

シングルセルシーケンスを用いた EB ウイルス関連 T/NK

リンパ増殖性疾患の病態解析

名古屋大学大学院医学系研究科

小児科 准教授 川田潤一

1. 研究の背景・目的

EB ウイルス (EBV) は成人の 90%に感染する普遍的なウイルスであるが、バーキットリンパ腫など主に B 細胞性の腫瘍との関連が知られている。一方で、本邦をはじめとする東アジア地域においては、EBV が感染した T 細胞や NK 細胞の腫瘍性増殖を特徴とする慢性活動性 EB ウイルス病 (CAEBV) や重症蚊刺過敏症などの報告も多い。これらの疾患は EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患と総称され、WHO 分類においても EBV 関連の難治性腫瘍と位置づけられている。

本研究はシングルセルシーケンス (scRNA-Seq) の手法を用いた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の病態解析を目的としている。scRNA-Seq を用いることで、細胞単位での遺伝子発現を網羅的に解析することが可能となり、患者末梢血中での EBV 感染細胞と非感染細胞を直接比較検討することができる。そのため、従来の組織や血球細胞をひとまとめして平均値で評価するバルク解析と比べて、高精度に EBV 感染細胞の遺伝子発現を評価することが可能となる。scRNA-Seq の手法で EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の末梢血を解析し、EBV に感染した T 細胞や NK 細胞に特異的に発現している遺伝子を同定することで、疾患の病態解明に加えて、新規治療標的への応用が期待される。

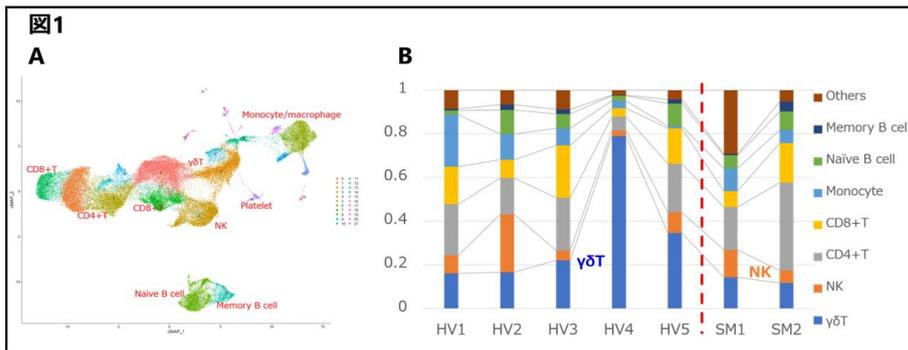
2. 研究の対象ならびに方法

名古屋大学および共同研究施設で同意の得られた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患のうり、重症蚊刺過敏症 (HV) 2 例、種痘様水疱症リンパ増殖異常症 (SMBA) 5 例を解析した。末梢血単核球から Dead cell removal kit を用いて死細胞を除去した後に、Feature barcoding kit を用いて細胞を標識した。生細胞 2 万個の細胞を用いて Chromium Single Cell 3' GEM, Library Kit および 10x Chromium Controller を用いてライブラリーを作成した。作成されたライブラリーを次世代シーケンサー (HiSeq X) で各検体 5000 細胞を、5 万リード/細胞を目標に判読し、得られたシーケンスデータを Cell Ranger、Seurat、Loupe Brower 等を用いて解析した。全ての EBV 関連遺伝子を網羅したリファレンス配列と照合し、EBV 感染細胞 (≡腫瘍性細胞) を同定した。さらに、EBV 感染細胞と、同じ cell lineage に属する EBV 非感染細胞での宿主遺伝子の発現を解析した。

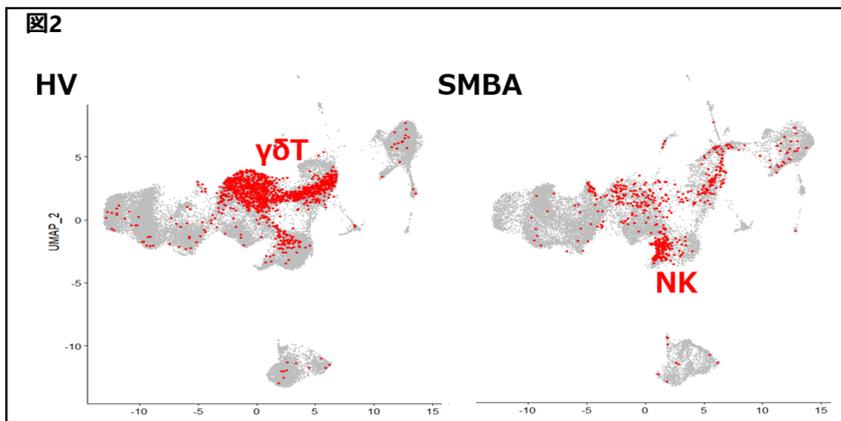
3. 研究結果

(1) 症例毎の細胞分画の比較および EBV 細胞

各細胞の遺伝子発現パターンをもとにクラスタリングした (図 1A)。また、症例毎の細胞分画の比較を行った (図 1B)。HV 症例の一部では $\gamma \delta$ T 細胞の分画が増加しており、EBV 感染細胞との関連が示唆された。一方で、EBV が主に NK 細胞に感染していると考えられている SMBA 症例では、NK 細胞の明らかな増加はみられなかった。

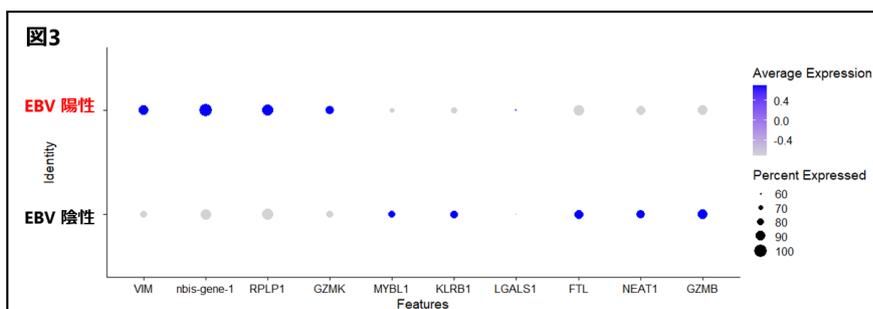


EBV 遺伝子が検出された細胞の分布を示す (図 2)。予想されたように、HV では EBV 遺伝子は主に $\gamma \delta$ T 細胞に検出された。一方で、SMBA においては NK 細胞に加えて、 $\gamma \delta$ T 細胞と考えられる細胞においても EBV 遺伝子が検出された。



(2) EBV 感染細胞/非感染細胞での遺伝子発現の比較

HV 症例において、EBV 感染細胞と非感染細胞での遺伝子発現の比較を行った (図 3)。EBV 陽性細胞では、*VIM*, *RPLP1*, *GZMK* などの遺伝子発現が亢進していた一方で、*MYBL1*, *KLRB1*, *FTL* などの遺伝子の発現が低下していた。



4. 考察

本研究では、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患である HV および SMBA の患者末梢血を scRNA-Seq の手法を用いて解析した。本手法を用いて、各細胞の遺伝子発現パターンに基づいたクラスタリングを行うと共に、EBV 遺伝子を検出することで、EBV 感染細胞を同定することが可能であった。さらに、同一の細胞分画内で EBV 感染細胞と非感染細胞の遺伝子発現を比較することが可能となり、病態の解明に極めて有用な手法であることが示唆された。一方で、各症例で検出された EBV 陽性細胞は多い症例でも数百細胞であり、解析した末梢血の 10%未満であった。一方で、FISH 法でこれらの症例を解析した場合には、末梢血単核球の 10-30%が EBV 陽性であり、scRNA-Seq による EBV 感染細胞の検出感度は低かった。この原因として宿主遺伝子の発現に比べて EBV 遺伝子の発現が弱いため、十分に検出できない可能性がある。今後は EBV 遺伝子の増幅と scRNA-Seq を組み合わせるなどの手法により、EBV 感染細胞の検出感度を上げることを検討している。また、症例数を増やしていくことで、本疾患の病態解明ならびに新規治療法の開発に貢献したい。

5. 文献

1. Kimura et al. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*. 2012. 673
2. Bollard et al. How I treat T-cell chronic active Epstein-Barr virus disease. *Blood*. 2018. 2899
3. Liu et al. Nivolumab treatment of relapsed/refractory Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Blood*. 2020. 826

6. 論文発表

1. Kawada J. Molecular Mechanisms of Severe Diseases Caused by Epstein-Barr Virus Infection. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2023. 206.
2. Kawada J et al. Updated guidelines for chronic active Epstein-Barr virus disease. *Int J Hematol*. 2023. 568
3. Hirai et al. Diagnostic and disease severity determination criteria for hydroa vacciniforme lymphoproliferative disorders and severe mosquito bite allergy. *J Dermatol*. 2023. e198