

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25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

培養細胞を用いた B 型肝炎ウイルス(HBV)実験系では、APOBEC および遺伝子修復系の核内ウイルス DNA への作用を検討する。また自然感染の系を導入し、このより感染病態に近い実験系で APOBEC の活性が確認できるか検討する。マウスを用いた HBV 実験系では、AID, APOBEC1, 3, UNG 欠損マウスに HBV を導入して、これら APOBEC の HBV 感染防御における役割を評価する。

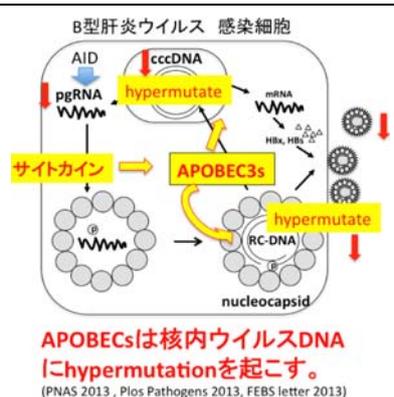
HPV 誘発性発癌研究では、HPV16 陽性頭頸部癌と正常組織切片における APOBEC の免疫染色を行い、病期と悪性度分類と APOBEC 発現率相関を検討する。HPV 培養細胞系では、インターフェロン刺激時に APOBEC3 のノックダウンを行いインターフェロンの持つ抗ウイルス活性における APOBEC3 の必要性を評価する。また APOBEC が HPV ゲノム挿入を誘導するのか、さらには DNA 損傷応答反応を惹起するか検討したい。

2. 研究の実施状況

HBV においては血中ウイルス DNA 量が、慢性 HBV 感染症が肝硬変や肝癌に進展するためのリスクファクターであることが知られている。従って APOBEC が HBV に抗ウイルス活性を示しウイルス量を低下させるかどうかを見極める事は、HBV 感染病態を理解する上でも重要である。そこでヒト肝臓由来培養細胞で HBV が複製されるようにした実験系を用いて、抗ウイルス活性が知られているインターフェロンをその細胞に投与し APOBEC の発現を誘導させた。その結果インターフェロンによりウイルスゲノムには高頻度変異が蓄積されウイルス複製が低下することが判明した。分子生物学的に APOBEC タンパクが発現できないように条件を設定して解析したところ、APOBEC がインターフェロン投与時に高頻度変異を蓄積する責任酵素であることを突き止めた。次に APOBEC を細胞に人工的に発現させてやると HBV のウイルス量が低下する事がわかった。これらのことより、ウイルス感染病態で分泌されるインターフェロンが感染細胞に作用すると APOBEC は作られ、HBV ウイルスの DNA に作用してウイルスの複製を阻害することが明らかになった。また APOBEC の作用点を詳細に解析したところ、APOBEC はウイルスの細胞質型 DNA のみならず核型 DNA にも作用することがわかった。これら新たに分かった知見は、HBV 感染症の病態の理解を進めた研究であり新たな治療法を考案する上で貴重な事実を明らかにするものである。

様式19 別紙1

ウイルス発癌においてウイルス DNA が感染細胞のゲノムに挿入される事は、細胞のガン化を大きく進めると考えられており、特にパピローマウイルス(HPV)による子宮頸癌では、その機構の解析が望まれている。HPV ウイルス DNA を核内に保持する細胞を用いて APOBEC がこのウイルス DNA 挿入反応を促進するか検討した。今回、APOBEC は高頻度変異を HPV ウイルス DNA に作り、その変異導入活性が DNA 切断を媒介する機構である除去修復に依存する事を解明した。HPV ウイルス DNA 挿入現象の初期反応に APOBEC が関与する可能性を世界で初めて提示した。



3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 6 件
計 6 件	<p>Role of Activation-induced Cytidine Deaminase in the Development of Oral Squamous Cell Carcinoma Yosuke Nakanishi, Satoru Kondo, Naohiro Wakisaka, Akira Tsuji, Kazuhira Endo, Shigeyuki Muro, Makoto Ito, Kouichi Kitamura, <u>Masamichi Muramatsu</u>, Tomokazu Yoshizaki <i>Plos One</i>, 2013, Apr 25;8(4):e62066</p> <p>IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of <i>Strongyloides venezuelensis</i> in a primary infection Makoto Matsumoto, Yuki Sasaki, Koubun Yasuda, Toshiyuki Takai, <u>Masamichi Muramatsu</u>, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi <i>Infection and Immunity</i> 2013, Jul;81(7):2518-27</p> <p>Concerted action of Activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduce covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus Sajeda Chowdhury, Kouichi Kitamura, Miyuki Simadu, Miki Koura, <u>Masamichi Muramatsu</u> <i>FEBS letter</i> 2013, Sep 17;587(18):3148-52</p> <p>Interleukin-1 and tumor necrosis factor-α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID Koichi Watashi, Guoxin Liang, Masashi Iwamoto, Hiroyuki Marusawa, Nanako Uchida, Takuji Daito, Hirofumi Ohashi, Kouichi Kitamura, <u>Masamichi Muramatsu</u>, Tomoko Kiyohara, Ryosuke Suzuki, Jisu Li, Shuping Tong, Yasuhito Tanaka, Kazumoto Murata, Hideki Aizaki, Takaji Wakita <i>J Biol Chem</i> 2013, Nov 1;288(44):31715-27.</p> <p>Low affinity IgM antibodies lacking somatic hypermutations are produced in the secondary response of C57BL/6 mice to(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl hapten Akikazu Murakami, Hayato Moriyama, Mina Osako-Kabasawa, Kanako Endo, Miyuki Nishimura, Keiko Udaka, <u>Masamichi Muramatsu</u>, Tasuku Honjo, Takachika Azuma, and Takeyuki Shimizu <i>International Immunology</i> 2013 Nov 27; 26(4):195-208</p> <p>APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus type 16 DNA upon Interferon-β stimulation Zhe Wang, Kousho Wakae, Kouichi Kitamura, Satoru Aoyama, Guangyan Liu, Miki Koura, Ahasan Md Monjurul, Iwao Kukimoto, and <u>Masamichi Muramatsu</u> <i>J Virol</i>. 2014 Jan;88(2):1308-17.</p>
	(掲載済み一査読無し) 計 0 件
	(未掲載) 計 0 件

<p>会議発表 計 19 件</p>	<p>専門家向け 計 16 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DNA Tumour Virus Meeting, <u>Masamichi Muramatsu</u>, Zhe Wang, Kosho Wakae, Kouichi Kitamura, Guangyan Liu, Iwao Kukimoto 「APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus type 16DNA」, Birmingham UK, 2013.7.22-27, University of Birmingham ・15th International Congress of Immunology in Milan, <u>M.Muramatsu</u>, Z.Wang, K.Wakae, K.Kitamura, M.Nakamura, S.Kyo, I. Kukimoto 「APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus viral genomic DNA upon interferon-B stimulation」 2013.8.22-27, Milan Italy, International Union of Immunology Societies ・北海道大学遺伝子病制御研究所 平成 25 年度共同利用・共同研究集会、<u>村松正道</u>、 「APOBEC vs B 型肝炎ウイルス」、札幌市、2013.10.26、北海道大学遺伝子病制御研究室 ・第 61 回日本ウイルス学会学術集会、<u>村松正道</u>、 「HPV16 ウイルス DNA に観察される高頻度突然変異」、神戸市、2013.11.10-12、日本ウイルス学会 ・第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会秋期学術大会、<u>村松正道</u>、 「B 細胞の抗体産生機構とその意外な副業」、金沢市、2013.11.30、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 ・ゲノムシステム研究会、<u>村松正道</u>、 「腫瘍ウイルス感染における APOBECs の役割」、京都市、2014.2.21、ゲノムシステム研究会(京都大学大学院生命科学研究科 石川冬木 他 ・第 12 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、 Kouichi Kitamura, Sajeda Chowdhury, Zhe Wang, Miyuki Shimadu, Miki Koura, <u>Masamichi Muramatsu</u> 「Concerted action of AID/APOBEC proteins and uracil-DNA glycosylase against covalently closed circular DNA of hepatitis B virus」、淡路島、2013.9.10-13、東京大学医科学研究所他 ・2013 International Meeting on Molecular Biology Hepatitis B Viruses, Kouichi Kitamura, Chowdhury Sajeda, Miyuki Shimadu, Miki Koura, <u>Masamichi Muramatsu</u> 「Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus」, Shanghai China, 2013.10.20-23, Hepatitis B Foundation ・第 61 回日本ウイルス学会学術集会、喜多村晃一、Chowdhury Sajeda, 島津美幸、小浦美樹、Liu Guangyan, Ahasan Monjurul, <u>村松正道</u>、 「B 型肝炎ウイルス cccDNA に対する脱アミノ化酵素 AID の作用」、神戸市、2013.11.10-12、日本ウイルス学会 ・第 36 回日本分子生物学会、喜多村晃一、Chowdhury Sajeda, 島津美幸、小浦美樹、<u>村松正道</u>、 「B 型肝炎ウイルス cccDNA を標的とする AID/APOBEC 及び UNG タンパク質の抗ウイルス機構」、神戸市、2013.12.3-6、日本分子生物学会 ・日本生化学会 北陸支部第 31 回大会、若江亨祥、青山 慧、王 哲、喜多村 晃一、劉 光炎、アハサン・モハメド・モンジュルル、中村 充弘、京 哲、柗元 巖、<u>村松 正道</u> 「APOBEC3 は HPV ゲノムに hypermutation を導入する」、金沢市、2013.5.26、日本生化学会北陸支部 ・NGS 現場の会第三回研究会、若江亨祥、青山 慧、王 哲、喜多村 晃一、劉 光炎、アハサン・モハメド・モンジュルル、中村 充弘、京 哲、柗元 巖、西山智明、<u>村松 正道</u> 「APBEC は HPV ゲノムに hypermutation を導入する」、神戸市、2013.9.4-5、NGS 現場の会 ・第 36 回日本分子生物学会、若江亨祥、青山 慧、王 哲、劉 光炎、アハサン・モハメド・モンジュルル、今康身依子、小浦 美樹、喜多村 晃一、中村 充弘、京 哲、近藤 悟、吉崎 智一、柗元 巖、西山智明、<u>村松 正</u>

様式19 別紙1

	<p>道 「APOBEC3はヒトパピローマウイルス(HPV)-16ゲノムに突然変異を導入する」、神戸市、2013.12.3-6、日本分子生物学会</p> <p>・日本生化学会 北陸支部第31回大会、Sajeda Chowdhury, Kouichi Kitamura, Miyuki Shimazu, Miki Koura and <u>Masamichi Muramatsu</u> 「Activation-induced cytidine deaminase can restrict the covalently closed circular DNA of Duck hepatitis B virus, depending on □racil-DNA glycosylase activity」、金沢市、2013.5.26、日本生化学会 北陸支部</p> <p>・金沢国際がん生物学シンポジウム & アカデミア創薬シンポジウム、Sajeda Chowdhury, Kouichi Kitamura, Miyuki Shimazu, Miki Koura, <u>Masamichi Muramatsu</u> 「Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus」、金沢市、2014.1.23-24、金沢大学 がん進展制御研究所</p> <p>・金沢国際がん生物学シンポジウム & アカデミア創薬シンポジウム、Guangyan, Liu, Guoxin Liang, Kouichi Kitamura, Zhe Wang, Kousho Wakae, <u>Masamichi Muramatsu</u> 「Activation-induced cytidine deaminase (AID) degrades hepatitis B viral RNA through recruitment of the RNA exosome complex」、金沢市、2014.1.23-24、金沢大学 がん進展制御研究所</p> <p>一般向け 計3件</p> <p>・北國がん基金助成金贈呈式 市民講座 2013.9.19、金沢市、北國新聞会館 17階会議室 「免疫と発がんリスクの意外な関係」 <u>村松正道</u></p> <p>・金沢大学医学展 ポスター展示による研究発表 2013.11.2、金沢大学宝町キャンパス <u>村松正道</u></p> <p>・金沢大学まちなかサイエンスセミナー 2014.3.2、金沢市、本多の森会議室 第1会議室 「免疫の利点と弱点」 <u>村松正道</u></p>
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	金沢大学医薬保健総合研究科 分子遺伝学 http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/home.html
国民との科学・技術対話 の実施状況	<p>・北國新聞 市民講座 2013.9.19、金沢市、北國新聞会館 17階会議室 「免疫と発がんリスクの意外な関係」 <u>村松正道</u> 対象者:一般市民 参加人数:約30名 北國がん基金助成金贈呈式に引き続いて行われた新聞社主催市民講座にて、免疫やがんの基礎知識、本研究の狙いや面白さ、これまで解明したことなどを分かりやすく説明した。</p> <p>・金沢大学まちなかサイエンスセミナー 2014.3.2、金沢市、本多の森会議室 第1会議室 「免疫の利点と弱点」 <u>村松正道</u>、対象者:一般市民 参加人数:約100名 大学主催の一般市民向け公開講座にて、本研究の背景や狙いや面白さ、これまで解明したことなどをわかりやすく説明した。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成25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	49,636,000	19,364,000	0	0
間接経費	20,700,000	14,890,800	5,809,200	0	0
合計	89,700,000	64,526,800	25,173,200	0	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	72,781	19,364,000	0	19,436,781	19,436,781	0	0
間接経費	7,869,116	5,809,200	0	13,678,316	13,678,316	0	0
合計	7,941,897	25,173,200	0	33,115,097	33,115,097	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	12,351,066	実験試薬、実験器具、液体窒素、炭酸ガス等
旅費	661,690	学会発表(第15回International Congress of Immunology)旅費等
謝金・人件費等	5,159,713	研究支援者給与、実験補助者謝金
その他	1,264,312	論文掲載料、実験動物研究施設利用料等
直接経費計	19,436,781	
間接経費計	13,678,316	
合計	33,115,097	

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
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems 4337456 1000反 応	1	936,600	936,600	2014/1/15	金沢大学
				0		
				0		