

201423038A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成27(2015)年3月

\*\*\*\*\* 目 次 \*\*\*\*\*

I. 総括研究報告書	
研究代表者：溝上 雅史 .....	1
II. 分担研究報告書	
1. 研究分担者：杉山 真也 .....	7
2. 研究分担者：福原 崇介 .....	11
3. 研究分担者：安井 文彦 .....	15
4. 研究分担者：片岡 一則 .....	19
5. 研究分担者：中西 真 .....	25
6. 研究分担者：星野 真一 .....	29
7. 研究分担者：武富 紹信 .....	33
8. 研究分担者：田中 榮司 .....	37
III. 研究成果の刊行一覧 .....	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	51

# 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

所属先：国立国際医療研究センター

研究要旨：本年度では、人工キメラ遺伝子の in vivo 系での最適化を進め、切断活性に比例して反応を得られる定量法を開発した。レポーター系と蛍光遺伝子系での定量系を開発したため、マウス個体を活かしたまま切断活性をモニターできるようになった。輸送担体の開発においては、人工塩基を導入した RNA を合成することで、マウスにおいても目的のタンパク質の持続的な翻訳亢進と免疫機構の惹起を抑制することに成功した。輸送分子の安定化については、人工 RNA の分解機構が通常の mRNA とは異なることを明らかにすることができ、投与する RNA を加工する際の知見を得た。一方で、人工キメラ遺伝子の副作用を評価すると、マウスへ投与した際には、非特異的な切断活性が極めて低いことが全ゲノムシーケンスから明らかとなった。また、細胞生物学的な側面からは、ヒト初代培養肝細胞にくわえて、マウスにおいても DNA 切断活性が上昇していないことを確認した。肝切除組織を用いた臨床検体の利用法を開発する点では、培地を工夫することで 20 週超の培養を可能とし、臨床組織から培養へ持ち込む際の最適条件を検討した。臨床試験に向けた検査マーカーの検討では、従来法の 50 倍の感度を目指した系の開発を進めた。その結果、従来法で陰性であった 92% で陽性を持続的に確認することができ、その臨床的有用性について今後の検討を進めることとした。以上から、当初の計画にそって成果を上げることができているため、来年度以降についてもヒト化マウスモデルでのさらなる検討と臨床的な検査手法の改良を進めていく。

### A. 研究目的

本研究班は、B 型肝炎ウイルスの完全排除を目指した治療法の開発を目的としている。HBV は、感染が成立するとそのゲノムを肝細胞核内に留める。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、細胞から排除されることは期待できない。治療法としては、核酸アナログ製剤が一般的であるが、ウイルス複製を抑制するのみであり、排除するものではない。

我々は、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。研究チームとしては、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(武富紹信)、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(Zinc Finger Nuclease(ZFN)、TALE Nuclease(TALEN)、

CRISPR/Cas9) の最適化と切断活性の評価を実施した。人工キメラ遺伝子の切断活性を定量的に評価する系として、レポーター遺伝子を用いた系を開発した。

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)

RNA の安定化を目的として、5 メチル (5m)C、シュード(ψ)U といった修飾塩基を反応液に添加することで、それらの修飾塩基を含む mRNA を調製した。mRNA もしくは pDNA を 10 μg 含むナノデバイス溶液 1.8 ml を、Balb/c マウス(♀、8 週齢)の尾静脈より 5 秒間で投与した (ハイドロダイナミクス法)。切断活性を可視化する GFP 遺伝子発現型の pDNA (pEGxxFP)を用いて、切断活性の評価を行った

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)

T7 RNA ポリメラーゼで人工合成 mRNA を合成した。EGFP-ORF の 3'非翻訳領域(3'UTR)には、beta-globin mRNA の安定化シス配列を導入した。また高感度で発現タンパク質を検出するために 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。また、5'末端にはアンチリバースキャップアナログを付加した。

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)

ヒト正常線維芽細胞およびヒト初代培養肝細胞に、人工キメラ遺伝子を導入した後起こる、DNA 損傷応答活性化についてウェスタンブロット法、および免疫染色法にて解析した。また、HBV 遺伝子挿入トランスジェニックマウスの DNA 損傷応答活性化について解析した。

人工キメラ遺伝子がヒトゲノムを非特異的に切断するか否かを高速シーケンサーで解析した。

5) ex vivo 系の開発をするグループ (武富紹信)

ヒト切除肝からの初代培養条件の検討をした。肝断面の門脈断端から血液を wash out 後に、コラゲナーゼ灌流、コラゲナーゼ・プロナーゼ消化、濾過、低速遠心を繰り返して肝細胞 rich な細胞懸濁液を得た。分散された懸濁液をメッシュ濾過し (大ききで選別)、遠心 (90~350 x g)を繰り返して、各フラクションを培養した。同様の検討をラット肝臓でも行った。

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)

HBs 抗原の高感度測定法の開発を進めた。今回開発中の超高感度 (SHQ) 法は高感度 (HQ) 法の改良型であり、0.001 IU/ml の感度を目標とした。HQ 法と SHQ 法では、検体の前処理に界面活性剤を用いて HBV 関連粒子の脂質二重膜を破壊する。SHQ では HQ に比べ使用する抗体の種類が多くなっている。SHQ 測定系の臨床的意義の検討では、通常の HBs 抗原測定系にて HBs 抗原が消失した 25 例を対象とした。HBs 抗原消失からの観察期間の中央値は 77 ヶ月で、最長 148 ヶ月であった。HBs 抗原の測定は保存血清を用いて測定し、通常法、HQ 法、SHQ 法の 3 種類の測定系を比較検討した。

## 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)

酵母を用いたアッセイによる Lac Z の発現効率により評価した 3 種の 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) であった事が確認できた。CRISPR 系では、Cas9 およびガイド RNA を発現させることで、HBV 感染を抑制するのみならず、Integrate したゲノムを破壊することができることが明らかになった。また、

Nickase とガイド RNA を発現させることで、Cas9 と同等の抗 HBV 活性を示すことが明らかになった。

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)

5mC mRNA 及び 5mC +  $\psi$ U mRNA で高い mRNA 導入効率を示した。更に、投与 4 時間後の肝臓での炎症性分子の産生を定量 PCR 法にて調べたところ、5mC +  $\psi$ U mRNA で最も効果的に炎症反応が制御されていた。これらの切断効率をマウスで調べたところ、pEGxxFP と ZFN 発現 mRNA をナノデバイスを用いて導入した群で、肝組織中の広い領域において GFP 発現細胞が観られた。

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)

細胞内 mRNA と同様に翻訳阻害剤シクロヘキシミドによって安定化が観察され、翻訳依存的に分解された。細胞内 mRNA と異なり、ポリ A 鎖分解が観察されず、ポリ A 鎖長によって安定性が影響をうけなかった。すなわち、ポリ A 鎖非依的に分解された。細胞内 mRNA においてはマイナーな 3' -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安定化が観察された。

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)

ヒト正常線維芽細胞に人工キメラ遺伝子を導入しても、DNA 損傷応答機構の活性化は見られなかった。またヒト初代培養肝細胞を用いた実験では、HBV 遺伝子挿入細胞においても人工キメラ遺伝子導入による DNA 損傷応答活性化は認められなかった。

全ゲノムシーケンスによって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。初代培養肝細胞を用いて、人工キメラ遺伝子を導入した細胞の配列をコントロールと比較したが、非特異的な欠損

変異は見つからなかった。

5) ex vivo 系の開発をするグループ (武富紹信)

[初代培養の成否]

合計 7 例の細胞分離、培養を行い、5 例で生細胞を分離、培養、維持することに成功した。手術中の血管遮断開始から摘出までが 2 時間を越えた症例では生細胞を得ることはできなかった。

[初代培養細胞の性質]

In house の培養液によって細胞を 20 週以上に渡って維持し得た。培養中には線維芽細胞とともに数種類の細胞が増殖した。線維芽細胞の増殖抑制下で 2 週以上培養すると、小型の細胞 (30-40  $\mu$ m) が旺盛に増殖した。線維芽細胞に囲まれた小型細胞を除去すると、速やかに大型 (80-120  $\mu$ m) で不均一な細胞で埋められた。

[初代培養細胞の凍結保存、再融解、再培養]

前記の小型細胞、線維芽細胞は凍結保存後に再融解し、培養することが可能であった。同様の所見はラット初代培養でも観察された。

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)

3 種類の HBs 抗原測定法を行うことによって、HBs 抗原消失時期別パターンが見られた。パターン 1 は従来法、HQ 法、SHQ 法で同時に消失した症例で 2 例 (8%) にみられた。パターン 2 は、従来法で最初に消失し、その後 HQ 法と SHQ 法で同時に消失した症例で 7 例 (28%) にみられた。パターン 3 は、従来法、HQ 法、SHQ 法の順で消失した症例で 7 例 (28%) にみられた。パターン 4 は、従来法と HQ 法が同時に消失し、その後 SHQ 法が消失した症例で 9 例 (28%) にみられた。SHQ 法は従来法に比較して 92% の患者で長期の検出が可能であった。同様に、HQ 法との比較では 64% の患者でより優れていた。



#### D. 考察

人工キメラ遺伝子の開発と最適化では、ZFN、TALEN、CRISPR 各種において効果的な分子を選択でき、切断活性の評価においても、蛍光分子とレポーター遺伝子を用いた系の二種類を準備出来た。これにより、今後動物実験の際に生きたままのイメージングを可能とするだけでなく、簡便なスクリーニング法として有用である。

輸送担体の開発の面では、修飾ヌクレオシドを利用することで、マウスにおいても肝臓への mRNA 導入に伴う免疫反応を減弱させることを確認した。また、修飾 mRNA はタンパク翻訳の期間を有意に延長した。マウス肝組織における GFP 切断活性の評価でも高い値を確認でき、輸送と切断がうまく融合できたと考えられる。

輸送核酸の安定化については、人工合成 mRNA においても翻訳依存性がみられ、翻訳中のリボソームに eRF1-eRF3 と相同な GTPBP1/2-Dom34 が結合し、エンドヌクレアーゼと共にエキソソーム-Ski 複合体をリクルートすることで分解が進行すると考えられた。

DNA 損傷応答については、人工キメラ遺伝子導入による副作用、とりわけ DNA 二重鎖切断の非特異的導入については、ヒト正常線維芽細胞、ヒト初代培養肝細胞、および HBV 遺伝子導入トランスジェニックマウス肝臓組織において見られなかった。

ヒト切除肝臓からの初代培養の成否は血管遮断 (温阻血) 時間が比較的短いことが重要であった。そのため、肝外側区切除症例が適切と考えられた。また、安定的に多数の細胞を回収するためには、摘出肝の障害を軽減するための工夫が必要である。実際、分離作業に入る前に、肝冷保存あるいは灌流保存用の液を細胞洗浄に使用すると、生細胞の回収率が向上することが示唆された。

臨床面では、HQ 法と SHQ 法を比較し新規測定法の検討を進めた。従来法に比較し HQ 法が長期検出の観点で優れていたのは 56%と半数以上であった。従来法と SHQ 法との比較では、92%とほとんどの症例で SHQ 法の方がより長期の検出が可能であった。HQ 法と SHQ 法の比較では SHQ 法の方が 64%で優れていた。以上の結果から、SHQ 法は微量の HBs 抗原の検出に優れていること、さらに HBs 抗体の存在下においても検出可能であることから、HBV cccDNA を破壊する新薬の効果判定に有用である可能性が示唆された。

#### E. 結論

本年度に各分担者の目標としていた進捗を得ることが出来た。来年度以降も計画した研究開発を進め、非特異的な反応を抑制し、標的切断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) Ifuku H, Kusumoto S, Tanaka Y, Totani H, Ishida T, Okada M, Murakami S, **Mizokami M**, Ueda R, Iida S. Fatal reactivation of hepatitis B virus infection in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatology Res*. 2015
- (2) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, **Mizokami M**, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide

(NTCP). *Hepatology*. 2014

May;59(5):1726-37.

- (3) Kusumoto S, Tanaka Y, **Mizokami M**,  
Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B  
reactivation in patients with resolved  
hepatitis B virus infection after  
rituximab-containing chemotherapy.  
*Hepatology*. 2014 Aug;60(2):765-6.

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



## Ⅱ. 分担研究報告書

## 核内 HBV ゲノムとホストゲノム解析

研究分担者：杉山 真也 所属先：国立国際医療研究センター

研究要旨：昨年度までに合成し最適化してきた人工キメラ遺伝子を野生型マウスへ投与した。マウスでの人工キメラ遺伝子の発現と切断活性を確認した。今回使用した人工キメラ遺伝子のいずれの量でもマウスへの毒性は認められなかった。野生型マウスの肝組織から得られたゲノム DNA を次世代シーケンサーによって全ゲノム解析を実施したところ、人工キメラ遺伝子の非特異的な作用と考えられる欠損変異は認めなかった。HBV トランスジェニックマウスへも同様に人工キメラ遺伝子を投与し、HBV ゲノムの切断をシーケンスで確認したところ、欠損変異が生じた HBV ゲノム配列を確認することができた。続いて、ミセル化した人工キメラ遺伝子の RNA の投与を行った。ミセル分子の毒性を確認するために、様々な量のミセル分子の投与を行ったが、いずれのミセル量でも肝障害を認めることはなかった。人工キメラ遺伝子の切断活性を定量的に評価するために、レポーター遺伝子を用いた系の開発を行った。ルシフェラーゼ遺伝子を利用して、切断が起きた際にレポーター活性が出る形とした。これにより、細胞株だけでなくマウス体内でもライブイメージングが可能となり、生体内での活性をリアルタイムに追うことが出来るようになった。

### A. 研究目的

昨年までに、*in vitro* での切断活性の向上を図ってきた。その成果を *in vivo* へ応用して、本年度では、人工キメラ遺伝子による HBV ゲノム切断の効率をマウスモデルで検証することを目的に研究を進めた。マウスモデルとしては、野生型マウスを用いた検討では、非特異的な切断や投与物質の毒性試験を実施した。この試験では、全ゲノムシーケンスを行うことで、マウスゲノムの非特異的な切断の有無を検討した。

また、HBV 遺伝子を有するトランスジェニックマウスを利用した検討では、染色体内にある HBV 遺伝子を切断できるか否かを検討した。この評価についても全ゲノムシーケンスを実施することで、人工キメラ遺伝子の特異的な切断の有無について検討した。

また、切断効率の簡便な評価系として、これまでの蛍光での評価系に加えて、レポーター遺伝子を用いた評価系の確立を行った。これにより、切断活性の定量的な評価が可能になると考えられる。

### B. 研究方法

人工キメラ遺伝子をマウスモデルへ投与するために、その DNA での投与を行った。また、分担研究者である片岡一則らのグループから、ドラッグデリバリー用のナノミセルを分与してもらった。その際の輸送分子としては、RNA を選択し、ナノミセルと RNA を混合することで RNA を内包するナノミセルを再構成した。これまでに合成した複数の人工キメラ遺伝子について、このナノミセルを作成し、マウスへ投与した。

マウスは、野生型と HBV 遺伝子をトランスジェニックしたマウスを用意した。それらのマウスへは、1、5、10、20 マイクログラムと量依存的に投与を行った。投与の 1-3 日で組織の回収を行い、肝臓への影響と切断効率を評価した。

人工キメラ遺伝子が投与された際の切断活性の評価では、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を実施した。人工キメラ遺伝子がヒトゲノムを切断したかあるか評価するために、剖検したマウス肝臓から抽出したゲノム DNA を解析した。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した。

切断効率の評価システムとしては、レポーター遺伝子を二分割し、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を作成した。それらのフラグメントの間に標的配列を挿入し、切断と修復が行われた際に、発光が生じる系とした。

### C. 研究結果

野生型マウスへ、人工キメラ遺伝子の各種 DNA を投与した。遺伝子の発現と切断活性を確認した。今回使用した人工キメラ遺伝子のいずれの量でもマウスへの毒性は認められなかった。野生型マウスの肝組織から得られたゲノム DNA を次世代シーケンサーによって全ゲノム解析を実施したが、人工キメラ遺伝子の作用とみられる欠損変異は認めなかった。

HBV トランスジェニックマウスへも同様に人工キメラ遺伝子の投与を行った。人工キメラ遺伝子の標的配列となる遺伝子があるため、その切断活性を次世代シーケンサーによって確認した。その結果、様々な長さの欠損変異が生じた HBV ゲノム配列を確認することができた。同様にこの HBV トランスジェニックマウスでも毒性を認めることはなかった。

続いて、ミセル化した人工キメラ遺伝子の RNA の投与を行った。ミセル分子の毒性を確認するために、先程と同様の遺伝子量を投与する形で、ミセル分子の投与を行った。その結果、いずれのマウスでもミセル投与に依る肝障害を認めることはなかった。

人工キメラ遺伝子の切断活性を定量的に評価するために、レポーター遺伝子を用いた系の開発を行った。ルシフェラーゼ遺伝子を利用して、オーバーラップした領域を持たせた二分割の遺伝子とした。その間に標的配列を挿入した。この遺伝子を細胞へ導入し、そこに人工キメラ遺伝子を投与したところ、量依存的に切断活性を確認できた。

### D. 考察

これまで、*in vitro* 培養系で切断活性を確認してきた人工キメラ遺伝子を活性を *in vivo* のマウスモデルでも確認できた。大量投与を行ってもマウスが死亡する例はないため、人工キメラ遺伝子の投与によってマウスが受けるダメージは少ないものと推察された。また、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施しても、非特異的な切断活性は認めなかった。これらのことから、人工キメラ遺伝子の特異的な切断活性があることと、毒性が低いことが示された。

レポーター系を開発したことで、人工キメラ遺伝子の切断活性を簡便にスクリーニングできるようになった。この技術は、この研究にかぎらず、今後の人工キメラ遺伝子の開発において有用なツールとなり得る。

### E. 結論

野生型マウスと HBV 遺伝子を持つトランスジェニックマウスにミセル会合させた人工キメラ遺伝子を投与し、*in vivo* での効果を確認した。ヒト肝細胞に人工キメラ遺伝子を投与し、非特異的切断の有無を全ゲノムシーケンスで確認した。人工キメラ遺伝子の切断活性を GFP や Luc で簡便にモニターするシステムを確立した。

### F. 研究発表(本研究に関わるもの)

#### 1. 論文発表

- (1) Okumura N, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, **Sugiyama M**, Mizokami M, Kato N. Negative regulation of hepatitis B virus replication by forkhead box protein A in human hepatoma cells. *FEBS Lett.* 2015 Apr 28;589(10):1112-8.
- (2) Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, Sisouk T, Phonekeo D, Sengkeopaseuth B, Som-Oulay V, Ishii K, Wakita T, **Sugiyama M**, Hachiya M. Chronic

- hepatitis B prevalence among children and mothers: results from a nationwide, population-based survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e88829.
- (3) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology*. 2014 May;59(5):1726-37.
2. 学会発表
- 国内
- (1) 「宿主因子を標的とした新規抗 B 型肝炎ウイルス製剤の開発と作用機序の解析」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第 50 回日本肝臓学会総会 シンポジウム ホテルニューオオタニ赤坂 2014 年 5 月 30 日 SY-2-15
- 国際
1. 「A novel genetic maker to improve the prediction of HCV spontaneous clearance: Polymorphisms consisting of (TA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat near IL28B gene」Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2014: 49th Annual Meeting of EASL in London, P-722 13th April 2014
2. 「Clinical Significance of Host Factors in Viral Hepatitis」Masashi Mizokami, Nao Nishida, and Masaya Sugiyama The 2nd International Symposium of Catholic University Liver Research Center Symposium 26<sup>th</sup> July 2014
3. Association of sphingolipid biosynthesis pathway as a novel therapeutic target for HBV replication. Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, Masayuki Sudoh, and Masashi Mizokami. Poster P-159, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep 4 2014, Los Angeles
4. Incidence of HBV infection in MSM cohort in Ulaanbaatar and new therapies for hepatitis B and C. Masaya Sugiyama Oral-4, Japan-Mongolia Collaborative Study for HIV and Hepatitis in MSM in Mongolia. October 23rd, 2014. Ulaanbaatar
5. Association between (TA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat near IL28B gene and HCV spontaneous clearance. Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramane, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Tatsuya Kanto, Jun Hayashi, David L Thomas and Masashi Mizokami. Poster P-1464 The 65<sup>th</sup> Annual Meeting of the AASLD Nov 10<sup>th</sup> 2014 Boston
- 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

## HBV 感染を標的とした CRISPR/Cas9 系の確立

研究分担者：福原崇介 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野

### 研究要旨：

B型肝炎の根治には、核内の cccDNA の排除が重要であり、cccDNA 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 を特異的に切断できる技術として、人工ヌクレアーゼや CRISPR/Cas9 システムが開発された。これまでに、HBV ゲノム内で保存されている領域に CRISPR/Cas9 を設計し、HBV ゲノムを切断し、HBV の感染性を抑制しうることを 1.28 倍長の HBV ゲノムを細胞内に導入する系で示してきた。今回、CRISPR/Cas9 による抗 HBV 効果を HBV ゲノムが Integration している HepG2.2.15 および NTCP 発現 HepG2 細胞に対する感染の系を用いて検討した。HBV ゲノムを標的とした CRISPR/Cas9 は HBV 感染を阻害するのみならず、Integrate された HBV ゲノムも破壊しうる事が明らかになった。さらに、Off target を軽減する目的で、Cas9 の代わりに Nickase を用いたところ、HBV ゲノムの 1 本鎖のみに切断が生じるだけで、HBV 複製を強く抑制できることが明らかになった。以上のことから、CRISPR/Cas9 または Nickase システムが B 型肝炎治療の新規候補に成りうる可能性が示唆された。

### 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 (Integrate) された HBV ゲノムを除去できないことから根治は困難である。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 を切断しうる革新的な技術として、人工ヌクレアーゼである ZFN や TALEN または 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し、新たな治療法開発の可能性があるかを明らかにする。

### 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。また、Cas9 および Nickase の発現系をプラスミド導入の系やレンチウイルスベクターの系で構築した。

Cas9 や Nickase の発現に伴う細胞毒性を MTT アッセイにより検討した。HBV の感染系として、hNTCP を安定的に発現する HepG2/NTCP-C4 を用い、HBV 粒子はテトラサイクリンを除去した HepAD38 細胞の上清より得て、PEG により濃縮したものをを用いた。感染後、10 日後に HBc の発現を Western Blotting にて、rcDNA 量をリアルタイム PCR 法により評価した。また、HBV ゲノム複製を評価する系としては、1.28 倍長のプラスミドを細胞内に導入することで検討し、Integrate した HBV ゲノムの評価は、HepG2.2.15 細胞を用いた。Integrate したゲノムに変異が導入されているかを、Surveyor assay および Direct Sequence により評価した。

### C. 研究結果

まず、HepG2 および Huh7 において Cas9 または Nickase を発現させたところ、MTT アッセイによる細胞毒性は ZFN や TALEN を発現させた時と有意な差は認められなかった。次に、

設計したガイドRNAを用いたCRISPR/Cas9系にHBVゲノムの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が効率良くHBV-DNAを切断可能であることを確認した。Cas9およびガイドRNAを発現することにより、1.28倍長のHBVゲノムをコードするプラスミド由来のHBV-DNAの複製を有意に抑制することができた。また、同様にHepG2/NTCP-C4細胞に対するHBV感染の系やHepG2.2.15細胞内のHBVの複製も有意に抑制した。また、HepG2.2.15細胞にIntegrateしたHBVゲノムの変異導入効率を検討した。Surveyor assayにより、Cas9およびガイドRNAを導入した細胞でのみ標的部局周辺に変異が導入されていることが示され、Direct Sequenceを用いた検討により、16%のゲノムで変異が導入されていることが明らかになった。続いて、Nickaseの有効性を検討した。NickaseとガイドRNAを発現させても、HepG2.2.15細胞において、IntegrateされたHBVゲノムには変異が導入されなかったが、2本鎖両方にNickが挿入できるようにガイドRNAを設計し、発現させると変異が導入された。NickaseとガイドRNAの発現によるHBV複製抑制効果を検討したところ、HBVゲノムの片側の1本鎖にNickが入るだけで、HBV複製が有意に抑制され、その効果はCas9の発現時と同等であることが明らかになった。

以上のことから、Cas9およびガイドRNAを発現させることで、IntegrateしたゲノムおよびcccDNAを標的としてHBV感染を抑制するのみならず、Integrateしたゲノムを破壊することができることが明らかになった。また、NickaseとガイドRNAを発現させることで、Cas9と同等の抗HBV活性を示すことが明らかになった。また、その際のガイドRNAを工夫すればIntegrateしたゲノムに変異を導入することも可能であることが示唆された。

#### D. 考察

本研究により、CRISPR/Cas9またはNickase

の系がHBVの複製を根本から抑制しうる可能性が示唆された。しかし、ZFNやTALENを含めて、Cas9やNickaseもOff Targetに伴う染色体への変異導入の可能性はある。Nickaseは他の3者と比較し、ゲノムを切断する活性がないことから、Off Targetの影響は少ないと考えられるが、次世代シーケンサーによる詳細な解析を今後行う必要がある。また、これまでは主にIn vitroによる検討を行ってきたため、今後はIn vivoにおける有効性を検討する必要がある。我々は、これまでにHBVゲノムをハイドロダイナミック法でマウスに接種することで、HBVゲノムの複製を評価する系を他の検討で行ってきた。今後はこの系におけるCRISPR/Cas9およびNickaseの有用性を検討する予定である。

#### E. 結論

CRISPR/Cas9系またはNickaseの系によって、HBVの複製を抑制できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表(本研究に関わるもの)

##### 1. 論文発表

1. [Fukuhara T](#), Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

##### 2. 学会発表

1. [Takasuke Fukuhara](#), Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, [Takasuke Fukuhara](#), Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual

- Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
  4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし



## HBV cccDNA を標的とした治療法の開発

研究分担者：安井 文彦 所属先 公益財団法人 東京都医学総合研究所

研究協力者：山本 直樹 所属先 公益財団法人 東京都医学総合研究所

### 研究要旨：

種々の遺伝子型 HBV に対して切断活性を有する人工制限酵素を開発するため、異なる遺伝子型間で高度に保存された領域に対する TALEN を 3 種（ポリメラーゼ領域、Core 蛋白質領域、X 蛋白質領域）及び CRISPR/Cas9 を 10 種（S 蛋白質・ポリメラーゼ共通領域に 2 ヶ所、ポリメラーゼ領域に 2 ヶ所、X 蛋白質領域に 3 ヶ所、Core 蛋白質領域に 3 ヶ所）設計した。これまでに HBV DNA(遺伝子型 C、JPNAT 株)導入 HEK293T 細胞を用いて、これら設計した人工制限酵素による DNA 切断活性を定量的 PCR により評価した。更に、良好な HBV DNA 切断活性が認められた人工制限酵素を用い、初代ヒト肝細胞での HBV DNA 切断活性を解析した。コントロール群に比べて、肝細胞内 HBV DNA を効果的減少させた TALEN を 2 種、CRISPR/Cas9 を 7 種得た。また、人工制限酵素の肝細胞内導入法として、肝臓指向性が高いアデノ随伴ウイルス (AAV-8) ベクターの導入効率を検討した。ヒト化 Renilla 緑色蛍光タンパク質(humanized Renilla Green Fluorescent Protein, *hrGFP*)を発現する AAV8 を初代ヒト肝細胞へ感染させたところ、細胞障害無く 90%以上の肝細胞に導入可能である事は明らかとなった。今後は、人工制限酵素配列を導入した組換え AAV8 を用いて、in vitro、in vivo での肝細胞内 HBV cccDNA の減少効果を解析する。

### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) による持続感染は、その大半が母児感染または乳幼児期といった免疫応答が不十分な時期での感染によって引き起こされる。HBV が持続感染化した肝細胞では、核内に完全閉鎖二本鎖 DNA(cccDNA) が持続的に存在し、また宿主ゲノム内に HBV DNA が導入される事により、HBV 遺伝子や蛋白質が常時発現している。現行の治療薬は、効果的にウイルス量を減少させることができるが、逆転写酵素阻害剤であるため、肝細胞核内に存在する完全閉鎖二本鎖 DNA(cccDNA) 及び宿主ゲノム内に導入された HBV DNA の分解・不活化する事はできない。そのため、一生涯投薬する必要があり、HBV 感染患者には大きな負担となっている。

肝細胞内に存在する HBV DNA の直接的な不活化は、既存の治療薬や RNAi 医薬では不可能であり、HBV DNA を標的とした人工制限酵素を開発する事で B 型肝炎の根治につなが

ることが期待される。

### B. 研究方法

#### (1)HBV DNA 選択的切断活性を有する人工制限酵素の開発

HBV には多くの遺伝子型 (A~J) が存在する為、種々の遺伝子型 HBV に対して切断活性を有する人工制限酵素を開発する必要がある。そこで、異なる遺伝子型間で高度に保存された領域に対する二種の人工制限酵素を作製した。一つは、植物病原細菌であるキサントモナス細菌由来の転写活性因子様蛋白質の DNA 結合ドメインと *FokI* のヌクレアーゼドメインを融合したハイブリッド酵素である TALEN (TALE-nuclease) を HBV ゲノム上の Core 蛋白質遺伝子領域 (TALEN-1)、X 蛋白質遺伝子領域 (TALEN-2)、ポリメラーゼ遺伝子領域 (TALEN-3) に三種設計した。もう一つは、哺乳類を含む多くの生物種で高効率にゲノム切断活性を示す事が報告されている

CRISPR/Cas9 である。昨年度設計した 4 種(ポリメラーゼ遺伝子領域に 2 ヶ所：CRISPR/Cas9-1、2、X 蛋白質遺伝子領域：CRISPR/Cas9-3、Core 蛋白質遺伝子領域：CRISPR/Cas9-4)に加え、更に 6 種(S 蛋白質・ポリメラーゼ共通領域に 2 ヶ所：CRISPR/Cas9-5、6、X 蛋白質領域に 2 ヶ所：CRISPR/Cas9-7、8、Core 蛋白質領域に 2 ヶ所：CRISPR/Cas9-9、10)を設計した。HBV (遺伝子型 C、JPNAT 株)を感染させたヒト肝臓キメラマウス由来のヒト初代肝細胞 (PXB 細胞)を用いて、これら設計した人工制限酵素による HBV DNA 切断活性を切断予測領域の外側に設計したプライマー及び SYBR green を用いた定量的 PCR により評価した。

## 2) AAV8 を用いた人工制限酵素のヒト肝細胞への導入法の検討

人工制限酵素の肝細胞内導入法として、肝臓指向性が高いアデノ随伴ウイルス (AAV-8) ベクターの導入効率を検討した。ヒト化 Renilla 緑色蛍光タンパク質 (humanized Renilla Green Fluorescent Protein, *hrGFP*)を発現する組換え AAV8 (rAAV8-*hrGFP*)を初代ヒト肝細胞へ感染させた後、経目的に GFP 発現を蛍光顕微鏡撮影した。その際、細胞核をヘキスト染色することにより、GFP 陽性肝細胞率を算出した。

## C. 研究結果

### 1) HBV DNA 標的人工制限酵素の設計

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 3 種の 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)であった事が確認できている。

そこで、これら 3 種の TALEN による HBV DNA 切断活性を検討する目的で、HBV 持続感染キメラマウス由来ヒト初代肝細胞へ TALEN 発現プラスミドをトランスフェクションし、48 時間後の細胞内 HBVDNA 量を 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た定量的 PCR により測定した。コントロール群の細胞内 HBV DNA 量を 100%とした時に、TALEN-1 及び 2 は、高効率に HBV DNA 量を減少させることが出来た(図 1)。

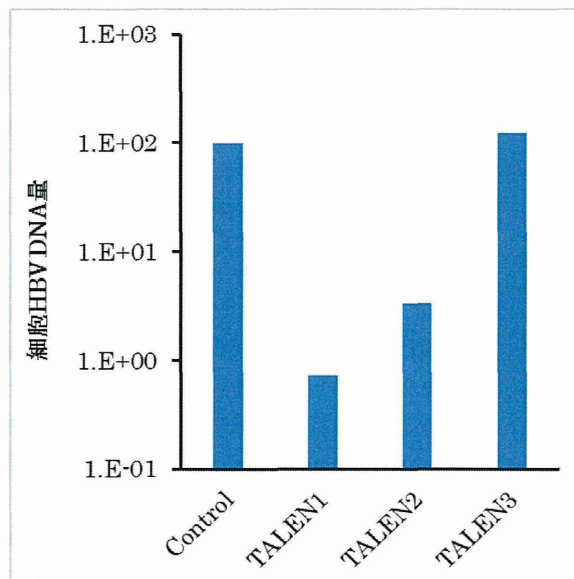


図 1 TALEN による HBV DNA 切断活性

同様に、CRISPR/Cas9 による肝細胞内 HBV DNA 切断活性を測定した。ポリメラーゼ遺伝子領域に設計した CRISPR/Cas9-1、X 蛋白質遺伝子領域に設計した CRISPR/Cas9-2 及び 3 は、コントロールに比べて、HBV DNA 量を 10%以下にまで減少させることが出来た(図 2)。

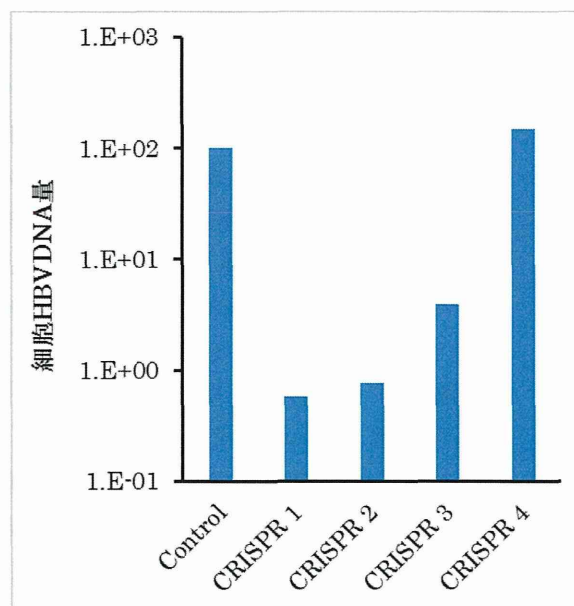


図 2 CRISPR/Cas9 による HBV DNA 切断活性(1)

更に、今年度新たに設計した 6 種の CRISPR/Cas9 のうち、4 種が高効率に肝細胞内 HBV DNA 量を減少させることが出来た(図 3)。

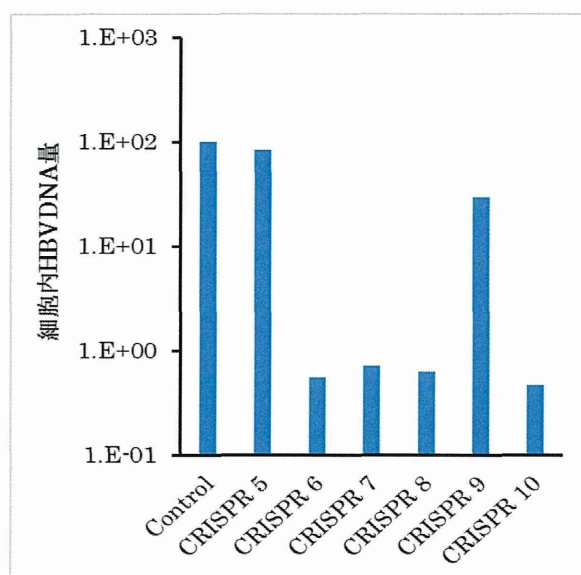


図 3 CRISPR/Cas9 による HBV DNA 切断活性(2)

## 2) AAV8 を用いた人工制限酵素のヒト肝細胞への導入法の検討

人工制限酵素のヒト肝細胞内への導入法として、rAAV8-hrGFP を  $10^6$  vg/cell または  $10^7$  vg/cell で初代ヒト肝細胞へ感染させた。経日的に GFP 陽性細胞率を顕微鏡観察した。観察期間中に、 $10^6$  vg/cell、 $10^7$  vg/cell いずれの rAAV8-hrGFP 感染細胞においても細胞障害は認められなかった。 $10^6$  vg/cell、 $10^7$  vg/cell rAAV8-hrGFP を感染させた細胞における hrGFP 陽性率は、それぞれ 89%、93%であった(図 4、5)。今後は、人工制限酵素配列を導入した rAAV8 を作製し、in vitro、in vivo での肝細胞中 HBV DNA、核内 HBV cccDNA 切断活性について解析を進める。

### 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

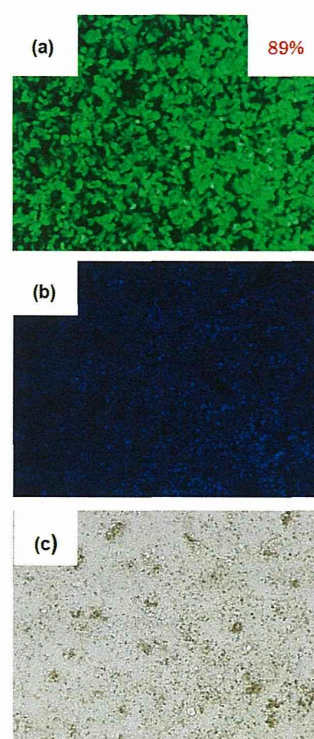


図 4  $10^6$  vg/cell rAAV8-hrGFP 感染ヒト初代肝細胞での hrGFP 発現率(感染 8 日後) : (a)hrGFP 発現、(b)核染色、(c)明視野観察

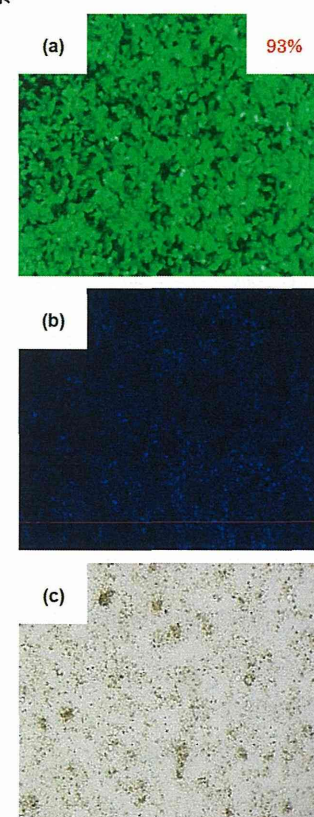


図 5  $10^7$  vg/cell rAAV8-hrGFP 感染ヒト初代肝細胞での hrGFP 発現率(感染 8 日後) : (a)hrGFP 発現、(b)核染色、(c)明視野観察



化できる人工制限酵素として、TALEN 2 種、CRISPR/Cas9 7 種を取得する事ができた。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、種々の遺伝子型 HBV に対して、高効率に切断活性を有するか否かを検討する必要がある。

最も困難な課題は、如何にしてヒト肝細胞へのこれら人工制限酵素を導入するかである。今回我々は、AAV8 がヒト初代肝細胞に対して、90%以上の遺伝子導入効率を示すことを明らかとした。今後は、in vitro に加えて、ヒト肝臓キメラマウスを用いた in vivo での肝細胞内への遺伝子導入についての検討を進める。これらの結果を基に、人工制限酵素導入 rAAV8 による 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 型肝炎患者は、一生薬を服用し続ける必要があるため、身体的、経済的負担も大きい。一方、本研究で開発を進めている人工制限酵素と安全性が担保され得る DDS を組み合わせる事で、肝細胞核内に存在する HBV DNA 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事が期待される。

#### F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## 肝特異的なドラッグデリバリーシステムの開発

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、mRNA デリバリーによりマウス肝臓へ zinc finger nuclease(ZFN)を導入することで B 型肝炎ウイルス(HBV)ゲノムを切断することを目的とする。独自に開発したミセル型ナノデバイスに mRNA を搭載することで、肝臓に対して高効率かつ安全な mRNA 導入が可能となる。また、mRNA への塩基修飾により安全性や導入効率の向上が可能だが、本年度はその修飾の最適化を行った。更に、最適化した mRNA をナノデバイスに搭載して ZFN 導入に用いることで、肝臓での HBV 配列の特異的切断に成功した。本システムは、ウイルスゲノム切断による B 型肝炎の根治的治療に極めて有望である。

### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)は、肝細胞に感染しその核内へ侵入すると完全 2 本鎖 DNA(cccDNA)に変換される。cccDNA は、既存の治療法により完全に取り除くことが困難であるため、治療後再発の原因となっている。そこで、本研究では配列特異的に DNA を切断することが可能な zinc finger nuclease (ZFN)を用いて HBV ゲノム DNA を切断し、B 型肝炎を治療することを目的としている。

治療では、ZFN を発現する遺伝子を肝臓へ導入する。このような遺伝子導入では、従来主に標的細胞で長期間のタンパク質産生が可能な DNA のデリバリーが検討されてきた。しかし、ZFN は DNA 切断活性を持つため、DNA デリバリーによる導入では、その持続的な発現により宿主細胞ゲノムを切断する危険性がある。更に、導入した DNA 自体が偶発的に宿主ゲノムへ挿入され、変異を誘発する懸念もある。そこで、発現が一過性でありゲノム挿入の危険性がない mRNA のデリバリーを検討した。

一方で、mRNA は生体内で速やかに酵素分解を受けること、免疫原性が強いことから、その *in vivo* でのデリバリーは困難と考えられてきた。これに対して、我々は独自に開発した生体適合性ミセル型ナノデバイスに mRNA を搭載し、これらの問題の解決を試みた。前年度までの研究で、ナノデバイスにより生体内での

mRNA の酵素分解が抑制され、更に mRNA の免疫原性が軽減されることを見だし、結果的にマウス肝臓に効率的に mRNA を導入することに成功した。

また、搭載する mRNA について、塩基の一部を化学修飾した塩基に置換することで、導入効率を向上させ、免疫原性を低下させられることが、報告されている(*Nat Rev Drug Discov* 2014; 13, 759)。そこで、前年度より mRNA の塩基修飾に関する検討を行ってきた。本年度は様々な組成の塩基修飾を行った mRNA を作製し肝臓へ導入することで、修飾法の最適化を行った。

更に、ここで最適化された塩基修飾組成の mRNA をナノデバイスに搭載して、実際に HBV ゲノムを標的とした ZFN をマウス肝臓へ導入し、HBV ゲノム配列の切断を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. mRNA の調製

mRNA は、目的とする遺伝子配列を T7 プロモーター下流に挿入したプラスミド DNA (pDNA)を設計し、キットを用いて *in vitro* 転写させることで作製した。その際に、5 メチル (5m)C、シュード(ψ)U といった修飾塩基を反応液に添加することで、それらの修飾塩基を含む mRNA が調製される。

#### 2. ミセル型ナノデバイスの調製

以前の報告に従い、PEG-PAsp(DET)ポリマー