

B型肝炎ウイルスX遺伝子と肝発癌

小池 和彦

①

論文題目

B型肝炎ウイルスX遺伝子と肝発癌

氏名 小池和彦

目次

序論

はじめに	3
HBV感染と肝癌	3
HBVゲノムの構造とHBx遺伝子	4
文献	6
図	7
第一部	8
要約	9
本文	10
文献	17
図	18
第二部	23
要約	24
本文	25
文献	32
図および表	34
第三部	37
要約	38
本文	39
文献	50
表および図	53
全般的な考察	63
結論	66
文献	68

序論

I. はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)がいかにして肝癌を引き起こすかという疑問に対して、過去十年以上にわたり諸家の精力的な検討がなされてきたが、その肝発癌のメカニズムは明らかでない。HBVそのものが肝発癌に直接的に関与しているのかについても不明である。その理由の一つはHBVのoncogenic property(腫瘍原性)をアッセイするのに好都合なシステムが無かったことにあると思われる。HBVの一遺伝子であるX遺伝子(図1、以下HBx遺伝子)は、HBVゲノムがクローン化された(1)後も、実際に蛋白として発現されるかどうか不明な遺伝子であった。筆者は、このHBx遺伝子を当初から一貫して研究し、蛋白としての同定を行い、この蛋白の肝発癌における役割について検討してきた。本論文ではこのHBx遺伝子を中心に、B型肝炎ウイルス慢性感染症における肝発癌について論じる。

II. HBV感染と肝癌

HBVはヒトにおけるウイルス発癌の候補として長年にわたり言及されてきているが、癌ウイルスとしての可能性は、おもに疫学的事実によって示唆されている。これまでに指摘されているHBVと肝癌の関係は以下のごとくである。一つは、HBVキャリアの地理的分布と肝細胞癌の分布が一致していることである。すなわち、HBVキャリアの多い東アジア、熱帯アフリカでは肝細胞癌が多発する。二つめはHBVキャリアの前向き調査で、対照に比べて肝癌の発生率がはるかに高く、その相対危険度が217倍にも及んだこと(2)である。

三番めとしてはHBV関連肝癌での、HBVゲノムの宿主遺伝子への組み込みが挙げられる。1981年に最初に報告されて以来(3)、この組み込まれたウイルスゲノムとその近傍の宿主遺伝子が精力的に調べられた(4、5)。その結果、

1) ほとんどのHBV関連肝癌でこの組み込みが認められたこと。また慢性肝炎あるいは急性肝炎においてもHBVの組み込みが認められ、このウイルスの宿主

DNAへの組み込みは感染の比較的早期に起こるらしいこと。

2) 組み込まれたHBV-DNAの断端(宿主遺伝子との接点)の一方は、cohesive endと呼ばれる部分に存在することが多いこと。

3) 組み込まれたHBV-DNAを中心として宿主遺伝子を巻き込んだ遺伝子の再編成が高頻度に行っていること、などが明らかとなった。しかし、宿主への組み込み場所には一定の規則性は無く、また特異的な遺伝子の再編成も認められず、特定の細胞遺伝子が影響を受けるといった所見も得られなかった。一例報告としては、retinoic acid receptor (6) と cyclin (7) という細胞増殖に関連した細胞遺伝子の近傍への組み込みがあるが、あくまでも一例報告であり普遍性を持つものではあり得なかった。このようにして、細胞癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化といったレトロウイルスのごとき挿入変異によるウイルス発癌のメカニズムでは説明不能であることが次第に明らかとなった。

「組み込み」の解析がポジティブな事実をもたらさなかったことを受けて、HBVは単に非特異的に肝発癌に関与しているだけなのではないかという考え方が、受け入れられ始めた。すなわち、HBVは肝炎を引き起こすことにより肝細胞の壊死をもたらし、その結果、壊死→炎症反応→肝細胞再生のサイクルを繰り返すうちに、宿主遺伝子の変異をきたし、増殖の良い細胞が出現し選択され最終的に悪性化するという説である(8)。この説においては、HBVは肝炎を起こすことにより間接的に、「非特異的に」肝発癌に関わっていることになる。しかし、HBV自身が肝発癌に直接的に関わっているという可能性はまだ捨て去ることはできないと思われる。

1.1.1. HBVゲノムの構造とHBx遺伝子

HBVウイルス粒子は直径約42nmの球状構造をしている。その遺伝子は、約3.2kbの二本鎖DNAからなるが、一部はプラス鎖が欠けて一本鎖となっている(図1)。このゲノム上には4つの遺伝子が存在し、それぞれ、S遺伝子、C遺伝子、P遺伝子、HBx遺伝子と呼ばれている。

S遺伝子はウイルスの表面蛋白をコードしているが、実際にはpreS1、preS2、Sの3つのパートにわかれ、large S蛋白、middle S蛋白、major S蛋白の3種類の蛋白をコードする。

C 遺伝子はコア遺伝子とプレコア遺伝子部分からなり、ウイルスのヌクレオカプシド蛋白と e 抗原という分泌型の蛋白の二つを作る。これらの蛋白をめぐる話題は現在のトピックのひとつであるが、本論とははずれるので省く。

P 遺伝子はポリメラーゼ（逆転写酵素）蛋白をコードしている。ただし、現在まで、この一部が DNA 結合蛋白をコードすることなどがわかっているが、蛋白そのもの（組み替え蛋白など）に逆転写酵素活性は実証されていない。

最後に残った HBx 遺伝子は、最近まで働きの不明であった蛋白である。この HBx 遺伝子が、他の遺伝子の発現を増加させるトランス活性化作用 (transactivating function) を保持することが、1987 年頃より知られ始めた。我々は、この HBx 遺伝子のトランス活性化作用が細胞の癌遺伝子を活性化して癌化をもたらす可能性を考慮し、HBx 遺伝子を導入してトランスジェニックマウスを作製した。この HBx 遺伝子トランスジェニックマウスでは、肝炎を伴うことなしに 8 割以上のばら高率に肝腫瘍が発生し、HBx 遺伝子があたかも癌遺伝子のごとく働くことが明らかとなった。すなわち我々のシステムは、HBV の一遺伝子である HBx 遺伝子の産物が生体内において肝癌を惹起すること、言葉を変えると、HBV 自身が直接的に肝発癌に関与していることを初めて示していた。本論文ではまず、第一部において HBx 遺伝子蛋白の培養細胞での発現とヒト感染時の抗 HBx 蛋白抗体の存在について述べ、第二部では HBx 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスによる肝発癌モデルの作製を、そして第三部ではこのトランスジェニックマウスにおける肝発癌のメカニズムについての分析について述べる。

文献

- 1) Galibert, F., Mandart, E., et al.: The hepatitis B virus. *Nature* 281:646-650, 1979.
- 2) Beasley, R.P., Hwang, L.W., et al.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 11:1129-1133, 1981.
- 3) Shafritz, D.A. & Kew, M.C.: Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1:1-8, 1981.
- 4) Nagaya, T., Nakamura, T., et al.: The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Gen Develop* 1:773-782, 1987.
- 5) Takada, S., Gotoh, Y., et al.: Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues. *J Virol* 64:822-828, 1990.
- 6) DeThe, H., Marchio, A., et al.: A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 330:667-669, 1987.
- 7) Wang, J., Chenivesse, X., et al.: Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 343:555-557, 1990.
- 8) Robinson, W.S.: Hepadna viruses and hepatocellular carcinoma. *Cancer-Detect-Prev* 14:245-252, 1989.

HEPATITIS B VIRUS(adr)

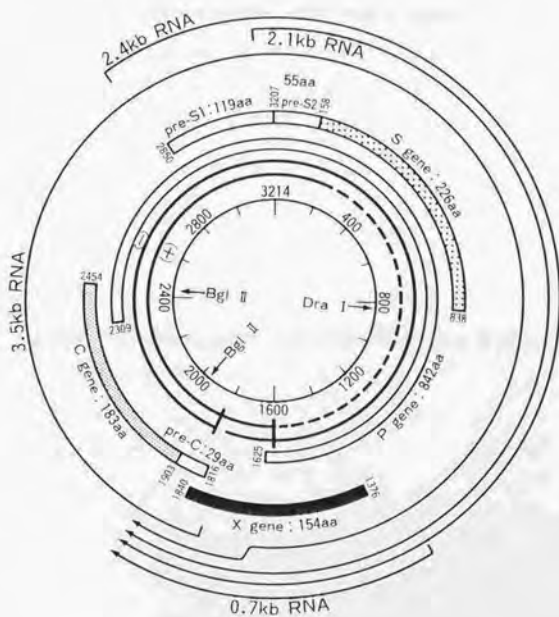


図 1

Hepatitis B Virus Genome (subtype *adr*)

第一部

B型肝炎ウイルスHBx遺伝子のCOS-1細胞における発現
およびB型肝炎患者血中での抗HBx蛋白抗体の検出

Characterization of hepatitis B virus x gene

---in vitro translation of mRNA from COS-1 cells

transfected with the x gene

(この第一部はVirology 163:233-235, 1988に発表された)

要約

B型肝炎ウイルス(HBV)-DNAのHBx遺伝子の生物学的役割を明らかにするため、HBV-DNAのStuI/BglII断片をpSV2ベクターに挿入して発現ベクターpSV2HBxを作製した。トランスフェクトしたCOS-1細胞中にはHBx遺伝子産物は同定されなかったが、この細胞のmRNAのin vitro翻訳産物を、HBx遺伝子オープンリーディングフレームのカルボキシル末端に対応する合成ペプチドに対して作製した抗体で免疫沈降したところ17kDの蛋白が同定された。68人のHBVキャリアからの血清を調べたところ、2人がこのin vitro翻訳産物と反応する抗体を含んでいた。これらの事実は、HBx遺伝子はHBV感染のいずれかの時期に実際に発現される遺伝子であることを示している。

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) には適当な培養細胞系での増殖システムが無いにもかかわらず、分子生物学的にクローン化されたHBV-DNAの分析によってこのウイルスの構造について多くの情報がもたらされてきている(1-5)。しかし、マイナス鎖に存在する4つのオープンリーディングフレーム(ORF)のうち154アミノ酸からなるポリペプチドをコードしうるHBx遺伝子についてはほとんど何もわかっていない。種々のHBVサブタイプや、他のヘパドウイルス(hepadnaviruses)のクローン(6)間でこの遺伝子がよく保存されていることは、HBVのライフサイクルにおいてこのORFが重要な役割を演じていることを示唆している。

最近になり、HBx遺伝子遺伝子の一部が大腸菌の β -galactosidase遺伝子に結合され、バクテリアのシステムでうまく発現されている。この融合蛋白に対する抗体が、HBs抗原陽性の肝炎患者の血清中に検出された(7-9)。さらに、HBx遺伝子蛋白に対する抗体は、ground squirrel hepatitis B virus(GSHBV)の自然感染の際にも陽性となることが示されている(10)。我々は、HBx蛋白を完全な形で真核細胞で発現させることを試みた。

方法

酵素、アイソトープ、DNA組み替え操作

DNA制限酵素、各種修飾酵素、はNew England Biolab, Bethesda Research Laboratoryから購入した。アイソトープはNew England Nuclear, Amershamから購入した。基本的なDNA組み替え操作は、文献(11)に従った。

細胞、DNAトランスフェクション

CO5-1細胞は、凍結保存されたものを使用の度に解凍して使用した。培養は、Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) + 10% ウシ胎児血清で成書のごとく行なった。

DNAトランスフェクションは燐酸カルシウム法にて行なった(11)。

DNAプロット

低分子DNAの抽出はHirtの方法にて行なった。DNAは1.0%のアガロースゲルで分離し、次にニトロセルロース膜に転写し、通常の方法でニックトランスレーション法(Amersham)でラベルしたDNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは50%フォルムアミド/3X SSC/5X Denhardt溶液/50mM HEPES(pH7.0)存在下で42°C、20時間行い、3XSSC、42°Cで10分間2回washingの後、3XSSC、68°Cで10分2回、最後に0.1XSSC、68°Cで5分間2回washingを行った。

ノーザン(RNA)プロット、S1マッピング

総RNAをGuITC法にて抽出した。概略を述べると、ディッシュにconfluentな培養細胞を3000回転で遠心し、セルベレットとし9mlの(4 MGuITC/1% sarcosine/5mMEDTA/1% 2ME)溶液中でホモジュナイズし、4mlの(5.7M CsCl/5mM EDTA)液に重層し、Beckmann 55Tローターで35,000回転、20時間遠心した。生じたベレットを400 μ lのddH₂Oに溶解し、エタノール沈澱した。15 μ gのRNAを0.9%のアガロース/フォルムアルデヒドゲルで分画し、ニトロセルロース膜に転写後³²Pでラベルした単鎖DNAプローブでハイブリダイゼーションを行った(11)。ハイブリダイ

ゼーションは (50% formamide/3XSSC/5XDenhardt's/50mMHEPES) 存在下で45°C, 20時間のあと、サザン法と同様にwashingを行い露出した。

S1マッピングはDNAプローブと100ugのRNAをhybridization buffer中で3時間hybridization後、S1 nuclease (100U/ml)で消化した。消化されたサンプルは中性アガロース中で泳動後転写し、HBV-DNAをビローブとしてhybridizationを行なった。

in vitro translation

100 μ gの総RNAを³⁵S-メチオニンを用いてrabbit reticulocyte lysate (Amersham) 中で翻訳させた。翻訳産物は抗HBx抗体で免疫沈降し、12% SDS-PAGE 中で電気泳動し、乾燥後オートラディオグラフィーを行なった。

結果および考察

プラスミド pSV2HBx の構築 (図1)

HBVのHBx遺伝子の全体を元々の形で発現させるにあたって、我々は、HBx遺伝子の全体をSimian virus 40 (SV40) 早期遺伝子プロモーターの制御のもとに、発現ベクターに導入した。すなわち、プラスミド pSV2 β -globinをBglIIとStuIで消化し、 β -globin遺伝子全体とSV40 PvuII-HindIII断片の3' 終末の19bpを取り除いた。4217bpの線状DNAは次に、pHBVadr4 (4) から準備されたStuI-BglIIHBV-DNA断片と結合された。この870bpのHBV-DNA断片は、HBx遺伝子ORFのみならず、プロモーター (12) とpolyA付加シグナル (13) を含んでいる。

HBx 遺伝子RNA の発現

組み替えプラスミド pSV2HBxは磷酸カルシウム法によってsubconfluentなCOS-1細胞 (14) にトランスフェクトされた。トランスフェクトされたプラスミド pSV2HBxの増殖はトランスフェクト後72時間にわたり蓄積したフォームI-DNA量の増加によって示された (図2)。総RNAはトランスフェクト48時間後に抽出され、polyA (+) RNAがオリゴdTセルロースカラムによって濃縮された。ノーザンブロット分析により、2種類のRNAが検出された。大部分の転写産物は大きさ1.6kbでマイナーな成分は1.0kbであった。それぞれの転写産物の転写開始点を知るため、S1ヌクレアーゼマッピングを行なった (図3)。pSV2HBxから切り出された663bpのPvuII/AvaI断片がポリA (+) RNAとハイブリダイズされた。DNA/RNA duplexはS1ヌクレアーゼ (100単位/mL、Boehringer-Mannheim, West Germany) で消化された。S1消化から保護されたDNA断片は、中性アガロースゲルで泳動され、ニトロセルロースフィルターに転写され、HBV-DNA全体をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。663bpのDNA断片に加え、440bp付近に幅広いバンドが検出された (図3B, lane 1)。しかしながら、長時間の露出の後でもより小さなバンドは検出できなかった (data not shown)。このようにpSV2HBxを導入されたCOS-1細胞でのHBV転写産物は、SV40プロモーターに対応するSV40配列の中から開始されていた。

HBV転写産物の3'終末も同様にしてpSV2HBxの2140AvaI/EcoRI断片を用いて決定された。中性アガロースゲルで検出されたメジャーなバンドは、およそ1300bpの長さであった(図3B, lane 2)。この結果は、メジャーな転写産物は、SV40のsmall T抗原スプライスシグナルとポリA付加シグナルを使用してプロセッシングを受けたことを示している。500bp付近の短いバンドはHBV断片中のポリA付加シグナル(TATAAA)で転写の止まったスプライスされない転写産物と考えられた。この配列はコンセンサスな転写終結のシグナルであるAATAAAやATTAAA(15)とは同一でないが、HBV-DNAはこの配列を転写終結のシグナルとして利用することが示されている(13)。このシグナルの効率が悪かったことはSaitoらの以前の所見に合致している(16)。850bpにあるかすかなバンドはSV40のスプライシングサイトで切れたアーチファクトと考えられた。

抗HBx蛋白抗体の作製

翻訳産物を免疫学的に検出するために、我々は推定上のHBx遺伝子産物に対する抗体を作製した。HBx蛋白の親水性部分から5つのオリゴペプチド(HBx遺伝子領域のアミノ酸番号で、①10-17(p10)、②24-31(p24)、③69-82(p69)、④115-128(p115)、⑤139-154(p154))を合成した。

これらのペプチドのなかでは、p139をdipalmitine acidに抱合させて免疫させた時に高いタイターの抗体が誘発された(EIA法で1:10000)。この抗体はp139と特異的に結合し、他の部分のペプチドとは反応しなかった。p139抗体の特異性はウェスタンブロッコにも確認された。陽性コントロールとしては、大腸菌で発現させた成長ホルモン-HBx融合蛋白を用いた。この融合蛋白とそれに対する特異抗体はJ. Obijeski (Genentech, CA)より供与された。抗p139抗体はHBx融合蛋白と、その特異抗体が結合するように結合し、イムノブロットイングで17kdのバンドを示した。

HBx遺伝子遺伝子産物の同定

pSV2HBxでトランスフェクトしたCOS-1細胞抽出物中を、P139抗体を用いて免疫沈降法を行なったが、17KDの特異的反応物を同定できなかったため、無

細胞翻訳系を用いてp139抗体反応産物を検索することにした。COS-1細胞に、pSV2HBxまたはpSV2 β -globinをトランスフェクトし48時間後にRNAを抽出した。RNAはウサギreticulocyteの無細胞翻訳系にてin vitroで翻訳した。pSV2HBxをトランスフェクトした細胞から得られたRNAの翻訳産物中に、p139抗体と免疫沈降する17kdのポリペプチドが検出された(図4)。この17kdポリペプチドは免疫前血清では沈降されなかったし、またpSV2- β globinをトランスフェクトした細胞中には検出されなかった。in vitro翻訳産物はp139ペプチドで吸収したp139抗体では免疫沈降されなかった。これに対して、p24で吸収したp139抗体は反応性を保持していた。このようにin vitro翻訳系においてHBV mRNAが機能的であったことから、pSV2/COS-1システムでx蛋白の発現が見られなかったのは、効率的な翻訳のための宿主細胞因子が不足していたためと考えられる。あるいは、我々の発現遺伝子中のHBx遺伝子ORFの上流にオーバーラップする配列がHBx遺伝子の翻訳を阻害したのかも知れない。HBx遺伝子ORFのAUGをSV40プロモーターに結合した新しいコンストラクトによる発現実験が現在進行中である。最近、SiddiquiらはアデノウイルスメジャープロモーターとHBx遺伝子のAUGを隣接させたプラスミドを用いて、COS細胞中でHBx遺伝子を発現させている(18)。

ヒト患者血清中における抗HBx抗体の検出

続いて、肝細胞癌患者を含む68人のHBVキャリアの血清とin vitro翻訳蛋白との反応性を検討した(図5)。2つの血清、一つは原発性肝がん患者からの、そしてもう一つはHBe抗体陽性の慢性B型肝炎患者からの血清が17KDの蛋白と反応した。残りの66人のHBVキャリア、急性B型肝炎(5人)、肝がん以外の癌(4人)そして健康人からの血清は全てこのアッセイでは陰性を示した。HBx遺伝子産物に対する抗体が68人の患者のうちわずか2人でだけ陽性であった理由は明らかでない。しかしながら、上に示した慢性B型肝炎の患者は抗HBx抗体は4年間にわたって検出されていることから、この患者においてはHBx遺伝子産物は続けて産生されていると推測される。

HBx遺伝子蛋白の機能はまだ知られていない。多くの肝細胞癌の例でHBV-DNAはこのHBx遺伝子の部分で宿主細胞DNAへ組み込まれていることが

示されている(19、20)。組み込みの場所でHBx遺伝子のORFが完全な形で保存されていることは希である。このことは、HBx遺伝子は組み込みの過程において重要な役割を果たすが、腫瘍化された状態を維持するためには必要ないのかも知れない。HBx遺伝子産物が近傍の細胞遺伝子を活性化するかも知れないという可能性は非常に興味深い。もしそうだとすると、HBx遺伝子の発現は常時起こっているわけではないであろう。ヒト患者の血清で抗HBx蛋白抗体の陽性率が低いのは、HBx遺伝子が一過性に発現されるためか、ごく微量にしか発現されないためかも知れない。

文献

- 1) Galibert, F., Mandart, E., et al.: Nature 281:646-650, 1979
- 2) Pasek, M., Goto, T., et al.: Nature 282:575-579, 1979.
- 3) Valenzuela, P., Quiroga, M., et al.: In "Animal virus genetics" (B. Fields, R. Jeanish, and C. F. Fox, Eds.), pp57-70. Academic Press, New York 1980.
- 4) Fujiyama, A., Miyano, A., et al.: Nucleic Acids Res. 11:4601-4610, 1983.
- 5) Ono, Y., Onda, H., et al.: Nucleic Acids Res 11:1747-1757, 1983.
- 6) Scaeffler, E., and Sninski, J. J.: Proc Natl Acad Sci USA 81:2902-2905, 1985.
- 7) Kay, A., Madart, E., et al.: EMBO J 4:1287-1292, 1985.
- 8) Meyers, M. L., Trepo, L. V., et al. J Virol 57:101-109, 1986.
- 9) Elfassi, E., Haseltine, W. A., et al.: Proc Natl Acad Sci USA 83:2219-2222, 1986.
- 10) Persing, D., H., Varmus, H. E., et al.: J Virol 60:177-184, 1986.
- 11) Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY)
- 12) Trentin, M., and Laub, O. Mol Cell Biol 7:545-548, 1987.
- 13) Tiollais, P., Pourcel, C., et al.: Nature 317:489-495, 1985.
- 14) Gluzman, Y. Cell 23:175-182, 1981.
- 15) Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G.: Nature 263:211-214, 1976.
- 16) Saito, I., Oya, Y., et al. J Virol 58:554-560, 1986.
- 17) Hopp, T. P., and Woods, K. R.: Proc Natl Acad Sci USA 78:3824-3828, 1981.
- 18) Siddiqui, A., Jameel, S., et al. Proc Natl Acad Sci USA 84:2513-2517, 1987.
- 19) Dejean, A., Sonigo, P., et al.: Proc Natl Acad Sci USA 81:5350-5354, 1984.
- 20) Miyaki, M., Sato, C., et al.: J Gen Virol 67:1449-1454, 1986.

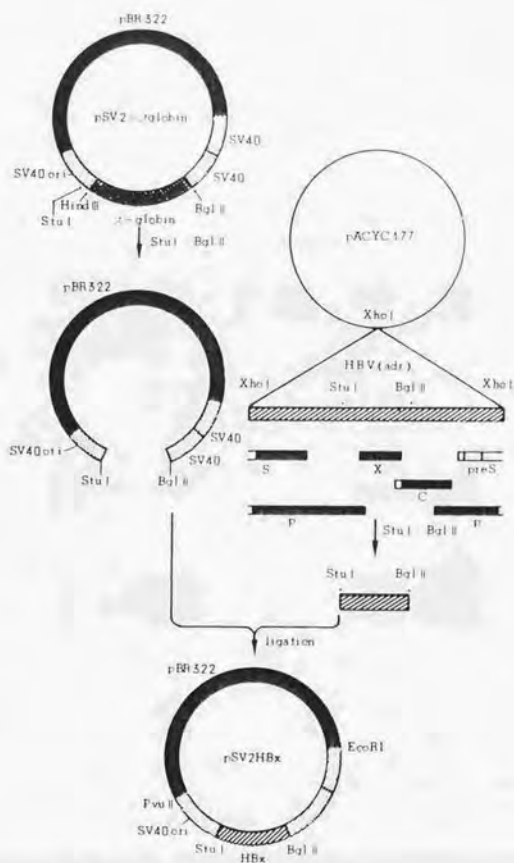


图 1

Construction of plasmid pSV2HBx

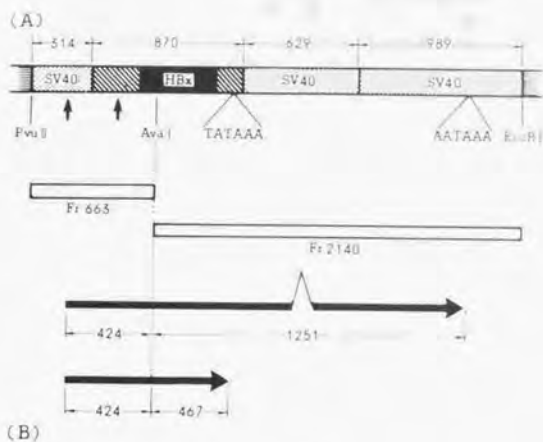
StuI-BglII fragment from pHBVadr4 was ligated into pSV2 β G which was digested with StuI and BglII.

M 7 24 48 72



图 2

Replication of the plasmid pSV2HBx in COS-1 cells. Supernatants were collected by Hirt's method at 7, 24, 48 and 72 hours after transfection and detected by Southern blotting. I: form I DNA, II: form II DNA.



3

(A) Schematic representation of the HBX expression unit. The vertical arrows indicate the SV40 and HBx promoter regions, respectively. DNA fragment, Fr663 and Fr2140, were used for S1 protection. The thick lines represent the two potential transcripts. (B) S1 mapping of transcripts from COS-1 cells transfected with pSV2HBx.

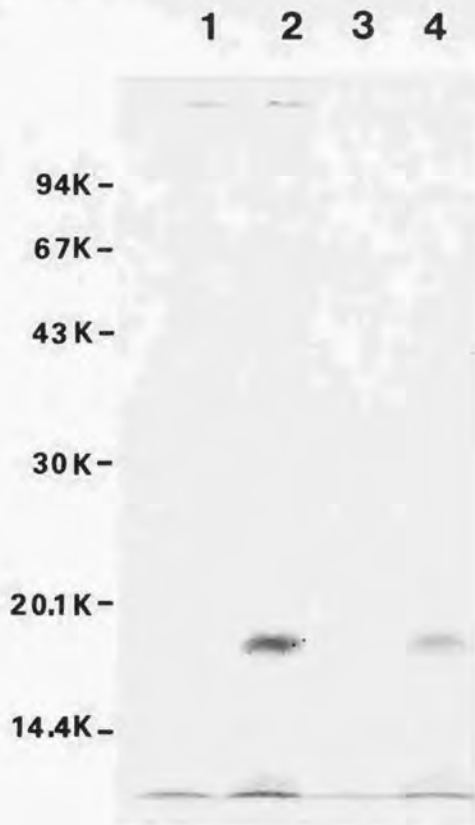


图 4

Immunoprecipitation of in vitro translation products of pSV2HBx mRNA with antibody to synthetic oligopeptides. The poly(A)+RNAs from COS-1 cells transfected with pSV2 β -globin(lane 1) or pSV2HBx(lane 2) were translated invitro in rabbit reticulocyte lysates in a total volume of 20 μ l. Samples were immunoprecipitated with the anti-HBx(P139) serum and subjected to 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The translation products were also reacted with anti-P139 absorbed with either P139(lane 3) or P24(lane 4) oligopeptides.



☒ 5

Screening of patients' sera for the presence of antibody to HBx protein. 2μ l of serum was reacted with in vitro translated product and electrophoresed.

第二部

B型肝炎ウイルスHBx遺伝子はトランスジェニックマウスで肝癌を誘発する

HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice

(この第二部はNature 351:317-321,1991に発表された)

要約

肝癌発生におけるB型肝炎ウイルスの役割は明らかでない。最近HBx遺伝子がウイルスの調節遺伝子として同定されたことから、HBxがトランス活性化遺伝子として細胞遺伝子の発現を変化させ肝細胞癌の発生へ至るという形で、B型肝炎ウイルスが直接的に肝癌の発生に関わっている可能性が示唆される。HBx遺伝子の全体をそれ自身の制御領域のもとにマウスの受精卵に導入することによって、この可能性を調べた。このウイルス遺伝子をもつマウスには、肝臓に特異的に進行性の組織学的変化が生じたが、それらは変異肝細胞の多巣的な集まりに始まり、良性のアデノーマ、そして悪性の肝細胞癌へと進行していった。オスのマウスはメスに比べかなり早期に肝腫瘍を生じた。HBx遺伝子の発現に続き、肝癌の発生に責任を果たす分子現象を知るためにこのトランスジェニックマウスモデルは最適である。

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) と肝細胞癌とのあいだには疫学的に非常に強い関連が示されているが (1-3)、このウイルスが肝臓の悪性腫瘍発生に直接的に関与していることを示す実験的なデータは極めて少ない (4、5)。実際多くの研究は、慢性肝炎の特徴である、持続的な肝細胞壊死と再生から起こる二次的な遺伝子の変化が必要であるとするもの (6、7)、HBV 遺伝子の組み込み場所における HBV の制御領域による細胞遺伝子の活性化 (8-10) などを指摘している。肝発癌の別なメカニズムとしてウイルス遺伝子産物の直接的な関与が考えられる。少なくとも培養細胞の系においては、他のウイルスの遺伝子を活性化する転写制御因子として働くウイルスのトランスアクチベーターである HBx 抗原を、HBV がコードしていることが最近になり明らかにされたことを考えると、この考えは特に魅力的である (12-14)。ウイルスのトランスアクチベーターは宿主の生合成装置を通じて働くことから、それらの遺伝子は感染細胞の細胞遺伝子の発現や分化機能に障害を与えるはずである (15-20)。我々は、トランスジェニックマウスにおいて HBx 遺伝子のみで肝発癌に至るか否かを検討した。

方法

酵素、マウス、アイソトープ、DNA組み替え操作

DNA制限酵素、各種修飾酵素、はNew England Biolab、Bethesda Research Laboratoryから購入した。アイソトープはNew England Nuclear、Amershamから購入した。基本的なDNA組み替え操作は、文献(21)に従った。

トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウス作製の典型的な実験例では、約30匹のメスCD-1マウスを妊馬血清(PMS)とヒトHCG投与により過排卵させ、CD-1 F1オスマウスと交配させた。翌朝、一卵期の受精卵を卵管より0.1mMのEDTAを含む改変Brinsterメヂウムにて流出させた。cumulus細胞は、hyaluronidase(300units/ml)により取り除いた。次に卵を洗い、破片や酵素を洗い流した。さらに卵への注入のために、重炭酸を24mMのHEPES buffer(pH 7.4)に変更し、cytocalasin B(5 μ g/ml)を加えたBrinsterメヂウム中に入れ、depression slideへ移動させた。メヂウム上にはpHの変化を避けるため、シリコンオイルを重層させた。続いて、卵を外径約30 μ mの先の丸い保持用ピペットにより軽い陰圧をかけ動かないようにし、micrometerに繋いだ100 μ lのハミルトンシリンジを使い、注入ピペットの先をゆっくりと卵に射し、2 μ g/mlのDNA溶液、約2plを注入した。注入ピペットはDNAサンプル以外の部分はシリコンオイルで満たされた。注入後、卵を洗いcytocalasin Bをきれいに落とした後、偽妊娠させたCD-1マウスの卵管へ戻した。

DNA分析

50-100mgのマウス尻尾からDNAを抽出しトランスジェニックマウスのスクリーニングを行った。尻尾をカミソリで小片とし、1mlのbuffer(1% SDS/50mM Tris/5mM EDTA/150mM NaCl)中で55°C、2時間proteinase Kにて消化した。ついで、フェノール/クロロホルムで3回抽出後エタノール沈澱し回収した。DNAは制限酵素で消化し0.8%のアガロースゲルで分離した。次にニトロセルロース膜に転写し、通常の方法でランダムプライム法(Pharmacia)でラベルしたDNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは40%ホルムアミ

ド/4X SSC/5X Denhardt溶液/50mM HEPES(pH7.0)存在下で42°C, 20時間行い, 3XSSC, 42°Cで10分間2回Washingの後, 3XSSC, 68°Cで10分間2回、最後に0.1XSSC, 68°Cで5分間2回washingを行った。

ノーザン(RNA)プロット法

総RNAをGuanidinium isothiocyanate-cesium chloride法にて抽出した。概略を述べると、組織、約200mgを9mlの(4mM GuITC/1% sarcosine/5mM EDTA/1% 2ME)溶液中でホモジェナイズし、4mlの(5.7M CsCl/5mMEDTA)液に重層し、Beckmann 55Tローターで35,000回転、20時間遠心した。生じたペレットを400ulのddH₂Oに溶解し、エタノール沈澱した。15μgのRNAあるいはポリA選択をしたRNAを0.9%のアガロース/フォルムアルデヒドゲルで分画し、ニトロセルロース膜に転写後³²Pでラベルした単鎖DNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは(50%フォルムアルデヒド/3X SSC/5X Denhardt/50mM HEPES)存在下で45°C, 20時間のあと、サザン法と同様にwashingを行い露出した。

組織学的検索

組織は、3.7%のPBS-buffered formaldehyde(pH7.4)で固定した。固定した組織は切片とし、通常の方法でHE染色した。また、組織の免疫染色は、Vectorstain Elite (Vector) を用いて行なった。

結果

トランスジェニックマウスの作製

H B x トランスジェニックマウスは、H B V サブタイプ adr の 707nt から 1856nt までの 1151bp (21) を outbred の C D - 1 マウスの一卵期の胎児にマイクロインジェクションして得た (15-20)。この断片は、H B x 遺伝子の全蛋白コード領域 (mp1246-1710) だけでなく、エンハンサー (mp945-1106; ref. 22)、主要な R N A 開始点 (mp1184, 1203, 1214 を含む、ref. 23) とポリ A 付加シグナル (mp1788; ref. 21) を含んでいる。生後 2-3 週齢のマウスの尾 D N A のサザンブロッティングの結果、9 匹のトランスジェニックマウスが得られた。81 匹中 9 匹 (11%) が陽性であったがこれは我々の通常作製するトランスジェニックマウスに比べてやや低めであった。導入遺伝子を 1 コピー以上持ち、F 1 世代のマウスの肝に予想されたサイズの H B x 遺伝子 m R N A を持つもの 3 系統 (C 11, E 1, H 9) を選択し、ライン化した。

トランスジェニックマウスにおける H B x 遺伝子の発現

トランスジェニックマウスの各臓器における H B x 遺伝子の発現を Northern blot で分析した。比較的高レベルの 0.8 kb の転写産物 (24) の発現が肝、腎、精巣で認められた (図 1 A)。他の 2 系統のラインにおいても同様の結果が得られた。肝と腎で発現が認められたことは、H B V の感染した個体での H B V - D N A の検出の結果と一致している (25)。H b x 蛋白がトランスジェニックマウスの肝臓で発現していることは、H B x 抗原に対するウサギポリクローナル抗体 (26) で免疫沈降を行い確認した。分子量 17000 の予想されたサイズの H B x 蛋白 (26) が抗体で特異的に検出された (図 1 B)。

トランスジェニックマウスにおける組織所見と肝発癌

4 カ月齢における肝の組織学的検索によって、3 系統のトランスジェニックマウスの全てにおいて変異肝細胞が多巣状に存在することが見いだされた (図 2 a)。だが、その正常な兄弟マウスにはこの変異は認められなかった。これらの変異巣は、わずかしか染色されない、顆粒状の細胞質を持つ細胞から成り立っていたが、細胞増殖の増加の所見は光顕上認められなかった。これらの細胞質に periodic acid Schiff (PAS) 染色で検出される glycogen が蓄積していたことは、これらが前

癌状態であることに適合している(図2b; ref 27)。これらの変異巢に存在する肝細胞は、免疫染色で比較的高レベルのHBx遺伝子を示しており(図2c, d)、同じサブセットの肝細胞で組織学的変化と導入遺伝子の発現が一致していた。約8から10カ月齢でトランスジェニックマウスの肝に腫瘍結節が出現し始めた。これらの結節はしばしば好塩基性の細胞から成り、隣接する正常肝実質を圧排しながら増殖しており(図3a, b)、肝アデノーマの全ての性質を保持していた(28)。変異細胞巢における細胞と同様に、これらの結節をつくる細胞は比較的高度のHBx蛋白の発現を示し、かつ多くのグリコーゲンを含んでいた(図3b)。しかし、変異細胞巢と異なり、アデノーマには α -フェトプロテインが検出された(data not shown)。すべてのアデノーマが好塩基性だったわけではない。明細胞からなるアデノーマも認められた(29)。時に、明細胞は好塩基性細胞からなる腫瘍結節の中から起こっていた(図3c)。これらの腫瘍細胞はHBx蛋白を発現し続けており(図3e)、そしてグリコーゲン(図3d)や α -フェトプロテイン(図3f)の発現も続いていた。屠殺後、肝に1、2個のアデノーマが発見されたマウスでは、血清alanine aminotransferase値は継続して正常範囲であった。この事実は肝細胞障害がこれらの良性的肝病変とは関わっていないことを示唆している(7)。

C11系統のオスマウスの多くは11カ月から15カ月齢の間に死亡した。剖検において、それらのマウスは肉眼的に視認できる肝腫瘍をもっていた。これらの腫瘍の多くは、明細胞型の肝細胞癌(30, 31)と診断された。病変の程度は、全ての肝葉に及ぶものから、一葉全体におよぶ良性的アデノーマの一部にできた巣状の悪性領域(図3g)までさまざまであった。明細胞型の癌を構成する細胞の核はしばしば2核化していた。アデノーマ細胞と同様にこれらはHBx蛋白(図3i)と α -フェトプロテインを発現し続けていた。良性細胞と異なり、癌細胞はもはやグリコーゲンを含んではいなかった(図3h)。このように、見かけ上の形態学的進展は、生化学的な変化を伴っていた。一部のマウスでは転移も認められた。重要なことであるが、対照のオスCD-1マウスはおよそ24カ月の寿命をもち、10%以下が肝腫瘍の徴候を示し、そしてそれらのうち明細胞型のものとは全く認められない。

トランスジェニックマウスにおける肝発癌の性差

C11トランスジェニックマウス系統における肝細胞癌の浸透度はオスで約90%、メスで60%であった (Table 1)。この観察はヒトにおける疫学的事実、すなわちHBVに慢性的に感染した男性は女性に比べ肝癌になりやすいという事実 (2) と合致している。しかし、もしこのマウスで肝癌が発生する時期を考慮にいとると、多くのオスは11から15カ月齢の間に死亡し、メスでは17から21カ月齢の間に死亡した (図4)。正常なCD-1マウスの寿命が21から24カ月であることを考えると、もし寿命がもう少し長かったとしたら、メスでもオスと同様の頻度で肝癌が発生したのかもしれない。その場合には、性差は単にいつ癌ができるかということに由来するだけで、両性は同様に発がんしやすいということになる。

トランスジェニックマウスにおける疾患の表現型を検討する場合、組み込み場所によるアーチファクトを除外する必要がある。そしてこのことは複数のファウンダーマウスからの系統を検討することで否定できる。3系統のマウス全てにおいて肝癌が選択的に発生した。C11とH9トランスジェニックマウス系統の比較では、オス、メスともに肝癌の発生頻度に有意な違いは認められなかった。腎と精巣におけるHBx遺伝子の発現にもかかわらず、これらの組織においては何等の組織学的変化もみとめられなかった。

考察

我々とは異なったHBV遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、ウイルスの全体を導入したのものも含めて、これまでに分析されているが(32-36)、このウイルスが肝発癌に直接的な役割を果たすという証拠はほとんど得られていない。これらのDNAコンストラクトにはHBx遺伝子を含んでいるが、HBx遺伝子の発現は検出されていない(33-37)。HBx遺伝子がヒトの α -アンチトリプシン遺伝子のプロモーターの制御下に導入されたマウスでは、肝癌は発生しなかった(37)。HBx遺伝子の発現は生後4週以内に消えてしまったため、肝組織中の進行性の腫瘍性変化は生じ得ようがなかったと考えられる。

我々の観察は、HBx遺伝子の発現のみによって進行性に形態学的な、そしておそらく生化学的な変化を引き起こし、最終的に悪性の肝癌に至るのであることを示している。興味深いことは、HBx蛋白が全ての肝細胞で発現されることなく、ある特定の肝細胞サブセット、おそらくある特異的な分化段階の肝細胞に限定して発現されたため、肝全体のび慢性の病変ではなく多巣性の病変を生じたことである。

結論として、我々の所見はHBVが肝発癌に直接的に関与していることを示しており、そして慢性肝炎(肝細胞壊死と再生の繰り返し)がヒトにおける肝発癌の原因として、唯一絶対的な条件であるという考えに対して反証するものである。また、ここに記載したトランスジェニックマウスは、肝に進行性の変化をもたらすHBx遺伝子の発現後、発癌に到るまでの分子現象を明らかにするためのモデルとしても役立つと思われる。

文献

- 1) Tiollais, P., Poulcel, & Dejean, A. *Nature* 317:489-495, 1985.
- 2) Beasley, R. B., & Hwang, L.-Y. in *Viral Hepatitis and Liver Disease* (eds Vyas, G. N.) 209-224 (Grune & Stratton, Florida, 1984).
- 3) Beasley, R. B., Hwang, L.-Y., Linn, C. C. & Chien, C. S. *Lancet* ii:1129-1133, 1981.
- 4) Dejean, A., Sonigo, P., et al.: *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5350-5354, 1984.
- 5) Rpgler, C. E., et al. *Science* 230:319-322, 1985.
- 6) Chisari, F. V., et al. *J Virol* 60:880-887, 1986.
- 7) Chisari, F. V., et al. *Cell* 59:1145-1156, 1989.
- 8) de The, H., Marchio, A., et al. *Nature* 330:667-670, 1987.
- 9) Hsu, T., Y., et al. *Cell* 55:627-635, 1988.
- 10) Pourel, G., et al. *Nature* 347:294-298, 1990.
- 11) Wollersheim, M., Debelka, U. & Hofschneider, P. H. *Oncogene* 3:545-552, 1988.
- 12) Twu, J.-S. & Schloemer, R. H. *J Virol* 61:3448-3453, 1987.
- 13) Spandau, D. F., & Lee, C. H. *J Virol* 62:427-434, 1987.
- 14) Seto, E., Michell, P. J. & Yen, T. S. B. *Nature* 344:72-72, 1990.
- 15) Vogel, J., Hinrichs, S. H., et al. *Nature* 335:606-611, 1988.
- 16) Nerenberg, M., Hinrichs, S. H., et al. *Science* 237:1324-1329, 1987.
- 17) Green, J. E., Hinrichs, S. H., et al. *Nature* 341:72-74, 1989.
- 18) Koike, K., Hinrichs, S. H., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5615-5619, 1989.
- 19) Small, J. A., Scangos, G., et al. *Cell* 46:13-18, 1986.
- 20) Small, J. A., Khoury, G., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8288-8292, 1986.
- 21) Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY)
- 22) Fujiyama, A., et al. *Nucleic Acids Res* 11:4601-4610, 1980.

- 23) Shaul, Y., Rutter, W. J. & Laub, O. *EMBO J* 4:427-430, 1985.
- 24) Treinin, M. & Laub, O. *Molec Cell Biol* 7:545-548, 1987.
- 25) Kaneko, S. & Miller, R. H. *J Virol* 62:3979-3984, 1988.
- 26) Dejean, A., Lugassy, C., et al. *J Gen Virol* 65:651-655, 1984.
- 27) Koike, K., Akatsuka, T. & Miyamura, T. *Virology* 163:233-235, 1988.
- 28) Klimek, F., Mayer, D., et al. *Carcinogenesis* 5:265-268, 1984.
- 29) Brooks, P. N. & Roe, F. J. C. in *Digestive System* (eds Jones, T. C., Mohr, U. & Hunt, R. D.) 47-52 (Springer, Berlin/Heidelberg, 1985).
- 30) Bannasch, P., Zerban, H. & Hacker, H. J. in *Digestive System* (eds Jones, T. C., Mohr, U. & Hunt, R. D.) 10-30 (Springer, Berlin/Heidelberg, 1985).
- 31) Becker, F. F. *Cancer Res* 42:3918-3923, 1982.
- 32) Popp, J. A. in *Digestive System* (eds Jones, T. C., Mohr, U. & Hunt, R. D.) 39-46 (Springer, Berlin/Heidelberg, 1985).
- 33) Chisari, F. V., et al. *Science* 230:1157-1160, 1985.
- 34) Babinet, C., Farza, H., et al. *Science* 230:1160-1163, 1985.
- 35) Burk, R. D., DeLoiz, J. A., et al. *J Virol* 62:649-654, 1988.
- 36) Farza, H., et al. *J Virol* 62:4149-4152, 1988.
- 37) Araki, K., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:207-211, 1989.
- 38) Lee, T.-H., et al. *J Virol* 64:5939-5947, 1990.
- 39) Cosman, D., Kress, M., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4947-4951, 1982.
- 40) Kress, M., Cosman, D., et al. *Cell* 34:189-196, 1983.

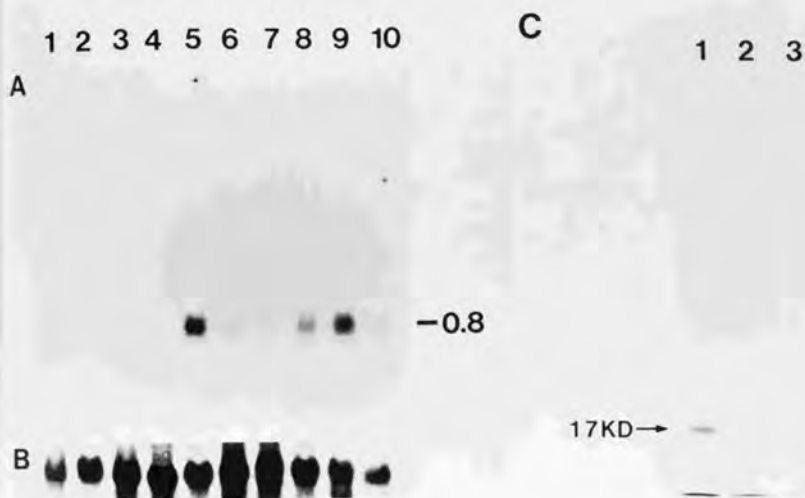


Fig.1

Analysis of the expression of the HBx gene in transgenic mice. A. Northern blot hybridization analysis using the HBx DNA probe of poly(A)+ RNA extracted from tissues of a 2 month-old transgenic mouse. B. Immunoprecipitation of transgenic mouse liver or control mouse liver with either a control rabbit serum or anti-HBx serum directed against a C-terminal peptide (amino acids 139-154). lane 1, transgenic liver with anti-HBx; lane 2, transgenic liver with a normal rabbit serum; lane 3, normal CD-1 mouse liver with anti-HBx antibody.

FIG. 2 Early focal lesions of altered hepatocytes in the liver of transgenic mice. *a* and *b*, Serial sections of liver from a C11 transgenic male mouse killed at 6 months and stained with haematoxylin and eosin, or periodic acid-Schiff, respectively. *c* and *d*, Serial sections of liver from a C11 transgenic male mouse killed at 5 months, immunostained with either a rabbit anti-HBx serum directed against a C-terminal peptide (amino acids 139 to 154) or a control rabbit serum, respectively, and visualized by the avidin-biotin complex method (vector Lab.). Arrows indicate foci of altered hepatocytes.

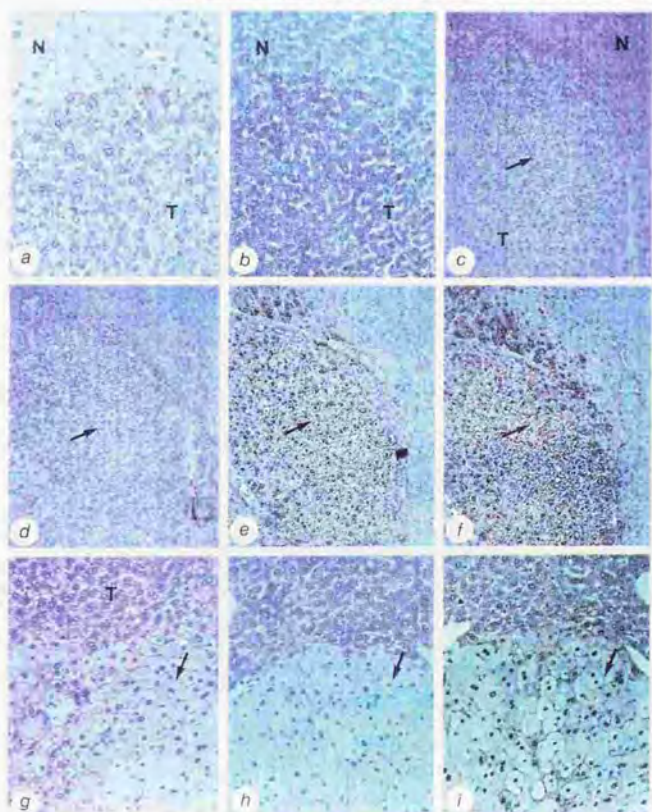
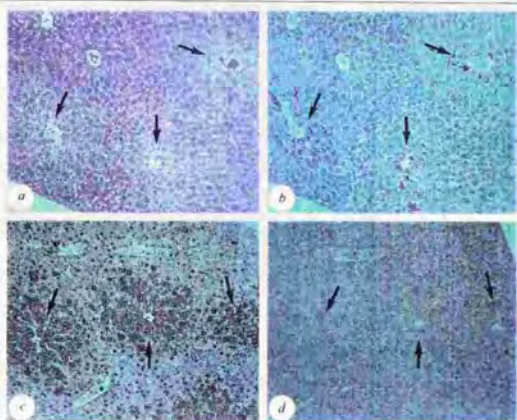


FIG. 3 Progressive neoplastic lesions in the liver of transgenic mice. *a* and *b*, Serial sections of liver from a 9-month-old C11 transgenic mouse, stained with a rabbit anti-HBx serum and periodic acid-Schiff, respectively. The tumour nodule (T) and the adjacent normal part of the liver (N) are indicated. *c-f*, Serial sections of liver from a 10-month-old H9 transgenic mouse stained with haematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, rabbit anti-HBx serum, and rabbit anti- α -fetoprotein, respectively. Arrow indicates the clear cell adenoma. *g-i*, Serial sections of liver of a 16-month-old E1 transgenic mouse stained with haematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, and rabbit anti-HBx serum, respectively. Arrow indicates the clear cell carcinoma.

TABLE 1 Susceptibility of transgenic mice to the development of liver tumours

Transgenic strain	Sex	No. of mice observed	No. of mice with tumours	Per cent of mice with tumours
C11	M	21	19	90.5
	F	20	12	60.0
	total	41	31	75.6
H9	M	10	8	80.0
	F	6	4	66.7
	total	16	12	75.0

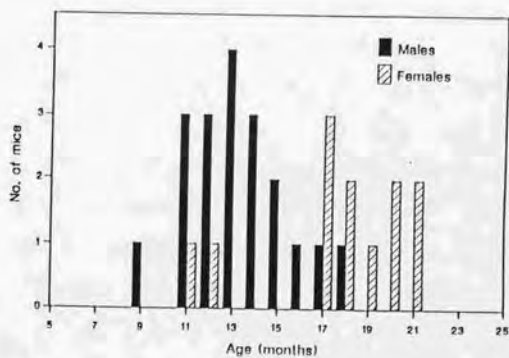


FIG. 4 Age at the time of death of transgenic mice with hepatic tumours. Transgenic C11 mice that died were subjected to gross and microscopic examination. Nineteen of 21 males and 12 of 20 females had detectable tumours in the liver.

第三部

HBx 遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝発癌のメカニズム
Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma
in transgenic mice carrying hepatitis B virus HBx gene

(本論文は現在投稿中である)

要約

B型肝炎ウイルスのHBx遺伝子を導入したトランスジェニックマウスで高率に肝癌が発生し、HBVが直接的に肝発癌に関わっていることが明らかとなった。このトランスジェニックマウスにおける肝発癌のメカニズムを、トランスジェニックマウスの一系統で検討した。HBx遺伝子の転写産物の検討から、肝発癌にはある値レベル以上のHBx遺伝子の発現が必要であること、発現レベルと肝癌発生の時期との間には密接な関連のあることが明らかとなった。出生後のマウス肝組織を経時的に観察すると、2ヶ月齢からPAS染色陽性の空胞をもつ変異肝細胞が中心静脈周囲に巣状に出現したが、10ヶ月齢までその組織所見は不変であり、増殖性の変化は認められなかった。12ヶ月齢過ぎから大きな核をもつ異型性細胞群が出現し、14ヶ月齢頃から肝腫瘍が発生した。肝癌組織中のDNAの検討では、導入されたHBx遺伝子を巻き込んだ宿主遺伝子の再編成は認められず、このトランスジェニックマウスにおける肝発癌には遺伝子の再編成は不必要と考えられた。myc、H-ras、N-myc、fos癌遺伝子の発現レベルは、正常肝と肝癌中で差は認められず、肝癌発生前においてもこれらの癌遺伝子の発現量増加は見られなかった。HBx遺伝子の発現している腫瘍発生前の中心静脈静脈周囲の変異細胞巢の肝細胞では、正常肝では決して見られないことであるが、核でのDNA合成が亢進していた。またFACSによる核のDNA含量の検討では、正常マウス肝で見られる2n、4n、8nのピークの減高とaneuploidの小さなピークの出現が4ヶ月齢から腫瘍発生前まで認められた。これらの結果から、HBx遺伝子は肝細胞に働いて増殖のよい肝細胞の小さいクローンを作り、そこへさらに二次的な変化が起こることでHBx遺伝子による生体内での肝発癌は達成されると考えられた。

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) 慢性感染症と肝細胞癌との間には強い関連性のあることが以前より指摘されてきた (1) が、その発癌のメカニズムは全く不明であった。HBV の遺伝子が肝癌細胞の遺伝子中に組み込まれていること (2) が発見されて以来、組み込まれたHBV 周辺の宿主遺伝子が精力的に検討された。しかし、その結果HBV-DNA の組み込みの起こり方は全くランダムであることが判明し (3, 4)、特定の細胞遺伝子の近傍に組み込まれることによるレトロウイルス類似の機序による肝発癌の可能性は否定的であった (5)。最近我々は、HBV の一遺伝子であるトランス活性化遺伝子HBx が、トランスジェニックマウスにおいて肝癌を引き起こし、HBV が直接的に肝発癌に関わっていることを初めて明らかにした (6)。本論文ではこのHBxトランスジェニックマウスにおける肝発癌の機序について、作製した3系統のトランスジェニックマウスのうちの一つであるH9系統のオスマウスについて、微細な組織学的検索、遺伝子発現、DNA合成などの点から検討し、メカニズムの解明を試みた。HBx遺伝子はマウス肝においてDNA合成を高め、肝発癌の初期の段階に働いていると考えられた。

方法

修飾酵素、マウス、アイソトープ、DNA組み替え操作

DNA制限酵素、各種修飾酵素、はNew England Biolab, Bethesda Research Laboratoryから購入した。アイソトープはNew England Nuclear, Amershamから購入した。基本的なDNA組み替え操作は、文献(7)に従った。また、癌遺伝子プロンプmyc、H-ras、N-mycはOncogene Science社から購入した。fos遺伝子は遺伝子バンクより供与を受けた。

トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスの作製については文献(6,8)に記載の通りである。3系統のHBx遺伝子導入トランスジェニックマウス(C11, E1, H9)が確立された(6)が、本検討は主にH9系統のオスマウスについて行なった。

DNAプロット

50-100mgのマウス尻尾からDNAを抽出しトランスジェニックマウスのスクリーニングを行った。尻尾をカミソリで小片とし、1mlのbuffer (1% SDS/50mM Tris/5mM EDTA/150mM NaCl) 中で55°C、2時間proteinase Kにて消化した。ついで、フェノール/クロロホルムで3回抽出後エタノール沈殿し回収した。DNAは制限酵素で消化し0.8%のアガロースゲルで分離した。次にニトロセルロース膜に転写し、通常の方法でランダムプライム法(Pharmacia)でラベルしたDNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは40%ホルムアミド/4X SSC/5X Denhardt溶液/50mM HEPES(pH7.0)存在下で42°C、20時間行い、3XSSC、42°Cで10分間2回washingの後、3XSSC、68°Cで10分2回、最後に0.1XSSC、68°Cで5分間2回washingを行った。

ノーザン(RNA)プロット法

総RNAをGuanidinium isothiocyanate-cesium chloride法にて抽出した。概略を述べると、組織、約200mgを9mlの(4M GuITC/1% sarcosine/5mM EDTA/1% β

ME) 溶液中でホモジェナイズし、4mlの(5.7M CsCl/5mM EDTA) 液に重層し、Beckmann 55Tローターで35,000回転、20時間遠心した。生じたペレットを400 μ lのddH₂Oに溶解し、エタノール沈殿した。15 μ gのRNAあるいはポリA選択をしたRNAを0.9%のアガロース/ホルムアルデヒドゲルで分画し、ニトロセルロース膜に転写後³²Pでラベルした単鎖DNAプローブでハイブリダイゼーションを行った(7)。ハイブリダイゼーションは(50% formaldehyde/3X SSC/5X Denhardt/50mM HEPES) 存在下で45°C, 20時間のあと、サザン法と同様にwashingを行い露出した。

組織学的検索

組織は、3.7%のPBS-buffered formaldehyde(pH7.4)で固定した。固定した組織は切片とし、通常の方法でHE染色した。また、組織の免疫染色は、Vectastain Elite (Vector) を用いてABC法にて行なった。抗HBx抗体は既報(9)のものを用いた。myc、rasに対する抗体はOncogene Science社より購入した。

DNA含量の分析

肝細胞のDNA含量は、CycleTEST (Becton Dickinson) を用いて検討した。マウス肝組織をハサミで細切後、0.3mlのsample bufferに浮遊させ、21Gの針をつけた注射器を用いて5-10回出し入れする。およそ 2.5×10^6 /mlとして、0.2mlの検体に1.8mlのsolution A (trypsin溶液) を加え、室温で10分間incubateする。さらに1.5mlのsolution B (trypsin inhibitor, RNase) を加え10分間、1.5mlのsolution C (propidium iodide) を加えて10分間incubateする。propidium iodideに染色された核をFACScan(Becton Dickinson) にて解析した。

BrdUの取り込み解析

マウス肝細胞におけるDNA合成はcell proliferation kit (Amersham) にて測定した。マウス肝細胞をスライス後、Dulbecco's modified eagle media内で60分間ラベルし、PBS緩衝10%ホルムアルデヒドで16時間固定した。通常のパラフィンブロックを作製し、特異抗体を用いて染色した。対照としては、同性、同月齢のマウスを用いた。

結果

肝内HBx遺伝子の発現レベルと肝発癌との関連

このトランスジェニックマウスにおいては、サザンブロットで計算した組み込まれた導入遺伝子のコピーナンバーと、ノーザンブロットで算定した肝臓でのHBx遺伝子の発現レベルとの間にはほぼ相関関係が存在した (data not shown)。本研究では3系統のトランスジェニックマウスが検討されたが、それぞれの系統で導入遺伝子についてホモ (homozygote) とヘテロ (heterozygote) が存在するので、発現レベルについては都合6系統のトランスジェニックマウスが存在することになる。これらの6系統における肝癌発生率を見ると、最もHBx遺伝子の発現の低いE1系統のヘテロでは24ヶ月で肝癌は全く認められず、そのほぼ2倍の発現レベルをもつE1ホモでは約60%で肝癌が発生した (表1)。他の4系統、すなわちHBx発現の高度なH9ヘテロ、H9ホモ、C11ヘテロ、C11ホモではいずれも24ヶ月間に約90%で肝癌が発生した。すなわち、肝癌発生にはある最低限のレベル以上のHBx遺伝子の発現が必要であることが明らかとなった。さらに興味あることに、その発癌の時期はE1系統ホモでほぼ24ヶ月と寿命いっぱいであったのに比べH9系統では15-20ヶ月、より発現の高いC11では12-16ヶ月であった。HBx遺伝子発現のレベルと肝癌発生時期との間には逆相関が存在していた。

肝における経時的な組織変化

HBx遺伝子を導入したトランスジェニックマウスのうちH9ラインのオスでは、14ヶ月を過ぎた時点から肝癌を発生したが、肝癌発生前に肝には特徴ある組織学的変化が生じている。およそ2ヶ月齢から肝の中心静脈のまわりに、細胞質にHE染色では染まらず白く抜けて見える顆粒状の空胞化をもつ肝細胞の集団が出現した。この空胞はPAS染色陽性であり、glycogenが蓄積していると考えられた。これらの肝細胞は過形成や腫瘍性の形態は全く示さなかった。このような肝細胞の変化 (altered hepatocytes) はマウス肝のいずれの領域における中心静脈周囲でも認められた。しかしながら、門脈周囲の肝細胞ではこのような変化は全く認められず、正常の形態を示していた。空胞化をもつ肝細胞は、抗HB

x抗体による染色でHBx遺伝子を比較的高度に発現していることが示された(文献6、図1)。H9系統のオスマウスで、この2ヶ月から14ヶ月までのオスマウスでの肝組織を順次、細かに観察してゆくと、この“変異細胞集(altered hepatocytes)”は4、6、8、10ヶ月の各オスマウスにおいても、細胞質に空胞化をもつ肝細胞として存在し、全く変化が無く、増殖性の変化も見られず、また肝細胞壊死、炎症反応も認められなかった(図2)。ようやく12ヶ月齢頃になると核と、細胞質の大きい異型性細胞と考えられる肝細胞の集団が出現した(図3)。最後に13-14ヶ月齢からアデノーマ、肝細胞癌などの肝腫瘍が出現した。腫瘍は13-14ヶ月齢では比較的小さく、マウスを死にいたらしめる程度ではなかった。より月齢が進むと肝腫瘍は次第に大きくなり、死にいたるマウスも多数出現した。このようにHBx遺伝子の発現の結果起こったと考えられる変異肝細胞(altered hepatocytes)は2ヶ月齢から約10ヶ月間にわたって是不変で、その後に変異形成(dysplasia)、腫瘍(neoplasia)を形成するに至った。

肝癌組織における導入遺伝子の再編成の有無

ヒト肝癌での組み込みHBV-DNAの検索で、宿主遺伝子を巻き込んだ遺伝子の再編成が高率に起こっていることが報告されている(3)。また、実験系においてもHBV-DNAはrecombinogenicであるとする報告もある(10)。しかし、これらの事実が肝発癌に関与しているか否かは全く明らかではない。我々のトランスジェニックマウスにおいて導入遺伝子を中心とした再編成が起こっているかどうかをサザン法で検討した。C11、E1、H9の3系統それぞれのマウスについて検討した。代表例を図4に示す。トランスジェニックマウスの尾、肝非癌部、肝癌部からそれぞれDNAを抽出してHBx遺伝子をプローブとしてサザン法を行なった。制限酵素BglIIあるいはBamHIによる消化でunit lengthの1.2kbの断片と宿主遺伝子への組み込み断端が見られたが、正常細胞と肝癌細胞の間でそのパターンには全く変化が認められなかった。

トランスジェニックマウス肝における癌遺伝子の発現

HBx遺伝子がトランス活性化遺伝子であることから、HBx遺伝子が細胞癌遺伝子を活性化して発癌に関与している可能性を調べるため、7例の肝癌につい

てマウス癌遺伝子 *myc*, *H-ras*, *N-myc*, *fos* の発現をノーザン法で検索した。正常 C D-1 マウスの肝、トランスジェニックマウス肝非癌部、トランスジェニックマウス肝から抽出された RNA について検討したが、*myc* の約 2.4 kb の転写産物、*H-ras* の約 1.2 kb の転写産物のレベルに差は認められなかった (図 5 A、B。 *N-myc*、*fos* については data not shown)。

次に肝癌発生前の癌遺伝子の関与について細胞レベルで検討するため、*myc*、*ras* 蛋白に対する抗体を用いて組織染色を行なった。4、7、10 か月齢のオスマウス肝について検討したが、染色される細胞は散見されたが、コントロールと差は見られなかった。*HBx* 遺伝子の発現している空胞をもつ変異肝細胞はこれらの抗体によって染色されず (図 6)、肝癌発生前におけるこれらの癌遺伝子の関与は否定的であった。

変異肝細胞における DNA 合成の亢進

トランス活性化遺伝子である *HBx* 遺伝子が肝細胞の DNA 合成に及ぼす影響を知るため、トランスジェニックマウス肝を BrdU でラベルして DNA 合成を検討した。4、7、10 ヶ月のオスマウスについて同性、同月齢のコントロールマウスとともに同時にラベルし、抗体による検出を行なった。7 ヶ月齢のマウスでの結果を図 7 に示す。中心静脈のまわりの空胞性変化をもつ肝細胞の核において特異的に抗 BrdU 抗体による染色が認められ、DNA の合成が亢進していることが示された (図 7 A、B)。一次抗体無しでは染色は見られず (図 7 C)、また同齢、同性の C D-1 マウスにおいては中心静脈周囲の肝細胞を含めて全く肝細胞核への BrdU の取り込みは認められなかった (図 7 D)。

トランスジェニックマウス肝での DNA ploidy の検討

HBx 遺伝子発現の結果、DNA 合成の亢進した変異肝細胞が出現したが、これらの肝細胞における DNA ploidy を知るため、肝細胞核を propidium iodide で染色して FACS により検討した。正常マウス肝では diploid の核に加え、tetraploid、octaploid の核が存在することが知られている (図 8 A、7 ヶ月齢オスマウス)。*HBx* 遺伝子をもつトランスジェニックマウスにおいては、2 ヶ月齢では正常マウス肝とほとんど変化がないが (図 8 B)、4 ヶ月齢になると 2n、

4n、8nのピークの減高が見られ始める(図8C)。さらに、小さなaneuploidのピークが出現していた。7ヶ月においても同様の傾向が見られた。すなわち、diploid, tetraploid, octaploid ピークの減高と小さいaneuploidピークの出現であるが、aneuploidのピークの大きさは4カ月齢のマウス肝と同様であり、進行性とは言い難かった。15カ月齢のマウスから採取された肝癌では2nに加えaneuploidの大きなピークが認められ、肝癌がモノクローナルであることを示していた。

考察

我々のトランスジェニックマウスマウスでのHBx遺伝子の発現を検討すると興味深いことが明らかとなった。一つは低レベル過ぎるHBx遺伝子の発現では肝癌が生じないこと、二つ目は発現レベルと肝癌発生の時期との間に逆相関関係があったことである。最初の事実は、たとえばHBVの全長を入れたトランスジェニックマウス(11)ではHBx遺伝子が肝でほとんど発現しておらず、肝癌も生じないという事実をよく説明している。あるレベル以上のHBx遺伝子発現をもつマウスでは肝癌が高頻度に起こるが、その中でも発現レベルが高いほどより早く発癌するという事実は、一定レベル以上のHBx蛋白をもつ肝細胞がより多数存在するために、後に述べるごとく二次的、三次的ヒットを受ける細胞が増え、癌化の確率が増すのであると考えられる。

既報のごとく(6)、我々のトランスジェニックマウスでは中心静脈周囲の肝細胞にHE染色で染まりの悪い顆粒状の空胞が生じ、それと同じサブセットの肝細胞ではHBx蛋白が比較的高度に発現していた(我々はこの変異肝細胞、*altered hepatocytes*と呼んでいる)。生後、経時的に肝組織を観察すると、この変異肝細胞ではnecrosis, neoplastic changeなどの組織学的な変化は10カ月以内にわり認められなかった。このように形態上は増殖性の変化を示していない変異肝細胞にDNA合成の亢進、DNA ploidyの変化が見られたことは興味深い。DNA合成の著明な増加、核内DNA量の増加が認められるにもかかわらず組織上は細胞の増殖が見られないという所見は十分に解釈するのは難しい。だが同様な所見がnon-toxicなlow doseのcarcinogenの投与でも見られること(12)、また癌遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでの発癌前にaneuploidの細胞の出現することが報告されており(13)、我々の観察したaltered hepatocytesが前癌状態であることを支持している。HBx蛋白は肝細胞のDNA合成を刺激するが、通常引き続いて起こるmitosisはブロックするのかもしれない。carcinogenであるtioacetamide (TAA)の少量投与でも同様の事実が観察されているのは興味深い(14)。細胞周期の観点からみると、G₀/G₁期からS期への進行は促進するがM期への進行はブロックすることになる(15)。トランス活性化蛋白であるHBx蛋白の細胞周期調節遺伝子への作用が関与している可能性も考え

られる。なお、組織学的にはapoptosisを示す所見は認められなかった。

さて、HBx蛋白によってDNA合成能の高まった変異肝細胞は一種の前癌細胞として存在していると考えられるが、一方この変異肝細胞の状態が長期にわたり続いたという事実は、生体内においてはそれだけでは癌化が起こり得ず、発癌のためには二次的なヒットが必要であることを示唆している。HBx遺伝子は肝細胞に作用して増殖のよい肝細胞とし、あと一息で癌化に到る前癌状態をつくり出すが、癌化のためには細胞癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの増殖制御遺伝子の変化、免疫機構からの逸脱、血管造成(16、17)などのファクターによる二次的、三次的なヒットが必要であると考えられる。そしてこのような生体内における多段階発癌は、myc、やrasなどの癌遺伝子を導入した他のトランスジェニックマウスでも共通に認められ、かつ考えられていることであり(18、19)、実際ヒトにおけるB型肝炎ウイルス感染から発癌までの長いincubation periodも説明しうるものである。

ヒト肝癌での組み込まれたHBV-DNAの解析の結果では宿主遺伝子を巻き込んだ再編成が認められ(3、4)、この遺伝子の再編成が肝発癌に関与していることが推測されていたが、HBx遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝発癌においては、この遺伝子再編成は不要であると思われた。またHNV-DNA自身がrecombinogenicであるとする報告もあるが(10)、今回の我々の解析の結果、他のトランスジェニックマウスの報告(11、20、21)を見る限り、HBV-DNAが肝細胞に組み込まれた後肝癌が発生してもgene rearrangementは起こりやすくなり(6、20)、またHBV-DNAの組み込みが存在するだけでは何等の組織変化も存在しない(11、21)。すなわち、integratedHBV-DNAの存在→遺伝子再編成→発癌というプロセスはトランスジェニックマウスによる検討を見る限り否定的である。

肝腫瘍あるいは発癌前の肝組織での癌遺伝子の検索の結果、癌遺伝子の発現量増加は認められなかった。しかし、今回検討された癌遺伝子はごく一部であり、今後他の癌遺伝子や増殖因子やその受容体の発現も検討する必要がある。

HBVによる肝炎あるいは肝癌の動物モデルを目的として、我々の作製したHBx遺伝子トランスジェニックマウス(6)のほかに、これまでいくつかのトランスジェニックマウスが作製されている。HBs抗原を作るマウス(20、21)、

HBVと思われる粒子を作るマウス(11)などが報告されているが、HBV様粒子を作るマウスおよび分泌型のHBs抗原を作るマウスでは、肝炎や肝腫瘍などの組織学的な変化は生じてこなかった(3, 21)。膜結合型のlargeHBs抗原を大量に産製するマウスでのみ肝癌の発生が報告されている(20)。

Chisariら(20)は、HBVゲノムのうちS遺伝子とX遺伝子を含むBgIII-BgIII断片をアルブミン遺伝子の制御領域のもとに導入してトランスジェニックマウスを作製した。彼らのマウスではlarge, major, smallの3種類のS抗原蛋白のうちの、小胞体(endoplasmic reticulum)の膜に結合するlarge S抗原蛋白が肝細胞内に蓄積し、その蓄積により肝細胞壊死を引き起こし、約一年半を経過した後には肝癌が発生した。しかし発生した肝癌にはもはやS遺伝子は全く発現していなかった。すなわち彼らのマウスのシステムにおける肝発癌においては、繰り返す肝細胞壊死とそれに続く肝再生が肝発癌の原因であるとされ(20)、HBV遺伝子産物自体は直接的には肝発癌に関与していない。largeHBs抗原が肝細胞に蓄積するという現象はヒトでのHBV感染症では明らかでないため、このマウスでの発癌のメカニズムがヒトでのHBVによる肝発癌のモデルであるとはいえない面があるが、肝細胞壊死の持続が肝癌の発生へ続くという意味では興味深い。なおChisariらのマウスではHBx遺伝子はほとんど発現しておらず、彼らのマウスでX遺伝子の作用を確認することは不可能である。

HBx遺伝子をヒトの α -1アンチトリプシン遺伝子の制御領域のもとに導入したトランスジェニックマウスも報告されているが、肝癌は発生しなかった(22)。彼らのマウスで肝癌が発生しなかった原因は、ひとえにHBx遺伝子の発現が2週齢以降減弱し、2カ月齢ではほとんど検出されなかった(22)ためと思われる。このような見地からみて、我々のトランスジェニックマウスで肝癌の誘発に成功したのは、HBVそれ自身の制御領域を用いたというコンストラクトの選択にあると思われる。

本トランスジェニックマウスでHBx遺伝子が肝の中心静脈周囲の肝細胞に高度に発現した理由は明らかでない。肝臓における肝細胞は全てが一樣なものではなく、門脈領域、中心静脈そしてその中間帯の肝細胞ではそれぞれ合成する蛋白、機能、酸素濃度などに違いのあることが知られている(23)。これらに関する詳細はまだまだ明らかでないことが多いが、異なったゾーンに存在する肝細胞には

分化度、機能、増殖因子に対する感受性にも違いが存在すると考えられる。この意味において、我々の選択したコンストラクトが中心静脈周囲の肝細胞でHBx遺伝子の高い発現を許したことは、我々のトランスジェニックマウスで肝癌の誘発に成功した理由の一つと思われる。

以上述べたごとく、HBx遺伝子は肝細胞を発癌準備状態とし、多段階発癌の初期の一段階を担っていると考えられる。HBx遺伝子による増殖の亢進がHBx蛋白の直接作用であるのか、他の増殖因子遺伝子を活性化するか、あるいは発癌のための二次的、三次的なヒットは何であるのかなどはこれから明らかにしていかななくてはならない。

文献

- 1) Beasley, R. P., Hwang, L. W., et al.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* II:1129-1133, 1981
- 2) Shafritz, D. A. & Kew, M. C.: Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1:1-8, 1981
- 3) Nagaya, T., Nakamura, T., et al.: The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Gen Develop* 1:773-782, 1987.
- 4) Takada, S., Gotoh, Y., et al.: Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues. *J Virol* 64:822-828, 1990.
- 5) Robinson, W. S.: Hepadna viruses and hepatocellular carcinoma. *Cancer-Detect-Prev* 14:245-252, 1989
- 6) Kim, C. M., Koike, K., et al.: HBx gene of hepatitis B virus induces hepatic cancer in transgenic mice. *Nature* 351:317-320, 1991.
- 7) Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).
- 8) Nerenberg, M., Hinrichs, S., et al.: The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 237:1324-1329, 1987
- 9) Koike, K., Akatsuka, T. & Miyamura, T.: Characterization of hepatitis B virus x gene: in vitro translation of mRNA from COS-1 cells transfected with the x gene. *Virology* 163:233-235, 1988
- 10) Hino, O., Tabata, S., & Hotta, Y. Evidence for increased in vitro recombination with insertion of human hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9248-9252.
- 11) Araki, K., Miyazaki, J., et al. Expression and replication of hepatitis

- B virus genome in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 86:207-211, 1989.
- 12) Clawson, G.A., Blankenship, L.J., Rhame, J.G., & Wilkinson, D.S. Nuclear enlargement induced by hepatocarcinogenesis alters ploidy. Cancer Res 52:1304-1308, 1992.
- 13) Ornitz, D.M., Hammer, R.E., Messing, A., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L. Pancreatic neoplasia induced by SV40 T-antigen expression in acinar cells of transgenic mice. Science 238:188-193, 1987.
- 14) Kleinfeld, R. Early changes in rat liver and kidney cells induced by trichloroacetamide. Cancer Res., 17:954-962, 1957.
- 15) Yoshida, M. & Beppu, T. Reversible arrest of proliferation of Rat 3Y1 fibroblasts in Both the G1 and G2 phases by trichostatin A. Exp Cell Res 177:122-131, 1988.
- 16) Tanaka, K., Yoshioka, T., Bieberich, C., & Jay, G. Annu Rev Immunol 6:359-380, 1988.
- 17) Folkman, J., & Klagsbrun, M. Angiogenic Factors. Science 235:442-447, 1987.
- 18) Rassoulzadegan, M. & Cuzin, F. "Sub-threshold neoplastic states" created in transgenic mice. Oncogene Res 1:1-6, 1987.
- 19) Hanahan, D. Transgenic mice as probes into complex systems. Science 246:1265-1275, 1989.
- 20) Chisari, F.V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H.A., Pinkert, C.A., Brinster, R.L., & Palmiter, R. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. Cell 59:145-156, 1989.
- 21) Babinet, C., Farza, H., et al: Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. Science 230:1160-1163, 1985.
- 22) Lee, T.-H., Finegold, M.J., Shen, R.-F., DeMayo, J.L., Woo, S.L.C., & Butcher, J.S. Hepatitis B virus transactivator x protein is not tumorigenic in transgenic mice. J Virol 64:5939-5947, 1990.

23) Ingermann, K., & Katz, N. Functional Specialization of Different Hepatocyte Populations. *Physiological reviews* 69:708-764, 1989.

Table 1
 HBx gene expression and hepatic tumors in male transgenic mice

mouse line	relative expression levels ^a of HBx gene	hepatic tumors ^b	age ^c
C11	hetero ^d	7	
	homo ^e	19/21 (91%) ^{f, 6)}	13.3 ± 2.2 ^{f, 6)}
H9	hetero	4	
	homo	25/29 (86%) ^f	16.6 ± 3.5 ^f
E1	hetero	1	-----
	homo	2.5	8/12 (67%) 23.5 ± 1.5

a:arbitrary units

b:incidence in 24 months

c:age(mo.) of mice at the development of hepatic tumors(mean ± SD)

d:heterozygote

e:homozygote

f:calculated heterozygote and homozygote together

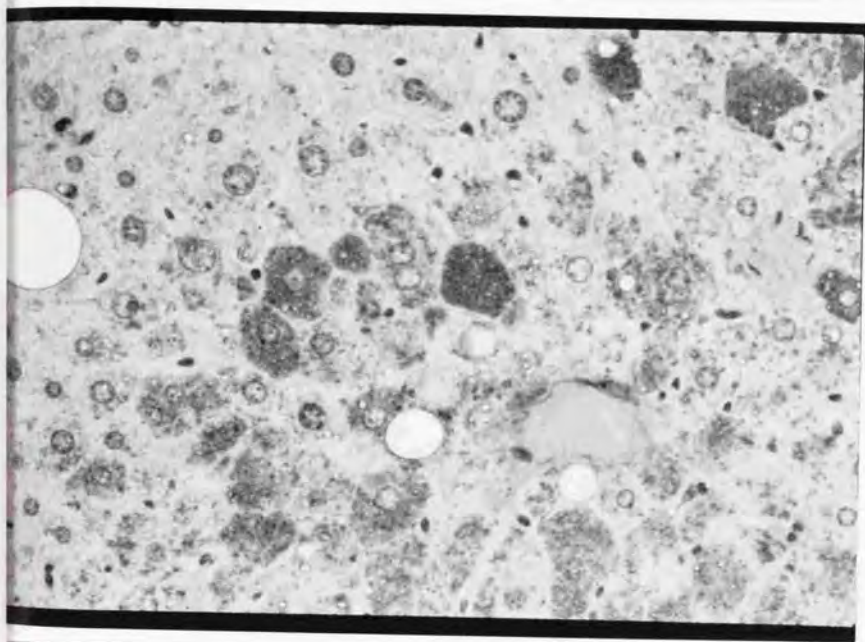


Fig. 1

Immunostaining of transgenic mouse H9 liver with anti-HBx antibody. Cytoplasm of altered hepatocytes with vacuolations around central vein was granularly stained with anti-HBx Ab. Counter-stained with hematoxylin(x100).

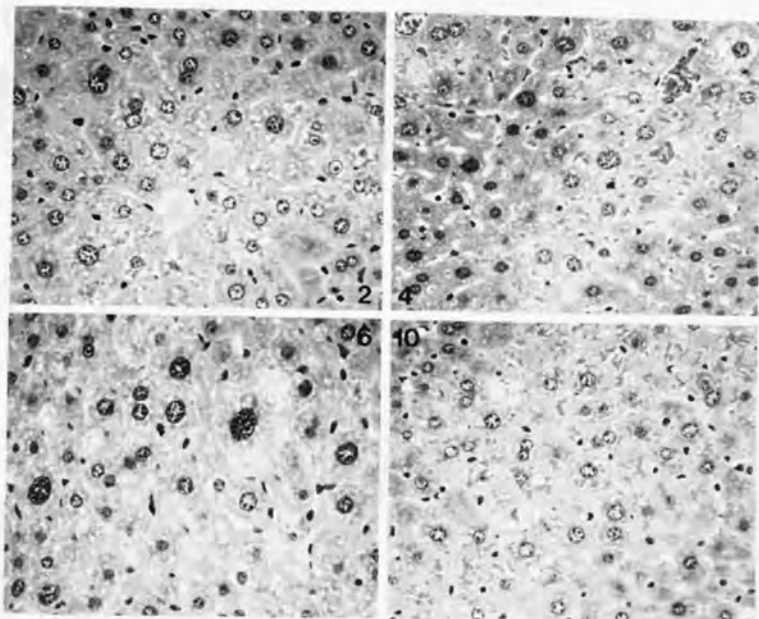


Fig. 2

Time course of histological changes in HBx transgenic mouse liver (line H 9). Foci of altered hepatocytes in central area did not progress histologically with age from 2 to 10 mo. (HE staining, x100). Numbers in the panels indicate mouse age in months.

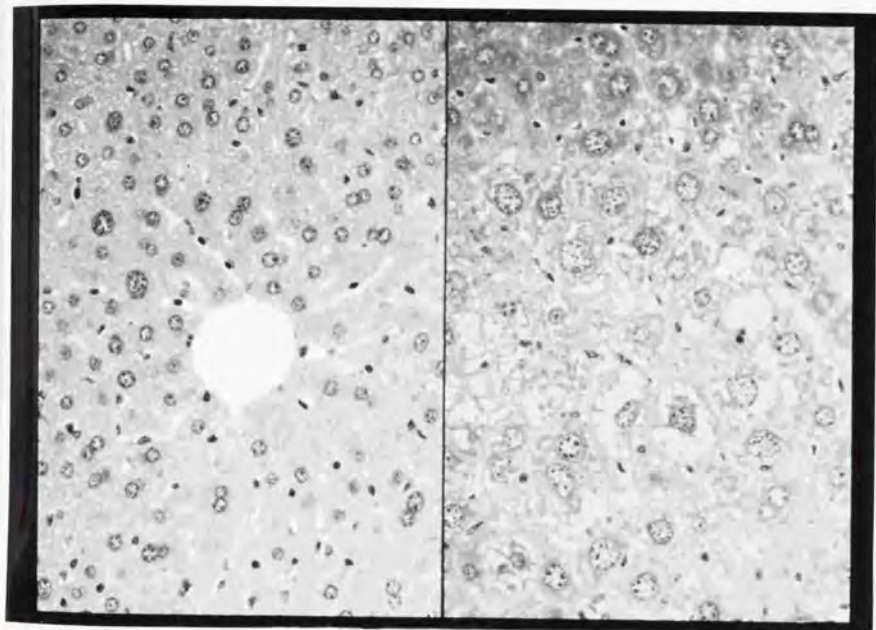


Fig. 3

Histological findings in 12 mo. mouse liver. Left: 12 mo. normal CD-1 mouse. Right: 12 mo. transgenic mouse: foci of dysplastic liver cells with large nuclei appeared about 12 mo. (compare with normal mouse).

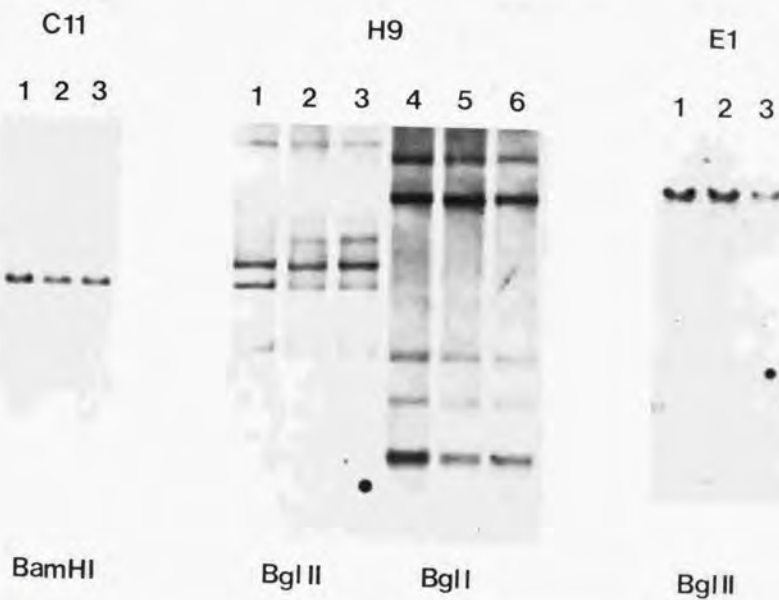


Fig. 4

Southern blotting of DNA from HCC developed in HBx transgenic mice. No gene rearrangement involving integrated HBV-DNA was observed in HCC. Fifteen micrograms of DNA from tail (lane 1 or 4), non-cancerous liver (lane 2 or 5) and HCC (lane 3 or 6) of transgenic mice were digested with restriction enzymes and hybridized with HBx gene probe.

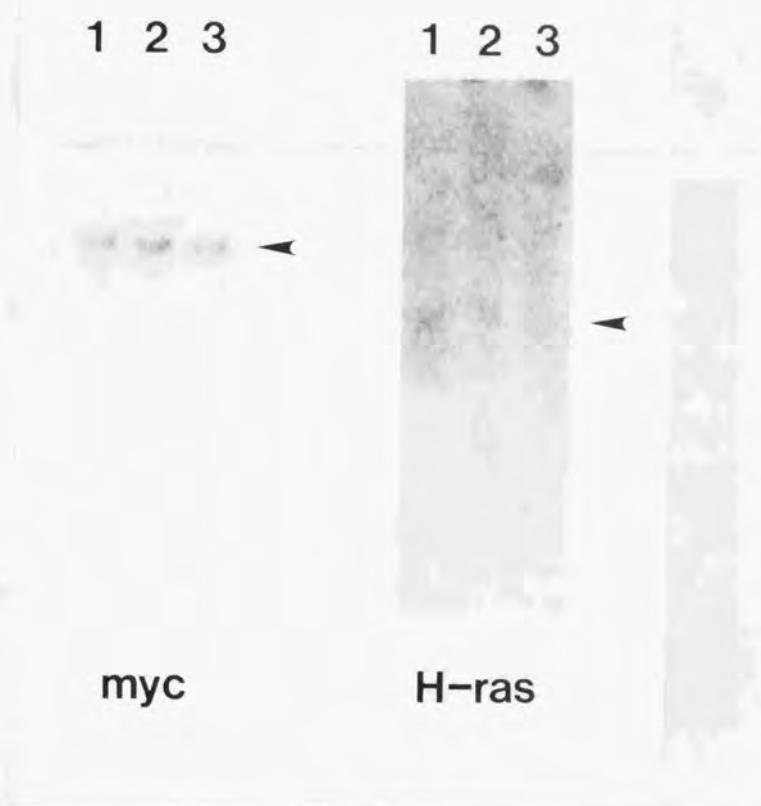


Fig. 5

Northern blot analysis of oncogenes, *myc* (panel A) and *H-ras* (panel B) in HCC tissues (17mo. H9 male). No increased levels of *myc* or *H-ras* oncogene expression were observed.

lane 1: normal CD-1 mouse liver, lane 2: non-cancerous liver of transgenic mouse, lane 3: HCC developed in transgenic mouse.

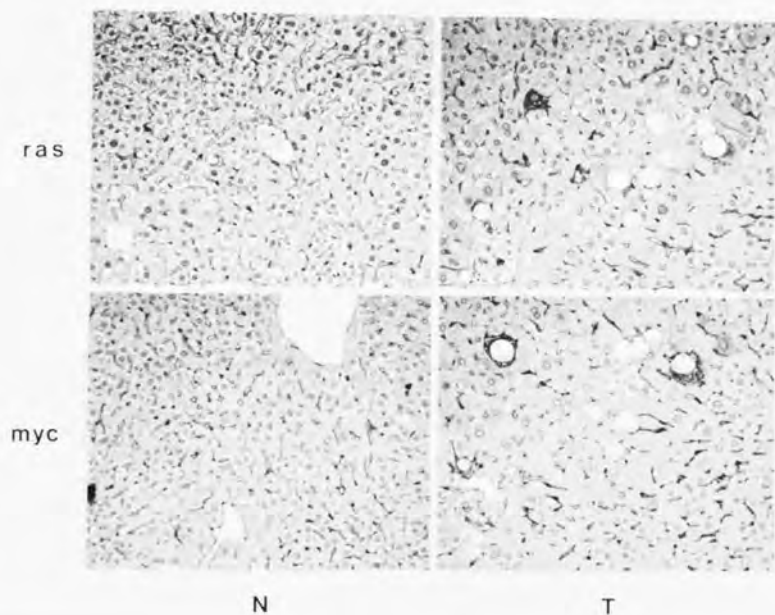


Fig. 6

Immunostaining of liver tissue from transgenic mouse before tumor development (7 mo. male). No difference was observed in *myc* (upper panels) or *H-ras* oncogene expression (lower panels). Left side panels show normal C57BL/6J mouse liver of the same age.

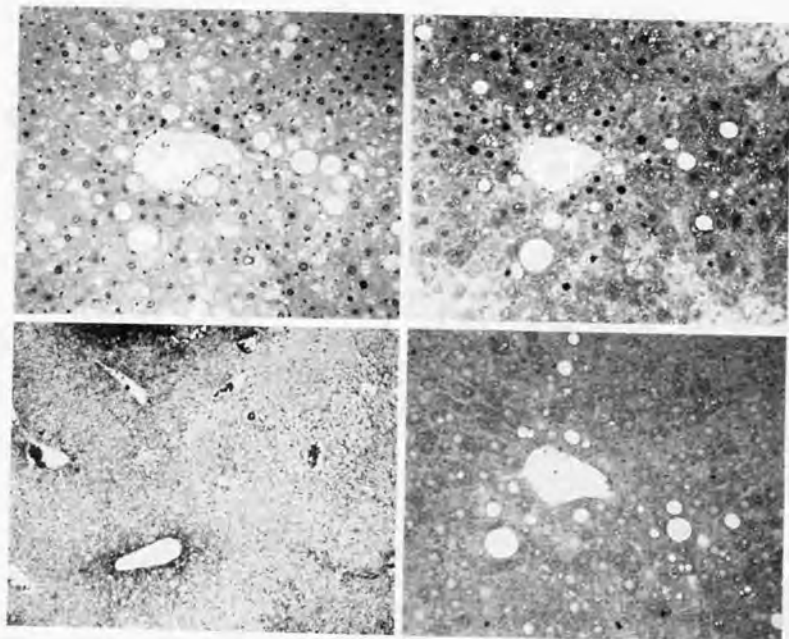


Fig. 7

Stimulation of DNA synthesis in altered hepatocytes.

Liver tissues from transgenic mouse or normal CD-1 mouse were labeled with bromo deoxy-uridine(BrdU) and analyzed. Stimulated DNA synthesis was observed in hepatocytes around central veins in transgenic mouse in contrast to no incorporation of BrdU into normal CD-1 mouse liver of the same age.

A:HE staining of liver from H9 transgenic mouse(7 mo., male). B:BrdU staining of the same mouse, C:Staining without anti-BrdU antibody as control. D:BrdU staining of normal CD-1 mouse(7 mo. male).

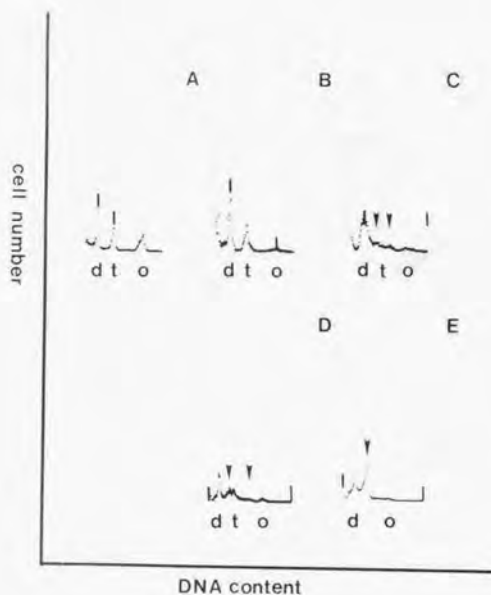


Fig. 8

DNA content analysis of transgenic mouse liver.

Liver tissues were labeled *in vitro* with propidium iodide and analyzed by FACScan (Beckton & Dickinson). Tetraploid (t) and octaploid (o) peaks normally seen in mouse liver (panel A) were decreased, and small aneuploid peaks (arrow heads) appeared before tumor development in transgenic mouse liver at 4-10 mo.

A: normal CD-1 (7 mo.), B: H9 mouse (2 mo.), C: H9 mouse (4 mo.), D: H9 mouse (7 mo.), E: hepatoma in H9 mouse (17 mo.).

HBx transgenic mice

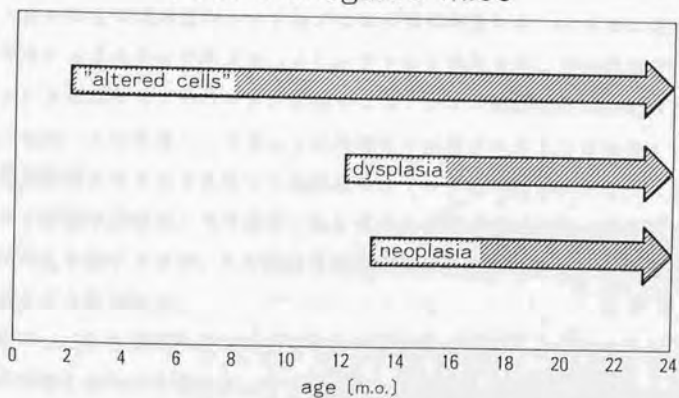


Fig. 9

Time course of HBx transgenic mouse. Altered hepatocytes appear about 2 mo. and did not change through 10 mo. Dysplasia appear around 12 mo. and neoplasia around 14 mo.

本論文ではB型肝炎ウイルス(HBV)のX遺伝子(HBx遺伝子)について、その蛋白としての同定から肝発癌における役割に関して、培養細胞を用いたトランスフェクション実験およびトランスジェニックマウスを用いた生体内でのHBx遺伝子の発現実験によって検討した。第一部では、クローン化されたHBV-DNAを用いて発現させたHBx蛋白と患者血清が反応することから、推定上は蛋白をコードしうると考えられていたHBx遺伝子オープンリーディングフレーム(ORF)(1)が、実際にヒトへの感染時に蛋白として発現されることを示した。我々のHBVキャリアにおけるHBx抗体の陽性率は比較的低いものであったが、これは我々のシステムの検出感度が低いためと思われる。HBx抗体のヒトにおける存在意義については、まだ不明の部分が多い。HBx蛋白がHBV粒子そのものの中に存在する(2)かどうかは確定せず、血液中にでてくるのか(3)も判然としない。HBx蛋白はそのトランス活性化という機能から推定して、turn overは速く、おそらく肝細胞外へ分泌されるものではなく、肝細胞が肝炎で破壊されるときに血中へと逸脱してくると思われる。したがって血清中のHBx抗体の存在は、ある程度の激しさ以上の肝炎があった(あるいは、現在ある)ことを示すだけで、この抗体の存在自体は肝発癌との関わりを直接に示すものではないと思われる。

次に、HBx遺伝子がトランス活性化遺伝子であることが、他のグループによって確認されたのを受けて、第二部で述べたごとく、我々はトランスジェニックマウスを作製した。その理論的裏付けは、ウイルスのトランス活性化が生体内において細胞遺伝子の発現を変化させることによって、細胞の増殖能に変化をきたして癌化へ到るのではないかというものである。

このHBx遺伝子トランスジェニックマウスには非常に高頻度に肝発癌が発生し、HBx遺伝子と肝発癌との密接な関連を示していた。このようにウイルス(の1遺伝子)と肝発癌との直接的な関係を示したのは今回の我々のデータが初めてである。HBVそのものは肝発癌には直接的には関与せず、HBVは肝炎を引き起こすことにより間接的に肝発癌に関わっているとするこれまでの説(4、5)、

すなわち、肝炎によって肝細胞壊死と肝細胞再生を繰り返すうちに宿主の細胞遺伝子に変異肝細胞をきたし、その積み重ねで細胞は癌化していくという考え方は異なった機序を示すものである。慢性肝疾患での肝癌発生率の違い、すなわちHBV関連慢性肝疾患では肝癌の発生率が高いこと(6)、また我々の日頃の患者の観察において、B型慢性肝疾患ではC型慢性肝疾患に比べ若い人および早い組織段階(すなわち肝硬変まで到達なくても、慢性肝炎の段階でも肝癌が起こり得る)での肝癌発生が見られることなどは、HBウイルスそのものの肝発癌への直接的な作用の反映と考えるとうまく説明される。筆者は仮説として以下のような考えを持っている。すなわち、肝発癌においては原因のいかんを問わないcommon pathwayが存在し、それはearly step(s)とlate step(s)から成り立っている。B型肝炎の場合にはHBx蛋白による作用がspecific pathwayとして存在し、common pathwayのうちのearly stepをバイパスさせるように働くのではないか。このように考えるとB型肝炎関連肝癌の臨床的特徴が説明されるように思える。

ヒトにおける肝発癌には種々のファクターが関わっており、HBx遺伝子だけで説明できるものではない。トランスジェニックマウスというのは、あくまでもHBx遺伝子の働きを知るためのひとつのシステムに過ぎないのである。しかしまたトランスジェニックマウスは、マウスを丸ごと使用するということが明らかのように、培養細胞の系に比べ、遺伝子発現の結果と身体全体の細胞およびネットワークとの相互作用を知ることができる。すなわち、発癌モデルとしては細胞のトランスフォーメーション(形質転換)は培養細胞のシステムで十分評価するが、腫瘍の形成において重要な宿主免疫系からの逸脱、血管の新生、増殖因子との関わりなどはトランスジェニックマウスを用いて初めて評価することが可能である。HBx遺伝子が本当にヒトの肝発癌に関わっているか否かはこれから明らかにしてゆかななくてはならない。第三部で述べたごとく、HBx遺伝子は肝発癌の初期に関わっている可能性が強い。したがって、培養細胞やトランスジェニックマウスのシステムとは異なり、ヒトで肝癌が完成した後はHBx遺伝子の持続的な発現は必要ない可能性があることに注意すべきである。

ヒトでの肝発癌をもたらす因子としては、他にもアフラトキシン、アルコールなど種々のものが考えられる。ウイルス肝炎としてはB型肝炎におけるHBx遺伝子以外にも、やはり肝炎での肝細胞壊死→再生による細胞回転の促進は大きな

ファクターであろう。ただ、この細胞回転の促進は、より発癌のプロモーションに関わっている可能性が強いと思われる。この観点からB型ウイルス肝炎を治療することは、HBx蛋白を減らし発癌のイニシエーションを抑えることと、プロモーションを抑えることとの両方に働く可能性がある。

最後に、我々が肝発癌のトランスジェニックマウスモデルの作製に成功した要因を考察してみたいと思う。第三部のDISCUSSIONで述べたように、これまでにHBVの一部あるいは全部をもついくつかのトランスジェニックマウスが作製されている。なかには我々と同じようにHBx遺伝子だけを発現させようとしたトランスジェニックマウスもある(7)。かれらのマウスで肝癌ができなかったのは、HBx遺伝子発現が生後4週目でほぼ消失したからと思われる。またHBVの全ゲノムを導入したトランスジェニックマウス(8)では、HBx遺伝子の発現は肝臓において検出されていない。HBx遺伝子による肝癌の発生のためには十分な量のHBx遺伝子産物の比較的長期にわたる発現が必要と考えられる。この意味で、我々のマウスでの成功はコンストラクトの選択にあったと考えられる。

筆者はHBx遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製するにあたってのstrategyとして2つの点に留意した。すなわち(a)導入遺伝子としてHBx蛋白のみをコードするコンストラクトを用いること。(b)ウイルス本来の制御領域を用いることが望ましいが、同時に高い発現を得られるものであること。これらを満たすものとして、HBVゲノムをDraI-BglIIで切断した1.15kbの断片を筆者は選択した。この断片はオープンリーディングフレームとしてHBx遺伝子だけを含み、HBx遺伝子自身のプロモーター、HBV自身のエンハンサー、ポリA付加シグナルを持ち、しかも他の遺伝子由来の断片を全く含んでいない。この選択の根拠は、筆者がこのトランスジェニックマウスを作製する以前に国立予防衛生研究所で行っていたHBx遺伝子関連のプロジェクトにあった。ベクターpdBPV-MMTneoを用いてHBx遺伝子を発現するcell lineを確立しようとしたものであるが、その中で筆者はHBx遺伝子発現用のDraI-BglII断片、HBx遺伝子の上流にHBs遺伝子の全体を含むBglII-BglII断片の二つをそれぞれ独立に発現させた。DraI-BglIIではHBx遺伝子の高レベルの発現(0.8kb)が見られるのに比し、BglII-BglIIではHBs遺伝子の発現(2.1kb)は良好であるが、HBx遺伝子の発現はほとんど認められなかった。すなわちHBx遺伝子とエンハンサー

の上流にHBs遺伝子(とそのプロモーター)が存在することによってHBx遺伝子の発現は抑制されるのである。そしてこのBglII-BglII断片はChisari(4)らが彼らのトランスジェニックマウスに導入したものとほぼ同一であり、彼らのマウスでHBx遺伝子がほとんど発現されなかったこともこれで理解される。

HBx遺伝子がトランスジェニックマウスの系で肝癌を誘発すること、発癌過程で肝細胞のDNA合成亢進に関わっていることなどが、本研究で明らかとなったが、ではHBx遺伝子はどのような細胞遺伝子と相互作用をするのか、そしてヒトでの実際の働きとその証拠は何かなどまだ明らかにすべきことは多い。

結論

- 1) B型肝炎ウイルスのHBx遺伝子を真核細胞で発現させ、この発現産物を用いてHBVキャリアの血清中に抗HBx抗体を検出した。HBx遺伝子産物がヒトへの感染時に蛋白として発現されることが明らかとなった。
- 2) トランス活性化作用をもつHBx遺伝子をそれ自身の制御領域のもとにCD-1マウスに導入してトランスジェニックマウスを作製した。肝などの臓器でHBx遺伝子の発現が認められた。
- 3) 独立した2系統のトランスジェニックマウスで、HBx遺伝子の発現の結果、2年間にオスで90%、メスで60%、合計して80%の高率に肝腫瘍(肝アデノーマ、肝癌)が発生した。特記すべきことに、腫瘍発生に先行する肝細胞壊死像は認められず、また血清GPT値の上昇も見られなかった。
- 4) 肝癌は、HBx遺伝子をよく発現し空胞を形成している肝細胞群の中から発生していた。そして肝腫瘍中には比較的高度のHBx遺伝子の発現が認められた。
- 5) これらの事実は、HBx遺伝子が生体内において癌遺伝子類似の作用を果たして、先行する肝炎の存在なしで肝癌を起こすことを示し、B型肝炎ウイルス自

身が肝発癌に関与している可能性を初めて示していた。

6) トランスジェニックマウス肝の経時的検討では、肝細胞でのDNA合成が高まり、他の動物モデルにおける前癌状態と同様のDNA ploidy (aneuploidy) を示していた。ここへさらに二次的な変化が加わって生体内での肝発癌が達成されると推測された。

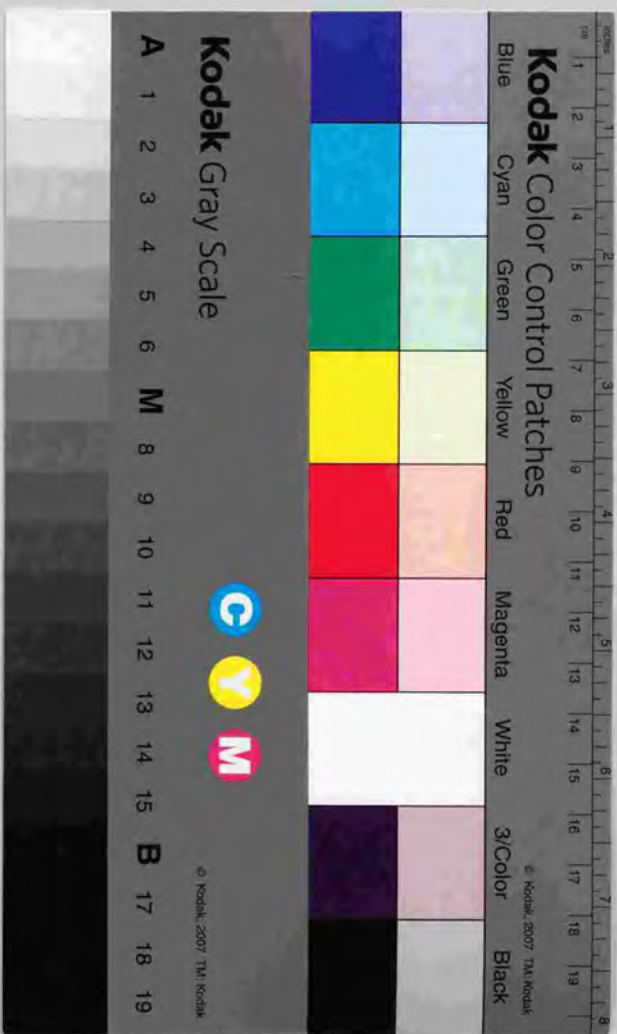
文献

- 1) Tiollais, P., Pourcel, C., & Dejean, A. The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495.
- 2) Wu, J. Y., Zhou, Z. -Y., et al. The hepatitis B virus -encoded transcriptional Trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* 63:687-695, 1990.
- 3) Feitelson, M. A. & Clayton, M. M. X antigen polypeptides in the sera of hepatitis B virus-infected patients. *Virology* 177:367-371, 1990.
- 4) Chisari, F. V., Klopchin, K. et al.: Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59:1145-1156, 1989
- 5) Robinson, W. S.: Hepadna viruses and hepatocellular carcinoma. *Cancer-Detect-Prev* 14:245-252, 1989
- 6) Johnson, P. J., Krasner, N., et al. Hepatocellular carcinoma in Great Britain: influence of age, sex, HBsAg status, and aetiology of underlying cirrhosis. *Gut* 19:1022-1026, 1978.
- 7) Lee, T.-H., Finegold, M. J., Shen, R.-F., DeMayo, J. L., Woo, S. L. C., & Butel, J. S. Hepatitis B virus transactivator x protein is not tumorigenic in transgenic mice. *J Virol* 64:5939-5947, 1990.
- 8) Araki, K., Miyazaki, J., et al. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:207-211, 1989.

謝辞

本研究を遂行する上で貴重なご助言、ご指導をいただいた東京大学第一内科
黒川清教授、国立予防衛生研究所 宮村達男部長、聖マリアンナ医大 飯野四郎
教授に深謝致します。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM, Kodak