

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：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

2. 研究開発代表者：溝上雅史（国立研究開発法人国立国際医療研究センター）

3. 研究開発の成果

・溝上雅史（研究開発代表者）

人工キメラ遺伝子の改良を進め、切断効率のさらなる向上を行い、RNAからの翻訳効率の上昇、RNA分解の抑制といった機能配列を組み込んだものを作成し、その効果の判定を行った。HBV感染したヒト肝細胞置換キメラマウスで *in vivo* 試験を実施し、それらのHBV切断効果と炎症誘導能が低いことを確認した。

・片岡一則（研究開発分担者）

本年度では、ナノデバイスの最適化を行うことで、肝臓に効率的に人工キメラ遺伝子を発現させることに成功した。更に、B型肝炎モデルマウスにおいて、マウス血液中のウイルス量を検出感度以下まで低下させることに成功するなど、優れた治療効果が得られた。

・中西真（研究開発分担者）

マウスモデルに人工キメラ遺伝子を投与し、肝組織、腎組織における DNA 損傷応答反応を解析した。その結果、腎臓および肝組織において DNA 損傷応答機構の活性化は検出されなかった。FACS 解析で ZFN 人工キメラ遺伝子導入が肝細胞および腎細胞の細胞周期動態に影響を与えないことも明らかとなった。

・武富紹信（研究開発分担者）

本年度では、1)全ゲノム解析を念頭においていた切除肝組織、血液の収集と管理体制の構築、2) 肝切除症例の切除肝組織、血液の集積（症例の追加）、3) 切除肝組織の修復、肝細胞培養の至適条件（ヒト、ラット）、不死化細胞樹立のための各種ベクター作成、4) 遺伝子編集の実験系の構築、を実施した。

・星野真一（研究開発分担者）

本年度は RNA 分解経路の全容を解明することに成功し、siRNA により阻害することで人工合成 mRNA を安定化するとともに翻訳量も増加させることにも成功した。阻害剤の候補としてクルクミンを同定した。

・田中榮司（研究開発分担者）

今回開発した新規 HBs 抗原測定系は、HBs 抗体を失活させると同時に HBs 抗原を高感度に検出することが可能である。従来の測定系で HBs 抗原消失と判定された症例を対象に新規測定系を使用すると、HBs 抗原消失と判定後、年余に亘って HBs 抗原を検出することが可能であった。

・杉山真也（研究開発分担者）

ヒト肝細胞の核内に存在している HBV ゲノムへの切断が正しく行われているかの確認実験を進めた。初代培養肝細胞やヒト肝細胞置換キメラマウスを利用し、*in vitro* と *in vivo* でゲノム配列の検証を行ったところ、非特異的な DNA 切断は認められず、HBVDNA の切断配列を複数同定した。

・福原崇介（研究開発分担者）

HBVゲノムを標的としたsgRNAおよびCas9、Nickase、dCas9の発現系を作製し、HBV感染および複製への抑制効果を検討した。いずれにおいてもHBVの複製を抑制しうることが明らかになった。

・尼子豊（研究開発分担者）

CRISPR/Cas9でのHBVゲノム分解の至適条件探索用にGateway vector systemを構築した。Cas9野生型（二重鎖切断）、Nickase型（一本鎖切断）及びDefective型（標的への結合のみ）の三種類を構築し、HBV ゲノム上の 16 の異なる箇所を標的とするガイドRNAとの組み合わせ効率を評価した。

4. その他

該当なし