

Identification of the Chromosomal Sites of Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) DNA Integration in a Woodchuck Hepatocellular Carcinoma-derived Cell Line (WH257 GE10)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8026

ウッドチャック肝細胞癌由来培養細胞株 (WH257 GE10) におけるウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) DNA の染色体上の組み込み部位の解析

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

水 野 恭 嗣

(昭和63年2月22日受付)

ヒト肝細胞癌の染色体 DNA 中に、高頻度に、ヒト B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) DNA の組み込みが証明される事実は、HBV DNA の組み込みと発癌との関連を強く示唆するものと考えられている。HBV に類似したゲノム構造を有するヘパドナウイルスに属し、最も発癌性が高いウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus, WHV) による肝細胞癌発生機構の解析は、HBV によるヒト肝細胞癌発生の解析の格好のモデル系と考えられている。ウッドチャック肝細胞癌由来培養細胞株 (WH257 GE10) では染色体異常 (36, X, -5, -13, -13, -Y, +M₁, +M₂) が存在することがすでに報告されているが、今回、WH257 GE10 における WHV DNA の染色体上の組み込み部位について *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。ウッドチャック染色体にて初めて決定された標準 G-バンドパターン模式図において、³H (トリチウム) 標識 WHV DNA の局在部位を同定した。その結果、WH257 GE10 では、第 6 染色体長腕部 3-3 領域 (6q33) と第 8 染色体長腕部 3-1 領域 (8q31) の 2 箇所に WHV DNA の組み込みが認められた。さらに、WHV DNA の染色体上の組み込み部位は、解析された継代期間を通して一定であったことから、WHV DNA の組み込みがウッドチャック肝細胞癌の発生に関与し、組み込まれた WHV DNA が癌細胞としての性質の維持に何らかの役割を果たしている可能性が推測された。

Key words woodchuck hepatitis virus (WHV), hepatocellular carcinoma, chromosomal abnormalities, *in situ* hybridization, chromosomal sites of WHV DNA integration

ヒト B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) 感染とヒト肝細胞癌の発生との間には、疫学的に密接な関連が存在することが知られている¹⁾。近年、ヒト肝細胞癌の染色体 DNA に HBV DNA が高率に組み込まれているという報告がなされ、HBV DNA の組み込みが肝細胞癌の発生に重要な役割を果たしていると考えられるようになった²⁾⁻⁶⁾。しかし、HBV がヒト、チンパンジーなどの特定の宿主にしか感染しないことや、ウイルスゲノム中に癌遺伝子が同定されていないことから、HBV と肝細胞癌の発生との関連性を直接的に証明することは極めて困難である。1980 年代後半から、

HBV と極めて類似した粒子構造、ゲノム構造を有するウイルスが各種動物より単離され、ヘパドナウイルスとして分類された。ウッドチャック (woodchuck; *Marmota monax*) にはヘパドナウイルスに属するウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus, WHV) が高率に持続感染し、WHV 陽性のウッドチャックでは、比較的短期間に極めて高率に肝細胞癌が発生することが明らかにされている。しかも、その寿命がヒトの約十分の一と短く、発癌までの全過程を短期間に観察できる利点をもつことから、ウッドチャックは HBV 関連ヒト肝細胞癌の発生機序解明に

Abbreviations: bp, base pairs; HBV, Hepatitis B virus; SSC, Standaard saline citrate; WHV, Woodchuck hepatitis virus.

とって格好の実験モデルとなった⁷⁾。ウッドチャック正常細胞および Unoura ら⁸⁾によって樹立されたウッドチャック肝細胞癌培養株 (WH257 GE10) の染色体構成は、Matsushita ら⁹⁾により G-バンド法を用いて初めて解析され、WH257 GE10 では染色体異常が存在することが明らかとなり、ウッドチャック肝細胞癌における発癌機構に染色体異常が関与している可能性が示唆された。また Kaneko ら¹⁰⁾によれば、WH257 GE10 では少なくとも3箇所に WHV DNA の組み込みが認められるとされており、その他の報告でも、ウッドチャックにおける肝細胞癌発生については、HBV 関連ヒト肝細胞癌の場合と同様、肝細胞 DNA への WHV の組み込みがその最も直接的な機序と考えられている¹¹⁾¹²⁾。

今回、著者は、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、WH257 GE10 における WHV DNA の染色体上の組み込み部位を明らかにした。

材料および方法

I. 染色体標本の作製および染色体解析

正常細胞としては雄ウッドチャック初代腎培養細胞、肝癌細胞としては Unoura ら⁸⁾によって樹立されたウッドチャック肝細胞癌由来培養細胞株 (WH257 GE10) を用い、Matsushita ら⁹⁾の方法に準じ、トリプシン・ギムザ・バンド法 (G-バンド法) によって染色体標本作製し、染色体核型を解析した。ウッドチャック初代腎培養細胞および WH257 GE10 において、個々の染色体についてその G-バンドパターンのマッピングを行い、染色体の標準分染パターンの模式図を作製した。染色体の標準バンドパターン模式図は、濃染 G-バンドを模式図の黒色バンドに、淡染 G-バンドを模式図の白色バンドにそれぞれ対応させた。また、模式図のサブバンド (領域番号, バンド番号) の命名は、分染法によるヒト染色体命名規約¹³⁾に基づいて行った。

II. *in situ* ハイブリダイゼーション法¹⁴⁾

1. 染色体標本の前処置

まず、WH257 GE10 について G-バンド標本作製し、写真撮影を行なった。ついで、この標本を1%塩酸-99%エタノール液にて脱色後、室温にて乾燥させた。次に試料細胞中に存在する RNA を除くため、RNase A (100 μ g/ml) (Sigma, 米国) にて 37°C, 60 分間処理し、0.3 M 塩化ナトリウム-0.03 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0) 溶液 (2 $\times$ standard saline citrate, 2 $\times$ SSC) にて 2 回洗浄後、70%エタノールにて 2 回、100%エタノールにて 1 回洗浄し、室温にて乾燥させた。さらに、染色体 DNA を変性させるため、

70%ホルムアミド-2 $\times$ SSC 溶液 (pH 7.0) にて 70°C $\cdot$ 3 分間熱処理し、氷冷した 0.015 M 塩化ナトリウム-0.0015 M クエン酸ナトリウム溶液 (0.1 $\times$ SSC) にて急冷後、エタノールにて洗浄し、室温にて乾燥させた。

2. プローブ DNA の作製

プラスミド pBR 325 の EcoRI site に組み込まれた 3320 base pairs (bp) の WHV 全ゲノム・WHV 2¹⁵⁾ をニック・トランスレーション法¹⁶⁾により、³H-4dNTP を用いて標識し、プローブとした。プローブの比活性は約 1 $\sim$ 2 $\times$ 10⁸ cpm/ μ g DNA であった。プローブ DNA は、室温にて 0.2 N NaOH で 15 分間アルカリ変性を行い、次いで 2 M Tris $\cdot$ HCl (pH 7.0) にて中和処理した。さらに、0.3 M NaCl, 60 mM Tris $\cdot$ HCl (pH 7.0), $\times$ 5 Denhardt 溶液 (0.1%ウシ血清アルブミン (生化学工業株式会社, 東京), 0.1%ポリビニルピロリドン (Sigma, 米国), 0.1%フィコール (Sigma, 米国)), 10%硫酸デキストラン, 1 mM EDTA, 250 μ g/ml 変性仔牛胸腺 DNA (Boehringer $\cdot$ Mannheim, 西ドイツ), 50%ホルムアミドからなるハイブリダイゼーション溶液とゆっくり混合した。

3. プローブ DNA とのハイブリダイゼーション

スライドガラスの試料の上にプローブ DNA を含んだハイブリダイゼーション溶液を滴下 (50 μ l/スライドガラス) し、シリコン処理をしたカバーガラスを滴下した溶液の上にそっとのせ、湿気のあるスライドケースの中に入れ、密封した後、42°C にて 14 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、50%ホルムアミド-2 $\times$ SSC 溶液中に、ハイブリダイゼーションの反応の終わったスライドガラスを浸し、カバーガラスをはずした。次に、50%ホルムアミド-2 $\times$ SSC 溶液にて 39°C $\cdot$ 5 分間の洗浄を 2 回行い、洗浄液を 2 $\times$ SSC にかえて 39°C $\cdot$ 5 分間の洗浄を 2 回行った。さらに 2 $\times$ SSC 溶液にて 30°C, 60 分間ずつ、3 回洗浄した後、70%, 100%エタノールにて脱水し、室温にて乾燥させた。

4. オートラジオグラフィ

暗室で、あらかじめ 45°C に加温した蒸留水に対し、等量のサクラ NR-M2 (小西写真工業 KK, 東京) を加え (通常、蒸留水 10 ml に対し等量の NR-M2 を加える), かくはんし、塗布用の乳剤とした。この乳剤にスライドガラスを浸すことにより、試料の表面に乳剤を塗布し、風乾させた後、シリカゲルの入った暗箱に入れ密封し、-70°C にて 21 日間オートラジオグラフィを行った。次に、スライドガラス上の乳剤フィルムを 20°C にてコニドール X (小西写真工業 KK) で 5 分間現象し、定着液 F-5 にて約 5 分間定着した。

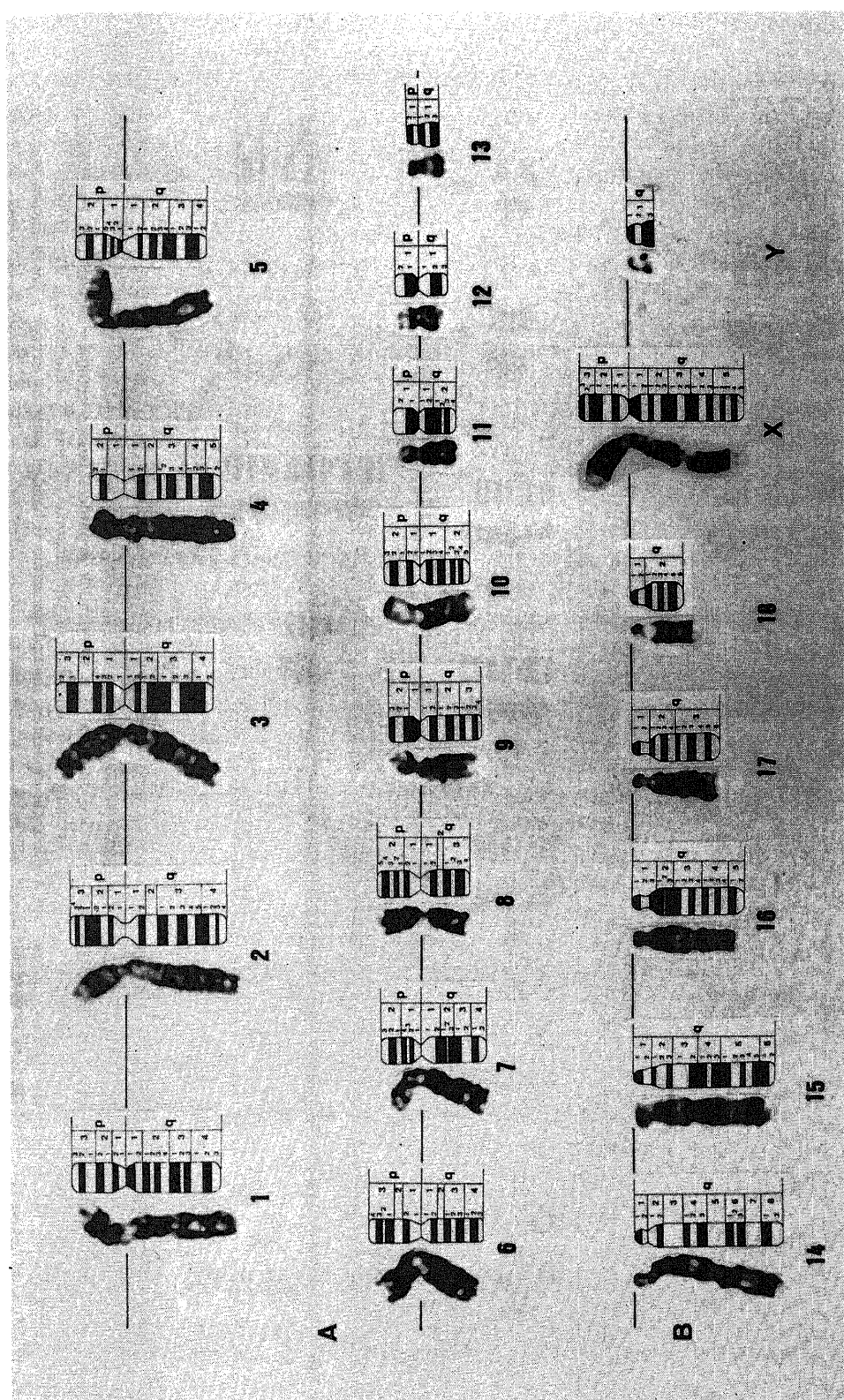


Fig. 1. Comparison between G-banded Karyotype and G-banded diagram of a woodchuck kidney cell. Autosomes were classified into the two groups (A and B) according to the position of the centromeres. Group A consisted of 13 pairs (No. 1-13) of metacentric or submetacentric chromosomes, and group B consisted of 5 pairs (No. 14-18) of telocentric or subtelocentric ones. X chromosome was submetacentric, and Y chromosome was telocentric.

安全光にてフィルムが透明になっていることを確認した後、軽く水洗し、再びギムザ染色を行い、顕微鏡下にて銀粒子の染色体上の局在部位を観察した。銀粒子の染色体上の局在部位は、*in situ* ハイブリダイゼーションを行う前にあらかじめ写真撮影をしておいた G-バンド染色体領域に、顕微鏡下でプロットすることにより同定した。*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析は、第 14, 27, 35, 49 代目の培養細胞株を用い、計 160 個の分裂中期核板 (metaphase plate) について行った。ハプロイドゲノムの割合 (% of haploid genome) は、観察した分裂中期核板 (metaphase plate) において、個々の染色体の短腕部 (p), 長腕部 (q) の長さを計測し、その平均値を染色体全体の長さの平均値で除し、百分率にて表現した。

III. 統計学的処理

χ^2 検定を用いて行った。

成 績

I. 染色体の核型解析および染色体の標準バンドパターン模式図との比較対応

雄ウッドチャック初代腎培養細胞 (正常細胞) では、常染色体は中部着糸型 (metacentric) あるいは次中部着糸型 (submetacentric) の染色体により構成される No. 1 から 13 までの 13 対 (A 群) と、端部着糸型 (telocentric) あるいは次端部着糸型 (subtelocentric) の染色体により構成される No. 14 から 18 までの 5 対 (B 群) の計 36 本で、性染色体は、大型の次中部着糸型 (submetacentric) の染色体 X と小型の端部着糸型 (telocentric) の染色体 Y とによって構成されていた (図 1)。

WH257 GE10 では、染色体数は 36 本で、常染色体では No. 5 が 1 本、No. 13 が 1 対 (2 本)、性染色体では Y が欠失し、さらに 2 本の次端部着糸型 (subtelocentric) マーカー染色体 (M_1, M_2) が出現していた。

M_1 は M_2 の長腕部末端に染色体断片が付着した形態を示していた (図 2)。

II. *in situ* ハイブリダイゼーション

in situ ハイブリダイゼーション法により WH257 GE10 の分裂中期染色体上に認められた銀粒子の分布を表 1 に示した。No. 1 から M_2 までの個々の染色体における銀粒子数の観測値と期待値との間で、 χ^2 検定を行った。第 6 染色体短腕部 (6p) では、期待値 24 に対し観測値は 35、第 6 染色体長腕部 (6q) では、期待値 32 に対し観測値は 75、さらに第 8 染色体短腕部 (8p) では、期待値 26 に対し観測値は 46、第 8 染色体長腕部 (8q) では、期待値 30 に対し観測値は 95 であ

り、これらの観測値は統計学的に有意であった (6p では危険度 0.05~0.01 であったが、6q, 8p, 8q では危険度 10^{-3} 以下と高い有意差を認めた)。その他の染色体では銀粒子の有意な集積は認められなかった。

また、分裂中期染色体 G-バンド領域における銀粒子の分布では、160 個の分裂中期核板 (metaphase plate) について観測された全銀粒子数 1,227 のうち、第 6 染色体には 110 個 (9.0%)、第 8 染色体には 141 個 (11.5%) の銀粒子の集積が認められた (図 3, 表 1)。さらに、6q と 8q の特定のサブバンド領域に銀粒子集積のピークが認められた (図 3)。これに対して、銀粒子数の観測値が期待値より高値を示したその他の染色体 (2p, q, 3q, 7p, q, 9p, q, 10p, q, 11p, q, 14, 18) では、特定のサブバンド領域への銀粒子の集積は認められなかった (図 3, 表 1)。

次に、銀粒子の有意な集積が認められた第 6 染色体と第 8 染色体について、G バンディングとその模式図を対応させ、サブバンド領域における銀粒子の分布を図 4 に示した。第 6 染色体では、110 個の銀粒子のうち 55 個 (50.0%) が長腕部 3-3 領域 (6q33) に集積し、第 8 染色体では、141 個の銀粒子のうち 71 個 (50.4%) が長腕部 3-1 領域 (8q31) に集積していた。その他のサブバンド領域ではいずれも銀粒子の集積は 10 個以下であった。

以上の知見より、WH257 GE10 では、第 6 染色体長腕部 3-3 領域 (6q33) と第 8 染色体長腕部 3-1 領域 (8q31) の 2 箇所、WHV DNA が組み込まれていると結論された。

なお以上の成績は第 14, 27, 35, 49 代のそれぞれの培養細胞株についての成績を総合したものであるが、個々の成績についても同様に、6q33 と 8q31 への WHV DNA の組み込みが認められており、WH257 GE10 における WHV DNA の染色体上の組み込み部位は、解析された継代期間を通して一定であると考えられた。

考 察

HBV 感染とヒト肝細胞癌の発生は、疫学的に密接な関連を有していることが知られている。最近の分子生物学的研究手法の著しい進歩によって、WHV DNA が肝細胞癌の染色体 DNA に高率に組み込まれていることが明らかにされ、HBV そのものがヒト肝細胞癌発生に関して直接的な役割を演じている可能性が示唆されている。

HBV と類似したゲノム構造をもつヘパドナウイルスの中で、WHV は最も発癌性が強いことが知られている。ウッドチャックには WHV が高率に持続感染

し、WHV 陽性のウッドチャックでは、高率に肝細胞癌の発生が認められ、しかも、肝硬変という病態を経ず、感染後2～3年という比較的短期間に肝細胞癌が発生する⁷⁾。これらの点から、ウッドチャックとWHVは、HBV 関連ヒト肝細胞癌の発生機序解明に格好の実験モデルと考えられている。ウッドチャック肝細胞癌の発生については、肝細胞癌のDNA中にWHVの組み込みが証明されて以来、WHVの組み込みがその

直接的な機序である可能性が示唆されているが、全ての例でWHVの組み込みが認められるわけではなく、他の要因の関与も否定できない。

さて、HBV DNAの組み込みが発癌にどのように関係しているのかについては、現在次のような可能性が推測される。すなわち、1) HBVがラウス肉腫ウイルスのようにウイルス発癌遺伝子(v-onc)を有し、組み込まれた肝細胞内において、そのv-oncが発現し、

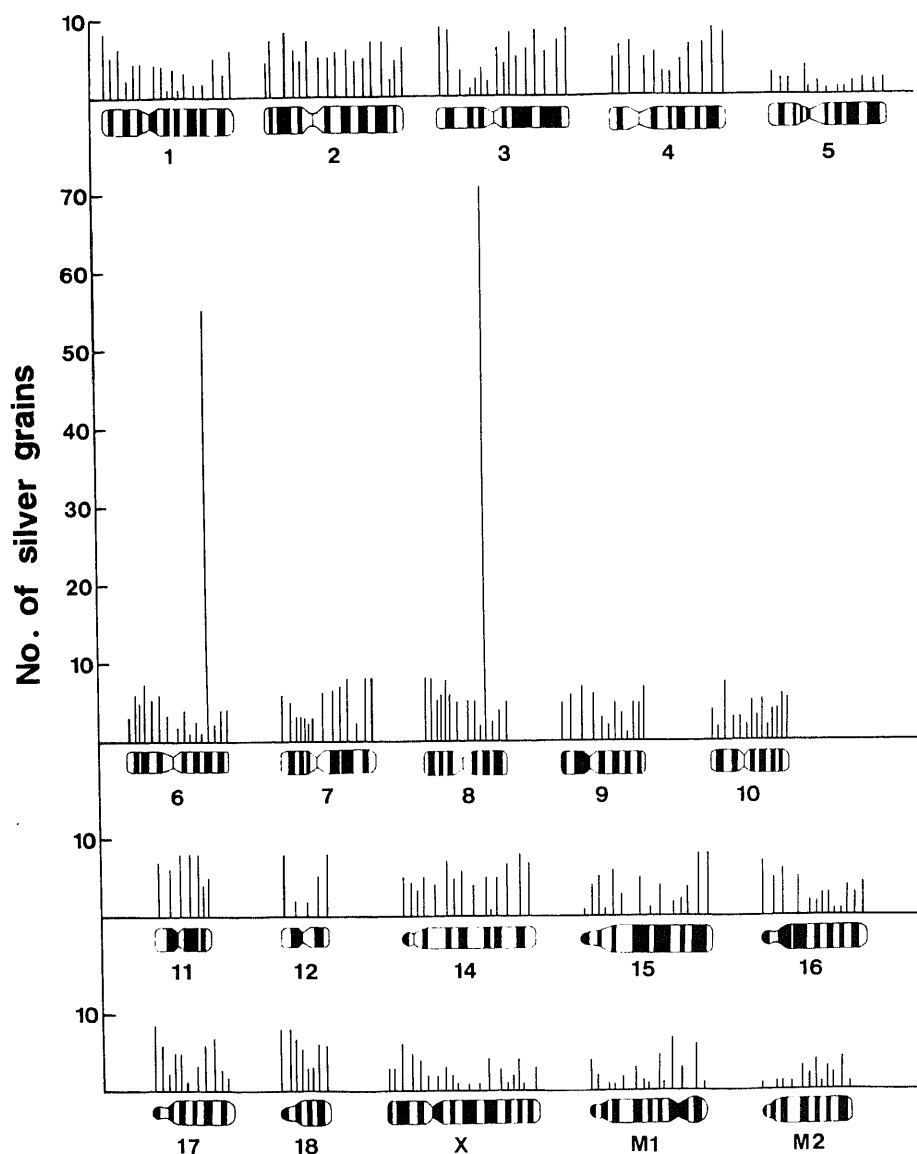


Fig. 3. Distribution of autoradiographic silver grains on the G-banded 160 metaphase chromosome spreads after *in situ* hybridization with a WHV DNA probe. Of 1227 silver grains associated with the chromosomes, 110 (9.0%) and 141 (11.5%) were located on the chromosomes 6 and 8, respectively.

細胞を癌化する可能性, 2) HBV DNA が肝癌細胞の DNA の特定部位に組み込まれることにより, 近傍の発癌遺伝子 (c-onc) に cis に働いて, これを直接活性化し癌化を引き起こす可能性, 3) HBV には X 領域などその機能の明らかでない領域があり, また組み込まれた HBV DNA には PreS から S の領域が保存されている場合が多いので, これらの領域にコードされているタンパクが増殖関連遺伝子に trans に働き, 癌化を引き起こす可能性 (trans-acting transcriptional

activation), 4) HBV DNA の組み込みにより染色体異常をきたし, 発癌を招来する可能性である。

近年, マウスの形質細胞腫やヒトのバーキットリンパ腫などでは, 染色体転座によって発癌遺伝子 (c-onc) が活性化され, 癌化が起こるという可能性¹⁷⁾¹⁸⁾が報告され, 癌と染色体異常との密接な関係が注目されてきている。

以上述べた発癌機構の可能性 1)~4)のうち, 癌と染色体異常について注目してみると, 肝細胞癌におけ

Table 1. Distribution of silver grains on WH257 GE10 metaphase chromosomes after in situ hybridization

Choromsomes		% of haploid genome	Number of silver grains			P values* of positive deviations
			Observed	Expected	χ^2	
1	p	2.45	29	30.1	0.038	0.05~0.01 <10 ⁻⁴
	q	4.57	34	56.1	8.73	
2	p	2.12	36	26.1	3.79	
	q	4.57	57	56.1	0.013	
3	p	3.27	28	40.1	3.65	
	q	4.57	60	56.1	0.27	
4	p	2.12	18	26.1	2.49	
	q	4.25	52	52.1	0.0003	
5	p	2.45	12	30.1	10.85	
	q	3.76	13	46.1	23.78	
6	p	1.96	35	24.0	4.99	<10 ⁻³ ≪10 ⁻⁴
	q	2.61	75	32.1	57.45	
7	p	1.63	25	20.0	1.22	
	q	3.43	45	42.1	0.20	
8	p	2.12	46	26.1	15.25	
	q	2.45	95	30.1	140.28	
9	p	1.14	18	14.0	1.12	
	q	2.94	38	36.1	0.10	
10	p	1.14	19	14.0	1.75	
	q	2.45	36	30.1	1.17	
11	p	0.65	13	8.0	3.10	
	q	1.96	33	24.0	3.33	
12	p	0.98	10	12.0	0.34	
	q	1.30	15	16.0	0.057	
14		5.88	76	72.1	0.21	
15		5.39	56	66.2	1.56	
16		4.09	45	50.1	0.52	
17		4.09	49	50.1	0.025	
18		2.94	47	36.1	3.31	
X	p	2.45	23	30.1	1.66	
	q	5.07	28	62.1	18.76	
M ₁		5.23	37	64.2	11.50	
M ₂		3.92	24	48.1	12.08	

* P value was determined from the χ^2 value for one degree of freedom

る染色体異常および HBV DNA の組み込みに関していくつかの報告がなされている。固形癌では染色体解析が技術的に困難であるためその報告は少ないが、Rogler ら¹⁹⁾によれば、第 1 1 染色体の短腕の一部 (11p13~11p14) が欠失し、同部への HBV DNA の組み込みが証明されている。さらに Hino ら²⁰⁾によれば、HBV DNA が組み込まれた部位で、第 17 染色体と第 18 染色体との間に転座が示されており、HBV DNA の組み込みは染色体異常をきたし、肝細胞癌の発生を誘発する可能性が示唆されている。

ヒト肝細胞癌培養株については、HBV DNA の組み込みを認める PLC/PRF/5 株および Hep 3B 株について詳細な検討が行われている。PLC/PRF/5 株では、第 1 染色体の部分的ペンタソミー、第 2, 6, 9, 10, 11, 17q, 22 染色体のトリソミー、第 15 染色体のテトラソミー、Y 染色体の欠失が認められ、これらの変化は継代を経てもきわめて安定している²¹⁾。Hep 3B 株においても、ほぼ同様の染色体異常が認められている²²⁾。さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法により、PLC/PRF/5 株では、15q22-15q23, 11q22 および 18q12 の 3 箇所に HBV DNA の組み込みが証明され、15q の複製が肝細胞のトランスフォーメーションと関

係している可能性が示唆されている²³⁾。Hep 3B 2-1/7 株では、12q13-12q14 に HBV の組み込みが証明され、HBV DNA の組み込みにより、成長制御遺伝子の異常発現や肝細胞のトランスフォーメーションが起こる可能性が示唆されている²⁴⁾。このように、ヒト肝細胞癌培養株では、染色体異常と HBV DNA の染色体上の組み込み部位が明らかにされているが、HBV の組み込みは、染色体異常とその近傍の部位においてのみ認められるとは限らない。

一方、ウッドチャック肝細胞癌においては、固形癌の染色体解析は技術的に困難な点が多く、まだ報告はなされていないが、Möröy ら²⁵⁾によれば、ウッドチャック肝細胞癌において c-myc 遺伝子の再編成と発現が示され、WHV DNA の組み込みにより、c-myc 遺伝子が活性化される可能性が示唆されている。

これに対し、ウッドチャック肝細胞癌由来培養細胞株 (WH257 GE10) では、Matsushita ら⁹⁾により染色体異常の存在が明らかにされている。すなわち、第 5 染色体 (1 本)、第 13 染色体 (1 対) および Y の欠失と、2 本のマーカー染色体 (M_1 , M_2) の出現である。さらに M_1 の長腕部に付着した染色体断片は第 13 染色体に類似しており、第 13 染色体の 1 本が転座した可

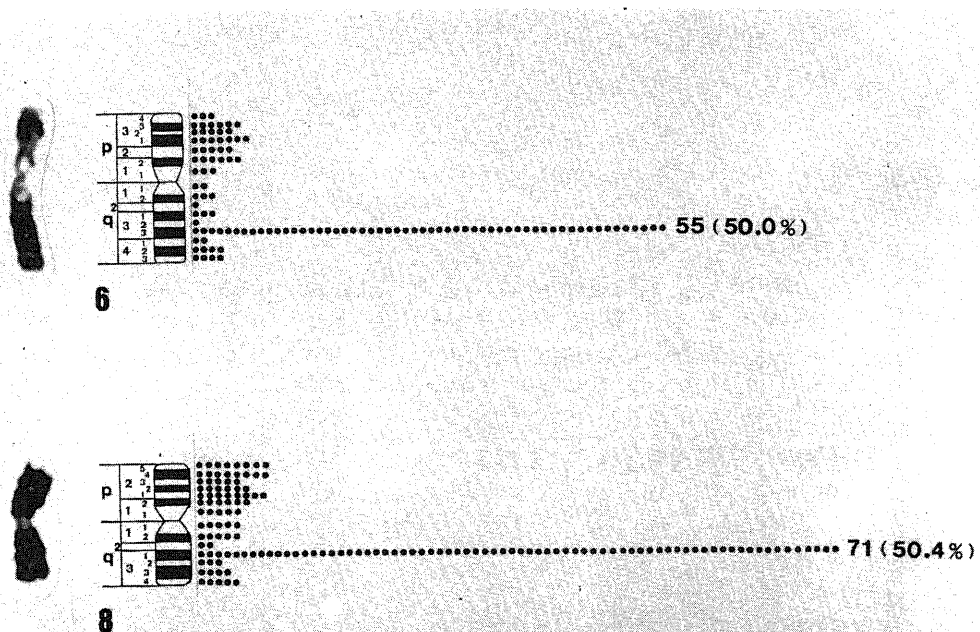


Fig. 4. Distribution of autoradiographic silver grains on the chromosomes 6 and 8 after *in situ* hybridization with a WHV DNA probe. Of 110 grains, 55 (50.0%) were concentrated within the 6q33, and of 141 grains, 71 (50.4%) were concentrated within the 8q31.

能性が推測されている。この知見から、ウッドチャック肝細胞癌発生に染色体異常が関与している可能性が推測されるが、WHV DNA の組み込みと染色体異常との関係については明らかではない。今回著者は、この課題への接近として、WH257 GE10 における WHV DNA の染色体上の組み込み部位について、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。

ウッドチャック肝細胞癌 DNA への WHV DNA の組み込みについては、Snyder ら²⁰⁾によって初めて報告され、肝細胞癌の発生と WHV DNA との密接な関係が示唆されている。今回、著者は、WH257 GE10 において、第 6 染色体長腕部 3-3 領域 (6q33) および第 8 染色体長腕部 3-1 領域 (8q31) の 2 箇所に WHV DNA が組み込まれていることを明らかにした。さらに、WHV DNA の染色体上の組み込み部位は解析された継代期間を通して一定であったことから、WHV DNA の組み込みが肝細胞癌の発生に関与し、組み込まれた WHV DNA が癌細胞としての性質の維持に何らかの役割を果たしている可能性が推測された。

WH257 GE10 における WHV DNA の組み込みと染色体異常との直接の関連性については、WHV DNA の組み込み部位と染色体異常の認められる部位とが一致していないことから、現在のところ言及することは困難であるが、次のような可能性が推測される。すなわち、1) WHV DNA が発癌遺伝子 (c-onc) の近傍に組み込まれることにより、c-onc の再編成および活性化が起こり、発癌さらに染色体 DNA の再編成 (染色体異常) を引き起こす可能性、2) WHV DNA の組み込みが宿主の DNA 組替えをはじめとする遺伝子再編成を引き起こし、染色体異常をきたすことにより、癌化を招来する可能性、3) WHV DNA の組み込みにより、宿主 DNA を含めたウイルス DNA に複雑な再編成が生じ²⁷⁾、染色体異常を引き起こす可能性などである。

現時点では、いずれの可能性をも積極的に支持する実験事実はない。これまでの報告から、ウッドチャック肝細胞癌の発癌機構を推測すると、まず第一に WHV DNA の組み込みが必須であり、WHV DNA の組み込みにより、何らかの過程を経て染色体異常をきたし、発癌に至るものと考えられる。

染色体異常が肝細胞癌発生の原因か否かについては、現時点では不明である。もし WHV DNA の組み込みが必須であるとしても、染色体異常が癌細胞としての性質の維持に必須である可能性は、否定することはできない。この意味でウッドチャック肝細胞癌の発生には、WHV DNA の組み込みによる初期過程 (細胞の immortalization) と、それに続く、染色体異常に

よる腫瘍性の獲得という段階を仮定することができるのではないだろうか。

今後、ウッドチャック肝細胞癌の発生機構を研究するひとつのアプローチとして、WHV DNA の組み込みと染色体異常との関係を明らかにするためには、WH257 GE10 染色体 DNA における各種発癌遺伝子の局在部位の解析が必要とされる。さしあたり、WHV DNA 組み込み部位の近傍に、どのような発癌遺伝子が存在し発現しているのかを明らかにしたい。特に、ウッドチャック肝細胞癌において、培養系を介さない原発肝細胞癌の解析は急務であり、この系において染色体異常や WHV DNA の組み込み部位が判明すれば、WHV DNA の組み込みと染色体異常および発癌との関係がさらに明らかになるものと期待される。

結 論

ウッドチャック肝細胞癌由来培養細胞株 (WH257 GE10) において、WHV DNA が組み込まれている染色体部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。

まず、個々の染色体の G-バンドパターンについて、その領域および亜領域を決定した。

in situ ハイブリダイゼーション法による解析の結果、WH257 GE10 では、第 6 染色体長腕部 3-3 領域 (6q33) と第 8 染色体長腕部 3-1 領域 (8q31) の 2 箇所に WHV DNA の組み込みが認められ、これらの組み込み部位は、解析された継代期間を通して一定であった。これらの知見から、WHV DNA の組み込みが肝細胞癌の発生に関与し、組み込まれた WHV DNA が癌細胞としての性質の維持に何らかの役割を果たしている可能性が推測された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました、恩師服部信教授に深甚の謝意を捧げます。また、直接の御指導をいただきました、金沢大学がん研究所分子免疫部大野真介博士、右田俊介教授、金沢大学第 1 内科鶴浦雅志博士、小林健一助教授に心から感謝いたします。本研究に、WHV DNA プローブ作製を通して御援助下さった、金沢大学がん研究所生物物理部村上清史助教授に深謝いたします。また、御協力と御助言をいただきました、松下文昭博士はじめ第 1 内科第 2 研究室員各位に深く感謝いたします。尚、本論文の要旨は、第 46 回日本癌学会総会 (昭和 62 年 9 月、東京) において発表した。

文 献

- 1) Beasley, R., Hwang, L. Y. & Lin, C. C.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet*, 2, 1129-1132 (1981).

- 2) **Shafritz, D. A., Shouval, D. & Sherman, H. I.**: Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cell in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1067-1073 (1981).
- 3) **Koshy, R., Maupas, P. H. & Müller, R.**: Detection of hepatitis virus-specific DNA in the genome of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues. *J. Gen. Virol.*, **57**, 95-102 (1981).
- 4) **Brechot, C., Pourcel, C. & Hadchouel, M.**: State of hepatitis B virus DNA in liver diseases. *Hepatology*, **2**, 27-34 (1982).
- 5) **Chen, D. S., Hoyer, B. H. & Nelson, J.**: Detection and properties of hepatitis B virus DNA in liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2**, 42-46 (1982).
- 6) **Hino, O., Kitagawa, T. & Koike, K.**: Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatology*, **4**, 90-95 (1984).
- 7) **Summers, J., Smolec, J. M. & Snyder, R.**: A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4533-4537 (1978).
- 8) **Unoura, M., Kobayashi, K. Fukuoka, K.**: Establishment of a cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **5**, 1106-1111 (1985).
- 9) **Matsushita, F., Ohno, S. & Unoura, M.**: Analysis of the chromosomal abnormalities of a woodchuck hepatocellular carcinoma-derived cell line (WH257 GE10). *Int. J. Cancer*, **40**, 711-714 (1987).
- 10) **Kaneko, S., Oshima, T. & Murakami, S.**: Stable integration of woodchuck hepatitis virus DNA in transplanted tumors and established tissue culture cells derived from a woodchuck primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, **46**, 3608-3613 (1986).
- 11) **Summers, J., Smolec, J. M. & Werner, B. G.**: Hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus are members of a novel class of DNA viruses. In M. Essex, G. Todaro, H. zur Hansen (eds.), *Viruses in Naturally Occurring Cancers*. p459-470, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980.
- 12) **Mitamura, K., Hoyer, B. H. & Ponzetto, A.**: Woodchuck hepatitis virus DNA in woodchuck liver tissues. *Hepatology*, **2**, 47-50 (1982).
- 13) **Paris Conference (1971)**: Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, Vol. 8, No. 7, The National Foundation, New York, 1972.
- 14) **Harper, M. E. & Saunders, G. F.**: Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma (Berlin)*, **83**, 431-439 (1981).
- 15) **Kodama, K., Ogasawara, N. & Yoshikawa, H.**: Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome; evolutionary relationship between hepadnaviruses. *J. Virol.*, **56**, 978-986 (1985).
- 16) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Molecular cloning: A laboratory manual, p109-112, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 17) **Ohno, S., Migita, S. & Wiener, F.**: Chromosomal translocations activating myc sequences and transduction of v-abl are critical events in the rapid induction of plasmacytomas by pristane and Ableson virus. *J. Exp. Med.*, **159**, 1762-1777 (1984).
- 18) **Klein, G.**: Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell*, **32**, 311-315 (1983).
- 19) **Rogler, C. E., Sherman, M. & Su, C. Y.**: Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma. *Science*, **230**, 319-322 (1985).
- 20) **Hino, O., Shows, T. B. & Rogler, C. E.**: Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma at chromosome 17; 18 translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8338-8342 (1986).
- 21) **Pinto, M. R., Bey, E. & Bernstein, R.**: The PLC/PRF/5 human hepatoma cell line. I. Reevaluation of the Karyotype. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **18**, 11-18 (1985).
- 22) **Simon, D., Aden, D. P. & Knowles, B. B.**: Chromosomes of human hepatoma cell-lines. *Int. J. Cancer*, **30**, 27-33 (1982).
- 23) **Bowcock, A. M., Pinto, M. R. & Bey, E.**: The PLC/PRF/5 human hepatoma cell line. II. Chromosomal assignment of hepatitis B virus integration sites. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **18**, 19-26 (1985).
- 24) **Simon, D., Searls, D. B. & Cao, Y.**: Chromosomal site of hepatitis B virus (HBV) integration in a human hepatocellular carcinoma-derived cell line.

Cytogenet. Cell Genet., **39**, 116-120 (1985).

25) Möröy, T., Marchio, A. & Etienne, J.: Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature*, **324**, 276-279 (1986).

26) Snyder, R. L. & Summers, J.: woodchuck hepatitis virus and hepatocellular carcinoma. In M.

Essex, G. Todaro, H. zur Hansen (eds.), *Viruses in Naturally Occurring Cancers*. p447-457, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980.

27) Rogler, C. E., & Summers, J.: Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from a chronically infected liver. *J. Virol.*, **50**, 832-837 (1984).

Identification of the Chromosomal Sites of Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) DNA Integration in a Woodchuck Hepatocellular Carcinoma-derived Cell Line (WH257 GE10)
Yasutsugu Mizuno, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **97**, 351—361 (1988)

Key words: woodchuck hepatitis virus (WHV), hepatocellular carcinoma, chromosomal abnormalities, *in situ* hybridization, chromosomal sites of WHV DNA integration

Abstract

The evidence that human hepatitis B virus (HBV) DNA is frequently integrated into host DNA in hepatocellular carcinomas (HCC) suggests that HBV DNA may play an essential role in the generation of HCC. Woodchuck hepatitis virus (WHV), which contains a genomic structure similar to HBV, is the most oncogenic among hepadnaviruses. Thus WHV and woodchucks have been regarded as one of the most suitable experimental model systems for understanding the oncogenic mechanism of virally induced HCC. In a woodchuck hepatocellular carcinoma-derived cell line (WH257 GE10), the chromosomal abnormalities were reported previously (36, X, -5, -13, -13, -Y, +M₁, +M₂). In this study, the chromosomal sites of WHV DNA integration were identified in WH257 GE10 by an *in situ* hybridization technique. ³H-labelled WHV DNA was assigned to the G-banded diagram which was determined for the first time in the woodchuck chromosomes. WHV DNA was integrated into two sites; 33 region of the long arm of chromosome 6 (6q33) and 31 region of the long arm of chromosome 8 (8q31). Chromosomal sites of WHV DNA integration were stable during the passage periods analyzed. These findings suggest that WHV DNA integration into the chromosomes of WH257 GE10 might be closely associated with the pathogenesis of a woodchuck hepatocellular carcinoma, and that integrated WHV DNA might play some role in the maintenance of the characteristics as cancer cells.