

| | |
|---------------|---|
| Title | Integration of woodchuck hepatitis virus (WHV) DNA at two chromosomal sites (Vk and gag-like) in a hepatocellular carcinoma |
| Author(s) | 山添, 光芳 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| oaire:version | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/37168 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | | | | |
|---------|--|-------|----|----|
| 氏名・(本籍) | やま | そえ | みつ | よし |
| 学位の種類 | 山 | 添 | 光 | 芳 |
| 学位記番号 | 医 | 学 | 博 | 士 |
| 学位授与の日付 | 第 | 9 | 6 | 7 |
| 学位授与の要件 | 第 | 9 | 6 | 7 |
| | 平成 | 3 | 年 | 3 |
| | 月 | 26 | 日 | |
| | 医学研究科 | 生理系専攻 | | |
| | 学位規則第5条第1項該当 | | | |
| 学位論文題目 | Integration of woodchuck hepatitis virus (WHV) DNA at two chromosomal sites (V κ and gag-like) in a hepatocellular carcinoma (肝細胞癌におけるウッドチャック肝炎ウイルスDNAの染色体2箇所への組み込みの解析:免疫グロブリンV κ 領域とレトロウイルス gag 類似遺伝子への組み込み) | | | |
| 論文審査委員 | (主査) | 教授 | 吉川 | 寛 |
| | (副査) | 教授 | 松原 | 謙一 |
| | | 教授 | 鎌田 | 武信 |

論文内容の要旨

(目的)

B型肝炎ウイルス (HBV) による慢性肝炎が長期間の後に肝硬変、肝癌を引き起こし、その時ウイルスDNAが肝癌細胞DNAに高頻度に組み込まれていることから、ウイルスDNAの組み込みと肝癌発生との間に密接な関係が示唆されている。ウイルスDNAの組み込みは、ウイルスのエンハンサー・プロモーター領域が細胞癌遺伝子の近くに挿入されたり、組み込まれたウイルス遺伝子と宿主DNAが融合して発現された蛋白が、新たな転写活性化作用を示すことによって発癌と直接的に関係しているのではないかとされている。WHV (Woodchuck Hepatitis Virus) は新生ウッドチャックに感染して慢性肝炎を誘起し1-4年の間に高率に肝癌を引き起こすので、発癌におけるウイルスの直接的な役割を研究するには最適のモデルといえる。

本研究ではWHVが感染した1個体のウッドチャックについてウイルスDNAの組み込みを解析し、発癌機構における役割を明らかにすることを目的とした。

(方法ならびに成績)

1. WHV表面抗原陽性の一匹のウッドチャックの発癌3カ月前、発癌後の独立した4つの腫瘍部 (T1-T4) 及び非腫瘍部の肝臓組織よりDNAを調製し、WHVの全ゲノムをプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行った。発癌前、発癌後の非腫瘍部ではウイルスDNAのクロナルな組み込みは認められなかった。一方4つの腫瘍部では全てにウイルスDNAの組み込みを認めたが、ウイルスDNAの部分も大きさもそれぞれ異なっており、4つの腫瘍は各々違った細胞が増殖した結果であると示唆された。

2. 組み込まれたウイルスDNAの構造を詳細に検討するため、T1腫瘍についてウイルスDNAを含む3 kbと7.8kbのBamHI断片(以下B3及びB7)をクローニングし全塩基配列を決定した。又非腫瘍部のDNAライブラリーから、組み込まれたウイルスDNA近傍の染色体DNAをプローブに使い、組み込み部位に相当する正常DNAをクローニングしウイルスDNAと宿主DNAの接合点の構造を決定した。
3. B7領域にはウイルスゲノムのS遺伝子後半からX遺伝子前半 $\frac{2}{3}$ までが再編成を受けずに組み込まれていた。そこにはエンハンサーとX遺伝子プロモーターが含まれており、その下流にはX遺伝子のN端119アミノ酸を含む156アミノ酸のフレームをとることができた。ウイルスと宿主の一方の接合点はウイルスゲノムの特異的繰り返し配列DR1とDR2の間に位置し、ウイルス由来の15塩基の反復配列が認められた。これらの構造はウイルスDNAの組み込みの比較的初期の構造を反映していると思われる。他方の接合点ではウイルスDNAと宿主DNAに共通な配列GGTがあり、組み込まれた後にこの場所で相同組み替えによる再編成を起こした可能性が示唆された。又B7領域では組み込みによる大きな染色体再編成はなかった。組み込み部位を特定するためにB7領域の宿主DNAを解析した結果、ウイルスDNAは免疫グロブリンV κ のスペーサー領域に組み込まれていることがわかった。
4. B3領域に組み込まれたウイルスDNAはpreS遺伝子とその上流が重複し、それに続く3つの小さな断片からなっていた。preS遺伝子の上流にはプロモーターがありpreS遺伝子のN端167アミノ酸から連続して翻訳される246アミノ酸のフレームをとることができた。ウイルスと宿主の2つの接合点では宿主由来の28塩基が存在していた。一方ウイルス同士の接合点では相同組み替えによって再編成したと思われる構造を認めた。B3領域の宿主DNA配列を解析した結果Alu typeの高頻度繰り返し配列が散在していた。また宿主DNAをアミノ酸配列に翻訳した結果ウイルスDNAの組み込み部位から1.7kb下流に351アミノ酸のフレームがとれた。これを既知の蛋白のアミノ酸配列と比較したところレトロウイルス、IAP (intracisternal A particle) のgag蛋白やIgE結合蛋白と相同性を認めた。そしてフレームのC端には2つのフィンガー構造が存在し転写因子である可能性も示唆された。

(総括)

WHVの感染と発癌との関係を明らかにするために1つのウッドチャック肝臓癌についてウイルスDNAの染色体への組み込みを調べた。WHVゲノムは2カ所(B7, B3)に分かれて組み込まれていた。B7では免疫グロブリンV κ のスペーサー領域に、S遺伝子の後半からX遺伝子途中までが染色体の大きな再編成を伴わずに組み込まれており、X遺伝子と宿主DNAからなる融合蛋白が発癌に関与しているのではないかと考えられた。B3ではウイルスDNAの5つの断片がレトロウイルスのgag類似遺伝子の近くに組み込まれることによりこの遺伝子の発現に影響を与えている可能性が考えられた。又組み込まれたウイルスDNAのpreS遺伝子が融合蛋白として発現されていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒト肝癌の発症におけるB型肝炎ウイルス（HBV）の組み込みの役割が示唆されているが、その因果関係は全く不明である。Woodchuck 肝炎ウイルス（WHV）はHBVに近縁のhepadnaウイルスで、感染後肝炎を経て、2-3年で肝癌を高頻度に発症する。発生した腫瘍はHBVと同様にウイルスDNAの組み込みを伴っており、発癌過程における組み込みの直接的な役割を検討するための優れた実験系である。

本研究は自然感染したWoodchuckを追跡観察し、発症初期の肝癌について組み込まれたウイルスDNAと組み込み部位周辺の染色体DNAの塩基配列を決定し、詳細な構造を決定したものである。ウイルスDNAは2箇所に染色体の再編成を伴うことなく組み込まれていた。一方はS遺伝子の後半からX遺伝子の前半までが免疫グロブリンV κ 遺伝子のスペーサー領域に、他方はpreS領域を主に5個の断片がレトロウイルスgagファミリー遺伝子の近傍に組み込まれていた。更に構造の詳細な解析の結果、

- 1) X遺伝子と染色体DNAとの融合蛋白
- 2) preS遺伝子と染色体DNAとの融合蛋白
- 3) gagファミリー遺伝子の活性化

のいずれか又は複合作用が発癌に関与する可能性を明らかにした。

以上の研究はhepadnaウイルスによる肝癌発生の機序を解明する上で重要な手がかりとなるもので、医学博士の学位を与える価値あるものと評価された。