

司会 CML の bcr の切れる場所によって血液学的に CML の多様性が説明できるかというなお話でしたが、質問でございますでしょうか。

木南 分けられてやっておられるのはいいと思うのですが、何かその根拠はあるのですか。例えば、別にノーザンブロットした方がもう少し根拠がありそうな気がするのですが。

古川 その通りなのですが、テクニカルの問題で、患者さんからノーザンをやる為にする血液量が多くないとどうしてもうまくいかないもので、それで今は DNA からこれを想定しているわけで、このことを考えた根拠の一つは、蛋白で先程の bcr の中のエクソンの 3' の部分を使った蛋白を調べたところが、crisis を起こした時に非リンパ芽球性急性転化の症例というのは、どうも 3' 側のエクソンの蛋白の抗体で認識される蛋白を作っているという論文が出たのと、何らかの違いが、慢性期にずっとこの蛋白が作られているわけで、それが何らか

の影響を持って急性転化を起こす原因になる可能性はあるのではないかとこの想定の下でやりました。

辻 細かいことで恐縮なのですが、サザンブロッティングで rearrangement から由来するバンドのシグナルの強さと、正常のバンドのシグナルの強さとはずいぶん違うようですが、それはコピー数の関連で何か意味があるのでしょうか。それとも、そのオーバーラップする部分の問題なのでしょうか。

古川 一つはですね、例えば末梢血を取った時に一般的に T リンパ球というのは Ph1 を持たないと今は考えられているので、末梢血で DNA を取ってきた時には Ph1 を持っていない細胞も DNA の中に混じってきてしまうので、濃さは全く比較の対象にならないと考えています。

司会 ありがとうございます。最後に、B型肝炎ウイルスの複製及び発癌ということで、小方先生お願い致します。

7) B型肝炎ウイルスの肝細胞癌発症機構

新潟大学医学部第三内科学教室（主任：市田文弘教授）

小 方 則 夫

A Mechanistic Role of Hepatitis B Virus in the Development of Hepatocellular Carcinoma

Norio OGATA

*Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
(Director: Prof. Fumihiko ICHIDA)*

We have previously described that 1) integration of hepatitis B virus (HBV) DNA into host chromosomes of hepatocytes occurs at a high frequency during the course of the viral carrier state, 2) hepatocytes containing the integrated viral DNA undergo multiclonal growth, and 3) all hepatocellular carcinomas (HCCs) develop clonally and some HCCs are of multiclonal origins even in a same liver. These findings indicate that HBV related HCC may be established through several steps of

Reprint requests to: Norio Ogata,
Third Department of Internal
Medicine, Niigata University School
of Medicine, Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第三内科学教室

小方 則夫

genetic alterations after the initial integration event of the viral DNA. To investigate the critical mode of HBV DNA integration for the transforming process of hepatocyte, we analyzed a HCC case for the structure of the integrants in both hepatocytes and hepatoma cell using molecular cloning technique. Characteristic features of the integrant found in the hepatoma cell were 1) the cohesive end region of HBV DNA along with flanking cellular DNA showed inverted repeat structure, and 2) the integration sites in host DNA was within human highly repetitive sequence, alpha satellite DNA.

Results described were discussed from a viewpoint of a possible role of HBV in hepatocarcinogenesis.

Key words: hepatitis B virus (HBV) carrier, hepatocellular carcinoma, HBV DNA integration.

B型肝炎ウイルス (HBV) キャリア, 肝細胞癌, HBV DNA 組込み.

はじめに

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) 持続感染状態と肝細胞癌 (肝癌) 発症との密接な因果関係は疫学的研究により明白である. この事実に基づき, HBV

の肝癌発症における役割機構を遺伝子工学的手法を用いて解析することが, 本研究の目的である.

結 果

HBV キャリアに発生する肝癌は, ほとんどすべて慢

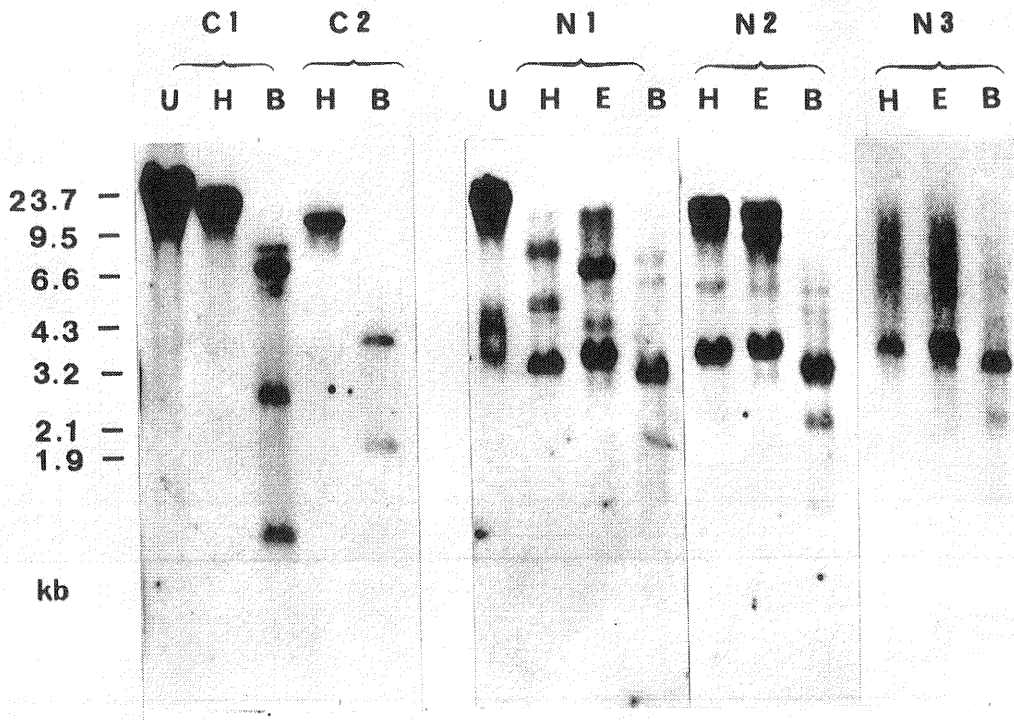


図 1 肝癌例の独立肝癌結節と非癌部肝組織複数部位における HBV DNA の組込み様式

C, cancer tissue: N, non-cancer tissue: U, undigested: H, Hind III-digested: E, Eco RI-digested: B, Bam HI-digested.

性肝炎やその終末像である肝硬変を母地とすることは、上記課題追求にあたり基本的に重要な事実と思われる。

はじめに、筆者らは、無症候例から肝癌例にわたる種々の病態の HBV キャリアの肝細胞および肝癌細胞における HBV ゲノム (DNA) の存在様態の把握が必須であると考え、47例 (肝癌非合併26例・肝癌21例)、約200検体を対象にサザン法にて検索した。その結果、HBV DNA はその複製中間体の存在の有無にかかわらず極めて高率に肝細胞および肝癌細胞を染色体に組み込まれていることを見出した。また、HBV ゲノム内部に切断部位を持たない制限酵素処理によるシグナルとして、非特異的反応性肝炎等の病理組織所見が軽度の症例では主にスメアを、一方、肝硬変等の小葉改築が進行した病理組織所見を呈する症例では主にバンドを、それぞれ検出した。さらに、同一症例の非癌部肝組織の異なる部位、並びに肉眼的に別個の肝癌関節では、各々、バンド形成パターンが異なっていた (図 1, 2)。

これら知見は、組織病変が軽度の時期には肝細胞は heterogenous な集団として存在するが、炎病反応の進

展に伴い HBV DNA の組み込みを有する肝細胞の一部が肝臓内各所で多数の別個のフローンとして増殖すること、さらに肝癌細胞も、やはり同一肝内で複数の独立したフローンとして成立することを意味するものと考えられる (図 3)。このことは、HBV 持続感染時の肝細胞の特殊な再生動態とこれを基盤とした肝癌の多中心性発生を示唆するものであり、また、HBV DNA の組み込み様式に個体間とはもとより同一肝内においても統一性は見出せないが、一部の、何らかの組み込み構造を持つに至ったものが肝癌形質を獲得する、という仮説を引き出す。

そこで、筆者らは、同一症例の肝癌細胞と非癌部肝細胞における組み込み構造の比較検討が肝癌形質獲得に機能したであろう HBV DNA や宿主染色体の要因を浮き彫りにし得る可能性を考え、20才台の無症候性 HBV キャリア (肝組織所見：非特異的反応性肝炎) に発症した肝癌 (単発) 例を対象とし、分子クローニング法により解析した。その結果判明した肝癌細胞における組み込み構造の極立った特徴は、組み込まれた HBV DNA の両端 (cohesive end 領域) と、これに接合する宿主 DNA

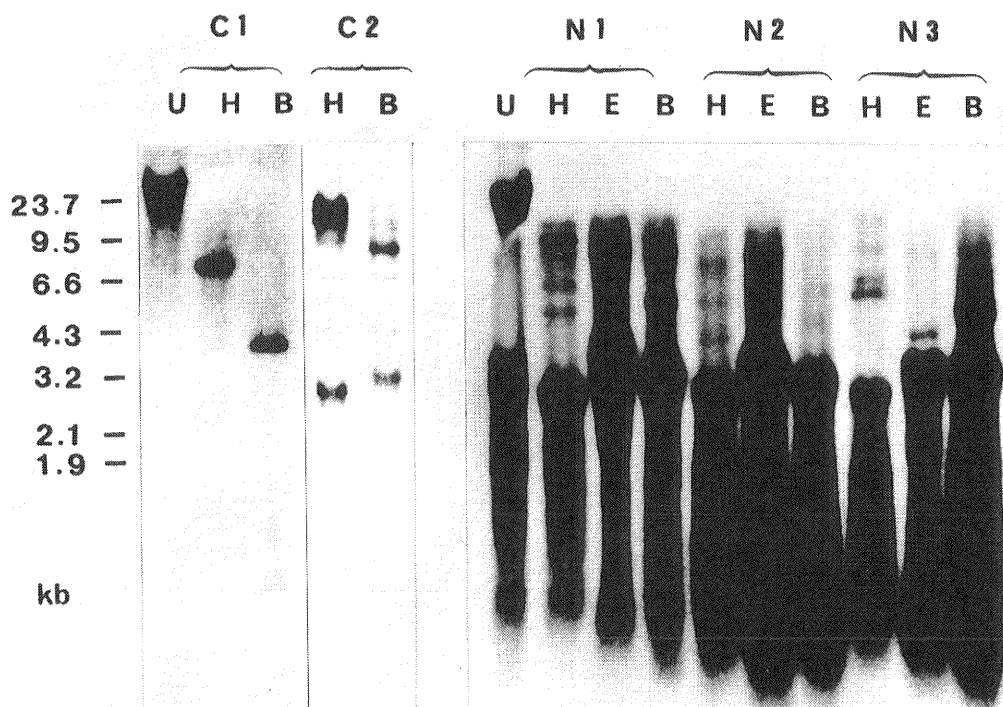


図 2 肝癌例の独立肝癌結節と非癌部肝組織複数部位における HBV DNA の組み込み様式

C, cancer tissue: N, non-cancer tissue: U, undigested: H, Hind III-digested: E, EcoRI-digested: B, Bam HI-digested.

Integration mode of HBV DNA

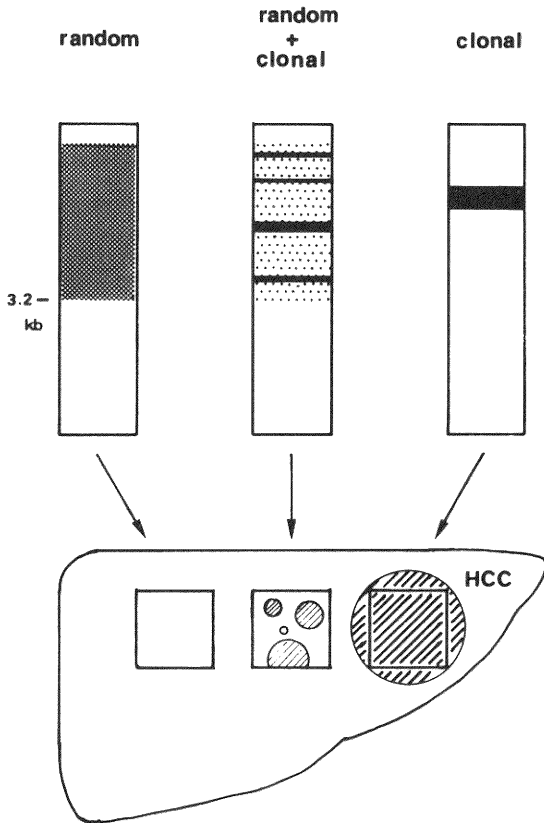


図3 サザン解析のシグナルと HBV DNA 組込みを持つ肝細胞・肝癌細胞のクローナル増生の模式図

が少なくともクローニングサイトまで互いに逆向きに同一塩基配列を有することと、宿主 DNA 上の組込み部位がヒトゲノムの高頻度反復配列、いわゆる alpha satellite DNA (alphoid DNA) であることであった。HBV DNA

の cohesive end 領域と宿主 DNA 接合体の inverted repeat 構造は培養肝癌細胞株 huSP でも見出されており、これに対しては培養期間中の変異であろうとする考えもあったが本例の知見はその可能性を否定する。また HBV DNA が高頻度反復配列に組込まれていることは、培養肝癌細胞株 PLC/PRF/5 と、ごく最近報告された台湾人症例において記載されている。うち塩基配列の解析がなされている後者例と本例の HBV-宿主接合部を比較すると、染色体番号は不明ながら、両クローン共 HBV DNA の宿主染色体への組込み部位が alpha satellite DNA の特定部位、塩基番号167であることが判明した(図4)。さらに、本クローンにおける接合部には ACTAG, AATGAT という HBV と alpha satellite DNA に共通する塩基配列が交互にくり返していた(図4)。このことは、HBV DNA の satellite DNA family への組込みが、単なる偶然ではなく、かつ互いの相補的塩基配列を仲立ちする組換え事象に基づくものであることを示唆する。

考 察

ヘルペスウイルスの thymidine kinase 遺伝子を用いた *in vitro* 実験系において、外来性遺伝子が宿主の satellite DNA に組込まれた場合、挿入遺伝子の形質発現の抑制と宿主 DNA の再編成の促進が引き起こされることが知られている。本クローンの HBV ゲノムの4つの open reading frame の構造上、肝細胞より得たクローンとは本質的な差異は認められず、また母肝癌組織を対象としたノザン法にて HBV 特異 mRNA は検出できないこと、そして、組込みの標的となった alpha satellite DNA が inverted repeat 構造を形成していることは、この事実の analogy と考え得るかもしれない。

以上の知見より、肝癌細胞成立過程の少なくとも最終段階においては HBV ゲノムの産生蛋白は関与せず(成人T細胞白血病における HTLV-1, *tax-1* 遺伝子に類似した機能を HBV, X 遺伝子が担い前記肝細胞のク

	1760	1770	1778	1790	1800	1810
HBV	GATTAGGTTA	AAGGTCCTTG	TACTAGGAGG	CTGTAGGCAT	AAATTGGTCT	GTTCAACAGC
cYSC	GACTAGGTTA	ATGATCTTTG	TACTAGGAAG	AATGATTCTC	ATAAACTCCT	TTGTGATGTG
Sat.	AGGAAATATC	TTCCTATAGA	AACTAGACAG	AATGATTCTC	AGAACTCCT	TTGTGATGTG
	140	150	160	167	170	180
				170	180	190

図4 肝癌細胞クローン(cYSC)におけるB型肝炎ウイルスDNAと宿主DNAの接合部塩基配列

HBV, hepatitis B virus DNA: Sat, alpha satellite DNA.

ローナルな増殖の一因となる可能性は否定できないが), HBV ゲノム組込みに伴う染色体再編成と(反復配列への組込みは, 染色体構築の流動性をさらに高めるのに効果的と思われる), これに引き続いて起こる何らかの細胞遺伝子(群)の活性化または抑制化が重要であろうと考えている。

結 語

筆者らの知る限り, satellite DNA family への HBV 以外のウイルスゲノム組込みの報告はなく, また同 DNA family を発癌機構と結びつける方向の研究も極く乏しい。今回記載した知見と考察が的はずれでないことを祈りつつ HBV DNA が satellite DNA を介して引き起こす染色体変異を追及するための実験系を考案中である。

謝 辞

本研究は, 大阪大学細胞工学センター, 時野隆至博士・松原謙一教授との共同研究である。また本学第一外科, 吉田奎介助教授より貴重な検索資料を供与して頂き, 本学ウイルス学教室浜田忠弥教授, 日本歯科大学新潟歯学部内科柴崎浩一教授より多大な御助力を賜った。

尚本研究の一部は昭和62年度文部省科学研究費, 一般研究(C)課題番号 62570314 による。

共に記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Tiollais, P., et al.: *Nature* 317: 489~495, 1985.
- 2) Wu, J.C. and Manuelidis, L.: *J. Mol. Biol.*, 142: 363~386, 1980.
- 3) Ogata, N.: *Intl. Symp. on Current HBV DNA Research*, 1985.
- 4) Ogata, N., et al.: *Intl. Symp. on HBV DNA Integration*, 1986.
- 5) Ogata, N., et al.: *Jap. J. Med.*, 25: 396, 1986.
- 6) 小方則夫, 他: *肝臓*, 27: 543~551, 1986.
- 7) 小方則夫: *肝臓*, 29: 60~70, 1988.
- 8) Ogata, N, et al.: In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. ed. by Zuckerman, A.J, pp. 746~751, Alan R. Liss, Inc. (New York), 1988.
- 9) Ogata, N., et al.: *J. Virol.* (submitted)

司会 B型肝炎ウイルスの組み込みとその後の癌への進展についての想定をお話し頂きましたが, どうか御質問ございますでしょうか。

斉藤 先程先生は, 同一症例で非癌部と癌部での southern hybridization の結果を示されていましたが, あれだと癌部の方は clonality がありそうなパターンでしたが, 非癌部でのB型肝炎ウイルスが integration されたもののひとつがクローン化して増殖した感じではないようでしたが, そうすると, 例えば hepatoma がどういう型で起こるかという事はわかりませんが, multiple に起こる様な hepatoma もあると思いますが, そうした場合2ヶ所の癌部において integration の場所が全然違うという症例が実際にあるのか, また証明はされているのかどうかというのが質問の第1点です。そして, そういう形で起こることがあるとすれば, multiple な癌化の場合においてはトランスのファクターが働く結果ではなくて, 更に gene の中でダイナミックな変化が起こる結果であるとお考えになるのでしょうか。つまり, 同じ症例においても癌部と非癌部で違ったパターンを示すという可能性に関してはいかがですか。

小方 限られたデータでものを言うのは危険なのですが, 御質問の意味は, 非癌部の方は2クローンだけ解析していますけれども, southern blot analysis のパターンから考えると, 様々な構造のクローンがあるだろうと, それをすべて解析してみないとわからないということですか。

斉藤 そうではなくて, 同一の症例においても2ヶ所以上の癌部組織で, 異なったサザンのパターンを示すこと, つまり肝炎ウイルスが異なったゲノムの位置に integrate されている可能性, あるいは integrate されてからさらに gene が変化する可能性はありうるのかという質問です。同一症例で異なるゲノムの位置にB型肝炎ウイルスを integrate された肝細胞がそれぞれクローン性の増殖をきたした例があるのかどうかということです。

小方 スライドでお示しましたように, 同一症例の複数の独立肝癌結節を解析すると, HBV の組み込みパターンが各々異なる例はかなりあります。クローニングして構造を解析したら違う構造だという可能性は充分にあると思います。それから, 非癌部肝細胞と肝癌細胞の組み込み構造の違いは, 只今紹介しましたとおり存在します。厳密には, 非癌部肝細胞に組込まれている HBV-DNA の構造を全部洗い出して, 肝癌細胞とそれと比較することが当然必要ですが, 現実にはできないことです。

肝細胞癌で観察された遺伝子変化がいつ起こるのか、組み込み時にもう既に起きるのか、それでもいったん組み込まれて、時間がたってから、おそらく宿主の肝細胞分裂に際して、こういう事が起こるのかということは、非常におもしろい所だと思いますが、直接証明するのはなかなか困難でしょう。ただ、HBV-DNA の組み込みに伴って起こる染色体変異が、現在のところ、肝癌発生に重要な機能を果たすものと考えています。

司会 どうもありがとうございました。では、せっかくですので、どなたか質問なり、演者同志で何かございますでしょうか。

永井 小方先生にですが、HTLV の感染で ATL が発症しますと、まだはっきりわかっていませんが、結構クロモゾームの異常というのか、似たような染色体の異常というのがだいぶつかまってくる部分があるんですけど、hepatoma の場合にはそういうクロモゾームの異常というのがあるかどうかお尋ねしたいのですが。

小方 生の肝癌組織そのものから解析するには困難があると思うので、そういう血液細胞におけるような直接的な染色体解析はやられていないようです。2 例だけなんですけど、HBV の組み込みに際して染色体のトランスロケーションが起こるという報告がありますが、共通する、広い意味での染色体異常というのは未だに捕まっ

ておりません。

司会 血液細胞では染色体異常が重要なマーカーとなりますが、それ以外では、木南先生、如何でしょうか。

木南 僕はよくわからないのですが、逆に方法論が難しいからではないでしょうか。血液細胞のような浮游細胞ではよく検出しうるらしいですが、solid tumor が材料では難しいと聞いていますが。

司会 他にございませんでしょうか。時間も参りましたが、今日のお話のように、遺伝子工学を用いた新しい技術は、今後さまざまな疾患の研究に取り入れられ、臨床医学も避けて通れない分野であることを実感いたしました。しかし DNA 解析で本当に100%診断が可能か、あるいは RFLP 連鎖解析がルーチン化できるかどうか、また、テクニックの面ではアイソトープを使うわけですが、アイソトープを使わない方法がないのかなどの技術的問題、更に進んで gene replacement therapy といった倫理に関する問題なども含まれて、今後解決すべき問題も多々ありますが、いずれにしても、新潟大学でもこの分野の研究がこれだけ進んでいることを、本日改めて実感した次第であります。今後とも、皆様の御活躍を祈りまして、今回のシンポジウムを終わりにしたいと思います。