

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670482

研究課題名(和文) CRISPRによるB型肝炎ウイルスの排除

研究課題名(英文) Elimination of hepatitis B virus by CRISPR

研究代表者

伊藤 昌彦 (ITO, MASAHIKO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50385423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)は、世界に3億5千万人のキャリアが存在し、B型肝炎や肝硬変、肝癌に進展する。肝細胞核内に存在しているHBV covalently closed circular DNA (cccDNA)を駆除する治療薬、治療法は確立されていない。CRISPR/Cas9システムは、HBV cccDNAの排除を達成するために有効な治療技術となる可能性がある。本研究では、CRISPR/Cas9システムだけでなく、CRISPRiによってHBV プレゲノムRNAの転写、HBs抗原、HBe抗原の産生を抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) infection is a major cause of acute and chronic hepatitis and is closely associated with development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. Treatments or drugs for the clearance of HBV cccDNA have not been established until now. CRISPR/Cas9 system has possibility to completely eliminate cccDNA in the nuclear of hepatocyte. In this study, we applied CRISPR/Cas9 and CRISPRi system to HBV infected cells, and revealed that these system could repress the transcription of pgRNA and expression of HBs and HBe antigen.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス CRISPR/Cas9 CRISPRi オカルトHBV cccDNA

1. 研究開始当初の背景

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR-associated proteins 9)システムによるゲノム編集が2013年に初めて報告されて以来^{1,2)}、さまざまな動物種、細胞においてゲノム編集が試みられている³⁾。CRISPR/Cas9システムは、細菌や古細菌が備える適応免疫性の防御機構であり、外来の核酸を認識しその侵入を抑制する。CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集では、切断したい標的塩基配列を含むガイドRNAとCas9タンパク質の発現させることで、ゲノム上の任意の箇所を切断し、変異導入することができる。CRISPR/Cas9システムは、人工タンパク質による特異的な配列への結合・切断を行うこれまでのゲノム編集ツール(ZFN, TALEN)とは異なり、より安価で簡便に特異性の高いゲノム編集を可能とした。最近になり、切断活性が欠損したCas9(D10A+H840A, deficient Cas9; dCas9)を用いることで、ゲノム上にある特定遺伝子の転写を抑制できるシステム(CRISPRi)も報告されている⁴⁾。CRISPR/Cas9システムのウイルス排除への応用は、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、エプスタイン・バーンウイルス(EBV)、また本研究期間においてHBVについても報告されている⁵⁻¹⁵⁾。

2. 研究の目的

B型肝炎は、ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)に属するB型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus, HBV)の感染によって引き起こされる。世界中で20億人のHBV患者が存在し、そのうち3億5千万人が持続感染者で、年間50万~70万人がB型肝炎やB型肝炎に起因する疾病(肝硬変・肝癌など)で死亡していると推定される。HBVは主として、HBV感染者の血液や体液などを介して感染し、持続感染の多くは出生時または乳幼児期の感染によって成立する。慢性B型肝炎の治療としては、現在抗ウイルス薬やインターフェロンによる治療が行われているが、HBs抗原陰性、HBV DNA陰性になった場合でも、核内にHBV cccDNAが存在するような潜伏感染も報告されている(オカルトHBV)。HBV cccDNAを切断、排除のためのゲノム編集に関しては、ZFNの導入によりHBV pregenome RNAの発現が29%に低下すること、TALENの導入によりcccDNAで35%に低下することが報告されている^{14,15)}。しかしながら、必ずしも高効率とはいえず、HBV cccDNAを完全に除去するためのより効果的な方法が待望されている。

そこで本研究では、HBV cccDNAの完全排除、複製・粒子産生の抑制を目的として、CRISPR/Cas9およびCRISPRiの応用によるHBVウイルス排除を試みた。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9ベクターの構築

CRISPR/CAS9ベクター(pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9)にターゲット配列を挿入した。配列には、pregenomeプロモーター、EnhancerI/HBxプロモーター、HBsプロモーター、YMDDドメインなどのHBVの転写、複製に重要な領域で、かつ遺伝子型(ジェノタイプ)間で保存された領域を選定した。

(2) CRISPRi(CRISPR/dCas9)ベクターの構築

CRISPR/CAS9ベクターのCAS9コード領域に変異を導入した(D10A, H840A)。また組換えレンチウイルス感染用のベクター(lentiCRISPRv2)にも同様の変異を導入した。これらのCRISPRiプラスミドに転写抑制のためのターゲット配列を挿入した。転写調節領域としてpregenomeプロモーター、EnhancerI/HBxプロモーター、HBsプロモーターを用いた。

(3) ノックアウト効率の検討

構築したCRISPR/CAS9およびCRISPRiプラスミドを、1.3倍長のHBV発現プラスミドを肝細胞癌由来細胞株HuH-7に共導入して効果を検証した。細胞内pregenome RNA(pgRNA)コピーをqRT-PCR法により、HBs抗原、HBc抗原の発現を抗HBc抗体(in house)および抗HBs抗体(Institute of Immunology, Tokyo, Japan)を用いたウエスタンブロット法により調べた。pregenomeプロモーターの転写活性は、pGL4.10(Promega Corporation, Madison, WI, USA)にpregenomeプロモーターを組み込んだレポータープラスミドとの共導入を行い、その後のLuciferase活性を測定した。培養上清に含まれるHBs、HBe抗原量をELISA法により定量した。

HBV持続感染HuH-7細胞株(HuH7/pEB-HBV)およびHBV持続感染HepG2細胞株(HepG2.215)を用いた解析では、CRISPR/CAS9およびCRISPRiプラスミドの単独導入を行い、上述のアッセイを行った。

(4) 細胞障害性の検討

CRISPR/CAS9およびCRISPRiプラスミドの導入による細胞障害性および細胞毒性をATPアッセイ(Cell-Titer Glo, Promega)により調べた。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9によるHBVウイルスの排除

これまでにHBVでは、EnhI/coreプロモーター、HBc抗原、HBs抗原やpol ORFを標的配列として、HBVを感染させたHuH-7細胞やHepaRG細胞、HBVを持続感染しているHepG2.2.15細胞(Genotype D)、HBV感染マウスの肝細胞で、CRISPR/Cas9によってHBV DNA、HBV cccDNA、HBs抗原、HBe抗原がコントロールに比べておよそ3割程度に低下することが報告されているが十分とはいえない⁵⁻¹⁵⁾。

そこで初めに、より効果的なガイド配列を同定するために、pregenomeプロモーター

から4ヶ所(pg1-4)、pol の活性中心である YMDD ドメイン近傍に4ヶ所(pol1-4)の新規のガイド配列を設計した(図1)。HuH-7細胞において、CRISPR/Cas9 プラスミド(pX330)とHBV発現プラスミドを共導入して効果を検証した。その結果、pg3によりpgRNAのコピー数は約20%、pol1~3でおおよそ15%に低下した(図2)。また、HBs抗原に対するウエスタンブロットによってもその効果が認められた(図3)。次にpregenomeプロモーターの転写活性(GT A, B, C, D)への効果を、Luciferaseを組み入れたプロモーターリポーターベクターによって解析した。その結果、pg3はプロモーター活性を20~28%に低下させること(図4)、同時に細胞毒性を示さないことを明らかになった(データ未掲載)。

また本講座においては、EBV由来の複製起点oriPとEBV Nuclear Antigen 1(EBNA1)遺伝子の働きにより、エピソード的にHBV DNAが複製されるHBV持続感染HuH-7細胞株(HuH7/pEB-HBV)を樹立している。この細胞株とHepG2.2.15細胞を用いてpg3やpol3をガイド配列として用いたアッセイを試みたが、pgRNAコピーや培養上清中のHBs抗原、HBe抗原量はコントロールの4~6割程度にしか低下しなかった(図5)。リポフェクション法だけでなく、組換えレンチウイルス感染(lentiCRISPRv2)によって高効率に遺伝子導入した場合でも大きな変化はみられなかった。このことはCas9によって二本鎖DNAが切断(DSBs)されたのち、非同末端連結(NHEJ)あるいは相同組換え修復(HR)の経路によって修復されること、もしくは欠失箇所、欠失長によってはHBV pgRNAの転写、polの機能に影響しないためであると推測される。

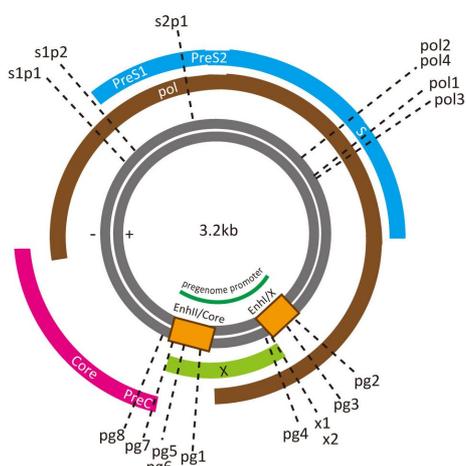


図1. HBV ゲノムの構造、遺伝子構成およびターゲットの箇所

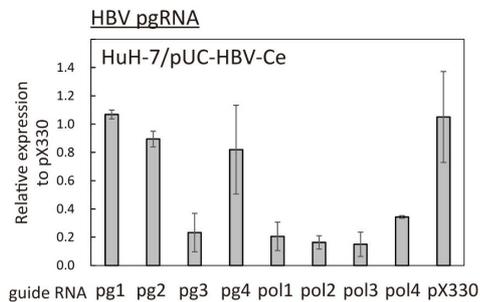


図2. CRISPR/Cas9発現プラスミドとHBV発現プラスミドの共導入によるpgRNA発現量への影響

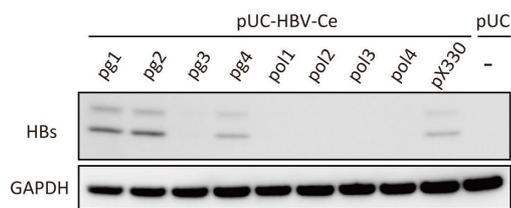


図3. CRISPR/Cas9発現プラスミドとHBV発現プラスミドの共導入によるHBs抗原量の変動

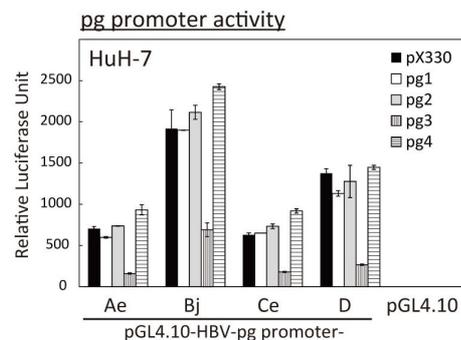


図4. CRISPR/Cas9によるpregenomeプロモーター活性の抑制効果

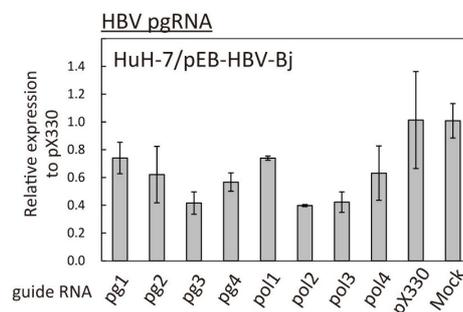


図5. HBV持続感染HuH-7細胞株でのCRISPR/Cas9によるHBV pgRNA発現量への影響

(2) CRISPRiによるHBV RNAの転写抑制

CRISPR/Cas9システムによるゲノム切断では、修復機構が働くため完全排除ができない可能性、Cas9による宿主ゲノムの非特異的な切断・変異導入の可能性の問題が考えられる。また、HBVキャリアの肝癌患者の肝細胞では非常に高率にHBV遺伝子が宿主染色体に組み込まれていることが報告されており、Cas9によるDNA切断は宿主染色体の不安定化要因にもなりうる。

これらの問題点を解決するために、nuclease活性を欠損させたdCas9を標的配列に留まらせることで、転写をブロックするCRISPRiシステムを用いて、HBV RNAの転写抑制を試みた。ガイド配列には、pregenomeプロモーターに6ヶ所(pg1-6)、pgRNA転写開始点下流に2ヶ所、(pg7-8)、Enh1/Xプロモーターに2ヶ所(x1-2)、pre-S1プロモーターに2ヶ所(s1p1-2)、pre-S2プロモーターに1ヶ所(s2p1)を設計した(図1)。はじめにHepG2.2.15細胞において、組換えレンチウイルス感染により効果の検証を行った。その結果、pgRNAのコピーは、転写開始点下流のpg8により約38%に低下した(図6)。この結果は、dCAS9の結合がRNA polymerase IIの進行を阻害することで転写阻害に働くとするこれまでの知見と一致する。次にpregenomeプロモーターの転写活性に対する影響をプロモーターリポーターベクターによって解析した。その結果、pg8によりプロモーター活性が約18%(GT Ae)、4%(GT Bj)に低下した(図7)。また、x1によりEnh1/Xプロモーター転写活性は74%に低下し(データ未掲載)、培養上清中のHBs抗原は36%、HBe抗原は48%に低下した(データ未掲載)。一方で、s1p1、s1p2、s2p1は、PreS1、PreS2プロモーターの転写活性、HBV pgRNAコピーに影響しなかった(データ未掲載)。

最後に、pg8とx1ガイド配列の組み合わせによる相乗効果を、HuH7/pEB-HBVおよびHepG2.2.15細胞に組換えレンチウイルスを感染させて検証した。その結果、pg8+x1により、HBV pgRNAコピーは43%(GT Ae)、38%(GT Bj)、60%(GT Ce)、34%(GT D)に減少させることができた(図8)。

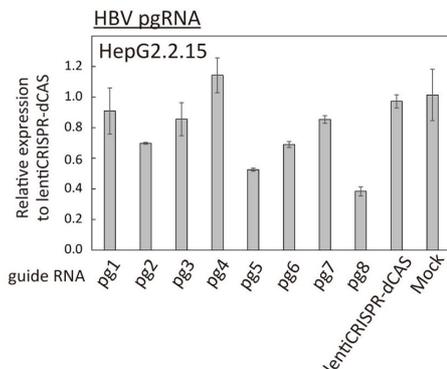


図6. pgプロモーターを標的としたCRISPRiによるpgRNA発現量への影響

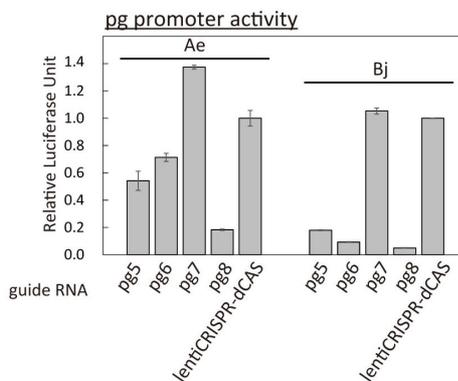


図7. pgプロモーターを標的としたCRISPRiによるpregenomeプロモーター活性への影響

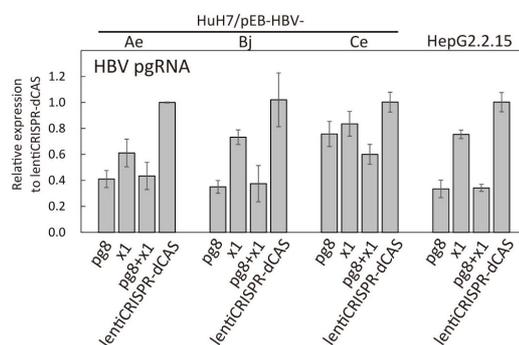


図8. HBV持続感染HuH-7細胞株およびHepG2.2.15でのCRISPRiによるpgRNA発現量の変動

(3) 考察

本研究によって、CRISPR/Cas9システムだけでなく、CRISPRiによってHBV pgRNAの低減、HBs抗原、HBe抗原の産生を抑制できることを明らかにした。CRISPR/Cas9システムではDSBsのちに修復機構が働くため、HBV cccDNAを完全に除去するには、近接領域でガイド配列を複数同時に用いることや、Cas9による切断が修復されないような工夫が必要かもしれない。また、Staphylococcus aureus由来Cas9(SaCas9)のPAM配列はNGRRRTであることから、より効果的なガイド配列を新たに見出すことができる可能性もある。SaCas9は、これまで汎用されているStreptococcus pyogenes由来Cas9(SpCas9, 4.2kbp)と同程度の切断活性でありながら3.2kbpとサイズが小さいため、4.5kbpが上限であるアデノ随伴ウイルス(AV)への組み込みが可能である。最近になり、SaCas9とそのガイドRNAを含む発現カセットをAAVベクターに組み込み、マウス肝臓のコレステロ

ール調節遺伝子 Pcsk9 を標的としたところ、ベクター注入から1週間以内に40%を超える遺伝子改変が観察され、血清中の総コレステロール値の大幅に低下することが報告された¹⁶⁾。このような遺伝子送達系を用いることで、B型肝炎患者の肝臓で安全かつ効率的にHBV cccDNAを除去できると考えられる。

B型肝炎の一番の問題点は、肝炎を発症していないHBVキャリアだけでなく、B型急性肝炎になり肝炎症状が鎮静化しHBV DNAが血中に検出されなくなっても、HBV cccDNAが肝細胞の核内に潜伏感染していることにある。この場合、免疫抑制剤や他のウイルスの重複感染により再活性化する危険性がある。現在のHBV治療に用いる選択薬は、PEG-IFN以外にはテノホビル、エンテカビル、ラミブジン、アデホビルなどのHBV polymeraseの逆転写酵素活性の阻害剤であり、核内のHBV cccDNAには直接作用しない。またこれらの薬剤の長期投与により薬剤耐性変異株が出現する可能性もある。現在まで、肝細胞核内に存在しているHBV cccDNAを駆除する治療薬、治療法は確立されていない。したがって、CRISPR/Cas9システムやCRISPRiは、HBV cccDNAの排除を達成するために有効な治療技術となる可能性がある。今後、肝臓への遺伝子デリバリーなどの技術革新、CRISPR/Cas9システムの更なる改良により、より効果的で安全な治療法となることが期待される。

引用文献

- 1) Cong L, Ran FA, Cox D et al.: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013;339:819-23
- 2) Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al.: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013;339:823-6
- 3) Ma Y, Zhang L, Huang X; Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 2014;281:5186-93
- 4) Gilbert LA, Larson MH, Morsut L et al.: CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013;154:442-51
- 5) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T et al.: Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *World J Gastroenterol* 2015;21:7084-8
- 6) Lin SR, Yang HC, Kuo YT et al.: The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e186
- 7) Seeger C, Sohn JA: Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e216
- 8) Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H et al.: Suppression of hepatitis B virus

DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* 2015;476:196-205

- 9) Zhen S, Hua L, Liu YH et al.: Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther* 2015;22:404-12
- 10) Dong C, Qu L, Wang H, et al.: Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res* 2015;118:110-7
- 11) Liu X, Hao R, Chen S et al.: Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *J Gen Virol* 2015;96:2252-61
- 12) Ramanan V, Shlomai A, Cox DB et al.: CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep* 2015;5:10833
- 13) Karimova M, Beschorner N, Dammermann W et al.: CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep* 2015;5:13734
- 14) Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S et al.: Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 2010;18:947-54
- 15) Bloom K, Ely A, Mussolino C et al.: Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 2013;21:1889-97
- 16) Ran FA, Cong L, Yan WX et al.: In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature* 2015;520:186-191

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. 伊藤昌彦, 鈴木哲朗: CRISPR システムによるB型肝炎ウイルスゲノムの排除と転写抑制, 月刊細胞, 47(11), 566-570, 2015, 査読有.
2. Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Omatsu T, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of the 3' untranslated region in encapsidation of the Hepatitis C Virus, *PLoS Pathog*, 12(2), e1005441, 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005441.

査読有.

- 3 . Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T: Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- in infectious virus production. J. Virol., 88; 7541-7555, 2014, doi:10.1128/JVI.03170-13, 査読有.

[学会発表](計6件)

- 1 . Ito M, Fukasawa M, Kohara M, Suzuki T: HCV infection upregulates expression of cytosolic phospholipase A2 gamma via activation of c-Myc and NFkB pathways, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日、福岡国際会議場(福岡市).
- 2 . Ito M, Fukasawa M, Kohara M, Suzuki T: Lipidomic analysis of the livers in HCV-infected humanized mice by imaging mass spectrometry, 第 22 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2015)、2015 年 10 月 10 日、ストラスブル(フランス)
- 3 . Ito M, Li Y, Sun S, Nakashima K, Suzuki T: LUC7L3/Luc7A/CROP as a negative regulator of enhancer II/basal core promoter of hepatitis B virus, 2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2015 年 10 月 7 日、バードナウハイム(ドイツ)
- 4 . 伊藤昌彦, 福原崇介, 鈴木亮介, 田川陽一, 松浦善治, 脇田隆字, 鈴木哲朗: HuH-7 由来オーバル細胞様細胞株 Hdo による HCV 生活環の調節に関わる分化関連宿主因子の同定, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 11 日、パシフィコ横浜(横浜市).
- 5 . Ito M, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Use of HuH7-derived, Bidirectional Oval-like Cells to Identify Differentiation dependent Host Factors That are Involved in Regulation of HCV Lifecycle, 第 21 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2014), 2014 年 9 月 9 日, パンフ(カナダ).
- 6 . Ito M, Li Y, Sun S, Suzuki T: Identification of novel factors that are implicated in transcriptional regulation of Hepatitis B virus pregenome, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2014 年 9 月 5 日, ロサンゼルス(アメリカ).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 昌彦 (ITO, Masahiko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 5 0 3 8 5 4 2 3