

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20756

研究課題名（和文）シングルセルシーケンス解析を応用した重症EBウイルス関連疾患の病態解析

研究課題名（英文）Single-cell RNA sequencing analysis of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

鈴木 高子（Suzuki, Takako）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60908721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：シングルセルシーケンスを応用し、EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症（EBV-HLH）の病態解析を行った。EBV-HLH症例の各免疫細胞の遺伝子発現を特徴付け、EBウイルスの典型的初感染像である伝染性単核症（EBV-IM）と比較検討した。EBV-HLH3例、EBV-IM2例および健康人2例から得られた計37,405細胞の末梢血単核球を解析した。EBV-HLHでは Ⅱ型インターフェロンシグナリングに関わる遺伝子の発現増強が共通してみられ、特に単球系で遺伝子発現の強い変化を認めた。EBV-IMの急性期に特異的に出現し、EBV-HLHでは希薄なCD8陽性T細胞クラスタが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBウイルス（EBV）は世界に普遍的に存在するウイルスだが、その感染により時に伝染性単核症（EBV-IM）を発症し、さらに稀にEBV関連血球貪食性リンパ組織球症（EBV-HLH）という重篤な疾患を発症する。これらのEBV感染性疾患の詳細なメカニズムは十分に解明されていない。EBV-HLHの治療標的として Ⅱ型インターフェロン（IFN）が着目されてきたが、本研究では Ⅱ型IFNシグナリングの関与が示され、新たな治療標的の可能性を示唆した。また、EBV-IMに特異的に出現が確認されたCD8陽性T細胞クラスタの遺伝子発現プロファイルは、EBV感染に対する免疫応答を理解する上で重要な知見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we applied single-cell RNA sequencing technology to characterize the gene expression of the epidemic cell population of EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH) and compared it with infectious mononucleosis (EBV-IM), a typical clinical manifestation of primary EBV infection. Three pediatric patients with EBV-HLH, 2 patients with EBV-IM and 2 healthy adults were enrolled, and peripheral blood mononuclear cells were analyzed. A total of 37,405 cells were included. In EBV-HLH, genes involved in type Ⅱ interferon signaling were commonly upregulated in each cell fraction, while monocytes showed robust changes in genes expression in all three EBV-HLH cases. The distinct proliferative CD8+ T cell cluster was recognized in the acute phase of EBV-IM, which cluster was scarce in all three EBV-HLH cases. The gene-expression profile obtained for this cluster is an important finding for understanding the immune response to EBV infection.

研究分野：小児感染症

キーワード：EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症 シングルセルシーケンス Epstein-Barr virus 伝染性単核症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1). EB ウイルス (EBV) は世界に普遍的に存在するウイルスで、小児期の初感染では大部分が無症候か軽微な気道症状に限られるが、一部で伝染性単核症 (EBV-IM) を発症し、さらに稀に EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) を発症する。EBV-HLH は、EBV の初感染や再活性化の際に EBV 感染細胞を排除できないために、T 細胞やマクロファージが過剰に活性化し、高サイトカイン血症や血球貪食を誘導することで発症すると考えられている。EBV-HLH は複数の病態が混在しているが、それらの臨床像は類似しており、初期に背景疾患を判別することは困難である。EBV-HLH は急速に進行する重篤な疾患で、免疫調整療法を速やかに開始する必要があるが、治療抵抗性を示し、多剤併用化学療法や同種造血幹細胞移植を要する例もある。治療抵抗性を示す例に、X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) や慢性活動性 EB ウイルス症 (CAEBV) などの基礎疾患を背景とする例が含まれ、こうした治療抵抗例を早期に判別できるバイオマーカーが求められる。

(2). 近年シングルセルシーケンス (scRNA-seq) が種々の病態解明に応用されている。scRNA-seq により、細胞 1 個単位で遺伝子発現を直接測定することが可能となり、細胞の種類や状態、各種調節経路における多数の遺伝子によって起こる動的同時変化を特徴づけることが可能となる。近年では新型コロナウイルス感染症などの感染性疾患の病態解析にも応用されている。

2. 研究の目的

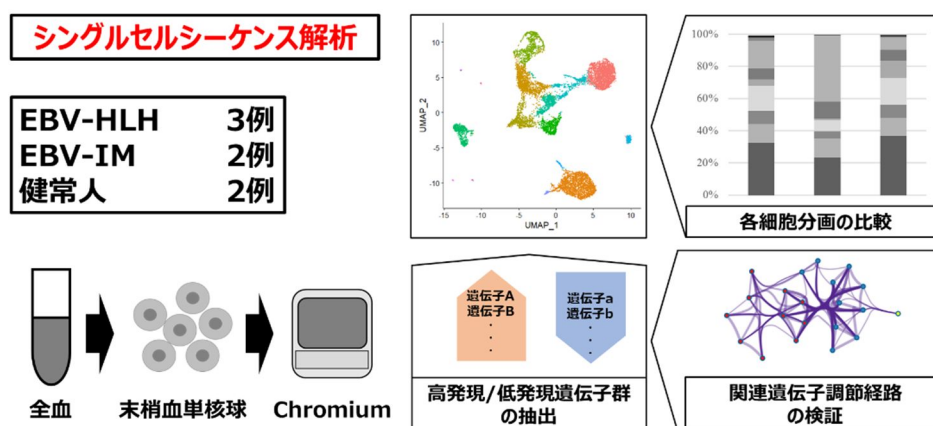
(1). scRNA-seq を用いて、EBV-HLH における各免疫細胞分画の遺伝子発現を解析し、EBV の典型的な初感染像である EBV-IM や健常人と比較することで、EBV-HLH における各免疫細胞分画の遺伝子発現の特徴を明らかにする。

(2). EBV 感染細胞における EBV 関連遺伝子や宿主遺伝子の発現を解析することで、EBV-HLH に関するウイルス側の因子についても検討を行う。

(3). EBV-HLH は複数の病態が混在する症候群であり、個々の病態の解明が予後予測や病態毎の治療戦略の確立に寄与すると考えられる。本研究では、異なる病態より生じた EBV-HLH 症例での EBV 感染細胞や各細胞分画の遺伝子発現を比較検証し、各病態に特異的な遺伝子発現パターンを検出することを目的としている。これらの解析を通じて、EBV-HLH に共通する、もしくは背景疾患に特異的な調節経路の変化を検出し、新規治療標的の検索を行う。

3. 研究の方法

EBV-HLH 症例 3 例の急性期および回復期検体より分離保存した末梢血単核球を用い scRNA-seq 解析を行った。EBV-IM 2 例、健常人 2 例の scRNA-seq を合わせて行い、各細胞分画や EBV 感染細胞での遺伝子発現を比較検証することで、EBV-HLH に特徴的な遺伝子発現パターンを検索し、さらに、病態別に特異的な遺伝子発現パターンを検索した。



(1). 分離保存した末梢血単核球から Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec) を用いて死細胞除去を行い、Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits (10x Genomics) を用い scRNA-seq 用のライブラリ調整を行った。一部の検体は、事前に TotalSeq™-B 抗体 (抗ヒト CD298 および 2 マクログロブリン) (BioLegend) を用いて細胞標識し、scRNA-seq ライブラリ調製前にプールした。調整されたライブラリを HiSeq X (Illumina) によりシーケンスを行い、得られたシーケンスデータで以降の解析を行った。

(2). シーケンスデータを Cell Ranger (10x Genomics) の cellranger count を用いて各細胞で検出された発現遺伝子数をカウントし、解析用メトリクスを出力した。レファレンスとしてヒト

ゲノム (GRCh38) と EBV 代表株ゲノム (NC_007605) から連結し作成したゲノムレファレンスを使用した。

(3). 出力データは Seurat (Satija Lab) を用いて解析を行った。ミトコンドリア RNA の割合、発現遺伝子数に基づくフィルタリングを行い、プール検体のデマルチプレックスを行った。1 サンプルあたり 1,171~4,938 細胞、合計 37,405 細胞のデータが得られた。主成分分析 (PCA) を用い、プールされたサンプルの単一ライブラリデータでは上位 10 個の主成分 (PC)、統合データでは上位 30 個の PC が選択され、UMAP によるクラスタリング解析を行った。各クラスターでのマーカー遺伝子の発現から細胞分画を同定した。

(4). クラスター間で統計的に差のある発現遺伝子は、Seurat の FindMarkers を用いて同定した。統計的有意性の算出には、Wilcoxon Rank Sum test を使用した。発現に有意差を認めた遺伝子を抽出し、Metascape (<http://metascape.org>) により遺伝子オントロジー解析を行った。

4. 研究成果

(1). 患者情報を表 1 に、各検体情報を表 2 に示す。

患者 ID	性別	年齢	診断	背景疾患	EBV 感染細胞
HLH-1	男	10	EBV-HLH	CAEBV	T 細胞
HLH-2	女	6	EBV-HLH	CAEBV	CD4 陽性 T 細胞
HLH-3	男	3	EBV-HLH	XLP1	B 細胞
IM-1	女	13	EBV-IM	なし	未検
IM-2	女	7	EBV-IM	なし	B 細胞
HC-1	男	31	健常	なし	-
HC-2	女	38	健常	なし	-

表 1

(2). EBV-HLH と EBV-IM の比較

EBV-HLH、EBV-IM、健常人 (HC) における免疫細胞の遺伝子発現を比較するため、全 scRNA-seq データを統合し、クラスタリング解析を行った。EBV-IM の急性期では、TUBA1B と STMN1 を高発現する CD8 陽性 T 細胞 (TUBA1B+STMN1+CD8+ T) の分布が特異的に増加していた (図 1)。

患者 ID	検体名	細胞数	EBV 関連遺伝子 検出細胞数	全血 EBV 定量 (IU/mL)
HLH-1	HLH-1_pre	3,149	15	3,290,642
	HLH-1_acute	2,541	10	5,705,870
	HLH-1_post	3,791	11	1,477,885
HLH-2	HLH-2_acute	3,073	8	140,124
	HLH-2_post	2,561	3	416,843
HLH-3	HLH-3_acute	2,833	55	4,609,336
	HLH-3_post	2,630	1	289,161
IM-1	IM-1_acute	3,772	0	12,552
	IM-1_post	4,938	0	556
IM-2	IM-2_acute	1,304	1	5,218,608
	IM-2_post	1,171	2	74,784
HC-1	HC-1	3,403	0	未検
HC-2	HC-2	2,239	0	未検

*copy/mL

表 2

次に、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、単球における遺伝子発現を HLH と IM で比較した。各分画で発現している遺伝子は、HLH と IM の間で異なっていた。HLH では、型インターフェロン (IFN) シグナリング (R-HSA-909733 Interferon alpha/beta signaling; $p = 10^{-29.2}$) に関わる遺伝子が、各分画で共通して発現亢進していた。特に、CD4 陽性 T 細胞における IFN シグナリングの活性化は、HLH においてのみ観察された。一方、細胞周期またはプログラム細胞死に関連する経路 (R-HSA-1640170 Cell Cycle; $p = 10^{-8.8}$, R-HSA-5357801 Programmed Cell Death; $p = 10^{-7.1}$) は、IM の特に CD8 陽性 T 細胞で活性化していた。

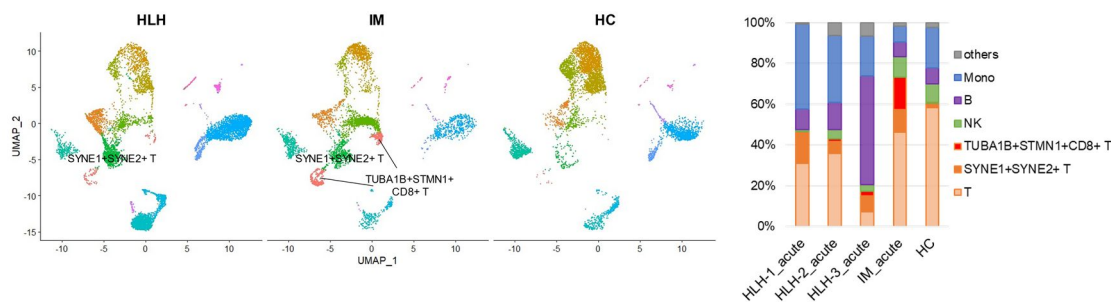


図 1

(3). EBV-IM の急性期に特異的に増加する CD8 陽性 T 細胞クラスターの発現遺伝子

EBV-IM の急性期に特異的に増加する CD8 陽性 T 細胞クラスター (TUBA1B+STMN1+CD8+ T) に着目し、IM-1 と IM-2 の急性期と回復期の統合データを分析した。急性期の TUBA1B+STMN1+CD8+ T 細胞クラスターに属する細胞の割合は、IM-1、IM-2 でそれぞれ 15.5%、19.5%であり、回復期のそれは 0.4%、0.5%であった。TUBA1B+STMN1+CD8+ T 細胞クラスターでは細胞周期に関連する遺伝子発現の増強がみられ、Seurat の CellCycleScoring を用い、細胞周期のスコアリングを他の T 細胞や NK 細胞クラスターと比較したところ、TUBA1B+STMN1+CD8+ T 細胞クラスターの細胞は、G1 期にはほとんどなく、主に S 期にあり、このクラスターの活発な細胞増殖を反映していると考えられた。

(図2)

次に、単球、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞における遺伝子発現を、IM の急性期と回復期で個別に比較検討した。CD4 陽性 T 細胞では遺伝子発現の変化はほとんど見られなかったが、CD8 陽性 T 細胞では遺伝子発現に大きな変化が見られた。急性期に発現亢進を認めた遺伝子群の遺伝子オントロジー解析により、CD8 陽性 T 細胞および単球において、II 型 IFN シグナリング (GO:0034341; Log10(p)= -12.94) の活性化が示唆された。IFI27, GBP5, MT2A, IFITM3 は、特に単球で発現亢進していた。

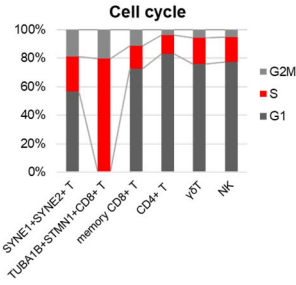


図2

(4). 異なる背景疾患をもとに発症した EBV-HLH3 例の比較

最後に、異なる背景を持つ HLH3 症例の症例間で比較検討した。3 例とも、急性期には単球の割合が増加していた。また、HLH-1_acute の T 細胞が 35.1%、HLH-3_acute の B 細胞が 55.1% と、EBV 感染細胞が属する細胞分画の割合が増大していた (図3)。各細胞分画で急性期に発現上昇を認めた遺伝子群の遺伝子オントロジー解析を行ったところ、3 例ともサイトカイン刺激に対する細胞応答 (GO:0071345) を含む種々の遺伝子発現調節経路が単球で特に活性化していることがわかった (図4)。

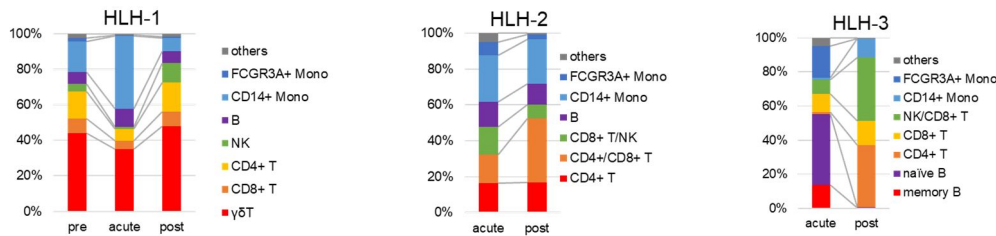


図3

T 細胞型 CAEBV を背景とする HLH-1

T 細胞クラスター中 36 細胞から EBV 関連遺伝子が検出された。EBV 関連遺伝子が検出された T 細胞と検出されなかった T 細胞との間で、宿主遺伝子の発現に有意差は認められなかった。細胞周期の分布の比較では、急性期の T 細胞の各画分について、G1 期に属する細胞が減少する傾向が見られた。

CD4 陽性 T 細胞型 CAEBV を背景とする HLH-2

急性期に、FCGR3A 陽性単球が増大していた。EBV 関連遺伝子は 11 細胞で検出され、そのうち 8 細胞は CD4 T 陽性細胞クラスターにあった。細胞周期の分布を比較すると、急性期では G1 期に属する細胞が減少傾向にあった。

XLP1 を背景とする HLH-3

経過中にリツキシマブを投与したため、回復期には B 細胞はほとんど見られなかった。単球系では、急性期に FCGR3A 陽性単球が増多しており、IFI27 の著しい発現上昇 (p<0.001) を認めた。EBV 関連遺伝子は、B 細胞で 54 細胞、全体では 56 細胞から検出され、メモリー B 細胞クラスターに局在していた。EBER とともに、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B/EBNA-3C、LMP-1 の検出がみられた。EBV 検出細胞、ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞の遺伝子発現を比較すると、EBV 検出細胞はメモリー B 細胞と同様に CD27 と IFI27 を高発現することがわかった。細胞周期の分布には大きな差を認めなかった。

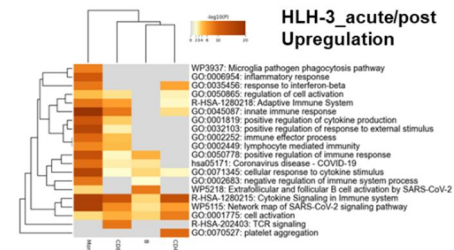
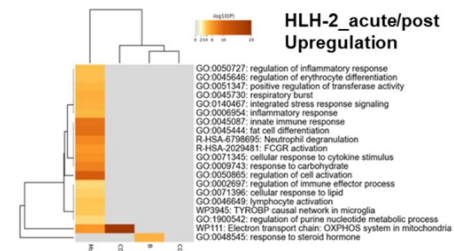
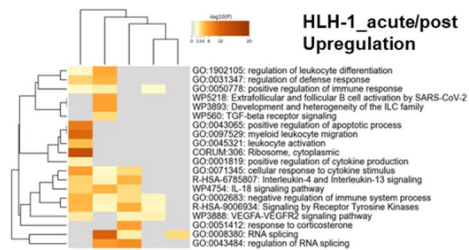


図4

(5). EBV-HLH と EBV-IM の scRNA-seq を用いた病態解析を行った。EBV-HLH では II 型インターフェロニンシグナリングに関わる遺伝子の発現増強が共通して見られた。EBV-IM の急性期に特異的に出現し、EBV-HLH では希薄な CD8 陽性 T 細胞クラスターが確認された。本クラスターの遺伝子発現プロファイルは、EBV 感染に対する免疫応答を理解する上で重要な知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木高子、佐藤好隆、鳥居ゆか、福田悠人、春田一憲、山口慎、奥野友介、濱麻人、木村宏、伊藤嘉規、川田潤一
2. 発表標題 シングルセルシーケンスを用いたEBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症の病態解析
3. 学会等名 第54回日本小児感染症学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 高子、佐藤 好隆、鳥居 ゆか、福田 悠人、春田 一憲、山口 慎、奥野 友介、濱 麻人、高橋 義行、木村 宏、伊藤 嘉規、川田 潤一
2. 発表標題 EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症のシングルセルシーケンスによる病態解析
3. 学会等名 第126回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 嘉規 (Ito Yoshinori)		
研究協力者	川田 潤一 (Kawada Jun-ichi)		

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
---------	---------