

Suppression of HBV replication by the expression of nickase-and nuclease dead-Cas9

栗原, 健

<https://doi.org/10.15017/1928623>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (医学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



氏 名：栗原 健

論 文 名：Suppression of HBV replication by the expression of nickase- and
nuclease dead-Cas9

(新しいゲノム編集ツールである nickase-Cas9 および nuclease dead-Cas9
を用いた B 型肝炎ウイルスを標的とした治療法の確立に関する研究)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

【背景】 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。近年の研究において、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開発が試みられており、Cas9 蛋白と特定のゲノム配列を認識する single-guide RNA の組み合わせによって *in vitro* 及び *in vivo* において B 型肝炎ウイルスゲノムに対して DNA2 本鎖切断を誘導しうることが報告されている。Cas9 は 2 つの DNA 切断基質を有し、single-guide RNA 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され、修復の過程で挿入欠損変異や相同組み替えが行われる。Cas9 によるターゲット配列への変異の導入は簡便であるが、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。【方法と結果】 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 及び両方の DNA 切断基質を失活させた nuclease dead-Cas9 の発現系を確立し、B 型肝炎ウイルスに対する効果を検討した。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レンチウイルスベクターを用いて発現させたところ、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 nickase-Cas9 蛋白発現プラスミドと 2 つの single-guide RNA 発現プラスミド及び標的となる B 型肝炎ウイルスゲノム配列を持つシフエラーゼ発現プラスミドを、ハイドロダイナミック法を用いてマウスに尾静脈より導入したところ、マウス肝臓内で標的となる B 型肝炎ウイルスゲノムの切断が確認された。また、d-Cas9 蛋白においても single-guide RNA を B 型肝炎ウイルスが複製する肝癌細胞株にレンチウイルスベクターを用いて発現させたところ、細胞株内の B 型肝炎ウイルスの複製が抑制された。【総括】 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。