

201321010A

厚生労働科学研究費補助金  
B型肝炎創薬実用化研究事業

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした  
肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

(H24-B 創-肝炎-一般-011)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成 26(2014)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
B型肝炎創薬実用化研究事業

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした  
肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

(H24-B 創-肝炎-一般-011)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成 26(2014)年 3 月

\*\*\*\*\* 目 次 \*\*\*\*\*

I. 総括研究報告書	
研究代表者：溝上雅史 .....	01
II. 分担研究報告書	
1. 研究分担者：杉山真也 .....	07
2. 研究分担者：福原崇介 .....	09
3. 研究分担者：安井文彦 .....	11
4. 研究分担者：片岡一則 .....	15
5. 研究分担者：中西 真 .....	19
6. 研究分担者：星野真一 .....	21
7. 研究分担者：武富紹信 .....	25
8. 研究分担者：田中榮司 .....	29
III. 研究成果の刊行一覧 .....	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	39

# I. 総括研究報告書

# 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした 肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

研究代表者：溝上 雅史 国立国際医療研究センター  
肝炎・免疫研究センター センター長

研究要旨：本年度では、人工キメラ遺伝子の改良とそれを輸送するデリバリーシステムの開発を昨年ひき続いて行った。DNA 切断活性を可視化する実験系を確立し、従来の手法よりも簡便に評価ができるようになった。また、デリバリーシステムを改編することによって、in vivo に投与することによって、肝臓の広範囲に RNA を輸送することを確認した。人工キメラ遺伝子を RNA で輸送するが、その際の発現量の調整を検討し、mRNA の分解機構を明らかとした。それによって、保護すべき領域が 3 末端であることが明らかとなり、その対策として、Ms2 配列を導入することで分解の制御を行った。オフターゲット効果を評価する目的で、細胞生物学的な観点から細胞老化の有無を検討したが、その影響は認められなかった。ゲノム解析においても変異箇所を認めず、非特異的な切断はかなり少ないと考えられた。また、ex vivo 系の樹立については、外科切除後の肝組織を培養するために、新規の培養液を作成し検証した。それによって、従来の培養液を使用した生存率と比べて最大で 5 倍程度の生存を示した。臨床応用した際の評価項目の検討として、HBVDNA と HBVRNA 検査の有用性を検証した。それによって、核酸アナログ製剤では、RNA が残存する可能性があることが明らかとなり、人工キメラ遺伝子においても、両マーカーを検証する必要があると考えられた。

## A. 研究目的

本研究課題は、B 型肝炎に感染した患者の体内に永続的に残存する HBV ゲノムを不活化することで、B 型肝炎患者の治癒を目指すものである。

HBV に一度感染するとそのゲノムは肝細胞核内にとどまり、ミニゲノムを形成することで半永久的に転写と複製を繰り返す。また、ヒトゲノム内にもインテグレーションされることが知られているため、細胞分裂にそってウイルスゲノムは次世代の細胞へと受け継がれていく。核酸アナログ製剤は、HBV の逆転写を阻害するものであるが、複製を抑制するのみで抗原産生を抑制することや肝細胞核内のゲノムは除くことが出来ない。

そこで、核内の HBV ゲノムを不活化もしくは排除することを目的として、人工キメラ遺伝子を用いた創薬研究を進める。研究班としては、1) 人工キメラ遺伝子の設計と効果の確認を行うグループ（杉山真也、福原崇介、安井文彦）、2) 人工キメラ遺伝子の輸送手法を開発するグループ（片岡一則）、3) 人工キメラ遺伝子の発現レベルを最適化するグループ（星野真一）、4) 人工キメラ遺伝子の副作

用を検討するグループ（中西真、杉山真也）、5) ex vivo 系の開発をするグループ（武富昭信）、6) 臨床試験に向けた臨床的評価マーカーを検討するグループ（田中榮司）で構成されている。各グループが共同することで、最終的には人工キメラ遺伝子の実用化を目指して研究を進める。

## B. 研究方法

1) 人工キメラ遺伝子の設計と効果の確認を行うグループ（杉山真也、福原崇介、安井文彦）

人工キメラ遺伝子の作成と最適化を行い、切断活性の評価を行った。人工キメラ遺伝子としては、Zinc Finger Nuclease (ZFN)、TALE Nuclease (TALEN)、CRISPR/Cas9 を使用した。遺伝子切断活性を簡便に評価する実験系の構築を目指して、GFP 遺伝子を利用して、遺伝子の相補的補修機構を用いた系を構築した。

2) 人工キメラ遺伝子の輸送手法を開発するグループ（片岡一則）

自己会合型のナノミセルを利用し、動物モデルでの遺伝子デリバリー効率について検討した。カチオン性ポリマー・脂質を用いた系

でも検討した。投与方法としては、ハイドロダイナミクスインジェクション法を用いてマウスへ導入した。投与する mRNA の合成については、シトシン(C)とウラシル(U)の一部を 5 メチル(5m)C、2 チオ(2t)U、シュード( $\phi$ )U といった修飾ヌクレオシドで置換することで、mRNA の免疫原性の軽減を狙った。

3) 人工キメラ遺伝子の発現レベルを最適化するグループ (星野真一)

人工合成 mRNA (EGFP) を利用して、EGFP ORF の 3'非翻訳領域(3'UTR)には  $\beta$ -globin の mRNA 安定化シス配列を導入した。タンパク質検出用に Flag タグを 5 コピー付加し、3'末端には 72 塩基のポリ A 鎖を付加した。RNA への繫留実験では、3'UTR に Ms2 結合部位を導入した。これらユニットの 3'末端を制限酵素により切断したものを鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼにより RNA 合成を行った。合成した RNA は HeLa 細胞にトランスフェクトした。

4) 人工キメラ遺伝子の副作用を検討するグループ (中西真、杉山真也)

FUCCI のシステムを用いて、DNA 切断が生じた際の細胞周期進行制御、および細胞老化誘導機構について検討した。また細胞老化誘導におけるがん抑制遺伝子 p53 や pRb の作用機構を明らかにする目的で、これらに対するレンチウイルス shRNA システムを用いた。HBVDNA 人工キメラ遺伝子を正常線維芽細胞に発現させたときの DNA 二重鎖切断導入についても検討を行った。

人工キメラ遺伝子がヒト細胞に投与された際の切断活性について評価した。人工キメラ遺伝子がヒトゲノムを切断する可能性を評価するために、初代培養肝細胞に人工キメラ遺伝子を導入し、培養後にその全ゲノム配列を解析した。データ解析用にパイプラインを構築して次世代シーケンサーによるデータ解析を自動化した。

5) ex vivo 系の開発をするグループ (武富紹信)

「初代培養」

切除肝を冷生食に浸漬し細分化した。組織片はコラゲナーゼ処理をおこない、金属メッシュでシングルセル化した。DMEM に FBS を 10%、F12 栄養液、抗生物質を添加した。検討のために必要に応じて成長因子を加えた。12 種類の培養条件を検討し、24 時間以内に培養皿に付着する細胞数が多いものを基準として条件を検討した。培養には、細胞外基質コーティング済培養皿を使用した。

「温阻血障害の軽減、修復」

外科手術において、血流を遮断後に切除・摘出される病変部位および周囲の非癌部組織は分離培養処理を行う段階で、高度の温阻血状態に曝露されている。正常肝においてもダメージが大きく、2 時間以上の温阻血では、再灌流後に高度の細胞死を呈する。肝病態(線維化、肝硬変、脂肪化)を呈している肝臓ではなおさらである。そこで、これらの傷害を軽減・修復することを目的とした臓器保存・修復法の開発を目指した。

6) 臨床試験に向けた臨床的評価マーカーを検討するグループ (田中榮司)

HBV RNA 検出の臨床的意義を検討した。患者は、核酸アナログ治療例を含む B 型慢性肝炎例 546 例を対象とした。In house の HBV DNA と HBV RNA の測定方法を用いた。RNA と DNA の同時測定の際には、逆転写処理のみを行った。PCR 用のプライマーは HBV 遺伝子の S 領域を標的とした。測定感度は HBV DNA と RNA 共におよそ 2.0 log copies/ml であった。HBV DNA 量はリアルタイム PCR 法(ロシュ)、HBs 抗原量は CLEIA 法(シスメックス)、HBcr 抗原量は CLEIA 法(富士レビオ)で測定した。

## C. 研究結果

1) 人工キメラ遺伝子の設計と効果の確認を行うグループ (杉山真也、福原崇介、安井文彦)

従来構築してきた HBV ゲノム切断用の ZFN を改変することで、切断効率が 20-40%程度向上した。3 種類の改変を行い、ZFN 投与量を増やすことで切断活性も向上することを確認

した。TALEN についても同様であり、量依存的な切断活性の向上が認められた。切断活性の可視化のために、蛍光遺伝子を改変したプラスミドの作成を行った。GFP 遺伝子をオーバーラップさせたものを二分化し、その間に HBV ゲノムを挿入した。細胞株へ人工キメラ遺伝子とコトランスフェクションしたところ、切断活性がある人工キメラ遺伝子を一緒に導入したもので蛍光遺伝子の発現を認めた。これによって、切断活性を可視化することに成功した。

#### 2) 人工キメラ遺伝子の輸送手法を開発するグループ (片岡一則)

ヌクレオシド修飾による免疫反応への影響については、投与 4 時間後の肝臓における炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$ )と 1 型インターフェロン(IFN- $\beta$ )の産生量を指標に定量を行ったところ、いずれの値においても、ヌクレオシド修飾で有意に低値であった。

また、これらのヌクレオシド修飾が、翻訳効率とその安定性に与える影響について検討した。その結果、未修飾 mRNA では発現の持続期間は 2 日程度であったが、修飾 mRNA では約 4 日まで延長した。

核酸輸送能力については、修飾 mRNA を用いて、ナノミセルと他の mRNA 導入システムとの比較を行った。肝臓でのルシフェラーゼ発現効率を、PEG を持たない PAsp(DET)ポリカチオンや、汎用されている試薬である linear polyethyleneimine (LPEI)、lipofectamine と比較したところ、ナノミセル群では他の群と比較して、数倍~10 倍程度高い発現を示した。その際の肝臓における炎症性サイトカイン産生を調べたところ、ナノミセル群では他の群と比較して有意に低値であった。

#### 3) 人工キメラ遺伝子の発現レベルを最適化するグループ (星野真一)

通常、細胞内で合成された mRNA は翻訳と共役する形で 3' 末端ポリ A 鎖の分解と 5' 末端キャップ構造の切断が生じて、5'  $\rightarrow$  3' 方向への分解が進行する。一方で、人工合成 mRNA は、ポリ A 鎖長によって mRNA の安定

性は影響をうけなかった。しかしながら、3'  $\rightarrow$  5' 分解に関わるエキソソーム-SKI 複合体をノックダウンすると RNA の安定化が観察された。このことから、トランスフェクトした人工合成 mRNA はエキソソームによる 3'  $\rightarrow$  5' 分解経路で分解されることが明らかとなった。

mRNA の安定化については、人工合成 mRNA の 3' UTR に  $\lambda$ ファージの Ms2 配列を挿入することで、そこに Ms2 と融合した各種翻訳関連因子を繫留させることで、人工 mRNA の翻訳効率を検討した。人工 mRNA にポリ A 鎖を付加すると翻訳効率は 7 倍増加し、そこにポリ A 鎖結合蛋白質 PABP を繫留すると 16 倍に増大した。また、翻訳終結因子である eRF3 を繫留すると約 30 倍の効率を示した。

#### 4) 人工キメラ遺伝子の副作用を検討するグループ (中西真、杉山真也)

FUCCI のシステムに対して、電離放射線照射を行い、DNA 切断を誘導した。その後、細胞周期進行をタイムラプスイメージングで解析した。高線量で細胞は DNA 複製後、分裂期をとわずに G1 期に移行した。その後、細胞老化へと至った。この分裂期の回避には、p53 依存的な p21 の発現誘導が必要で、誘導された p21 は Cdk1 および Cdk2 の活性抑制を介して、APC/C(Cdh1)の早期活性化を誘導した。一方、細胞老化の誘導には活性型の Cdh と pRb を G2 期の細胞に一過性に発現誘導するだけで十分であることが明らかとなった。HBVDNA 人工キメラ遺伝子を正常細胞に導入しても DNA 二重鎖切断は誘導されなかった( $\gamma$ H2AX 発現が認められない)。しかしながら、長期間の発現、または高レベルでの発現でどのような反応が起きるかは引き続き解析が必要である。

ゲノム解析の面から人工キメラ遺伝子の非特異的な切断活性の有無を検討した。次世代シーケンサーによるデータ解析パイプラインの構築を実施し、ケースとコントロールサンプルを少ない手間で比較することができるようになった。

5) *ex vivo* 系の開発をするグループ (武富紹信)

「初代培養」

切除肝組織の癌部・非癌部から細胞の分離、培養が可能となった。また、血管構成細胞の単離、培養も成功した。血流遮断から組織の氷冷までに3時間以上を要した症例では、生細胞はほとんど培養できなかった。また、細胞死は大半が単離時および最初に培養皿に播く段階までが原因であることが明らかとなった。

2週間以上の長期培養では、形態変化が観察され、肝細胞の数が減少し、線維芽細胞様の細胞が増殖した。しかしながら、2% DMSO を添加して培養を行った場合、肝細胞様の細胞が再び出現した。

「温阻血障害の軽減、修復」

切除後、保存処理を氷冷 UW 液で行ったが、細胞の回収量は増加しなかった。氷冷 UW 液への単純浸漬は温阻血と単離操作によって生じるストレスに対して、細胞保護効果を認めなかった。「自作臓器灌流修復液」

切除後の処理をして自作液に浸漬し、30分間室温に復温させたところ、細胞の回収量は増加した。自作液で処理した場合には、24時間の時点で多数の細胞がしっかりと接着していた。生細胞数は通常法の3-5倍程度であった。

6) 臨床試験に向けた臨床的評価マーカーを検討するグループ (田中榮司)

HBV DNA 量はラミブジン (LAM) 投与後速やかに低下したが、HBV RNA 量は一過性にやや上昇した後に低下した。LAM 投与前は HBV DNA 優位であったが、投与中は HBV RNA が比較的高値を示した。HBcr 抗原と HBc 抗原の定量値は HBV RNA と類似して徐々に低下した。つまり、核酸アナログがその効果を発揮している時は HBV RNA が比較的高値を示し、核酸アナログの効果が無い時は HBV DNA が高くなった。

#### D. 考察

人工キメラ遺伝子合成について、昨年度から作成してきたものを配列の最適化を行うこ

とで切断効率を上昇させた。蛍光遺伝子を改変した切断の可視化モデルを利用することでより簡便な評価が可能となった。来年度では、動物モデルに投与することでその効果を検証していく。

デリバリーシステムについては、修飾ヌクレオシドを用いることで、肝臓への mRNA 導入に伴う免疫反応を減弱させることが可能となった。また、修飾 mRNA はタンパク翻訳の期間を有意に延長した。また、使用したナノミセルは他のキャリアと比べて、導入に伴う炎症を抑制し、高いタンパク質発現効率を得られた。PEG を持つナノミセルでは、炎症反応を回避することが出来た。このように修飾 mRNA とナノミセルを用いたシステムは、有用性の高いシステムであることが分かった。肝臓における GFP 発現の分布が mRNA で DNA に対して有意であった。

輸送核酸の安定化については、細胞内で合成された mRNA は 5' → 3' 方向へ分解されるのに対し、トランスフェクトした人工合成 mRNA はエキソソームにより分解された。外来の mRNA は核を経由しないため、ポリ A 鎖の PABP 保護が不十分であると考えられた。そこに、PABP を繫留することで安定した翻訳活性が得られた。

DNA 損傷応答については、二重鎖切断が多数生じた場合、もしくは、修復困難な切断であった場合は、高率に分裂期回避が起り、細胞老化が誘導されることが示唆された。ゲノム解析でパイプラインを構築したことによって、オフターゲット効果を短時間で探索できるようになったといえる。

*ex vivo* 系の樹立では、血流遮断から分離培養までの温阻血時間が3時間以内であることが重要であった。培養中に定期的に DMSO を添加することで肝細胞を長期間維持できる可能性が示唆された。自作培養液は酸素化なしで使用した際にも強い臓器保護効果を発揮することを preliminary 実験で確認している。肝臓の単離、復温、再酸素化等によるストレス障害を軽減することが細胞の生着率を向上さ



せるものと考えられた。

核酸アナログ薬治療中でのHBVマーカーの検討によって、HBV DNA量とRNA量の比が大きく変化することが明らかとなった。このことから、HBV DNA量とRNA量の同時測定は抗HBV薬の効果を評価する上で有用であることが示唆された。核酸アナログ製剤投与によって、HBV複製は抑制されるが、タンパク発現等に関連するHBVRNAはHBVDNAと併せて減少することは少ない。治療の継続という時間的な要因が必要であった。HBVのcccDNA不活化を目指す本研究では、多方面からその効果を検討する必要がある。

#### E. 結論

各分担者の成果によって目標としていた進捗を得ることが出来た。来年度以降も開発を進めて、効果を最大化した人工キメラ遺伝子の開発とデリバリーシステムの改善を行っていく。

#### F. 研究発表(本研究に関わるもの)

##### 1. 論文発表

- (1) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey *Microbiol Immunol* 57 (2): 122-9. 2013
- (2) Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat* 20 (4): e27-36. 2013
- (3) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 57 (7): 935-42. 2013
- (4) Michikawa T, Inoue M, Sawada N, Sasazuki S,

Tanaka Y, Iwasaki M, Shimazu T, Yamaji T, Mizokami M, Tsugane S. Plasma levels of adiponectin and primary liver cancer risk in middle-aged Japanese adults with hepatitis virus infection: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22 (12): 2250-7. 2013

- (5) Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Gimenez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubina JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behaviour regarding its parental genotypes. *J Gen Virol* 94 Pt 12: 2724-8. 2013
  - (6) Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R. Is antiviral prophylaxis necessary to prevent hepatitis B virus (HBV) reactivation in patients with HBV-resolved infection receiving rituximab-containing chemotherapy? *J Clin Oncol* 31 (35): 4480. 2013
  - (7) Khan A, Al Balwi MA, Tanaka Y, Hajeer A, Sanai FM, Al Abdulkarim I, Al Ayyar L, Badri M, Saudi D, Tamimi W, Mizokami M, Al Knawy B. Novel point mutations and mutational complexes in the enhancer II, core promoter and precore regions of hepatitis B virus genotype D1 associated with hepatocellular carcinoma in Saudi Arabia. *Int J Cancer* 133 (12): 2864-71. 2013
  - (8) Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved HBV infection following rituximab-containing chemotherapy. *Hepatology* [Epub ahead of print]. 2013
- ##### 2. 学会発表
- 国内
- (1) 溝上雅史 B型肝炎疾患概念の変遷 第61回日本輸血・細胞治療学会, 横浜, 2013.05.16-18
  - (2) 溝上雅史 Changing concept of hepatitis B virus diseases 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013.06.6-7

- (3) 溝上雅史. なぜ、今再びB型肝炎ウイルスか?ーChanging Concept of HBVー. 第45回小石川消化器病フォーラム, 東京, 2013.06.27
- (4) 溝上雅史. B型肝炎の再活性化について. 第26回肝臓フォーラム (東部), 東京, 2013.07.6

#### 国際

- (1) Mizokami M. Changing Concept of Hepatitis B Virus from HBV Genotype Research. Seminar on Control of Viral Hepatitis -Epidemiology, Prevention and Treatment, 市川, 2013.09.27
- (2) Mizokami M. Genome-wide Association Study and Clinical Application in Hepatitis B. The American association for the study of liver diseases 64th annual meeting and postgraduate course (AASLD) The Liver Meeting 2013 Washington DC, 2013.11.1-5
- (3) Mizokami M. HBV Viral Genome Genotypes and Mutations Precore/Core promoter, Enhancer II mutations, and Pre-S deletions mutations. Recommendation for Management of Chronic Hepatitis B Infection– Expert Panel Meeting – Hong Kong, 2013.12.7
- (4) Mizokami M. Genetic Influence on Development of Complications (I) HBV Viral Genome Genotypes and Mutations Precore/Core promoter, Enhancer II mutations, and Pre-S deletions mutations. Recommendation for Management of Chronic Hepatitis B Infection – Expert Panel Meeting – 2013.12.7

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得  
特になし
- 2. 実用新案登録  
特になし
- 3. その他  
特になし

## Ⅱ. 分担研究報告書

# 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした 肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：杉山 真也 国立国際医療研究センター  
肝炎・免疫研究センター 上級研究員

研究要旨：本研究の分担内容としては、B 型肝炎ウイルスの複製に利用される鋳型 DNA (cccDNA) とヒトゲノム内にインテグレーションされた HBV ゲノムを切断して不活化するために、人工キメラ遺伝子を実験的に設計し、活性を確認することである。前年までに構築した人工キメラ遺伝子を最適化し、切断活性の向上を目指した。さらに、その切断活性を可視化するために、蛍光遺伝子を改変したシステムを構築した。その結果、切断が起きた場合にだけ、蛍光を発することが確認でき、擬陽性反応を抑えた評価系を確立した。また、ヒトゲノムを切断する副次的な作用がないことを確認するために、初代培養肝細胞を全ゲノムシーケンスし、データ解析をするための解析パイプラインの構築を行った。

## A. 研究目的

本年度では、HBV ゲノム切断の効率を向上させることが目的である。そのために、前年度までに作成してきた人工キメラ遺伝子の配列を改変して、その切断効率を向上させる。利用する人工遺伝子としては、ZFN と TALEN を使用した。また、これらの切断活性を評価するシステムが必要である。そこで、まずは定性的な評価をするために、蛍光遺伝子を使った評価系の確立を目指した。一方で、人工キメラ遺伝子が HBV ゲノム以外を切断することがあるか評価する必要がある。そこで、初代培養肝細胞に対して、人工キメラ遺伝子を投与してその効果を調べた。手法としては、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを実施した。

## B. 研究方法

人工キメラ遺伝子の切断効率の改善については、標的配列に対する ZFN や TALEN を複数準備し、それらの活性を評価した。加えて、ヒトゲノムを切断することがないように、細胞傷害性を細胞増殖でモニターした。切断効率の評価システムとしては、GFP 遺伝子を二分割し、それぞれのフラグメントにオーバーラップする配列が生じるようにしたものである（大阪大学伊川教授との共同研究）。それらのフラグメントの間に標的配列を挿入した。

そのプラスミドを細胞株に導入することで人工キメラ遺伝子が投与された際の切断活性について評価した。人工キメラ遺伝子がヒトゲノムを切断する可能性があるか評価するために、初代培養肝細胞に対して、人工キメラ遺伝子を投与した。そのデータ解析用にパイプラインを構築して次世代シーケンサーによるデータ取得から解析データの算出までを自動化することを試みた。

## C. 研究結果

従来構築してきた HBV ゲノム切断用の ZFN を改変することで、切断効率が 20-40%程度向上した。3種類の改変を行い、ZFN 投与量を増やすことで切断活性も向上することを確認した。TALEN についても同様であり、量依存的な切断活性の向上が認められた。切断活性の可視化のために、蛍光遺伝子を改変したプラスミドの作成を行った。GFP 遺伝子をオーバーラップさせたものを二分化し、その間に HBV ゲノムを挿入した。細胞株へ人工キメラ遺伝子とコトランスフェクションしたところ、切断活性がある人工キメラ遺伝子を一緒に導入したもので蛍光遺伝子の発現を認めた。これによって、切断活性を可視化することに成功した。次世代シーケンサーによるデータ解析パイプラインの構築においては、既存の解析ソフトウェアを複数個について組み合わせ

ることでアダプター配列除去から、アライメント、標準ゲノムに対する多型コールまでを1次解析とした。続いて、そのデータを用いて、ケースとコントロールサンプルを比較することで特異的な切断点の抽出を行った。

#### D. 考察

人工キメラ遺伝子の配列の最適化によって切断効率が上昇した。そこで作成した配列は、次世代シーケンサーによるゲノム解析を行っても非特異的な切断が認められることはなく、HBV ゲノムを狙ったように切断していることを示唆していた。しかしながら、より詳細な解析を進めるために切断活性を可視化、定量化する必要がある。今年度の研究によって、蛍光遺伝子で可視化することが可能となった。

#### E. 結論

最適な切断活性を得るために、投与量や作用時間について、決定する必要がある。そのためには、切断活性を評価する最適なシステムが必要であると考えられた。

#### F. 研究発表(本研究に関わるもの)

##### 1. 論文発表

Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes. *J Gen Virol*. 2013 Dec;94 Pt 12:2724-8.

##### 2. 学会発表

###### 国内

B型肝炎ウイルス複製に関連する脂質分子の同定とその効果」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第49回日本肝臓学会総会 シンポジウム 京王プラザホテル 2013年6月7日

###### 国際

- (1) 「Polymorphisms consisting of (TA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat near IL28B gene could improve the predictive value for HCV

spontaneous clearance with IL28B SNPs.]

Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramane, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Jun Hayashi, and Masashi Mizokami The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the AASLD P-1426 Nov 4<sup>th</sup> 2013 Washington DC

- (2) 「Clinical and virological analysis on Hepatitis B virus genotype D」 Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, and Masashi Mizokami Symposium. Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B. Tokyo, Japan April 14th, 2013
- (3) 「Prediction improvement on the effect of interferon-based therapy and spontaneous clearance of hepatitis C using rs7225881 near IL-28B following rs8099917」 Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2013: 48th Annual Meeting of EASL in Amsterdam, P-26th April 2013

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## CRISPR/Cas9 システムを用いた HBV-DNA の不活化

研究分担者：福原崇介 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨： B 型肝炎の根治には、核内に存在する cccDNA を排除する必要があるため、cccDNA を標的とする新たな治療法の開発が必要である。近年、二本鎖 DNA を切断しうる新たな技術として、人工ヌクレアーゼや CRISPR/Cas9 システムが開発された。今回、配列が様々な遺伝子型で保存されている HBV-DNA を標的としたガイド RNA を設計し、発現系を構築した。in vitro にて、HBV を標的とした CRISPR/Cas9 系の発現はウイルス DNA の複製を強く抑制した。以上のことから、CRISPR/Cas9 系は新たな治療法の候補に成りうることが示唆された。

### A. 研究目的

B 型肝炎に対する現行の治療は、HBV の逆転写酵素を標的としているため、核内に存在する cccDNA やゲノム内に取り込まれた HBV-DNA には効果がないことから根治は難しい。従って、慢性 B 型肝炎を根治するには核内の HBV-DNA を標的とした新たな治療法の開発が必要である。近年、二本鎖 DNA を切断しうる新たな技術として、人工ヌクレアーゼである ZFN や TALEN、また CRISPR/Cas9 システムが開発された。今回、HBV-DNA を標的とした CRISPR/Cas9 系の HBV 感染への影響を検討する。

### B. 研究方法

HBV-DNA のうち、遺伝子型 A、B、C の間で保存されている配列を標的としたガイド RNA を設計し、発現系を構築した。1.28 倍長の HBV-DNA を導入する系や、HepG2.2.15 を HBV-DNA の複製系として用いた。CRISPR/Cas9 系発現による細胞毒性を MTT assay を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

設計したガイド RNA を用いた CRISPR/Cas9 系に切断活性があるかどうかを、レポーターシステムで検討し、全てのガイド RNA が効率的に HBV-DNA の切断が可能であることが判明した。さらに、HBV を標的とした CRISPR/Cas9 系を発現させることによって、1.28 倍長のプラスミド由来の HBV-DNA の複製を有意に抑制した。さらに、HepG2.2.15 細胞における HBV-DNA 量も有意に抑制した。以上のことから、CRISPR/Cas9

系は HBV の新たな治療標的になる可能性がある。また、CRISPR/Cas9 の導入による細胞毒性は、in vitro の培養系において、ZFN や TALEN による細胞毒性と同等であった。

### D. 考察

本研究によって CRISPR/Cas9 系が HBV-DNA の複製を抑制しうることが示唆された。今後は、HBV-DNA の抑制効果をヒト肝細胞キメラマウス等の in vivo モデルを用いて検討する。さらに、CRISPR/Cas9 系の細胞内への導入法として、アデノウイルスの有用性を検討する。

### E. 結論

HBV-DNA を標的とした CRISPR/Cas9 系はウイルス DNA の複製を抑制しうる

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
2. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
3. Fukuhara T, Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J Gastroenterol.* 2013; 48(2): 169-76.

#### 2. 学会発表

1. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原崇介、

森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、第86回日本生化学会、横浜、2013

2. Fukuhara F, Yamamoto S, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University Park, 2013
  3. Okamoto T, Sugiyama Y, Ono C, Aizawa S, Ngoc PD, Kohwaki T, Hirooka E, Fukuhara T, Yamamoto M, Matsuura Y. Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
  4. Fukuhara T, Yamamoto S, Shiokawa M, Wada M, Ono C, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
  5. Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Yamamoto S, Wada M, Okamoto T, Okuzaki D, Matsuura Y. Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
  6. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森保、松浦 善治、HCV感染により誘導されるオートファジーの性状、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
  7. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
  8. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
  9. 山本聡美、福原崇介、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、B型肝炎ウイルスの増殖に関わる宿主因子の解析、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。





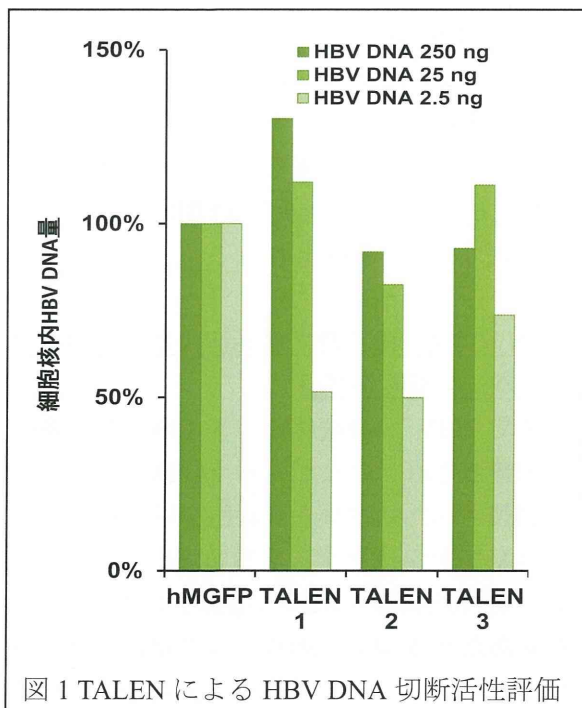
経日的に回収し、HBV DNA 量を定量的 PCR で測定した。HBV DNA 量が一定値に達し、持続感染化していることを確認した。更に、HBV 持続感染初代ヒト肝細胞に TALEN あるいは CRISPR/Cas9 発現プラスミドを導入して HBV cccDNA 切断活性を検討した。

### C. 研究結果

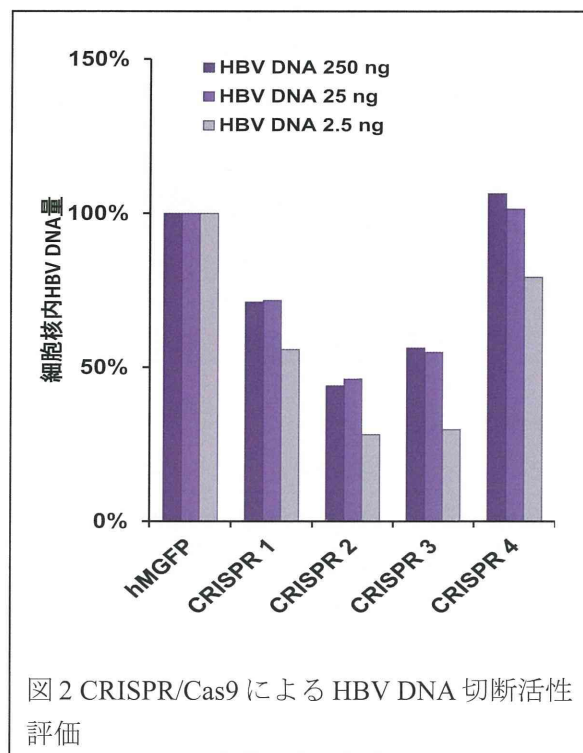
#### 1) HBV DNA 標的人工制限酵素の設計

作製した三種の TALEN の切断活性は、酵母を用いた single strand annealing アッセイによる Lac Z の発現効率により評価した。これら TALEN の切断活性は、それぞれ 0.69、0.87、0.55 であり、いずれも良好な切断活性（0.45 以上が良好）であった。

そこで、培養細胞での TALEN による HBV DNA の切断活性を検討する目的で、HEK293T 細胞へ HBV DNA と共に TALEN 発現プラスミドをコトランスフェクションした。72 時間後に低張液を用いて採取した細胞核分画から DNA を抽出し、TALEN による切断想定部位の外側に設計したプライマーを用いて定量的 PCR を行った。HBV DNA 2.5ng 導入細胞において、陰性コントロールである hMGFP をコトランスフェクションした場合の細胞核内 HBV DNA 量を 100%とした時に、TALEN-1 及び 2 は、PCR の鋳型となり得る細胞核内 HBV DNA 量を 50%程度にまで低下させることができた（図 1）。



更に、同様の評価系を用いて、CRISPR/Cas9 による HBV DNA 切断活性を測定した所、ポリメラーゼ遺伝子領域、及び X 蛋白質遺伝子領域に設計した CRISPR/Cas9-2 及び 3 は、陰性コントロールに比べて、HBV DNA 量を 30%程度にまで減少させることができた（図 2）。



#### 2) TALEN による HBV 持続感染初代ヒト肝細胞での HBV DNA 切断活性評価

HBV 持続感染培養細胞の樹立に関しては、HBV を感染させた初代ヒト肝細胞は、遺伝子型 A、B、C のいずれ感染においても 50 日以上に持続感染化が確認され、 $1 \times 10^6$  コピー/mL 以上の HBV DNA が培養上清中に放出されていることが判明した。この時、肝細胞の約 80% が HBV に感染していることを免疫組織化学的染色によって確認できた。また、遺伝子型 C について、細胞内の HBV DNA 量を測定した所、全 HBV DNA 量としては、約  $1 \times 10^6$  コピー/ $\mu$ g DNA、cccDNA は、約  $1 \times 10^4$  コピー/ $\mu$ g DNA 存在していた。

この HBV 持続感染初代ヒト肝細胞培養系を用いて、TALEN による HBV cccDNA 切断活性を検討した。遺伝子型 C の HBV を感染させてから 25 日後の初代肝細胞にコア蛋白質遺伝子領域に設計した

TALEN-1 をトランスフェクションし、更に 7 日間培養した後、細胞から DNA を抽出し、cccDNA 量を測定した。導入した TALEN 量に依存して cccDNA 量は低下し、1.0ug の TALEN-1 導入細胞では、検出限界付近にまで低下させられることができた(図3)。

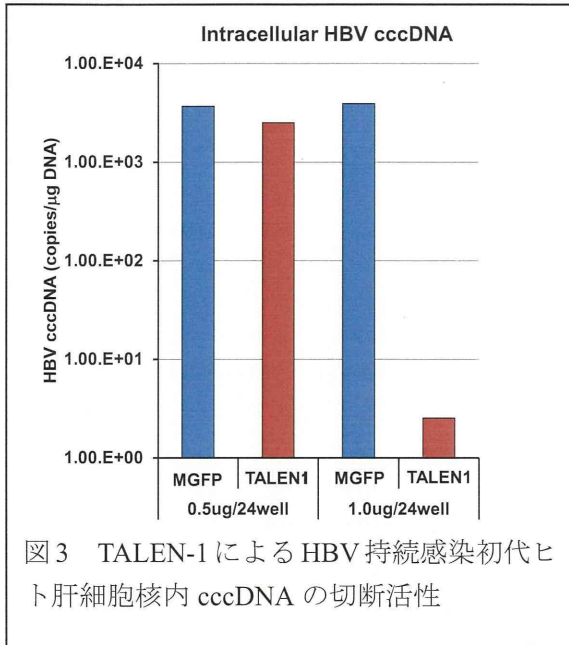


図3 TALEN-1によるHBV持続感染初代ヒト肝細胞核内cccDNAの切断活性

#### D. 考察

肝細胞核内に持続的に存在する HBV cccDNA を分解・不活化する手段として、人工制限酵素を用いた治療効果が最も有力な治療法の一つであると考えられる。既に我々は、高効率に肝細胞核内に存在する HBV DNA を分解・不活化できる人工制限酵素として、TALEN 2 種、CRISPR/Cas9 3 種を取得する事ができた。更に、これら人工制限酵素は、種々の HBV 遺伝子型を超えて高度に補存された領域に設計されている為、いずれの遺伝子型 HBV DNA に対しても高効率に切断活性を示す事が期待される。

今後は、*in vitro* だけでなく *in vivo* においても、高効率に肝細胞内に遺伝子導入できる DDS の開発が必要となる。これに関しても我々は、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) 又は、アデノ随伴性ウイルスを用いた DDS の開発に着手している。MEND に含有させた蛍光色素発現プラスミドを用いて、マウス肝臓への導入を検討した結果、大部分の肝実質細胞内での発現を確認でき

た。現在、更に発現量を上げるための条件設定を検討中である。

また、アデノ随伴ウイルス血清型 8 をベクターとした遺伝子導入法についても、AAV-8/hrGFP により 90%以上初代ヒト肝培養細胞への導入に成功している。今後は、AAV-8/TALEN を作製し、HBV 持続感染初代ヒト肝細胞での核内 HBV DNA の分解・不活化の評価を進める予定である。更に、これらの結果をもとに HBV 持続感染ヒト肝臓キメラマウスでの治療効果の検討へと展開していきたいと考えている。

#### E. 結論

既存の逆転写阻害剤では、肝細胞核内にある HBV DNA を排除する事が出来ないため、発症した慢性 B 型感染患者は、薬を服用し続ける必要があり、経済的負担にもつながる。一方、本研究で開発を進めている人工制限酵素と現在検討を進めている DDS を組み合わせる事で、肝細胞核内に存在する HBV を高効率に分解・不活化できる可能性があり、より効率的な治療法の確立につながる。

#### F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

# 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした 肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：片岡一則 東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科

研究要旨：本研究は、肝臓へ効率的に mRNA を導入するシステムの開発を目的とする。mRNA は生体内で酵素分解を受けやすく、その *in vivo* 導入では適切なキャリアを用いた mRNA の保護が必要である。キャリアの候補として、独自に開発した表面が PEG で覆われたナノミセルのほか、カチオン性ポリマー・脂質に基づくキャリアが挙げられた。そこで、毒性や導入効率の観点でそれぞれの機能の比較を行ったところ、ナノミセルが最も優れたシステムであることが分かった。一方で、ナノミセルを用いた導入でも、一過性ながら mRNA の免疫原性に起因する炎症反応が惹起された。これに対して、mRNA のヌクレオシド修飾を試みたところ、炎症反応が軽減され、さらに導入 mRNA 発現の持続性が向上した。ナノミセルを用いた修飾 mRNA 導入は、B 型肝炎治療に対する遺伝子導入法として有望である。

## A. 研究目的

本研究は、人工キメラ遺伝子を肝臓へ導入し肝臓内の HBV のゲノム DNA を不活性化することで、B 型肝炎の治療を目指すものである。当研究室では、高効率かつ安全な肝臓への遺伝子導入に向けたデリバリー技術の開発を行っている。従来の遺伝子デリバリーでは核酸種として主にプラスミド DNA (pDNA) が用いられていたが、ランダムに宿主細胞ゲノムへ挿入されゲノムの変異を誘発する、さらに挿入された pDNA からの発現の制御が困難になるといった安全面での問題から臨床応用が難しい。そこで、本研究ではこのような危険性のない mRNA の導入を検討している。

しかし、mRNA には生体内でヌクレアーゼにより急速な分解を受けるという問題があり、これまでに *in vivo* で効果的な導入に成功した報告はほとんどない。そこで、我々独自に開発した高分子ナノミセルに mRNA を内包させることでこの問題の解決を目指した。このナノミセルは表面が生体適合性ポリマー、ポリエチレングリコール(PEG) で覆われ、中心部分に凝縮した mRNA を持つ構造をしており、生理的環境下でも安定に存在し、かつ異物認識を受けにくいといった特徴を持つため、pDNA や siRNA の *in vivo* デリバリーにおいて高い機能を持つことが分かっている。

前年度、ルシフェラーゼ発現 mRNA を用いた肝臓への *in vivo* デリバリーの実験において、ナノミセルを用いることで生体内での mRNA の分解が効果的に抑制されること、結果的に mRNA を単体で

導入した場合(naked mRNA)と比べて肝臓において 10~100 倍効率的なルシフェラーゼ発現が得られることを見いだした。従って、*in vivo* mRNA 導入では何らかのキャリアで mRNA を保護することが重要であることが明らかとなった。

一方で、このようなキャリアの候補として、ナノミセル以外にもカチオン性ポリマー・脂質を用いたシステムが報告されている。そこで、本年度、これら他のシステムとの比較検討を行った。

また、前年度の研究で、ナノミセルを用いた mRNA 導入の際、肝臓において一過性であるものの一定の炎症反応を認めた。これは、mRNA が、Toll 様受容体(TLR)や RIG-1 といった自然免疫系の認識を受けたためと想定された。これに対して、mRNA のシトシン(C)とウラシル(U)の一部を 5 メチル(5m)C、2 チオ(2t)U、シュード( $\psi$ )U といった修飾ヌクレオシドで置換することで、mRNA の免疫原性を軽減できるという報告がある (*Nat Biotechnol.* 2011;29:154)。そこで、今回、このような修飾 mRNA を用いた mRNA 導入についても合わせて検討した。

## B. 研究方法

### 1) 修飾 mRNA の調製

mRNA は *in vitro* 転写により合成されるが、その際、反応液に上記の修飾ヌクレオシドを添加することで、全 C, U に対して 20%の 5mC, 10%の 2tU, 10%の  $\psi$ U を含む mRNA を作製した。

### 2) 高分子ナノミセルの調製

PEG とポリカチオンからなるブロック共重合体 (PEG-PAsp(DET), ChemMedChem. 2006;1:439) と mRNA を混合することで、粒径約 50 nm の高分子ナノミセルを調製した。

3) ハイドロダイナミクス法による肝臓への mRNA の導入

ナノミセル溶液 1.8 ml をマウス尾静脈より 5 秒間で投与した。この方法では肝臓の静水圧が急激に上昇することで、肝臓の細胞に対して高効率に核酸が取り込まれる。

### C. 研究結果

#### 1) 修飾 mRNA を用いた際の炎症反応

まず、ナノミセルを用いた mRNA 導入に伴う肝臓での炎症反応と、それに対するヌクレオシド修飾の影響を、投与 4 時間後の肝臓における炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$ )と 1 型インターフェロン(IFN- $\beta$ )の産生量を指標に定量 PCR 法にて測定した。いずれの値も、ヌクレオシド修飾により有意に軽減していた(図 1)。

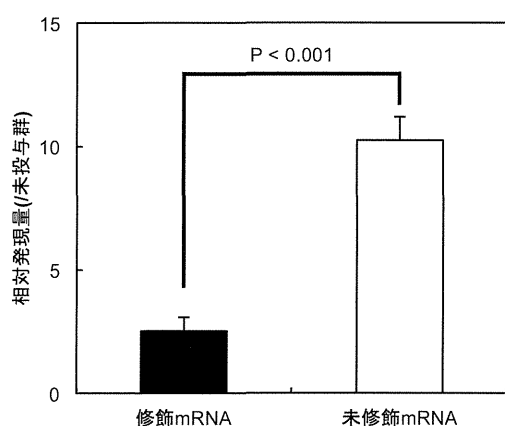


図 1 ナノミセル導入後の肝臓におけるインターロイキン(IL)-6 の産生(4 時間後、定量 PCR)

#### 2) 修飾 mRNA を用いた際のタンパク質発現効率

続いて、導入 mRNA からのタンパク質発現効率に対するヌクレオシド修飾の影響を、ルシフェラーゼをレポーターとして評価した。すると未修飾 mRNA では発現の持続期間は高々 2 日程度であったのに対して、修飾 mRNA では 4 日程度まで延長した(図 2)。

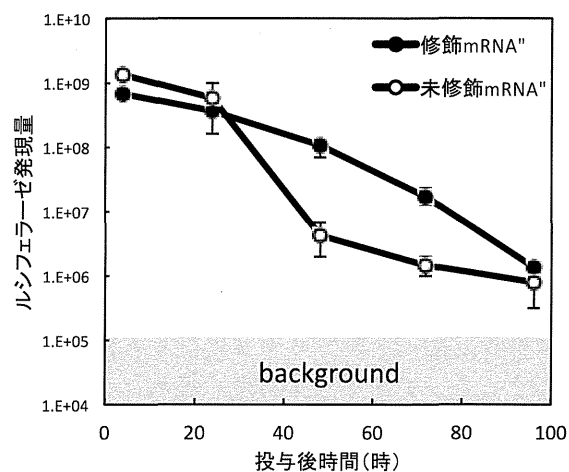


図 2 ナノミセル導入後の肝臓におけるルシフェラーゼの発現量

さらに、このような修飾 mRNA を用いて造血因子エリスロポエチンを導入したところ、投与後 2 か月にわたって未投与群と比べ有意な造血作用が観察された。

#### 3) 他の mRNA 導入システムとの比較

続いて、修飾 mRNA を用いて、ナノミセルと他の mRNA 導入システムとの比較を行った。肝臓でのルシフェラーゼ発現効率を、PEG を持たない PAsp(DET)ポリカチオンや、汎用されている試薬である linear polyethyleneimine (LPEI)、lipofectamine と比較したところ、ナノミセル群では他の群と比較して、数倍~10 倍程度高い発現を示した。さらに肝臓における IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  産生を調べたところ、ナノミセル群では他の群と比較して有意に炎症反応が軽度であった。

### D. 考察

前年度の研究ではナノミセルを用いることで肝臓に対して効率的に mRNA を導入できることを見いだした。本年度の研究では、本システムの改良とともに、機能発現メカニズムの解析に取り組んだ。まず修飾ヌクレオシドを用いることで、肝臓への mRNA 導入に伴う炎症反応を軽減させることに成功した。さらに、修飾 mRNA を用いることで、mRNA の発現期間が有意に延長した。これは、炎症が軽度であったため、mRNA が導入された細胞の機能が良好に維持されたことが原因と考えられた。