

# 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>, 黒田和道<sup>2)</sup>

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

Kazushige NIREI<sup>1)</sup>, Mitsuhiro MORIYAMA<sup>1)</sup>, Kazumichi 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様式について検索した。本年度の研究には、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH)法を用いて、HBs抗原陽性およびHCV抗体陽性HCC例の末梢血リンパ球より、HBVゲノムのヒトゲノムへの組み込みの有無と組み込み様式の特徴について検索した。対象は、2011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HBs抗原陽性4例およびHCV抗体陽性4例の計8例である。これらの症例の末梢血リンパ球を用いて、前年度に作製したprobeを用いてFISH法を行い、この結果、HBs抗原陽性例では全例にHBVゲノムの組み込みを示す蛍光を認めた。またHCV抗体陽性例では4例中3例にHBVゲノムの組み込みを示す蛍光を認めた。比較的hot spotに近い部位へのHBVゲノムの集積を認めたが、全例に同一の組み込み部位は認められず、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。一方HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性例においても、HBs抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められたが、同様に同一の特定部位へのHBVゲノムの組み込みは確定されなかった。以上より、FISH法を用いてHBs抗原陽性HCC例の末梢血リンパ球より、HBVゲノムのヒト染色体上へのHBVゲノムの組み込みを検出した。一方HCV抗体陽性のいわゆるC型HCCにおいても、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C型慢性肝炎・肝硬変からのHCC発生には、HBVが関与していることも考慮すべきであることが示唆された。

### 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。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、B型およびC型HCC例についてHBV遺伝子の組み込み部位を確認することである。

### 2. 対象および方法

対象は、当院消化器外科にて2011年より肝細胞癌の診断にて血管造影を施行され、検体使用の許諾を得たHBs抗原陽性4例、HCV抗体陽性4例である。

これらの症例より末梢血10mlをヘパリン添加採血した。この後直ちにリンパ球を分離し、培養後各々10細胞をカウントした。

1. HBVゲノムの組み込みの検出は以下の如く行った。

1) 末梢血10mlをヘパリン添加採血した。この後直ちに血球を分離して培養後、プレパラート上に薄層に添付する。

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

2) Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH)  
法により、染色体上へのHBVゲノムの組み込み  
の検出を行う。

2. 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。
  - ・細胞標本を70℃ホットプレート上で2時間ハー  
ドニング後、70℃の70%ホルムアミド/2×  
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。
  - ・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℃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。
  - ・1スライドあたり10 $\mu$ lのプローブをチューブ  
に入れ75℃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。
  - ・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℃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。
  - ・2×SSC中5分浸漬しカバーグラスを静かには  
ずして、37℃の50%ホルムアミド/2×SSC中  
20分浸漬する。
  - ・1×SSCですすいだ後1×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) HBs抗原陽性HCC例のリンパ球からのヒト染色  
体上のHBVゲノムの組み込みの検出

ヒト染色体上にHBVゲノムの組み込みを示す蛍  
光を認める。Fig.1に case 1の1細胞の染色体上に  
HBVゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する(矢  
印)。

Fig.2に4症例各々20細胞分のkaryogramのまと  
めを提示する。同一染色体上のほぼ同一部位に  
最大8細胞がHBVゲノムの組み込みを認めた。  
しかしながら大多数は4細胞以下であり、ヒト染  
色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、  
ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが  
確認された。

2) HCV抗体陽性HCC例のリンパ球からのヒト染色  
体上のHBVゲノムの組み込みの検出

Fig.3に case 5の1細胞の染色体上にHBVゲノム  
の組み込みを示す蛍光を提示する(矢印)。

Fig.4に4症例各々10細胞分のkaryogramのまと  
めを同様に提示する。同一染色体上のほぼ同一  
部位に、最大8細胞がHBVゲノムの組み込みを  
認めた。しかしながらHCV抗体陽性例でも同様  
に、大多数は4細胞以下であり、ヒト染色体上へ

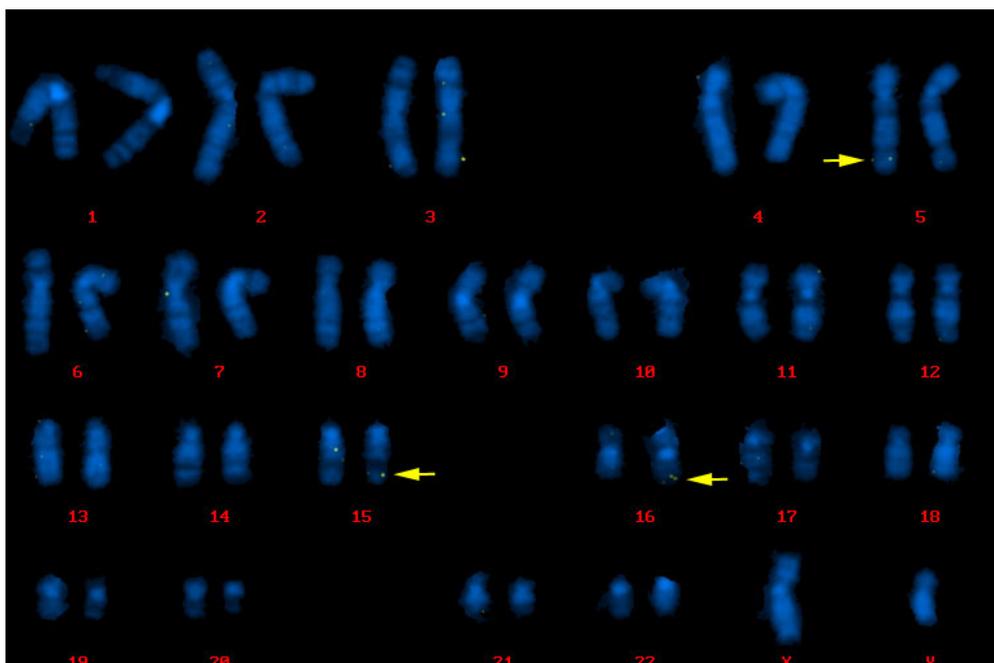


Fig. 1 HBs抗原陽性 Case 1 karyogram

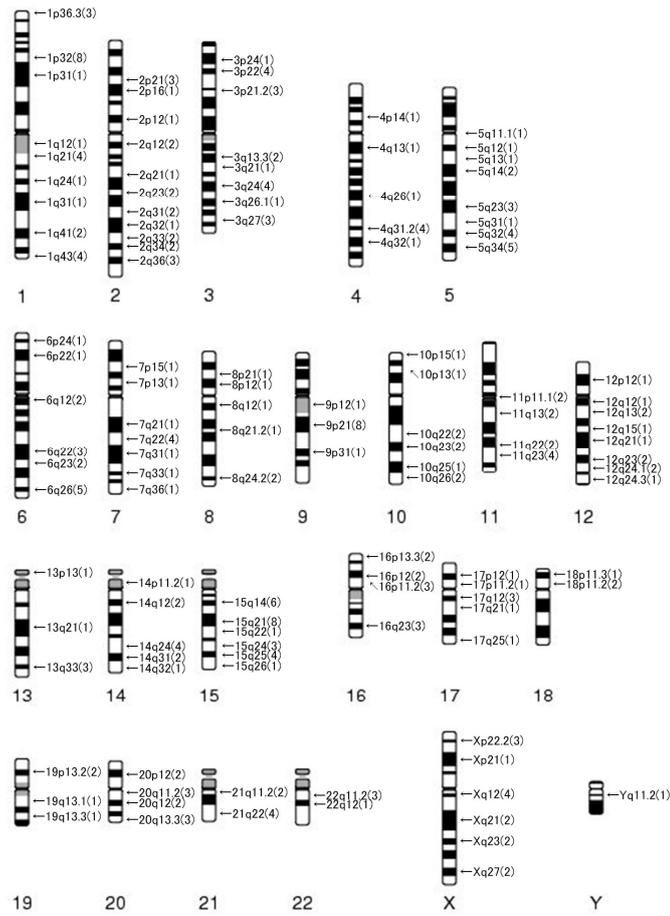


Fig. 2 HBV4症例の ideogram のまとめ

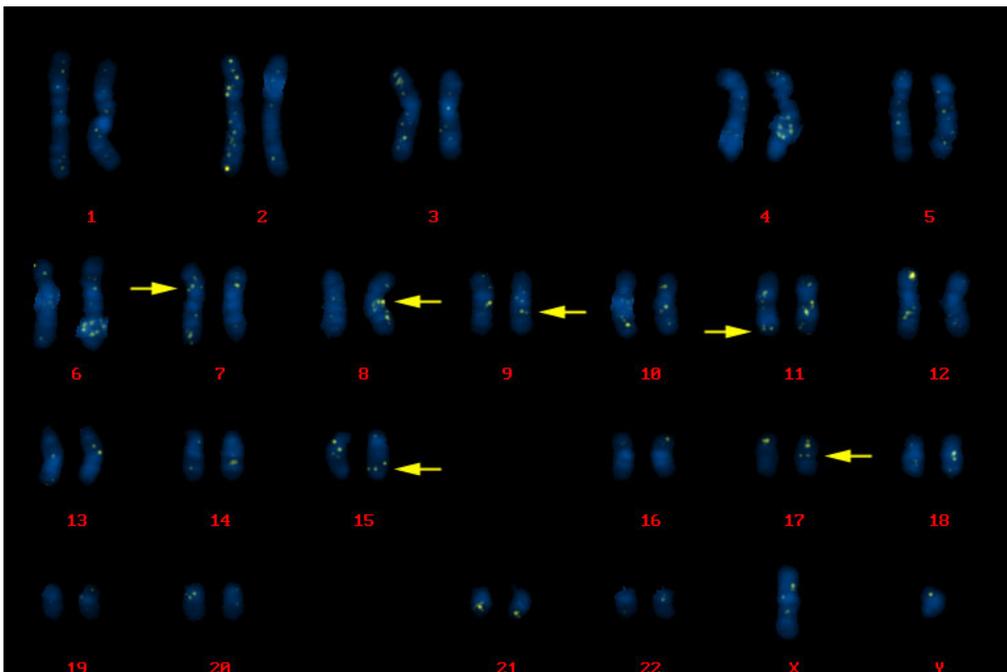


Fig. 3 HCV抗体陽性 Case 1 karyogram

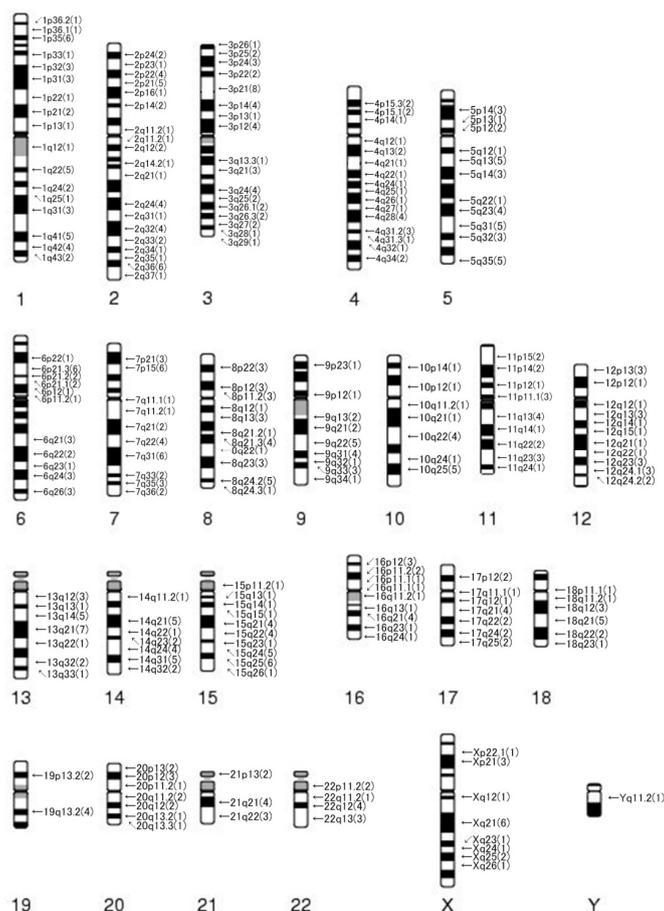


Fig. 4 HCV4症例のideogramのまとめ

の特徴的な組み込み部位は認められず、ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが確認された。

#### 4. 考察

Fish法の結果では、末梢血リンパ球からも多数の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、ヒト染色体上への特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは今のところ認められていない。

HBs抗原陽性例におけるHBVゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。

一方HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性例においても、HBs抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。今までのところ、HBs抗原陽性例と同一の特定部位へのHBVゲノムの組み込みは確定されていないが、HCV抗体陽性のいわゆるC型

HCCにおいても、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C型慢性肝炎・肝硬変からのHCC発生には、HBVが関与していることも考慮すべきであることが示唆された。

現在、組み込み部位と発癌に関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

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.