

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 白濱 新多朗

急性網膜壊死は免疫健常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、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。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。これまでに急性網膜壊死の疾患モデルマウスを用いた解析により、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。したがって、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、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、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。

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。さらに近年、宿主細胞におけるウイルス増殖において、宿主由来 lncRNA がウイルス増殖を促進する機能を持つことが明らかにされつつある。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。

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。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。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、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は未だ開発途上である。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、ドラッグデリバリーシステムの観点から siRNA の投与にあたって有利な臓器である。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、ドラッグデリバリーシステム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 の増殖を促進する宿主由来 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。

初めに、急性網膜壊死の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探索した。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。さらに同定 lncRNA の中で HSV-1 感染後の発現上昇率が上位 5 つの遺伝子に着目し、同遺伝子の急性網膜壊死の疾患モデルマウス網膜における発現を解析した。その結果、U90926 のみが有意に発現上昇しており、同分子に着目して機能解析を進めた。

次に、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。U90926 ノックダウン細胞における HSV-1 のゲノム DNA 複製および増殖は、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。その結果、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% 減少していた。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% 減少していた。

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 過剰発現細胞、コントロール細胞の双方を 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 ( $p < 0.05$ ) で U90926 過剰発現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有意に上昇した。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 複製ならびに増殖にとって重要な因子であることが示唆された。

次に、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を評価した。その結果、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 ( $p < 0.0001$ ) で、コントロール細胞と比較して有意に増加した。特に 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。これらの結果は、U90926 の発現上昇が HSV-1 の増殖を促進することで、宿主細胞死を誘導していることを示唆している。

次に、U90926 ノックダウンがウイルス遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。HSV-1 のゲノム DNA 複製は、HSV-1 初期遺伝子の発現によって開始され、HSV-1 初期遺伝子の発現は HSV-1 前初期遺伝子の発現に依存するとされる。そこで、U90926 ノックダウン細胞、コントロール細胞の双方における HSV-1 前初期遺伝子である ICP-0 および ICP-4 の発現量を定量した。その結果、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。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。これらの結果は、U90926 の発現上昇が 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。

最後に、HSV-1 感染時に U90926 によって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探索し、最終的に 396 遺伝子を同定した。同定遺伝子のオントロジーエンリッチメント解析の結果、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」、「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。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。

本研究を通じて、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を通じて、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。