

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17020

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9治療によるB型肝炎ウイルスcccDNA切断後の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology after hepatitis B virus cccDNA cleavage by CRISPR / Cas9 treatment

研究代表者

村井 一裕 (Murai, Kazuhiro)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：50867314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HBVゲノムを標的としたCRISPR/Cas9治療によりHBV感染肝細胞でcccDNAの標的部位にindel形成を認め、cccDNA、pgRNAは低下した。CRISPR/Cas9治療後にPARP活性の上昇を認め、その上昇をPARP阻害剤オラパリブで阻害するとCRISPR/Cas9治療によるcccDNA、pgRNA低下効果は増強した。二本鎖DNA修復過程初期に関わるPARP2-HPF1経路や非相同末端修復(NHEJ)関連遺伝子LIG4を抑制した際もその効果の増強が認められた。CRISPR/Cas9治療では、宿主のNHEJを介したDNA修復によりcccDNA切断効果が減弱することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルス(HBV)に対して様々な新規標的薬開発が進んでいるが、cccDNAを直接標的にした治療法はなく、HBVを体内から完全に排除するにはcccDNAを標的とした新規治療法の開発が重要である。HBVゲノムを標的としたCRISPRがcccDNAに二本鎖切断を誘導し、cccDNAを減少させることが実験レベルでは示されているものの全ての感染細胞にCRISPRを導入してもcccDNAを完全に排除することは出来ない。本研究成果によりCRISPRとolaparibの併用が、cccDNAをより低下させることが明らかとなり、cccDNAを標的とした新規治療法の開発の一助となった。

研究成果の概要(英文)：After CRISPR / Cas9 treatment targeting the HBV genome, indel formation was observed at the target site of cccDNA in HBV-infected hepatocytes, and cccDNA and pgRNA decreased. CRISPR/Cas9 targeting the HBV genome significantly increased PARP activity. PARP inhibitor (olaparib) significantly augmented the reduction of the levels of intracellular pgRNA and cccDNA upon CRISPR therapy. The suppression of PARP2 or HPF1, important for the initial step of DNA repair, or LIG4, essential to non-homologous end joining (NHEJ), significantly enhanced anti-viral effect of CRISPR/Cas9 treatment.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：非相同末端修復結合 olaparib PARP阻害薬 HPF1 LIG4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染患者は世界中で約 2 億 5000 万人と推測されており (Gastroenterology.2019: 156; 297-310)、長期経過により慢性肝炎から肝硬変・肝細胞癌等の致死的な疾患へと至る。現在、抗ウイルス療法としてはインターフェロン (IFN) と核酸アナログが用いられる。いずれもウイルス複製に対する抑制効果を発揮するが、治療中断後に再燃する。その原因は HBV が感染肝細胞核内に形成する cccDNA であり、これら既存の治療法は cccDNA に対する作用は極めて少ない。現在、HBV に対して様々な新規標的薬開発が進んでいるが、cccDNA を直接標的とした治療法はなく、HBV を体内から完全に排除するには cccDNA を標的とした新規治療法の開発が重要である。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/ Cas9 は、任意のゲノム領域に二本鎖切断を誘導することが出来る技術としてゲノム編集に用いられている。この技術の治療応用として、HBV ゲノムを標的とした CRISPR が cccDNA に二本鎖切断を誘導し、cccDNA を減少させることが実験レベルでは示されている (Sci Rep.2015: 5; 10833)。CRISPR が cccDNA を直接標的とした新たな HBV 治療になる可能性が考えられる。一方で、全ての感染細胞に CRISPR を導入しても cccDNA を完全に排除することは出来ない。二重鎖切断の際に生じる DNA 修復機構や cccDNA 維持機構・転写調節機構の分子が CRISPR による治療効果を阻害している可能性が想定されるが、その原因は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、cccDNA を標的とした CRISPR 治療を阻害する因子や cccDNA 切断時に生じる修復機構を解明し、CRISPR との併用により cccDNA の完全排除を可能とする新規治療標的を同定することである。

3. 研究の方法

(1) HBV 感受性肝細胞株での検討

CRISPR の cccDNA に対する効果についてのこれまでの検討はいずれも HBV ゲノム組み込み細胞株や、HBV 感受性細胞株に HBV 感染前あるいは HBV 感染と同時に CRISPR を導入した検討であった。B 型慢性肝炎の治療標的としての有用性を適切に検証するためには、HBV 感染後に CRISPR を導入する必要がある。まず、HBV 感受性細胞株である HepG2-hNTCP-C4 に、DOX 誘導型 Cas9 を遺伝子導入した細胞株である HepG2-hNTCP-iCas9 を作成した。これにより、HBV 感染後の任意の時期で Cas9 の発現を誘導し、CRISPR の治療効果を検討することが可能となった。HBV ゲノムの open reading frame 内にある X 領域、P 領域、C 領域を標的とした gRNA を既報を参考に設計し、HBV やヒトゲノムを標的としないコントロール gRNA も複数設計し、レンチウイルス型の発現ベクターにクローニングした。HepG2-hNTCP-iCas9 に対して、HBV ゲノム組み込み細胞株 HepG2.2.15 株培養上清から調整した HBV の inoculum を 10^4 GEq (genome equivalent)/cell で投与して HBV 感染を成立させた。HBV 感染数日後に DOX を投与し、Cas9 を HBV 感染後に発現させて、培養上清中の HBV DNA、HBs 抗原、HBe 抗原、細胞内プレゲノム RNA (pgRNA)、cccDNA について RT-PCR、ELISA (CLEIA 法) などで検討を行った。cccDNA 修復に関わる遺伝子として宿主の DNA 修復に関わる分子は、siRNA や阻害薬を用いて抑制を行い、CRISPR による cccDNA 減少効果に与える影響を検討した。

(2) 初代培養ヒト肝細胞での検討

肝癌細胞株では初代培養ヒト肝細胞と比べ、各種トランスポーターの機能低下や細胞内自然免疫の低下があり、肝癌細胞株の検討では、実際のヒト生体内で起こり得ない現象を見ってしまう可能性がある。二段階コラゲナーゼ選流法により、ヒト化肝細胞キメラマウスから良好な生存率の初代培養ヒト肝細胞を採取した。初代培養ヒト肝細胞に対して HBV 感染後にレンチウイルスによる CRISPR の導入を行い、cccDNA 抑制効果を検討した。また、HBV 感受性肝癌細胞株の検討で同定した cccDNA 修復に関与する分子候補について、siRNA や阻害薬を用いて抑制を行い、CRISPR による cccDNA 減少効果に与える影響を検討した。

4 . 研究成果

HepG2.2.15 に対する HBV-gRNA/Cas9 導入により、HBV 標的部位に Indel 形成を認め、細胞内 pregenomic RNA(pgRNA)量、培養上清中 HBV DNA 量、HBs・HBe 抗原量が有意に減少した。HBV を感染させた初代培養ヒト肝細胞(PHH)に対する HBV-gRNA/Cas9 導入により、細胞内 cccDNA 量・pgRNA 量、培養上清中 HBV DNA 量、HBs・HBe 抗原量が有意に減少した。HBV-gRNA を導入した HepG2-hNTCP-iCas9 に HBV を感染させた後に Cas9 発現を誘導した結果、cccDNA に Indel 形成を認めた。また Cont-gRNA 導入群と比し細胞内 cccDNA 量・pgRNA 量、培養上清中 HBV DNA 量、HBs・HBe 抗原量が有意に減少した。HBV-gRNA 導入群では Cont-gRNA 導入群と比し、細胞内免疫関連遺伝子群(RIG-I、IRF3、cGAS、STING、ISG15、ISG56)の変化は認めない一方、PARP 活性の有意な上昇を認めた。HBV-gRNA 導入群では、PARP 阻害剤オラパリブにより PARP 活性を抑制した結果、CRISPR による細胞内 cccDNA 量・pgRNA 量減少効果が有意に増強した。また、二本鎖 DNA 修復過程初期に関わる PARP2-HPF1 経路や非相同末端修復(NHEJ)関連遺伝子 LIG4 を siRNA により抑制した際もその効果の増強が認められた一方、相同組換え関連遺伝子 BRCA の抑制では認められなかった。HBV 感染 PHH に対して HBV-gRNA/Cas9 とオラパリブを併用した結果、単独群と比し有意な細胞内 cccDNA 量・pgRNA 量の低下が認められた。cccDNA を標的とした CRISPR/Cas9 による抗ウイルス効果は NHEJ を介した DNA 修復経路の阻害により増強された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuhiro Murai, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Keisuke Fukutomi, Satoshi Shigeno, Yuto Shiode, Daisuke Motooka, Yuichiro Higuchi, Kei Miyakawa, Hiroshi Suemizu, Akihide Ryo, Yuki Tahata, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of nonhomologous end joining-mediated DNA repair enhances anti-HBV CRISPR therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村井一裕、小玉尚宏、疋田隼人、下田彬允、福岡誠、福富啓祐、山井琢陽、中堀輔、山田涼子、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 HBVに対するアデノ随伴ウイルス型CRISPR/Cas9による治療効果の検討
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Efficacy of novel anti-HBV combination therapy with CRISPR/Cas9 targeting HBV genome and inhibitors of host DNA synthesis/repair pathways.
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会（JDDW2020）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Keisuke Fukutomi, Yuki Tahata, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Novel anti-HBV therapies using CRISPR/Cas9 targeting HBV genome strongly suppress HBV
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting Digital Experience (TLMDx)（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村井一裕,小玉尚宏,疋田隼人,下田彬允,福岡誠,福富啓祐,田畑優貴,牧野祐紀,山田涼子,阪森亮太郎,巽智秀,竹原徹郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9とPARP阻害薬(オラパリブ)によるB型肝炎根治を目指した新規治療法の検討
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Novel anti-HBV combination treatment of CRISPR/Cas9 and suppression of NHEJ-mediated DNA repair
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会 (JDDW2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Jihyun Sung, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Satoshi Shigeno, Keisuke Fukutomi, Yuki Tahata, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Novel anti-HBV combination treatment using CRISPR/Cas9 targeting HBV genome and suppression of NHEJ-mediated DNA repair
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井一裕,小玉尚宏,竹原徹郎
2. 発表標題 B型肝炎根治を目指したCRISPR/Cas9によるウイルスゲノム切断とDNA 修復経路阻害併用療法の開発
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------