

「本邦に特徴的な CMV 血症・眼感染症眼内液由来 CMV ゲノム解析と抗 CMV 免疫の解明」

現在の所属 職位 九州大学大学院医学研究院眼科 教授
氏名 園田 康平

要旨

本研究はアジア地域に多い CMV 前部ぶどう膜炎 (AU) の病態解明を目的とし、まず本邦の CMV 関連疾患 11 症例の CMV 全ゲノム情報を同定した。アジア由来 CMV は欧米由来 CMV とは全ゲノム系統樹上で明らかに分岐した。CMV-AU 由来ゲノムは UL144-UL145 領域の相同性低下がみられた。UL55 (gB) は眼内液と血液で遺伝型頻度が異なり、gB3/gB1 は眼検体の 8 割を占め、gB2 は血液検体で最多であった。gB3/gB1 陽性検体はウイルスコピー数が有意に高く、ペプチドの HLA 抗原提示能が低いことから、ウイルス増殖、gB 免疫回避能の高い CMV が眼内に侵入する可能性が示唆された。また、アジア由来 CMV gB3/gB1 に特徴的な K518R 置換を検出した。さらに CMV-AU 患者の抗 CMV T 細胞免疫応答解析から、ウイルス組織侵入防御能の低下と再活性化時の過剰応答が示唆され、抗 CMV 免疫の dysregulation や乖離が示唆された。また、CMV-AU のゲノムワイド関連解析では、有意水準を上回る関連は認められなかったものの、5 番染色体の *SH3PXD2B* 領域が CMV 眼感染症感受性に影響することが示唆された。

背景・目的

背景

CMV 前部ぶどう膜炎 (CMV-AU) はこれまでの疾患概念を覆し、2008 年に明らかな免疫異常のない宿主に発症する CMV 疾患として報告され、眼内液 PCR 検査の普及により、東アジアでは疾患頻度が欧米の 3-30 倍高頻度にみられることが明らかになった^{1,2}。ウイルス・ホストの遺伝的背景や、抗 CMV 免疫応答の異常が示唆されるが、病態や治療は確立していない³。

HCMV は約 235kb の DNA ウイルスで、その全長配列の決定は困難でウイルス分離が必須であった。近年の次世代シーケンスの進歩により、欧米から多くの全ゲノム情報が報告されているが、本邦をはじめ、アジア人由来の情報は中国、韓国からの 2 例のみで、日本人由来の全ゲノム情報は無い⁴。

CMV UL55 がコードする Glycoprotein B (gB) は宿主細胞侵入に重要なエンベロープタンパクであるとともに、自然抗体やワクチン開発の主要なターゲットタンパクである⁵。UL55 は furin cleavage site を中心に多型に富むが、これまでの報告では組織特異性やその機能的意義は明らかになっていない⁶。

CMV のコントロールには T 細胞や NK 細胞が重要であるが、これまでの研究は HIV 感染者や造血幹細胞移植後患者など高度免疫能低下患者におけるものであり、またその多くは欧米人を対象としたものである⁷。

以上を鑑み、本研究はアジア人由来の CMV ゲノムの特徴を明らかにするとともに、CMV 関連眼疾患に関わるウイルス・宿主因子や病態を解明し、発症リスクや予後予測、治療戦略の発展に寄与することを目標に下記を目的とした。

目的

1. CMV 全ゲノム解析

日本人由来 CMV 全ゲノムシーケンスの構築を行い、欧米由来 CMV との違いや、CMV-AU の特徴を解析する。

2. CMV UL55 遺伝子多型解析

CMV 関連眼疾患眼内液、血液中 CMV の UL55 多型の違い、アジア由来 CMV の UL55 多型、多型の機能的意義について解析する。

3. CMV-AU 患者の CMV 特異的 T 細胞免疫解析

CMV 血清陽性健康人と CMV 前部ぶどう膜炎患者の抗 CMV 免疫応答の違いを解析する。

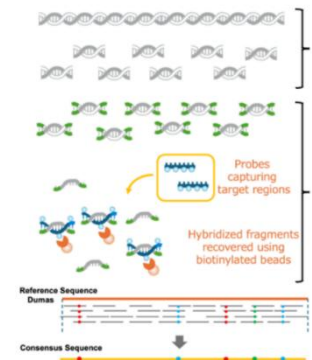
4. CMV-AU 患者のゲノムワイド関連解析

CMV-AU 患者の遺伝的背景を調べ、感受性座位を同定する。

方法

1. CMV 全ゲノム解析

CMV 血症、CMV 関連眼疾患の日本人患者由来血液検体、眼内液検体より gDNA を抽出し、CMV 全ゲノムの次世代シーケンスを行った (図 1)。シーケンスはターゲットエンリッチメントシステムを用いて、臨床検体中の核酸より CMV ゲノムを選択的に濃縮したライブラリーを用いて行った。シーケンスデータは、韓国人患者由来血液検体より同定された JHC 株をリファレンス配列として用いて比較し、コンセンサス配列を取得した。得られたコンセンサス配列において、カバレッジが低い箇所はサンガーシーケンスによって補填した。



得られたウイルスゲノム全長配列を NCBI データベースの欧米由来、

アジア由来全ゲノムデータとともに比較解析を行い、アジア由来 CMV や CMV-AU に特徴的な CMV ゲノムの特徴を調べた。

図 1 CMV 全ゲノム解析

2. CMV UL55 遺伝子多型解析

1) CMV 血症、CMV 網膜炎、CMV-AU、CMV 慢性網膜壊死の日本人患者由来血液検体、眼内液検体より gDNA を抽出し、UL55 furin-cleavage site 周辺領域の増幅とダイレクトシーケンス、続いて multiplex sequence-specific (SSP) PCR による遺伝子型の決定をした (図 2)。

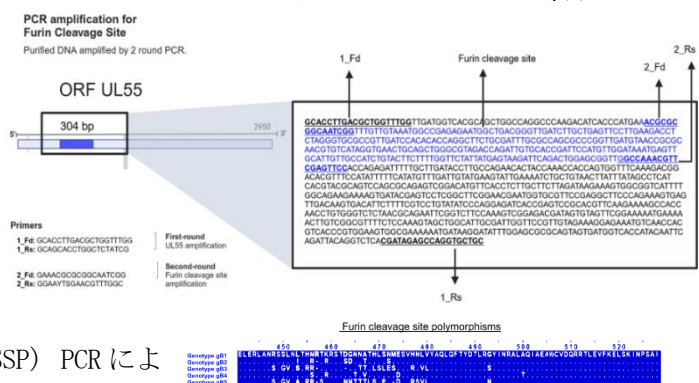


図 2 UL55 遺伝子多型解析

2) gB 由来の免疫原性の報告のあるペプチドで多型があり、

NetMHCIIpan-4.3 による HLA クラス II との結合予測 Rank 値に 2 倍以上の差のあるものを選択し、MHC-density assay を行った⁸(図 3)。

3) NCBI データベース上の欧米由来 220 CMV 全長配列とアジア由来 3 配列とともに furin-cleavage region 周囲の遺伝子多型を比べ、アジア由来 CMV に特徴的な多型を解析した。特異的なアミノ酸置換の gB タンパク構造変化予測を PyMOL を用いて行った。アミノ酸置換部位の自然選択圧を Bayesian 事後確率解析法を用いて解析した⁹。

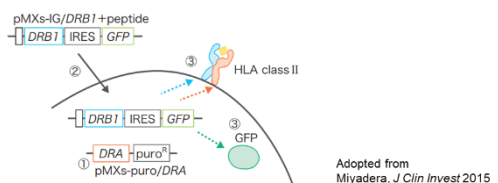


図 3 MHC density アッセイ

3. CMV-AU 患者の CMV 特異的 T 細胞免疫解析 (図 4)

1) HLA-A*24:02 をもつ CMV-AU 患者 11 人と CMV 血清陽性健康人

11人の8種類のCMVタンパク由来 overlapping ペプチドに対するT細胞のIFN- γ 、TNF- α 産生、脱顆粒応答を比べた。CMV-AU患者で高いCD8+T細胞免疫応答を誘導したIE1由来ペプチドをNetMHCpanで予測し、単独ペプチド刺激でT細胞活性化の確認を試みた。

2)CMV-AU患者6人、CMV血清陽性健康人5人のPBMCをIE1、pp65、gBオーバーラッピングペプチドで刺激し、刺激前後のCD8+T細胞をソートし、10XシングルセルRNAシーケンス解析とTCRシーケンス解析を行った。

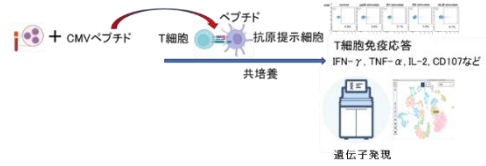


図4 抗CMV-T細胞応答の評価

4. CMV-AU患者のゲノムワイド関連解析

CMV-AU患者141名の血液を収集し、DNAを抽出しマイクロアレイ (Illumina Japanese Screening Array)による遺伝型測定を行った。また、日本眼科学会の協力の下、約1200名分の同マイクロアレイによる測定結果を入手した。測定した遺伝的変異について品質管理を行ない、1000ゲノムプロジェクトを参照配列とした全ゲノム塩基配列推定を実施した。関連解析は、人口構造化や近縁関係を調整できるSAIGE (Zhou et al. *Nat Genet* 2018)にて実施した。ゲノムワイド関連解析の有意水準としては、一般的に用いられるゲノムワイド有意水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$)とした。

結果

1. CMV全ゲノム解析

63例のCMV感染患者血液や眼内液検体の全ゲノム解析を試み、本研究期間にCMV-AU5例、CMV先天感染1例、CMV網膜炎2例、CMV慢性網膜壊死3例、計11例のCMV感染患者由来CMV全ゲノム配列を同定した。11例の全ゲノム情報とNCBIデータベース配列とのゲノム系統解析の結果、中国・韓国2例を含むアジア由来CMVゲノムは欧米由来CMVから分岐した(図5)。アジア由来と欧米由来CMVゲノムの違いについてさらに解析を進めている。また、CMV-AU患者由来CMVゲノムをその他のCMVゲノムと比較すると、UL144-UL145領域で相同性の低下がみられた(図6)。

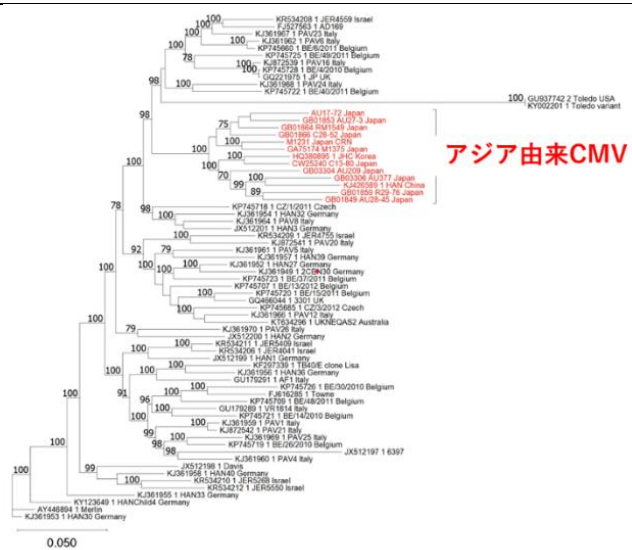


図5 アジア・欧米由来CMV全ゲノム系統解析

2. CMV UL55 遺伝子多型解析

CMV血症血液検体、CMV関連眼疾患血液、眼内液検体計49検体のCMV UL55 furin-cleavage region周辺領域のシーケンス解析に続き、62検体でmultiplex SSP PCRによるUL55遺伝子型タイピングを行った結果、血液検体と眼内液検体で有意な違いがみられた(図7)。血液ではgB2が41%を占め、続いてgB1が33%、gB3が11%であった。一方眼内液ではgB3が最多で43%、gB1が37%、gB2は17%であった。CMV関連眼疾患間のgB遺伝子型頻度に有意な違いはなかった。

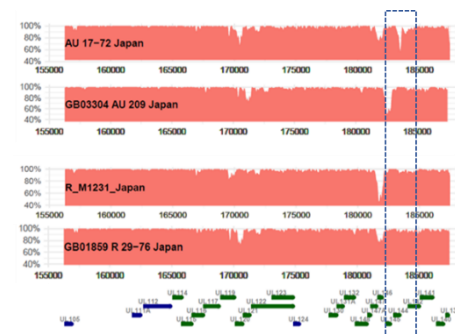
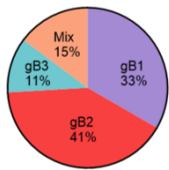
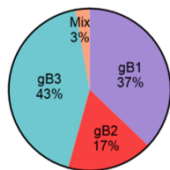


図6 CMV-AUと網膜炎由来ゲノム相同性

CMV In the Blood samples
n = 27



CMV In the Ocular fluid
n = 35



■ gB1
■ gB2
■ gB3
■ Mix Inf

図7 血液・眼内液 gB 遺伝子型頻度

| Genotype | n | Viral load | |
|----------|----|--|----|
| gB1 | 22 | 2.24×10^5 ($1.70 \times 10^4 - 6.60 \times 10^6$) | * |
| gB2 | 17 | 8.94×10^3 ($3.92 \times 10^3 - 1.61 \times 10^5$) | |
| gB3 | 18 | 9.53×10^5 ($2.01 \times 10^4 - 1.85 \times 10^7$) | ** |

Note: Copies/mL. Data are median (IQR: 25th–75th percentile). Kruskal–Wallis test; $p = 0.016$; Dunn's post hoc; mix infection was excluded.

*gB1 versus gB2; $p = 0.02$.

**gB3 vs gB2; $p = 0.01$.

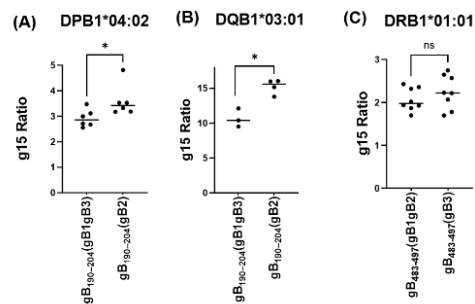
表1 gB 遺伝子型とウイルスコピー数

次に gB 型とウイルスコピー数の違いについて調べたところ、gB1/gB3 が検出された検体では gB2 が検出された検体と比べて有意にウイルスコピー数が高かった (表 1)。

次に gB 由来の免疫原性ペプチドで gB 型間で多型があり、患者群や本邦にみられる HLA クラス II との結合能の差が予測されるものとして、gB2 由来の gB₁₉₀₋₂₀₄ (gB2) (SRVIGT~~U~~TVFVAYHRD) と眼内液の 8 割を占

める gB1/gB3 由来の gB₁₉₀₋₂₀₄ (gB1gB3) (SRVIA~~G~~TVFVAYHRD) のペアが挙げられた。これらのペプチドが提示される HLA クラス II タンパク DPB1*04:02、HLA-DQB1*03:01 上の発現レベルを MHC-density assay で比べると、gB1/gB3 由来ペプチドは gB2 由来ペプチドと比べて HLA 発現レベルが有意に低かった (図 8)。

次に本研究で得られた UL55 furin cleavage site 周囲のシーケンスを NCBI データベースと比べ、アジアに特徴的な多型を検索したところ、K518R 置換が gB1/gB3 を持つアジア由来 CMV の 80%にみられた一方、欧米由来 CMV では 3%のみであった (図 9)。また、K518R 置換は gB2 にはみられなかった。in silico モデルで解析 K518R 置



Peptide gB₁₉₀₋₂₀₄ Peptide gB₁₉₀₋₂₀₄ Peptide gB₄₈₃₋₄₉₇

図8 MHC density アッセイ

換が gB1/gB3 を持つアジア由来 CMV の 80%にみられた一方、欧米由来 CMV では 3%のみであった (図 9)。また、K518R 置換は gB2 にはみられなかった。in silico モデルで解析 K518R 置

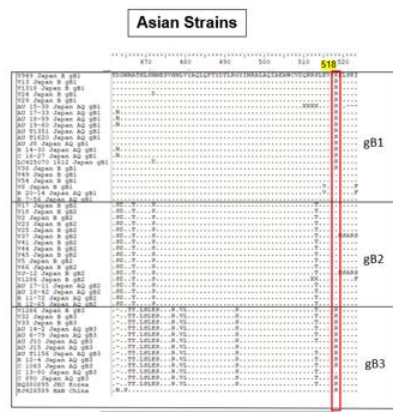


図9 アジア・欧米 CMV gB 多型

換の gB タンパク構造への影響を予測すると、本置換は gB Domain III の頂上付近に存在し、Domain 内の Glu515 と Glu519、Domain IV の Glu597 との相互作用を強め、gB postfusion 構造の安定性を高める可能性が示唆された (図 10)。

さらに K518R への選択圧を解析すると、正の選択圧がかかっていることが示唆された。

3. CMV-AU 患者の CMV 特異的 T 細胞免疫解析

CMV-AU 患者では IE1、IE2、UL82 に対する CD8+T 細胞応答が有意に高く、UL55 への応答が低い傾向がみられた (図 11)。pp62 刺激には有意差がなかった。

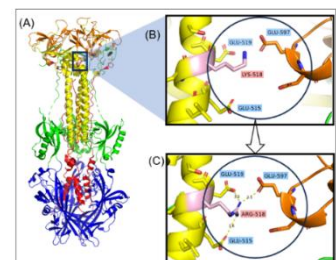


図10 アジア CMV gB K518R による構造変化予測

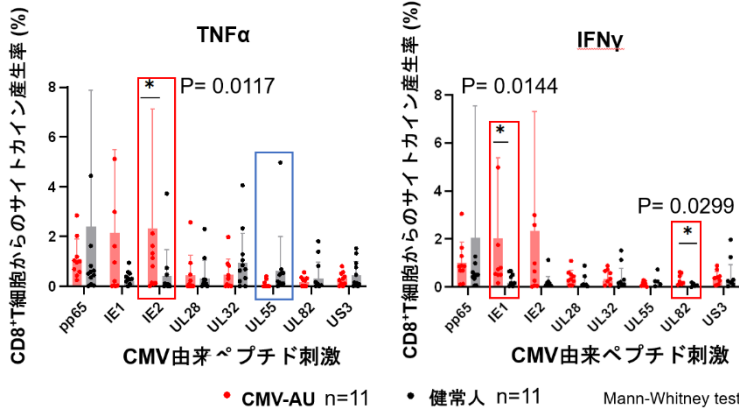


図 11 CMVAU 患者と CMV 血清陽性健常人の T 細胞抗 CMV 免疫応答

NetMHCpan を用い、HLA-A*24 と高い親和性を持つと予想される IE1/IE2 由来ペプチド (IE1 由来ペプチド 4 種、IE2 由来ペプチド 2 種) を同定したが、ペプチド刺激実験で強い T 細胞活性化を確認することはできなかった。そこで CMV-AU 患者と CMV 血清陽性健常人 PBMC の IE1, UL55, pp65 オーバーラッピングペプチド刺激前後の CD8+T 細胞のシングルセル RNA シーケンス解析を行った。

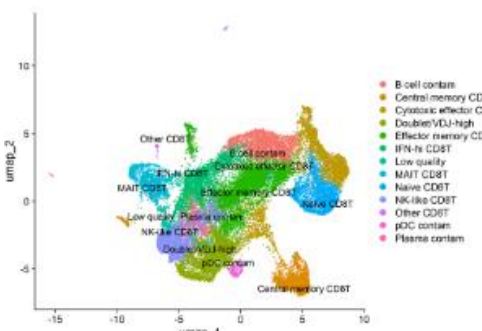


図 12 IE1 刺激 CD8+T 細胞クラスター

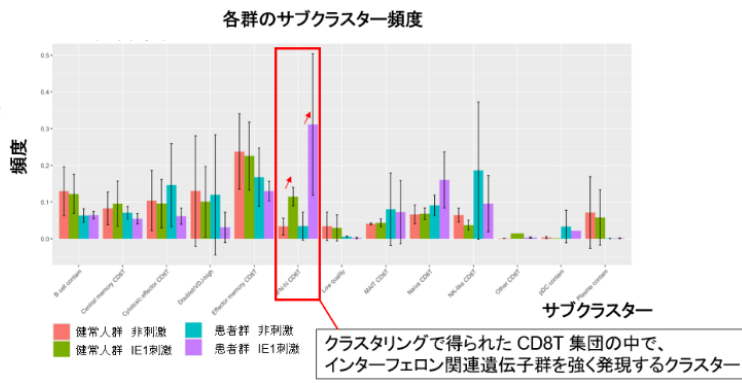


図 13 各クラスター頻度

IE1 刺激前後の解析では CD8+T 細胞が 17 のサブクラスターに分類された (図 12)。

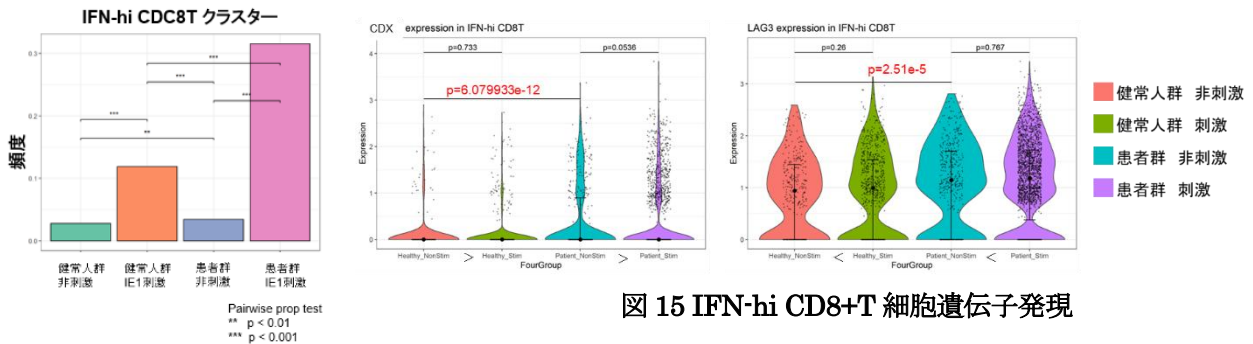


図 14 IFN-hi CD8+T クラスター頻度

図 15 IFN-hi CD8+T 細胞遺伝子発現

これらのサブクラスターの中で患者群で高頻度に見られたのは、IFN 関連遺伝子を高発現するクラスターであり、刺激前後でいずれも有意に高頻度であった (図 13, 14)。

さらに、患者群の IFN-hi CD8+T クラスターでは CDX の発現が高く、LAG3 などの疲弊化マーカーの発現が上昇していた (図 15)。

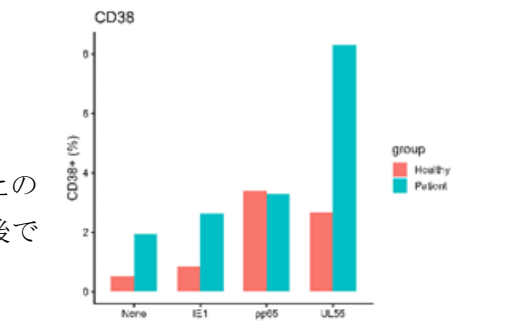


図 16 ウイルスタンパク刺激による CDX の発現量変化

TCR 解析では、同クラスターに属する特定の T 細胞クローンが IE1 刺激後に選択的に拡大し、これらのクローンにおいて CDX 発現は他のクローンと比較して有意に高値を示した。GO および KEGG 解析では、抗ウイルス応答、酸化ストレス応答、ならびにミトコンドリア代謝関連経路の活性化が示された。UL55 刺激では IE1 刺激と比較して CDX 発現がさらに高値を示した (図 16)。一方で、LAG3 や TOX などの疲弊関連分子の発現は IE1 刺激時より低い傾向を示した。pp65 刺激による CDX および疲弊関連分子の発現変化は小さかった。

3. CMV 前部ぶどう膜炎患者のゲノムワイド関連解析

CMV-AU 患者 141 名の血液を収集し、DNA 測定を行った。CMV-AU 患者 141 名の血液を収集し、DNA 測定を行った。ゲノムワイド関連有意水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) を超える関連は観察されなかったものの、5 番染色体の *SH3PXD2B* 領域に強い関連 ($P = 8.4 \times 10^{-8}$) を認め、CMV-AU 感受性への影響が示唆された。同領域の他形質への関連について、GWAS カタログを参照したところ、近傍の遺伝的変異 (rs1560682) は、血清 SH3PXD2B タンパク量に関連することがアフリカ系人種で報告されていた (Surapaneni A et al. *Kidney Int.* 2022)。

考察

1. CMV 全ゲノム解析

本研究期間に日本人由来 CMV 疾患 11 症例の全ゲノム情報を決定した。データベース上のアジア地域からの情報は 2 例のみであることから、重要な情報である。また、従来のウイルス分離培養後のゲノムには高頻度に変異が入ることが指摘されていたが、本研究は臨床検体中のウイルスゲノムを CMV 特異的 RNA プローブで濃縮し、次世代シーケンス解析で決定したことから、人工的変異のないウイルスゲノム情報として価値が高い。また、データベースのアジア、欧米由来 CMV 情報との比較解析により、アジア由来 CMV ゲノムの特徴や、CMV-AU 由来 CMV ゲノムの特徴が明らかになってきた。CMV-AU に特徴的なゲノム領域は免疫逃避に関わる UL144-145 があり、発症機序に関与する可能性がある。アジアの CMV 高感染率、CMV-AU 高頻度との関連についてもさらに解析を進めていく。

2. CMV UL55 遺伝子多型解析

CMV 感染や感染防御免疫に重要な gB の組織向性が明らかとなり、gB 遺伝子型によって異なる CMV 増殖能や免疫逃避能を介して、血液から眼内への進展が起きている可能性が示唆された。これは血液-眼柵の存在する眼に特異的な現象であるとも考えられた。また、現在開発中の gB ワクチンが眼組織向性の高い gB3 型に無効であることから、ウイルス遺伝子型を考慮した次世代ワクチンの開発が望まれる。また、アジア由来 CMV の眼組織向性の高い gB 遺伝子型にのみ高頻度にみられたアミノ酸置換は、gB タンパク構造変化の重要な位置にあり、選択圧もかかっていることが示唆されることからアジアにおける CMV 感染の広がりに関連している可能性も考えられた。

3. CMV 前部ぶどう膜炎患者の CMV 特異的 T 細胞免疫解析

CMV-AU 患者では、ウイルスの組織侵入に関わる UL55 タンパクに対する免疫応答の低下や、ウイルス再活性化初期に発現するウイルスタンパク IE1/IE2 への過剰応答が病態に関与していることが示唆される。CMV-AU 患者では IFN- γ CDX 高発現 CD8⁺T 細胞の活性化が無刺激でも健常人と比べて活性化状態であり、IE1 や UL55 タンパク刺激で CDX 発現はさらに上昇した。これらの所見から、抗 CMV IE1 免疫の dysregulation や抗 UL55 免疫活性化の機能的乖離が起きている可能性も示唆される。一方既感染を示す pp65 に対する免疫応答については患者、健常人で違いは見られなかった。

4. CMV 前部ぶどう膜炎患者のゲノムワイド関連解析

今回実施したゲノムワイド関連解析では有意水準を超える関連は観察されなかったものの、強い関連を示しており、再現性検証とそれらとの統合解析により CMV-AU の感受性座位であることが確認される可能性がある。強い関連を示した座位の近傍に存在する SH3PXD2B タンパクについては、論文検索を行なった限りではウイルス感染における関与は報告されておらず、別の近傍に存在する遺伝子が感受性に関与する可能性があり、追試による再現性が確認された後には、バイオインフォマティクスや実験的手法によって、本領域が CMV-AU の感受性に関わる生物学的機序について検討することで、未知の発症メカニズム解明に寄与することが期待される。

共同研究者

| 氏名 | 所属機関・職名 |
|--------|---------------------------------------|
| 八幡 信代 | 九州大学大学院医学研究院眼病態イメージング講座・准教授 |
| 元岡 大祐 | 大阪大学微生物病研究所・講師 |
| 秋山 雅人 | 九州大学大学院医学研究院眼病態イメージング講座・准教授 |
| 柴田 健輔 | 九州大学大学院医学研究院視機能再生学分野講座・准教授 |
| 武田 篤信 | 大分大学大学眼科学・教授 |
| 長谷川 英一 | 九州大学大学院医学研究院眼科・共同研究員 |
| 蕪城 俊克 | 自治医科大学眼科・教授 |
| 徳永 勝士 | 国立国際医療研究センターゲノム医科学プロジェクト 戸山プロジェクト長 |

引用論文

1. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004;4:725-38.
2. Radosavljevic A, Agarwal M, Chee SP, et al. Epidemiology of viral induced anterior uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2021;1-13.
3. Sonoda KH, Hasegawa E, Namba K, et al. Epidemiology of uveitis in Japan: a 2016 retrospective nationwide survey. *Jpn J Ophthalmol* 2021;65:184-190.
4. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, et al. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J Virol* 2015;89:7673-7695.
5. Rasmussen L. Molecular pathogenesis of human cytomegalovirus infection. *Transpl Infect Dis* 1999;1:127-34.

6. Liu Y, Heim KP, Che Y, et al. Prefusion structure of human cytomegalovirus glycoprotein B and structural basis for membrane fusion. *Sci Adv* 2021;7.
7. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005;202:673-85.
8. Miyadera H, Ohashi J, Lernmark A, et al. Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J Clin Invest* 2015;125:275-91.
9. Angelis K, Dos Reis M, Yang Z. Bayesian estimation of nonsynonymous/synonymous rate ratios for pairwise sequence comparisons. *Mol Biol Evol* 2014;31:1902-13.

助成研究に関連した発表論文

1. Lestari T, Yawata N, Gonzalez G, Miyadera H, Motooka D, Imamura Y, Oki H, Mori Y, Shirane M, Khor SS, Omae Y, Shimada M, Dyah Ayu W, Nakano S, Tsutsui H, Kuramoto S, Fukui C, Nakamura R, Yamana S, Kaburaki T, Mashimo H, Takase H, Yanai R, Hasegawa E, Shibata K, Yawata M, Tokunaga K, Ohguro N, Sonoda KH. Molecular variations in glycoprotein B of Asian human cytomegalovirus: Potential impact on virus entry and immune evasion in ocular diseases. ; *J Med Virol* 2026, 98:e70786.
2. Shirane M, Yawata N, Sonoda KH. Current understanding of ocular fluid analysis in uveitis. *Taiwan J Ophthalmol.* 15(2):196-202, 2025/05/28
3. Shirane M, Yawata N, Motooka D, Shibata K, Khor SS, Omae Y, Kaburaki T, Yanai R, Mashimo H, Yamana S, Ito T, Hayashida A, Mori Y, Numata A, Murakami Y, Fujiwara K, Ohguro N, Hosogai M, Akiyama M, Hasegawa E, Paley M, Takeda A, Maenaka K, Akashi K, Yokoyama WM, Tokunaga K, Yawata M, Sonoda KH. Intraocular human cytomegaloviruses of ocular diseases are distinct from those of viremia and are capable of escaping from innate and adaptive immunity by exploiting HLA-E-mediated peripheral and central tolerance. *Front Immunol.* 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.1008220.
4. Fukuda Y, Yawata N, Hasegawa E, Yamana S, Shirane M, Ito T, Takeda A, Sonoda M, Eguchi K, Ishimura M, Ohga S, Sonoda KH. Clinical Features of Pediatric Uveitis at a Tertiary Referral Center in the Western Region of Japan. *Ocul Immunol Inflamm.* 2023; doi: 10.1080/09273948.2023.2273363.