

## 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

(別紙様式2)

氏名	栗原 健			
論文名	Suppression of HBV replication by the expression of nickase-and nuclease dead-Cas9			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	鈴木 淳史
	副査	九州大学	教授	柳 雄介
	副査	九州大学	教授	中村 雅史

### 論文審査の結果の要旨

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。この問題に対し、近年では、新しいゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9系を用いて、肝細胞核内に存在するB型肝炎ウイルスDNAを標的とした治療法の開発が試みられている。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DNA2本鎖切断を引き起こす。その結果、切断部位の修復過程において挿入欠損変異や相同組換えが生じる。このように、Cas9による標的配列への変異導入は容易だが、宿主細胞に予想外の非標的DNA切断をもたらす危険性もある。そこで申請者は、Cas9の発現による非標的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、並びに両方のDNA切断基質を失活させたnuclease dead-Cas9 (dCas9)の発現系を確立し、B型肝炎ウイルスのDNAを有する細胞に対する効果を検討した。nickase-Cas9と共にB型肝炎ウイルスDNAの両鎖を標的としたペアのsingle-guide RNAをB型肝炎ウイルスの複製が認められる肝癌細胞株に発現させたところ、B型肝炎ウイルスDNAに2本鎖切断が生じ、ウイルス蛋白の減少やウイルスの複製抑制が観察された。マウス肝臓内においてもその効果を検証したところ、nickase-Cas9によるB型肝炎ウイルスDNAの切断が可能なが確認された。一方、dCas9を発現させた肝癌細胞株では、DNAの切断がなくても、Cas9蛋白複合体がB型肝炎ウイルスDNAに結合するだけで、B型肝炎ウイルスの複製が抑制された。以上の結果から、nickase-Cas9とペアのsingle-guide RNAを組み合わせることで、宿主DNAへの変異導入リスクを軽減させたB型肝炎ウイルスDNA完全排除の可能性が見出された。

以上の成績はこの方面の研究に知見を加えた意義あるものと考えられる。本論文についての試験は、まず研究の目的、方法、結果、考察などについて説明を求め、次いで各調査委員より専門的な観点から論文内容及びこれに関連した事項について種々の質問を行い、いずれについても適切な回答を得た。

なお本論文は共著者13名であるが、予備調査の結果、本人が主導的役割を果たしていることを確認した。

よって、調査委員合議の結果、試験は合格であると判断した。