

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業

肝炎等克服実用化事業 肝炎等克緊急対策研究事業

(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) HBV ゲノムを多数同時切断し破壊する多重ガイド RNA 発現アデノベクター及びモニター用蛍光誘導 HBV ゲノムの開発

(英語) Developments of adenovirus vectors expressing multiplex guide RNAs for simultaneous cleavage/disruption of HBV genome and HBV genomes for monitoring using fluorescent induction

研究開発担当者 (日本語) 医科学研究所 教授 斎藤 泉

所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, Professor, Izumu Saito

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) HBV ゲノム蛍光モニターシステムの開発

開発課題名：(英語) Development of the system for fluorescent monitoring of HBV genome

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 上級研究員 山崎 学

所属 役職 氏名：(英語) Microbial Chemistry Research Foundation, Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN), Senior Researcher, Manabu Yamazaki

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者の斎藤は、山崎 学 上級研究員（微生物化学研究会 微生物化学研究所）とともに、次のような成果を得た。まず Cas9 を用いたこれまでのゲノム編集技術よりも格段に安全性が高い double-nicking を行いながら同時に 2 ヶ所のゲノム切断を行うのに必要な 4 個の多重ガイド RNA 発現ユニットを持つだけでなく、そのアデノベクターゲノム上にさらに 5 kb の外来 DNA を組み込んだ「多重ガイド・外来遺伝子同時発現型アデノベクター」の作製に成功した。この成功は 2 年目において今回の外来遺伝子の代わりに double-nicking を起こす Cas9 nickase を用いることにより、ゲノム編集治療薬開発で現在望まれている「double-nicking all-in-one アデノベクター」の作製に向けた大きな進展である。一方本件のもうひとつの柱である HBV ゲノムの蛍光検出系については、トランスフェクション系において HBV PreS1 プロモーターという弱いプロモーターを用いた場合でも分断 Cre（ α Cre および β Cre）の同時発現により、実際に Cre 活性により HBV ゲノムを持つプラズミドが蛍光検出できることが示された。

HBV ゲノムを標的とする慢性 B 型肝炎の治療が難しい理由は、HBV の ccc ゲノムが二本鎖 DNA であり、ミニ染色体のように安定であることによる。現在のところ HBV 二本鎖 DNA ゲノムを積極的に破壊する治療薬はない。研究代表者は HBV ゲノムだけを標的として切断破壊する CRISPR/Cas9 系のガイド RNA を、多数個同時に発現する安定なプラズミドの作製に成功し特許を出願した。Cas9 系の臨床応用には Cas9 nickase を用いて安全性を担保する方法（double nicking 法）が必須であるが、2 つのガイドを同時に発現させる必要がある。代表者の方法は安全かつ効果的な切断が行える 4 個以上のガイドの同時発現が可能である。

一方ゲノムの切断破壊をモニターするためには HBV ゲノムの減少度を簡便に定量する方法の開発が必要である。そこで複製した HBV ゲノムの量を蛍光でしかも高感度に測定できる「蛍光誘導 HBV ゲノム」の開発を上記と平行して行う。HBV ゲノムは小さいため GFP 遺伝子全長を組み込むことはできない。そこで提案者は Cre の前半（ α -Cre）と後半（ β -Cre）を同時発現させると両者が会合し活性を示す現象（ α 相補）を利用し、HBV ゲノムが複製できる大きさの「split Cre」を組み込むことで高度に増幅した蛍光を誘導する HBV ゲノムの作製を行った。その結果、実際に HBV の PreS1 プロモーターから発現した α -Cre も β -Cre も蛍光を誘導することがトランスフェクション実験で観察された。

平成 28 年度ではトランスフェクション実験において今回我々が設計した α Cre と β Cre が分子会合して確かに活性を持ち蛍光を誘導することをまず示した。しかも実際に HBV ゲノムを定量するためには外来プロモーターからではなく、HBV ゲノム上のプロモーターで発現する分断 Cre の量で十分でなければならない。実際に HBV PreS1 プロモーターから発現する量の分断 Cre で蛍光が誘導されることが実証されたのは大きな進歩と考えられる。

The representative of the research and development obtained the results described below with Dr. Manabu Yamazaki, Senior Researcher in Microbial Chemistry Research Foundation, Institute of Microbial chemistry (BIKAKEN). First, we succeeded in the construction of “adenovirus vectors simultaneously expressing multiplex guide RNAs (gRNAs) and a foreign gene product”. This vector was used for gene editing adopting the double-nicking strategy, remarkably superior to current method using Cas9, possesses not only four gRNA-expression units necessary for double cleavage of the target, but also a large (5kb) foreign DNA. The success offered a basis for establishment of “double-nicking adenovirus vector of all-in-one type”, which is planned in the second year using the expression unit of Cas9 nickase instead of this 5kb DNA and currently desired for the development of gene-editing drugs. Second, as for the development of the system of the fluorescent detection of HBV genome, the other project of this program, it was shown that the plasmid containing HBV genome was able to be detected even using a weak PreS1 promoter of HBV in the system of the split Cre's (α -Cre and β -Cre) in the transfection experiments.

The current methods of the therapy against chronic hepatitis targeting HBV genome, nucleotide analogs for example, are not sufficiently effective. One of the reason is that the HBV ccc genomes consisting of double-strand DNA are extremely stable as if they are the cellular chromosomes. At present, there is no method to destroy directly the double-strand DNA genomes. The representative researcher of his project has been succeeded in the construction of completely-stable plasmids expressing multiplex gRNAs (patent pending) . The double-nicking strategy is valuable for secure safety but simultaneous expression of the two gRNAs for one cleavage is needed for this system. The representative researcher developed a method for simultaneous expression of more than four gRNAs, which may probably be effective for safe and efficient cleavage.

Meanwhile, it is essential for establishment of a method to monitor and quantify the amount of HBV genome. Therefore, in parallel, we are constructing the “fluorescence-inducing HBV genome” aiming sensitive measurement. HBV genome is, however, too small to insert GFP gene without maintaining its genome replication. Therefore, we utilized to the phenomenon that the simultaneous expression of the first half of Cre (α Cre) and the latter half (β Cre) resulted in automatic assemble and acquisition of Cre activity (α -complementation). Actually, we observed that simultaneous expression of α Cre and β Cre expressed under the control of a potent EF1 α promoter successfully showed efficient induction of GFP expression by removing a spacer DNA flanked with loxPs that inhibit GFP expression. Moreover, either α Cre or β Cre expressed by HBV preS1 prompter does induced Cre-dependent GFP expression in the transfection experiments. These results demonstrated that in the transfection experiments the system using split Cre's inserted in the HBV genome worked efficiently.

In the second year using α Cre and β Cre system we planned to perform these experiments using our adenovirus vector system instead of transfection. The constructions of the vectors for these experiments are now under way.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Matsuda N, Nomoto A, Suzuki T, Saito I (corresponding author), Kanegae Y. Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. Sci. Rep., 2017, 7:41851.
2. Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Shi G, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single-domain intrabodies against hepatitis C virus core inhibit viral propagation and core-induced NFκB activation. J. Gen. Virol., 2016 97:887-892.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Improvement of the efficiency in CRISPR/Cas9 system against Hepatitis B virus using adenovirus vector, ポスター, 近藤小貴, 前川文, 鈴木まりこ, 鐘ヶ江裕美, 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会, 2016/7/28, 国内.
2. ガイド RNA 多重同時発現法の開発とアデノウイルスベクターへの応用, 口頭, 斎藤泉, 日本ゲノム編集学会 第 1 回大会, 2016/9/6, 国内.
3. Cas9 及び多重 guide RNA 発現アデノウイルスベクターを用いた高効率 HBV DNA 除去システム, 前川文, 斎藤泉, 鐘ヶ江裕美, 日本ゲノム編集学会 第 1 回大会, 2016/9/6, 国内.
4. CRISPR/Cas9 システムを利用した MHC class II ノックアウト NSG マウスの作製, 中西友子, 権賢貞, 堀江亮, 内田翔太郎, 米田美佐子, 斎藤泉, 甲斐知恵子日本ゲノム編集学会 第 1 回大会, 2016/9/6, 国内.
5. The efficient elimination system of HBV DNA using adenovirus vector expressing Cas9 and multiplex guide RNAs, 口頭, 前川文, 鈴木まりこ, 斎藤泉, 鐘ヶ江裕美, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/24, 国内.
6. Efficient elimination system of HBV DNA using adenovirus vector expressing Cas9 and multiplex guide RNAs, ポスター, 前川文, 斎藤泉, 鐘ヶ江裕美, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内.

日経産業新聞 平成 28 年 9 月 14 日朝刊 「B 型肝炎やエイズ根治に挑む ゲノム編集で DNA 切断」 慈恵医大鐘ヶ江准教授・東京大学(本研究)と共同

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし