

## 論文の内容の要旨

論文題目 感染初期の細胞における確率論的な抗ウイルス応答の選択

氏名 井上 萌

### [序論]

ウイルスに感染した際、ウイルスを体内から排除するための初期の防御応答として自然免疫系が働く。自然免疫系において細胞がウイルスを排除する戦略の一つに I 型インターフェロン(IFN)の産生がある。この戦略においては、まず侵入した RNA ウイルスや DNA ウイルスから産生された二本鎖 RNA(dsRNA)や二本鎖 DNA が細胞内センサーによって認識され、その後のシグナル伝達によって感染細胞において I 型 IFN の発現が誘導される。感染細胞によって分泌された I 型 IFN は感染細胞自身や周囲の細胞によって受容体を介して受容され、それらの細胞に IFN stimulated genes (ISGs)の発現を誘導する。ISGs を発現した細胞はウイルスの増殖しにくい状態である抗ウイルス状態となる。

感染初期にウイルスを排除する戦略として、もう一つ重要なのがアポトーシスの誘導である。アポトーシスという戦略においては感染細胞が死ぬことによってウイルスの増殖の場所をなくし、ウイルスの排除に貢献すると考えられている。

これまでの研究では「細胞を集団全体として観察」することで、ウイルス感染後に I 型 IFN の産生とアポトーシスの両方が誘導されることが示されてきた(Figure 1 上)。また、dsRNA の刺激やインフルエンザウイルスなどの感染において感染細胞が分泌した I 型 IFN は細胞にアポトーシスを誘導することも報告されている。I 型 IFN は分泌因子であり、I 型 IFN を産生した細胞自身と周囲の細胞のどちらにも作用する。これらの結果から、I 型 IFN を産生した細胞でアポトーシスも誘導されると考えられてきた。しかし、I 型 IFN の産生とアポトーシスの誘導を「1 細胞ごとに観察」した例はほとんどない。このため、本当に同じ細胞で両方の応答が誘導されているかは分かっていない。もし、I 型 IFN を産生している細胞がアポトーシスしてしまうと、十分な量の I 型 IFN が産生されないことが予想される。では、I 型 IFN を産生する細胞とアポトーシスする細胞は本当に同じ細胞なのだろうか。これを調べるため、本研究では、これら 2 つの応答に注目して一細胞ごとの応答を観察することを目指した(Figure 1 下)。

### [実験系]

私はまず、I 型 IFN の産生とアポトーシスを 1 細胞ごとに検出する系を構築した(Figure 2)。I 型

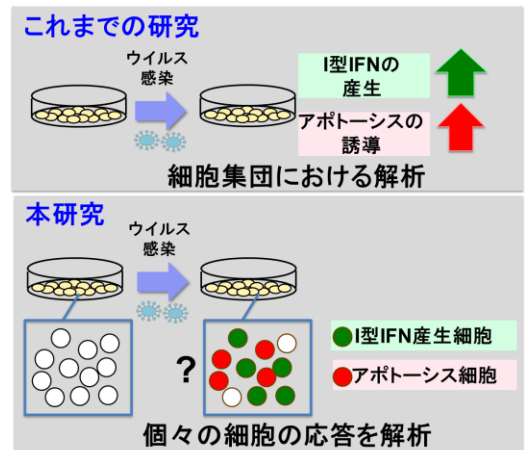


Figure 1. 従来の研究と本研究の目的

IFN の産生を検出するために、I 型 IFN の一つである IFN $\beta$  のレポーターマウスを用いた。このマウス由来の細胞では、IFN $\beta$  が発現すると内部リボソーム導入部位 (IRES 配列) を介して yellow fluorescent protein (YFP) を発現する。このため、IFN $\beta$  を産生した細胞は YFP 陽性となる。一方、アポトーシスを検出するために AnnexinV binding assay を行い、アポトーシス細胞を AnnexinV 陽性細胞として検出した。

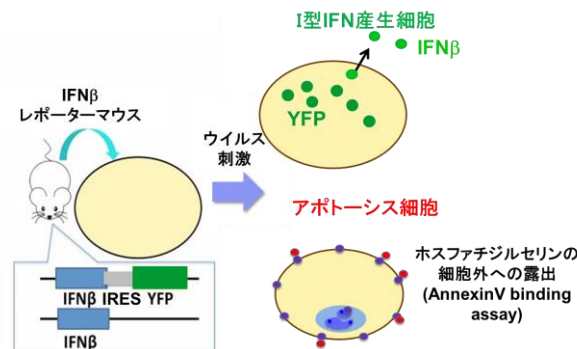


Figure 2. I 型 IFN 産生細胞とアポトーシス細胞を一細胞ごとに検出する実験系

## [結果]

### 1. ウイルス感染後、I 型 IFN を産生する細胞とアポトーシスする細胞は異なっていた

まず、クローン化した IFN $\beta$  のレポーターマウス由来のマウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) に対しウイルス模倣刺激として dsRNA をトランスフェクションし、I 型 IFN の産生とアポトーシスの誘導が起こるか確かめた。すると、dsRNA をトランスフェクションして 24 時間後の MEF の細胞集団で YFP 陽性細胞も AnnexinV-Cy5 陽性細胞も増加したことから、I 型 IFN の産生もアポトーシスも誘導されたことが確認された。驚いたことに、このとき YFP と AnnexinV-Cy5 のうち、YFP 単独陽性細胞と AnnexinV-Cy5 単独陽性細胞が両方陽性の細胞に比べて多く存在した (Figure 3a)。同じ MEF クローンに対して水泡性口内炎ウイルス (VSV) を感染させても同様の結果が得られたことから (Figure 3b)、遺伝的に均一な MEF クローンにおいてウイルス感染に対しアポトーシスを誘導せずに I 型 IFN を産生する細胞集団 (以下、I 型 IFN 産生集団と呼ぶ) と I 型 IFN を誘導せずにアポトーシスする細胞集団 (以下、アポトーシス集団と呼ぶ) という 2 つの異なる集団が存在することが示唆された。

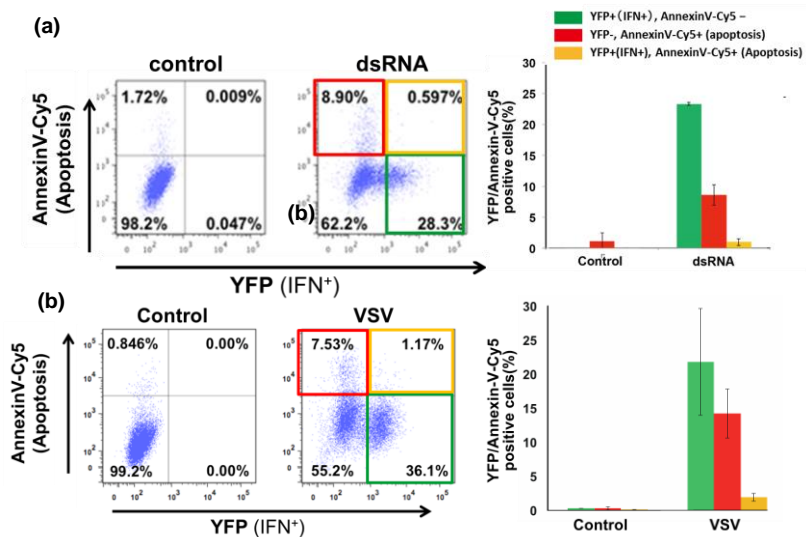


Figure 3. ウイルス感染後に I 型 IFN を産生する細胞とアポトーシスする細胞は異なっていた。(a) dsRNA 刺激後と (b) VSV 刺激後の MEF クローンにおける YFP 陽性細胞 (I 型 IFN 産生選択細胞) と AnnexinV-Cy5 陽性細胞 (アポトーシス選択細胞)。それぞれ右のグラフは FACS における YFP 単独要請細胞 (緑) と AnnexinV-Cy5 単独要請細胞 (赤) と両要請細胞 (黄) の定量データ

れたことから (Figure 3b)、遺伝的に均一な MEF クローンにおいてウイルス感染に対しアポトーシスを誘導せずに I 型 IFN を産生する細胞集団 (以下、I 型 IFN 産生集団と呼ぶ) と I 型 IFN を誘導せずにアポトーシスする細胞集団 (以下、アポトーシス集団と呼ぶ) という 2 つの異なる集団が存在することが示唆された。

### 2. 一度目の刺激に対して I 型 IFN を産生した細胞でも、二度目の刺激に対して再び I 型 IFN 選択細胞とアポトーシス選択細胞という 2 つの集団に分かれた

上記の実験で遺伝的に均一な細胞が I 型 IFN 産生集団とアポトーシス集団に分かれることが示唆された。では I 型 IFN 産生集団とアポトーシス周田の違いはどのようにして生じるのだろうか。たとえ遺伝的に均一な細胞であっても、一方の応答を起こしやすくなるような何らかのバイアスが一部の細

胞にあった可能性も考えられる。例えば IFN の産生を選択した細胞は、次に刺激した時にも IFN の産生を選択し、一度目の刺激に対して YFP も AnnexinV-Cy5 も陽性にならなかった double negative 細胞は二度目の刺激に対してもどちらの応答も誘導しないといったバイアスがあるのだろうか(Figure 4a)。これを調べるために、dsRNA 刺激後に I 型 IFN 産生を選択し YFP 単独陽性になった細胞や double negative 細胞を FACS で単離し(Figure 4b)、数週間培養して YFP の蛍光が消失した後に二度目の dsRNA 刺激を行った。すると、一度目の刺激に対して I 型 IFN の産生を選択した細胞も、どちらの応答も誘導しなかった細胞も I 型 IFN 産生細胞とアポトーシス誘導細胞に同様の割合で分かれた(Figure 4b, c)。このことから、過去に選択した応答の履歴に依存するようなバイアスがないことが示唆された。従って、どの応答を選択するかについてはあらかじめ決まっているのではなく、確率論的なプロセスが関与する可能性が考えられる。

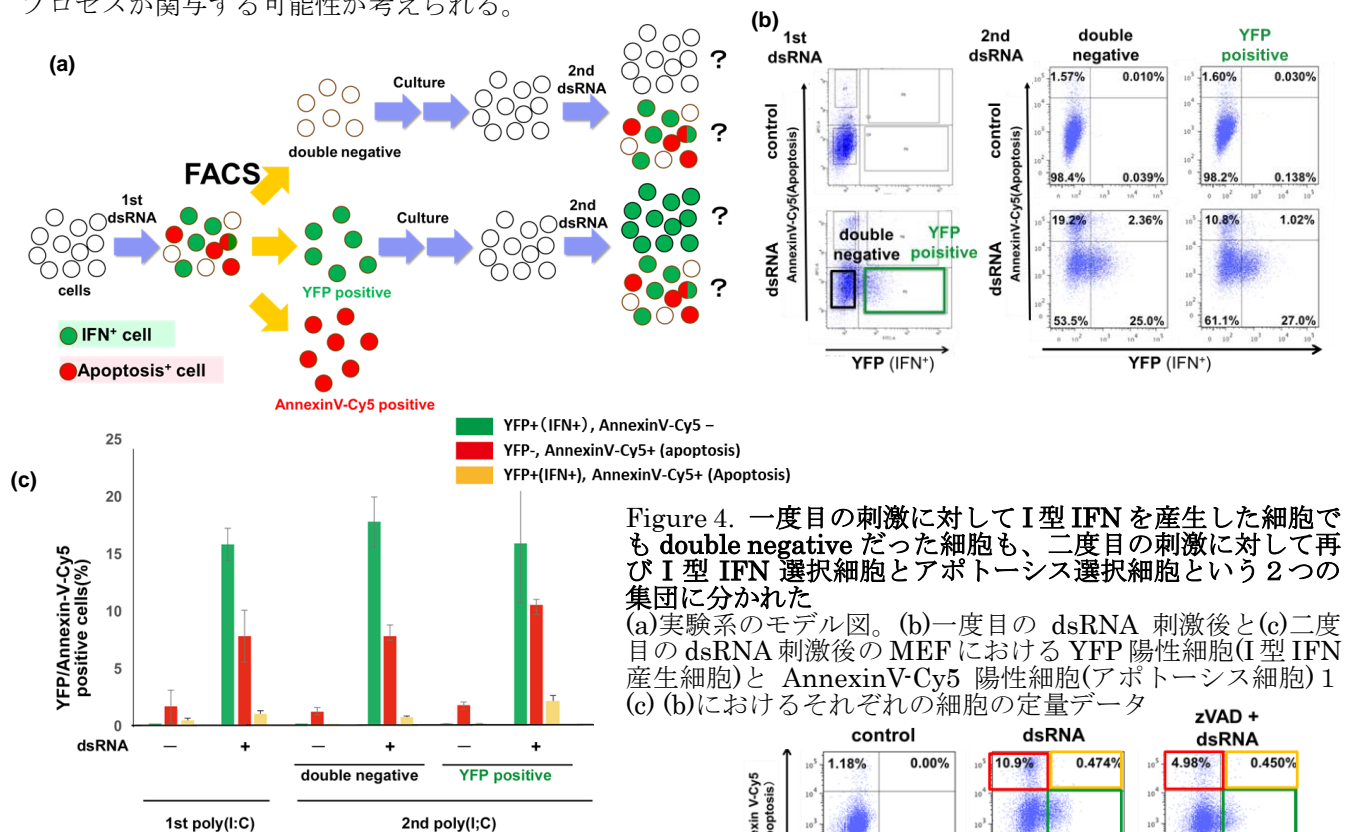


Figure 4. 一度目の刺激に対して I 型 IFN を産生した細胞でも double negative だった細胞も、二度目の刺激に対して再び I 型 IFN 選択細胞とアポトーシス選択細胞という 2 つの集団に分かれた (a)実験系のモデル図。(b)一度目の dsRNA 刺激後と(c)二度目の dsRNA 刺激後の MEF における YFP 陽性細胞(I 型 IFN 産生細胞)と AnnexinV-Cy5 陽性細胞(アポトーシス細胞) 1 (c) (b)におけるそれぞれの細胞の定量データ

### 3. I 型 IFN の産生とアポトーシスのうち、一方の応答を阻害するともう一方の応答を誘導する細胞の割合も減少した

これまでに、遺伝的に均一な細胞内で「細胞が I 型 IFN の産生を選択するかアポトーシスを選択するか」は確率論的に決定される可能性が示された。では I 型 IFN 産生集団とアポトーシス集団の割合は何によって決まるのだろうか。まず、I 型 IFN 選択細胞とアポトーシス選択細胞がお互いに影響しあうのか調べることにした。

まず、zVAD によってアポトーシスを阻害した場合、dsRNA による I 型 IFN 産生細胞の割合が変化するかを調べた。する

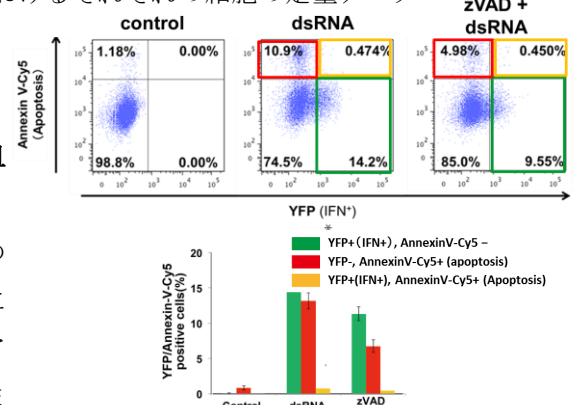


Figure 5. アポトーシスを阻害すると I 型 IFN を誘導する細胞の割合も減少した アポトーシスを阻害して二本鎖 RNA 刺激した MEF における YFP 陽性細胞(I 型 IFN 産生細胞)と AnnexinV-Cy5 陽性細胞(アポトーシス細胞)。右のグラフはそれぞれの細胞の定量データ

と、zVAD 処理によってアポトーシスする細胞の割合が減少しただけでなく、YFP 単独陽性になる細胞の割合も有意に減少した(Figure 5)。従ってアポトーシス選択細胞が I 型 IFN 選択細胞の割合に影響を与えることが示唆された。

次に、I 型 IFN の受容体(IFNAR)を欠損する MEF を用いて I 型 IFN のシグナル伝達を阻害した場合、dsRNA によるアポトーシス誘導細胞の割合が変化するか調べた。すると、dsRNA 刺激による I 型 IFN 選択細胞の割合が減少しただけでなく、アポトーシスする細胞の割合も減少していた。では逆に I 型 IFN のシグナル伝達を促進するとアポトーシス細胞の割合は増加するのだろうか。IFN $\beta$ で細胞を前処理しておくとも I 型 IFN 産生細胞の割合が増加することが知られている。そこで細胞を IFN $\beta$ で前処理した後に dsRNA で刺激したところ、前処理によって I 型 IFN 産生細胞の割合が増加するだけでなく、アポトーシス細胞の割合も増加した。以上より、I 型 IFN 産生集団とアポトーシス集団がそれぞれお互いに促進的に影響を与え合い、それぞれの抗ウイルス応答を選択する細胞の割合が決まる可能性を考えている。

#### [まとめと考察]

これまでウイルス感染の際に同じ 1 つの細胞が I 型 IFN の産生もアポトーシスも両方誘導すると考えられてきた。しかし、本研究で私はウイルス感染後の細胞の抗ウイルス応答を 1 細胞ごとに観察することによって一見均一に見える細胞においても I 型 IFN 産生集団とアポトーシス集団という 2 つの異なる細胞集団に分かれることを初めて示した。これは、感染細胞の中でも IFN 産生によって周囲に感染を知らせる細胞と、自殺によって感染の場をなくす細胞という「役割分担」があることを意味する。更に、IFN を産生するかアポトーシスするかという役割分担は各細胞によって固有に決められたものではなく、確率論的プロセスである可能性も示された。最後に IFN 産生集団とアポトーシス集団の割合を決める機構として、それぞれの細胞集団がお互いの応答を促進するという、フィードフォワード型の制御が行われていることを示しました。ウイルス感染が起こった時に、フィードフォワード型の制御によってお互いに促進しあうために、2 つの集団がある程度以上作られ効率的な抗ウイルス応答が達成されるという意義が考えられる。

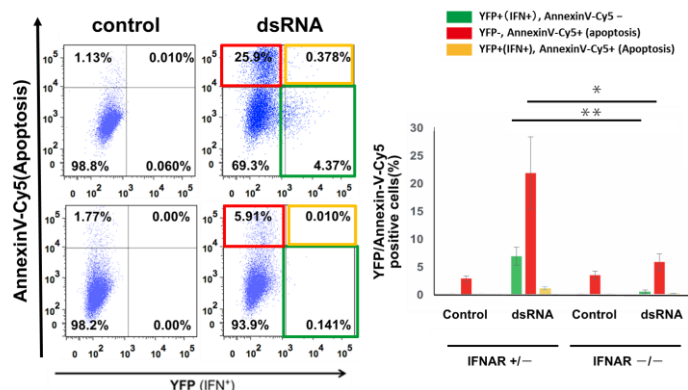


Figure 6. I 型 IFN のシグナル伝達を阻害すると、アポトーシスする細胞の割合も減少した

I 型 IFN のシグナル伝達を阻害して二本鎖 RNA 刺激した MEF における YFP 陽性細胞(I 型 IFN 産生細胞)と AnnexinV-Cy5 陽性細胞(アポトーシス細胞)。右のグラフはそれぞれの細胞の定量データ

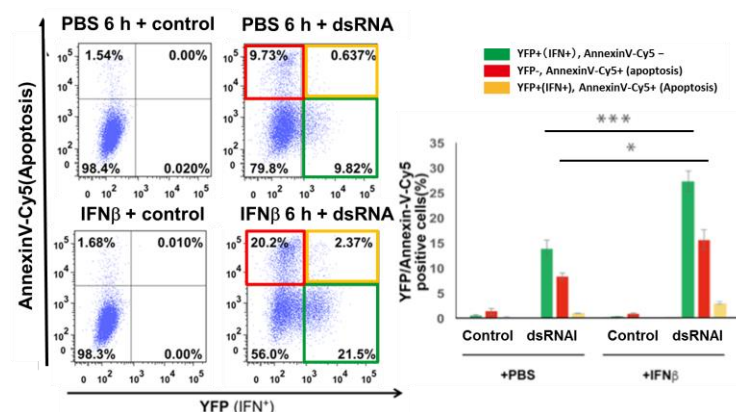


Figure 6. I 型 IFN のシグナル伝達を促進すると、アポトーシスする細胞の割合も増加した

I 型 IFN シグナル伝達を促進して二本鎖 RNA 刺激した MEF における YFP 陽性細胞(I 型 IFN 産生細胞)と AnnexinV-Cy5 陽性細胞(アポトーシス細胞)。右のグラフはそれぞれの細胞の定量データ