

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16805

研究課題名（和文）母乳以外のHTLV-1母子感染経路の解明に関する研究

研究課題名（英文）Other routes of HTLV-1 mother-to-child transmission except for breast feeding

研究代表者

淵 直樹（FUCHI, NAOKI）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：20727359

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）の母子感染において母乳以外の感染経路を明らかにするため、キャリア妊婦の胎盤組織におけるHTLV-1感染の状態を検討したところ、約半数で胎盤組織中にHTLV-1を検出し、母が人工栄養を選択した場合でも胎盤組織中にHTLV-1を認めた群の方が母子感染成立が多いことが明らかになった。さらにその分子機構として、母児の血液を隔てる胎盤関門を構成する栄養膜細胞がHTLV-1感染のターゲットになっていることが明らかになった。これらの研究結果は、新たな母子感染経路として経胎盤感染を示し、感染抑制に向けた新たな取り組みが必要であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまでほとんど未解明であったHTLV-1母子感染の母乳を介さない感染経路として妊娠中の経胎盤感染の可能性を示し、特に母児の血液を隔てる胎盤関門を構成する栄養膜細胞が母子感染の主要な役割を果たしていることを明らかにした。今回確立した胎盤組織中のHTLV-1を高感度に検出する手法（RNA scope）は、これまで不明であった妊娠中の母児感染成立に関わる新たな知見を提供し、これらの研究結果はHTLV-1の母子感染対策や関連疾患の予防法の発展・開発につながる重要な発見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：We investigated Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection in placental tissues of carrier pregnant women to clarify an alternative route of mother-to-child transmission of HTLV-1 other than breast milk. We found that the HTLV-1 infection was detected in the placental villous tissues of the fetus of nearly half the pregnant carriers, and that mother-to-child transmission was more frequent in pregnant women with HTLV-1-infected placenta than those without HTLV-1-infected placenta, even when exclusively bottle-feeding. Furthermore, the molecular mechanism of HTLV-1 placental infection is that villous trophoblast cells, which compose as the blood-placental barrier separating maternal and fetal blood, are a target for HTLV-1 infection in the placenta. These findings demonstrate the transplacental transmission as a new route of mother-to-child transmission and indicate the need for new efforts to control mother-to-child transmission of HTLV-1.

研究分野：産婦人科学

キーワード：HTLV-1 母子感染 経胎盤感染

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) は、難治性疾患である成人T細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 型関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスであり、主な感染経路は母乳を介した母子感染である。現在でも ATL や HAM に対する有効な治療手段や HTLV-1 に対するワクチン療法は確立されておらず、出産時の人工栄養の選択による HTLV-1 母子感染の予防が唯一の有効な対策である。しかし一方で、人工栄養を選択した妊婦においても母子感染が成立している例が 2.4% 存在することがわかっており、母乳以外の感染経路が存在することが示唆されているが、その感染経路については明らかになっていない。より確立した HTLV-1 母子感染予防プログラムを実施するには、この母乳以外の感染経路の同定が重要であり、喫緊の課題である。これまでに母乳以外に HTLV-1 感染細胞が母親から児へ移行する可能性として考えられているのは、胎盤および臍帯を介した経胎盤感染、出産時の産道における母体血液暴露を介した産道感染あるいは出生後の母体の唾液を介した唾液感染などがあるが、いずれも確定的な証拠はないのが現状である。

先行研究 (平成 28 年度若手研究 B 「妊娠が HTLV-1 キャリアに及ぼす影響についての基礎的研究」課題番号 16K20198) において、胎盤組織や臍帯血においてリアルタイム PCR 法で HTLV-1 プロウイルスが検出されることを証明した。臍帯血中のプロウイルスを認めたリンパ球は、DNA サテライトマーカーを用いた STR 解析において、母体血の混入ではなく、胎児由来のリンパ球であることを証明した。母体血中の HTLV-1 感染 T リンパ球が、子宮内で胎盤組織や臍帯血中の胎児のリンパ球へ直接あるいは間接的に感染していることは、HTLV-1 の母子感染の経路として経胎盤感染の可能性を示している。本研究では、これまでの私どもの研究成果を進展させて、母乳以外の HTLV-1 母子感染経路としての実態解明を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、HTLV-1 キャリア妊婦から採取した末梢血、臍帯血ならびに胎盤組織を用いて HTLV-1 感染の状態を評価するとともに、周産期背景 (分娩様式や母体の合併症、選択した栄養方法) と 3 歳時点で判定される母子感染の有無を調査することで、経胎盤感染や産道感染の評価、さらには母児間においてどのようにして HTLV-1 の経胎盤感染が成立するのかを明らかにすることを目的とした。

期間内の具体的な研究項目を以下に挙げる。

- (1) HTLV-1 キャリア妊婦の末梢血、胎盤および臍帯血の試料集積を行う。
- (2) HTLV-1 キャリア妊婦における末梢血、胎盤および臍帯血の HTLV-1 プロウイルス量を測定し、HTLV-1 感染の状態と周産期背景 (分娩様式の差、周産期合併症の有無など) を調査する。
- (3) 経胎盤感染の可能性の検証として、人工栄養児かつ臍帯血陽性例での母子感染の有無を調査する。
- (4) 産道感染の可能性の検証として、人工栄養児かつ臍帯血陰性例での母子感染の有無と分娩様式の違い (経膈分娩、帝王切開、陣痛発来の有無) を調査する。
- (5) 経胎盤感染の分子機構を明らかにするため、HTLV-1 感染細胞株と胎盤絨毛細胞、胎児臍帯血由来リンパ球との間接的共培養を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) HTLV-1 キャリア妊婦の末梢血、胎盤および臍帯血の試料集積

HTLV-1 キャリア妊婦については、長崎県における妊婦 HTLV-1 スクリーニングシステムを利用し、本研究の遂行に必要な検体を集積し、3 歳時点における母子感染成立の有無について評価した。1 次検査である HTLV-1 抗体検査で陽性もしくは偽陽性であった妊婦に対しては、2 次検査の確定検査として WB 法もしくは LIA 法 (2019 年より) を用いて HTLV-1 キャリアの判定を行なった。WB 法や LIA 法で判定保留の場合は PCR 法でプロウイルスを検出した場合に HTLV-1 キャリアと判定した。

#### (2) HTLV-1 キャリア妊婦における末梢血、胎盤および臍帯血の HTLV-1 プロウイルス量の測定

HTLV-1 プロウイルス量の測定は、単核球から DNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法を用いて HTLV-1 プロウイルス量を以下の公式を用いて算出した。

HTLV-1 プロウイルス量 (%) =  $[(\text{HTLV-1 pX copy number}) / (-\text{globin copy number} / 2)] \times 100$ 。

#### (3)(4) 経胎盤感染ならびに産道感染の可能性の検証

HTLV-1 キャリアの妊娠・分娩の背景を把握するため、分娩方法 (経膈分娩 vs 帝王切開) と母が選択した栄養方法 (人工栄養、短期母乳栄養、長期母乳栄養、凍結母乳栄養) についての調査票を回収し、データベース化した。長崎県における児の HTLV-1 抗体スクリーニングシステムは、3 歳を過ぎてから長崎県内の小児科医療機関で実施している。そのデータと本研究のデータベースを照合し、母子感染成立の有無について評価した。

#### (5) 経胎盤感染の分子機構の検証

まず RNA scope という高感度にウイルス核酸を検出できる in situ ハイブリダイゼーション手法を確立し、HTLV-1 キャリア妊婦の胎盤組織内の HTLV-1 転写産物 (pX) を標的とした発現解析を行なった。ついで In vitro の実験系として、血液胎盤関門を構成している細胞群 (栄養

膜細胞、間葉系繊維芽細胞、血管内皮細胞)を用いて、HTLV-1に対する感受性ならびに感染モデルの検討を行った。次に HTLV-1 産生細胞と胎盤細胞との共培養の実験系を用いて、HTLV-1に感染した胎盤の細胞がウイルス抗原を発現し、新たに感染を引き起こす能力があるかどうかを検討した。さらに *in vivo* の感染モデルとして、ヒト化マウスモデルにこれらの HTLV-1 を感染させた細胞群を末梢血より投与し、HTLV-1 感染が成立するかどうかを検討した。最後に HTLV-1 キャリア妊婦の胎盤組織において、胎盤内のどの細胞に選択的に感染しているかを HTLV-1 転写産物 (HBZ) と栄養膜細胞のマーカーである KRT7 を標的とした免疫染色を行い HTLV-1 の局在と発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) HTLV-1 キャリア妊婦の末梢血、胎盤および臍帯血の試料集積

研究期間内(平成30年から令和3年)に長崎県の妊婦の中で HTLV-1 の2次検査を行った204名のうち、最終的に162名の妊婦が HTLV-1 キャリアと診断された。その中から末梢血162例、胎盤157例、臍帯血157例集積した。

##### (2) HTLV-1 キャリア妊婦における末梢血、胎盤および臍帯血の HTLV-1 プロウイルス量の測定

これまでに集積した HTLV-1 キャリア妊婦の妊娠中の末梢血、胎盤および臍帯血をセットとし、254例について HTLV-1 プロウイルス量を real-time PCR 法で定量した。キャリア妊婦254例中、140例(55.1%)の胎盤組織から HTLV-1 プロウイルスを検出した。この140例のうち、臍帯血中にも HTLV-1 プロウイルスを検出したのは6例(4.2%)であった。臍帯血陽性例のプロウイルス量は母体血や胎盤中プロウイルス量と相関しなかった(図1)。

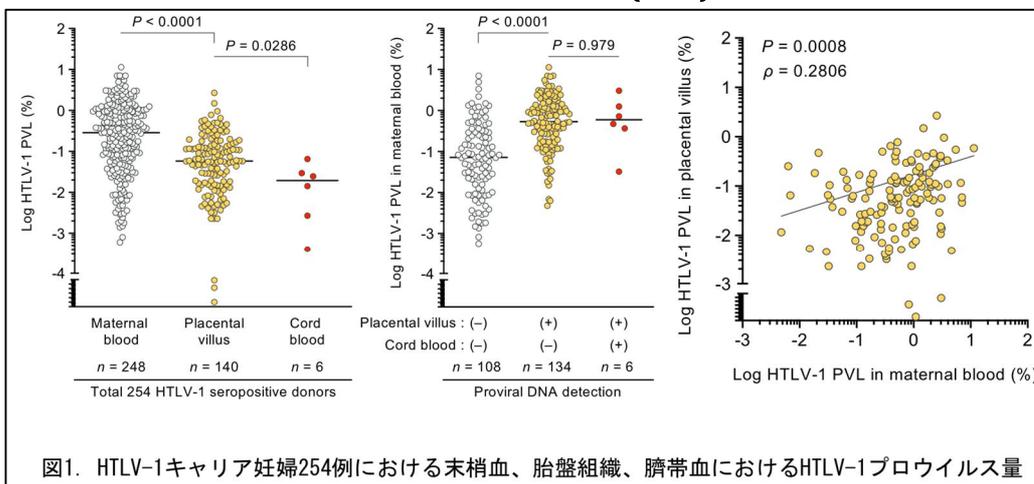


表1. HTLV-1キャリア妊婦254名の中で胎盤内にHTLV-1プロウイルスを認めた群とそうでない群における患者情報の比較

|                           | 胎盤内HTLV-1陽性<br>N = 140 (55.1%)           | 胎盤内HTLV-1陰性<br>N = 108 (42.5%) | p value                                   |
|---------------------------|--|--------------------------------|---|
| 胎盤内HTLV-1プロウイルス量 (%)      | 0.05813 (1.12x10 <sup>-5</sup> -2.67181) | Not detected                   | * Mann-Whitney U test, ** Chi-square test |
| 妊娠中の末梢血中HTLV-1プロウイルス量 (%) | 0.53527 (0.00478-11.36456)               | 0.07183 (0.00056-7.07676)      | * <0.001                                  |
| 妊娠中の抗体価 (CLEIA, COI)      | 37 (3-45)                                | 24 (3-45)                      | * <0.001                                  |
| 妊娠回数                      |  |                                |   |
| 初産婦                       | 43 (30.7%)                               | 50 (46.3%)                     | **0.012                                   |
| 経産婦                       | 97 (69.3%)                               | 58 (53.7%)                     |   |
| 母体年齢 (歳)                  | 32 (19-43)                               | 32 (20-45)                     | *0.857                                    |
| 分娩週数 (週)                  | 39 (34-42)                               | 39 (32-41)                     | *0.586                                    |
| 分娩方法                      |  |                                |   |
| 経陰分娩                      | 111 (79.3%)                              | 89 (82.4%)                     | **0.537                                   |
| 帝王切開                      | 29 (20.7%)                               | 19 (17.6%)                     |   |
| 陣痛発来前の帝王切開                | 22                                       | 8                              |   |
| 陣痛発来後の帝王切開                | 7  | 11                             |   |
| 性別                        |  |                                |   |
| 男児                        | 64 (45.7%)                               | 53 (49.0%)                     | **0.746                                   |
| 女児                        | 66 (47.1%)                               | 51 (47.2%)                     |   |
| 不明                        | 10                                       | 4                              |   |
| 出生体重 (g)                  | 3,045 (2,440-4,058)                      | 3,061 (1,562-4,020)            | *0.823                                    |
| 妊娠中の合併症                   |  |                                |   |
| なし                        | 119 (85.0%)                              | 92 (85.2%)                     |   |
| 切迫早産                      | 11 (7.8%)                                | 10 (9.3%)                      | **0.694                                   |
| 妊娠糖尿病                     | 5 (3.6%)                                 | 5 (4.6%)                       | **0.726                                   |
| 妊娠高血圧症候群                  | 5 (3.6%)                                 | 3 (2.8%)                       | **0.674                                   |

キャリア妊婦の中で胎盤組織中に HTLV-1 プロウイルスを認めた群 (胎盤陽性群、N=140) と認めなかった群 (胎盤陰性群、N=108) において、HTLV-1 感染の状態や周産期背景を比較検討したところ、胎盤陰性群と比較して胎盤陽性群では、末梢血中プロウイルス量は多く (0.53% vs 0.071%, p<0.001) 母体血中の抗体価は高く (37 COI vs 24 COI, p<0.001) 経産婦が多い (69.3% vs 53.7%, p=0.012) という結果であった。一方で、分娩方法や児の性別、出生体重ならびに妊娠中の母体合併症にはそれぞれ差を認めなかった (表1)。

##### (3)(4) 経胎盤感染ならびに産道感染の可能性の検証

本研究において母子感染の有無が判明している 106 例において、人工栄養を選択した例は 79 例 (74.5%)、短期母乳栄養は 20 例 (18.0%)、長期母乳栄養は 5 例 (4.7%) であった。106 例のうち母子感染が成立した児は 4 例 (3.8%) であった (表 2)。106 例のうち胎盤組織中に HTLV-1 プロウイルスを認めた例が 43 例 (40.6%)、認めなかった例が 63 例 (59.4%) であった。人工栄養を選択し、かつ胎盤内に HTLV-1 プロウイルスを認めた 32 例のうち母子感染が成立していたのは 2 例 (6.25%) である一方、人工栄養を選択し胎盤内に HTLV-1 プロウイルスを認めなかった 47 例のうち母子感染が成立した例は認めなかった ( $p=0.0826$ )。人工栄養でかつ胎盤組織中に HTLV-1 プロウイルスを認めた例で母子感染成立が多かったことは、HTLV-1 の経胎盤感染の存在を示唆した (表 2)。人工栄養を選択し、かつ臍帯血の HTLV-1 は陰性だった 72 名のうち、母子感染が成立したのは 2 名であり、分娩様式は経膣分娩 ( $N=54$ ) で 1 例 (1.9%)、帝王切開 ( $N=18$ ) で 1 例 (5.6%) であった。産道感染については母子感染例が少なく評価できなかった。

| 表 2. 胎盤内に HTLV-1 プロウイルスを認めた群とそうでない群との母子感染追跡調査 (N = 106名) |               |               |         |
|--|---------------|---------------|---------|
|  | 胎盤内 HTLV-1 陽性 | 胎盤内 HTLV-1 陰性 | p value |
|  | N = 43        | N = 63        |         |
| 母が選択した栄養方法   |               |               |         |
| 人工栄養   | 32 (74.4%)    | 47 (74.6%)    |         |
| 短期母乳栄養 (3ヶ月未満)   | 7 (16.3%)     | 13 (20.6%)    |         |
| 長期母乳栄養 (3ヶ月以上)   | 3 (6.9%)      | 2 (3.2%)      |         |
| 凍結母乳栄養   | 1 (2.4%)      | 0             |         |
| 不明   | 0             | 1 (1.6%)      |         |
| 母子感染の有無  |               |               |         |
| 母子感染あり   | 4 (9.3%)      | 0             | *0.0136 |
| 母子感染なし   | 39 (90.7%)    | 63 (100%)     |         |
| 人工栄養を選択した母児における母子感染の有無                                   |               |               |         |
| 母子感染あり   | 2 (6.3%)      | 0             | *0.0826 |
| 母子感染なし   | 30 (93.7%)    | 47 (100%)     |         |

Data are number of donors (%). \*Chi-square test.

### (5) 経胎盤感染の分子機構の検証

HTLV-1 キャリア妊婦の胎盤組織 18 例 (胎盤陰性・臍帯血陰性 6 例、胎盤陽性・臍帯血陰性 6 例、胎盤陽性・臍帯血陽性 6 例) において、RNA scope による HTLV-1 プロウイルスの発現解析 (pX を標的) を行ったところ、胎盤陰性・臍帯血陰性群ではシグナルが検出されなかったのに対して、胎盤陽性群では全例にシグナルを検出した。さらに、胎盤陽性群の中では、臍帯血陰性例と比較して臍帯血陽性例の方が有意に発現量が多かった。

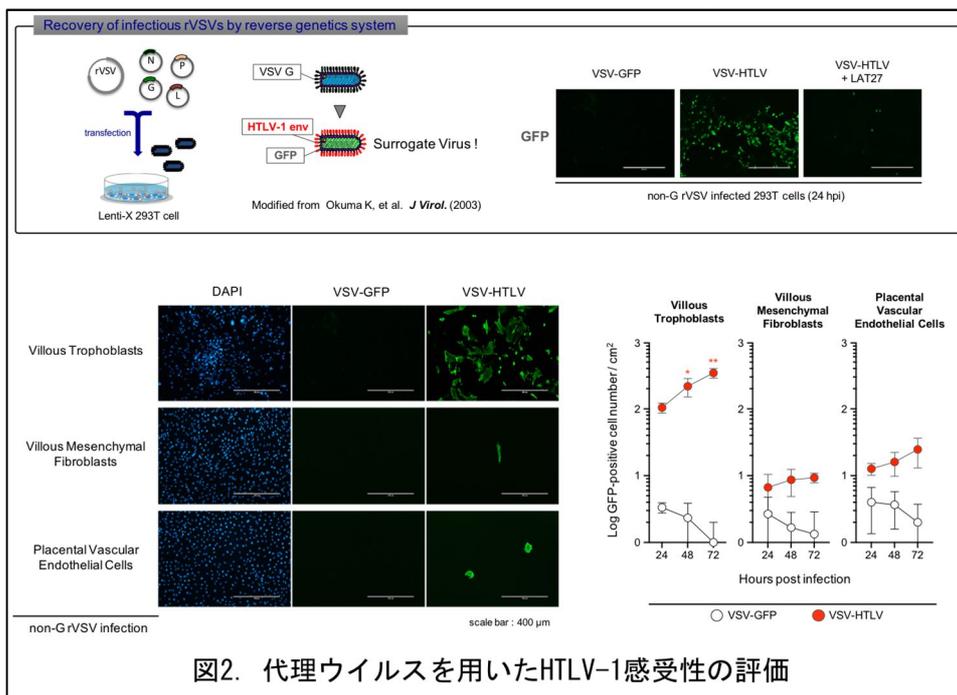
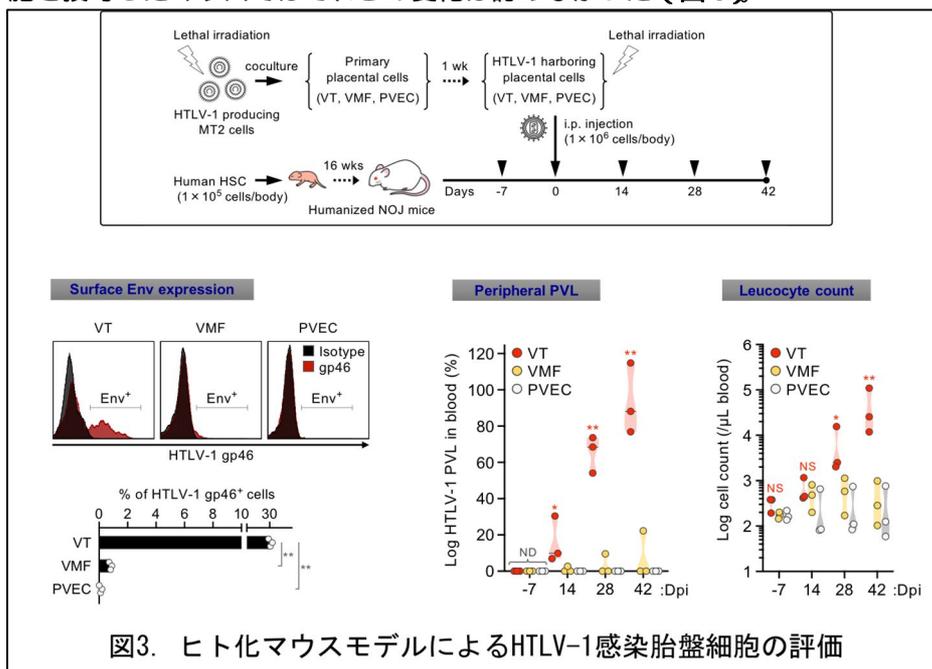
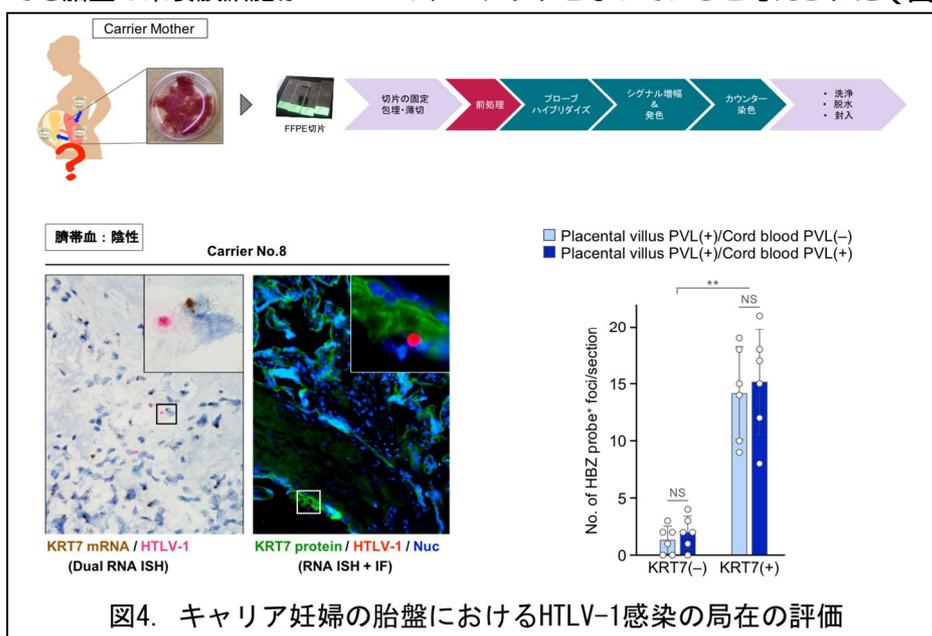


図2. 代理ウイルスを用いたHTLV-1感受性の評価

次いで、HTLV-1 感染性を認める代理ウイルスを用いて血液胎盤関門を構成する栄養膜細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞それぞれの HTLV-1 に対する感受性を検討したところ、栄養膜細胞において HTLV-1 の顕著な感染を認め、さらに時間経過とともに感染が拡大することが明らかになった (図 2)。さらに、HTLV-1 感染細胞と胎盤細胞との共培養の実験系を用いて、HTLV-1 に感染した胎盤の細胞がウイルス抗原を発現し新規感染を引き起こす能力があるかどうか検討したところ、栄養膜細胞では他の間葉系細胞や血管内皮細胞と比較して有意に高いウイルス抗原の発現を示した (図 3)。in vivo モデルとしてヒト化マウスモデルを用いた実験系では、それぞれの胎盤細胞と HTLV-1 感染細胞とを共培養した後、ヒト化マウスへそれぞれの胎盤細胞を末梢血に投与したところ、栄養膜細胞を投与したマウスでは末梢血中に HTLV-1 が検出され、継続的な HTLV-1 プロウイルス量の増加とともに白血球数の増加を認めたが、間葉系細胞や血管内皮細胞を投与したマウスではそれらの変化は認めなかった (図 3)。



最後に、HTLV-1 キャリア妊婦の胎盤組織を用いて栄養膜細胞に HTLV-1 が感染しているか in situ ハイブリダイゼーション法で局在を検討したところ、栄養膜細胞のマーカである KRT7 陽性細胞では陰性細胞に比べて有意に高い HTLV-1 の陽性率を示したことから、HTLV-1 は KRT7 陽性細胞へ選択的に感染していることが考えられた。これらの結果から、実際の生体内においても胎盤の栄養膜細胞が HTLV-1 のターゲットとなっていると考えられた (図 4)。



今後は本研究で得られた結果をもとに、胎盤を介した胎児への HTLV-1 母子感染の成立をいかに予防するかについてさらなる検討が必要であり、また蓄積されている HTLV-1 キャリア妊婦のデータベースと出生後の母子感染成立の有無のデータを継続して解析することで、分子疫学的な評価が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Tezuka K, Fuchi N, Okuma K, Tsukiyama T, Miura S, Hasegawa Y, Nagata A, Komatsu N, Hasegawa H, Sasaki D, Sasaki E, Mizukami T, Kuramitsu M, Matsuoka S, Yanagihara K, Miura K, Hamaguchi I. | 4. 巻<br>130             |
| 2. 論文標題<br>HTLV-1 targets human placental trophoblasts in seropositive pregnant women.  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Investigation   | 6. 最初と最後の頁<br>6171-6186 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1172/JCI135525  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>淵直樹                                 | 4. 巻<br>86              |
| 2. 論文標題<br>妊婦HTLV-1スクリーニング検査におけるHTLV-1水平感染の検討 | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>産科と婦人科                              | 6. 最初と最後の頁<br>499 - 500 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                 | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難        | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Fuchi N, Miura K, Tsukiyama T, Sasaki D, Ishihara K, Tsuruda K, Hasegawa H, Miura S, Yanagihara K, Masuzaki H | 4. 巻<br>217             |
| 2. 論文標題<br>Natural Course of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral DNA Levels in Carriers During Pregnancy.       | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>J Infect Dis.   | 6. 最初と最後の頁<br>1383-1389 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/infdis/jiy017  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                           | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究協力者 | 手塚 健太<br><br>(Tezuka Kenta)<br><br>(10754533) | 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官<br><br><br><br>(82603) |    |

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|