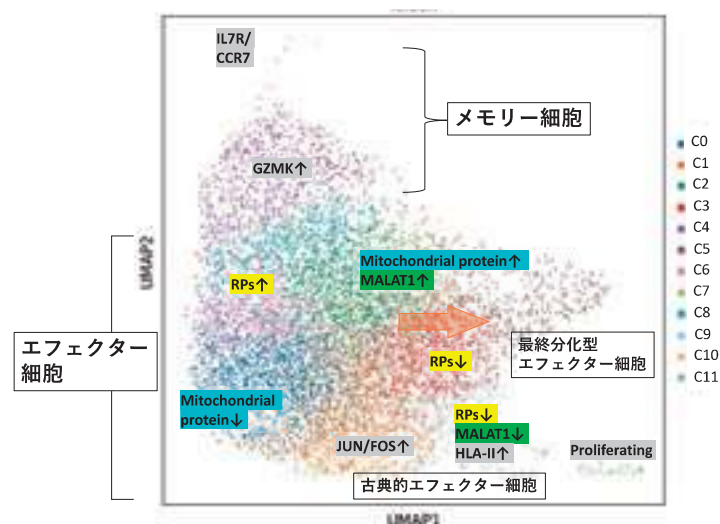


図1. CMV特異的CD8 T細胞のクラスター分類

CMV特異的CD8 T細胞をもとに単一細胞解析を行い、UMAPによる次元削減を行った結果、主に11個のクラスターに分類された。

IL7R, interleukin 7 receptor; CCR7, C-C chemokine receptor type 7; GZMK, granzyme K; RPs, ribosomal proteins; HLA-II, class II human leukocyte antigen; MALAT1, metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1.

(原著論文で投稿予定から改編)

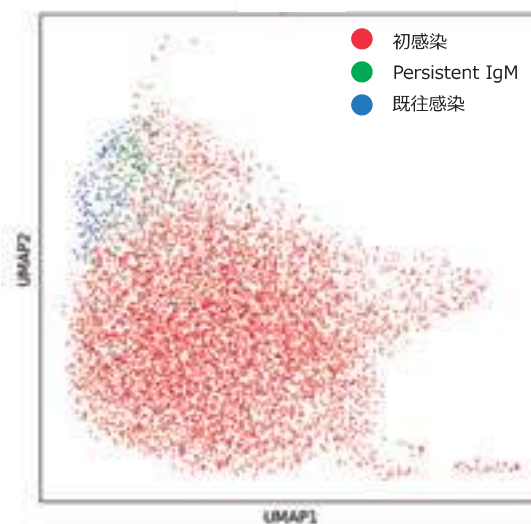
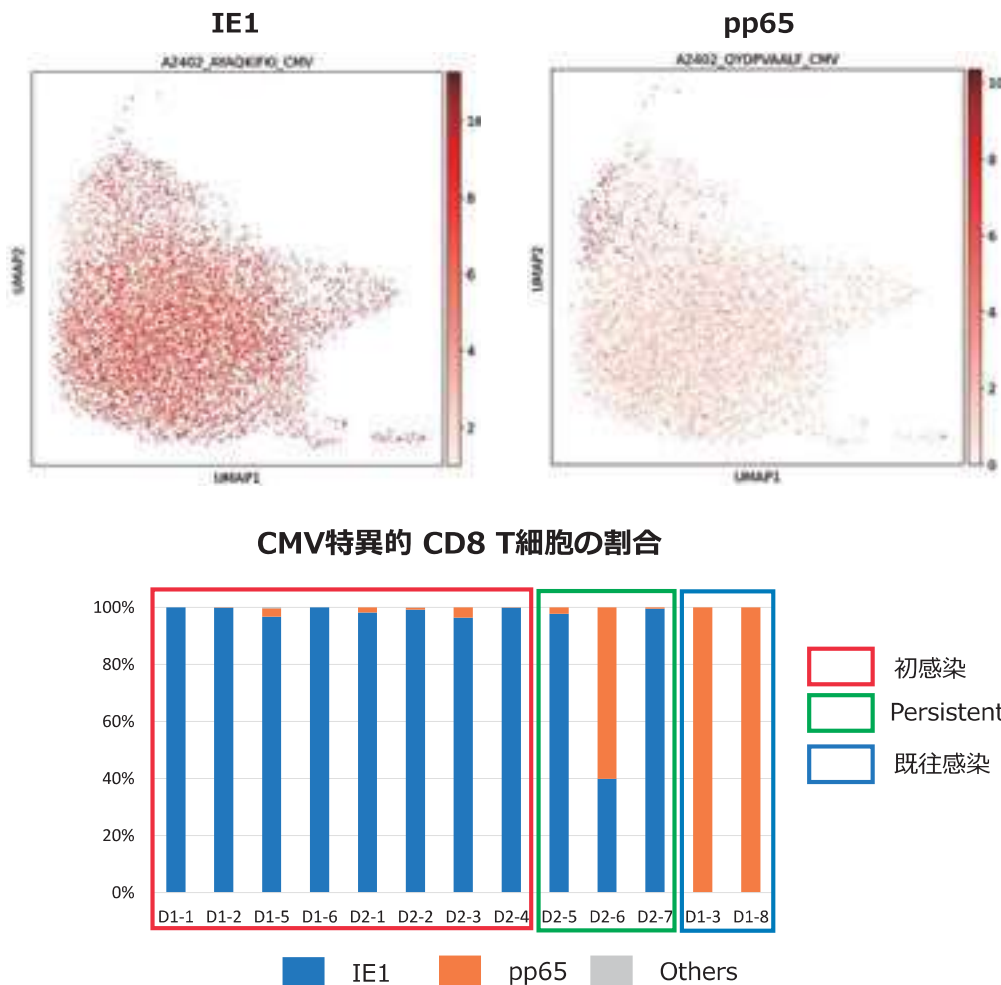


図2. CMVの血清学的診断に基づく、CMV特異的CD8 T細胞の分布

(原著論文で投稿予定図から改編)



**図 3. 認識CMV抗原に基づく、CMV特異的CD8 T細胞の分布**  
 上図：それぞれ、IE1：A2402 AYAQKIFKI(左) と、pp65：A2402 QYDPVAALF(右) に結合するCD8 T細胞の分布を示した。  
 下図：各症例における、認識抗原の割合を表した。  
 (原著論文で投稿予定から改編)

(STMN1) や proliferating cell nuclear antigen (PCNA) などの細胞分裂マーカーの発現上昇を認め分裂が盛んなCD8 T細胞であることが分かる。また、C1はJUN/FOSの活性化を伴うエフェクターT細胞であった。そのほかのクラスターはミトコンドリア関連遺伝子発現、リボソームRNA発現、代謝関連遺伝子である metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1 (MALAT1) 発現により分類されており、C0とC6はミトコンドリア関連遺伝子発現が低く、C6ではリボソームRNA発現が上昇し、C2においてはMALAT1の発現上昇がみられる。C5ではMALAT1の発現は高い状態であるがリボソームRNA発現は低下していた。C9ではMALAT1発現もリボソームRNA発現も低下していたがHLA-Class II発現が上昇しており活性化の高い機能的なCD8 T細胞であると考えられた。

次に感染状態によるCD8 T細胞の分布を確認し

た。初感染症例では、エフェクター分画を中心に分布していた。エフェクター機能が低いC1 (JUN/FOS) とC9 (HLA-Class II発現上昇) においては初感染症例が中心で既往感染やpersistent IgM症例ではほとんど認めなかった。またpersistent IgM症例はC4とC10のメモリーT細胞を認めた以外に、エフェクター分画にもCD8 T細胞の分布を認めた。一方、既往感染症例ではC4が中心であった。

なお、C4に注目すると、初感染、既往感染、persistent IgM症例、でCD8 T細胞の分布に特徴があることがわかった (図2)。

次に、CMVの抗原性について評価した。症例ごとにpp65に対するCD8 T細胞とIE1に対するCD8 T細胞の割合を検討した。その結果、初感染症例では全ての症例でIE1に反応するCD8 T細胞が主であるのに対して、既往感染症例では、pp65に対するCD8 T細胞が中心であった。Persistent IgM症例について

は3例中2例でIE1優位型、1例はpp65とIE1に対するCD8 T細胞が半分ずつの割合であった(図3)。

## 考 察

CMV特異的CD8 T細胞を対象に単一細胞解析をすることで、妊娠中のCMV感染状態に応じた抗CMV CD8 T細胞の活性化や抗原性を詳細に調べることができた。既往感染ではメモリーT細胞が主であり、初感染ではエフェクターT細胞が中心であること、persistent IgM症例でもCMVに対するエフェクターT細胞が存在することがわかった。さらに興味深いことに、CMV感染状態に応じて認識CMV抗原に違いがある可能性が示唆された。

まず、CMV感染症の状態によりCD8 T細胞の分化や活性化が異なることが明らかになった。初感染においてはほとんどがエフェクターT細胞であり、既往感染においてはほとんどがメモリーT細胞であった。興味深いことに、persistent IgM症例はメモリー分画が存在するものも2例中3例で認めたが、いずれの症例においてもエフェクターT細胞の存在が確認された。このことから、persistent IgM症例においてはCMVの再活性化もしくは再感染による活動的な抗CMV免疫応答が起こっていることが考えられた。

次に、抗原性に目を向けてみると、初感染症例では全ての症例でウイルス複製に関係するIE1に対する免疫応答が主であることがわかった。一方で、既往感染症例ではウイルス複製に関係するIE1に対する免疫応答は少なくテグメント蛋白であるpp65に対する応答が中心であることがわかった。また、persistent IgM症例ではpp65応答T細胞の割合に差はあるものの、いずれの症例でもIE1に対する免疫応答が起こっていることが確認できた。このことからpersistent IgM症例では体内で、ウイルス複製が亢進しウイルスの再活性化が起こっていることが示唆された。今までpersistent IgMについては、感染時期からの時間が間もないことや検査の偽陽性などが原因として考えられてきた。本研究の結果から、persistent IgM症例ではIE1に対する免疫応答が起こっておりまたエフェクターT細胞分画が存在することがわかり、ウイルス複製を伴うCMVの再活性化状態を反映していることが示唆された。

次にエフェクター分画を詳細に見ていくと、高いエフェクター機能を反映するJUN/FOS活性を伴う

C1、HLA-Class II発現が高いC9については初感染にほぼ特異的な分画であり、初感染においてより強い免疫応答が起こっていることが推察された。その他のエフェクター分画は、リボソームRNA関連遺伝子発現、ミトコンドリア関連遺伝子発現、MALAT1発現により分類されることがわかった。リボソームRNA関連蛋白はCD8 T細胞の活性化段階で発現上昇し、最終分化型エフェクターT細胞においてはその発現は減少することが知られている<sup>7</sup>。また、ミトコンドリア関連蛋白は、CD8 T細胞の活性化や分化段階で発現を変化させ、特にCD8 T細胞の活性化段階において発現上昇することが知られている<sup>8</sup>。MALAT1はEZH2との直接的な相互作用を通じて、メモリー細胞関連遺伝子の多くでH3K27me3の増加と関連し、それによって最終分化型エフェクターや最終分化型エフェクターメモリーT細胞の分化が促進されることが報告されている<sup>9</sup>。これらの性質を考慮すると、リボソーム関連RNAが高発現してくるC6は活性化の初期段階にあるエフェクターT細胞であり、C2はミトコンドリア関連遺伝子発現が上昇した活性化状態のT細胞集団であり、MALAT1が高発現してリボソーム関連RNA発現が低いC5は最終分化型エフェクターT細胞といえる。また、ミトコンドリア関連蛋白の発現が低く、細胞骨格蛋白遺伝子発現が高いC0は抗原刺激に暴露され嫌気性応答となっているCD8 T細胞集団であると推定された。このように、単一細胞解析を行うことで、初感染におけるCMVに反応するCD8 エフェクターT細胞の特徴づけが可能となった。

本研究では、CMV特異的単一細胞解析を行うことで、妊娠中のCMV感染症の細胞性免疫動態が明らかとなった。今後症例数を増やすことで先天性CMV感染症におけるCD8 T細胞の特徴解明に繋がることが期待される。

## 参考文献

1. Shin Koyano, Naoki Inoue, Akira Oka, et al. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study *BMJ Open*, 2011;1(1):e000118.
2. Laura Puhakka, Marjo Renko, Merja Helminen et al. Primary versus non-primary maternal cytomegalovirus infection as a cause of symptomatic congenital infection - register-based study from Finland *Infect Dis (Lond)*, 2017;49(6):445-453.
3. S Lumley, M Patel, P D Griffiths. The combination of specific

- IgM antibodies and IgG antibodies of low avidity does not always indicate primary infection with cytomegalovirus *J Med Virol.* 2014;86(5):834-7.
4. Gil Mor, Ingrid Cardenas. The immune system in pregnancy: a unique complexity *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):425-33.
  5. Shigeru Saito, Akitoshi Nakashima, Tomoko Shima, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):601-10.
  6. Jami R Erickson, Terry Stevens-Ayers, Florian Mair, et al. Convergent clonal selection of donor- and recipient-derived CMV-specific T cells in hematopoietic stem cell transplant patients *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(6):e2117031119.
  7. Koichi Araki, Masahiro Morita, Annelise G Bederman, et al. Translation is actively regulated during the differentiation of CD8+ effector T cells *Nat Immunol.* 2017;18(9):1046-1057.
  8. Michael D Buck, David O, Sullivan, Erika L Pearce. T cell metabolism drives immunity *J Exp Med.* 2015;212(9):1345-60.
  9. Jad N Kanbar, Shengyun Ma, Eleanor S Kim, et al. The long noncoding RNA Malat1 regulates CD8+ T cell differentiation by mediating epigenetic repression *J Exp Med.* 2022;219(6):e20211756.

## Abstract

Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is the most common congenital infection worldwide. Accurate diagnosis of CMV infection during pregnancy has been difficult due to the presence of persistent IgM. With the recent development of single-cell analysis techniques, it has become possible to characterize in detail the activation of immune cells and the antigens they recognize. In this study, we performed anti-CMV CD8 T-cell single-cell analysis to elucidate the immune dynamics of CMV infection during pregnancy and to develop diagnostic methods. Pregnant women who visited the University of Tokyo Hospital between February 2019 and June 2021 were included in the study. Blood samples were collected between 15 and 20 weeks of gestation. CD8 T cells against CMV-pp65 and CMV-IE1 were isolated from the PBMCs and 10x single-cell RNA- sequence analysis was performed. Effector T cells were predominant in the primary infection, whereas memory T cells were predominant in the past infection, and effector fractions were also present in persistent IgM cases. Furthermore, the effector fractions with JUN/FOS activity and with high HLA-Class II expression were found to be increased in primary infection. Furthermore, focusing on the recognized CMV antigens, we found that CD8 T cells to IE1 were predominant in the primary infection, whereas CD8 T cells responding to pp65, were predominant in the past infection. CMV-specific single-cell analysis revealed the cellular immune dynamics of CMV infection during pregnancy. These findings are expected to lead to the characterization of CD8 T cells in congenital CMV infection.