

# 肝癌におけるB型肝炎ウイルス遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式の解明

楡井和重<sup>1)</sup>, 森山光彦<sup>1)</sup>, 黒田正道<sup>2)</sup>

## Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Kazushige NIREI<sup>1)</sup>, Mitsuhiro MORIYAMA<sup>1)</sup>, Masamichi KURODA<sup>2)</sup>

### 要旨

肝癌(HCC)におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在までなされてきた。HCV関連HCCにおいては、我々は既に、Occult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している。今回の研究の目的は、HCC症例でOccult HBV感染例の全塩基配列を増幅するPCR法を行い、FISH法にてHBV遺伝子のヒト染色体への組み込み部位の検索を行い、real-time PCRシステムおよびアッセイ系を開発することである。対象は、2003年より肝細胞癌の診断にて手術切除され、検体使用の許諾を得た36例である。これらの症例の癌部および非癌部の凍結組織より、通常の方法にてDNAを抽出後、nested PCR法にてHBx DNA (150bp)、PCR法にてHBV-DNA (3.2kbp)、cccDNA (500bp)、の検出を行った。結果としては、HCCにおけるoccult HBV感染の頻度は、HBx DNAは43%に検出された。HBV DNA (3.2kbp)は、B型では3例中2例(66.7%)に検出可能であった。いずれの症例においても癌部よりのみ検出された。このPCR産物を精製して、FISH法のprobeとして使用することとした。

### 1. はじめに

肝癌(HCC)におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在までなされてきた。現状では、HBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は、ランダムであり特定の部位への組み込みはないとされている。一方HCV関連HCCにおいては、我々は既に、Occult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している。今回の研究の目的は、HCC症例でOccult HBV感染例の全塩基配列を増幅するPCR法を行い、そのPCR産物をProbeとして用いるFISH法にてHBV遺伝子のヒト染色体への組み込み部位の検索を行い、C型および非B非C(NBNC)型HCC例についてHBV遺伝子の組み込み部位を確認し、簡便な検出法(real-time PCRシステムおよびアッセイ系)を開発することである。

### 2. 対象および方法

対象は、当院消化器外科にて2003年より肝細胞癌の診断にて手術切除され、検体使用の許諾を得た36例である。内訳は、B型肝炎細胞癌；3例、C型肝炎細胞癌；20例、NBNC型肝炎細胞癌；13例である。これらの症例の癌部および非癌部の凍結組織より、通常の方法にてDNAを抽出後、nested PCR法にてHBx DNA (150bp)、PCR法にてHBV-DNA (3.2kbp)、cccDNA (500bp)、の検出を行った。

- ①高頻度にHBV DNAを検出し得るHBx領域の primer setsを用いたnested PCR法にてHBV DNAを検出した。
- ②HBV DNA検出例について、3.2kbの全塩基配列を増幅できるPCR法を用いてfull genomeの検出を行い、その全塩基配列をAuto Sequencerにて決定する。

FISH法による解析は、2011年に肝癌にて外科切

1)内科学系消化器肝臓内科学分野  
2)病態病理学系微生物学分野  
楡井和重：nirei.kazushige@nihon-u.ac.jp

除された、HBs抗原陽性5例とHBs抗原陰性かつHCV抗体陽性1例の末梢血リンパ球より、リンパ球ヒト染色体上のHBVゲノムの組み込みの検出を行った。

- ①HBV関連肝癌発生のヒト遺伝子へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、3.2kbのPCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討した。
- ②PCR産物を精製して、FISH法に用いるProbeを作製する。

#### 1. HBV DNAの検出方法は以下の如く行った。

- 1) 肝がん症例の全血10mlないしは凍結保存血清100 $\mu$ 、あるいは凍結肝組織よりDNA抽出kitを用いてDNAを抽出する。
- 2) 採取したDNAを用いて、HBx部位に設定したprimer setsを用いて、nested PCR法を行う。

#### 2. HBVの組み込みの検出は以下の如く行った。

- 1) ヘパリン加全血10mlを血球を分離して、プレパレート上に薄層に添付する。
- 2) Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法により、染色体上へのHBVの組み込みの検出を行う。
- 3) B型肝炎患者の血清よりPCRにてHBV全長を増幅し、このPCR産物を利用してFISH法のprobeを作製する。DNA濃度を1 $\mu$ g/ $\mu$ lに調整して20 $\mu$ gをprobeとして使用する。

固定細胞FISHプロトコルを以下に提示する。

- 1) 細胞の変性処理を以下のごとく行う。
  1. 細胞標本を70 $^{\circ}$ Cホットプレート上で2時間ハードニング後、70 $^{\circ}$ Cの70%ホルムアミド/2 $\times$ SSC中2分間変性処理した後、氷冷した70%エタノールに5分浸漬する。
  2. 70%エタノールで洗った後100%エタノールに5分浸漬後風乾もしくは37 $^{\circ}$ Cインキュベーターで乾燥する。
- 2) プローブの変性処理を以下のごとく行う。
  3. スライドあたり10 $\mu$ lのプローブをチューブに入れ75 $^{\circ}$ Cで10分変性して、5分以上氷冷する。
  - 3) ハイブリダイゼーションを行う。
  4. 細胞標本にプローブをアプライしカバーグラ

スをかける。この後37 $^{\circ}$ Cで必要時間ハイブリダイズする。

- 4) 洗浄および検出を行う。
  5. 2 $\times$ SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずして、37 $^{\circ}$ Cの50%ホルムアミド/2 $\times$ SSC中20分浸漬する。
  6. 1 $\times$ SSCですすいだ後1 $\times$ SSC中15分浸漬した後、DAPI染色後マウントし蛍光観察を行う。

### 3. 結果

#### (1) HCCにおける occult HBV感染の頻度

- 1) この結果ではHBx DNAは43%に検出された。内訳はHBx DNAはB型HCC; 3/3(100%)、C型HCC; 6/20 (30%)、NBNC型肝細胞癌; 6/13 (46.2%) に検出された。癌部/非癌部の検索では、B型HCC; 100/100%、C型HCC; 25/25%、NBNC型HCC; 38.4/38.4%であった。

- 2) HBV DNA (3.2kbp) は、B型では3例中2例(66.7%)に検出可能であった。このうち1例をFISH法のprobeとして使用した。Fig.1に全塩基配列を提示する。次に、C型においては全例で検出されなかった。NBNC型HCCにおいては、17例中の1例(7.7%)に検出が可能であった。いずれの症例においても癌部よりのみ検出された。

- 3) このうちNBNC型HCCより検出可能であった1例のPCR産物より3.2kbの全塩基配列をAuto Sequencerを用いたdirect sequence法にて決定した。この結果より、genotype Cに分類された。この症例においては現在詳細を検索中である。

- 4) cccDNAは、B型では3例全例に検出され、C型では20例中2例(10%)、NBNC型では13例中1例(7.7%)に検出された。

癌部と非癌部の比較では、B型は全例が両者より検出された。C型では、癌部2例(10%)、非癌部1例(5%)に検出され、NBNC型では癌部/非癌部ともに1例ずつ(7.7/7.7%)に検出された。

cccDNAの検出例はいずれもHBx DNAが検出されていた。また3.2kbpのHBV DNAが

### 38T-Full genome sequence

```

CTCCACCAGTTCACCAAACTCTCAAGATCCCAGAGTCAGGGCTCTGTACCTTCTGCTGGTGGCTCCAGTTCGGAAACAGTAAGCCCTGCTCAGAATACTGT
CTCAGCCATATCGTCAATCTTATCGACGACTGGGGACCCTGCGCCGAACATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTT
TTTCTCGTGGCAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAGTTTTCTAGGGGAAACACCCGTTGTGCTGGCCAAAATTCGCA
GTCCAAAATCTCCAGTCACTACCAACCTGTTGCTCCTCAATTTGCTCCTGGTATCGCTGGATGTGCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCT
ATGCCTCATCTTCTGTTGGTCTTCTGACTATCAAGGTATGTTGCCGCTTGTCTCTAATTCAGGATCATCAACCACAGCAGGGACCATGCAAGACCTG
CAGACTCCTGCTCAAGGAACTCTCGCTCCATCATGTTGTTGTACAAAACCTAGGGACGGAACTGCACCTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGC
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTCAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGCTGGCTTTTCAGT
TATATGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAAGTCTGTACAACACCTTGAGACCCCTTATGCGCGTGTACCATTCTTGTGTCTTGGTATACATTTAAACCCCT
CACAAAACGAAAGATGGGGATATCCCTTAACTTATGGGATATGTAATGGGAGTGGGGCATTGCCACAGGAACATATTGCCCCAAAATCAAATATGT
TTAGAAAATCTCTGTAACAGGCTATTGATTGAAAGTATGTCAACGAATTTGGGCTTTTGGGGTTTGTGCCCTTTTACGCAATGTGGATATCCTGCT
TTAAAGCATTATATGCATGTATACAGGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTATAAGGCCCTTCTACGTCAACAGTATCTGAACCTTTACCCCGTTGCT
CGGCAACGGCTGGTCTGTGCAAGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTGGGGCTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACTTTGTGTCTCCTCTG
CCGATCCACTGCGGAACCTTAGCCCTTGTGTTGCTCGCAGCAGGTGGAGCCAACTCATCGGACTGACAATTCGTGCTGCTCCCGCAAATATACA
TCGTTTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAATCGGATCCTGCGCGGACGCTCTTTGTTTACGTCCCGTGGCGCTGAATCCCGCGGACGCCCTCCCGGGG
CGTTTTGGGCTCTACCGCCGCTTCTCGCTGCCGTACCGACCCAGCCGCGGCGCACCTCTCTTACGCGGTCTCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGAC
CGTGTGCACTTTCGCTTACCTCTGCACGTTGCATGGAACCCCGTGAACGCCACCGGAGCCTGCCAAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTTCAGCAA
TGTCAACGACCGACTTGAAGGCTACTTCAAAGACTGTGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGACGAGGTTAAAGGTCTTGTACTAGGAGGCTGTA
GGCATAAATGGTCTGTTCCACGACCTTGAACCTTTTCACTCTGCCTAGTCACTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCAAAGCTGTGCCTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATTGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTTCTATAGAGTTACTCTCTTTTTTGCCTACTGACTTCTATCCGTGCGGAGACCTCCTAGA
TACCGCGCTGCACTGTATCGGGACGCAATAGAATCCAATGAACATTGCTCACCTACCATACAGCAATCAGGCAAGCTATTGTGTGCTGGGGGAAAGTAAAGTAC
TCTAGCTTCTGGTGGTGGAAATTTACAAGATCCAGCATCCAGGATCTAGTGTGATGTTAAGCAATCAACATGGCCCTAAAGATCAGGCAATTAATGTTG
GTTTACATTTCTGCTTACTTTTGAAGAGAAGTGTGCTTGAATATTTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTGCGACTCCTCCTGCCTACAGACCACCAATGC
CCCTATCTTATCAACACTTCCGAAACTACTGTTGTTAGACGAGGAGGACGCTCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGGCTCAATCACCGG
TCGCAAGAAGATCTCAATCTCGGGATCCCAATGTTAGTATCCCTGGACTCATAAGGTGGGAACTTTACGGGGCTCTATTCTTACAGTACCTGCTTCAATC
CTGAATGGCAAACCTCTCTTTTCCAGACATTCATTTGCAGGAGGATATTGTTGATAGATGTAAGCAATTTGTTGGACCACTTACAGTAAATGAAACCAAGGAG
TAAATTAATAATGCCTGCTAGATTTTATCCTAAGGTTACCAATATTTACCCTTAGATAAAGGGATCAAACCTTATTATCCAGAGCATGTAGTTAGTCACTACT
TCCAGACAAGACATTAATGCACTCTTTGGAAGGCGGGGATCTTATATAAAGAGAGTCAACACAGAGCGCCTATTCTGCGGGTACCATATTTGGGAAAC
AAGATCTACAGCATGGGAGGTTGGTCTTCAAACCTCGAAAGGCATGGGGACAAATCTTCTGTGCCCAATCCCAAGGATTTCTCCCGATCATCAGTTGGAC
CCTGCCTTCAAAGCACTCAGAACTCCAGATTGGGACCTCAACCCACAAAGACAACCTGGCCGGACGCCACAAGGTGGGAGTGGGAGCATTGGGCCAGGG
TTCACCCCTCCCATGGGGACTGTTGGGTGGAGCCCTCAGACTCAGGGCATACTTACATCTGTGCCAGCAGCCCTCCTCCTGCCTCCCAATCGGCAGTCA
GGAAAGGACGCAACTCCCTATCTCCACCTCTAAGGACACTCATCTCAGGCCATGCAGTGGAA
    
```

Fig1 38T株の全塩基配列

検出された例からは、HBx DNAおよびcccDNAの両者も検出されていた。以上より、HBs抗原が陰性のHCC症例であっても、肝組織よりHBVが検出されること、cccDNAが低頻度ではあるが検出されたことより、HBVがcccDNAの形態にて存在する症例が存在することが確認された。

#### (2) HCC発生例のヒト遺伝子へのHBVゲノムの組み込みの検出

PCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討した。

この結果、B型HCC例4例全例に、ヒトゲノムへのHBVゲノムの組み込みを確認した。

これらの検索結果では、HBVゲノムはヒト染色体へ多数の組み込みが認められた。しかしながら、特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは認められず、HBVゲノムの組み込みはランダムであった。

#### 4. 考察

このPCR産物を精製して、FISH法のprobeとして使用した。

Fish法の結果では、多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら、特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは認められず、その組み込みはランダムであった。現在、組み込み部位と発癌に關与する遺伝子発現の有無など背景因子について、次世代高速シーケンサーを用いて検討中である。

#### 文献

- Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.
- Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2009; 51: 352-361.
- Wang J, Lin J, Chang Y, Li P, Yang Y. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and

its implication in hepatocarcinogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2010; 30: 425-429.

Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5821-5826.