

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09986

研究課題名(和文) 感染性ぶどう膜炎の病態形成に関与する長鎖ノンコーディングRNAに関する研究

研究課題名(英文) Long noncoding RNAs involved in the pathogenesis of infectious uveitis

研究代表者

田中 理恵 (Tanaka, Rie)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70746388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性網膜壊死(ARN)の原因ウイルスとして、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)がある。ウイルスの中には、宿主由来の長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)を自らの増殖に活用しているものがある。そこで、ARNに対する抗ウイルス療法の新規治療標的としてlncRNAに着目した。初めにHSV-1感染後に、マウス視細胞株で高発現していたU90926遺伝子を同定した。U90926ノックダウン細胞では、HSV-1の増殖が顕著に抑制されることで宿主細胞生存率が大幅に上昇することを確認した。この結果は、lncRNA-U90926がHSV-1に対する抗ウイルス療法の新規治療標的になり得ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)が視細胞内で宿主由来の長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA-U90926)を自らの増殖に利用していることが明らかとなった。lncRNA-U90926の阻害は、HSV-1増殖の抑制を通して、宿主細胞生存率の上昇に大きく寄与することから、lncRNA-U90926は抗ウイルス薬の有望な治療標的候補になり得る。これまでのHSV-1に対する抗ウイルス薬はウイルス側因子のみを標的としたものしかなかったが、本知見は宿主側因子を標的とした新規抗ウイルス薬の開発基盤を提供し得るものである。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is the causative virus of acute retinal necrosis (ARN). Some viruses utilize host-derived long noncoding RNAs (lncRNAs) for their own growth. Therefore, we focused on lncRNAs as a novel therapeutic target for antiviral therapy against ARN.

Initially, we identified the U90926 gene, which was highly expressed in a mouse photoreceptor cell line after HSV-1 infection. And we confirmed that host cell survival was greatly increased in U90926 knockdown cells due to marked inhibition of HSV-1 proliferation. These results suggest that lncRNA-U90926 may be a novel therapeutic target for antiviral therapy against HSV-1.

研究分野：眼科学

キーワード：長鎖ノンコーディングRNA 急性網膜壊死 単純ヘルペスウイルス1型 U90926

1. 研究開始当初の背景

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、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。

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、治療抵抗性の症例も存在する。この背景には、アシクロビル、バラシクロビルのいずれもが、ウイルス DNA ポリメラーゼという同一の標的分子を対象とした薬剤であることが一因であるため、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。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。またいくつかのウイルスでは、ウイルス自身が、自らの宿主細胞内におけるゲノム複製ならび増殖に、ウイルス感染の応答により生じた宿主由来 lncRNA を利用していることが明らかになっている。そこで、ウイルス増殖を促進する機能を持つ 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、抗ウイルス薬の有望な新規治療標的になり得ると考えた。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

- (1) HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA の同定
- (2) HSV-1 のゲノム DNA 複製、増殖における U90926 の関与の検討
- (3) 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の検討
- (4) ヒト U90926 遺伝子の同定
- (5) ヒト U90926 転写物の HSV-1 を起因とする急性網膜壊死患者の硝子体液中における発現解析
- (6) 硝子体液中のヒト U90926 転写物量、硝子体液中のウイルス量、最終矯正 logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR) 視力の各変数間の相関関係の検討

4. 研究成果

(1) マウス視細胞株である 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 シーケンズ解析を行った。非感染群、感染群の各遺伝子転写物について平均 fragments per kilobase of exon per million reads mapped (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 (*in vitro* 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、急性網膜壊死モデルマウスの網膜における発現量を定量的ポリメラーゼ連鎖反応法 (quantitative polymerase chain reaction; qPCR) で評価した。その結果、U90926 のみが有意に発現上昇していた ($p < 0.05$)。これらの結果から、本検討では、*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。

(2) 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。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 ($p < 0.001$) の各時点で、対照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、対照細胞と比較して約 80% 減少した。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 時間の各時点で、対照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、対照細胞と比較して約 93% 減少した。

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 時間の各時点で、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。その後、両細胞を HSV-1 に感染させたところ、HSV-1 感染後 3 時間、6 時間 ($p < 0.01$)、9 時間、12 時間 ($p < 0.05$) の各時点で、対照細胞と比較して 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。

(3) 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 ($p < 0.0001$) の各時点で、対照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)] であったのに対し対照細胞の生存率は 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。

(4) U90926 のヒトゲノムにおけるシンテニー領域にオルソログ遺伝子 (ヒト U90926) を同定し、同遺伝子の 2 つの転写産物 (1,955 と 592 塩基) とマウス lncRNA-U90926 の間で高い配列相同性 (38.5%、45.3%) を持つことを明らかにした。

(5) 長いヒト U90926 転写物 (1,955 塩基) 量は、HSV-1 を起因とする急性網膜壊死の患者の硝子体液中に、サルコイドーシスや眼内悪性リンパ腫の患者の硝子体液中に比べて、それぞれ約 30 倍、約 40 倍と著明に上昇していた。一方で、短いヒト U90926 転写物 (592 塩基) 量は 3 群間で有意な差を認めなかった。これらの結果は、ヒト U90926 転写物の中で長いヒト U90926 転写物が HSV-1 を起因とする急性網膜壊死の患者の硝子体液中で特異的に上昇し

ていることを意味する。

(6) 硝子体液中の長いヒト U90926 転写物量は、最終矯正 logMAR 視力 ($r=0.7671, p=0.0079$) ならびに硝子体液中のウイルス量 ($r=0.6115, p=0.0499$) と正の相関性を示した。これらの結果は、長いヒト U90926 転写物量が硝子体液中で多いほど、硝子体液中のウイルス量が多く、視力予後が悪いことを意味している。

本研究により HSV-1 の増殖に寄与する宿主由来 lncRNA として、lncRNA-U90926 を同定した (Shirahama *et al*, *Sci Rep*, 2020)。さらに HSV-1 を原因ウイルスとする急性網膜壊死患者の硝子体液中のヒト U90926 転写物の解析により、硝子体液中の長いヒト U90926 転写物量が硝子体液中のウイルス量ならびに最終矯正視力と強い相関があることがわかった (Shirahama *et al*, *Sci Rep*, 2021)。

HSV-1 は宿主のウイルス感染に対する応答の結果生じた lncRNA を巧みに操り、自らの複製ならび増殖に活用していることが明らかとなった。これまでの抗ウイルス戦略はウイルス由来産物を標的とした薬剤の開発が主体であったが、lncRNA-U90926 のような宿主由来産物を標的とすることで、新規の抗ウイルス戦略を構築することが可能になるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shirahama Shintaro, Onoguchi-Mizutani Rena, Kawata Kentaro, Taniue Kenzui, Miki Atsuko, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi, Tanaka Rie, Kaburaki Toshikatsu, Kawashima Hidetoshi, Urade Yoshihiro, Aihara Makoto, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Long noncoding RNA U90926 is crucial for herpes simplex virus type 1 proliferation in murine retinal photoreceptor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76450-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shirahama Shintaro, Taniue Kenzui, Mitsutomi Shuhei, Tanaka Rie, Kaburaki Toshikatsu, Sato Tomohito, Takeuchi Masaru, Kawashima Hidetoshi, Urade Yoshihiro, Aihara Makoto, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Human U90926 orthologous long non-coding RNA as a novel biomarker for visual prognosis in herpes simplex virus type-1 induced acute retinal necrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91340-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Takafumi, Kaburaki Toshikatsu, Tanaka Rie, Shirahama Shintaro, Komae Keiko, Nakahara Hisae, Takamoto Mitsuko, Kawashima Hidetoshi, Aihara Makoto	4. 巻 41
2. 論文標題 Incidence and changing patterns of uveitis in Central Tokyo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2377 ~ 2388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10792-021-01791-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Rie, Kaburaki Toshikatsu, Taoka Kazuki, Karakawa Ayako, Tsuji Hideki, Nishikawa Masako, Yatomi Yutaka, Shinozaki Ushiku Aya, Ushiku Tetsuo, Araki Fumiyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 More Accurate Diagnosis of Vitreoretinal Lymphoma Using a Combination of Diagnostic Test Results: A Prospective Observational Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2021.1873394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Rie, Kaburaki Toshikatsu, Yoshida Atsushi, Takamoto Mitsuko, Miyaji Tempei, Yamaguchi Takuhiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Fluorescein Angiography Scoring System Using Ultra-Wide Field Fluorescein Angiography Versus Standard Fluorescein Angiography in Patients with Sarcoid Uveitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 1398 ~ 1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09273948.2020.1737141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitano Marie, Tanaka Rie, Kaburaki Toshikatsu, Nakahara Hisae, Shirahama Shintaro, Suzuki Takafumi, Komae Keiko, Aihara Makoto	4. 巻 29
2. 論文標題 Clinical Features and Visual Outcome of Uveitis in Japanese Patients Younger than 18 Years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 1280 ~ 1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09273948.2020.1726972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白濱新多朗、田中理恵、高田幸子、村田博史、中原久恵、小前恵子、川島秀俊、蕪城俊克
2. 発表標題 3種類のヘルペス性虹彩炎に伴う続発緑内障の視野障害
3. 学会等名 第53回 日本眼炎症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 久子、蕪城 俊克、田中 理恵、佐藤 智人、竹内 大、戸澤 英人、桂 真理、和田 洋一郎、白濱 新多朗、曾我 拓嗣、川島 秀俊、相原 一
2. 発表標題 ぶどう膜炎疾患の硝子体液中サイトカイン濃度の比較
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木貴文、蕪城俊克、田中理恵、中原久恵、白濱新多朗、小前恵子、伊沢英知、高本光子、相原一
2. 発表標題 近年の東京大学医学部附属病院におけるぶどう膜炎初診患者の疫学的検討
3. 学会等名 第53回 日本眼炎症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張本亮、田中理恵、蕪城俊克、伊沢英知、中原久恵、川島秀俊、相原一
2. 発表標題 サイトメガロウイルスによるChronic Retinal Necrosisの4例
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 単純ヘルペスウイルス増殖阻害剤	発明者 秋光 信佳、蕪城 俊克、裏出 良博、 白濱 新多朗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、52100628021	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	蕪城 俊克 (Kaburaki Toshikatsu) (00280941)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	秋光 信佳 (Akimitsu Nobuyoshi) (40294962)	東京大学・アイソトープ総合センター・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川村 猛 (Kawamura Takeshi) (70306835)	東京大学・アイソトープ総合センター・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関