

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24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	遺伝子改変酵素群 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・医薬保健研究域・教授
氏名	村松 正道

1. 当該年度の研究目的

AID/APOBEC 遺伝子改変酵素群が B 型肝炎ウイルスおよび HPV ウイルスに与える影響を調べ、その抗ウイルス活性と発癌機構への関与をたどっていくのが本プロジェクトの趣旨である。

①抗ウイルス活性のメカニズム: AID/APOBEC が持つ B 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス活性のメカニズムを解析し、平成 24 年度は主に AID のウイルス RNA への作用を解析する。また遺伝子改変酵素群が、薬剤耐性ウイルスを作る可能性の検討は基礎的実験条件が整備できたので、それをふまえてその可能性を実証する。

②マウス肝炎モデル: AID/APOBEC の抗 HBV 活性をマウス個体レベルで検討する。

③HPV 発癌実験系: ウイルスゲノム変異解析とウイルス DNA 定量にて AID/APOBEC が HPV の複製を抑制するかを培養細胞系と臨床検体系で調査する。

2. 研究の実施状況

AID/APOBEC は遺伝子の配列をかえる能力のある11種類からなる酵素群である。B 型肝炎ウイルス(HBV)やパピローマウイルス(HPV)は、人に癌を起こすウイルスであるが、その発癌誘発機序は未だ不明である。

本研究は、HBV と HPV が起こす発癌プロセスに AID/APOBEC が関わる可能性を検証する事を目標としている。HIV を代表とする他のウイルスでは AID/APOBEC は抗ウイルス活性が知られている。そこでまず AID/APOBEC が HBV に抗ウイルス活性を示す事で発癌を抑制する可能性を検討した。肝臓由来培養細胞で HBV が複製でき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投与し内在性 APOBEC を発現誘導させた。その結果インターフェロンによりウイルス複製が低下している事を観察し、またウイルスゲノムには高頻度変異が導入されていた。高頻度変異をウイルスゲノムに入れるのは AID/APOBEC であると想定されたが、RNA 干渉の実験にてインターフェロンが誘導する高頻度変異は APOBEC3G が責任遺伝子である事がわかった。また AID/APOBEC の中でも RNA への活性の有無が注目されている AID について、HBV の RNA への作用を検討したところ、AID の RNA に対する変異活性をみだしこれを論文に報告した(AID の RNA 活性は世界で初めての証明であったので記者発表した)。

HBV に近縁の肝炎ウイルス実験系でも類似の実験を行った。その結果、APOBEC3G は、肝炎ウイルスの複数の作用点でウイルスゲノムに変異を導入し結果的にウイルス複製阻害をする事を見だしこれを論文発表した。APOBEC3G がウイルスゲノムに変異を導入する事が明らかになったので、そのような変異

様式19 別紙1

に薬剤耐性変異が含まれるか検討した。実際、薬剤耐性変異は多数検出したものの、そのようなウイルスクローンは同時に別の多数の変異も持ち、ウイルス複製を支持せず結果的に APOBEC3G がウイルス耐性をつくる可能性は証明できなかった。マウス肝炎モデルでは、AID, APOBEC1, APOBEC3 欠損マウスに HBV を導入し、APOBEC の抗 HBV 活性を個体レベル検討している。現時点ではどの遺伝子欠損マウスでも HBV の高頻度変異は観察され、APOBEC ファミリー間での相互補填性が明らかになりつつある。

HPV 発癌実験では、新たに立ち上げたヒト子宮頸癌由来細胞株実験系で、インターフェロンにより APOBEC が発現誘導され、HPV ウイルスゲノムに変異を入れる事を見だし、論文投稿中である。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase Liang G, Kitamura K, Wang Z, Liu G, Chowdhury S, Fu W, Koura M, Wakae K, Honjo T, <u>Muramatsu M</u> <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 2013 Feb 5;110(6):2246-51. (掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 3 件 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 Muroho, Makoto Ito, Kouichi Kitamura, <u>Masamichi Muramatsu</u>, Tomokazu Yoshizaki <i>Plos One</i>, 2013, in press</p> <p>Uracil DNA Glycosylase Counteracts APOBEC3G-Induced Hypermutation of Hepatitis B Viral Genomes: Excision Repair of Covalently Closed Circular DNA Kouichi Kitamura, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, Miyuki Simazu, Miki Koura, <u>Masamichi Muramatsu</u> <i>Plos Pathogens</i> 2013, in press</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 in press</p>
<p>会議発表 計 14 件</p>	<p>専門家向け 計 13 件</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, <u>Masamichi Muramatsu</u> oral : invited 「AID/APOBEC DNA deaminases hypermutate viral genomes of papillomavirus-16 (HPV16) and hepatitis B virus (HBV)」, Kanazawa, 2012.11.7, Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University</li> <li>• International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 喜多村晃一, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, 島津美幸, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Uracil-DNA Glycosylase (UNG) Counteracts the Hepadnavirus Hypermutation and Restriction Induced by APOBEC3G」, Oxford, England, 2012.9.22-25, Hepatitis B Foundation</li> <li>• The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, 喜多村晃一, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, 島津美幸, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Uracil-DNA Glycosylase (UNG) Counteracts the Hepadnavirus Hypermutation and Restriction Induced by APOBEC3G」, 金沢市, 2012.11.7, Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University</li> <li>• 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 喜多村晃一, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, 島津美幸, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「塩基除去修復機構は APOBEC3G が引き起こす B 型肝炎ウイルス変異を修復しウイルス複製に寄与する」, 大阪市, 2012.11.13-15, 日本ウイルス学会</li> </ul>

様式19 別紙1

	<p>・第 35 回日本分子生物学会年会, 喜多村晃一, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, 島津美幸, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「塩基除去修復機構は APOBEC3G が引き起こす B 型肝炎ウイルスゲノム高頻度変異を修復する」, 福岡市, 2012.12.11-14, 日本分子生物学会</p> <p>・The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, Satoru Aoyama, Kosho Wakae, Zhe Wang, Kouichi Kitamura, Guangyan Liu, Miki Koura, Mitsuhiro Nakamura, Satoru Kyo, Iwao Kukimoto, and <u>Masamichi Muramatsu</u> 「APOBEC proteins introduce hypermutation in Human papillomavirus 16(HPV-16) viral DNA triggered by IFN stimulation」, 金沢市, 2012.11.7, Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University</p> <p>・日本生化学会北陸支部第 30 回記念大会, Zhe Wang, 喜多村晃一, Iwao Kukimoto, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Hypermuatation of human papillomavirus 16 viral DNA by APOBEC3 proteins」, 金沢市, 2012.5.26, 日本生化学会北陸支部</p> <p>・第 60 回日本ウイルス学会学術集会, Zhe Wang, 喜多村晃一, 若江亨祥, Iwao Kukimoto, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Hypermuatation of human papillomavirus 16 viral DNA by APOBEC3 proteins」, 大阪, 2012.11.13-15, 日本ウイルス学会</p> <p>・The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, Zhe Wang, 喜多村晃一, 若江亨祥, Iwao Kukimoto, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Hypermuatation of human papillomavirus 16 viral DNA by APOBEC3 proteins」, 金沢市, 2012.11.7, Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University</p> <p>・第 3 回発がんスパイラル国際シンポジウム &amp; 金沢国際がん生物学シンポジウム, Zhe Wang, 喜多村晃一, 若江亨祥, Iwao Kukimoto, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Hypermuatation of human papillomavirus 16 viral DNA by APOBEC3 proteins」, 金沢市, 2013.1.24-25, 金沢大学がん進展制御研究所</p> <p>・The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, Sajeda Chowdhury, 喜多村晃一, 島津美幸, 小浦美樹, <u>村松正道</u> 「Activation- induced cytidine deaminase and base excision pathway induced hepadnavirus cccDNA degradation」, 金沢市, 2012.11.7, Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University</p> <p>・第 41 回日本免疫学会学術集会, Guoxin Liang, 喜多村晃一, Zhe Wang, Guangyan Liu, Sajeda Chowdhury, 小浦美樹, 若江亨祥, <u>村松正道</u> 「RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase」, 神戸市, 2012.12.6, 日本免疫学会</p> <p>・The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, Guoxin Liang, 喜多村晃一, Zhe Wang, Guangyan Liu, Sajeda Chowdhury, 小浦美樹, 若江亨祥, <u>村松正道</u> 「RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase」, 金沢市, 2012.11.7, Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University</p> <p>一般向け 計 1 件 金沢大学医学展 2012.11.3-4 にてポスター発表 村松 正道 最先端・次世代研究開発プログラム「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」</p>
<p>図 書 計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件  (出願中) 計 0 件</p>

様式19 別紙1

Webページ (URL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・金沢大学医薬保健総合研究科 分子遺伝学 <a href="http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/">http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/</a></li> <li>・日刊工業新聞 Business line 食品・医薬・繊維ページ <a href="http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020130122eaap.html">http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020130122eaap.html</a></li> </ul>
国民との科 学・技術対話 の実施状況	<p>金沢大学医学展 2012.11.3-4 にてポスター発表 村松 正道 最先端・次世代研究開発プログラム「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」対象:医学展を訪れた一般市民 また本研究の一般人向け解説説明として研究解説の動画を作成し、大学のホームページより配信している。 (金沢大学 HP 研究紹介ページ <a href="http://nextprogram.w3.kanazawa-u.ac.jp/research05.html">http://nextprogram.w3.kanazawa-u.ac.jp/research05.html</a>)</p>
新聞・一般雑 誌等掲載 計 2 件	<p>業績論文 PNAS 2013 Feb 5;110(6):2246-51 についての記者発表が、2紙に取り上げられた。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>①京都新聞(朝刊)・夕刊) 平成 25 年 1 月 22 日(24面)掲載</li> <li>②日刊工業新聞(web 版) <a href="http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020130122eaap.html">http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020130122eaap.html</a> 平成 25 年 1 月 22 日</li> </ul>
その他	

4. その他特記事項

特になし

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 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	18,425,000	19,364,000	0
間接経費	20,700,000	9,363,300	5,527,500	5,809,200	0
合計	89,700,000	40,574,300	23,952,500	25,173,200	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	2,631,198	18,425,000	0	21,056,198	20,983,417	72,781	0
間接経費	7,899,776	5,527,500	0	13,427,276	5,558,160	7,869,116	0
合計	10,530,974	23,952,500	0	34,483,474	26,541,577	7,941,897	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	13,884,821	Bioruptor UCD-300型、実験試薬等
旅費	134,360	学会発表等旅費(日本ウイルス学会)等
謝金・人件費等	5,692,913	研究支援者給与、実験補助者謝金
その他	1,271,323	実験動物研究施設利用料、実験機器修理費等
直接経費計	20,983,417	
間接経費計	5,558,160	
合計	26,541,577	

## 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
Bioruptor UCD-300 型 高性能消音箱 付	東湘電機(株)製 UCD300	1	1,233,225	1,233,225	2012/6/5	金沢大学
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem 4337456 1000反 応	1	942,480	942,480	2012/10/4	金沢大学
オートクレーブ	(株)トミー精工 LSX-500	1	546,000	546,000	2012/11/8	金沢大学