

| | |
|------|-------|
| 課題番号 | LS051 |
|------|-------|

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

| | |
|----------------|---|
| 研究課題名 | 遺伝子改編酵素群 AID/APOBEC がつくる B 型肝炎慢性化と発癌の機序 |
| 研究機関・ 部局・職名 | 金沢大学・医学系・教授 |
| 氏名 | 村松 正道 |

1. 当該年度の研究目的

試験管内実験系を使って AID/APOBEC がウイルスゲノムに与える作用と感染細胞のゲノムに与える影響を検討し、AID/APOBEC のウイルス慢性化の病態とウイルス発ガンへの寄与を検討する事を目標にした。具体的な評価方法としては、薬剤耐性ウイルス出現等のウイルスの遺伝的多様性、ウイルスゲノムの感染細胞ゲノムへの挿入、p53 変異等のゲノム不安定指標の検討をする。マウスモデルではハイドロダイナミクス法による肝炎モデルの構築とその肝炎モデルの AID/APOBEC の病態の寄与を見る。臨床検体解析系では、パイロットケースや模擬サンプルを使って解析系の整備をする。以上、3つのアプローチにより AID/APOBEC の B 型肝炎ウイルスとウイルス慢性化と発ガンの寄与を決めるためのデータを収集する。

2. 研究の実施状況

試験管実験系では、AID/APOBEC の発現によるウイルスゲノムの遺伝的多様性増幅を観察した。その多様化過程で HBV 治療薬ラミブジンの薬剤を誘導する変異 YIDD を検出した。AID/APOBEC が薬剤耐性株を作る可能性が示唆されたが、そのようなウイルス株はすべて YIDD の変異以外に多数の変異も同時に蓄積しており、ウイルスとしては replication できない事もわかった。この結果は、薬剤耐性株を作り出す状況でも、AID/APOBEC の変異は抗ウイルス因子として働く事を示唆した。

また試験管実験系に、ヒト子宮頸癌由来細胞株 W12 の系を導入した。この系は発ガンウイルスの慢性感染を模倣できる事が知られている。この細胞系でも AID/APOBEC の発現によりウイルスの遺伝的多様性が蓄積する事を見いだした。

マウスモデル系では、ハイドロダイナミクス法によりマウス肝臓で HBV の複製を確認し、少なくとも急性肝炎がある程度模倣する事に成功した。しかし尾静脈からマウス肝臓へのレプリコン導入に失敗する事も多く技術上の問題点も明らかとなった。そこでレプリコンが導入されたマウスを末梢血で識別できるようレポーター遺伝子の共導入を応用して、各遺伝子欠損マウスでの検討に入っている。

臨床検体解析系では、パイロットサンプルで検体より DNA を抽出しウイルスの遺伝子型の決定、検体のゲノム不安定性の検出、ウイルス遺伝子多様性を検出するプロトコールの整備をした。

3. 研究発表等

| | |
|------------------------|---|
| <p>雑誌論文 計 2 件</p> | <p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 Kondo S, Wakisaka N, Muramatsu M, Zen Y, Endo K, Murono S, Sugimoto H, Yamaoka S, Pagano JS, Yoshizaki T Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines. J Virol. 2011 Nov;85(21):11255-64. Epub 2011 Aug 17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849440</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件 Zhe Wang, Kouichi Kitamura, Miki Koura, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki, and Masamichi Muramatsu APOBEC3 deaminates the E2 gene of human papillomavirus-16 The Waksman Foundation of Japan Inc. Report of researches in 2010</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p> |
| <p>会議発表 計 12 件</p> | <p>専門家向け 計 10 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物学シンポジウム、喜多村晃一、Zhe Wang、Sajeda Chowdhury、島津美幸、小浦美樹、<u>村松正道</u> 「Uracil Excision Repair Pathway in APOBEC3G-edited Hepatitis B virus Genome」、金沢市、2011.5.25-26、日本分子生物学会/金沢大学 ・IUMS2011, XV International Congress of Virology/第 59 回日本ウイルス学会学術集会合同開催、喜多村晃一、Zhe Wang、Sajeda Chowdhury、島津美幸、小浦美樹、<u>村松正道</u> 「Contribution of Uracil DNA Glycosylase to anti-Hepatitis B virus effect of APOBEC3G」、札幌市、2011.9.11-16、International Union of Microbiological Societies/日本ウイルス学会 ・第 40 回日本免疫学会学術集会、喜多村晃一、Zhe Wang、Sajeda Chowdhury、島津美幸、小浦美樹、<u>村松正道</u> 「Base Excision Repair Pathway in Hypermutated Hepatitis B virus Genome 高頻度突然変異を受けた B 型肝炎ウイルスゲノムにおける塩基除去修復機構」、千葉市、2011.11.27-29、日本免疫学会 ・日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物学シンポジウム、Guoxin Liang、G Liu、K Kitamura、Z Wang、<u>M Muramatsu</u> 「AID suppresses hepatitis B virus replication and induces hypermutation in virus genome」、金沢市、2011.5.25-26、日本分子生物学会/金沢大学 ・日本生化学会北陸支部大会、Guoxin Liang、G Liu、K Kitamura、Z Wang、<u>M Muramatsu</u> 「AID suppresses hepatitis B virus replication and induces hypermutation in virus genome」、金沢市、2011.5.28-29、日本生化学会北陸支部/金沢大学 ・IUMS2011, XV International Congress of Virology/第 59 回日本ウイルス学会学術集会合同開催、Guoxin Liang、G Liu、K Kitamura、Z Wang、<u>M Muramatsu</u> 「AID suppresses hepatitis B virus replication and induces hypermutation in virus genome」、札幌市、2011.9.11-16、International Union of Microbiological Societies/日本ウイルス学会 ・第 40 回日本免疫学会学術集会、Guoxin Liang、G Liu、K Kitamura、Z Wang、<u>M Muramatsu</u> 「AID suppresses hepatitis B virus replication and induces hypermutation in virus genome」、千葉市、2011.11.27-29、日本免疫学会 ・日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物学シンポジウム、Zhe Wang、Kouichi Kitamura、Kazunari Kondo、Miki Koura、Satoru Kondo、Tomokazu Yoshizaki、<u>Masamichi Muramatsu</u> 「APOBEC3 deaminates E2 gene of human papillomavirus 16」、金沢市、2011.5.25-26、日本分子生物学 |

様式19 別紙1

| | |
|--|---|
| | <p>会/金沢大学</p> <ul style="list-style-type: none"> ・金沢大学脳医科学専攻シンポジウム、Zhe Wang、Kouichi Kitamura、Iwao Kukimoto、Kazunari Kondo、Miki Koura、Satoru Kondo、Tomokazu Yoshizaki、<u>Masamichi Muramatsu</u> 「Deamination of human papillomavirus 16 E2 gene by APOBEC3 proteins」、金沢市、2011.1.30、金沢大学 ・金沢大学脳医科学専攻シンポジウム、Guangyan Liu、Guoxin Liang、Kouichi Kitamura、Weixin Fu、Zhe Wang、<u>Masamichi Muramatsu</u> 「AID suppresses HBV replication and induces hypermutation in virus genome」、金沢市、2011.1.30、金沢大学 <p>一般向け 計 2 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本財団助成 15 周年記念共同研究等助成事業報告会、Zhe Wang、「薬剤耐性ウイルス出現における自然免疫効果分子 APOBEC の役割」、東京、2011.7.1、日中医学協会 ・金沢大学まちなかサイエンスセミナー、村松正道、「免疫系：場合によってはガンを作るかも?」、金沢市、2011.12.23、金沢大学 |
| <p>図 書</p> <p>計0件</p> | |
| <p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p> | <p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p> |
| <p>Webページ (URL)</p> | <p>http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/</p> |
| <p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p> | <p>2011.12.23 金沢大学まちなかサイエンスセミナー「免疫系：場合によってはガンを作るかも?」、村松 正道</p> <p>内容:金沢大学の最先端・次世代プログラムの紹介(他5件)、 対象:一般市民、 参加者数:約 50 名</p> |
| <p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p> | |
| <p>その他</p> | |

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

| | ①交付決定額 | ②既受領額 (前年度迄の 累計) | ③当該年度受 領額 | ④(=①-②- ③)未受領額 | 既返還額(前 年度迄の累 計) |
|------|------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 69,000,000 | 31,211,000 | | 37,789,000 | |
| 間接経費 | 20,700,000 | 9,363,300 | | 11,336,700 | |
| 合計 | 89,700,000 | 40,574,300 | 0 | 49,125,700 | 0 |

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

| | ①前年度未執 行額 | ②当該年度受 領額 | ③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く) | ④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入 | ⑤当該年度執 行額 | ⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額 | 当該年度返還 額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 29,679,420 | 0 | | 29,679,420 | 27,048,222 | 2,631,198 | |
| 間接経費 | 9,363,300 | 0 | | 9,363,300 | 1,463,524 | 7,899,776 | |
| 合計 | 39,042,720 | 0 | 0 | 39,042,720 | 28,511,746 | 10,530,974 | 0 |

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

| | 金額 | 備考 |
|---------|------------|--------------------------|
| 物品費 | 21,912,822 | 吸光蛍光発光マイクロプレートリーダー、実験試薬等 |
| 旅費 | 420,660 | 研究資料収集旅費(IUMS2011)等 |
| 謝金・人件費等 | 3,937,384 | 研究支援者給与、実験補助者謝金 |
| その他 | 777,356 | 実験動物研究施設利用料、実験用装置修理等 |
| 直接経費計 | 27,048,222 | |
| 間接経費計 | 1,463,524 | |
| 合計 | 28,511,746 | |

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名 | 仕様・型・性能 等 | 数量 | 単価 (単位:円) | 金額 (単位:円) | 納入 年月日 | 設置研究機関 名 |
|---------------------------------|-----------------------------|----|--------------|--------------|-----------|-------------|
| インキュベーター シェーカー | 和研薬 E24 M1352-0001 | 1 | 651,525 | 651,525 | 2011/4/11 | 金沢大学 |
| リアルタイムPCRシ ステム | アジレント・テクノロジー Mx3000P 1台、 | 1 | 2,646,000 | 2,646,000 | 2011/5/30 | 金沢大学 |
| BigDye Terminator v3.1 Cycle | Applied Biosystems | 1 | 934,605 | 934,605 | 2011/7/26 | 金沢大学 |
| 吸光蛍光発光マイ クロプレートリー | DSファーマバイオ メディカル社 パ | 1 | 2,992,500 | 2,992,500 | 2011/8/4 | 金沢大学 |
| Tail イメージベース サイトメーター | ライフテクノロ ジーズジャパン | 1 | 1,398,600 | 1,398,600 | 2011/8/29 | 金沢大学 |
| マイスターサイク ラープロバンドル | エッペンドルフ 95559 | 1 | 859,950 | 859,950 | 2011/10/3 | 金沢大学 |