

# 博士論文

単純ヘルペスウイルス 1 型の増殖に寄与する  
宿主由来長鎖ノンコーディング RNA の同定

白濱 新多朗

論文タイトル：単純ヘルペスウイルス 1 型の増殖に寄与する宿主由来長鎖ノンコーディング RNA の同定

所属：東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教員：相原 一

申請者：白濱 新多朗

要旨：長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA : lncRNA) はウイルス増殖に重要な役割を果たしているが、単純ヘルペスウイルス 1 型 (Herpes simplex virus type 1 : HSV-1) の増殖における lncRNA の役割は不明である。マウス視細胞において HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA として lncRNA-U90926 (522 ヌクレオチド) を同定した。RNA 干渉による U90926 の発現抑制は、HSV-1 DNA 複製 (感染後 12 時間で約 80%減少) および HSV-1 増殖 (感染後 12 時間で約 93%減少) を顕著に抑制した。また、HSV-1 感染後の U90926 ノックダウン細胞の生存率は、コントロール細胞に比べて顕著に上昇した (感染後 24 時間でそれぞれ約 81% (si U90926) および約 21% (si control))。これらの結果は、U90926 の発現上昇が、HSV-1 増殖を促進することで、宿主細胞死を誘導することを示唆している。

## 目次

### 第一章 序文

1-1. 視覚成立における視細胞の重要性	・・・5
1-2. 急性網膜壊死の病態形成機構	・・・7
1-3. 急性網膜壊死の治療における課題	・・・10
1-4. 長鎖ノンコーディング RNA のウイルス増殖における役割	・・・11
1-5. 研究目的	・・・12

### 第二章 方法

2-1. 細胞培養	・・・13
2-2. HSV-1 感染	・・・13
2-3. RNA シーケンス解析	・・・14
2-4. 急性網膜壊死の疾患モデルマウスの作製ならびに網膜からの RNA 抽出	・15
2-5. 低分子干渉 RNA とプラスミドの設計	・・・15
2-6. トランスフェクション	・・・17
2-7. 遺伝子発現解析	・・・18
2-8. HSV-1 DNA の定量	・・・20
2-9. プラークフォーミングアッセイ	・・・21

2-10. 細胞生存率測定	・・・21
2-11. 細胞分画別の RNA 抽出	・・・22
2-12. ウェスタンブロッティング	・・・22
2-13. 統計学的解析	・・・23
第三章 結果	
3-1. HSV-1 感染後に発現上昇する長鎖ノンコーディング RNA の同定	・・・25
3-2. U90926 の発現上昇は HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖を促進する	・28
3-3. U90926 の発現上昇はウイルス遺伝子 (ICP-0、ICP-4) の発現を促進する	・35
3-4. U90926 により発現制御される宿主側遺伝子の網羅的同定	・・・41
3-5. 結果のまとめ	・・・68
第四章 考察	・・・72
引用文献	・・・76
謝辞	・・・83

## 第一章 序文

### 1-1. 視覚成立における視細胞の重要性

日常生活において外界から得る情報の約 80%をヒトは視覚から得ており、視覚は人間の五感の中でも極めて重要な機能である<sup>1</sup>。角膜および前房を通過した光は瞳孔によって光量が調節され、水晶体によって網膜に結像するように焦点が調節される(図1)<sup>1</sup>。網膜は眼底の最内層を形成する視覚受容器で、厚さ:0.2~0.3 mmの膜状の組織で、カメラに例えるならばフィルムに相当する<sup>2</sup>。網膜は10層構造となっており、神経網膜(9層)と網膜色素上皮層により構成される<sup>2,3</sup>。光は神経網膜の中を透過して、最下層に位置する光受容体である視細胞で電気信号に変換された上で、神経細胞間を伝達し、最終的に大脳皮質視覚領に投射されることで知覚される<sup>1</sup>。このため、光受容体である視細胞は視機能を維持する上で極めて重要な細胞の一つである。

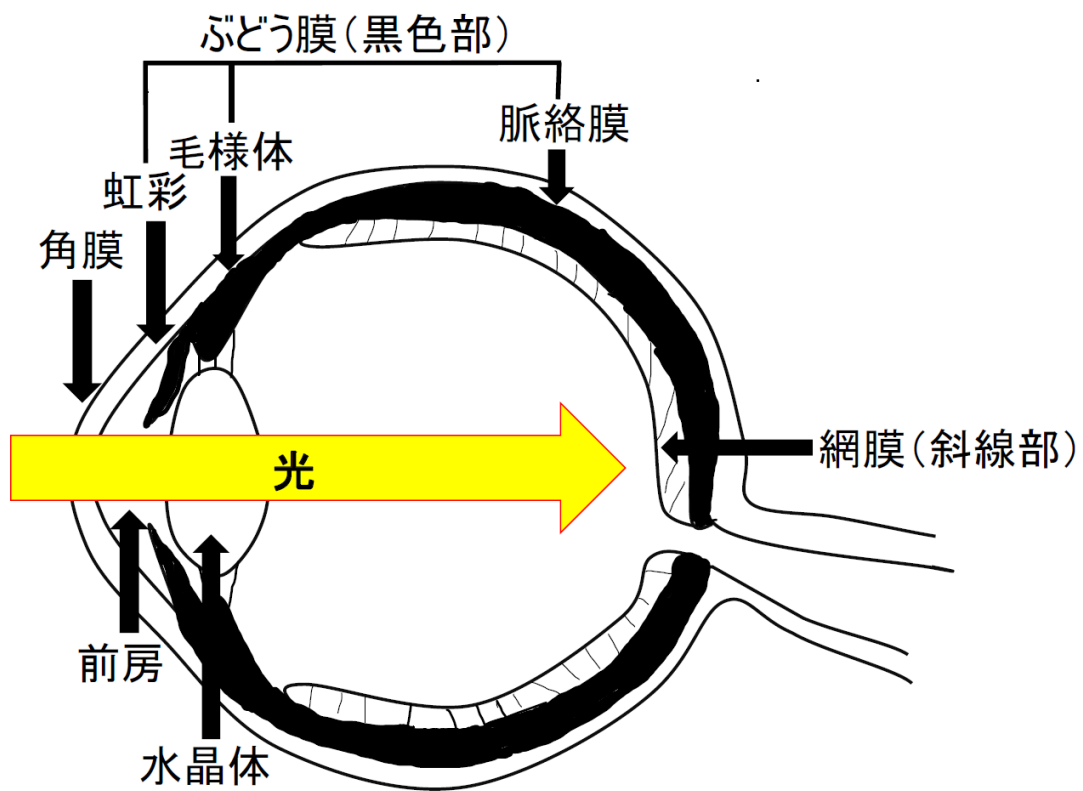


図1 眼球模式図 (矢状断)

光は角膜、前房、水晶体を通過して、最終的に網膜の最下層に位置する光受容体である視細胞で電気信号に変換される。

## 1-2. 急性網膜壊死の病態形成機構

急性網膜壊死は免疫健全者の網膜にヒトヘルペスウイルスが感染することで急速に網膜が壊死し（図 2）<sup>4</sup>、最終的に続発性網膜剥離や視神経萎縮をきたし失明する極めて予後不良な疾患である<sup>5</sup>。ヒトヘルペスウイルスの中でも単純ヘルペスウイルス 1 型（herpes simplex virus type 1 : HSV-1）、単純ヘルペスウイルス 2 型、水痘帯状疱疹ウイルスが主要な原因ウイルスである<sup>5</sup>。

急性網膜壊死の動物モデルとして、von Szily のモデルがよく知られている<sup>6</sup>。同モデルでは、ウイルスを一眼の前房内に接種後、約 1 週間で対側眼に発症する網膜炎を観察する（図 3A）<sup>7,8</sup>。対側眼網膜にウイルスの存在が証明されることから、網膜炎はウイルス感染に対する免疫反応によるものではなく、ウイルスの直接侵襲によって発症するとされている<sup>7,8,9</sup>。さらに同動物モデルを用いたウイルス接種後の各組織のウイルス価の経時的変化の解析によって、ウイルスは接種眼、視神経、対側眼の順に検出されるようになり、さらにそのウイルス価のピークも同様の推移を示すことが報告されている（図 3B）<sup>10,11</sup>。以上の結果から、前房内に接種されたウイルスが視神経を介して、対側眼網膜に到達していることが示唆されている。また、同動物モデルでの蛍光抗体法を用いた網膜内のウイルス抗原の検索によって、ウイルスは視細胞を含めた神経細胞が主な感染細胞であることが明らかになっている<sup>10,12</sup>。

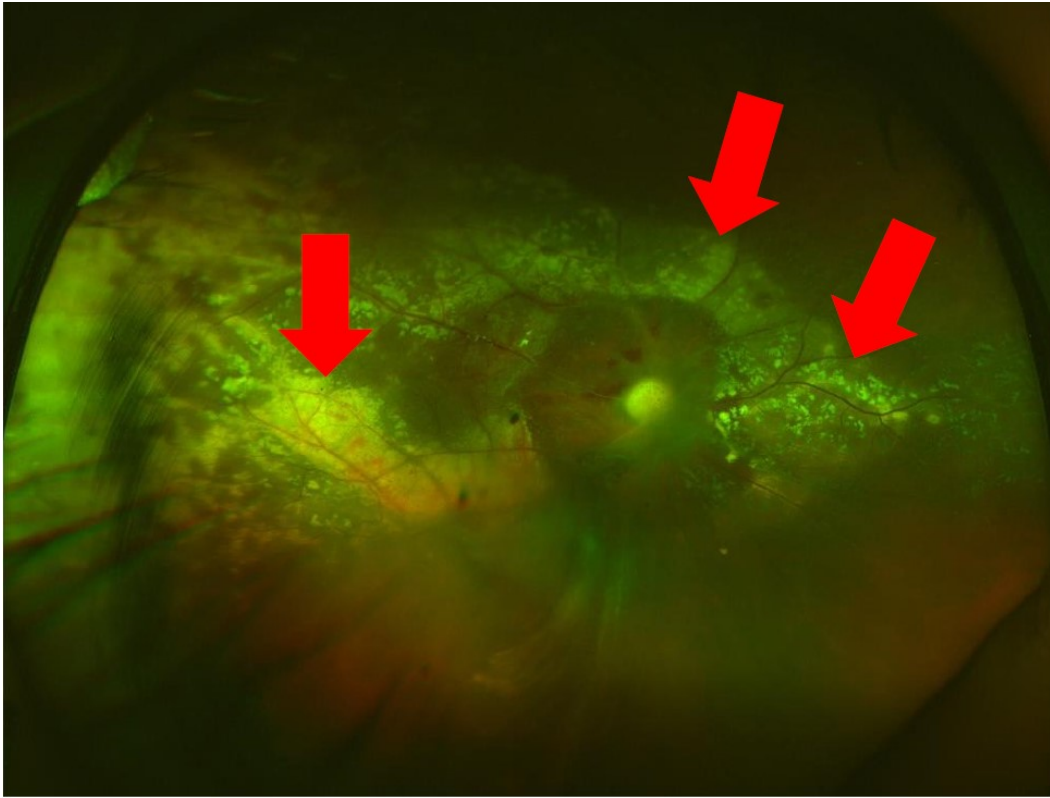


図 2 急性網膜壊死症例の眼底写真

周辺部網膜に黄白色病変を示す壊死網膜（赤矢印）を認める。



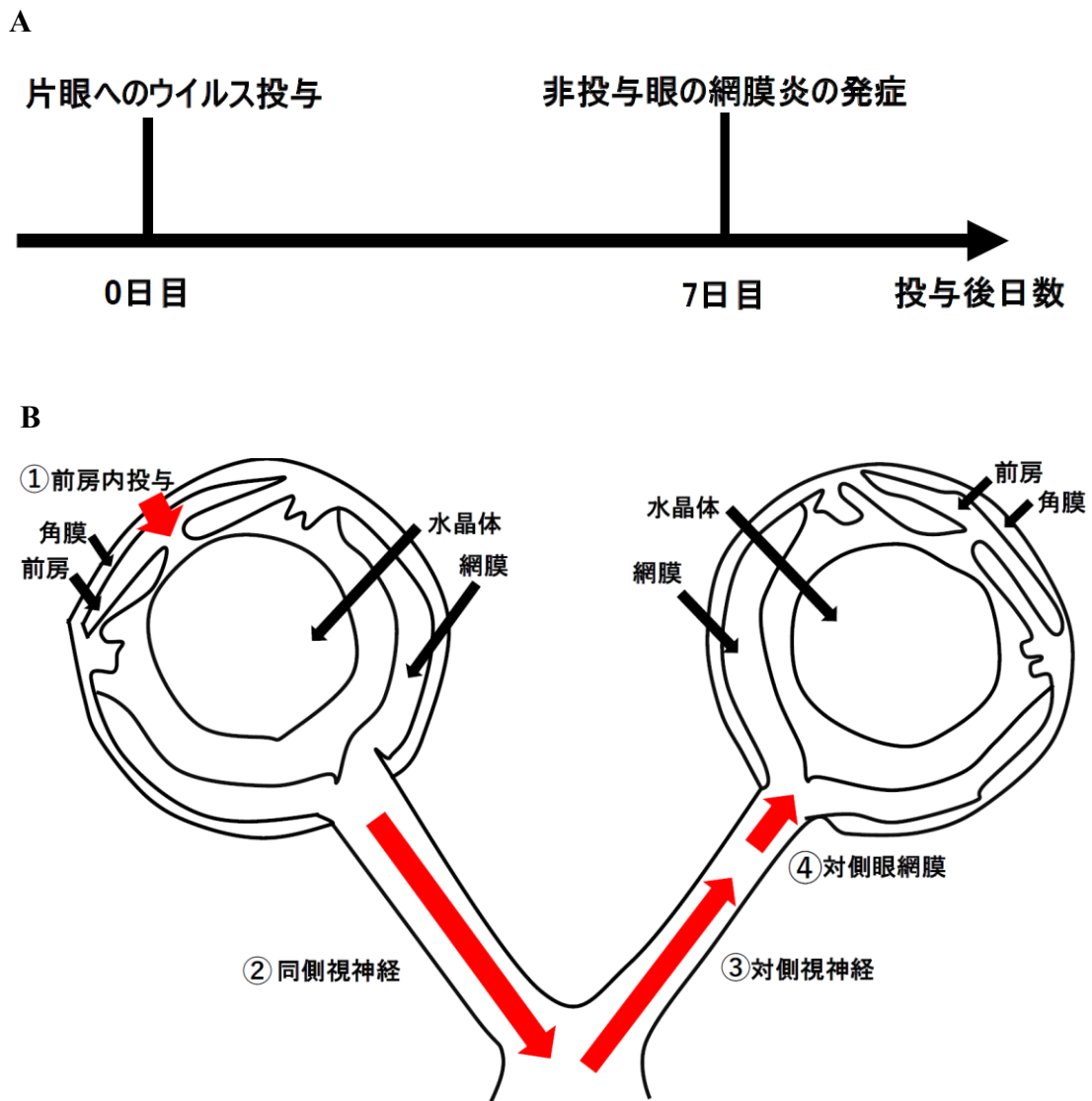


図3 急性網膜壊死の疾患モデル動物の作製とウイルスの輸送経路

**A. 急性網膜壊死の疾患モデルマウスの作製方法**

ウイルスを片眼に投与後、約1週間後に非投与眼に発症する網膜炎を観察する。

**B. 急性網膜壊死の疾患モデルマウスにおけるウイルスの輸送経路**

前房内投与(①)されたウイルスは②同側視神経→③対側視神経→④対側眼網膜の順に神経行性に輸送される。

### 1-3. 急性網膜壊死の治療における課題

疾患モデル動物の解析を通じて、急性網膜壊死の克服には視細胞を含めた神経細胞内におけるウイルス増殖の抑制が喫緊の課題である。現状、急性網膜壊死に対する抗ウイルス療法としてはアシクロビル、バラシクロビルが承認されているが、耐性ウイルスによる急性網膜壊死の症例も多く<sup>13</sup>、新規抗ウイルス薬の開発が切望されている。耐性ウイルスが出現している背景には、アシクロビル、バラシクロビルのいずれの薬剤もウイルス DNA ポリメラーゼを標的としていることがあるため<sup>13</sup>、新規治療標的を有する抗ウイルス薬の開発が急務である。

#### 1-4. 長鎖ノンコーディング RNA のウイルス増殖における役割

近年、次世代シーケンサーを用いた全トランスクリプトーム解析により、新たに長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA : lncRNA) と呼ばれるタンパク質をコードしない RNA が哺乳類ゲノムの大部分から転写されていることが明らかになってきた<sup>14</sup>。lncRNA は病原体の感染を含めた様々な細胞のストレス応答に重要な役割を果たしていることがわかっている<sup>15-21</sup>。さらに近年、宿主細胞内におけるウイルス増殖を促進または抑制する宿主由来 lncRNA がいくつか報告されている。具体的にはウイルス増殖を促進する lncRNA として A 型インフルエンザウイルスの増殖を促進する lncRNA-VIN<sup>22</sup>、lncRNA-IPAN<sup>23</sup>、lncRNA-PANN<sup>24</sup>、水疱性口内炎ウイルスの増殖を促進する lncRNA-ACOD1<sup>25</sup>、C 型肝炎ウイルスの増殖を促進する lncRNA-EGOT<sup>26</sup>、一方でウイルス増殖を抑制する lncRNA としてヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1) を抑制する lncRNA-NRON<sup>27</sup>、lncRNA-NEAT1<sup>28</sup>、C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する lncRNA-GAS5<sup>29</sup>、HSV-1 の増殖を抑制する lncRNA-NEAT1<sup>30</sup> が報告されている。ウイルス増殖を促進する lncRNA については、その阻害によりウイルス増殖が抑制されるため、抗ウイルス薬の新規治療標的となり得る。

## 1-5. 研究目的

低分子干渉 RNA (small interfering RNA : siRNA) は、RNA 鎖に相補結合することで治療標的を RNA レベルで制御できる核酸医薬の一つである<sup>31</sup>。低分子医薬品と同様に化学合成により製造することが可能であるだけでなく、抗体医薬と同様に高い特異性を併せ持つことから、有望な薬剤であると考えられている<sup>32</sup>。しかし、単純な siRNA の全身投与は生体内で容易に分解されてしまい<sup>33</sup>、siRNA を効率的に送達するためのドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System : DDS) は未だ開発途上である<sup>34</sup>。そのため、これまでヒトヘルペスウイルスに対して抗ウイルス作用を持つ siRNA は開発されてこなかった。

眼球は閉鎖空間であると同時に、体外からのアクセスに優れているため、DDS の観点から siRNA の投与にあたって有利な臓器である<sup>35</sup>。そのため、ヒトヘルペスウイルスの増殖を促進する lncRNA を新たに同定し、siRNA の眼内投与によりその機能を阻害することで、DDS が持つ課題を回避するとともに、これまでとは全く異なる戦略でウイルス増殖を抑制できるのではないかと考えた。そこで本研究では、視細胞における HSV-1 の増殖に寄与する宿主由来 lncRNA を同定し、同定 lncRNA が急性網膜壊死に対する抗ウイルス薬の新規治療標的となり得るかを検証することを目的とした。

## **第二章 方法**

### **2-1. 細胞培養**

マウス視細胞株である 661W 細胞 (American Type Culture Collection, VA, USA)、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞株である Vero 細胞 (American Type Culture Collection, VA, USA)、マウス網膜血管内皮細胞 (Cell Biologics, IL, USA) を使用した。培養培地として 661W 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 with L-glutamine and phenol red (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)、Vero 細胞は High Glucose Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine, phenol red, HEPES, and sodium pyruvate (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)、マウス網膜血管内皮細胞は Complete mouse endothelial cell medium/w Kit (Cell Biologics, IL, USA)、に 10%のウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を添加したものを使用した。全ての細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下の環境で培養した。

### **2-2. HSV-1 感染**

HSV-1 は Vero 細胞内で増殖させた。661W 細胞は感染の 1 日前に 12 ウェルプレートに播種し、HSV-1 を 5 multiplicity of infection (MOI) で細胞に感染させた。

### 2-3. RNA シーケンス解析

NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いて、細胞から全 RNA を抽出した。抽出 RNA の品質確認は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) を使用し、全ての RNA は RNA Integrity Number の値が 9.0 以上であることを確認した上で、ライブラリー調製を進めた。

非感染サンプル (n=2) および感染サンプル (n=2) (DRA 番号 : 008496) のライブラリーは、Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (Epidemiology) (Illumina, CA, USA) を用いて構築した。標準プロトコールに基づき、100bp ペアエンドリード RNA シーケンスデータを Illumina HiSeq3000 シーケンサーを用いて生成した。

一方で、非感染サンプル (n=2) (DRA 番号 : 008495)、si control をトランスフェクションした感染サンプル (n=3)、si U90926 (1) をトランスフェクションした感染サンプル (n=3)、および si U90926 (2) トランスフェクションした感染サンプル (n=3) (DRA 番号 : 010598)、のライブラリーは TruSeq Strand mRNA Sample Prep Kit (Illumina, CA, USA) を用いて構築した。標準プロトコールに基づき、100 bp ペアエンドリード RNA シーケンスデータ (非感染サンプル) および 150 bp ペアエンドリード RNA シーケンスデータ (si control、si U90926 (1)、si U90926 (2) をそれぞれトランスフェクションした感染サンプル) を、Illumina HiSeq3000 シーケンサーを用いて生成した。この配列データは、ジョンズ・ホプ

キンズ大学の Centre for Computational Biology

(<ftp://ftp.ccb.jhu.edu/pub/infphilo/hisat2/data/>) から入手したマウスゲノム配列およびアノテーションデータ (mm10) と、HISAT2 v2.1.0<sup>36</sup> を用いて、デフォルトのパラメータでアライメントした。次に、アライメントされたデータを StringTie v1.3.4d<sup>37,38</sup> にデフォルトのパラメータで入力し、個々の転写物の発現を、FPKM (fragments pre kilobase of exon per million reads mapped) 値として算出した。

#### 2-4. 急性網膜壊死の疾患モデルマウスの作製ならびに網膜からの RNA 抽出

メス 6 週齢の BALB/cAnNCrIcrIj マウス (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC., Kanagawa, Japan) を使用した。同マウスの右眼硝子体内に、30G 鋭針を接続したハミルトンシリンジを用いて、HSV-1 溶液 ( $1.5 \times 10^4$  PFU/ml) : 5 $\mu$ L を投与することで、左眼の網膜炎を誘導した。感染後 7 日目に左眼の眼球を摘出し、眼球から網膜を分離した。マイクロ・マルチミキサー (Tokyo Garasu Kikai, Tokyo, Japan) で網膜をホモジナイズした後に、NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いて、網膜から全 RNA を抽出した。

#### 2-5. 低分子干渉 RNA とプラスミドの設計

すべての siRNA は Silencer Select siRNA (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を

使用した。siRNA の配列は下記に記載した。

#### siRNA 配列一覧

##### Silencer Select si control

sense sequence 5'-GUACCUGACUAGUCGCAGA-3'

antisense sequence 5'-UCUGCGACUAGUCAGGUAC-3'

##### Silencer Select si U90926 (1)

sense sequence 5'-CCACUGAGCAGAAGAACUA-3'

antisense sequence 5'-UAGUUCUUCUGCUCAGUGG-3'

##### Silencer Select si U90926 (2)

sense sequence 5'- UGCUCAUACUGAUAAAGAA-3'

antisense sequence 5'-UUCUUUAUCAGUAUGACCA-3'

U90926 過剰発現ベクターを作成するために、NotI 部位と BamHI 部位の間に U90926 cDNA 配列の一部 (498 bp) を含む pTwist CMV ベクター (Twist Bioscience, CA, USA) を購入した。このベクターを鋳型として、下記のプライマーを用いて U90926 の全長 cDNA を増幅した。

forward primer 5'-CACACACACACACACACACATATATATATGTT-3'



reverse primer 5'-TAATGTAAGCTTTTTATTGACACATCAGGTAGGGA-3'

一方で pEGFP-C1 ベクター (Addgene, CA, USA) を鋳型として、下記のプライマーを用いて、線状化ベクターを作成した。

forward primer 5'-AAAAAGCTTACATTATCCGGACTCAGATCTCGAG-3'

reverse primer 5'-GTGTGTGTGTGACCGGTAGCGCTAGCGG-3'

最終的に、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara, Osaka, Japan) を用いて、U90926 の全長 cDNA を線状化ベクターにクローニングすることで、U90926 過剰発現ベクターを取得した。

## 2-6. トランスフェクション

siRNA および U90926 過剰発現ベクターの両方を、4D-Nucleofector X ユニット (Lonza, Basel, Switzerland) を用いた電圧ポレーションにより、661W 細胞にトランスフェクションした。簡潔に説明すると、SF 溶液 (Lonza, Basel, Switzerland) と混合した siRNA デュプレックス (最終濃度 : 100nM) または SF 溶液 (Lonza, Basel, Switzerland) と混合した U90926 過剰発現ベクター (最終濃度 : 10 ng/ $\mu$ L) のいずれかを、661W 細胞に電圧ポレーション (プログラム EN-138) によりトランスフェクションした。

## 2-7. 遺伝子発現解析

細胞からは NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いて、全 RNA を抽出した。全 RNA を Prime Script RT master Mix (Takara, Osaka, Japan) を用いて、一本鎖 cDNA を合成した。SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Osaka, Japan) を用いて、リアルタイム RT-PCR 法により遺伝子発現を解析した。解析に用いたプライマー配列を下記に示す。PCR 反応条件は熱変成 (95°C、5 秒間)、アニーリング・伸長 (60°C、30 秒間) を 40 サイクル行った。最終的に目的の遺伝子の発現量は、内部標準として *Gapdh* を用いて  $\Delta \Delta Ct$  法により相対値として算出した。

### プライマー配列一覧

#### *U90926*

forward primer 5'-GTGATTCTGATGGCCCTTCT-3'

reverse primer 5'-ATCTTGCCAGGGAATCTTGA-3'

#### *Gm19589*

forward primer 5'-AAAGGACCACCAACAACAGC-3'

reverse primer 5'-GGGATGATGAAAAAGCTCCA-3'

#### *E230013L22Rik*

forward primer 5'-GGTCCAACGCTCTCTGACTC-3'

reverse primer 5'-TGCTTTAATGTCCCCCTCAG-3'

*Gm12603*

forward primer 5'-GCTGGGAACAAGTCTTGGAA-3'

reverse primer 5'-GGTGATTTGACCTGCCATCT-3'

*Neat1(v2)*

forward primer 5'-CTTGCCACACCTTGTCTTGC-3'

reverse primer 5'-TAGCTGGTGCATCCTGTGTG-3'

*ICP-0*

forward primer 5'-ACCACCATGACGACGACTC-3'

reverse primer 5'-AGCCCCGTCTCGAACAGT-3'

*ICP-4*

forward primer 5'-GCAGCAGTACGCCCTGA-3'

reverse primer 5'-TTCTGGAGCCACCCCATG-3'

*$\beta$ -Actin*

forward primer 5'-GTACCCAGGCATTGCTGACA-3'

reverse primer 5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

*Gapdh*

forward primer 5'-GGTCCCAGCTTAGGTTTCATCA-3'

reverse primer 5'-CCAATACGGCCAAATCCGTT-3'

## 2-8. HSV-1 ゲノム DNA の定量

NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) と NucleoSpin RNA / DNA buffer set (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いて、HSV-1 に感染した 661W 細胞から DNA を抽出した。HSV-1 の ICP-27 遺伝子に対する特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により HSV-1 ゲノム DNA を定量した。解析に用いたプライマー配列を下記に示す。PCR 反応条件は熱変成 (95°C、5 秒間)、アニーリング・伸長 (60°C、30 秒間) を 40 サイクル行った。最終的に目的の遺伝子の発現量は、内部標準として *Gapdh* を用いて  $\Delta \Delta Ct$  法により相対値として算出した<sup>39</sup>。

プライマー配列一覧

*ICP-27*

forward primer : 5'-TCCGACAGCGATCTGGAC-3'

reverse primer : 5'-TCCGACGAGGAACACTCC-3'

*Gapdh*

forward primer 5'-GGTCCCAGCTTAGGTTTCATCA-3'

reverse primer 5'-CCAATACGGCCAAATCCGTT-3'

## 2-9. プラークフォーミングアッセイ

HSV-1 を含むサンプルの連続希釈液を Vero 細胞の単層 (12 ウェルプレート) に塗布し、37°C で 1 時間インキュベートし、ウイルスの付着と細胞内への侵入を可能にした。上清を吸引し、細胞を PBS (-) (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) で 2 回洗浄し、0.2%  $\gamma$ -グロブリン (Merck, Land Hessen, Germany)、1% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を含む High Glucose Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine, phenol red, HEPES, and sodium pyruvate (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) 中で、プラーク形成を可能にするために 37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境下で 3 日間インキュベートした。ウイルス力価はプラーク数により算出し、プラーク形成単位 (PFU) /mL として表した。

## 2-10. 細胞生存率測定

HSV-1 感染後 3、6、9、12、および 24 時間で 96 ウェルプレートに播種した 661W 細胞の生存率を、Cell counting kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて

評価した。以下の式を用いて細胞生存率を計算した。細胞生存率 = [(HSV-1 感染後 3、6、9、12 および 24 時間における、各 siRNA をトランスフェクションされた 661W 細胞における 450nm の波長における吸光度値) - (培地単独での波長 450nm の吸光度値)] / [(各時点での非感染 661W 細胞での波長 450nm の吸光度値) - (培地単独での波長 450nm の吸光度値)]。吸光度は、Tecan Infinite F200 Microplate Reader (Tecan, Zürich, Switzerland) を用いて測定した。

## 2-11. 細胞分画別の RNA 抽出

PARIS kit (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を用いて、細胞の核および細胞質画分から RNA をそれぞれ抽出した。分画指標として Neat1v2 RNA を核画分、 $\beta$ -Actin RNA を細胞質画分の指標として用いた。

## 2-12. ウェスタンブロッティング

細胞溶解バッファー (50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, 5% Glycerol) を用いて、細胞から全タンパク質抽出物を調製し、等量のタンパク質を 4-15% Mini-PROTECAN TGX Precast Gels (Bio-Rad, CA, USA) 上で分離した。タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜 (Merk Millipore, MA, USA)

に転写し、0.1%Triton X-100 を含む 3%BSA/Tris 緩衝生理食塩水を用いて 25°Cで 30 分間ブロッキングした。その後、メンブレンを抗 ICP-0 マウスモノクローナル抗体 (ab6513) (Abcam, Cambridge, UK) の 300 倍希釈溶液、抗 ICP-4 マウスモノクローナル抗体 (hib-8183) (American Type Culture Collection, VA, USA) の 5000 倍希釈溶液、および抗 GAPDH マウスモノクローナル抗体 (MAB374) (Merk Millipore, MA, USA) の 5,000 倍希釈溶液をそれぞれ用いて、25°Cで 1 時間インキュベートした。全ての一次抗体は IMMUNO SHOT 1 (Cosmobio, Tokyo, Japan) で希釈した。その後、メンブレンをワサビペルオキシダーゼで標識したヤギ抗マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) の 5000 倍希釈溶液を用いて、25°Cで 1 時間インキュベートした。二次抗体は IMMUNO SHOT 2 (Cosmobio, Tokyo, Japan) で希釈した。最後に、Immobilon Forte Western HRP 基質 (Merck, Land Hessen, Germany) を用いてタンパク質を可視化し、化学発光シグナルを Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出した。

### 2-13. 統計学的解析

数値は全て平均 ± 標準偏差として示した。2 群間の連続変数の比較は、Student の t 検定を適用した。P 値が 0.05 未満である場合、統計学的に有意な差

があると判定した。グラフの\*は  $P$  値が 0.05 未満、\*\*は 0.01 未満、\*\*\*は 0.001 未満、\*\*\*\*は 0.0001 未満であることを示す。全ての統計学的解析は、GraphPad Prism Software version 7 (GraphPad Software, CA, USA) を用いて行った。



## 第三章 結果

### 3-1. HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA の同定

#### 3-1-1. 661W 細胞において HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA の網羅的同定 (*in vitro* 系)

661W 細胞において HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA を網羅的に同定するために、非感染サンプル (n=2)、感染サンプル (n=2) を用いて、RNA シーケンス解析を行った。非感染群、感染群の各遺伝子転写産物について平均 FPKM 値を算出し、感染後に 2 倍以上の発現上昇が認められた lncRNA を 19 個同定した (表 1)。

#### 3-1-2. 疾患モデルマウスの網膜における同定 lncRNA の発現 (*in vivo* 系)

*in vitro* 系で HSV-1 感染後の発現上昇率が上位 5 つの遺伝子 (U90926、Gm19589、E230013L22Rik、Gm12603、Neat1) について、疾患モデルマウスの網膜における発現量を定量した。その結果、U90926 のみが疾患モデルマウスの網膜において有意に発現上昇していた ( $p < 0.05$ ) (図 4)。これらの結果から、本研究においては、*in vitro* と *in vivo* の双方の系で、HSV-1 感染後に発現上昇を確認できた U90926 に着目した。

表 1 HSV-1 感染後に 2 倍以上の発現上昇を確認できた lncRNA の一覧

Refseq_ID	Symbol	平均 FPKM 値 (非感染群)	平均 FPKM 値 (感染群)	Fold change (感染群/非感染群)
NR_033483.1	U90926	0.07	3.75	50.9
NR_037971.1	Gm19589	0.29	2.13	7.34
NR_126558.1	E230013L22Rik	0.52	2.77	5.31
NR_033533.1	Gm12603	5.96	25.4	4.26
NR_131212.1	Neat1	2.13	6.79	3.19
NR_030676.1	Phtf1os	1.31	3.64	2.78
NR_027800.1	Map2k3os	0.92	2.47	2.69
NR_137283.1	G530011O06Rik	0.55	1.49	2.69
NR_132746.1	Pvt1	1.91	5.08	2.66
NR_045751.1	Gm16596	0.41	1.07	2.63
NR_002688.1	Gm13363	1.14	2.82	2.47
NR_015511.2	E030011O05Rik	5.49	13.4	2.44
NR_033603.1	Gm5176	1.48	3.51	2.37
NR_001461.5	Kcnq1ot1	0.77	1.77	2.29
NR_029446.1	6230400D17Rik	0.73	1.63	2.22
NR_102275.1	AI839979	1.46	3.19	2.19
NR_038172.1	4931403G20Rik	0.60	1.28	2.12
NR_027819.1	1810032O08Rik	7.51	15.6	2.07
NR_110452.1	Crnde	0.92	1.90	2.07

FPKM: Fragments per kilobase of exon per million mapped fragments

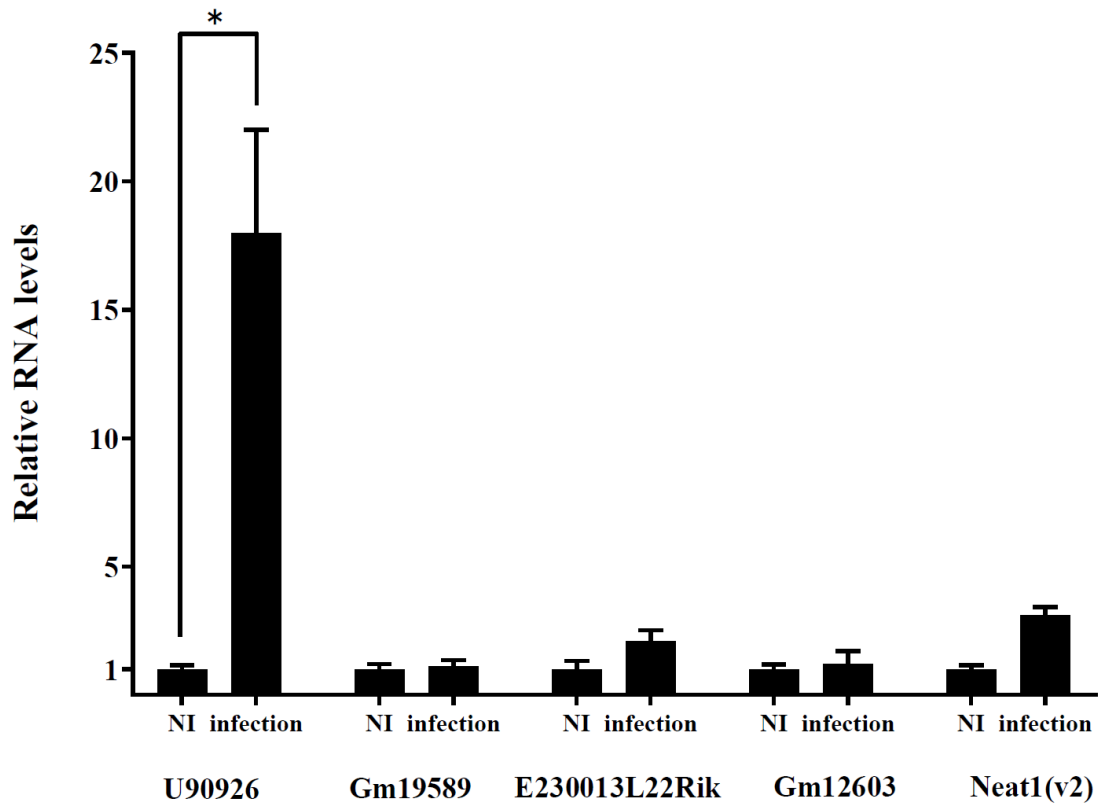


図4 疾患モデルマウス網膜における同定 lncRNA の発現

非感染、HSV-1 感染後 7 日目の疾患モデルマウス網膜における U90926、Gm19589、E230013L22Rik、Gm12603、Neat1(v2)の相対的な RNA レベル。

### 3-2. U90926 の発現上昇は HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖を促進する

#### 3-2-1. lncRNA-U90926 の基本的特徴ならびに発現誘導される細胞

National Centre for Biotechnology Information Reference Sequence Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) でアノテーションされている lncRNA-U90926 (NR\_033483.1) は、全長が 522 ヌクレオチドで 5 つのエクソンで構成されている。661W 細胞では、lncRNA-U90926 は非感染時には検出されず、感染後に発現誘導される lncRNA であった (図 5 A)。一方で、急性網膜壊死における感染細胞の一つである網膜血管内皮細胞では、HSV-1 感染するものの (図 5 B)、非感染、感染の双方のサンプルで、lncRNA-U90926 は検出されなかった。

#### 3-2-2. HSV-1 感染後の U90926 の経時的な発現量変化

661W 細胞では、U90926 の発現量は HSV-1 感染後 10 時間まで徐々に上昇し、その後、感染後 24 時間で約 100 倍まで劇的に上昇した (図 5 C)。

#### 3-2-3. HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖における U90926 の関与

初めに、U90926 ノックダウンが HSV-1 のゲノム DNA 複製および増殖に及ぼす影響を評価した。2 種類の異なる siRNA をトランスフェクションした U90926 ノックダウン細胞における U90926 の発現量は、HSV-1 感染後の評価したすべて

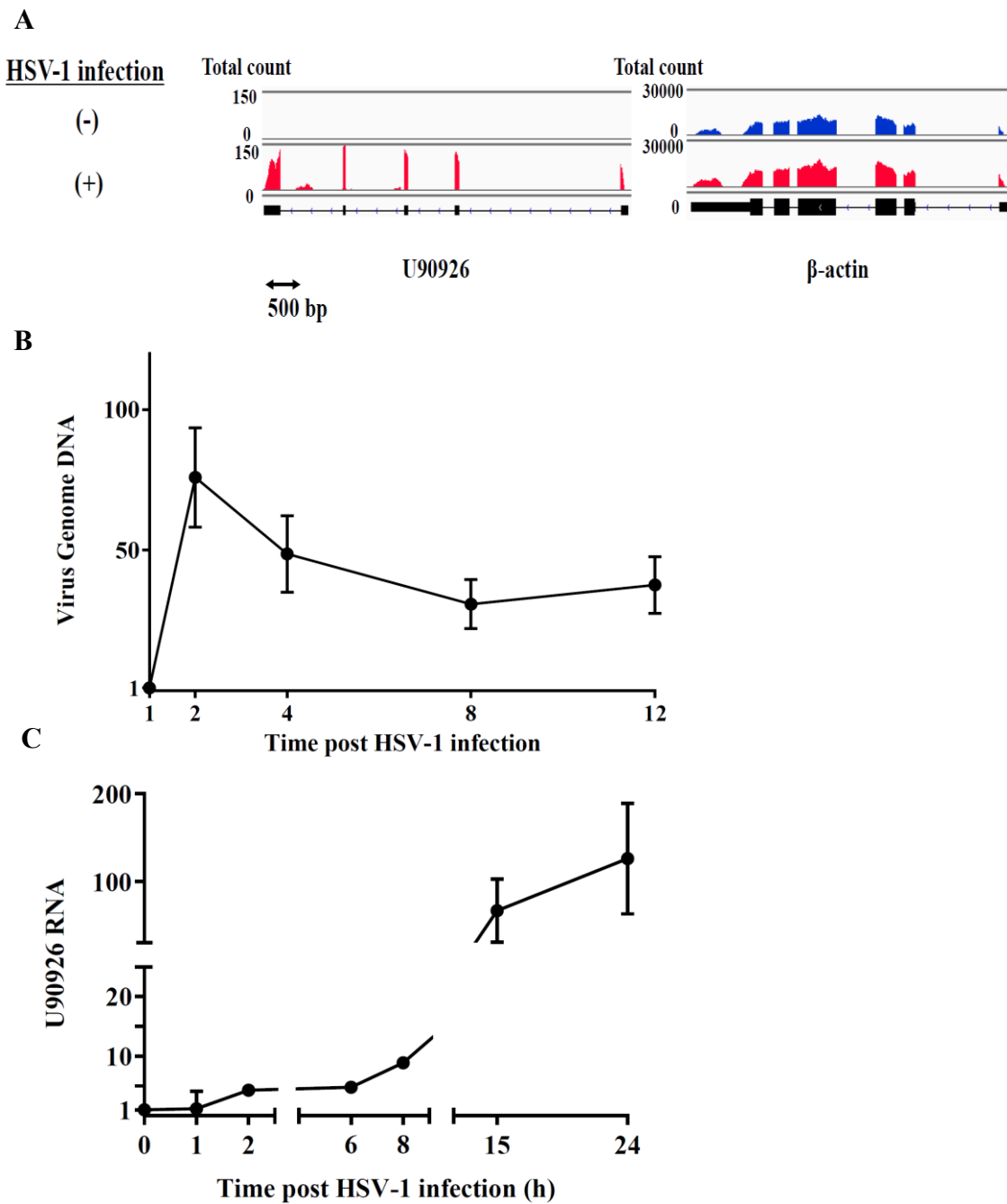
の時点でコントロール細胞の 20%以下であることを確認した (図 6 上段)。その後、U90926 ノックダウン細胞における HSV-1 のゲノム DNA 複製および増殖を、それぞれウイルスゲノム DNA 量およびウイルス力価を測定することによって解析した。U90926 ノックダウン細胞におけるウイルスゲノム DNA 量は、HSV-1 感染後 3 時間 ( $p < 0.05$ )、6 時間、9 時間 ( $p < 0.01$ )、および 12 時間 ( $p < 0.001$ ) において、コントロール細胞よりも有意に低かった。特に HSV-1 感染後 12 時間では、U90926 ノックダウン細胞のウイルスゲノム DNA 量は、コントロール細胞と比較して約 80%減少した (図 6 中段)。さらに、U90926 ノックダウン細胞におけるウイルス力価は、HSV-1 感染後 3、6、9 および 12 時間の時点でコントロール細胞の力価よりも有意に低かった ( $p < 0.0001$ )。特に HSV-1 感染後 12 時間で、U90926 ノックダウン細胞におけるウイルス力価は、コントロール細胞と比較して約 93%減少した (図 6 下段)。

次に、U90926 過剰発現が HSV-1 のゲノム DNA 複製に及ぼす影響を評価した。U90926 過剰発現ベクターをトランスフェクションした細胞における U90926 の発現量は、HSV-1 感染後 3、6、9、および 12 時間の時点で、空ベクターをトランスフェクションした細胞における U90926 の発現量の 20 倍以上であることを確認した (図 7 上段)。その後、両細胞を HSV-1 に感染させたところ、HSV-1 感染後 3、6 時間後 ( $p < 0.01$ )、9 時間後、12 時間後 ( $p < 0.05$ ) にコントロー

ル細胞と比較して、U90926 過剰発現細胞のウイルスゲノム DNA 量が有意に上昇した。これらの結果は、HSV-1 のゲノム DNA 複製が U90926 の発現上昇によって促進されることを示唆している (図 7 下段)。

#### 3-2-4. U90926 ノックダウンが HSV-1 感染後の宿主細胞生存率に及ぼす影響

U90926 ノックダウンが HSV-1 感染後の宿主細胞生存率に関与しているかどうかを検討した。HSV-1 に感染した U90926 ノックダウン細胞の生存率は、HSV-1 感染後 6 時間 ( $p < 0.05$ )、9 時間 ( $p < 0.001$ )、12 時間 ( $p < 0.0001$ ) および 24 時間 ( $p < 0.0001$ ) において、コントロール細胞と比較して有意に増加した。HSV-1 感染後 24 時間では、U90926 ノックダウン細胞の生存率は 80.2% [siU90926 (1)] および 82.6% [siU90926 (2)] であったのに対し、コントロール細胞の生存率は 21.3%であった (図 8)。これらの結果は、U90926 の発現上昇が細胞内の HSV-1 の増殖を促進することで、宿主細胞死を誘導することを示唆している。



**図 5 HSV-1 感染後の U90926 の発現誘導**

**A.** Integrative Genomics Viewer (Illumina, CA, USA) を用いて可視化した非感染（上段）および HSV-1 感染（下段）661W 細胞における U90926 および  $\beta$ -Actin のリードカウントデータ。

**B.** 網膜血管内皮細胞における HSV-1 感染後のウイルスゲノム DNA 量。

**C.** 661W 細胞における U90926 発現量の HSV-1 感染後の時間経過（n = 3）。

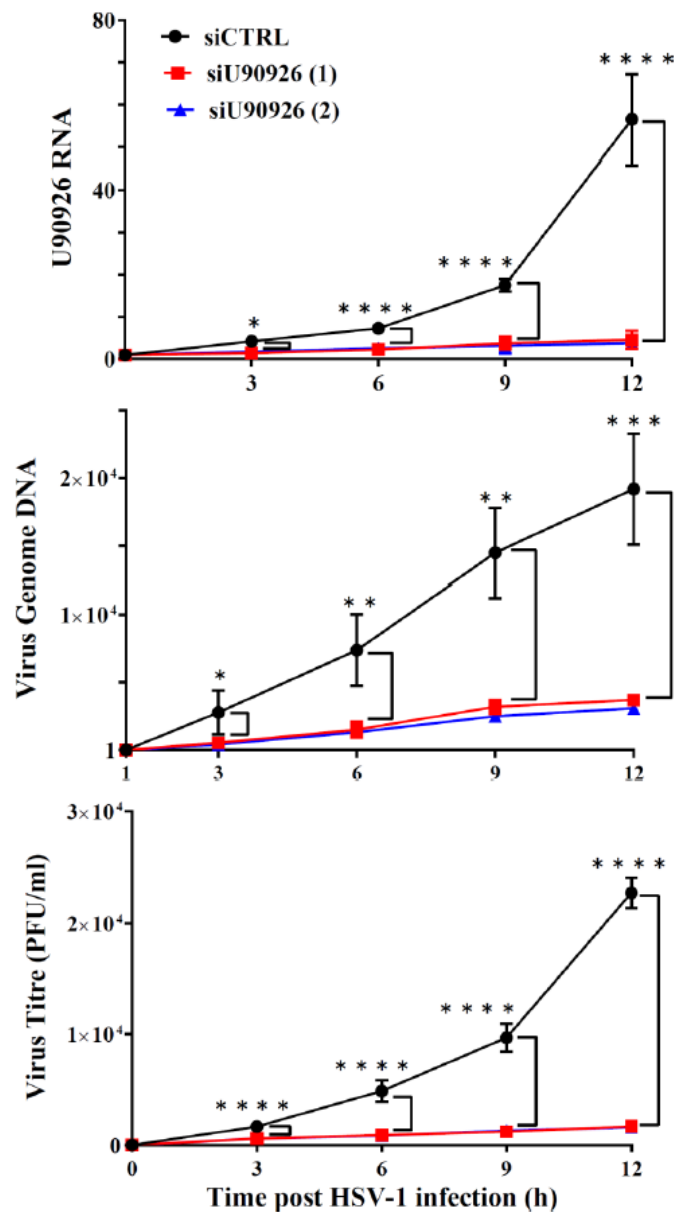


図 6 U90926 ノックダウン細胞におけるウイルスゲノム DNA およびウイルス力価の経時変化

siU90926 をトランスフェクションした細胞はコンロール細胞と比較して、U90926 の発現量が、HSV-1 感染後 3、6、9、12 時間の時点で、20%以下であることを確認した (上段) (n = 4)。

HSV-1 感染後 3、6、9、12 時間の時点で、siU90926 (1) (赤)、siU90926 (2) (青)、si control (黒) をトランスフェクションした細胞におけるウイルスゲノムの相対的 DNA レベル (中段)、およびウイルス力価 (下段) (n = 4)。



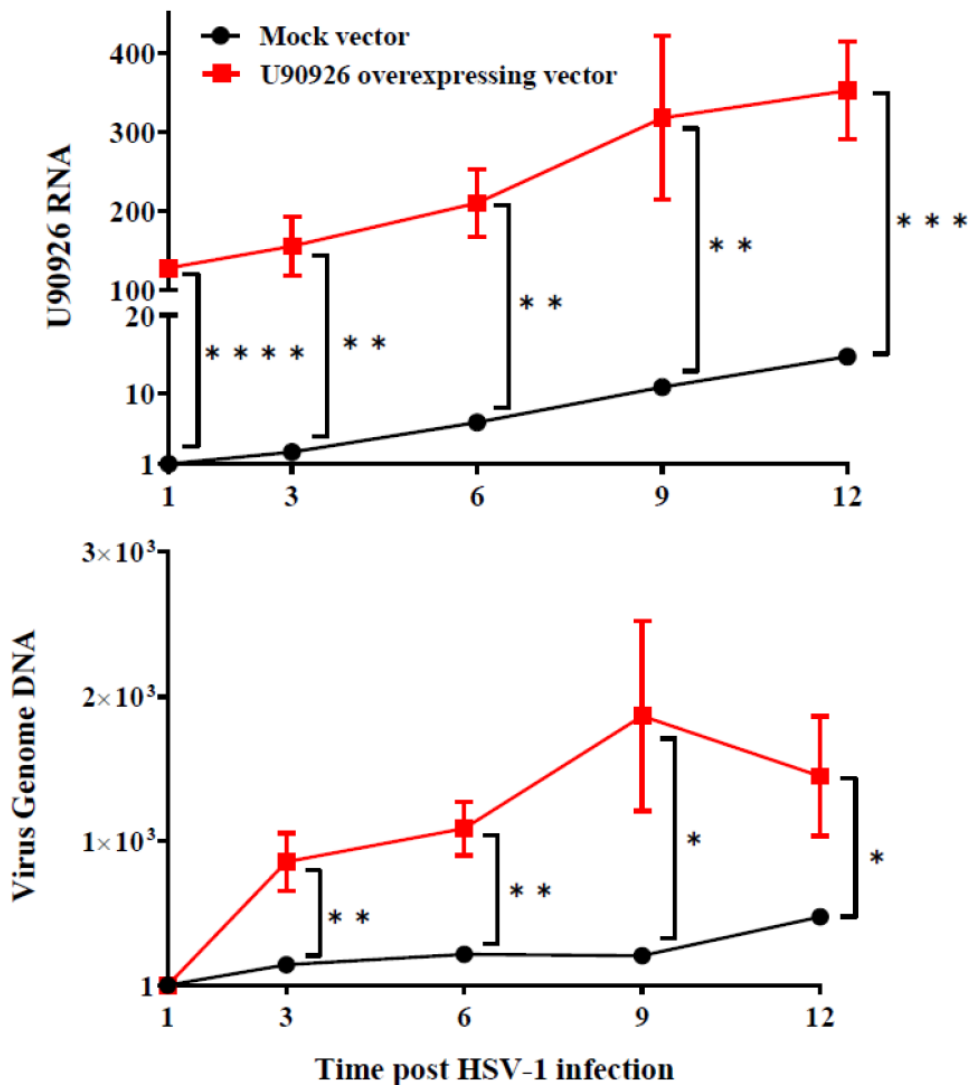


図7 U90926 過剰発現細胞におけるウイルスゲノム DNA の経時変化

U90926 過剰発現ベクターをトランスフェクションした細胞はコントロール細胞と比較して、U90926 の発現量が、HSV-1 感染後 3、6、9、12 時間の時点で、20 倍以上であることを確認した（上段）（n=3）。

HSV-1 感染後 3、6、9 および 12 時間後の空ベクターまたは U90926 過剰発現ベクターをトランスフェクションした細胞におけるウイルスゲノムの相対的 DNA レベル（下段）（n=3）。

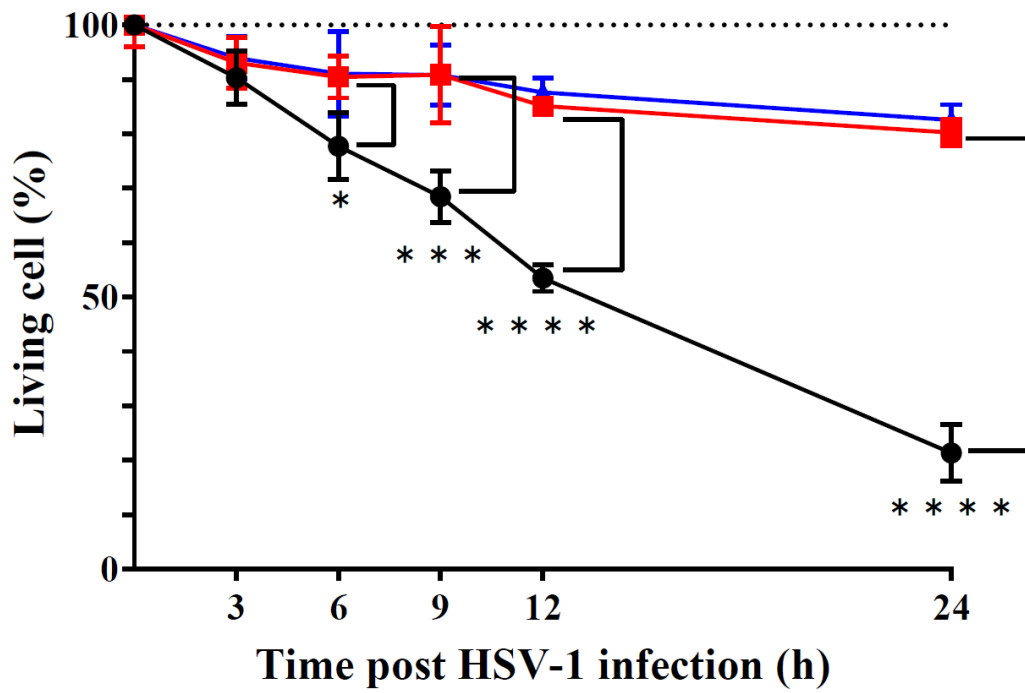


図8 U90926 ノックダウン細胞の HSV-1 感染後の宿主細胞生存率の経時変化  
 HSV-1 感染後 3、6、9、12 および 24 時間におけるの siU90926 (1) (赤)、siU90926  
 (2) (青)、si control (黒) をトランスフェクションした細胞の宿主細胞生存率  
 (n = 4)。

### 3-3. U90926 の発現上昇は HSV-1 遺伝子 (ICP-0、ICP-4) の発現を促進する

#### 3-3-1. lncRNA-U90926 の細胞内局在

HSV-1 は宿主細胞に侵入すると、核内でゲノム DNA を複製する (図 9)。そこで、lnc-RNA U90926 が核内におけるゲノム DNA 複製に関与しているかどうかを検討するために、lncRNA-U90926 の細胞内局在を調べた。その結果、細胞分画分析により、HSV-1 に感染した 661W 細胞における lncRNA-U90926 は核内に主に局在していた (図 9)。

#### 3-3-2. U90926 ノックダウンが HSV-1 遺伝子発現に及ぼす影響

HSV-1 遺伝子は発現時期によって、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子の 3 群に大別され、それぞれの遺伝子発現はカスケード状に制御されている<sup>40</sup> (図 10)。さらに HSV-1 のゲノム DNA 複製は、初期遺伝子の発現によって開始され<sup>41</sup>、その発現は前初期遺伝子の発現に依存する<sup>42</sup> (図 10)。そこで、U90926 ノックダウン細胞における前初期遺伝子 (ICP-0 および ICP-4) の発現量を定量した。U90926 ノックダウン細胞における ICP-0 および ICP-4 RNA 量は、HSV-1 感染後 3、6、9 および 12 時間において、コントロール細胞における ICP-0 および ICP-4 RNA 量よりも有意に ( $p < 0.0001$ ) 低いことがわかった。特に HSV-1 感染後 12 時間で、U90926 ノックダウン細胞はコントロール細胞よりも ICP-0 および

ICP-4 RNA 量が約 88%低かった (図 11)。さらにタンパク質レベルの解析において、コントロール細胞では HSV-1 感染後 6、9 および 12 時間後において ICP-0 および ICP-4 タンパク質が検出されたが、U90926 ノックダウン細胞では、感染後 3、6、9 および 12 時間後のいずれの時点でも、ICP-0 および ICP-4 タンパク質は検出されなかった (図 12)。これらの結果は、U90926 の発現上昇が、核内で HSV-1 前初期遺伝子である ICP-0 および ICP-4 の発現を促進することで、HSV-1 のゲノム DNA 複製を促進していることを示唆している。

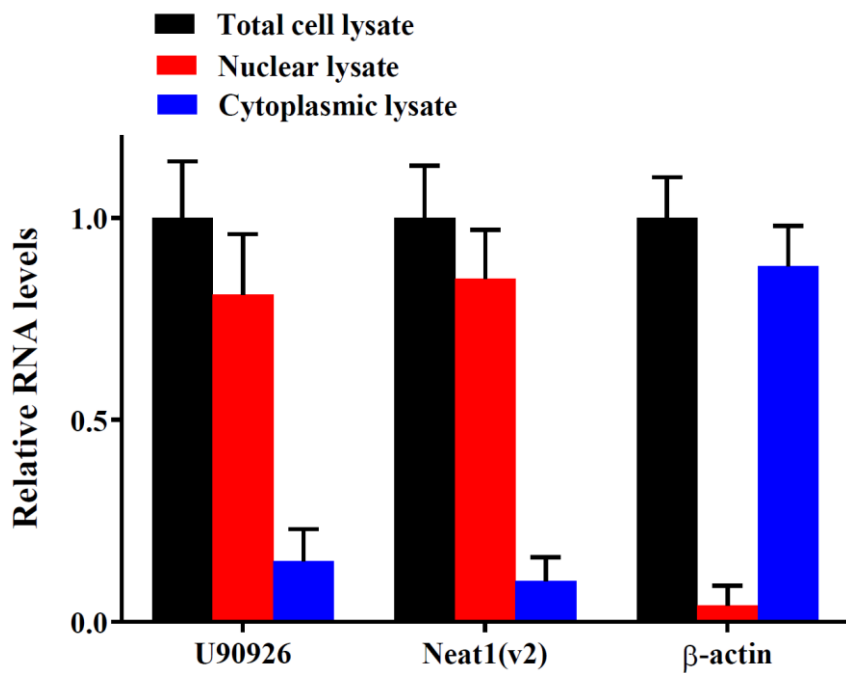


図9 lncRNA-U90926の細胞内局在

HSV-1 感染後 8 時間における 661W 細胞の全細胞抽出物 (黒)、核抽出物 (赤)、細胞質抽出物 (青) における U90926、Neat1(v2)、および β-Actin の相対的な RNA レベル。Neat1v2 および β-Actin RNA は、それぞれ核抽出物および細胞質抽出物の分画指標とした (n = 3)。

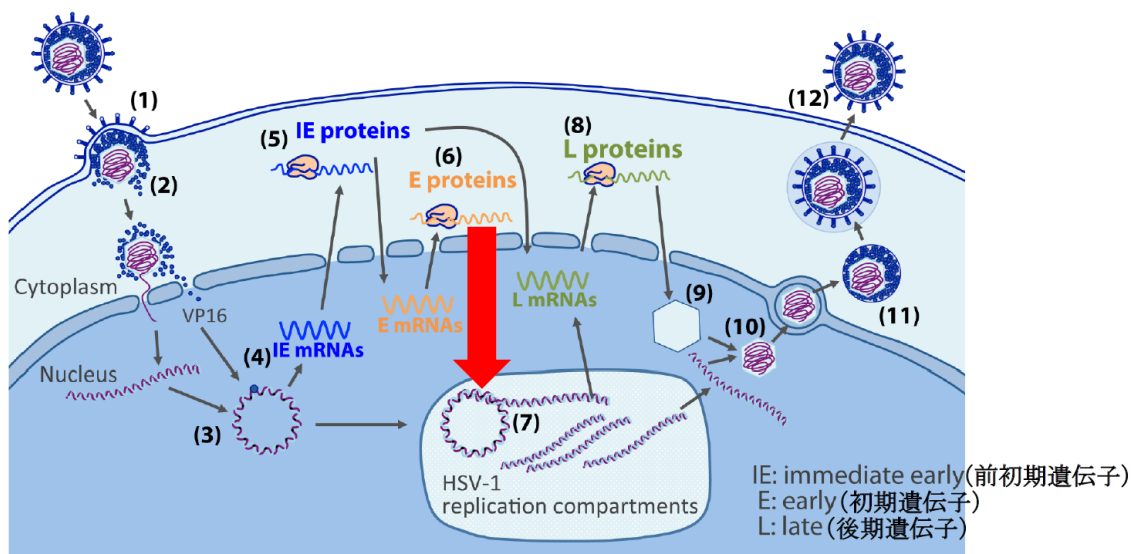


図 10 HSV-1 の遺伝子発現制御 (佐藤 由佳、東京大学大学院医学系研究科博士論文、2016 より改変)

HSV-1 のゲノム DNA は核内に侵入すると、核内で環状化され、HSV-1 遺伝子の転写が開始される。前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子の順に転写が活性化され、それぞれの発現はカスケード状に制御されている。また、HSV-1 のゲノム DNA 複製は、初期遺伝子の発現によって開始される (赤矢印)。

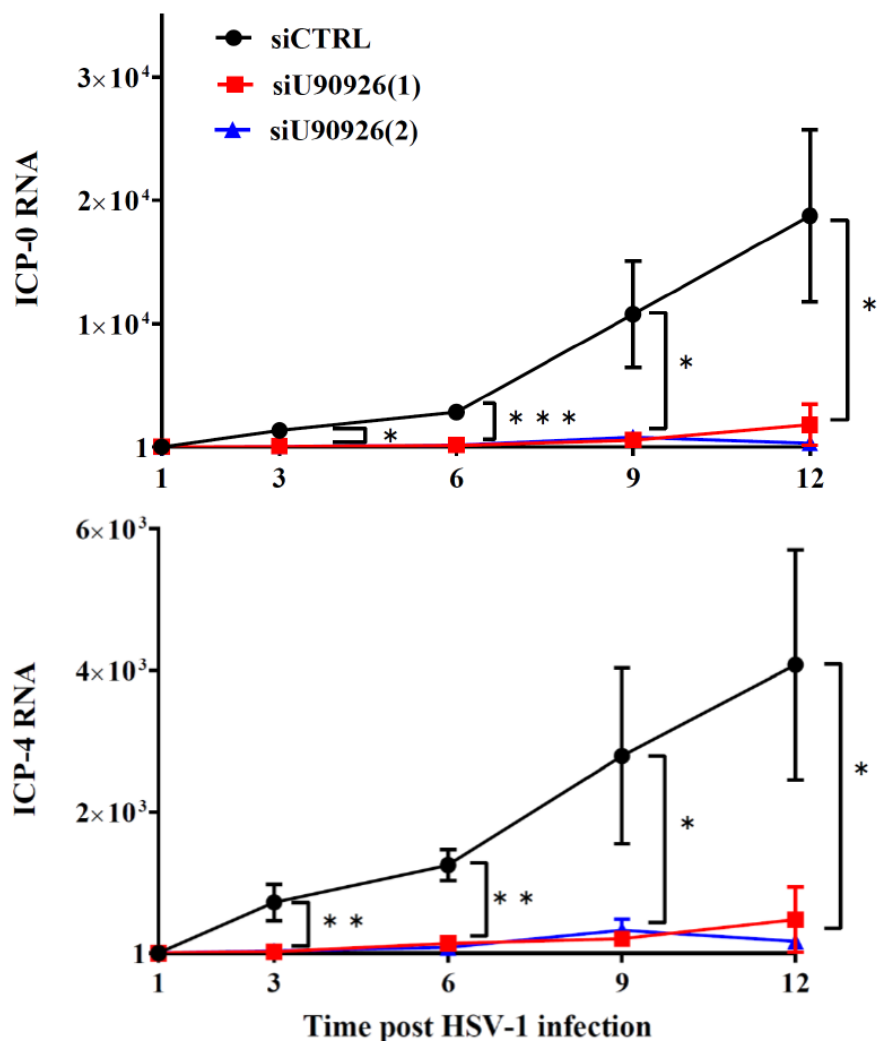


図 11 U90926 ノックダウン細胞におけるウイルス遺伝子 (ICP-0、ICP-4) 発現の経時変化

HSV-1 感染後 3、6、9、12 時間の時点の siU90926 (1) (赤)、siU90926 (2) (青)、si control (黒) をトランスフェクションした細胞における ICP-0 (上段) および ICP-4 (下段) の相対的 RNA レベル (n=3)。

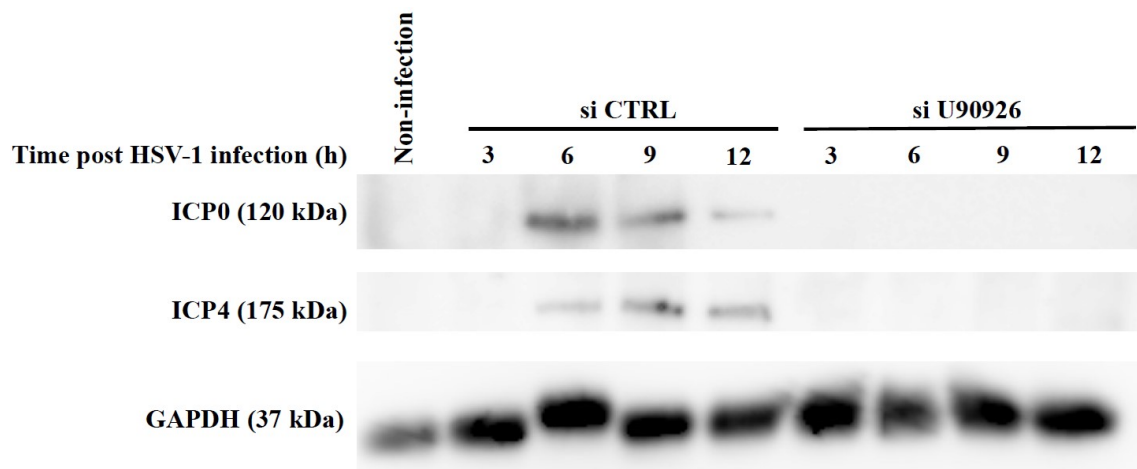


図 12 U90926 ノックダウン細胞におけるウイルスタンパク質 (ICP-0、ICP-4) の発現

HSV-1 感染後 3、6、9 および 12 時間後のコントロール細胞または U90926 ノックダウン細胞における ICP-0 (上段) および ICP-4 (中段) タンパク質のウェスタンブロッティング法による検出。GAPDH (下段) タンパク質をローディングコントロールとして用いた。



### 3-4. U90926 により発現制御される宿主側遺伝子の網羅的同定

661W 細胞において HSV-1 感染後に U90926 により発現制御される宿主側遺伝子を網羅的に同定するために、全部で 4 群の RNA シーケンスデータを用意した (A : si コントロールなしの非感染群 (n = 2)、B : si コントロールありの HSV-1 感染群 (n = 3)、C : siU90926 (1) ありの HSV-1 感染群 (n = 3)、D : siU90926 (2) (n = 3) ありの HSV-1 感染群)。全ての RNA シーケンスデータにおいて、転写産物毎に FPKM 値を算出し、各群の平均 FPKM 値に基づいて、下記の選択基準を用いて、HSV-1 感染後に発現上昇する宿主側遺伝子の中から U90926 依存的に発現が制御される遺伝子を抽出した。

#### U90926 により発現制御される遺伝子の選択基準

A 群の平均 FPKM 値が 0 より大きい場合は、以下の全ての基準を満たす遺伝子を選択した。① [B 群の平均 FPKM 値が >1、[(B 群の平均 FPKM 値) / (A 群の平均 FPKM 値)] : >5、② [(C 群の平均 FPKM 値) / (B 群の平均 FPKM 値)] : <0.2、③ [(D 群の平均 FPKM 値) / (B 群の平均 FPKM 値)] : <0.2。

一方、A 群の平均 FPKM 値が 0 の場合は、以下の全ての基準を満たす遺伝子を選択した。① B 群の平均 FPKM 値 : >1、② [(C 群の平均 FPKM 値) / (B 群の平均 FPKM 値)] : <0.2、③ [(D 群の平均 FPKM 値) / (B 群の平均 FPKM

値)] : <0.2。

同定遺伝子の中から false detection rate が 0.05 未満である遺伝子を抽出し、最終的に U90926 依存的に発現が制御される遺伝子を全部で 396 個同定した (表 2) 。その後、Clustal Omega の Pairwise Sequence Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) を用いて、同定遺伝子の中で U90926 と配列相同性のある遺伝子があるかについて検討を行った。その結果、最も高い配列相同性を示した遺伝子で配列相同性は 37.3% であり、同定遺伝子の中に U90926 と高い配列相同性を持つ遺伝子は存在しなかった (表 3) 。最後に、PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) を用いて同定遺伝子のオントロジーエンリッチメント解析を行った。分子機能に関する遺伝子オントロジー用語では、同定遺伝子は、「CXCR ケモカイン受容体結合」、「ケモカイン受容体結合」、「ケモカイン活性」、「サイトカイン活性」などの免疫機能に関連する遺伝子が有意に濃縮されていた (図 12) 。これらの結果は、HSV-1 感染後に U90926 が発現誘導され、ウイルス増殖が促進されることで、宿主の免疫応答を活性化させていることを示唆している。

表 2 U90926 により発現制御される宿主側遺伝子の一覧

Refseq_ID	Symbol	平均FPKM値 (非感染群)	Fold-change (感染群 / 非感染群)	Fold-change (感染群 (si U90926 (1) ) /非感染群) / Fold-change (感染群 (si control) /非感染群)	Fold-change (感染群 (si U90926 (2) ) /非感染群) / Fold-change (感染群 (si control) /非感染群)
XM_006523759.2	Mllt4	1.28	642304.83	0.00	0.00
XM_006532766.3	N4bp3	1.04	258916.75	0.00	0.04
XM_006497358.3	Il15ra	2.26	40330.88	0.00	0.02
XM_006521761.3	Dlg1	1.07	13160.26	0.00	0.00
NM_199080.2	Ddx17	3.92	5134.83	0.00	0.00
XM_011247874.1	Mospd2	1.81	4724.30	0.00	0.00
NM_010927.4	Nos2	16.68	4405.31	0.00	0.00
XM_017316057.1	Ccdc66	1.86	1524.41	0.00	0.00
XM_006515054.1	Trib2	1.84	1495.45	0.02	0.00
NM_001114596.1	Ehbp1l1	2.23	1463.61	0.00	0.00
NM_001014423.2	Abi3bp	94.09	1235.57	0.03	0.00
XM_017313067.1	Plekho2	2.03	1147.20	0.00	0.00
XM_006495436.3	Atp6v1h	1.11	1050.57	0.00	0.00
NM_001289687.1	Arhgef3	2.84	916.36	0.10	0.00
NM_001271456.1	Tnip1	3.51	838.37	0.00	0.00
NM_009528.3	Wnt7b	5.09	827.40	0.00	0.00
XM_011245484.2	Maff	1.26	762.35	0.00	0.00
XM_006510800.3	Col12a1	2.40	720.80	0.18	0.00
XM_006512769.3	Bend3	3.83	588.04	0.11	0.00
XM_006507275.3	Capn5	1.40	559.68	0.00	0.00
NM_133954.2	Usb1	5.89	537.51	0.00	0.00
XM_006510888.3	Sema7a	1.25	518.48	0.00	0.00
XM_006524028.2	Zfand3	3.01	489.74	0.00	0.00
XM_006513681.3	Nav3	1.16	474.44	0.00	0.01
NM_029409.3	Mff	1.50	473.98	0.00	0.01
NM_001159591.1	Csnk1g2	3.24	423.10	0.00	0.00
XM_011248707.2	Soes3	2.47	411.98	0.01	0.13
XM_017315844.1	Fdft1	2.40	386.47	0.00	0.00
XM_006505530.3	Fbln2	2.64	356.69	0.01	0.00
XM_006515710.3	Cipc	3.74	348.59	0.00	0.19

NM_008453.5	Klf3	3.68	307.64	0.00	0.01
XM_006504077.3	Mfsd10	5.36	264.73	0.11	0.01
XM_017314500.1	Vdac1	6.03	233.68	0.00	0.01
XM_011244046.2	Serpina3n	1.99	232.45	0.02	0.01
NM_172735.2	Zc3hc1	6.68	228.85	0.03	0.03
NM_009140.2	Cxcl2	7.60	208.82	0.00	0.00
XR_380395.3	Cdk17	9.96	206.54	0.08	0.01
XM_006496197.3	Bzw1	4.40	204.73	0.00	0.00
NM_009969.4	Csf2	4.36	199.01	0.00	0.00
XM_006532610.3	Rpl19	19.20	185.41	0.01	0.00
XM_017318433.1	Flna	1.14	174.15	0.00	0.00
NM_008491.1	Lcn2	26.35	170.22	0.00	0.00
XM_006497360.2	Il15ra	1.54	159.56	0.14	0.02
XM_006525481.3	Smim3	15.24	145.36	0.02	0.01
XM_011247155.2	Jak2	1.99	143.28	0.08	0.00
XM_006514761.3	Ramp3	2.26	139.72	0.00	0.06
NM_001287056.1	Vegfa	2.15	139.47	0.01	0.00
XM_017314035.1	Midn	8.25	132.99	0.00	0.03
XM_017320729.1	Cyth3	9.28	123.13	0.05	0.02
XM_006514197.2	Prdm4	5.43	119.73	0.08	0.19
XM_006530949.3	Klhdc4	1.41	108.29	0.01	0.00
XM_017314711.1	Klhl10	2.48	105.13	0.01	0.01
XM_011245651.1	Csnk1e	6.91	104.06	0.00	0.12
NM_001159738.1	Ccl20	43.65	102.38	0.00	0.00
XM_006538293.3	3110043O21	2.92	101.99	0.01	0.02
	Rik				
XM_017317994.1	Tmem173	3.56	96.88	0.00	0.01
NM_011267.3	Rgs16	12.09	95.94	0.01	0.01
NM_018879.2	Nprl2	4.03	94.96	0.08	0.02
XM_011240977.2	Tnrc18	1.23	94.30	0.01	0.04
NM_203320.3	Cxcl3	20.30	88.83	0.01	0.01
XM_006499667.3	Trp53bp1	1.24	81.23	0.01	0.00
XM_017320414.1	Stk40	1.58	80.17	0.01	0.01
XM_011249712.2	Fndc3b	1.03	74.54	0.01	0.00
XM_006514544.3	Lif	1.41	70.22	0.00	0.00
XM_006529215.1	Lrrfip1	2.09	70.12	0.01	0.01

XM_017322311.1	Kansl11	1.64	66.12	0.09	0.18
NM_016960.2	Ccl20	78.96	64.81	0.00	0.00
NR_033483.1	U90926	4.71	64.09	0.00	0.00
NM_027569.2	Spag9	25.42	62.84	0.16	0.01
NM_011315.3	Saa3	42.75	60.46	0.00	0.00
NM_031168.2	Il6	10.38	58.93	0.00	0.00
XM_017321160.1	Sun1	1.77	56.30	0.01	0.01
NM_001177785.1	Cd44	6.82	55.24	0.01	0.00
NM_001025250.3	Vegfa	2.15	54.53	0.02	0.01
XM_006524905.3	Prss22	1.96	52.19	0.00	0.00
XM_006515148.1	E2f6	1.80	50.47	0.00	0.00
NM_022314.3	Tpm3	1.03	49.93	0.00	0.00
XM_011245813.2	Cdc45	8.26	46.17	0.03	0.07
XM_006527111.2	Esrra	3.22	46.10	0.18	0.04
XM_006495933.3	Slc39a10	3.06	45.93	0.01	0.01
NM_009141.3	Cxcl5	279.13	45.02	0.01	0.01
XR_001781810.1	Top3b	1.62	41.87	0.00	0.12
XM_006514542.3	Lif	39.08	40.69	0.00	0.00
NM_010493.2	Icam1	15.42	40.28	0.01	0.00
NM_007679.4	Cebpd	287.27	38.97	0.02	0.01
NM_020581.2	Angptl4	9.60	38.39	0.01	0.01
XM_006538236.3	Trim32	1.09	36.60	0.01	0.02
NM_001030290.1	Rdh8	1.20	36.55	0.03	0.02
NM_001177577.1	Gm1045	4.80	36.16	0.06	0.06
XM_017319302.1	Pea15a	10.98	33.50	0.04	0.08
XR_384530.3	Cd47	4.03	32.26	0.08	0.00
XM_017314999.1	Dicer1	3.85	31.38	0.12	0.00
NM_008176.3	Cxcl1	1611.28	29.70	0.02	0.01
XM_006521665.2	Zc3h7a	2.30	29.62	0.00	0.01
XM_006518451.3	Anxa11	3.87	28.55	0.09	0.08
XM_006496646.3	Enah	1.22	26.91	0.00	0.00
NM_009704.4	Areg	108.16	26.57	0.03	0.03
NM_133662.2	Ier3	461.55	26.49	0.04	0.03
NM_013784.3	Pign	3.69	26.04	0.00	0.01
XM_006498647.2	Cd44	4.79	25.59	0.01	0.01
NM_011427.3	Snail	8.45	25.21	0.09	0.06

NM_009396.2	Tnfaip2	13.16	24.73	0.04	0.02
XM_006524906.2	Prss22	2.69	24.65	0.00	0.03
XM_011239149.2	Gapvd1	1.18	24.52	0.03	0.03
NM_031494.2	Zfp275	2.94	24.12	0.01	0.06
NM_011643.3	Trpc1	1.20	24.00	0.01	0.13
NM_008084.3	Gapdh	7.07	23.25	0.03	0.04
XM_006507731.1	Ino80e	3.00	23.12	0.17	0.06
NM_133753.1	Errfi1	378.82	22.08	0.04	0.03
NM_001172475.1	Sphk1	5.54	21.73	0.05	0.00
XM_006526193.3	Rnmt	3.48	21.69	0.00	0.00
XM_006538035.3	Col27a1	3.66	21.25	0.00	0.00
NR_106143.1	Mir7678	2.91	21.10	0.00	0.00
XM_006504344.3	Gtf2ird2	1.28	20.88	0.03	0.09
XM_006532671.3	Sphk1	4.33	20.68	0.01	0.04
NM_001033202.3	Usp30	8.83	20.18	0.06	0.00
NM_009883.4	Cebpb	100.67	19.40	0.11	0.08
XM_006538699.3	Szrd1	2.04	19.26	0.08	0.09
XM_017312807.1	Clasp1	2.72	18.85	0.00	0.00
NM_153159.2	Zc3h12a	66.86	18.66	0.06	0.05
NM_001310469.1	Osmr	31.91	18.59	0.02	0.00
NM_011693.3	Vcam1	196.75	18.52	0.01	0.01
XM_006523762.2	Mllt4	1.19	17.96	0.00	0.00
NM_133731.2	Prss22	2.55	17.89	0.00	0.00
XM_011248915.2	Usp43	9.88	17.76	0.18	0.08
NM_001122992.1	Gmeb1	1.30	17.30	0.06	0.03
NM_001039537.2	Lif	39.60	17.08	0.04	0.04
NM_138671.2	Nadk	3.37	17.00	0.00	0.00
XM_011244254.2	Larp4b	1.04	16.78	0.00	0.00
NM_001289598.1	Txndc5	3.33	16.35	0.00	0.01
XM_006538700.2	Szrd1	1.32	16.28	0.18	0.07
NM_011414.3	Slpi	100.85	16.17	0.02	0.01
XM_006510590.2	Sik3	3.39	16.08	0.00	0.18
NM_001085390.1	Dusp5	192.60	16.02	0.07	0.05
NM_172380.4	Poglut1	4.59	15.88	0.09	0.09
XM_006496737.2	Fam20b	2.56	15.78	0.00	0.04
NM_176933.4	Dusp4	89.42	15.56	0.05	0.03

XM_011243548.2	Atp2b1	2.84	15.45	0.03	0.01
NM_001085492.1	Rere	6.85	15.45	0.08	0.07
XM_006525993.3	Bin1	8.67	15.42	0.09	0.07
XM_006521090.2	Ep300	1.26	15.40	0.15	0.06
XM_017313893.1	Sbno2	77.53	15.09	0.05	0.13
NM_001291049.1	Usp43	4.93	14.60	0.11	0.17
XM_011244639.2	Lhfp12	1.57	14.58	0.07	0.03
NM_001159394.1	Nfkbiz	64.90	14.44	0.10	0.10
NM_010235.2	Fosl1	98.75	14.05	0.07	0.05
NM_013855.3	Abca3	4.26	13.89	0.16	0.05
NM_177320.2	Pik3r5	7.74	13.72	0.11	0.10
XM_006530843.2	Tom1	2.44	13.46	0.00	0.09
XM_006496800.3	Ahctf1	1.29	13.00	0.01	0.00
XM_006531798.1	Unc93b1	2.29	12.97	0.17	0.00
XM_011248846.2	Stat3	4.75	12.93	0.13	0.05
XM_006520423.1	Ptk2	3.79	12.82	0.00	0.00
XM_011242126.1	Polb	1.84	12.68	0.07	0.02
NM_009035.5	Rbpj	6.92	12.66	0.12	0.18
NM_007707.3	Socs3	142.11	12.64	0.13	0.10
XM_006525704.3	Mbd1	2.36	12.54	0.12	0.10
NM_029001.5	Elovl7	1.13	12.35	0.05	0.08
NM_029035.2	Spsb1	43.94	12.24	0.15	0.13
XM_006507565.2	Tead1	3.04	12.15	0.05	0.08
NM_001164724.1	Il33	19.92	12.11	0.03	0.04
NM_001025257.3	Vegfa	45.96	12.04	0.17	0.09
XM_006522286.3	Abi3bp	9.87	12.02	0.00	0.09
XM_006523056.2	Usp25	1.71	11.93	0.00	0.00
XR_391553.3	Gm33570	1.57	11.88	0.02	0.04
NR_121616.1	Ndst3	1.60	11.80	0.13	0.00
XR_881589.2	Gm13070	3.04	11.70	0.10	0.04
NM_001317242.1	Mtch2	1.41	11.55	0.11	0.16
XM_011241723.1	Tead1	3.66	11.27	0.07	0.07
XM_006513914.2	Midn	3.50	11.26	0.16	0.07
NM_021327.4	Tnip1	1.60	11.14	0.02	0.02
XM_006517703.3	Mast4	5.23	11.07	0.03	0.03
NM_021274.2	Cxcl10	187.16	11.06	0.16	0.10

NM_011898.2	Spry4	1.37	10.97	0.08	0.04
XM_017320154.1	Gnl2	2.39	10.92	0.03	0.06
NM_008102.3	Gch1	9.22	10.62	0.04	0.03
XM_006524031.3	Tgif1	10.55	10.53	0.08	0.09
NM_009264.2	Sprr1a	4.94	10.53	0.09	0.08
NM_026268.3	Dusp6	113.70	10.51	0.05	0.03
NM_011352.2	Sema7a	38.81	10.48	0.10	0.06
NM_001314054.1	Il6	1.02	10.42	0.00	0.01
XM_006538664.3	Nadk	2.00	10.40	0.13	0.09
NM_009505.4	Vegfa	17.04	10.35	0.15	0.14
NM_013609.3	Ngf	16.11	10.24	0.18	0.04
XM_006517030.3	Brd9	1.30	10.22	0.00	0.01
XM_006513272.3	Itgb2	3.40	10.21	0.01	0.00
XM_006525791.1	Svil	1.60	10.20	0.05	0.15
NM_001286844.1	Etv3	1.31	10.19	0.20	0.02
NM_001190975.1	Axl	10.54	10.18	0.13	0.13
XM_006524353.2	Ltbp1	13.30	10.18	0.16	0.00
NM_026931.2	1810011O10	23.41	10.09	0.02	0.02
	Rik				
XM_006496643.3	Enah	3.03	10.08	0.00	0.00
XM_006525995.3	Bin1	9.18	9.97	0.14	0.13
NM_010437.2	Hivep2	5.20	9.87	0.14	0.08
NM_009895.4	Cish	1.81	9.80	0.11	0.10
NM_011448.4	Sox9	44.21	9.73	0.08	0.09
NM_021400.3	Prg4	1.05	9.56	0.09	0.08
XM_006498611.3	Bcl2l1	5.03	9.54	0.01	0.00
XR_001781098.1	Rps24	3.08	9.48	0.08	0.07
XM_006524032.2	Tgif1	18.61	9.48	0.09	0.06
NM_033601.3	Bcl3	24.00	9.41	0.12	0.13
XM_006513040.3	Jmjd1c	1.49	9.30	0.04	0.04
NM_011198.4	Ptgs2	123.37	9.20	0.14	0.15
NM_009344.3	Phlda1	145.09	9.14	0.10	0.10
NM_009834.2	Noct	115.51	9.05	0.09	0.09
NM_009890.1	Ch25h	50.35	8.96	0.01	0.01
XM_006532674.3	Sphk1	1.35	8.89	0.12	0.05
XM_006507729.1	Ino80e	4.01	8.88	0.17	0.17



NM_023785.3	Ppbp	1.73	8.75	0.11	0.13
NM_144549.4	Trib1	57.69	8.62	0.16	0.14
NM_009896.2	Socs1	10.29	8.59	0.16	0.18
XM_006529464.2	Gigyf2	1.94	8.45	0.17	0.16
NM_010743.3	Il1rl1	261.48	8.44	0.09	0.06
NM_001083316.1	Pdgfra	12.91	8.22	0.10	0.05
XM_006538099.3	Ptpn3	1.34	8.16	0.00	0.00
NM_013820.3	Hk2	53.85	8.12	0.09	0.07
NM_008416.3	Junb	349.40	8.11	0.18	0.16
NM_001271500.1	Il15ra	1.43	8.09	0.08	0.11
NM_001159395.1	Nfkbiz	27.55	8.00	0.05	0.03
NM_001317041.1	Vegfa	14.30	7.99	0.15	0.14
XM_017314453.1	Usp43	8.60	7.95	0.03	0.01
XM_006511617.3	Mapkapk3	4.19	7.95	0.08	0.06
NM_011333.3	Ccl2	2165.72	7.91	0.02	0.01
NM_130858.3	Nxph3	3.92	7.86	0.08	0.08
XM_006516558.2	Inhba	1.73	7.84	0.09	0.07
NM_178890.3	Abtb2	34.08	7.80	0.14	0.12
XM_006530532.3	Phkb	1.86	7.69	0.19	0.15
XM_006525769.2	Zeb1	1.33	7.63	0.05	0.01
XM_017320663.1	Fgfr3	1.13	7.53	0.16	0.17
NM_001190974.1	Axl	11.68	7.45	0.14	0.19
NM_009251.1	Serpina3g	6.48	7.45	0.00	0.00
NM_172911.3	D8Ert82e	33.09	7.44	0.10	0.07
NM_001145896.1	Gse1	3.87	7.29	0.08	0.08
XM_006523677.3	H2-K1	1.62	7.26	0.09	0.13
XM_011242651.2	Dennd4a	3.79	7.25	0.00	0.01
NM_178446.4	Rbm47	4.37	7.23	0.14	0.12
XM_017314402.1	Stat5a	1.20	7.23	0.01	0.08
XM_011242298.1	Klhl26	4.62	7.21	0.18	0.11
XM_017316495.1	Slc11a2	5.38	7.10	0.00	0.12
NM_007539.2	Bdkrb1	19.98	7.07	0.10	0.09
XM_011243991.2	Bdkrb2	4.14	7.06	0.10	0.08
NM_001252202.1	Map4k4	2.41	6.97	0.10	0.04
NM_013529.3	Gfpt2	1.04	6.95	0.09	0.08
NM_001287057.1	Vegfa	21.08	6.87	0.09	0.09

XM_006504490.2	Sbds	2.88	6.86	0.10	0.18
NM_177305.4	Arl4c	97.05	6.77	0.19	0.18
XM_011242133.1	Nrg1	1.48	6.74	0.00	0.09
NM_001204233.1	Spp1	16.32	6.72	0.02	0.03
XR_388210.1	Gm31546	2.05	6.70	0.08	0.09
XM_006503441.3	Stk40	3.56	6.43	0.04	0.00
NM_009627.1	Adm	6.07	6.41	0.17	0.15
NM_145539.2	Tm4sf4	1.06	6.38	0.08	0.14
XM_006525705.3	Mbd1	1.16	6.36	0.17	0.03
NM_001316681.1	Ptpre	1.20	6.33	0.00	0.00
XM_017318068.1	Jak2	34.87	6.29	0.08	0.00
XM_017317970.1	Pqlc1	1.02	6.28	0.01	0.03
XM_011249674.1	Nudt6	2.62	6.26	0.06	0.00
XM_017315031.1	Cipc	1.12	6.22	0.00	0.00
NM_007498.3	Atf3	41.01	6.20	0.13	0.06
XM_011242583.1	Qtrt1	2.08	6.17	0.06	0.03
NM_001168294.1	Serpina3f	4.45	6.15	0.01	0.00
XM_017319197.1	Gapvd1	1.00	6.13	0.19	0.08
NM_028244.2	Rrp1b	1.64	6.10	0.11	0.14
NR_037971.1	Gm19589	1.71	6.10	0.08	0.05
XM_006537950.1	Casp8ap2	3.52	5.92	0.12	0.01
NM_013653.3	Ccl5	48.78	5.92	0.11	0.08
XM_006525775.3	Zeb1	18.41	5.88	0.00	0.07
NM_011227.1	Rab20	25.20	5.88	0.06	0.04
NM_001310442.1	Atp6v1h	9.49	5.84	0.04	0.05
NM_172598.3	Wdhd1	4.41	5.82	0.03	0.06
NM_008006.2	Fgf2	10.82	5.79	0.17	0.15
NM_026864.1	Rasl11a	27.83	5.78	0.16	0.14
NM_001304956.1	Nfkbie	3.86	5.73	0.07	0.13
NR_131140.1	Gm6093	2.18	5.70	0.10	0.05
NM_009747.2	Bdkrb2	11.36	5.61	0.10	0.09
XM_006507521.2	Sec23ip	4.76	5.58	0.00	0.15
NM_145508.2	Dyrk3	13.86	5.56	0.15	0.14
XM_006496606.3	Uap1	73.47	5.47	0.00	0.17
XM_006520577.3	Slc11a2	2.16	5.44	0.05	0.00
XM_011240453.1	Hivep3	9.94	5.42	0.00	0.17

XM_006519016.3	Spry2	4.50	5.38	0.02	0.10
XM_006537677.3	Ripk2	3.71	5.33	0.09	0.08
XM_006535399.3	Fgf2	2.40	5.27	0.15	0.07
NM_001163590.1	Stx11	12.05	5.22	0.09	0.14
XM_011242042.2	Rab20	7.08	5.22	0.06	0.07
NM_001042591.1	Arrdc3	26.05	5.21	0.10	0.11
NM_001204202.1	Spp1	43.10	5.20	0.03	0.04
NM_010090.2	Dusp2	4.96	5.20	0.17	0.08
XM_006495433.3	Atp6v1h	6.38	5.19	0.12	0.16
XM_006529417.2	R3hdm1	1.21	5.16	0.04	0.05
NM_010226.2	Foxs1	11.37	5.08	0.02	0.01
XR_872121.1	Gm40783	6.04	5.03	0.04	0.03
XR_001785084.1	Nabp1	1.14	5.03	0.07	0.19
NM_001033399.4	Gfod1	10.83	5.02	0.19	0.20
NM_001042580.1	Cd63	1.21	N.C.	0.00	0.20
XM_011242686.2	Sin3a	1.95	N.C.	0.16	0.17
NM_008470.1	Krt16	1.17	N.C.	0.04	0.17
XM_006509933.2	Phldb1	1.60	N.C.	0.00	0.16
XM_006535143.1	Pitpnb	16.58	N.C.	0.00	0.16
NM_013827.3	Mtf2	4.32	N.C.	0.13	0.15
XM_006520838.2	Brd1	2.23	N.C.	0.00	0.15
XM_006529505.3	2310035C23	4.17	N.C.	0.06	0.15
	Rik				
XM_006507837.1	Tsku	1.25	N.C.	0.13	0.13
NM_178688.3	Ablim1	13.42	N.C.	0.00	0.13
NM_001159577.1	Lnx1	1.21	N.C.	0.15	0.12
NM_029498.3	Zmym2	1.77	N.C.	0.16	0.12
XM_017321946.1	Apbb1	1.40	N.C.	0.00	0.11
XM_011239067.2	Snapc4	1.03	N.C.	0.18	0.10
XM_011239054.2	Traf1	2.75	N.C.	0.00	0.10
XM_017322217.1	Zfp646	1.18	N.C.	0.00	0.09
XM_011240746.2	D5Erttd579e	1.07	N.C.	0.00	0.09
XM_006515763.2	Cdc42bpb	2.94	N.C.	0.00	0.08
XM_017322289.1	Map3k10	1.78	N.C.	0.05	0.07
XM_006501748.1	Pdim5	6.05	N.C.	0.05	0.07
XM_006499557.2	Olfri1033	5.40	N.C.	0.11	0.07

XM_006510889.2	Sema7a	6.20	N.C.	0.19	0.07
NM_001135152.1	Slc39a14	4.48	N.C.	0.04	0.05
XM_006495710.2	Il18rap	1.10	N.C.	0.10	0.04
XM_017319082.1	Il1rl1	21.27	N.C.	0.00	0.04
XM_006517718.3	Parp8	2.75	N.C.	0.08	0.04
NM_009851.2	Cd44	1.34	N.C.	0.01	0.03
NM_001199284.1	Slc43a2	1.49	N.C.	0.21	0.03
XM_006532564.3	Rapgef6	1.07	N.C.	0.11	0.02
XM_006535675.3	Agap3	1.79	N.C.	0.00	0.02
XM_006497686.1	Fnbp1	1.88	N.C.	0.20	0.02
XM_006515646.2	Plekhh1	2.84	N.C.	0.05	0.01
XM_017317129.1	Traf1	3.22	N.C.	0.08	0.01
XM_006518914.3	Farp1	1.93	N.C.	0.00	0.01
XM_006509033.1	Ppp2cb	1.09	N.C.	0.02	0.01
XM_006521765.3	Dlg1	1.93	N.C.	0.00	0.00
NM_001313980.1	Eif4e	11.60	N.C.	0.01	0.00
NM_030612.3	Nfkbiz	12.95	N.C.	0.00	0.00
XM_006521767.3	Dlg1	1.31	N.C.	0.00	0.00
XM_006521762.3	Dlg1	1.69	N.C.	0.00	0.00
NM_022882.4	Lpin2	1.12	N.C.	0.00	0.00
XM_011245293.1	Gm16867	2.89	N.C.	0.00	0.00
XM_006520315.1	Adcy6	3.19	N.C.	0.19	0.00
NM_009667.3	Ampd3	6.19	N.C.	0.03	0.00
XM_011242627.2	Ncapd3	2.94	N.C.	0.00	0.00
XM_006515593.3	Papola	1.45	N.C.	0.19	0.00
XM_011249544.1	Slc4a4	1.02	N.C.	0.19	0.00
NM_001164042.1	Smad5	1.08	N.C.	0.17	0.00
XM_006512122.1	Zfp445	2.01	N.C.	0.07	0.00
XM_006498042.2	Zeb2	3.06	N.C.	0.07	0.00
NM_031405.2	Srrt	8.58	N.C.	0.03	0.00
XM_006515596.3	Papola	13.71	N.C.	0.03	0.00
XM_006528479.2	Cstf2	1.08	N.C.	0.02	0.00
XM_011249931.2	Lpar1	1.18	N.C.	0.00	0.00
NM_001039150.1	Cd44	2.14	N.C.	0.00	0.00
NM_009971.1	Csf3	16.07	N.C.	0.00	0.00
NM_001174170.1	Serpib2	9.56	N.C.	0.00	0.00

XM_011243447.2	Cdk17	8.84	N.C.	0.00	0.00
NM_020030.2	Raet1d	7.05	N.C.	0.00	0.00
NM_011111.4	Serpinb2	6.15	N.C.	0.00	0.00
XM_006516958.3	Nol8	4.97	N.C.	0.00	0.00
XM_006518865.3	Mtmr6	3.99	N.C.	0.00	0.00
XM_006523674.3	H2-K1	3.89	N.C.	0.00	0.00
NM_001309437.1	Aebp2	3.13	N.C.	0.00	0.00
NM_172121.1	Zc3h3	2.94	N.C.	0.00	0.00
XM_006495741.1	Il1rl1	2.90	N.C.	0.00	0.00
XM_017315041.1	Elk4	2.61	N.C.	0.00	0.00
NM_001081337.1	Sipa1l2	2.52	N.C.	0.00	0.00
XM_006513010.2	Csnk1g2	2.39	N.C.	0.00	0.00
XM_011239708.2	Ncoa6	2.22	N.C.	0.00	0.00
XM_011242382.2	Fam118b	2.11	N.C.	0.00	0.00
XM_017319344.1	Vps16	2.03	N.C.	0.00	0.00
XM_006531774.3	Atg2a	2.02	N.C.	0.00	0.00
XM_006532084.3	Cacna1g	1.82	N.C.	0.00	0.00
NM_133775.2	Il33	1.80	N.C.	0.00	0.00
NM_144800.2	Mtss1	1.72	N.C.	0.00	0.00
XM_011245298.1	Gm16867	1.72	N.C.	0.00	0.00
XM_011240415.1	Macf1	1.71	N.C.	0.00	0.00
NM_015743.3	Nr4a3	1.59	N.C.	0.00	0.00
XM_011239936.1	Arfgap1	1.57	N.C.	0.00	0.00
NM_029639.2	Plet1	1.49	N.C.	0.00	0.00
XM_006510698.3	Ncapd3	1.43	N.C.	0.00	0.00
XM_011242814.1	Myo1e	1.42	N.C.	0.00	0.00
NM_001168295.1	Serpina3f	1.37	N.C.	0.00	0.00
NM_001163675.1	Abcc4	1.37	N.C.	0.00	0.00
NM_138648.2	Olr1	1.37	N.C.	0.00	0.00
NM_008501.2	Lif	1.33	N.C.	0.00	0.00
NM_001146038.2	Runx2	1.32	N.C.	0.00	0.00
NM_175314.3	Adams2	1.31	N.C.	0.00	0.00
XM_017321300.1	Olr1	1.28	N.C.	0.00	0.00
XM_006526444.3	Epg5	1.27	N.C.	0.00	0.00
XM_006498645.2	Cd44	1.25	N.C.	0.00	0.00
XM_006521089.1	Ep300	1.25	N.C.	0.00	0.00

XM_006507366.2	Folr1	1.17	N.C.	0.00	0.00
XM_006503038.3	Eva1b	1.16	N.C.	0.00	0.00
XM_006533144.3	Tex2	1.15	N.C.	0.00	0.00
NM_001110845.1	Cacna2d1	1.14	N.C.	0.00	0.00
NR_040519.1	Sox5os3	1.11	N.C.	0.00	0.00
XM_006518002.2	Slc4a7	1.09	N.C.	0.00	0.00
XM_006523544.2	Runx2	1.09	N.C.	0.00	0.00
XM_017315075.1	Gphn	1.02	N.C.	0.00	0.00
XR_880045.1	Gm31522	1.01	N.C.	0.00	0.00

---

FPKM: Fragments per kilobase of exon per million mapped fragments, N.C.: Not calculated

表 3 U90926 と同定遺伝子の配列相同性の一覧

Refseq_ID	Symbol	Similarity (%)
NM_011315.3	Saa3	37.3
NM_001177577.1	Gm1045	36.8
XR_391553.3	Gm33570	36.4
NM_008006.2	Fgf2	35.7
NM_008491.1	Lcn2	35.7
XM_011242126.1	Polb	35.6
NM_009264.2	Sprr1a	35.4
NM_013653.3	Ccl5	35.4
NM_011414.3	Slpi	35.2
XM_011245298.1	Gm16867	35.0
XM_011242583.1	Qtrt1	34.0
XM_011245293.1	Gm16867	33.6
NM_011227.1	Rab20	33.4
NM_009969.4	Csf2	32.9
NM_023785.3	Ppbp	32.1
XM_006532610.3	Rpl19	31.0
NR_040519.1	Sox5os3	30.8
NM_001042580.1	Cd63	30.6
NM_008176.3	Cxcl1	30.1
NM_011333.3	Ccl2	29.1
NM_203320.3	Cxcl3	29.0
NM_026864.1	Rasl11a	28.1
NM_021274.2	Cxcl10	27.8
NM_009140.2	Cxcl2	27.6
NM_013609.3	Ngf	27.5
NM_001159738.1	Ccl20	27.1
NM_016960.2	Ccl20	27.0
XM_011242042.2	Rab20	27.0
XM_011249674.1	Nudt6	26.9
NM_133662.2	Ier3	26.8
NM_001085390.1	Dusp5	26.7
XM_006535399.3	Fgf2	26.3
XM_006507366.2	Folr1	26.2

NM_026931.2	1810011O10Rik	26.1
XM_006504490.2	Sbds	25.8
NM_001314054.1	Il6	25.3
NM_009896.2	Socs1	25.1
NM_031168.2	Il6	25.0
NM_008084.3	Gapdh	24.8
NM_009704.4	Areg	24.8
NM_018879.2	Nprl2	24.6
NM_007539.2	Bdkrb1	24.2
NM_020030.2	Raet1d	24.0
NM_009627.1	Adm	23.6
NM_001030290.1	Rdh8	23.3
NM_010226.2	Foxs1	23.2
NM_001204202.1	Spp1	23.1
NM_145539.2	Tm4sf4	23.1
XM_011242382.2	Fam118b	23.1
NM_133731.2	Prss22	23.0
NM_009971.1	Csf3	22.9
XM_006514761.3	Ramp3	22.9
XM_006509033.1	Ppp2cb	22.6
NM_009890.1	Ch25h	22.5
XM_006524905.3	Prss22	22.5
NM_010090.2	Dusp2	22.3
NM_001204233.1	Spp1	22.1
XM_006497360.2	Il15ra	21.8
XM_006523677.3	H2-K1	21.6
XM_011245484.2	Maff	21.5
NM_008470.1	Krt16	21.3
XM_006523674.3	H2-K1	21.3
XM_006524906.2	Prss22	21.0
XM_006525481.3	Smim3	20.9
NM_009747.2	Bdkrb2	20.7
NM_033601.3	Bcl3	20.6
NM_010235.2	Fosl1	20.3
NM_001271500.1	Il15ra	20.2
XM_006524032.2	Tgif1	20.0



NM_133954.2	Usb1	19.8
NM_172735.2	Zc3hc1	19.5
NM_009141.3	Cxcl5	19.0
NM_020581.2	Angptl4	18.7
XR_388210.1	Gm31546	18.7
XM_011244046.2	Serpina3n	18.4
XM_017317994.1	Tmem173	18.4
NM_011427.3	Snai1	18.3
NM_001172475.1	Sphk1	18.0
XM_006526193.3	Rnmt	17.9
XR_380395.3	Cdk17	17.9
XM_017317970.1	Pqlc1	17.8
NM_029409.3	Mff	17.7
NM_029639.2	Plet1	17.7
XM_006497358.3	I115ra	17.6
NM_008416.3	Junb	17.3
XM_006504077.3	Mfsd10	17.2
NM_001174170.1	Serpib2	17.1
NM_009251.1	Serpina3g	17.1
XR_881589.2	Gm13070	17.1
NM_022314.3	Tpm3	17.0
XM_006525995.3	Bin1	17.0
NM_001168295.1	Serpina3f	16.9
NM_001310442.1	Atp6v1h	16.9
NM_011111.4	Serpib2	16.9
XM_006530949.3	Klhdc4	16.9
XM_011239936.1	Arfgap1	16.9
XM_006507565.2	Tead1	16.7
XM_006510889.2	Sema7a	16.7
NM_007498.3	Atf3	16.6
XM_006507731.1	Ino80e	16.5
XM_006507729.1	Ino80e	16.4
XM_006525993.3	Bin1	16.4
XM_017314500.1	Vdac1	16.4
XR_872121.1	Gm40783	16.4
XM_006511617.3	Mapkapk3	16.3

NM_145508.2	Dyrk3	16.2
XM_017320154.1	Gnl2	16.0
XM_006530843.2	Tom1	15.9
XM_011241723.1	Tead1	15.9
NM_130858.3	Nxph3	15.8
NM_133775.2	Il33	15.7
XM_006515148.1	E2f6	15.7
XM_006524031.3	Tgif1	15.7
NM_001164724.1	Il33	15.6
XM_006495436.3	Atp6v1h	15.6
XM_006503038.3	Eva1b	15.5
XM_006527111.2	Esrra	15.5
XM_011245813.2	Cdc45	15.5
NM_001168294.1	Serpina3f	15.4
XM_006529215.1	Lrrfip1	15.4
NM_001159591.1	Csnk1g2	15.3
XM_006531798.1	Unc93b1	15.3
NM_008453.5	Klf3	15.2
NM_009883.4	Cebpb	15.2
NM_011267.3	Rgs16	15.2
XM_006510888.3	Sema7a	15.2
XR_001781098.1	Rps24	15.2
NM_009344.3	Phlda1	15.1
NM_001304956.1	Nfkbie	14.9
NR_037971.1	Gm19589	14.9
XM_006498611.3	Bcl2l1	14.8
XM_006532671.3	Sphk1	14.8
NM_176933.4	Dusp4	14.5
XM_017319302.1	Pea15a	14.5
NM_010493.2	Icam1	14.3
NM_007679.4	Cebpd	14.2
XM_006537677.3	Ripk2	14.2
XR_880045.1	Gm31522	14.2
NM_001163590.1	Stx11	14.1
XM_006517030.3	Brd9	14.1
XM_006518451.3	Anxa11	14.0

XM_006535143.1	Pitpnb	13.9
XM_011239054.2	Traf1	13.9
XM_006507837.1	Tsku	13.8
XM_006496606.3	Uap1	13.6
XM_006499557.2	Olfr1033	13.6
XM_006513010.2	Csnk1g2	13.6
XM_006524028.2	Zfand3	13.4
XM_006532766.3	N4bp3	13.2
XR_001781810.1	Top3b	13.2
NM_001159577.1	Lnx1	13.1
XM_017319344.1	Vps16	12.9
NM_008102.3	Gch1	12.8
NM_010743.3	Il1rl1	12.7
XM_011245651.1	Csnk1e	12.7
XM_017321946.1	Apbb1	12.7
NM_001289598.1	Txndc5	12.5
NM_172380.4	Poglut1	12.5
NM_001033202.3	Usp30	12.4
NM_001271456.1	Tnip1	12.4
NM_153159.2	Zc3h12a	12.4
XM_006507521.2	Sec23ip	12.4
NM_013529.3	Gfpt2	12.3
XM_017317129.1	Traf1	12.3
NM_021327.4	Tnip1	12.2
NM_029035.2	Spsb1	12.2
XM_006513272.3	Itgb2	12.2
NM_133753.1	Errf1	12.0
XM_006519016.3	Spry2	12.0
XM_006538664.3	Nadk	12.0
NM_001317242.1	Mtch2	11.9
NM_031405.2	Srrt	11.9
NM_138671.2	Nadk	11.9
NM_026268.3	Dusp6	11.7
XM_011242298.1	Klhl26	11.7
XM_011249931.2	Lpar1	11.7
XM_017315031.1	Cipc	11.6

NM_007707.3	Socs3	11.5
NM_009834.2	Noct	11.5
XM_006495433.3	Atp6v1h	11.5
NR_106143.1	Mir7678	11.4
NM_009528.3	Wnt7b	11.3
NM_009895.4	Cish	11.3
XM_011243447.2	Cdk17	11.3
NM_172121.1	Zc3h3	11.2
XR_384530.3	Cd47	11.2
XM_006532674.3	Sphk1	10.9
NM_011693.3	Vcam1	10.8
XM_006520577.3	Slc11a2	10.8
XM_006538699.3	Szrd1	10.8
XM_011248707.2	Socs3	10.8
XM_017313067.1	Plekho2	10.8
XM_017321300.1	Orl1	10.8
NR_131140.1	Gm6093	10.6
XM_006504344.3	Gtf2ird2	10.6
XM_006538700.2	Szrd1	10.6
XM_017314453.1	Usp43	10.6
NM_001025257.3	Vegfa	10.5
XM_011248915.2	Usp43	10.5
XM_017315041.1	Elk4	10.3
NM_011352.2	Sema7a	10.2
NM_138648.2	Orl1	10.2
XM_006503441.3	Stk40	10.2
NM_001287057.1	Vegfa	10.1
NM_001317041.1	Vegfa	10.1
NM_009396.2	Tnfaip2	10.1
NM_009505.4	Vegfa	10.1
XM_006496197.3	Bzw1	10.1
XM_006525704.3	Mbd1	10.1
XM_006525705.3	Mbd1	10.1
XM_006538293.3	3110043O21Rik	10.0
NM_001025250.3	Vegfa	9.9
NM_001159395.1	Nfkbiz	9.9

NM_001287056.1	Vegfa	9.9
NM_001114596.1	Ehbp111	9.7
XM_017320729.1	Cyth3	9.7
NM_001159394.1	Nfkbiz	9.6
XM_006514197.2	Prdm4	9.6
NM_001289687.1	Arhgef3	9.5
XM_006516558.2	Inhba	9.5
XM_006538236.3	Trim32	9.5
XM_017322289.1	Map3k10	9.5
XM_006513914.2	Midn	9.4
XM_006521665.2	Zc3h7a	9.4
XM_017315075.1	Gphn	9.4
XM_011247874.1	Mospd2	9.3
NM_001042591.1	Arrdc3	9.2
XM_017320414.1	Stk40	9.2
NM_008501.2	Lif	9.1
NM_009667.3	Ampd3	9.1
XM_017314035.1	Midn	9.1
NM_010927.4	Nos2	9.0
NM_030612.3	Nfkbiz	9.0
XM_006535675.3	Agap3	9.0
NM_001039537.2	Lif	8.9
NM_172598.3	Wdhd1	8.9
XM_006515593.3	Papola	8.9
XM_017321160.1	Sun1	8.9
NM_144549.4	Trib1	8.8
XM_006515054.1	Trib2	8.8
NM_011448.4	Sox9	8.7
NM_021400.3	Prg4	8.7
XM_006496737.2	Fam20b	8.7
XM_006516958.3	Nol8	8.7
XM_017316495.1	Slc11a2	8.7
NM_178890.3	Abtb2	8.6
XM_006509933.2	Phldb1	8.6
XM_006514542.3	Lif	8.6
XM_006528479.2	Cstf2	8.6

XM_006531774.3	Atg2a	8.6
XM_011242627.2	Ncapd3	8.6
NM_013827.3	Mtf2	8.5
XM_006507275.3	Capn5	8.5
XM_011242814.1	Myo1e	8.5
XM_017316057.1	Ccdc66	8.5
NM_001291049.1	Usp43	8.4
NM_011198.4	Ptgs2	8.4
NM_011898.2	Spry4	8.4
XM_006520423.1	Ptk2	8.4
XM_011244639.2	Lhfp12	8.4
XM_017320663.1	Fgfr3	8.4
NM_177320.2	Pik3r5	8.3
NM_001310469.1	Osmr	8.2
XM_006495710.2	Il18rap	8.2
XM_006515596.3	Papola	8.2
XM_017314402.1	Stat5a	8.2
XM_006515710.3	Cipc	8.1
XM_006518865.3	Mtmr6	8.1
XM_011248846.2	Stat3	8.1
NM_001014423.2	Abi3bp	8.0
NM_177305.4	Arl4c	8.0
XM_006497686.1	Fnbp1	8.0
XM_017313893.1	Sbno2	8.0
XM_017322311.1	Kansl1	8.0
NM_011643.3	Trpc1	7.9
NM_001190975.1	Axl	7.8
NM_199080.2	Ddx17	7.8
XM_006518914.3	Farp1	7.8
XM_006523056.2	Usp25	7.8
NM_001316681.1	Ptpre	7.7
NM_028244.2	Rrp1b	7.7
XM_011243991.2	Bdkrb2	7.7
XM_006505530.3	Fbln2	7.6
XM_006514544.3	Lif	7.6
XM_006521767.3	Dlg1	7.6

NM_001135152.1	Slc39a14	7.5
XM_006533144.3	Tex2	7.5
XM_017318068.1	Jak2	7.5
NM_001190974.1	Axl	7.4
XM_006501748.1	Pdlim5	7.4
XM_006529417.2	R3hdm1	7.4
XM_011239067.2	Snape4	7.4
NM_001039150.1	Cd44	7.2
NM_178446.4	Rbm47	7.2
XM_017315844.1	Fdft1	7.2
NM_013820.3	Hk2	7.1
NM_144800.2	Mtss1	7.1
NM_001177785.1	Cd44	7.0
XM_006495741.1	Il1rl1	7.0
XM_017319082.1	Il1rl1	7.0
NM_001313980.1	Eif4e	6.9
NM_001163675.1	Abcc4	6.8
XM_006498647.2	Cd44	6.8
XM_006529464.2	Gigyf2	6.8
XM_011242686.2	Sin3a	6.8
XM_006498645.2	Cd44	6.7
XM_006524353.2	Ltbp1	6.7
NM_001309437.1	Aebp2	6.6
NM_172911.3	D8Erd82e	6.6
XM_006529505.3	2310035C23Rik	6.6
NM_009851.2	Cd44	6.5
NR_121616.1	Ndst3	6.5
XM_006521765.3	Dlg1	6.5
XR_001785084.1	Nabp1	6.5
NM_001252202.1	Map4k4	6.4
XM_006521761.3	Dlg1	6.4
XM_006521762.3	Dlg1	6.4
XM_006522286.3	Abi3bp	6.4
NM_001286844.1	Etv3	6.2
NM_009035.5	Rbpj	6.2
NM_015743.3	Nr4a3	6.2

NM_029001.5	Elov17	6.2
XM_006496646.3	Enah	6.2
NM_001081337.1	Sipa112	6.1
NM_001164042.1	Smad5	6.1
XM_006496643.3	Enah	6.1
XM_006510590.2	Sik3	6.0
NM_001083316.1	Pdgfra	5.9
NM_022882.4	Lpin2	5.9
XM_006538099.3	Ptpn3	5.9
XM_017314711.1	Klhl10	5.9
NM_013855.3	Abca3	5.8
NM_178688.3	Ablim1	5.8
XM_006510698.3	Ncapd3	5.8
NM_031494.2	Zfp275	5.7
NM_001146038.2	Runx2	5.6
NM_001199284.1	Slc43a2	5.6
NM_175314.3	Adams9	5.6
XM_006495933.3	Slc39a10	5.6
XM_006515646.2	Plekhh1	5.6
XM_006538035.3	Col27a1	5.6
XM_017322217.1	Zfp646	5.6
NM_001122992.1	Gmeb1	5.5
XM_006520315.1	Adcy6	5.5
XM_006520838.2	Brd1	5.5
XM_011239149.2	Gapvd1	5.5
XM_006512122.1	Zfp445	5.4
XM_006512769.3	Bend3	5.4
XM_006515763.2	Cdc42bbp	5.4
XM_006523544.2	Runx2	5.4
NM_029498.3	Zmym2	5.3
XM_011243548.2	Atp2b1	5.3
XM_017319197.1	Gapvd1	5.3
NM_001145896.1	Gse1	5.2
XM_006532564.3	Rapgef6	5.2
XM_011239708.2	Ncoa6	5.2
XM_006525769.2	Zeb1	5.1



XM_006525775.3	Zeb1	5.1
XM_006537950.1	Casp8ap2	5.1
XM_011240746.2	D5Ert579e	5.1
XM_006518002.2	Slc4a7	5.0
XM_006526444.3	Epg5	5.0
XM_017312807.1	Clasp1	5.0
NM_001110845.1	Cacna2d1	4.9
NM_013784.3	Pign	4.9
NM_001033399.4	Gfod1	4.7
NM_001085492.1	Rere	4.7
NM_027569.2	Spag9	4.7
XM_006523759.2	Mllt4	4.7
XM_006523762.2	Mllt4	4.7
XM_006532084.3	Cacna1g	4.7
XM_011247155.2	Jak2	4.7
XM_006510800.3	Col12a1	4.6
XM_011249544.1	Slc4a4	4.6
XM_006525791.1	Svil	4.5
XM_006517718.3	Parp8	4.4
XM_006496800.3	Ahctf1	4.3
XM_006530532.3	Phkb	4.3
XM_011242651.2	Dennd4a	4.3
XM_017314999.1	Dicer1	4.3
XM_017318433.1	Flna	4.2
XM_006498042.2	Zeb2	4.1
XM_006513681.3	Nav3	4.0
XM_006499667.3	Trp53bp1	3.9
XM_011244254.2	Larp4b	3.9
XM_006521089.1	Ep300	3.8
XM_006521090.2	Ep300	3.8
XM_006513040.3	Jmjd1c	3.7
XM_011240977.2	Tnrc18	3.7
XM_011249712.2	Fndc3b	3.7
NM_010437.2	Hivep2	3.6
XM_006517703.3	Mast4	3.4
XM_011242133.1	Nrg1	3.3

XM_011240453.1	Hivep3	2.7
XM_011240415.1	Macf1	2.0

---

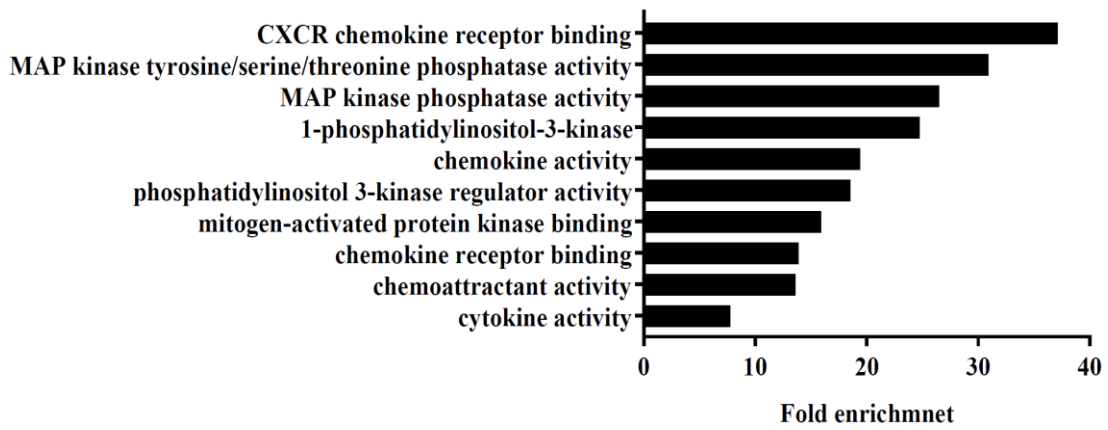


図 12 U90926 依存的に発現制御される宿主側遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

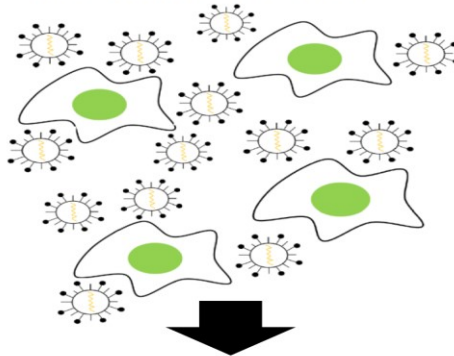
分子機能に関する遺伝子オントロジー用語を Fold enrichment の数値を基に、上位 10 用語を棒グラフに示した。全ての遺伝子オントロジー用語は False detection rate が 0.05 未満であることを確認した。

### 3-5. 結果のまとめ

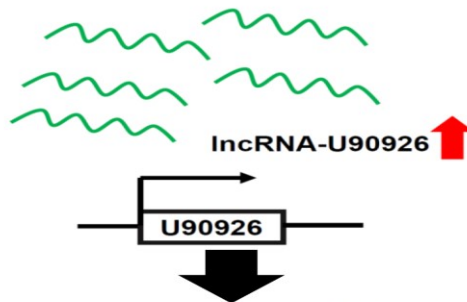
**3-1** では急性網膜壊死における感染細胞の一つである視細胞において、HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定した。その結果、感染後に発現が 2 倍以上に上昇する lncRNA を合計で 19 個同定した。また同定 lncRNA の中では、U90926 のみが急性網膜壊死の疾患モデルマウスの網膜において発現上昇を確認できた。**3-2** では U90926 に着目し、同分子の HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖における寄与をノックダウン細胞、過剰発現細胞を用いて解析した。その結果、U90926 ノックダウン細胞では HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖とも著明に抑制された。一方で、U90926 過剰発現細胞では HSV-1 のゲノム DNA 複製が著明に亢進した。以上のことから、U90926 の発現上昇は視細胞における HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖にとって重要な因子であることが示唆された。**3-3** では、初めに U90926 のウイルス遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。具体的にはウイルスゲノム DNA の複製開始に重要なウイルス前初期遺伝子である ICP-0、ICP-4 の発現について解析した。その結果、U90926 ノックダウン細胞では ICP-0、ICP-4 の発現が著明に抑制されていた。**3-4** では、HSV-1 感染時に U90926 によって発現制御される宿主側遺伝子を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定した。その結果、同定遺伝子は免疫関連遺伝子が有意に濃縮されていた。

以上のことから、HSV-1 感染が U90926 の発現を誘導し、その結果、ウイルス前初期遺伝子 (ICP-0、ICP-4) の発現を促進することで、ウイルスのゲノム DNA 複製ならびに増殖を促進していると考えられる。そして、ウイルス増殖の促進が宿主免疫応答を活性化していると考えられる (図 13)。

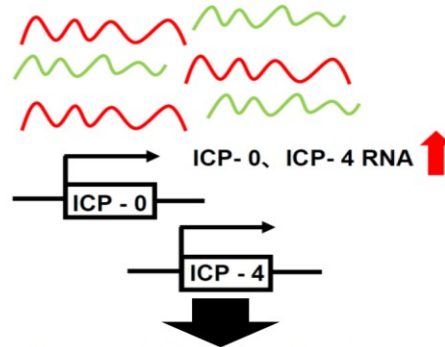
**Virus infection into host cell**



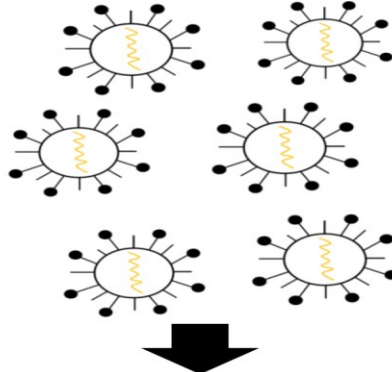
**Upregulation of host lncRNA-U90926**



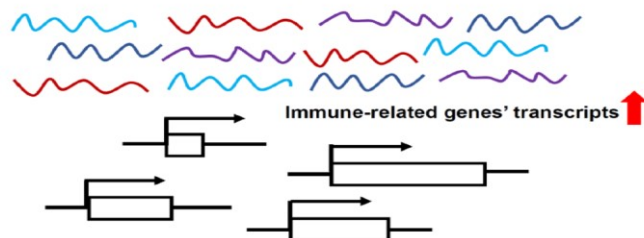
**Upregulation of virus immediate early genes' (ICP-0, ICP-4) expression**



**Increased virus proliferation**



**Activation of the host immune response**



### 図 13 本研究の概念図

HSV-1 感染により U90926 が発現誘導され、その結果、HSV-1 前初期遺伝子 (ICP-0、ICP-4) の発現を促進することで、ウイルスのゲノム DNA 複製ならびに増殖を促進する。そして、ウイルス増殖の促進が宿主免疫応答を活性化している。

## 第四章 考察

本研究では、マウス視細胞株ならびに急性網膜壊死の疾患モデルマウスの網膜を用いて、HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA として lncRNA-U90926 を同定した。さらに同分子のノックダウン細胞では HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖とも著明に抑制、過剰発現細胞では HSV-1 のゲノム DNA 複製が著明に亢進し、lncRNA-U90926 は HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖に重要な因子であることを見出した。また lncRNA-U90926 を標的とする 2 種類の異なる siRNA (19 ヌクレオチド) は、宿主細胞におけるウイルスゲノム DNA 複製ならびにウイルス増殖を著明に抑制することで、宿主細胞の生存率を著明に増加させることを併せて見出した。

これまでに lncRNA-U90926 の機能に関する報告は、2 報報告されている。具体的には、マクロファージで Toll 様受容体の刺激によって U90926 の発現が誘導され、インターロイキン-10 誘導の正の調節因子、また CD80/CD86 誘導の負の調節因子として作用する二機能性の lncRNA であることが報告されている<sup>43</sup>。また、U90926 の発現は、前駆脂肪細胞の分化過程で低下することが報告されている<sup>44</sup>。一方で、本研究結果は lncRNA-U90926 が HSV-1 の増殖に寄与する宿主由来 lncRNA として最初に報告したものである。ウイルスは遺伝子構造の違いに基づいて、大きく RNA ウイルスと DNA ウイルスに分類される<sup>45</sup>。RNA ウイルス



の増殖に寄与する宿主由来 lncRNA はいくつか報告され、具体的には A 型インフルエンザウイルスの lncRNA-VIN<sup>22</sup>、lncRNA-IPAN<sup>23</sup>、lncRNA-PANN<sup>24</sup>、水胞性口内炎ウイルスの lncRNA-ACOD1<sup>25</sup>、C 型肝炎ウイルスの lncRNA-EGOT<sup>26</sup> が挙げられる。一方で、DNA ウイルスの増殖に寄与する宿主由来 lncRNA はこれまでに報告されておらず、本研究結果は DNA ウイルスの増殖に寄与する宿主由来 lncRNA として世界で最初に報告したものである。

ウイルス感染に対する生体防御において、自然免疫は感染初期の速やかな防御機構として重要な役割を担っている。自然免疫系における Pattern recognition receptors (PRPs) は感染をいち早く前線において感知し、その後、細胞内にシグナルを伝え、I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン・ケモカインの発現誘導といった自然免疫応答を活性化する<sup>46</sup>。HSV-1 を含めた DNA ウイルスは、PRPs の中でも DNA センサータンパク質である Toll-like receptor 9 (TLR9) や DNA dependent activator of interferon regulator factors (DAI) により宿主細胞内で認識され、インターフェロン調節因子や NF- $\kappa$ B の活性化が誘導されることが明らかになっている<sup>46</sup>。これらの知見と U90926 が HSV-1 感染により発現誘導されることを考慮すると、U90926 は TLR9 や DAI などの DNA センサーを介したシグナル伝達により発現誘導されている可能性が考えられる。さらに本研究では、U90926 は HSV-1 感染によりマウス視細胞株では発現誘導されたが、マウス

網膜血管内皮細胞株では発現誘導されなかった。両細胞とも HSV-1 感染しているにも関わらず、U90926 が視細胞特異的に発現誘導されることから、U90926 は視細胞特異的に機能していることが推測される。

核酸医薬品は従来の低分子医薬品や抗体医薬品では標的にできなかった DNA や RNA などの核酸を標的にできる点において魅力的である<sup>46</sup>。さらに核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性が期待できる一方で、低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができるため製造コストが安く、次世代医薬品として注目を集めている<sup>47</sup>。しかし、核酸医薬品は生体内における安定性に課題を残しており、修飾核酸技術や DDS 技術が発展してはいるが、依然として上市されている核酸医薬品は少ない<sup>48,49</sup>。一方で、眼球における核酸医薬品の投与空間である前房や硝子体は、閉鎖空間で血流から独立していると同時に、体外からのアクセスに優れているため、DDS の観点から眼球は核酸医薬品の投与にあたって有利な臓器である<sup>35</sup>。実際に眼球では、核酸医薬品を前眼部には点眼投与、後眼部には硝子体注射することで効率的に投与することが可能であり<sup>35</sup>、核酸医薬品は眼科疾患の治療に大変有用な治療法である<sup>50</sup>。例えば、フォミビルセン（販売名：ビトラベン）は、サイトメガロウイルス mRNA の immediate early region 2 に相補的な 21 ヌクレオチド配列を有する、サイトメガロウイルス網膜炎に対する世界で最初に承認されたアンチセンス薬であり、硝子体注射で投与される

<sup>51</sup>。これらの知見から、本研究成果は lncRNA-U90926 が HSV-1 を原因ウイルスとする急性網膜壊死に対する核酸医薬の新規治療標的となり得ることを示唆している。今後は急性網膜壊死の疾患モデルマウスを用いて、lncRNA-U90926 が急性網膜壊死に対する抗ウイルス薬の新規治療標的となり得るかについて、*in vivo* の実験を進めていく予定である。

## 引用文献

1. 佐藤 秀蔵. 視覚毒性. 日薬理誌. **131**, 50～54 (2008).
2. Gupta, M.P., *et al.* Retinal Anatomy and Pathology. *Dev Ophthalmol.* **55**, 7-17 (2016).
3. Caspi, R.R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* **120**, 3073-83 (2010).
4. Tripathy, K., *et al.* Serial ultra-wide field imaging for following up acute retinal necrosis cases: *Oman J Ophthalmol.* **8**, 71-2 (2015).
5. Schoenberger, S., *et al.* Diagnosis and Treatment of Acute Retinal Necrosis: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology.* **124**, 382-392 (2017).
6. Aurel, V.S. Experimentalle endogene infektionstberstragung von Bulbus zu Bulbus. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* **72**, 593-602 (1924).
7. Kimura, S.J. Herpes simplex uveitis: A clinical and experimental study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* **60**, 440-470 (1962).
8. Pettit, T.H., *et al.*: Herpes simplex uveitis : An experimental study with the fluorescein-labeled antibody technique. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **4**, 349-357(1965).
9. Whittum, J.A., *et al.*: Ocular disease induced in mice by anterior chamber inoculation of herpes simplex virus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **25**, 1065-1073 (1984).
10. 中川 尚. 実験的単純ヘルペス性網膜炎 (von Szilyモデル) におけるウイ

ルス伝播経路について. 東女医大誌. **58**, 671~676 (1988).

11. Labetoulle, M., *et al*: Neuronal pathways for the propagation of herpes simplex virus type 1 from one retina to the other in a murine model. *J Gen Virol.* **81**, 1201-10 (2000).

12. Pettit, H.T., *et al*: Herpes Simplex Uveitis: An Experimental Study with the Fluorescein-labeled Antibody Technique. *Invest Ophthalmol.* **4**, 349-57 (1965).

13. Jiang, Y. C., *et al*. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int. J. Oral Sci.* **8**, 1-6 (2016).

14. Carninci, P., *et al*. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science.* **309**, 1559-1563 (2005).

15. Mizutani, R., *et al*. Identification and characterization of novel genotoxic stress-inducible nuclear long noncoding RNAs in mammalian cells. *PLoS One.* **7**, e34949 (2012).

16. Valadkhan, S., *et al*. LncRNAs in stress response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **394**, 203-236 (2016).

17. Yilmaz, S.S., *et al*. Analysis of long non-coding RNA (lncRNA) expression in hepatitis B patients. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **18**, 150-161 (2018).

18. Huang, S., *et al.* The expression of lncRNA NEAT1 in human tuberculosis and its antituberculosis effect. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 9529072 (2018).
19. Imamura, K., *et al.* Long non-coding RNAs involved in immune responses. *Front. Immunol.* **5**, 573 (2014).
20. Imamura, K., *et al.* Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol. Cell.* **53**, 393–406 (2014).
21. Imamura, K., *et al.* Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. *EMBO J.* **37**, e97723 (2018).
22. Winterling, C., *et al.* Evidence for a crucial role of host non-coding RNA in influenza A virus replication. *RNA Biol.* **11**, 66–75 (2014).
23. Wang, J., *et al.* Influenza virus exploits an interferon-independent lncRNA to preserve viral RNA synthesis through stabilizing viral RNA polymerase PB1. *Cell Rep.* **27**, 3295–3304 (2019).
24. Wang, J., *et al.* Host long noncoding RNA lncRNA-PAAN regulates the replication of influenza A virus. *Viruses.* **10**, E330 (2018).

25. Wang, P., *et al.* An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism. *Science*. **358**, 1051–1055 (2017).
26. Carnero, E., *et al.* Long noncoding RNA EGOT negatively affects the antiviral response and favors HCV replication. *EMBO Rep.* **17**, 1013–1028 (2016).
27. Imam, H., *et al.* The lncRNA NRON modulates HIV-1 replication in a NFAT-dependent manner and is differentially regulated by early and late viral proteins. *Sci Rep.* **5**, 8639 (2015).
28. Zhang, Q., *et al.* NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. *mBio.* **4**, e596–e512 (2013).
29. Qian, X., *et al.* Long non-coding RNA GAS5 inhibited hepatitis C virus replication by binding viral NS3 protein. *Virology.* **492**, 155-65 (2016).
30. Wang, Z., *et al.* NEAT1 modulates herpes simplex virus-1 replication by regulating viral gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* **74**, 1117–1131 (2016).
31. Dana, H., *et al.* Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci.* **13**, 48–57 (2017).
32. Valeur, E., *et al.* New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed Engl.* **56**, 10294-10323 (2017).

33. Hickerson, P.R., *et al.* Stability Study of Unmodified siRNA and Relevance to Clinical Use. *Oligonucleotides*. **18**, 345–354 (2008).
34. Benizri, S., *et al.* Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjug Chem*. **30**, 366-383 (2019).
35. Guzman A.A., *et al.* Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy. *Br. J. Pharmacol*. **170**, 730–747 (2013).
36. Kim, D., *et al.* HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods*. **12**, 357–360 (2015).
37. Perteza, M., *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol*. **33**, 290–295 (2015).
38. Perteza, M., *et al.* Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc*. **11**, 1650–1667 (2016).
39. Man, A., *et al.* The cyclin-dependent kinase 5 inhibitor peptide inhibits herpes simplex virus type 1 replication. *Sci. Rep*. **9**, 1260 (2019).
40. Roizman, B., *et al.* Whitley. Herpes simplex viruses, p. 2501-2602. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Virology*, 5th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A. (2007).



41. Sandra, K., *et al.* Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**, a013011 (2012).
42. Roizman, B., *et al.* Herpes simplex viruses and their replication, p. 2399-2459. In P. M. Howley and D. M. Knipe (ed.), *Virology*, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, P.A. (2001).
43. Sabikunnahar, S., *et al.* Functional characterization of a novel myeloid cell-specific lncRNA U90926. *J Immunol.* **202**, 187.26 (2019).
44. Chen, J., *et al.* The role and possible mechanism of lncRNA U90926 in modulating 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Int. J. Obes.* **41**, 299–308 (2017).
45. Baron, S. *Medical Microbiology* 4th edition, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston (1996).
46. 高岡 晃教、他. 自然免疫系における DNA センサー. *ウイルス.* **58**, 37-46 (2008).
47. Lundin, K.E., *et al.* Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum Gene Ther.* **26**, 475-85 (2015).
48. Stein C.A., *et al.* FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther.* **25**, 1069-1075 (2017).

49. Adams, B. D., *et al.* Targeting noncoding RNAs in disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 761–771 (2017).
50. Tatiparti, K., *et al.* siRNA delivery strategies: A comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials (Basel)*. **7**, E77 (2017).
51. Perry, C. M., *et al.* Fomivirsen. *Drugs*. **57**, 375–380 (1999).

## 謝辞

研究の機会を与えて下さり、4年間に渡り終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜った東京大学大学院医学系研究科外科学専攻眼科学教室 相原 一 教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、東京大学アイソトープ総合センター 秋光 信佳 教授、自治医科大学附属さいたま医療センター 蕪城 俊克 教授、第一薬科大学薬学部 裏出 良博 教授、自治医科大学眼科学講座 川島 秀俊 教授、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻眼科学教室 田中 理恵 特任講師には終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜り厚く感謝申し上げます。

共同研究を快く引き受けてくださった東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野 加藤 哲久 助教、川口 寧 教授に深謝致します。

また本研究に際して数々の御助言、御協力を頂きました、東京大学アイソトープ総合センター 小野口(水谷) 玲菜 特任助教、川田 健太郎 特任助教、谷上 賢端 特任准教授、三木 敦子 元特任助教をはじめ、秋光研究室の皆様がこの場を借りて厚く御礼申し上げます。