

## 「D 型肝炎ウイルスを利用した遺伝子導入技術の開発と B 型肝炎治療への応用」

現在の所属 浜松医科大学肝臓内科 職位 診療助教

氏名 千田 剛士

### 要旨

Hepatitis B virus (HBV) は肝線維化および肝発癌の要因である。HBV ゲノムは covalently closed circular DNA (cccDNA) という安定した形態で核内に存在するため、既治療による完全排除が困難である。本研究では、肝指向性を有する Hepatitis delta virus (HDV) を遺伝子導入ベクターとして応用し、cccDNA の維持に関わる HBV pregenomic RNA (pgRNA) を標的とした siRNA を肝細胞へ導入する新規治療法の基盤構築を目的とした。HDV ゲノムの改変許容性を検討した結果、特定のループ構造への遺伝子挿入を行ってもゲノム複製能が維持されることが明らかとなった。さらに、HDV ゲノムに siRNA 前駆体である hairpin RNA を組み込んで肝癌細胞株で発現させると、細胞内において Drosha 依存的に標的遺伝子の発現が抑制されることを実証した。HBV pgRNA を標的とした siRNA 配列の検討では、pgRNA を著明に抑制する配列を同定した。本研究は、HDV を用いた肝特異的遺伝子導入技術の有用性を示し、cccDNA 排除を目指した HBV 根治療法の開発に向けた重要な基盤を提供する。

### 背景・目的

Hepatitis B virus (HBV) は肝臓癌の主要な原因であり、持続感染者は全世界で約 2.5 億人、HBV 関連疾患の死亡者は年間約 130 万人である<sup>(1)</sup>。HBV に対する抗ウイルス療法の最終目標は、肝臓から HBV ゲノムを完全に排除することにある。しかしながら HBV ゲノムは感染肝細胞の核内において covalently closed circular DNA (cccDNA) という安定した形態で維持され、宿主免疫および現在保険適応となっている治療によってウイルスを排除することは極めて困難である<sup>(2)</sup>。

本研究では cccDNA の前駆体である HBV pregenomic RNA (pgRNA) を標的とした siRNA を用い、pgRNA の分解およびそれに伴う cccDNA 合成の抑制を図る戦略に着目した。肝細胞への siRNA の導入手段として、Hepatitis delta virus (HDV) を遺伝子改変したウイルスベクターの利用を試みた。

HDV は約 1.7Kb の一本鎖環状 RNA をゲノムとし、ウイルス蛋白質として HD 抗原のみをコードしている。ヒト肝細胞において HBV と共感染し、HBV が発現する HBs 抗原を自身のエンベロープ蛋白として粒子形成している。HBs 抗原を介して、HDV は肝細胞特異的に感染する。これまでに、HDV のゲノム複製がヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞において少なくとも 8 週間持続することを見出している<sup>(3)</sup>。さらに、HDV ゲノムはエピゾーマルに複製され、宿主染色体へ組み込まれないことから、遺伝子導入ベクターとしての安全性の面でも利点を有すると考えられる。これらの特性を踏まえ、HDV を siRNA 発現ベクターとして応用することで、ヒト肝臓に対して特異的かつ持続的に効果を発揮するベクターの実現が可能であると考えた。

本研究では、HDV ゲノムに siRNA 配列を組み込んだ HDV ベクターの構築と評価を行い、HBV pgRNA を標的とする新規遺伝子治療法開発に向けた技術基盤の確立を目指す。

## 方法

**方法①：HDV ゲノムに任意の遺伝子を挿入しゲノムの改変許容性を理解する。**

HDV ゲノムはゲノム内の相補塩基対により rod-like の二次構造をとる。この二次構造を維持しつつ、HDV ゲノムの中に複数存在するループ構造に任意の遺伝子を挿入する (図 1)。遺伝子の編集は HDV ゲノム発現プラスミドに、inverse PCR 法を用いて行う。作成した HDV ゲノム発現プラスミドを肝癌細胞株に導入後、HDV RNA を Taqman qPCR で定量して複製能を評価する。この結果により HDV ゲノムのどの位置にどのような改変が許容されるか理解する。

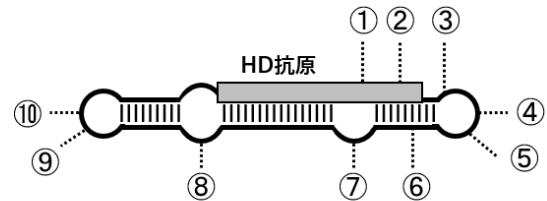


図1 HDVゲノム改変の候補

**方法②：標的遺伝子に対する siRNA 前駆体 (hairpin RNA) を HDV ゲノムに導入し、肝細胞内で HDV ゲノム複製と同時に siRNA が発現することを立証する。**

方法①の結果をもとに HDV ゲノム内の遺伝子導入可能部位に標的遺伝子に対する siRNA の前駆体 (80~100 nt) を挿入する。siRNA 前駆体は図 2 のような hairpin RNA の構造を取り入れ、遺伝子を導入した細胞内で Drosha により切断され siRNA が発現するように設計する。

作成した HDV ゲノム発現プラスミドを肝癌細胞株に導入後、細胞内での siRNA 発現量とそれによる標的遺伝子発現の変化を評価する。また肝癌細胞株から CRISPR-Cas9 を用いて Drosha ノックアウト細胞を作成し、Drosha ノックアウト細胞では siRNA によるノックダウン効果が見られないことを確認する。

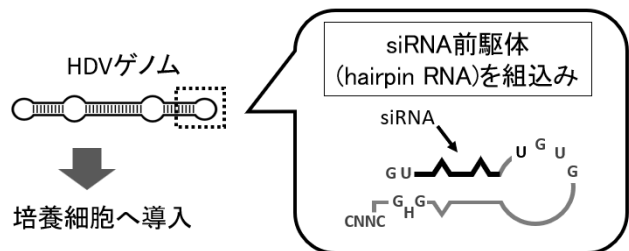


図2 HDVゲノムへのsiRNA導入の概略

**方法③：HBV pgRNA を標的とする最適な siRNA を設計し、HDV ベクターに組み込む**

HBV pgRNA を標的とした干渉作用をもつ siRNA 配列(5'-GGACUUCUCUCAAUUUUCUTT-3')が知られているが、pgRNA の抑制効果を最大化するため、その他の候補配列との比較を行う。最も効果の高い siRNA 配列を hairpin RNA の構造で HDV ベクターに組み込む。

## 結果

**① HDV ベクター産生細胞における HDV ゲノムの改変許容性の解明とベクター粒子作成条件の検討**

HDV ゲノムの二次構造においてループ構造を形成する部分に 18 塩基の配列を挿入し (塩基の挿入位置については図 1 を参照)、培養肝細胞に導入してゲノムの複製について調べた (図 3)。

④および⑤の位置に塩基を追加しても、未改変の HDV と比較して複製効率の低下が見られないことが明らかになった。

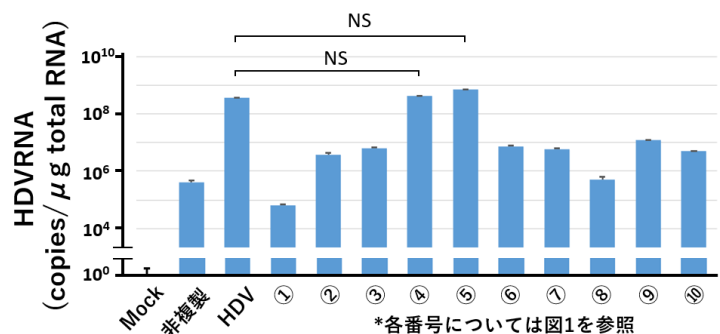


図3 遺伝子導入によるHDVゲノム複製の変化

## ② 改変 HDV ゲノムを導入した標的細胞における siRNA 発現と標的遺伝子抑制効果の検証

①の知見を踏まえて hairpin RNA の最適な挿入位置を決定した。改変した HDV ゲノムを標的細胞に導入すると、効果的に標的遺伝子の発現を抑制することが実証された。さらに siRNA の成熟化に必要な Drosha を CRISPR-Cas9 で欠損させた細胞 (Drosha-KO 細胞) を作成し、同様に改変 HDV ゲノムを導入したところ抑制効果が見られなかったことから、HDV ゲノムに組み込んだ siRNA が発現して機能していることが示された (図 4)。

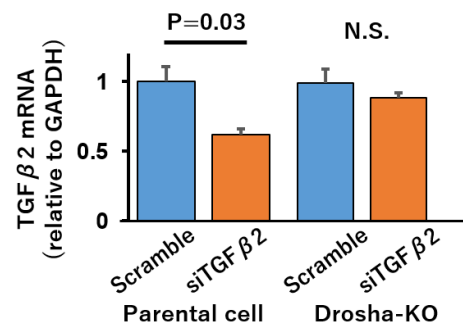


図4 HDVベクターによる標的遺伝子抑制効果 (HDVゲノム導入後7日)

## ② HBV pgRNA 抑制に効果的な siRNA 配列の探索

HBV pgRNA を標的とする複数の siRNA 配列候補を比較し、高い抑制効果を持つ配列を同定した。

図 5 の si pgRNA-2 を導入すると、コントロールと比較して pgRNA のコピー数が約 0.01 倍となり、この配列が遺伝子治療において有用であると考えられた。

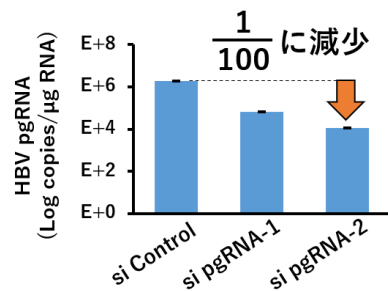


図5 pgRNA抑制に効果的なsiRNA

## 考察

HBV は全世界で感染者数が約 2.5 億人、HBV 関連死者数が年間約 130 万人とされ、公衆衛生上の大きな問題である。本邦ではpeg化インターフェロンおよび核酸アナログが抗ウイルス薬として承認されており、これまでに HBV 侵入阻害薬やキャプシド集合阻害薬などの治療薬開発も進められてきた。しかしながら、これらの治療法はいずれも作用機序から考えて cccDNA の持続を根本的に断つには至っていない。

本研究では、肝指向性を有する HDV を遺伝子導入ベクターとして応用し、HBV pgRNA を標的とする siRNA を肝細胞へ導入する治療基盤の構築を試みた。HDV ゲノムの特定部位は外来配列の挿入を許容し、rod-like 構造を維持することで複製能が保たれることが示された。また、HDV ゲノムに組み込んだ hairpin RNA から Drosha 依存的に siRNA が産生され、標的遺伝子の抑制効果が確認された。

今後は HBV pgRNA に対する siRNA を組み込んだ HDV ベクターを作成し、培養肝細胞および動物モデルを用いて抗ウイルス効果の検証を進める予定である。HBV pgRNA を標的とする siRNA により cccDNA を減少させることができれば、HBV 治療において本手法が新たな選択肢となる可能性がある。本研究は、HBV 治療戦略に寄与し得る基礎的知見を提供するものであり、将来的には公衆衛生上の課題解決に資する治療開発への展開が期待される。

## 共同研究者

川田一仁・浜松医科大学内科学第二講座・准教授

鈴木哲朗・浜松医科大学次世代創造医工情報教育センター・特任教授

## 引用論文

1. CDC. Viral Hepatitis. 2025. Global Viral Hepatitis. : <https://www.cdc.gov/hepatitis/global/index.html>
2. Reville PA, Chisari FV, Block JM, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019;4(7):545–58.
3. Chida T, Ishida Y, Morioka S, et al. Persistent hepatic IFN system activation in HBV-HDV infection determines viral replication dynamics and therapeutic response. *JCI Insight.* 2023;8(9):e162404.

## 助成研究に関連した発表論文

該当なし