

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18123

研究課題名（和文）nickase-Cas9を用いた新たなB型肝炎ウイルスDNA排除戦略

研究課題名（英文）Complete removal of HBV genome by nickase-Cas9

研究代表者

栗原 健（KURIHARA, Takeshi）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50823598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Cas9の発現による非ターゲットDNA切断のリスクを抑制するため、片方のDNA切断基質を失活させたCas9の変異体であるnickase-Cas9とB型肝炎ウイルスゲノムの両鎖を標的としたペアのsingle-guide RNAをB型肝炎ウイルスが複製する肝癌細胞株に発現させたところ、標的となるB型肝炎ウイルスゲノムに対してDNA2本鎖切断が起こり、細胞株内のウイルス蛋白やウイルスの複製が抑制された。マウス肝臓内においてもnickase-Cas9蛋白発現プラスミドと2つのsingle-guide RNA発現プラスミドにより標的となるB型肝炎ウイルスゲノムが切断されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎患者に対する現行の治療ではB型肝炎ウイルスDNAを完全に排除するのは困難である。ゲノム編集ツールであるCas9蛋白は特定のゲノム配列を認識するsingle-guide RNAとの組み合わせによってB型肝炎ウイルスゲノムのDNA2本鎖切断を誘導するが、Cas9蛋白は宿主細胞に想定外の非ターゲットDNA切断が起こるリスクも高い。今回の研究によりnickase-Cas9蛋白とペアとなるsingle-guide RNAの組み合わせることによって、宿主DNAへの変異導入のリスクを低減した感染細胞核内のB型肝炎ウイルスゲノムの完全排除の可能性が見出された点において学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recent reports have shown that a novel genome-editing tool using Cas9 with a single-guide RNA (sgRNA) system can cleave the HBV genome in vitro and in vivo. However, Cas9 risks undesirable off-target cleavage on the host genome. Nickase-Cas9 cleaves a single strand of DNA, and thereby two sgRNAs are required for inducing DSBs. To avoid Cas9-induced off-target mutagenesis, we examined the effects of the expressions of nickase-Cas9 and with sgRNAs on HBV replication. The expression of nickase-Cas9 with a pair of sgRNAs cleaved the target HBV genome and suppressed the viral-protein expression and HBV replication in vitro. Moreover, nickase-Cas9 with the sgRNA pair cleaved the targeted HBV genome in mouse liver. These results suggest the possible use of nickase-Cas9 with a pair of sgRNAs for eliminating HBV DNA from the livers of chronic hepatitis B patients with low risk of undesirable off-target mutation on the host genome.

研究分野：消化器外科

キーワード：B型肝炎 ゲノム治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎患者における肝細胞癌発生のリスクは高く、感染後に肝細胞内に維持される B型肝炎ウイルス DNA が発癌に関連している可能性が示唆されている。B型肝炎患者に対する現行の治療では、持続感染した肝細胞核内に存在する B型肝炎ウイルス DNA を完全に排除するのは困難である。われわれは、新しいゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 系を用いた核内の B型肝炎ウイルス DNA をターゲットとした治療法の確立を目指して研究を行い、肝細胞核内に維持される B型肝炎ウイルス DNA の排除の可能性を示した (Scientific Reports, 2017)。Cas9 は 2つの DNA 切断基質を有し、sgRNA によって認識されるゲノム配列に DNA 2本鎖切断を引き起こし、容易にターゲット配列へ変異を導入しうるが、宿主細胞に想定外の非ターゲット DNA 切断が起こるリスクも高い。今回われわれは片側の DNA 切断基質が失活した nickase-Cas9 とペアとなる single-guide RNA の組み合わせることによって、宿主 DNA への変異導入のリスクを低減した新たな B型肝炎ウイルス DNA 排除戦略の構築を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は CRISPR/Cas9 系による非ターゲット配列への変異導入を低減する nickase-Cas9 を用いた肝細胞核内に維持される B型肝炎ウイルス DNA の排除法の確立である。ゲノム編集ツールを人体に応用する場合、非ターゲット配列への望まれない遺伝子変異の導入が最も課題となる。今回われわれはよりターゲット特異的な nickase-Cas9 を用いて B型肝炎ウイルス DNA の排除を目指す点において独自性があると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) B型肝炎ウイルスゲノム特異的な sgRNA の作成

標的領域内で protospacer motif (PAM) 配列 (GGN or NCC) を同定し、両鎖に対して 0 から 20 塩基の間隔で PAM 配列に連なる 20 塩基をペアとして sgRNA を作成する。

#### (2) nickase-Cas9 による B型肝炎ウイルス DNA に対する切断活性と抗 HBV 効果

B型肝炎ウイルス慢性感染のモデルとして B型肝炎ウイルス持続複製肝細胞株である HepG2.2.15.7 細胞を用い、nickase-Cas9 および sgRNA をレンチウイルスベクターを用いて細胞内で発現させる系を用いる。

急性感染のモデルとして HBV レセプターであるナトリウムタウロコール酸共輸送ポリペプチド (NTCP) を発現させた HepG2.C4 細胞に nickase-Cas9 と sgRNA をレンチウイルスベクターを用いて発現させ、HBV 粒子を感染させる系を用いる。

nickase-Cas9 とペア sgRNA のターゲット配列に対する切断活性は DNA を抽出し Surveyor 法を用いて変異導入を評価する。ウイルス蛋白発現はイムノブロットング法を用いて定量し、細胞内のウイルス DNA 量は q-PCR 法を用いて評価する。

#### (3) 抗 HBV 効果の機序についての検討

ノザンブロットング法にてウイルス RNA を定量し B型肝炎ウイルス制御における機序について検討する。さらにディープシーケンシング法を用いて DNA 切断による遺伝子変異導入効率や非ターゲット配列に対する変異導入について評価する。

#### (4) in vivo での nickase-Cas9 とペア sgRNA による B型肝炎ウイルスゲノムに対する切断活性の評価

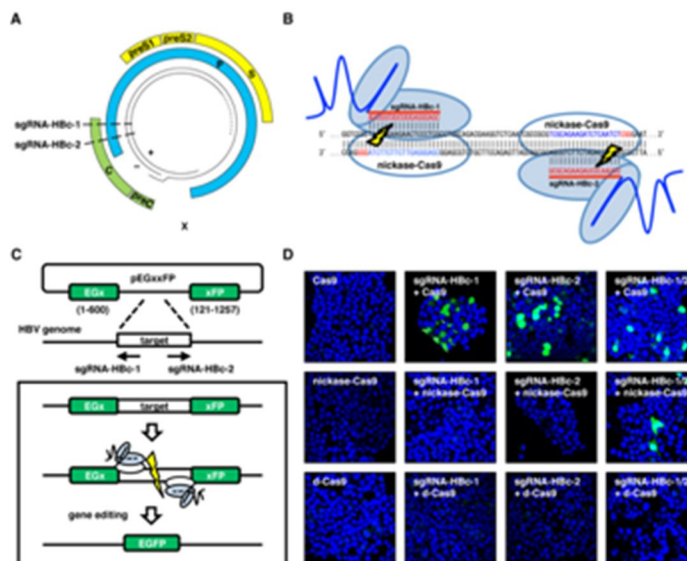
ハイドロダイナミック法を用いてマウスの尾静脈に nickase-Cas9 およびペア sgRNA とターゲット B型肝炎ウイルス DNA 配列を挿入したルシフェラーゼプラスミドを注入し、ルシフェラーゼの蛍光にてマウス内での nickase-Cas9 の切断活性を評価する

### 4. 研究成果

B型肝炎ウイルスにはそのゲノム配列の多様性により 8つのジェノタイプが存在している<sup>22</sup>。B型肝炎ウイルスゲノムを標的するにあたりそれらのジェノタイプの配列を比較し、ジェノタイプ間で保存された Hbc 蛋白をコードする領域 (図 1A) の両鎖に対して 20 塩基の間隔で protospacer motif (PAM) 配列に連なる 2つの sgRNA (sgRNA-Hbc-1、sgRNA-Hbc-2) をデザイン

した (図 1B)。同配列に対する nickase-Cas9 蛋白とペア sgRNA の切断活性を検討するために、標的となる B 型肝炎ウイルスゲノム配列を含む split EGxxFP プラスミドを作成した 23。

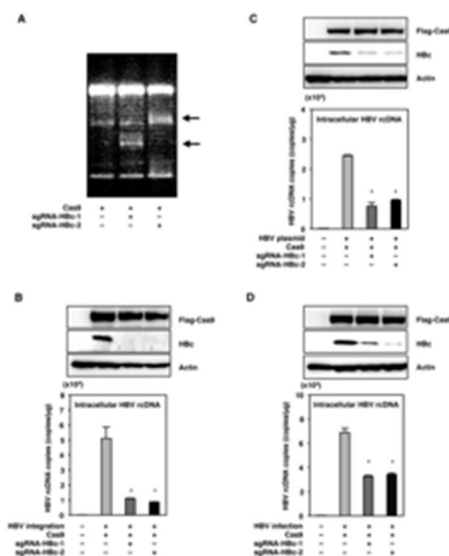
作成した EGxxFP プラスミドは挿入された標的ゲノム配列に DNA 2 本鎖切断が起こると EGFP への組み替えが誘導される。ターゲット配列への切断活性はこの EGFP の蛍光として可視化される (図 1C)。Cas9 蛋白と sgRNA-HBc-1 もしくは sgRNA-HBc-2 のいずれかを 293T 細胞に供発現させると EGFP の蛍光が誘導された。対して nickase-Cas9 蛋白では sgRNA-HBc-1 と sgRNA-HBc-2 の両方を供発現させた場合にのみ EGFP の蛍光が誘導された。また、d-Cas9 蛋白においては sgRNA-HBc-1 と sgRNA-HBc-2 とを供発現させても EGFP の蛍光は誘導されなかった (図 1D)。



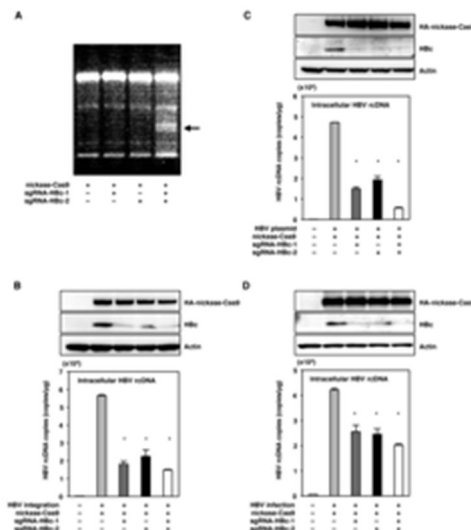
Cas9 蛋白と sgRNA はターゲットとなる B 型肝炎ウイルス DNA を切断し、B 型肝炎ウイルスの複製を抑制した。次に Cas9 蛋白とデザインした sgRNA によって標的とした B 型肝炎ウイルスの複製に対する効果を検討した。Cas9 蛋白と sgRNA-HBc-1 もしくは sgRNA-HBc-2 とをレンチウイルスベクターを用いて HepG2.2.15.7 細胞に遺伝子導入した。Surveyor 法を用いてターゲット配列への変異導入を評価したところ、いずれの sgRNA との組み合わせでも Cas9 蛋白によって標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムに変異導入が起こることが確認された (図 2A)。また、Cas9 蛋白と sgRNA-HBc-1 もしくは sgRNA-HBc-2 の供発現によって HepG2.2.15.7 細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量は有意に減少した (図 2B)。次に 1.3 倍長の B 型肝炎ウイルス DNA を含む発現プラスミド 26 を肝癌由来細胞株の Huh7 細胞にトランスフェクションする系において Cas9 蛋白と sgRNA の効果を検討した。Cas9 蛋白と sgRNA の供発現によって Huh7 細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量は有意に減少した (図 2C)。

また、B 型肝炎ウイルスの感染を許容する肝癌由来細胞株の HepG2-hNTCP-C4 細胞 27, 28 においても同様に Cas9 蛋白と sgRNA の効果を検討した。Cas9 蛋白と sgRNA を供発現させた HepG2-hNTCP-C4 細胞に B 型肝炎ウイルスの感染性粒子を産生する HepAD38.7 細胞の培養上清によって B 型肝炎ウイルスを感染させた。Cas9 蛋白と sgRNA の供発現によって B 型肝炎ウイルスを感染させた 10 日後の HepG2-hNTCP-C4 細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量は有意に減少した (Fig.2D)。以上より Cas9 蛋白とデザインした sgRNA の発現はターゲットとなる B 型肝炎ウイルス DNA を切断し B 型肝炎ウイルスが複製する肝癌由来細胞株において B 型肝炎ウイルスの複製を抑制しうることを示唆された。

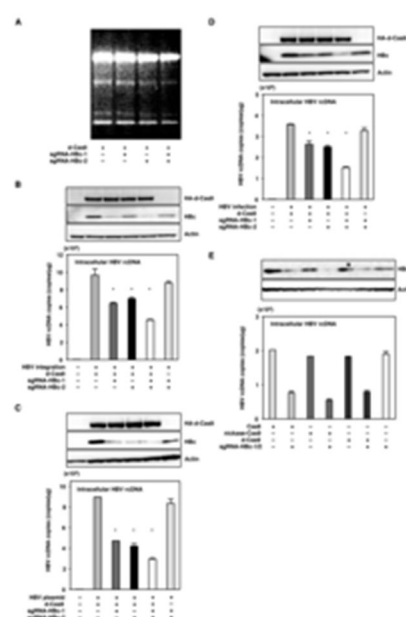
nickase-Cas9 蛋白と sgRNA 単独もしくはペアとの供発現による B 型肝炎ウイルスの複製に対する効果を評価するために、HepG2.2.15.7 細胞に nickase-Cas9 蛋白と sgRNA-HBc-1 と sgRNA-HBc-2 をレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。Surveyor 法によってターゲット配列における変異導入を評価したところ、nickase-Cas9 蛋白と sgRNA-HBc-1 と sgRNA-HBc-2 をペアで発現させた細胞では変異導入が見られたが、いずれかの sgRNA との供発現においてはターゲット配列に変異導入は見られなかった (図 3A)。nickase-Cas9 蛋白とペアの sgRNA の供発現によ



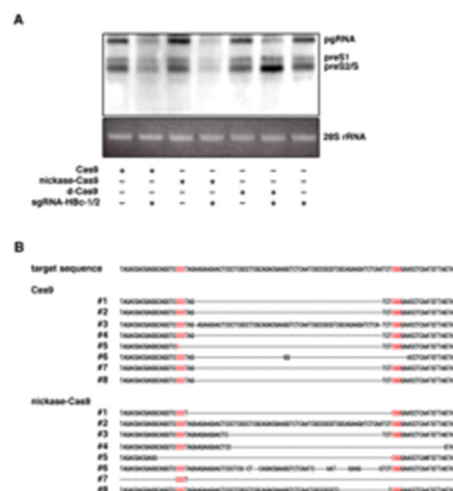
て HepG2.2.15.7 細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量は有意に減少した。興味深いことにターゲット配列に変異導入が誘導されない nickase-Cas9 蛋白といずれか単独の sgRNA との併発現においても HepG2.2.15.7 細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量は有意に減少し、B 型肝炎ウイルスの複製は抑制された(図 3B)。1.3 倍長の B 型肝炎ウイルス DNA を含むプラスミドをトランスフェクションした Huh7 細胞内及び B 型肝炎ウイルスを感染させた HepG2-hNTCP-C4 細胞内でも、いずれか単独の sgRNA と nickase-Cas9 蛋白の併発現により細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量が有意に減少した(図 3C,D)。以上よりターゲットとなる DNA の切断の如何にかかわらず標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムとの複合体を形成することによって nickase-Cas9 蛋白と sgRNA は B 型肝炎ウイルスの複製は抑制しうることが示唆された。



B 型肝炎ウイルスの複製を抑制するために標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムの切断が必要か否かを検証するために、sgRNA との複合体により認識されたターゲット配列と結合能を有するが DNA 切断活性は失活している d-Cas9 蛋白を用いてその効果を検討した。Surveyor 法によりいずれの sgRNA との併発現によっても d-Cas9 蛋白がターゲット配列への変異導入を引き起こさなかった(図 4A)。しかしながら、d-Cas9 蛋白と sgRNA を HepG2.2.15.7 細胞に併発現させると細胞内の HBc 蛋白量とウイルス DNA 量は有意に減少した(図 4B)。また、1.3 倍長の B 型肝炎ウイルス DNA を含むプラスミドをトランスフェクションした Huh7 細胞内及び B 型肝炎ウイルスを感染させた HepG2-hNTCP-C4 細胞内でもいずれの sgRNA と d-Cas9 蛋白の併発現により HBc 蛋白量及びウイルス DNA 量が有意に減少した(図 4C,D)。B 型肝炎ウイルスの複製における Cas9 蛋白、nickase-Cas9 蛋白、d-Cas9 蛋白による抑制効果と比較したところ、HepG2.2.15 細胞における HBc 蛋白量及びウイルス DNA 量はいずれの Cas9 蛋白においても同等程度に減少していた(図 4E)。以上より、B 型肝炎ウイルスの複製の抑制は主に標的となるゲノム配列と sgRNA と Cas9 蛋白が複合体を形成することによって起ることが示唆された。

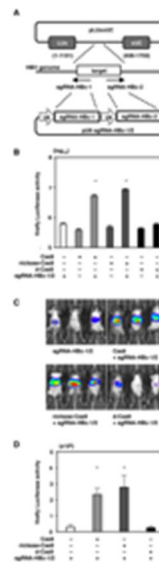


Cas9 蛋白による B 型肝炎ウイルスの複製の抑制の機序を検討するために、ウエスタンブロッティング法を用いて HepG2.2.15.7 細胞内のウイルス RNA 量を測定した。標的となる配列に含まれるプレゲノミック RNA は Cas9 蛋白、nickase-Cas9 蛋白、d-Cas9 蛋白のいずれにおいても減少したが、標的となる配列に含まれない PreS1 及び PreS2/S は Cas9 蛋白と nickase-Cas9 蛋白においては sgRNA との組み合わせで減少を認められたが、d-Cas9 蛋白では減少を認めなかった。以上の結果より Cas9 蛋白及び nickase-Cas9 蛋白と sgRNA の組み合わせは B 型肝炎ウイルスゲノムに変異導入を誘導し、その結果全てのウイルス RNA の発現を抑制した。対して d-Cas9 蛋白と sgRNA の組み合わせではターゲットとなる B 型肝炎ウイルスゲノムの変異導入は行われず、標的となるゲノム配列に結合することによってターゲットとなるプレゲノミック RNA のみ発現が減少したと考えられた(図 5A)。次に HepG2.2.15.7 細胞において Cas9 蛋白及び nickase-Cas9 蛋白と sgRNA によって誘導される B 型肝炎ウイルスゲノムへの変異導入について検討した。Cas9 蛋白においては 8 クローン全てにおいて欠損変異の導入を同定した。変異導入箇所の多くは Cas9 蛋白によって想定される切断部位及びそのごく近傍に位置していた。対して nickase-Cas9 蛋白によって誘導された変異導入は 8 クローン中の 7 クローンに同定され、その欠損変異の長さは様々であった(図 5B)。ディープシーケンシングによって HepG2.2.15.7 細胞内



の B 型肝炎ウイルスゲノムにおける変異を検討したところ Cas9 蛋白と nickase-Cas9 蛋白によって誘導される変異は同等程度であった。また、d-Cas9 蛋白によって誘導される変異は同定されなかった(表 2)。以上の結果より、Cas9 蛋白と nickase-Cas9 蛋白は sgRNA との組み合わせで標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムに変異導入を誘導することができ、また B 型肝炎ウイルスの複製の抑制には主に標的となるウイルスゲノムとの複合体を構成することにより起こることが示唆された。

最後に *in vivo* での nickase-Cas9 蛋白とペアの sgRNA の組み合わせによる標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムが切断されうるかを評価するために、ターゲットとなる B 型肝炎ウイルスゲノムが挿入された split LUxxUC プラスミドを作成した。作成した LUxxUC プラスミドは挿入されている B 型肝炎ウイルスゲノムに DNA 2 本鎖切断が起こるとホタルルシフェラーゼ遺伝子の相同組み替えが起こりルシフェラーゼの蛍光を示す(図 6A)。細胞株内においてルシフェラーゼの活性は Cas9 蛋白及び nickase-Cas9 蛋白とペア sgRNA の組み合わせで誘導されるが、d-Cas9 では誘導されないことを確認した(図 6B)。続いてそれらの Cas9 蛋白とペア sgRNA とをハイドロダイナミック法を用いてマウスに注入したところ、Cas9 蛋白及び nickase-Cas9 蛋白はペア sgRNA との組み合わせによってマウス肝臓内で高いルシフェラーゼ活性を示し、d-Cas9 蛋白はルシフェラーゼの活性を示さなかった(図 6C,D)。以上の結果より nickase-Cas9 蛋白はペア sgRNA との組み合わせによってマウス生体内においても標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムを切断しうることを示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------