

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 )  
分担研究報告書 (平成26年度)

TALEおよびCRISPR/Cas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  
研究協力者 佐久間哲史 広島大学大学院理学研究科・特任助教

### 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、ヌクレアーゼ型およびニッカーゼ型のCRISPR/Cas9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制限酵素TALENやCRISPR/Cas9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培養細胞にお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ヌクレアーゼの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/Cas9システム(ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型、FokI-dCas9型)を構築し、ヒト培養細胞での活性評価を行った後に、HBVの増殖抑制効果をHepG2細胞およびT23細胞において調べた。

#### C. 研究結果

昨年度の結果から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が確認できなかったため、本年度はCRISPR/Cas9システムを用いた抑制効果についてHepG2細胞検討を行った。その結果、ヌクレアーゼ型およびNニッカーゼ型のCRISPRを用いた場合、有意にHBV量を低下させることがHepG2細胞において示された。一方、FokI-dCas9型では、抑制効果を確認す

ることができなかった。

#### D. 考察

本研究によってCRISPR/Casシステムを用いたHBVの増殖抑制が可能であることが示された。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作用が知られている。そのため、HBVゲノム破壊と同時に、細胞のヒトゲノムへの変異導入について調べる必要がある。ニッカーゼ型のCRISPRは、off-target作用を避けることが知られており、より安全性が高いと予想されるが、この点をoff-targetの候補配列のシーケンスによって確認する必要がある。

#### E. 結論

CRISPR/Cas9システムのヌクレアーゼ型とニッカーゼ型によってHBVの増殖を抑制する効果が確認された。今後は、off-target作用による細胞のゲノムへの変異導入を解析し、安全性について評価を行うことが必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154, 2015

2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 5: 5560, 2014

3)Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and Yamamoto T. Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells. *Scientific Reports*, 4: 7125, 2014

4)Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T and Mori K. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *Journal of Cell Biology*, 206: 347-356, 2014

5)Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4: 5400, 2014

## 2. 学会発表

1) Yamamoto T, Suzuki K and Sakuma T. Targeted genome editing using Platinum TALENs. 第47回日本発生物学会, 名古屋, 2014

2)山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での標的遺伝子改変. 第10回肝免疫・ウイルスフロンティア, 東京, 2014.

3)Yamamoto T. Genome editing using Platinum TALENs, Technical Symposium. Application of haploid cell lines and innovative genome-editing technologies in cell biology. 第66回日本細胞生物学会, 奈良, 2014

4)山本 卓. ゲノム編集の基本原則と研究の現状. 第87回日本生化学会フォーラム次世代ゲノム編集技術の展開, 京都, 2014

5)山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変, 平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 東京 2014

6)山本 卓. ゲノム編集技術の基本原則と現状. 第6回遺伝子組換え実験安全研修会, 東京, 2014

7)Yamamoto T. Genome editing cultured cells and animals and using TALENs and CRISPR/Cas. The 3rd International Institute for Advanced Studies". Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, Kyoto, 2014

8)山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性. 第12回日本再生歯科医学会学術大会総会教育講演、徳島、2014

9)Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using TALENs. JARI & ISEV Japan 6<sup>th</sup> Annual meeting, Genome editing makes new RNA world, Hiroshima, 2014

10)佐久間哲史, 中出翔太, 西川綾美, 茶山一彰, 鈴木賢一, 山本 卓. マルチgRNAシステムを用いたCRISPR/Cas9によるゲノム編集, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014

11)Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using site-specific nucleases, The 8<sup>th</sup> meeting of Bone Cartilage Frontier, Tokyo, 2014

12)Yamamoto T. Targeted Genome Editing in Cultured Cells and Animals. Genome Editing

Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research, Niigata, 2015

13)山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性. 第20回分子複合医薬研究会, 大阪, 2015

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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、国際出願PCT/JP2014/061329 (平成26年4月22日)

3)DNA結合ドメインを含むポリペプチド、国際出願PCT/JP2014/062518 (平成26年5月9日)

4)核酸挿入用ベクター、国際出願PCT/JP2014/079515 (平成26年10月24日)