

京都大学	博士（薬科学）	氏名	麻生 啓文
論文題目	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		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>一部のウイルスは異なる種に感染し、種間伝播・循環する。その病原性には、ウイルスと宿主の組み合わせによって大きな違いがある。ウイルス顕性・不顕性感染時の免疫反応の比較によるウイルスの病原性発現機構の解明は、治療法開発に直結するゆえにきわめて重要である。コウモリは、エボラウイルスや新型コロナウイルスなどのヒト致死性新興ウイルスに、自然宿主として不顕性感染していると考えられている。先行研究ではゲノム、分子機能、シグナリングなどの解析から、自然免疫反応で特にコウモリには他種と異なる特徴があることが分かってきた。しかしながら、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、十分な知見が得られていない。そこで本研究では、ウイルス感染そのものに対する免疫応答として霊長類とコウモリの動物種間で自然免疫反応がどのように異なるのかを調べるために、1細胞レベルの網羅的遺伝子発現解析実験をおこなった。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）から分離した末梢血単核球細胞（PBMC）に、異種感染する単純ヘルペスウイルス1型（DNAウイルスであるHSV-1）あるいはセンダイウイルス（RNAウイルスであるSeV）、陰性対照として非刺激（Mock）、自然免疫誘導の陽性対照としてリポ多糖（LPS）をそれぞれ暴露刺激して、計16種のPBMC検体（4種の動物細胞 × 4条件）を回収した。そしてそれらのSingle-cell RNA sequencing（scRNA-seq）データを取得し、宿主の遺伝子発現プロファイルを1細胞レベルで解析した。</p> <p>まず、動物ごとにscRNA-seqデータの教師なしクラスタリングを行い、網羅的遺伝子発現パターンに基づく各クラスターの細胞種の帰属同定を行った。その結果、ウイルス感染による細胞種の構成割合の変化が、動物種によって明確に異なることがわかった。次に、各細胞を霊長類とコウモリ間で共通に検出されたB細胞、Naive T細胞、KillerTKN（Killer T細胞およびNatural Killer（NK）細胞）、単球、cDC（従来型樹状細胞）、pDC（形質細胞様樹状細胞）の6細胞種に分類し、下流の動物種間比較解析に用いた。</p> <p>次に、自然免疫応答の動物種間の違いと、細胞種や刺激の差異などの他の因子の違いとの関係性を調べた。具体的には、動物種、刺激、細胞種の全組み合わせの平均発現変動率を遺伝子ごとに計算し、主成分分析による次元圧縮を行い、そのデータの距離行列を用いた階層的クラスタリングを行った。その結果、まず動物種ごとにデータは分岐し、続いてそれぞれの細胞種ごとに分岐した。すなわち、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わかった。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。</p> <p>次に、動物種特異的な自然免疫応答パターンの同定のための解析を行った。具体的には、テンソル分解により、動物種共通の応答パターンおよびコウモリ特異的な応答パターンを抽出した。さらに、動物種共通の応答パターンおよびコウモリ特異的な応答パターンの両方で、刺激および細胞種に共通して発現変動量が大きい25遺伝子を見出した。その中には、主要な病原体センサーであるcGAS、RIG-I、LGP2、MDA5の他に、Viperin、IFI6、OAS1、IFIT3</p>			

などの抗ウイルス性分子の遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子発現量をコウモリとヒト間で刺激ごとに比較したところ、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。つまりそれらの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までのダイナミクスが異なることが示唆された。

さらに、動物種によって異なる自然免疫応答の原因となりうる動物種特異的な細胞種の同定を行った。4動物種のそれぞれにおいて、B細胞、T/NK細胞、および単球のデータを次元削減し、刺激の有無でサブクラスターの構成パターンを比較したところ、コウモリ単球において、刺激特異的に出現するサブクラスターの存在を見出した。そのサブクラスターは、インターフェロン（IFN）応答性遺伝子（ISG）が低発現であり、自然免疫応答のnegative feedbackに関わる*DUSP1*、*DUSP5*、*SOCS2*が高発現であった。これらの結果は、negative feedback分子群の作動により、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を示唆する。すなわち本解析から、自然免疫応答のnegative feedback作動コウモリ単球細胞集団を見出したと考える。

主要なDNAセンサーであるcGAS、TLR9、AIM2、IFI16は、コウモリでは変異あるいは欠損していることが先行研究のゲノム解析から知られており、コウモリはDNAウイルス感染を認識できない可能性が示唆されていた。しかし、免疫細胞に対するウイルス感染実験による検証はされていなかった。そこで、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ところ、コウモリ細胞は霊長類細胞と同程度に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DNAセンサー4遺伝子の作動がなくても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分かった。

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、コウモリ・ヒト間のウイルスセンシングダイナミクスの違い、コウモリ単球特異的な細胞集団の同定、およびDNAウイルスセンシングの減弱が想定されていたコウモリにおける正常なIFN応答を示した。本研究により、宿主間におけるウイルスの病原性の違いを規定しうる自然免疫応答の違いの一端が明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

ウイルスは様々な動物種に感染し動物種間を循環しているが、ウイルス感染による病原性の発現の程度はウイルスと宿主の組み合わせによって異なる。様々なヒト病原性ウイルスの自然宿主であるコウモリではそれらのウイルスが不顕性感染していることが多いが、ウイルス感染に対し免疫細胞がどのように応答をしているのかについては十分な知見が得られていない。本研究では、ウイルス感染に対する自然免疫応答の動物種間比較により、霊長類とコウモリの間で自然免疫応答がどのように異なるかを検討するために、single-cell RNA sequencing 解析を行った。まず、自然免疫応答は刺激や細胞種の違いよりも、動物種の違いが大きく寄与することを明らかにした。次に、テンソル分解を利用した解析により、動物種共通の応答パターンおよびコウモリ特異的な応答パターンを抽出した。動物種共通の応答パターンとコウモリ特異的な応答パターンの両方で発現変動が大きい 25 遺伝子を同定した。その発現量をコウモリとヒト間で比較したところ、病原体センシングから抗ウイルス応答までのダイナミクスが異なることを示唆する結果を得た。さらに、コウモリ単球において刺激特異的に出現するサブクラスターとして、インターフェロン応答性遺伝子 (ISG) を低発現する集団および自然免疫応答の **negative feedback** がかったコウモリ単球特異的な集団を発見した。本研究により、コウモリとヒト間のウイルスセンシングダイナミクスの違い、コウモリ単球特異的な細胞集団の存在などが示された。以上の研究は、宿主動物種間におけるウイルス病原性の違いの解明に貢献し、ウイルス感染症における免疫応答の機序の理解に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年2月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、(令和7年3月31日までの間)当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：令和5年3月24日以降