

特集 ( 多因子性疾患の遺  
伝解析と臨床応用 )

## 原発性肝癌における遺伝子およびゲノム DNA 変化の解析

永井 尚生 江見 充

日本医科大学老人病研究所分子生物学部門

Genome and cDNA analysis of human hepatocellular carcinoma

Hisaki Nagai and Mitsuru Emi

Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology,

Nippon Medical School

近年、欧米では政府あるいは民間主導でゲノムプロジェクトの整備、発展がはかられ、大量解析が可能となりつつあるが、日本発の独創的、有効かつ強力な方法論を開発し応用して行くプロジェクトが、ゲノム研究や医学などの分野を問わず必要であると思われる。われわれは肝炎ウイルスのヒトゲノムへの関与を検索し、肝発癌との関連性について解明したく研究を行っている。

### 1. 肝炎ウイルス感染と宿主のゲノム変化

近年、分子生物学のめざましい発展に伴い、遺伝病や癌など様々な病因遺伝子が明らかにされるとともに、徐々にその病態が解明されつつある。肝臓病学の分野においても、最も特徴的であり、かつ、臨床的にも最大の問題であろうウイルス感染の慢性化、そしてそれに起因する慢性肝炎、肝硬変、肝癌といった種々の病態などについて多くの基礎的研究がなされている。これら肝臓病学の基礎的柱となる肝炎ウイルス病学について、近年の重要なブレイクスルーがいくつかあげられるが、それらは 1980 年代になって肝癌のゲノムに B 型肝炎ウイルス DNA (HBVDNA) が組み込まれていることが発見されて以来、発癌との関連性について多くの報告がなされてきたこと、1982~3 年にかけて肝癌の細胞培養系、およびそれ以後の HBV の *in vitro* での複製系の樹立の後、これらを使ってシスあるいはトランスに働く HBV の構成成分が見い出され、組み込まれたウイルスの保持する機能部分が宿主細胞に及ぼす変化のいくつかが解明されたことがある。HBV については感染者が非感染者の 100 倍におよぶ肝発癌リスクを有する、という疫学的知見からも、発癌との関連性について重点的に研究がなされてきた。しかしながら、これについての決定的な答えははまだ

見い出されていないのが現状である。ウッドチャック肝癌のゲノム解析においては、約 50% の例で c-myc や N-myc がん遺伝子近傍に WHVDNA (woodchuck hepatitis virus DNA) が組み込まれ、それら遺伝子の活性化が癌化に重要な関連性を有することが明らかになっているが、ヒトにおいてはこのような関係は見い出されていない。がん遺伝子ではないが、近傍に組み込まれた HBVDNA のシス活性化作用により、レチノイン酸レセプターやサイクリン遺伝子など核転写活性や細胞周期に関与する遺伝子の活性化が見られた例もあるが、そもそもこのような、シス活性化効果については、HBVDNA の組み込みがランダムである以上、こうした機構で癌化がおこるのはむしろ例外的であると考えざるを得ない。組み込まれた X や preS/S2 領域の有するトランス活性化によって癌遺伝子を含む多くの遺伝子が活性化される可能性があるが、実際 *in vivo* における発癌過程でどの程度本質的な関与をしているのか。また、癌抑制遺伝子を念頭に置いた肝癌の染色体欠部位の検索では、HBV 感染や組み込みに関連性があることを論ずる報告もあるが、むしろ否定的なものが多い。この様に HBV 感染と肝発癌の間には関連性は強いが、いずれも一定の法則性には欠け、組み込みによる染色体変化など偶然性に基づく変異源としての働きを示唆する所見が少なくない。これらの研究と全く異なるアプローチによる本研究により HBVDNA 組み込みによる新たなゲノム変化が見い出されることを期待する。HCV 感染が肝発癌に関与しているのも事実である。しかしながら、感染者における発癌率は発癌までに平均 30 年近く有するため正確な数字を把握しにくいのが現状であり、HBV 感染者のそれと比べると低く推定されている。また、HCV ゲノムは HBV の様に宿主ゲノムと組み込みという直接的な関与をし

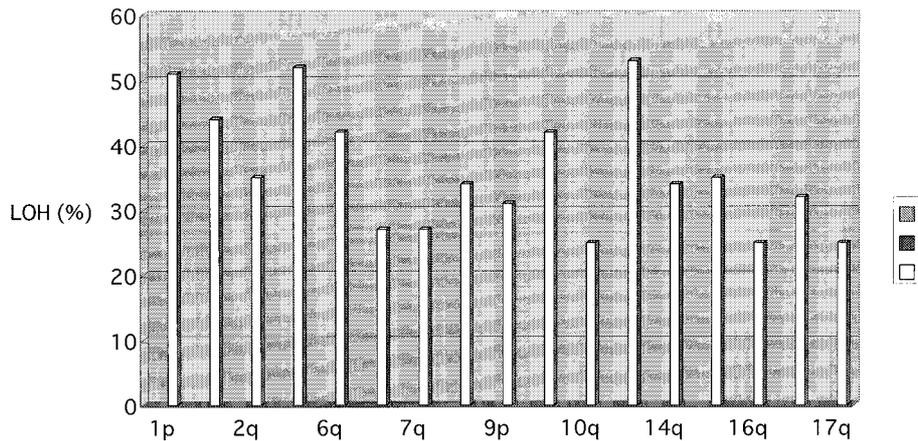


図1 肝癌で高頻度 LOH を示す染色体領域

ている所見はなく、有効な細胞培養系、実験系もないため、現時点では積極的なゲノム変化への関与を示唆する所見は見い出されていない。HBV 感染の慢性化の場合について提唱されているモデルのように、炎症の持続下における細胞壊死、再生の繰り返しによって変異細胞の出現頻度が高まり、そうした変異細胞群の中からさらに癌化細胞が出現してくる、という機序によるのか。HCV 感染者の約 80% と非常に高率に慢性化することが知られているが、この様な、主たる病態といえるウイルスの持続感染についてはいまだ不明な点が多く、また、その多くは、持続感染が成立するそのメカニズムや、抗体を有するもののトランスアミナーゼの変動を認めない無症候性キャリアーの存在など HBV の研究において解決されなかった基本的な問題そのままである。この様にいまだ多くの研究課題を残すものの、ここ数年予防医学的分野においては大きな成果が挙げられつつある。B 型肝炎ウイルスワクチンの接種は確実にキャリアーにおける主たる感染経路である母子垂直感染予防効果を示し、将来的にも通常のワクチン接種と併せて行われるようになった場合、一層キャリアー率を減少させることが可能となるはずである。より多くのキャリアーが存在すると考えられる HCV 感染については、献血者の抗 HCV 抗体のスクリーニングはこのウイルスの主な感染経路である輸血を介する感染を予防、減少させつつある。インターフェロンなど抗ウイルス的治療も近年広く行われるようになったが、原則的にはウイルスの排除、治癒というよりも将来的に肝硬変、肝癌への移行を抑制するためのトランスアミナーゼの安定など病態の悪化の抑制、安定化をはかるという現状である。現状の血液スクリーニングや公衆衛生の向上に加え、将来的には有効なワクチンの開発が必須であり、また HBV 感染者も含め

た既感染者に対する有効な治療指針を確立することにより肝癌の発生率を減少させていくことが現実に可能になって行くであろう。

## 2. 原発性肝癌

肝臓は体内で代謝を担う主たる臓器であるが、肝障害や切除後に示される様に、その再生能力が非常に高いことに加え、肝炎ウイルスによる持続感染が成立するため、宿主に免疫応答が関与して慢性肝炎や肝硬変を引き起こし、多くの癌はこうした素地に発生してくる。肝癌では大腸癌の様ないわゆる腺腫形成を経て発育する例はむしろまれであり、その意味合いにおいても慢性肝炎や肝硬変の前癌病変としての性格が議論されるが、結論には未だ至っていない。われわれは包括的に肝癌の発生機構を解明すべく、各段階的発育状態にある肝癌の様々な遺伝子変化や、さらには前癌段階として慢性肝炎や肝硬変にも注目し、ゲノムや遺伝子の異常をマイクロサテライト DNA マーカーによる染色体欠失の検索を試みた。

1) マイクロサテライト DNA マーカー検索による染色体欠失 (LOH, Loss of heterozygosity) 検索を用いた細胞に生じた微細な変化をとらえる。2) その材料に肝発癌の段階別サンプルとして、慢性肝炎、肝硬変、微小肝癌、結節内結節肝癌を顕微鏡下に病理学的に分離したものをを用いた。これにより微小部位から抽出した DNA を用い、的確にその“ゲノム像”を描出できるため、従来の“病理像”による分類と異なった、ゲノム変化という見地から肝癌を見直すことを試みた。具体的には、組織検体として肝硬変再生結節 4 例、40 結節、肝癌合併慢性肝炎、肝硬変各 10 例、微小肝癌 6 例、結節内結節肝癌 6 例、18 結節を用い、各常染色体の長短腕に分布するマイクロサテライト DNA マーカー約

50 個，既知の癌遺伝子，癌抑制遺伝子領域近傍に局在の知られている遺伝子マーカー 20 個を用いて全染色体上の遺伝的变化を検索した．結節内結節での結果を比較検討し，以前から報告されている第 1 番染色体短腕などの領域に加え，新たに最近報告されている第 6，7，9，14 番染色体などの欠失についてその関与の段階を決定した．また，欠失のみられた領域においてはその両端のマーカーを追加検討し，欠失の進展方向順序についてさらなる検索を行うとともに臨床病理学的知見との相関について検討を行い，段階的肝発癌の分子的機構について総合的に評価した．これにより前癌病

変や微小肝癌などでのいわゆる初期変化から転移に至るまでの発育過程で起こる段階的な変化の把握，結節内結節での相互の変化の比較，解析などによって得られる“ゲノム像”からその発育過程を正常，変異細胞のクローン化，癌などのカテゴリーに分類し，今後，そこから発癌メカニズムの解明や予後の解析も可能となると思われる．

( 受付：1999 年 8 月 3 日 )

( 受理：1999 年 8 月 6 日 )

---