The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	B型肝炎ウィルスDNAの組み込みに伴う宿主DNAの欠失の解析
Author(s)	中村, 孝昭
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36680
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【65】

氏名・(本籍)	中村孝昭（なかむらたかあき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8355 号
学位授与の日付	昭和63年10月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**B型肝炎ウィルスDNAの組み込みに伴う宿主DNAの欠失の解析**
論文審査委員	(主査) 教授 松原 謙一 (副査) 教授 吉川 寛　教授 羽倉 明

論文内容の要旨

〔目　的〕

B型肝炎ウィルス（以下HBVと略す）DNAはしばしば肝細胞癌や慢性肝炎組織に組み込まれていることが知られている。しかし，組み込み機構についてはよく知られていない。本実験では多くの肝癌組織より得られたHBVを含むDNAクローンに組み込まれたHBVゲノムの構造を解析した。その大部分は，宿主染色体への組み込み後，複雑な再編成を行っていた。本実験の目的は，ウィルスゲノムが単純な形のクローンを選び，正常組織における組み込み部位の構造と比較解析することによって，HBVの組み込みに伴ってどのような変化が宿主DNAに起こったのかを考察することにある。

〔方法ならびに成績〕

肝癌組織よりHBVDNAをプローブとして，HBVゲノムを含むDNA断片をλファージにクローニングし，プラスミドに再クローニングした。この中のクローンpYには，約3.1kbのウィルスゲノムが組み込まれていた。ウィルスの5′末端はDR1より2bp5′側にあり，3′端はX遺伝子の中にあった。ウィルスゲノムの中に再編成や欠失は認められなかった。pYのウィルスDNAに隣接する宿主側の配列の中からユニークな断片を選び，これらをpYの5′及び3′側プローブした。正常人白血球DNAに対してこの両プローブを用いSouthern法で解析したところ，Hind Ⅲ消化した場合，両プローブが同じDNAfragmentに対応することが分った。従って，両プローブは，正常組織では約5kbの範囲内にあると推定された。またこのプローブを用い，正常人白血球DNAから作製したcosmidライブラリーより組み込み部位を含むDNA断片をクローニングし，プラスミドベクターに再クローニングした。これをpNYと名付けた。pYとpNYの制限酵素地図を作成し，比較したところ，HBVの組み込みに伴

う宿主側配列の再編成や大きな欠失は認められなかった。更に，組み込み部位の構造を詳細に調べる為に塩基配列の決定をSangerの方法に従って行い，pYとpNYについて比較したところ，以下のことが分った。

(1) ＨＢＶＤＮＡの組み込み部位には，15bpの欠失が生じていた。これはＨＢＶの組み込みに伴って生じたと思われる。

(2) ウィルス－宿主ジャンクション付近に宿主とウィルスとの塩基配列の相同性は見つからなかった。しかし，5′側ジャンクション近旁にあるウィルスの配列ＣＣＴＣＴが，欠失した宿主の15bpの配列の中にも存在していた。また，3′側のジャンクション近旁にあるウィルスの配列ＴＡＡが欠失した宿主の配列の中にも存在していた。

(3) pYの3′側ジャンクションの宿主側の塩基配列がＴからＡへ置換されていた。これには多型性による可能性と，ウィルスの組み込みに伴って生じた可能性の2通りが考えられる。以上の知見を既に報告のあった解析例と比較してみたところ以下のことが分った。他の1例で，pYと同様に全長に近い長さのウィルスゲノムがＤＲ１からＸ遺伝子まで組み込まれていた。宿主側に短い欠失を伴い，うち一部がウィルスの末端と短い相同性を有していた。また，別の2例では，組み込まれたウィルスゲノムは全長の½～¾であるが，一端はcohesive end領域であり，やはり宿主に短い欠失を起こさせており，欠失した一部のＤＮＡ配列とウィルスの間に短い相同性が認められた。これらは，多くのintegrantの中でも，一群のユニークなグループを構成していると思われる。これら，pYを含めた4例は全く別個の肝癌組織に由来することから，以上の現象は，組み込みに伴って一般的に起こる現象の一部と考えられる。

〔総　　括〕

肝癌組織よりクローニングしたＨＢＶのintegrantの中より，ウィルスゲノムが単純な形をとっているクローンを選び，その組み込み部位付近の構造を組み込み体と組み込み前の正常組織について比較解析した結果，組み込みの標的となった宿主ＤＮＡは小さな欠失を生じ，かつ欠失したＤＮＡとウイルの間に相同性が認められた。ウィルスの一端はcohesive端であり，ウィルスにも欠失が認められた。また，別に同じような解析例が3例報告されている。これら組み込み体は，ウィルス側にも宿主側にも再編成が認められないことから，以上の現象がウィルス組み込み後の早い段階で起こっていることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

Ｂ型肝炎ウィルスの肝癌における組み込みについての解析はこの数年いくつかの報告がなされている。しかし，これらの報告は特殊と思われるクローンや少数例をもって組み込み機構を一般化しようとする傾向があった。本論文では，組み込み機構を解析するために組み込み体のウィルスゲノムが単純で，かつ別の肝癌組織にもよく似たものが見られるクローンを選んだ。それらについて，組み込み体と組み込

み前の宿主ＤＮＡと比較解析することによって，組み込み反応の機構を探ろうとした。

本論文により１）宿主側の塩基配列に組み込みに伴った数 bp〜十数 bp の欠失が生じていた。２）組み込み体のウィルスゲノムは cohesive 領域を中心とした欠失が生じていた。３）組み込み体のウィルスゲノムの一端は必ず cohesive 領域にあった。４）欠失した宿主側の配列と cohesive 領域側にある宿主ウィルス組合点付近にあるウィルスゲノムの配列との間に５〜６ bp の短いホモロジーが見られた等の事実が明らかになった。以上の点が全く別個の４例の肝癌より得られたクローンに見られたことを既に報告されている解析例を引用することによって示した。さらに，これらの組み込み体クローンが組み込み反応の初期の産物である可能性を示唆し，ウィルスの１次組み込み反応が，ウィルスの複製中間体を基質として，cohesive 領域近くの配列と宿主との相同組み換えによっておこる可能性を示した。

本論文より得られた知見は，Ｂ型肝炎ウィルスＤＮＡのヒト染色体への組み込み反応の初期の過程，およびこれに続く２次の再編成反応，更に肝癌発生の機構解明に大いなる意義をもつものであり，博士論文としてふさわしいものと考える。