

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

TALEを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発

研究分担者 山本 卓 広島大学大学院理学研究科 教授

研究要旨：

本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）の増殖を抑制するシステムを確立するために、HBVに結合する人工タンパク質TALEおよびHBVゲノムを切断するTALENおよびCRISPRシステムを設計・合成し、HBVの増殖に対する影響を調べた。その結果、CRISPR/CasシステムによってHBVの増殖を強く抑制する効果が確認された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）の共有結合性閉環状型DNA（cccDNA）は肝細胞の核内に存在し、ウイルス増殖の際の複製中間体として働く。抗ウイルス薬投与後もcccDNAは肝細胞に残存することから、このDNAの完全除去が完全治療につながると考えられる。そこで本研究では、cccDNAを標的として結合あるいは切断する人工タンパク質やCRISPR/Casシステムを設計・作製し、肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用について検討することを目的とする。

B. 研究方法

HBVのコアプロモーター領域の転写調節因子FTFやHNF4の結合するTALEタンパク質およびHBVのコアタンパク質を切断する人工酵素TALENの作製し、HepG2細胞におけるHBVの増殖抑制効果について調べた。さらに、HBVのコアタンパク質を標的とするCRISPR/

Casシステムを構築し、HBVの増殖抑制効果を調べた。

C. 研究結果

TALEタンパク質およびTALENを用いて、HepG2細胞でのHBVの増殖に与える効果を調べたが、有意な抑制効果は確認できなかった。これに対して、CRISPR/Casシステムを用いた場合、コントロールのHBV量を1/5程度に低下させることが示された。

D. 考察

昨年、海外の複数のグループからTALENを用いたHBVの増殖抑制効果について報告された。今回我々の行ったTALEやTALENの実験では、明確な抑制効果は見られなかったが、作製したTALEやTALENがゲルシフト解析および培養細胞での評価において高い活性を示していることから、条件検討によって抑制効果を改善できると考えている。しかし

ながら、HBVの多型性を考慮すると、複数の標的配列をTALENによって同時に切断することが必要と考えられる。この点では、TALEやTALENよりCRISPR/Casシステムの方がHBV破壊に適していると思われる。

今年度の研究によってCRISPR/Casシステムを用いたHBVの増殖抑制が可能であることを示した。しかしながら、CRISPR/Casシステムには、類似配列へ変異を導入するoff-target効果が知られており、より安全性の高いシステムの利用が必要である。

E. 結論

CRISPR/CasシステムによってHBVの増殖を抑制する効果を確認した。今後は、off-target効果を抑えるDouble nickase型のCasを用いて、同時にHBVの複数個所を切断するシステムの確立を目指す。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions, *Genes Cells*, 2014, in press
- 2)Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base -pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS

(MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1461-1466

3)Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim*, 2014, 63: 79-84

4) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3379

5)Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications. *Genes Cells*,2013, *Genes Cells*, 18: 315-326

2. 学会発表

- 1)山本 卓、Platinum TALENの開発と様々な動物におけるゲノム編集、理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」、つくば、2013
- 2)Yamamoto T, Targeted genome editing using highly-active TALENs、京都大学iPS研究所セミナー、京都、2013
- 3)Sakuma T, Woltjen K, Hosoi S, Suzuki K, Kawahara A, Okada Y, Ochiai H, Matsuura S and Yamamoto T, Improved TALEN construction and evaluation methods for animal and human cell applications, Genome Engineering-Research & Applications, Italy, 2013

4) Sakuma T and Yamamoto T, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Matsue, 2013

5) 山本 卓, 鈴木賢一、相田知海、田中光一、佐久間哲史、高活性型TALENを用いたゲノム編集、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013

6) 李 紅梅, 藤本直子, 笹川典子, 白井紗矢, 山本 卓, Woltjen Knut, 櫻井英俊, 山中伸弥, 堀田秋津. TALENやCRISPR/Cas9を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞のゲノム手術、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013

7) 山本 卓, 高活性型TALENの開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変、第65回日本生物工学会シンポジウム「次世代植物バイオテクノロジー」、広島、2013

8) 山本 卓, ゲノム編集技術を利用した培養細胞および動物個体での標的遺伝子改変、奈良県立医科大学講演会、橿原、2013

9) 山本 卓, ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発、平成25年度広島バイオフィォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」、広島、2013

10) 山本 卓, ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、第15回京都市心血管代謝セミナー、京都、2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1) PPRモチーフを利用したDNA結合性タンパク質の設計方法及びその利用、特願2013-88940

2) ヌクレアーゼを発現させるためのベクターおよびベクターセット、ならびに変異を受けた細胞の取得方法、特願2013-098724

3) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、特願2013-166768

4) 核酸挿入用ベクター、特願2013-2303