

シングルセルトランスクリプトーム解析を駆使した
ウイルス感染に対する動物種特異的自然免疫応答の同定

2022

麻生 啓文

目次

略語一覧.....	2
序論.....	4
結果.....	13
考察.....	18
結論.....	20
方法と材料.....	21
発表論文.....	29
謝辞.....	30
引用文献.....	32

略語一覽

BH	Benjamini–Hochberg
cDC	conventional dendritic cell
cDNA	complementary DNA
CIU	cell infectious unit
COVID-19	coronavirus disease 2019
DEG	differentially expressed gene
DNA	deoxyribonucleic acid
FC	fold-change
FDR	false discovery rate
GEM	gel beads-in-emulsion
GO	Gene Ontology
GSEA	gene set enrichment analysis
GSVA	gene set variation analysis
HOI	higher-order orthogonal iteration
HSV-1	herpes simplex virus type 1
IFN	interferon
IFN- α	IFN alpha
IFN-I	type-I IFN
ISG	IFN-stimulated gene
LPS	lipopolysaccharide
MOI	multiplicity of infection
NGS	next-generation sequencing

NK	natural killer
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PFU	plaque forming unit
PRR	pattern recognition receptor
QC	quality control
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
RT-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
SARS	severe acute respiratory syndrome
scRNA-seq	single-cell RNA-seq
SeV	Sendai virus
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI	unique molecular identifier

序論

人類の生存は、おそらく有史以前から感染症の流行に脅かされてきた。特に頻繁に多くの人の移動を伴うグローバル化した近代社会では、インフルエンザ、エイズ、重症急性呼吸器症候群（severe acute respiratory syndrome; SARS）、エボラウイルス病、新型コロナウイルス感染症（coronavirus disease 2019; COVID-19）などの新たに出現したウイルスの感染症（新興ウイルス感染症）によって社会生活に大きな影響が及ぶ事態が頻発している。そのため、新興ウイルス感染症がどのように現実の世界で起きるのか、その分子機序の解明、ならびに、その知見に基づく制御法の開発はきわめて重要である。

新興ウイルス感染症の多くは、自然界においてそのウイルスを保有する宿主動物（自然宿主）からヒトへ異種間伝播した人獣共通感染症と考えられている¹（**図1A**）。そして異種間伝播によってその宿主に適応したウイルスの遺伝子変異が起こり、新たな宿主で感染伝播が拡張、時には複数の宿主動物間を循環することもある。複数の宿主に適応循環するウイルスは、宿主によって異なる病原性を示すことは少なくない。長期に個体内でウイルスが生存可能な自然宿主では、そのウイルスは病原性を示さないことがほとんどである（**図1B**）。その一例として、自然宿主が旧世界ザルであるBウイルス（オナガザルヘルペスウイルス1型）があげられる。ユーラシア大陸南部を中心に広く分布するアカゲザル（*Macaca mulatta*）ではBウイルスは無症候性感染しているが、ヒト（*Homo sapiens*）では咬傷などによるBウイルス接触感染者の約半数に脳脊髄炎などの神経障害を伴う致死性徴候が観察される²。同様に、マールブルグウイルスは、自然宿主であるエジプトルーセットオオコウモリ（*Rousettus aegyptiacus*、以下ルーセットオオコウモリ）からウイルスが分離され、この宿主では無症候性感染している。ところがこのウイルスがヒトに感染すると、

きわめて重篤な熱性徴候が誘導され、ヒトからヒトへの伝播例も少なくない³。明確な臨床症状を伴う感染様式は顕性感染、感染後にほとんど臨床症状がない感染様式は不顕性感染と分類されるが、コウモリ種は、ニパウイルス、エボラウイルスや新型コロナウイルスに近縁のウイルスが不顕性感染する自然宿主であることが知られている⁴ (図1B)。

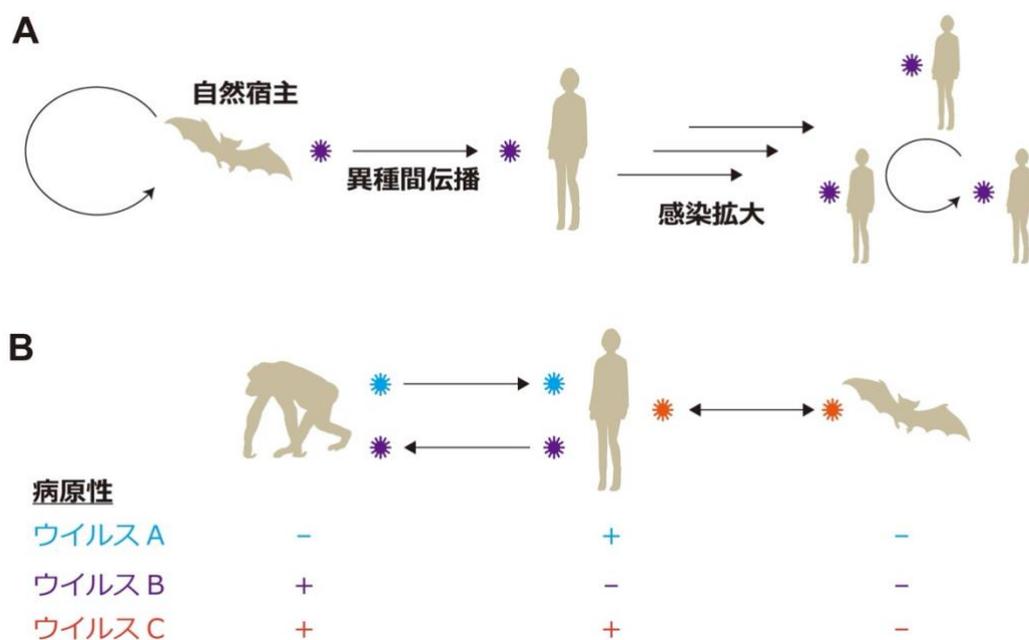


図1. ウイルスの異種間伝播と病原性

(A) ウイルスの異種間伝播と感染拡大の関係性の概念図を示す。通常、自然宿主に感染しているウイルスは特定の種にのみ感染する。異種間伝播してそれまで感染できなかった種に感染できるようになると、新たな宿主内で感染拡大する。(B) ウイルスの病原性は宿主によって異なることを示す概念図。「+」は病原性があることを示し、「-」は病原性がないことを示す。ウイルスの病原性は宿主によって異なる。特に、コウモリは多くのウイルスの自然宿主であり、顕著な症状を示すことなく感染していると考えられている。

このように宿主種によって、顕性感染あるいは不顕性感染などの異なる感染様式が生じる要因として、宿主動物種ごとの免疫応答、特に炎症性サイトカインの産生様式の異同が以前から観察されている⁵。そして最近、ルーセットオオコウモリでは、マールブルグウイルス感染ヒト個体で感染症の重篤化に関連する炎症性サイトカイン*CCL8*、*FAS*、および、*IL6*の発現誘導が起きづらいことが報告された⁶。この結果からマールブルグウイルスがルーセットオオコウモリに不顕性感染する理由の一つが、それらの炎症性サイトカインの誘導が欠如あるいは低下であること、すなわちコウモリはヒトと自然免疫応答の様式が大きく異なることが示唆されている。このように、宿主の自然免疫応答の違いとウイルスの病原性発現様式には関連性があり、したがって動物種ごとにどのような自然免疫応答が作動あるいは作動しないかを明らかにすることは、ウイルスの病原性発現機構の解明への重要な手掛かりとなる。特にコウモリは様々なヒト病原性ウイルスの自然宿主と想定されている⁴ (図1B)。コウモリ種とヒト種では自然免疫応答様式がどのように異なるかを明らかにすることは、ウイルス感染時の重症化を阻止する新たな治療法の開発に貢献すると考える。

自然免疫応答の誘導分子群は脊椎動物では広く保存されており、病原体関連分子パターン (pattern-associated molecular pattern; PAMP) によりパターン認識受容体 (pattern recognition receptor; PRR) 分子群が活性化されることで下流のインターフェロン誘導分子群を中心とした自然免疫応答反応が惹起される⁷⁻¹⁰ (図2)。ヒトおよび純系マウス種 (*Mus musculus*) の一連の免疫学研究から明らかになっているPAMPとPRRの組み合わせとしては、以下のものが挙げられる。ウイルス由来のPAMPとして、デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid; DNA) ウイルスの細胞質内DNAは、DNAセンサーであるcGAS (*CGAS*)、AIM2、IFI16、あるいは、TLR9によって認識される^{7,8,11}。リボ核酸 (ribonucleic acid; RNA) ウイルスの二本鎖RNAは、RNAセンサーであるRIG-I (*DDX58*)、MDA5 (*IFIH1*)、LGP2 (*DHX58*)、TLR3によって^{7,8}、RNAウイルスの一本鎖RNAは、RNAセンサーであるTLR7/8によって認識される^{7,8}。細菌由来のPAMPとして、グラム陰性菌のリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) は、TLR4に

よって認識される^{7,8,12}。それぞれに対応するPRRによりPAMPが認識されると、インターフェロン (interferon; IFN) 応答、および、炎症応答が誘導される^{7,8} (図2)。IFN応答では、1型インターフェロン (type-I IFN; IFN-I) がまず感染細胞より遊離し、隣接する細胞にIFN-I受容体を介在したシグナルによって様々なIFN誘導性遺伝子 (IFN-stimulated gene; ISG) の発現が誘導され、自然免疫応答が増幅される。ISGの中には、cGAS、RIG-I、LGP2、MDA5などの主要センサー分子自身に加えて、Viperin (RSAD2)、IFI6、OAS1、IFIT3などの抗ウイルス性活性を有する分子が多く含まれる¹³。特に、先行研究において見出された哺乳類共通のISG群¹³ (core^{mamm} ISG) は、哺乳類に共通する自然免疫機構の一端を担う遺伝子群であると考えられる。炎症応答では様々な炎症性サイトカインが産生され、細胞遊走性サイトカインがそれぞれの免疫担当細胞を炎症部位へ遊走させるなど、種々の免疫応答が引き起こされる。これらの自然免疫応答は、ひとたび病原体を認識して作動すると正のフィードバック機構が働くことで、素早い免疫防御反応が実行される。その一方、本来宿主を病原体から守る防御機構であるはずの自然免疫応答が過剰に作動すると、反って宿主に悪影響を及ぼすことがある。例えばCOVID-19の重症例では、過剰なサイトカイン産生により免疫細胞が異常に活性化し、血圧低下などを伴う全身性の病状悪化が加速するサイトカインストームという現象が知られている¹⁴。このような異常な免疫細胞の活性化を防ぐために、生体には免疫応答の負のフィードバック機構が存在する。例えば、SOCS2は自然免疫応答により発現が上昇する分子でありながら、NF-κBによる炎症性サイトカインの転写抑制に働く機能が知られており、炎症性サイトカインが過剰に発現誘導された際のストッパー役を担っている^{15,16}。

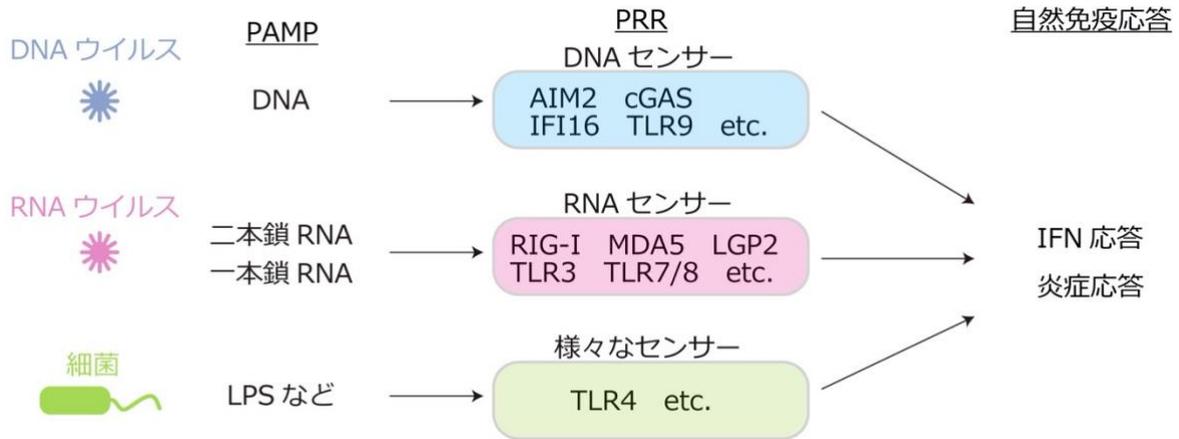


図2. 病原体のセンシングによる自然免疫応答の惹起

病原体を認識して自然免疫応答を引き起こすメカニズムの概念図。病原体由来のPAMPを宿主細胞が発現するPRRが認識し、下流の自然免疫応答を惹起する。

最近の免疫学の解析手法は、従来の細胞機能の解析手法と今世紀はじめに導入されたゲノム情報解析手法との統合によって急速に進歩している。全ゲノム解析により明らかにされた全遺伝子配列情報は、医学生物学において行われてきた抗体を用いた特定細胞の分取法や実験動物による解析実験より解明された種々の免疫細胞機能の知見と統合化され、免疫応答時の発現遺伝子群およびシグナリングに関するその分子機能の関係性の知見、それぞれの各免疫細胞の生体反応における機能を明らかにしてきた。特にモデル動物である純系マウス種の免疫機構の解析では、細胞表面分子に対する抗体による特定の細胞の検出・抽出、そして、免疫関連分子の遺伝子改変動物による生体における機能解明が進んできた。しかしながら、モデル動物を使った手法では、解析対象の動物種の細胞表面分子を認識する単クローン抗体の作製が求められ、広範な動物種間の比較解析の実行には大きな壁があった。一方、近年急速に進歩した解析手法としては、網羅的解析、いわゆるオミクス解析がある。対象検体のDNA塩基配列を網羅的に決定する次世代シーケンス (next generation sequ

encing; NGS) 法が様々な研究分野で展開され、科学的にきわめて大きなインパクトを与えている。サンプル細胞のメッセンジャーRNAを逆転写したcomplementary DNA (cDNA) の塩基配列決定法をRNAシーケンシング (RNA sequencing; RNA-seq) といい、RNA-seq等による網羅的遺伝子発現量解析であるトランスクリプトーム解析が広く試みられている。そして、フローセルデバイスによる単一細胞の細胞分取法が進歩し、そのトランスクリプトーム解析として1細胞レベルのシングルセル解析の技術展開が近年目覚ましく、取得データの大規模並列化、いわゆるハイスループット化が大きく進んでいる。1細胞単位でRNA-seqを実行する手法をシングルセルRNA-seq (single-cell RNA-seq; scRNA-seq) といい、scRNA-seqにより取得した大量のデータをコンピューターにより高速処理が可能なシングルセルトランスクリプトーム解析が実現化した。細胞分取法に関しても、2009年頃は1細胞の単離に限外希釈法による手動分取を行っていたが¹⁷、マイクロ流路内の生成エマルジョンの各液滴内に1細胞を隔離しNGSライブラリを作製する装置であるChromium (10X Genomics) の開発によりハイスループット化され、シングルセルトランスクリプトーム解析が汎用解析法のひとつとして定着した¹⁸。

オミクス解析技術の進歩は、ヒトやマウスのような従来の解析対象に加えて、コウモリのような非モデル動物の解析においても大きな恩恵をもたらした。NGSの解析対象は、ヒトやマウスといった解析対象だけでは無い。ほとんどの生物が共通して利用するメッセンジャーRNAの配列を解析する手法であるトランスクリプトーム解析の対象は、ウイルス感染細胞に存在するRNAも解析対象とすることができる。免疫学分野では、発現タンパク質を特異的に認識する抗体を利用した細胞検出・分類する手法がこれまで行われてきた。しかし、この手法では解析対象種の特異的抗体がない非モデル生物の解析が困難である。一方、生物に共通のRNA分子を対象とするRNA-seq解析は利用展開の可能が大きく、特にscRNA-seqでは、遺伝子発現パターンをもとに細胞の種類、例えばT細胞や単球などを判定することができるため、非モデル動物でも細胞種の分類後にその細胞内の発現パターンの取得が可能である。

つまり、NGS解析によって、抗体を用いた解析が困難なコウモリ種細胞のオミクス解析が可能である。

さて、オミクス解析研究により、コウモリ・ヒト間では様々な点で異なることが明らかとなってきた^{19, 20, 21}。その例として、ルーセットオオコウモリのゲノム解析からIFN-I遺伝子を含む免疫関連遺伝子の遺伝子座の重複を含む多様性の存在²²、オーストラリアクロオオコウモリ (*Pteropus alecto*) におけるトランスクリプトーム解析からIFN-Iの正常組織における恒常的な発現があげられる²³。これらの報告は、コウモリ種の免疫反応が他の哺乳類よりも強化されていることでウイルスに対する耐性を得ていることを示唆している。一方、コウモリにおけるいくつかの免疫応答の減弱が、コウモリの様々なウイルスに対する耐性の理由であるとする報告もある^{20, 22, 24}。例えば、主要なDNAセンサーであるcGASによるシグナリングの減弱や、同じく主要なDNAセンサーであるAIM2およびIFI16の遺伝的欠損が、ルーセットオオコウモリを含むコウモリ科動物共通の特徴として報告されている^{24, 25} (図3)。これらのヒト・コウモリ間の自然免疫応答の違いが、ウイルスの感染性が宿主によって異なる理由の一つとなりうるため、ヒト・コウモリ間での自然免疫応答の異同のさらなる解析は重要である。

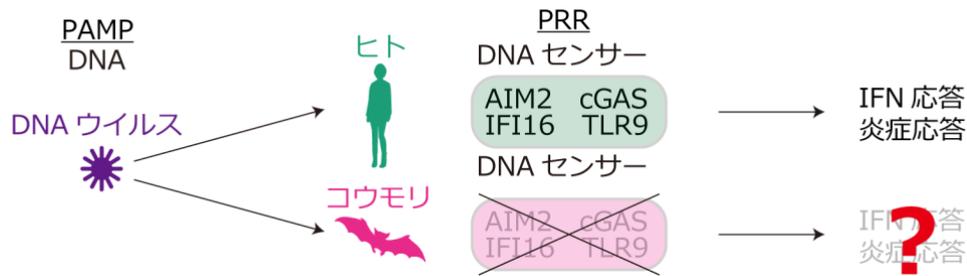


図3. DNAウイルスのセンシングにおけるヒト・コウモリ間の違い

DNAウイルス感染時の免疫応答における、既知のヒトとコウモリ間の違いを示す。DNAウイルス感染時、ヒトではPRRの一種であるDNAセンサーがウイルスDNAをPAMPとして認識することで、自然免疫応答を誘導できる。しかし、コウモリでは主要なDNAセンサー4遺伝子が働かないため、DNAウイルス感染時の自然免疫応答が働かない、あるいは少なくとも減弱していると考えられている。

以上のように、コウモリの免疫システムに関する先行研究において、ゲノム解析^{22, 23, 25}、トランスクリプトーム解析^{6, 26-28}、分子レベルおよびシグナリングレベルの解析^{24, 29, 30}から、コウモリはヒトと大きく異なる自然免疫応答を有する可能性が示されてきた。しかしそもそも、ウイルス感染に対してコウモリのどの免疫細胞がどのような応答をしているのか、そしてそれがヒトとどのように異なるのか、十分な知見が得られていない。そこで本研究では、ウイルス感染に対する自然免疫応答が霊長類とコウモリの間でどのように異なるのかを明らかにすることを目的とした。そのため、4動物種から得た末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) および3種類の感染性の刺激を用いて、1細胞レベルの網羅的遺伝子発現解析実験、つまり、シングルセルトランスクリプトーム解析を行った。第1節で実験条件の妥当性を検証したのち、第2節にてシングルセルトランスクリプトームデータを取得した。第3節では、第2節で得たデータセットに対して細胞種の分類を行った。第4節では、第1節から第3節までで得られたデータセットをもとに、自然免疫応答

の動物種間比較の重要性について検討した。その後、第1節から第3節までで得られたデータセットをもとに、動物種特異的自然免疫応答パターンの解析（第5節および第6節）、動物種特異的細胞集団の解析（第7節および第8節）、および、コウモリのDNAウイルス感染に対する応答パターンの検証（第9節）を行った。

結果

(要約)

第1節 実験条件の妥当性検証

本研究では、ウイルス感染に対する自然免疫反応が霊長類とコウモリの動物種間でどのように異なるのかを調べるために、ウイルス感染に対する網羅的遺伝子発現応答の差異を検討した。具体的には、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、ルーセットオオコウモリ（以下コウモリ）から分離したPBMCに、herpes simplex virus type 1 (HSV-1)、Sendai virus (SeV)、LPSをそれぞれ暴露刺激、あるいは非刺激の、計16種のPBMC検体（4種の動物細胞 × 4条件）を作製し、そして刺激後1日目にこれらの細胞を回収し、scRNA-seq解析を行い、それらのデータを取得・解析した。そこで、本研究において用いたヒト、サル、コウモリ由来のPBMCには、HSV-1およびSeVの感染が成立すること、そして、HSV-1感染、SeV感染、LPS刺激に対して自然免疫応答が誘導されることを実験的に検証し、感染の成立および自然免疫応答が確認された。

第2節 1細胞レベルのトランスクリプトームデータ取得

本研究で取得したscRNA-seqデータセット、各動物種のリファレンスゲノム配列、および、トランスクリプトモデルを用いて、1細胞レベルのトランスクリプトームデータを取得した。その後に低品質のデータを持つ細胞を除外するQuality Control (QC)を行った結果、計16サンプルのscRNA-seqのデータから合計40,717細胞の発現遺伝子データが基準を満たすと判定され、それらの細胞の発現遺伝子データのみを用いて以後の解析を進めた。

第3節 細胞種のカラ

各細胞の遺伝子発現パターンに基づき、細胞種のカラ解析を行った。その結果、4動物種に共通の細胞種として、「B細胞」、「ナイーブT細胞」、「キラーT細胞/Natural Killer (NK) 細胞」、「単球」、「従来型樹状細胞 (cDC)」、そして「形質細胞様樹状細胞 (pDC)」の計6細胞種に分類することができた。以下、この6細胞種への分類結果を用いて、動物種間比較解析を行った。

第4節 自然免疫応答における動物種間比較解析の重要性

動物種間の違い、刺激による違い、細胞種による違いのなかで、特にどの違いが自然免疫応答の特徴を形成するのか、各条件 (動物種×刺激×細胞種) における発現誘導パターンの階層的クラスタリングにより検証した。その結果、自然免疫応答における動物種ごとの違いは、刺激ごとの違いおよび細胞種ごとの違いよりも大きなものであることが示唆された。これは、動物種間比較解析の重要性を裏付ける結果である。

第5節 動物種特異的自然免疫応答パターン抽出手法の構築

テンソル分解を用いた動物種特異的自然免疫応答パターン抽出手法を作成した。各条件 (動物種×刺激×細胞種) における各遺伝子のfold-change (FC) のデータを用いて、動物種、刺激、細胞種、遺伝子の4つの軸からなる4階テンソルを作成した。続いて、その4階テンソルを、テンソル分解の手法の一つであるTucker分解により処理することで、各軸に対応する4軸からなるコアテンソルと各軸の分解前後の対応関係を示す4つの因子行列を得た³¹。動物種の軸に対応する因子行列A1のパターンから、動物種間共通の特徴、コウモリ特異的な特徴、サル特異的な特徴に分解できることが示唆された。さらに、動物種特異的な免疫応答パターンの詳細

な解析のために、コアテンソルと3つの因子行列（刺激、細胞種、遺伝子に対応）の積を用いて、刺激特異性と細胞特異性に基づく発現遺伝子の分類を行った。

第6節 コウモリ特異的自然免疫応答の同定

コウモリ特異的な遺伝子発現パターンの同定を行った。その結果、刺激および細胞種に共通で、動物種共通で発現誘導が強く、その中でも特にコウモリで誘導が顕著な25遺伝子を見出した。また、主要な病原体センサーや抗ウイルス性分子の遺伝子が25遺伝子のうち約半数を占めていた。これらの遺伝子の発現量をコウモリとヒト間で刺激ごとに比較した結果、刺激後の発現量はコウモリ・ヒト間で同程度だったのに対して、刺激前の発現量はコウモリでは低かった。つまりそれら25遺伝子の発現上昇率がコウモリで特異的に高いのは、刺激前の定常状態における発現量がコウモリでは低いからであるとわかった。すなわち、ヒトとコウモリでは病原体センシングから抗ウイルス応答に至るまでの反応ダイナミクスが異なることが示唆された。

第7節 動物種特異的細胞集団の同定

動物種によって異なる自然免疫応答の原因のひとつの可能性である、動物種特異的細胞集団が存在する可能性について検証した。その結果、コウモリ単球において刺激時にのみ出現する特異なサブクラスター細胞（RaC5、RaC7）の存在を見出した。次に、RaC5の特異的発現遺伝子群（RaC5マーカー）と、RaC7の特異的発現遺伝子群（RaC7マーカー）を同定し、定義された各マーカー遺伝子群の平均的発現スコアを、4動物種全てで細胞ごとに計算した。その結果、コウモリ以外の動物種においてRaC5マーカー高発現のサブセット細胞は見出せなかった。この結果は、RaC5は刺激特異的サブセットであるだけでなく、コウモリ特異的なサブセットでもあることを支持する結果である。一方、RaC7マーカー高発現の細胞はコウモリ以外の動物でも一定数確認され、4動物種全てにおいて刺激前では低発現で、

刺激後に一部の細胞で高発現となることがわかった。これらの結果から、RaC7はコウモリ特異的なサブセットではなく、他の動物種にも同様の細胞が存在するが、コウモリで特に大きな発現パターンの変化が起こる細胞群であると考えられる。

第8節 コウモリ特異的細胞集団の特徴の描出

第7節で見出した、コウモリでのみ刺激により出現する細胞サブセットRaC5およびRaC7の特徴の描出を行った。その結果、RaC5において特に発現量が高い遺伝子として、*DUSP5*、*DUSP1*、*SOCS2*が見出された。これらの遺伝子は、炎症応答を促進するMAPKやIFN応答を促進するJAK/STATの働きを抑制することで自然免疫応答のネガティブフィードバックを作用する遺伝子である^{15, 32, 33}。また、RaC5においてIFN応答関連遺伝子の発現量が低いことがわかった。以上の結果から、RaC5において、自然免疫応答のネガティブフィードバック分子群の作用により、刺激によって亢進された自然免疫応答がISG低発現の水準まで抑制されていることが示唆される。すなわち本解析から、自然免疫応答のネガティブフィードバックが作用したコウモリ単球細胞集団を見出したと考える。次に、RaC7について解析した。その結果、RaC7において特に発現量が高い遺伝子として、*CXCL6*、*IL18BP*、*CXCL8*、*CCL2*、*CCL8*、*CCL13*、*CCL5*、*CXCL10*、*IL15*、*IL4I1*が同定された。これらの遺伝子は、化学走化性に関連する遺伝子である (https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOBP_CELL_CHEMOTAXIS.html)。また、RaC7において特に発現量が高い遺伝子のgene set enrichment analysis (GSEA)の結果から、化学走化性、細胞走性、ケモカインに対する応答などのGO termのenrichmentが確認された。これらの結果は、RaC7は細胞遊走性に関わるサブクラスターであることを示唆する結果である。

第9節 DNAウイルス感染に対する応答パターン

主要なDNAセンサーであるcGAS、TLR9、AIM2、IFI16は、コウモリ細胞では変異あるいは欠損していることが先行研究^{24, 25, 34}から知られており、コウモリ細胞はDNAウイルスの感染を認識できない可能性が示唆されていた。しかしながら、コウモリの免疫細胞がDNAウイルス感染を実際に認識するかについては、感染実験による検証はされていなかった。そこで、本研究ではDNAウイルスであるHSV-1感染に対するIFN応答をコウモリと霊長類種間で比較した。その結果、コウモリの免疫細胞は霊長類の細胞と同程度にHSV-1感染に対し応答していた。この結果から、コウモリは主要な4つのDNAセンサー（cGAS、TLR9、AIM2、IFI16）が作動しなくてもDNAウイルスの感染（少なくともHSV-1）に効率よく応答することが判明した。また、DNAセンサー以外の多くのセンサー遺伝子がコウモリにおいて発現していることが確認された。特に、先行研究でヒトおよびマウスにおけるHSV-1センシングに寄与するという報告³⁵がある二本鎖RNAのセンサー遺伝子であるTLR3の発現が、霊長類だけでなくコウモリでも確認された。これらの結果から、主要なDNAセンサー4遺伝子が機能しないコウモリにおいて、他のPRRによりDNAウイルスのセンシングが補われている可能性が示唆された。

考察

(要約)

動物種ごとにウイルスの病原性が異なる大きな要因として、動物種間で自然免疫応答パターンが異なるからだと考えられている⁵。しかしながら、自然免疫応答パターンが動物種間で実際にどのように、あるいは、どの程度異なるのかについて、十分な知見は得られていない。特に、様々な新興感染症の原因ウイルスの自然宿主であると考えられているコウモリにおける特異的な自然免疫応答パターンの解明は、コウモリがウイルス感染に対して耐性あるいは無症候性である理由、あるいは翻って、ヒトがウイルス感染に対して感受性であり、それによって病態を示す理由を明らかにするきわめて重要な研究課題である。本研究では、ヒトとコウモリを含む4動物種由来のPBMCに対して4種類の刺激（陰性対照である非刺激を含む）を加えて得た計16種類の検体におけるscRNA-seqデータ（第1節、第2節）を解析することで、自然免疫応答パターンの動物種間の差異、特に霊長類とコウモリとの間の差異を明らかにした（第3節、第4節）。その結果、コウモリの病原体のセンシングから抗ウイルス応答までのダイナミクスが霊長類のそれと異なること（第5節、第6節）、自然免疫応答の負のフィードバックが作動している特異な単球サブセットがコウモリ種に存在すること（第7節、第8節）、そして、主要なDNAセンサー4遺伝子に変異あるいは欠損のためにDNAウイルスに対して自然免疫応答が減弱していると考えられているコウモリ種においても、DNAウイルスであるHSV-1の感染に対して応答できること（第9節）を示した。

本研究において明らかにできなかったこととして、動物種間で異なる自然免疫応答の描出において機能的解析や病態との関連性の解析が不十分である点がある。本研究では、トランスクリプトーム解析による遺伝子発現パターンの動物種間の

違いを解析した。その中で、特に免疫応答に関連する因子の発現パターンに特に注目して解析した。しかし、それらの遺伝子の発現パターンの違いがヒト・コウモリ間で異なる病態の違いに関連していることを直接示すような実験系ではない。うえ、その実験的検証も行っていない。さらに、本研究における技術的な限界として、遺伝子のアノテーションや機能の分類、細胞種の分類方法など、様々な点において、これまでのヒトの遺伝子情報を用いて動物種間比較解析を行ったという点が問題点として挙げられる。すなわち、本解析手法では、動物種特異的な遺伝子や、動物種によって異なる遺伝子の機能などの影響を含めた解析研究にまで至っていない。特に、本研究で示唆された、動物種特異的な発現パターンを示す遺伝子や動物種特異的な細胞サブセットについて、その機能的な側面を解析することが、コウモリの様々なウイルスに対する耐性の理由、翻って、それらのウイルスがヒトでは感染病態を示す理由を明らかにするのに重要であると考えられる。

結論

本研究では scRNA-seq データ解析により、自然免疫応答パターンの動物種間比較解析を行った。その結果、刺激の種類や細胞種によらずコウモリ細胞において病原体のセンシングから抗ウイルス応答までの反応ダイナミクスが霊長類細胞よりも誘導の幅が大きいこと（第5節、第6節）、自然免疫応答の負のフィードバックが作動している単球サブセット細胞がコウモリ種に存在すること（第7節、第8節）、そして、主要な DNA センサー4 遺伝子（*cGAS*、*AIM2*、*IFI16*、*TLR9*）が変異／欠損するコウモリ細胞においても DNA ウイルス（少なくとも HSV-1）は感染し、ISG 誘導を含む自然免疫反応が生じること（第9節）を見出した。これらのコウモリとヒトを含む霊長類間の自然免疫応答パターンの違いは、コウモリにおける様々なウイルス感染に対する耐性機構を解き明かす手がかりになると期待される。それらの関連性に関するさらなる解析が望まれる。

方法と材料

(要約)

倫理規程に関する内容

動物検体の採取に関わる全てのプロトコルは、日本学術会議の動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに則り実施した。それら動物実験に関わるプロトコルは、京都大学動物実験委員会にて承認を得ている（承認番号: 2017-B-5、2019-C-9、2019-162、2019-177、2020-C-5）。全てのヒト検体はインフォームドコンセントを書面にて得ている。ヒト検体の使用に関する全てのプロトコルは、東京大学医科学研究所の倫理委員会（承認番号: 2019-55）および、京都大学の倫理委員会（承認番号: G1089）に審査され、承認を得ている。

PBMC の入手

ヒト末梢血は腕静脈より採血した。チンパンジー末梢血は、定期健診時の麻酔下に大腿静脈より採血した。アカゲザルの末梢血は、麻酔下、瀉血および灌流の前に心臓穿刺により採血した。コウモリの末梢血は、翼膜の橈側皮静脈より採血した。PBMC は、Ficoll-Paque™ Plus (Cytiva、Cat# 17144003) を用いた密度勾配遠心法により、末梢血から分取した。

HSV-1 の調製とタイトレーション

HSV-1 (F株; GenBank 登録番号: GU734771) ³⁶は、先行研究に記載の方法 ³⁵により調製され、川口寧教授（東京大学医科学研究所）より提供された。ウイルス感染価としてプラーク形成単位 (plaque forming unit; PFU) を用いた。

SeV の調製とタイトレーション

SeV (Cantrell 株、cCdi クローン; GenBank 登録番号: AB855654) は先行研究に記載の方法³⁷により調製され、入江崇准教授 (広島大学) より提供された。ウイルス感染価として細胞感染単位 (cell infectious unit; CIU) を用いた。

感染および刺激

濃度 100,000 細胞/500 μ l の PBMC に対して、HSV-1 または SeV を感染多重度 (multiplicity of infection; MOI) 0.1 で感染させた。LPS (Sigma-Aldrich、Cat# L5024-10MG) は最終濃度 200 ng/ml となるように加えた。刺激後 1 日の時点で、刺激暴露 PBMC を回収し、後述の real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) および scRNA-seq に用いた。

RT-qPCR

RT-qPCR は先行研究と同様の方法で行った³⁸。簡潔に述べると、細胞内 RNA を QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen、Cat# 52304) を用いて抽出し、RNase-free DNase set (Qiagen、Cat# 79254) によって処理した。続いて cDNA を SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific、Cat# 18080044) と Random Primer (Thermo Fisher Scientific、Cat# 48190011) を用いて合成した。そして、Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific、Cat# 4367659) と各遺伝子に対して設計したプライマーを用いて、RT-qPCR を行った。RT-qPCR は、CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて行った。

scRNA-seq

scRNA-seq ライブラリは、Chromium Next GEM Single Cell 3' Kit (10X Genomics) を用いて、製造業者 (10X Genomics) の取扱説明に従って作製した。簡潔に言うと、細胞、ゲルビーズ、油を Chromium に入れ、1 細胞ずつ格納された gel beads-in-

emulsion (GEM) を生成した。その後バーコードがついた cDNA を増幅し、シーケンスに必要なアダプターとインデックスをつけた。ライブラリ生成の確認は BioAnalyzer (Agilent Technologies) を用いて行った。生成されたライブラリは、NovaSeq6000 platform (Illumina) を用いて paired-end でシーケンスされた。

ゲノム配列データ

各動物種のゲノム配列は、NCBI RefSeq (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome) より入手した。ヒトは GRCh38.p13 (RefSeq 登録番号: GCF_000001405.39) を、チンパンジーは Clint_PTRv2 (RefSeq 登録番号: GCF_002880755.1) を、アカゲザルは Mmul_10 (RefSeq 登録番号: GCF_003339765.1) を、ルーセットオオコウモリは mRouAeg1.p (RefSeq 登録番号: GCF_014176215.1) を用いた。なお、各ゲノム配列から、ALT コンティグ配列を除去した。ウイルスのゲノム配列も NCBI RefSeq より入手した。HSV-1 は F 株 (GenBank 登録番号: GU734771.1) を、SeV は Cantell 株 cCdi クローン (GenBank 登録番号: AB855654.1) を用いた。scRNA-seq データのマッピング用のリファレンスゲノム配列ファイルとして、各動物種のゲノム配列ファイルに HSV-1 と SeV のゲノム配列を組み込んだファイルを作成し、それらをカスタムゲノム配列として用いた。

遺伝子アノテーションとオルソログ情報

まず、4 動物種の遺伝子アノテーションを、NCBI RefSeq より入手した。ヒトは GRCh38.p13 の Release 109.20200228 を、チンパンジーは Clint_PTRv2 の Release 105 を、アカゲザルは Mmul_10 の Release 103 を、ルーセットオオコウモリは mRouAeg1.p の Release 101 を用いた。なお、ウイルスの発現量も定量できるよう、HSV-1 および SeV の全長を一つのエクソンとして、(+) 鎖と (-) 鎖のそれぞれ二本ずつ、計 4 行を追加した。その結果得られた遺伝子アノテーションをカスタム遺伝子アノテーションとして用いた。

ヒトとその他の動物種（チンパンジー、アカゲザル、ルーセットオオコウモリ）のオルソログ遺伝子のリストは、2021年7月26日にNCBIから入手した（https://ftp.ncbi.nih.gov/gene/DATA/gene_orthologs.gz）。そのファイルから、ヒト（taxonomy ID: 9606）、チンパンジー（taxonomy ID: 9598）、アカゲザル（taxonomy ID: 9544）、そしてルーセットオオコウモリ（taxonomy ID: 9407）のオルソログ情報を抽出した。

NCBIから入手したオルソログ情報において、ルーセットオオコウモリの情報の中にCD4やIRF1などの一部の免疫関連遺伝子が含まれていなかった。そのため、Bat1K コンソーシアム（<https://bat1k.com>）による遺伝子アノテーション情報³⁷を用いることで、それらのオルソログ情報を解析に組み込んだ。

scRNA-seq データからの遺伝子発現行列の取得

scRNA-seq データセットから、CellRanger (v6.0.1) (10X Genomics) を用いて遺伝子発現行列を取得した。まず、各動物種において、カスタムゲノム配列とカスタム遺伝子アノテーションを用いて”cellranger mkref”を実行することで、カスタムリファレンスを作成した。続いて、scRNA-seq の生シーケンスデータとカスタムリファレンスを用いて、”cellranger count”をデフォルトの設定で実行することで、unique molecular identifier (UMI) ベースのカウント行列を入手した。

scRNA-seq データの QC

R パッケージ Seurat (v4.0.4)⁴⁰、および、リファレンスベースの細胞分類予測プログラム Azimuth (v0.4.3) (<https://azimuth.hubmapconsortium.org>) を用いて、各細胞の細胞分類を予測し、シーケンスクオリティの低い細胞および解析対象外の細胞を除去した。

データの統合、データの可視化、細胞クラスタリング

データの統合、データの可視化、および細胞クラスタリングは、Seurat を用いて動物種ごとに行った。この処理では、HSV-1 と SeV 由来のウイルス発現量のデータは除いて行った。

データの統合は、非刺激を含む 4 種類の刺激を加えた検体の発現行列の統合を、動物種ごとに行った。その際、非刺激のデータを「リファレンス」としてデータの統合を実行した。

データの可視化は、RunPCA 関数を実行した後、RunUMAP 関数を用いて、Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) ⁴¹ を実行した。

細胞クラスタリングは、動物種ごとに、グラフベースの教師なしクラスタリングを行った。

細胞分類

前項目 (データの統合、データの可視化、細胞クラスタリング) においてグラフベースの教師なしクラスタリングによって同定した各クラスターを、Azimuth による細胞種予測結果、各クラスター間の距離、動物種間のクラスターの対応関係の 3 つの情報を参考に、マニュアルで 11 細胞種に分類した。

また、11 種類の細胞種への分類後に行った階層的クラスタリング (後述の階層的クラスタリングの項を参照) の結果をふまえ、以降の解析ではより粗雑な 6 種類の細胞種 (B、ナイーブ T、キラーT/NK、単球、cDC、pDC) にまとめて解析することとした。

階層的クラスタリング

本研究において、3種類の階層的クラスタリングを行った。一つ目は、細胞種の判定のために行った。二つ目は、細胞種間の類似性を検証するために行った。三つ目は、動物種間、刺激間、および、細胞種間の免疫応答の差のいずれが免疫応答の特

徴において最も影響のある違いであるかを確認するために行った。発現量あるいは FC の値を持つ行列に対して、主成分分析を行ってから、距離行列を作成し、ワード法による階層的クラスタリングを行った。

テンソル分解

本研究における複雑な構造のデータ（4 動物種×3 刺激×4 細胞種×7557 オルソログ遺伝子）から、動物種特異的あるいは共通の遺伝子発現誘導パターンを抽出するために、テンソル分解をした。まず、各条件における FC の値を Z score 化し、その値を持つ 4 階テンソルを作成し、テンソル分解の一手法である Tucker 分解を行った³¹。テンソル分解は、Python のパッケージである TensorLy（v0.6.0）（<http://tensorly.org/stable/index.html>）を用いて行った。Tucker 分解は higher-order orthogonal iteration（HOI）のアルゴリズムにより実行された。HOIにおいて、コアテンソルの大きさ、いわゆるランクは、[動物種: 3、刺激: 2、細胞種: 3、遺伝子: 15]と設定した。

テンソル分解の結果を用いた遺伝子の分類

テンソル分解を利用した遺伝子分類は、コアテンソルと 3 つの因子行列 A2、A3、A4 の積における値のパターン（high/mid/low）に基づいて、遺伝子分類ごとに定義した理想的なパターンに一致する遺伝子分類の候補を選抜した後、その候補の中から「類似度スコア」が最も良い遺伝子分類をその遺伝子の遺伝子分類とした。

まず、コアテンソルと三つの因子行列 A2（刺激に対応）、A3（細胞種に対応）、A4（遺伝子に対応）の積を、R パッケージである rTensor（v1.4.8）（<https://github.com/rikenbit/rTensor>）の ttl 関数を用いて計算した。ここで、HSV-1 と SeV の平均値を刺激「Virus」における値として取り扱い、同様に、ナイーブ T とキラーT/NK の平均値を細胞種「T/NK」における値として取り扱った。つまり、こ

れ以降の遺伝子分類では、2 刺激（Virus と LPS）3 細胞種（B、T/NK、単球）の 6 条件として取り扱った。

次に、L1_1、L1_2、L1_3 のそれぞれに対応する箱状データごとに、遺伝子を 11 種類の遺伝子分類に分類した。分類方法を要約すると、値のパターン（high/mid/low）を用いて、理想的なパターンと一致する遺伝子分類を候補とし、さらに「類似度スコア」が最小の遺伝子分類を選抜し、最後にいくつかの基準から最終版の遺伝子分類を確定させた。

GSEA

GO 解析は、フィッシャーの正確確立検定で行った。その際、MSigDB（v7.3）（<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>）で定義された GO canonical pathways と GO biological processes を用いた。P 値の補正は、Benjamini–Hochberg（BH）法で行った。

Gene set variation analysis（GSVA）スコアの計算

遺伝子セットレベルの発現スコアは、R パッケージである GSVA（v1.38.2）⁴² を用いて計算した。その際、アルゴリズムは”ssgsea”を使用した。

DEG およびマーカー遺伝子の同定

コウモリ単球において、RaC5 あるいは RaC7 と、それ以外のサブクラスター間での DEG は、Seurat パッケージの FindMarkers 関数を用いて同定した。DEG の定義は、以下 3 つの基準を満たす遺伝子とした。1 つ目は、BH 法によって計算された false discovery rate（FDR）が 0.05 以下であること、2 つ目は、平均 log₂FC が 1 より大きいまたは -1 未満であること、3 つ目は、各画分における発現細胞割合が 20% より大きいことである。

RaC5 マーカーおよび RaC7 マーカーは、先ほど同定された DEG のうち、各クラスターにおける発現量が高い遺伝子、つまり、 \log_2FC の値が 1 より大きい遺伝子と定義した。

発表論文

第1節から第9節

Single-cell transcriptome analysis illuminating the characteristics of species-specific innate immune responses against viral infection

Hirofumi Aso, Jumpei Ito, Haruka Ozaki, Yukie Kashima, Yutaka Suzuki, Yoshio Koyanagi, and Kei Sato

bioRxiv 誌 doi: <https://doi.org/10.1101/2022.12.06.519403>

2022年12月に掲載

謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導とご鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 薬科学専攻 分子ウイルス学分野 小柳義夫 教授（現 京都大学国際高等教育院 特定教授）、京都大学大学院薬学研究科 薬科学専攻 免疫制御学分野 生田宏一 教授、東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 システムウイルス学分野 佐藤佳 教授に心より御礼申し上げます。

本論文をご査読頂き、貴重なご意見を頂戴しました、京都大学化学研究所附属バイオインフォマティクスセンター 生命知識工学研究領域 馬見塚拓 教授、ならびに、京都大学医生物学研究所 ウイルス制御分野 橋口隆生 教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、様々な面で丁寧なご指導を受け賜りました東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 システムウイルス学分野 伊東潤平 助教に深く感謝いたします。

本研究の scRNA-seq データ解析に関して様々なご指導・ご助言を受け賜りました筑波大学医学医療系 バイオインフォマティクス研究室 尾崎遼 准教授に深く感謝いたします。

本研究の scRNA-seq データ取得実験に関して様々なご指導・ご協力を受け賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 生命システム観測分野 鈴木穰 教授ならびに鹿島幸恵 特任助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたって、多大なご支援をいただきました東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 システムウイルス学分野 三沢尚子 女史ならびに菅波麻衣 女史に深く感謝いたします。

本研究における実験を行っていただきました、東京大学医科学研究所 大出暁子 女史、東京大学大学院新領域創成科学研究科 阿部佳澄 女史に感謝申し上げます。

実験の材料の分与をしていただいた、京都大学ヒト行動進化研究センター 今井啓雄 教授、東京大学医科学研究所 川口寧 教授、広島大学大学院医系科学研究科 入江崇 准教授、京都市衛生環境研究所食肉検査部門 森田鮎子 女史に感謝申し上げます。

本研究は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータ SHIROKANE (<http://sc.hgc.jp/shirokane.html>) を利用しました。本研究は京都大学 霊長類研究所の共同利用プログラム (2019-c9) を利用しました。

引用文献

1. Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993. 10.1038/nature06536.
2. Huff, J.L., and Barry, P.A. (2003). B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease. *Emerg Infect Dis* 9, 246-250. 10.3201/eid0902.020272.
3. Towner, J.S., Amman, B.R., Sealy, T.K., Carroll, S.A., Comer, J.A., Kemp, A., Swanepoel, R., Paddock, C.D., Balinandi, S., Khristova, M.L., et al. (2009). Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* 5, e1000536. 10.1371/journal.ppat.1000536.
4. Letko, M., Seifert, S.N., Olival, K.J., Plowright, R.K., and Munster, V.J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat Rev Microbiol* 18, 461-471. 10.1038/s41579-020-0394-z.
5. Seal, S., Dharmarajan, G., and Khan, I. (2021). Evolution of pathogen tolerance and emerging infections: A missing experimental paradigm. *Elife* 10. 10.7554/eLife.68874.
6. Guito, J.C., Prescott, J.B., Arnold, C.E., Amman, B.R., Schuh, A.J., Spengler, J.R., Sealy, T.K., Harmon, J.R., Coleman-McCray, J.D., Kulcsar, K.A., et al. (2021). Asymptomatic infection of Marburg virus reservoir bats is explained by a strategy of immunoprotective disease tolerance. *Curr Biol* 31, 257-270.e255. 10.1016/j.cub.2020.10.015.
7. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801. 10.1016/j.cell.2006.02.015.

8. Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805-820. 10.1016/j.cell.2010.01.022.
9. Hansen, J.D., Vojtech, L.N., and Laing, K.J. (2011). Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol* *35*, 886-897. 10.1016/j.dci.2011.01.008.
10. Lu, Y., Su, F., Li, Q., Zhang, J., Li, Y., Tang, T., Hu, Q., and Yu, X.Q. (2020). Pattern recognition receptors in *Drosophila* immune responses. *Dev Comp Immunol* *102*, 103468. 10.1016/j.dci.2019.103468.
11. Dempsey, A., and Bowie, A.G. (2015). Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology* *479-480*, 146-152. 10.1016/j.virol.2015.03.013.
12. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085-2088. 10.1126/science.282.5396.2085.
13. Shaw, A.E., Hughes, J., Gu, Q., Behdenna, A., Singer, J.B., Dennis, T., Orton, R.J., Varela, M., Gifford, R.J., Wilson, S.J., and Palmarini, M. (2017). Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. *PLoS Biol* *15*, e2004086. 10.1371/journal.pbio.2004086.
14. Fajgenbaum, D.C., and June, C.H. (2020). Cytokine storm. *N Engl J Med* *383*, 2255-2273. 10.1056/NEJMra2026131.
15. Posselt, G., Schwarz, H., Duschl, A., and Horejs-Hoeck, J. (2011). Suppressor of cytokine signaling 2 is a feedback inhibitor of TLR-induced activation in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* *187*, 2875-2884. 10.4049/jimmunol.1003348.
16. Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* *7*, 454-65. 10.1038/nri2093.

17. Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., et al. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 6, 377-82. 10.1038/nmeth.1315.
18. Zheng, G.X., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8, 14049. 10.1038/ncomms14049.
19. Schountz, T., Baker, M.L., Butler, J., and Munster, V. (2017). Immunological control of viral infections in bats and the emergence of viruses highly pathogenic to humans. *Front Immunol* 8, 1098. 10.3389/fimmu.2017.01098.
20. Gorbunova, V., Seluanov, A., and Kennedy, B.K. (2020). The world goes bats: Living longer and tolerating viruses. *Cell Metab* 32, 31-43. 10.1016/j.cmet.2020.06.013.
21. Banerjee, A., Baker, M.L., Kulcsar, K., Misra, V., Plowright, R., and Mossman, K. (2020). Novel insights into immune systems of bats. *Front Immunol* 11, 26. 10.3389/fimmu.2020.00026.
22. Pavlovich, S.S., Lovett, S.P., Koroleva, G., Guito, J.C., Arnold, C.E., Nagle, E.R., Kulcsar, K., Lee, A., Thibaud-Nissen, F., Hume, A.J., et al. (2018). The Egyptian rousette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity. *Cell* 173, 1098-1110.e1018. 10.1016/j.cell.2018.03.070.
23. Zhou, P., Tachedjian, M., Wynne, J.W., Boyd, V., Cui, J., Smith, I., Cowled, C., Ng, J.H., Mok, L., Michalski, W.P., et al. (2016). Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 2696-2701. 10.1073/pnas.1518240113.
24. Xie, J., Li, Y., Shen, X., Goh, G., Zhu, Y., Cui, J., Wang, L.F., Shi, Z.L., and Zhou, P. (2018). Dampened STING-dependent interferon activation in bats. *Cell Host Microbe* 23, 297-301.e294. 10.1016/j.chom.2018.01.006.

25. Ahn, M., Cui, J., Irving, A.T., and Wang, L.F. (2016). Unique loss of the PYHIN gene family in bats amongst mammals: Implications for inflammasome sensing. *Sci Rep* 6, 21722. 10.1038/srep21722.
26. Irving, A.T., Zhang, Q., Kong, P.S., Luko, K., Rozario, P., Wen, M., Zhu, F., Zhou, P., Ng, J.H.J., Sobota, R.M., and Wang, L.F. (2020). Interferon regulatory factors IRF1 and IRF7 directly regulate gene expression in bats in response to viral infection. *Cell Rep* 33, 108345. 10.1016/j.celrep.2020.108345.
27. De La Cruz-Rivera, P.C., Kanchwala, M., Liang, H., Kumar, A., Wang, L.F., Xing, C., and Schoggins, J.W. (2018). The IFN response in bats displays distinctive IFN-stimulated gene expression kinetics with atypical RNASEL induction. *J Immunol* 200, 209-217. 10.4049/jimmunol.1701214.
28. Lin, H.H., Horie, M., and Tomonaga, K. (2022). A comprehensive profiling of innate immune responses in *Eptesicus* bat cells. *Microbiol Immunol* 66, 97-112. 10.1111/1348-0421.12952.
29. Ahn, M., Anderson, D.E., Zhang, Q., Tan, C.W., Lim, B.L., Luko, K., Wen, M., Chia, W.N., Mani, S., Wang, L.C., et al. (2019). Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. *Nat Microbiol* 4, 789-799. 10.1038/s41564-019-0371-3.
30. Goh, G., Ahn, M., Zhu, F., Lee, L.B., Luo, D., Irving, A.T., and Wang, L.F. (2020). Complementary regulation of caspase-1 and IL-1 β reveals additional mechanisms of dampened inflammation in bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 28939-28949. 10.1073/pnas.2003352117.
31. Tucker, L.R. (1966). Some mathematical notes on three-mode factor analysis. *Psychometrika* 31, 279-311. 10.1007/BF02289464.
32. Shah, S., King, E.M., Chandrasekhar, A., and Newton, R. (2014). Roles for the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase, DUSP1, in feedback control of

- inflammatory gene expression and repression by dexamethasone. *J Biol Chem* 289, 13667-13679. 10.1074/jbc.M113.540799.
33. Li, Q.J., Chau, J., Ebert, P.J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., et al. (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129, 147-161. 10.1016/j.cell.2007.03.008.
34. Banerjee, A., Rapin, N., Bollinger, T., and Misra, V. (2017). Lack of inflammatory gene expression in bats: a unique role for a transcription repressor. *Sci Rep* 7, 2232. 10.1038/s41598-017-01513-w.
35. Sato, R., Kato, A., Chimura, T., Saitoh, S.I., Shibata, T., Murakami, Y., Fukui, R., Liu, K., Zhang, Y., Arii, J., et al. (2018). Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTORC2 axis. *Nat Immunol* 19, 1071-1082. 10.1038/s41590-018-0203-2.
36. Ejercito, P.M., Kieff, E.D., and Roizman, B. (1968). Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* 2, 357-364. 10.1099/0022-1317-2-3-357.
37. Yoshida, A., Kawabata, R., Honda, T., Sakai, K., Ami, Y., Sakaguchi, T., and Irie, T. (2018). A single amino acid substitution within the paramyxovirus Sendai virus nucleoprotein is a critical determinant for production of interferon-beta-inducing copyback-type defective interfering genomes. *J Virol* 92. 10.1128/jvi.02094-17.
38. Yamada, E., Nakaoka, S., Klein, L., Reith, E., Langer, S., Hopfensperger, K., Iwami, S., Schreiber, G., Kirchhoff, F., Koyanagi, Y., et al. (2018). Human-specific adaptations in Vpu conferring anti-tetherin activity are critical for efficient early HIV-1 replication in vivo. *Cell Host Microbe* 23, 110-120.e117. 10.1016/j.chom.2017.12.009.
39. Jebb, D., Huang, Z., Pippel, M., Hughes, G.M., Lavrichenko, K., Devanna, P., Winkler, S., Jermin, L.S., Skirmuntt, E.C., Katzourakis, A., et al. (2020). Six reference-quality genomes reveal evolution of bat adaptations. *Nature* 583, 578-584. 10.1038/s41586-020-2486-3.

40. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., 3rd, Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* *184*, 3573-3587.e3529. 10.1016/j.cell.2021.04.048.
41. McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2018). UMAP: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. arXiv:1802.03426.
42. Hänzelmann, S., Castelo, R., and Guinney, J. (2013). GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* *14*, 7. 10.1186/1471-2105-14-7.