

HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と 肝癌発生に与える影響の解明

松岡俊一¹⁾, 森山光彦¹⁾, 浅井 聡²⁾, 黒田和道³⁾
吉宗一晃⁴⁾, 田村彰教¹⁾

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Shunichi MATSUOKA¹⁾, Mitsuhiko MORIYAMA¹⁾, Satoshi ASAI²⁾, Kazumichi KURODA³⁾,
Hideki KOHNO⁴⁾, Akinori TAMAURA¹⁾

要旨

肝癌 (HCC) における HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式について検索した。本年度の研究には、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法を用いて、HBs 抗原陽性 (B 型) および HCV 抗体陽性 (C 型) および非 B 非 C 型 (NBNC 型) HCC 例の末梢血リンパ球より、HBV ゲノムのヒトゲノムへの組み込みの有無と、組み込み様式の特徴について検索した。対象は、2011 年より肝細胞癌の診断にて当院にて治療を行い検体使用の許諾を得た、B 型 4 例および C 型 18 例、NBNC 型 16 例の計 38 例である。これらの症例の末梢血リンパ球を用いて、前年度に作製した probe を用いて FISH 法を行い、この結果、子 B 型では 4 例全例に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を認め、C 型では 18 例中 14 例に、NBNC 型では 16 例全例に蛍光を認めた。比較的 hot spot に近い部位を認めたが、ideogram の解析からは、HBV ゲノムの同一の組み込み部位は認められず、HBV ゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。一方 C 型および NBNC 型においても、HBs 抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数の HBV genome のヒト染色体への組み込みが認められたが、同様に同一の特定部位への HBV ゲノムの組み込みは確定されなかった。以上より、FISH 法を用いて B 型 HCC 例の末梢血リンパ球より、HBV ゲノムのヒト染色体上への組み込みを検出した。一方 C 型および NBNC 型 HCC においても、HBV ゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C 型慢性肝炎・肝硬変からの HCC 発生および原因不明の HCC 例には、HBV が関与していることも考慮すべきであることが示唆された。

1. はじめに

わが国における原発性肝細胞癌 (HCC) 死亡は年間 3 万人を超え、治療法の進歩により 5 年生存率は向上しているが、高い再発率を背景としてどのような治療法を選択しても疾患死亡率は 80% を超えている。したがって肝癌発生予知・抑止は重要な課題である。現在までのところ、肝癌発生に関与している遺伝子や SNPs は多数報告されているが、いずれも確定的とされる原因遺伝子や SNP は今のところ確認されていない。我々は、以前より HBV 感染が肝癌発生に重要な影響を与えていることを報告してきた¹⁾。肝癌における HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在ま

でなされてきた。最近では Alu-PCR 法を用いた C 型 HCC 例における HBV ゲノムの組み込みの検出や、B 型 HCC 例の癌部および非癌部組織より、次世代高速シーケンサーを用いた全ヒトゲノム解析より HBV ゲノムの組み込み様式の報告が為されてきている²⁵⁾。しかしながら、今のところ特徴的な HBV ゲノムの組み込み様式は確定されていない。HBx 部位の組み込み頻度が高く、またヒトゲノムでは teromerase 領域への組み込み頻度が比較的高いことなどが報告されているにすぎない。

一般的には、現状では、HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は、ランダムであり特定の部位への組み込みは乏しいとされている。

1) 内科学系消化器肝臓内科学分野

2) 生体機能医学系薬理学分野

3) 病態病理学系微生物学分野

4) 生産工学部応用分子化学科

松岡俊一: matsuoaka.shunichi@nihon-u.ac.jp

一方HCV関連肝癌においては、その血中よりHBV DNAが検出されるOccult HBV感染が危険因子であることが既に報告されている。我々は既に、このOccult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している⁶⁾。またmurakami²⁾らも、肝がん例の組織よりAlu-PCR法を用いて、HBVゲノムの組み込みが認められることを報告している。

本研究では、申請者がこれまで長年にわたり蓄積してきた肝癌発生に関する研究、HCVとHBVの感染研究の成果に立脚し、肝癌発生に関与しているHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込み様式とその部位をFISH法を用いて検討し、新しい肝癌発生の予知・予防の方法論を確立して、臨床に応用可能な基盤的知見を得ることを本研究の目的とする。

本研究により、肝癌におけるHBV遺伝子の組み込み部位を確定し、簡便な検出法を開発することに成功すれば、肝癌発生にHBV感染が関与していることを証明することが可能である。現状では肝癌発生の原因は確定されておらず、HBV感染が背景因子にかかわらず肝癌発生の原因のひとつとして確認することができればユニバーサルワクチネーションをより強力に推進することが可能となり、今後の本邦における肝癌発生の予防・抑止に果たす効果は絶大なものがある。

2. 対象および方法

本研究は、平成24年度より25年度までの2ヵ年計画である。平成24年度には、(1) まず慢性肝炎および肝硬変例の血中より高頻度にHBV DNAを検出し得る primer sets を用いたPCR法にてHBV DNAを検出して、Occult HBV症例の頻度を検索した。さらに、(2) この結果を基にして、Occult HBV関連肝癌症例の血中ないしは肝組織より同様にOccult HBV症例の頻度を検索した。(3) このうちHBV DNA検出例について、3.2kbの全塩基配列を増幅できるPCR法を開発してその全塩基配列を決定しえた。(4) 手術切除した肝細胞癌症例の肝組織より、HBV DNAとcccDNAをPCR法にて検出しHBVの関与を検索した。ここまでは平成24年度成果として、日本大学紀要に、「肝癌におけるB型肝炎ウイルス遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式の解明」として報告した。

本年度については、以下のごとく研究を中心におこなった。

- (1) HBV関連肝癌発生例のヒト遺伝子へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、PCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討する。
- (2) この結果に立脚して次にC型HCCにおけるHBVゲノムのヒト遺伝子への組み込みの有無を、B型HCCと同様にFISH法にて検出する。
- (3) NBNC型HCCにおけるHBVゲノムのヒト遺伝子への組み込みの有無を、同様にFISH法にて検出する。
- (4) 次世代高速シーケンサーを用いたヒトゲノム解析

2症例について患者の同意を得て、末梢血リンパ球より次世代高速シーケンサーを用いて、ヒト全ゲノムの解析を行った。試薬類にかかるコストと委託費用などを勘案して、paired endで10 foldのシーケンスを施行した。次世代高速シーケンサー (Illumine Hisex2000) のランの委託は、実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。

研究対象と方法を以下に示す。

- 1) B型、C型およびNBNC型HCC例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出

B型、C型およびNBNC型HCC例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、患者末梢血リンパ球を用いたFISH法にて検出した。

対象は、2011年1月より当院消化器外科および消化器内科にて血管造影を施行してHCCと診断された症例である。このうちFISH法施行の同意が得られたB型HCC4例、C型HCC18例、NBNC型HCC16例である。

これらの症例より末梢血10mlをヘパリン添加採血した。その後直ちにリンパ球を分離した。

- B型HCC4例については10mlをFISH法に使用した。

残りの血液5mlよりDNAを抽出して、HBV全長の3.2kbpを増幅させるPCR法を行った。この結果、3例に3.2kbpの増幅が得られた。この3例のPCR産物を精製してFISH法のprobeとして使

用した。さらに精製したprobeを用いて試験的にFISHを行い、最もバックグラウンドの少なかった38Tをprobeとして用いて以下のFISH実験に使用した。

尚、分子系統樹解析では、38T株はHBV genotype Cに分類された。

また検索した細胞数は各症例ともに20細胞である。

1. HBVの組み込みの検出

- 1) 採取したヘパリン加全血10mlを用いて行う。
- 2) 血球を分離してプレパラート上に薄層に添付する。
- 3) このプレパラートを用いて、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法により、染色体上へのHBVの組み込みの検出を行う。
- 4) B型肝炎患者さんの血清よりPCRにてHBV全長を増幅する。
- 5) このPCR産物よりprobeを作製する。DNA濃度を $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整して $20\mu\text{g}$ をprobeとして使用する。

2. 染色体解析用固定細胞作製

<試薬>

コルセミド溶液：ナカライ09356-74など、低張液：0.075M KClなど、固定液：メタノール：酢酸=3：1、用時調製

<染色体標本作成>

- 1) 浮遊細胞の場合10ml程度の培地で、付着細胞の場合10cmのDishで継代後しばらく培養する。
- 2) 対数増殖期の細胞に $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにコルセミドを添加し、適当時間培養を継続する。
- 3) コルセミド処理をした細胞浮遊液を15mlチューブに回収し、1200rpmで5分間遠心して細胞をみつめ、上清を捨てる。コルセミド処理時間に影響するので迅速に行う。
- 4) 細胞にパスツールピペットで少量の低張液を加え静かにピペティングして細胞を分散させる。細胞が分散したらさらに1.5mlまで低張液を加え、ピペティングにより再度細胞を分散させる。室温に20分間放置して低張処理をおこなう。

5) 総量が10ml程度になるようにゆっくりと固定液を加える。

6) 静かに全体をパスツールピペットで攪拌し細胞を固定する。

7) 1200rpmで5分間遠心し上清をすて、新たな固定液を数滴加え、ピペティングにより細胞を分散させる。さらに10ml程度の固定液を加え全体を攪拌する。この作業をさらに2回行い完全に固定する。

8) 固定が完了したらチューブを固定液で満たし、 -20°C で保存。

3. 固定細胞FISHプロトコール

<試薬>

FISHプローブ、ホルムアミド、エタノール

<細胞の変性処理>

1. 細胞標本を 70°C ホットプレート上で2時間ハードニング
2. 70°C の70%ホルムアミド/2×SSC中2分間変性処理
3. 氷冷した70%エタノールに5分浸漬
4. 別の70%エタノールで洗った後100%エタノールに5分浸漬
5. 風乾もしくは 37°C インキュベーターで乾燥

<プローブの変性処理>

6. 1スライドあたり $10\mu\text{l}$ のプローブをチューブに入れ 75°C で10分変性
7. 5分以上氷冷

<ハイブリダイゼーション>

8. 細胞標本にプローブをアプライしカバーガラスをかける
9. 37°C で必要時間ハイブリダイズ

<洗浄・検出(ダイレクト蛍光標識プローブの場合)>

10. 2×SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずす
11. 37°C の50%ホルムアミド/2×SSC中20分浸漬
12. 1×SSCですすいだ後1×SSC中15分浸漬

<洗浄・検出(ハプテン標識プローブの場合)>

- i. 1% BSA / 4×SSC溶液で希釈した抗体を $100\mu\text{l}$ アプライしパラフィルムでカバーする
- ii. 37°C で1時間反応

iii.0.1% Nonidet P-40 (0.05% Tween20) / 4×
SSC で 10分 × 2回, 4×SSC で 10分 × 1回
洗浄

13. DAPI 染色後マウント
14. 蛍光観察

3. 結果

(1) probe に使用した 38T の全塩基配列を Fig.1 に提示する。

(2) HBs 抗原陽性肝細胞癌例のヒト染色体への HBV 遺伝子の組み込みの検出

1) Fig. 2 に case 1 の 1細胞あたりの Ideogram と 12細胞分の解析結果の Karyogram を提示する。染色体上に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する (矢印)。この結果, B 型肝細胞癌例 4例全例に, ヒトゲノムへの HBV ゲノムの組み込みを確認した。

Fig. 3 に 4 症例各々 12細胞分の karyogram のまとめを提示する。同一染色体上のほぼ同一部位に HBV ゲノムの組み込みを認めた。しかしながら大多数は 4 細胞以下であり, ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず, ラ

ンダムに HBV ゲノムの組み込みがあることが確認された。

これらの検索結果をまとめると, HBV ゲノムはヒト染色体へ多数の組み込みが認められた。しかしながら, 特定の部位への組み込みの集積, いわゆる hot spot は認められず, HBV ゲノムの組み込みはランダムであった。現在さらに詳細なる検索・検討中である。現在までに得られた結果をまとめると, 1q32 (13), 2q36 (10), 3q24 (11), 6q22 (10), 9p21 (11), 14q31 (10), 15q21 (11) などに比較的多数の HBV ゲノムの組み込みが認められている。

(3) HCV 抗体陽性 HCC 例のリンパ球からのヒト染色体上の HBV ゲノムの組み込みの検出

Fig. 4 に case 5 の 1細胞あたりの Ideogram と 12細胞分の解析結果の Karyogram を提示する。染色体上に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する (矢印)。この結果, C 型肝細胞癌例 10例全例に, ヒトゲノムへの HBV ゲノムの組み込みを確認した。

38T-Full genome sequence

```
CTCCACCACGTTCCACCAAACTCTTCAAGATCCCAGAGTCAGGGCTCTGTACCTTCTGCTGGTGGCTCCAGTTCGGAAACAGTAAGCCCTGCTCAGAATACTGTC
CTCAGCCATATCGTCAATCTTATCGACGACTGGGGACCCCTGCGCCGAACATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTT
TTTCTCGTTGACAAAACTCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAGTTTTCTAGGGGGAACACCCGTTGTCGTGGCCAAAAATTCGCA
GTCCAAAATCTCCAGTCACTCACCACCTGTTGTCTCCAAATTTGTCCTGGTATCGCTGGATGTGCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCT
ATGCCATCTTCTTGTGGTCTTCTGGACTATCAAGGATGTGGCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATCAACCACCCAGCAGGGACCATGCAAGCCCTG
CACGACTCCTGCTCAAGGAACTCTTCCGCTCCATCATGTTGTTGTACAAAACCTAGGGACGGAACTGCACCTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTTGGC
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTGAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGCTGGCTTTCAGT
TATATGGATGATGGTATTGGGGGCAAGTCTGTACAACACCTTGAGACCTTTATGCCGCTGTTACCCATTTTCTGTGCTTTGGGTATACATTTAAACCCCT
CACAAAACGAAAAGATGGGATATTCCTTAACTTCAATGGGATATGTAATTGGGAGTGGGGCACATGGCCACAGGAACATATTGCCAAAAAATCAAACTATGT
TTTAGAAAACCTCTGTAACAGGCTATTGATTGAAAAGTATGTCAACGAATGTGGGTCTTTGGGGTTTGTGCCCTTTTACGCAATGTGGATATCCTGCT
TTAAAGCCATTATATGATGTATACAGGCAAAACAGGCTTTTACTTTTCCGCAACTTAAAGCCTTTCTACGTCACAGATATCTGAACCTTTACCCCGTTGCT
CGGCAACGGCTGGTCTGTGCAAGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACTTTGTGCTCCTCTG
CCGATCCATCTCGGAACTCTAGCCGCTGTTTTGCTCGCAGCAGGCTGGAGCGAACTCATCGGACTGACAATTTCTGTGCTCTCCCGCAAAATATACA
TGGTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCAATCGGATCCTGCGCGGACGCTCCTTTGTTTACGTCGCTGCGGCTGAATCCGCGGAGCAGCCCTCCCGGGG
CGTTTGGGCTCTACCGCCGCTTCTCCGCTGCGGATCCGACCGACCACGGGGGCGACCTCTCTTTACGGGCTCTCCCGCTGTGCTTCTCATCTGCCGGG
CGTGTGCACCTTCGCTTCACTCTGCACGTTGCATGGAAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGA
TGCAACGACCGACTTGAAGCTACTTCAAGACTGTGTGTTACTGAGTGGGAGGAGCTGGGGAGGAGACGAGGTTAAAGGCTTTTGTACTAGGAGGCTGTA
GGCATAAATGGTCTGTTCAACGACCTTGAACCTTTTCACTCTGCATAGTCATCTTGTTCATGCTCTACTGTTCAAGCCCTCAAGCTGTGCTTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATGACCCCTATAAAGAAATTTGGAGCTTCTATAGAGTACTCTCTTTTTGCTACTGACTTCTATCCGTCGTTGCGAGACCTCTAGA
TACCGCCCTGCACTGTATCGGAACTTGAATCCAATGAACATTTGCTCACCTCACCTACACATACAGCAATCAGGCAAGCTATTGTGCTGGGGGAAAGTAATGAC
TCTAGCTTCTGGTGGTGGAAATTTACAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCGATATTGTTAACACTAACATGGGCTTAAAGATCAGGCAATATTGTG
GTTTCAATTTCTGCTTACTTTTGAAGAGAAGTTGTTCTTGAATTTTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTGCACTCTCCTGCTACAGACCACCAATGCG
CCCTATCTTTCAACACTTCCGAACTACTGTTGTTAGACGACGAGGACGCTCCCTAGAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTTCAATCACCAGG
TCGACAGATCTCAATCTCGGGATCCCAATGTTAGTATCCCTGGACTCATAAGTGGGAACTTTACGGGCTCTATTCTCTACAGTACCTGTCTTCAATC
CTGAATGGCAAACTCCTCTTTTCCAGACATTTCAATTTGAGGAGGATATTGTTGATAGATGTAAGCAATTTGTTGGGACCACTTACAGTAAATGAACACAGGAGAC
TAAATTAATGCTGCTAGATTTATCCTAAGGTTACCAAAATTTTACCCCTAGATAAAGGATCAAACTTATTATCCAGACATGTAGTTAGTACTTACT
TCCAGACAAGACATTTATTTGCAATCTTTTGAAGCGGGGATCTTATATAAAGAGAGTCAACACAGAGCGGCTCATTCTGGGTTACCATATTTCTGGGAAC
AAGATCTACAGCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGAAAAGCATGGGACAAAATCTTCTGTCCCAATCCCAAGGATCTTCCCGATCATCAGTTGGAC
CCTGCCCTCAAAGCCAACTCAGAACTCCAGATTTGGGACCTCAACCCACACAAAGACAACCTGGCCGAGCCGACAAAGGTTGGGAGTGGGAGCATTTGGGCGAGGG
TTCAACCCCTCCCATGGGGACTGTTGGGTTGGAGCCCTCAGACTCAGGGCATACTTACATCTGTGCCAGACGCCCTCCTCCTGCTCCACCAATCGGCAGTCA
GGAAGGCACGCAACTCCCTATCTCCACCTCTAAGGACACTCATCTCAGGCCATGCAGTGGAA
```

Fig. 1

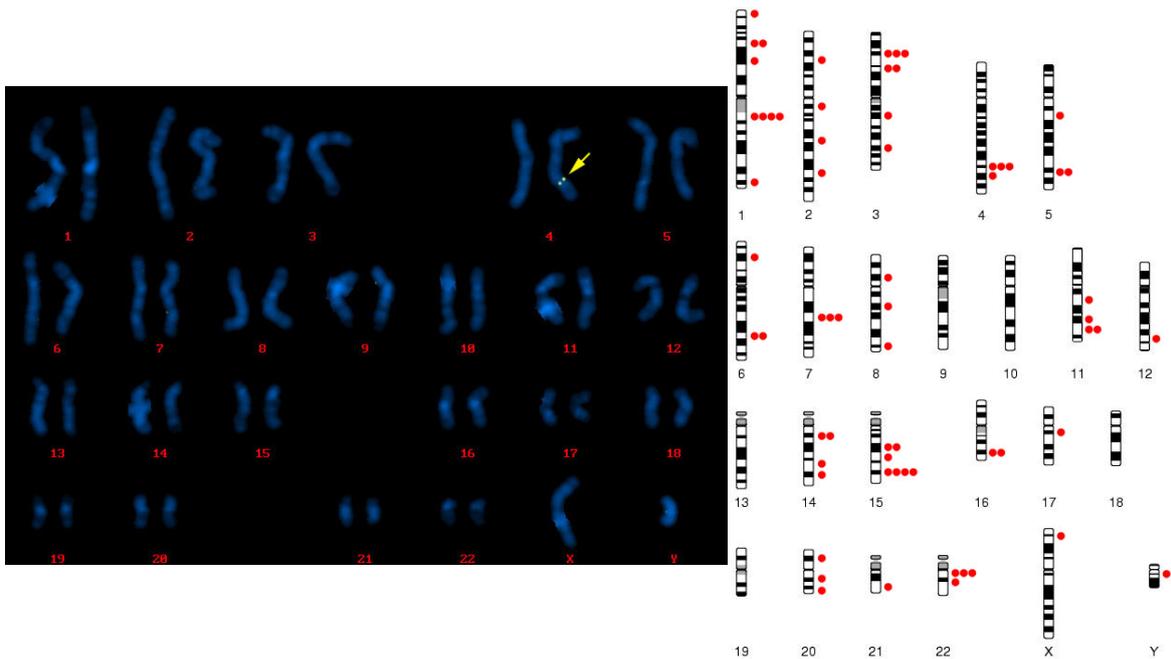


Fig. 2

ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが確認された。

現在までに得られた結果をまとめると、HBc抗体陰性例では、1p35 (6), 1q22 (5), 1q41 (5), 1q42 (4), 2p22 (4), 2p22 (5), 2q24 (4), 2q32 (4), 2q36 (6), 3p21 (8), 3p14 (4), 3p12 (4), 3p24 (4), 4q28 (4), 5q13 (5), 5q23 (4), 5q31 (5), 5q35 (5), 6p21.3 (6), 7p15 (6), 7q22 (4), 7q31 (6), 8q24.2 (5), 9q22 (5), 9q31 (4), 10q22 (4), 10q25 (5), 11q13 (4), 13q14 (5), 13q21 (7), 14q21 (5), 14q24 (4), 14q31 (5), 15q21 (4), 15q22 (4), 15q24 (5), 15q25 (6), 16q21 (4), 17q21 (4), 18q21 (5), 19q13.2 (4), 21q21 (4), 22q12 (4), などに比較的多数のHBVゲノムの組み込みを認めた。

HBc抗体陽性例では、1p31 (4), 1q31 (5), 3p21 (4), 3q13.3 (4), 3q24 (5), 3q26.1 (4), 5q31 (4), 6p21.1 (4), 6q22 (6), 6q23 (4), 9q22 (4), 10q24 (4), 13q21 (4), 14q23 (4), 14q31 (4), 18q21 (7), などにHBVゲノムの組み込みを認めたが、その頻度はHBc抗体陰性例に比較して少ない傾向が認められた。

しかしながらHCV抗体陽性例でも同様に、大多数は4細胞以下であり、ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、ランダム

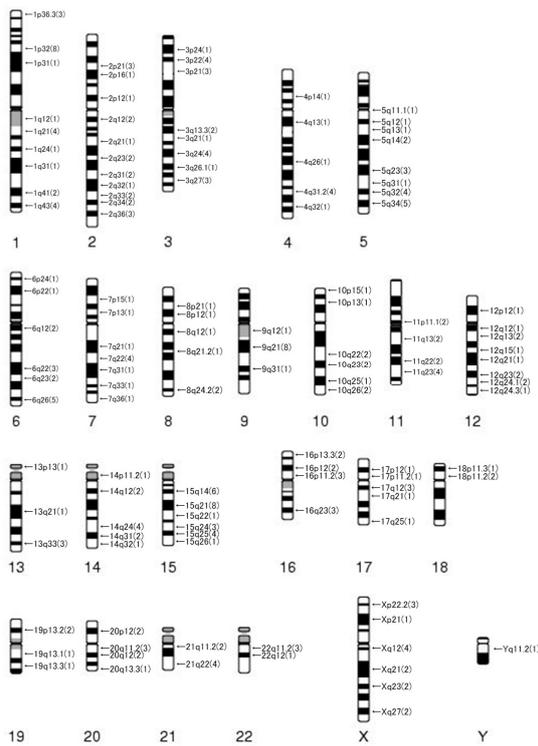


Fig. 3

Fig. 5に、HBc抗体陰性の10症例、各々12細胞分のkaryogramのまとめを同様に提示する。同一染色体上のほぼ同一部位にHBVゲノムの組み込みを認めた。しかしながらHCV抗体陽性例でも同様に、大多数は4細胞以下であり、

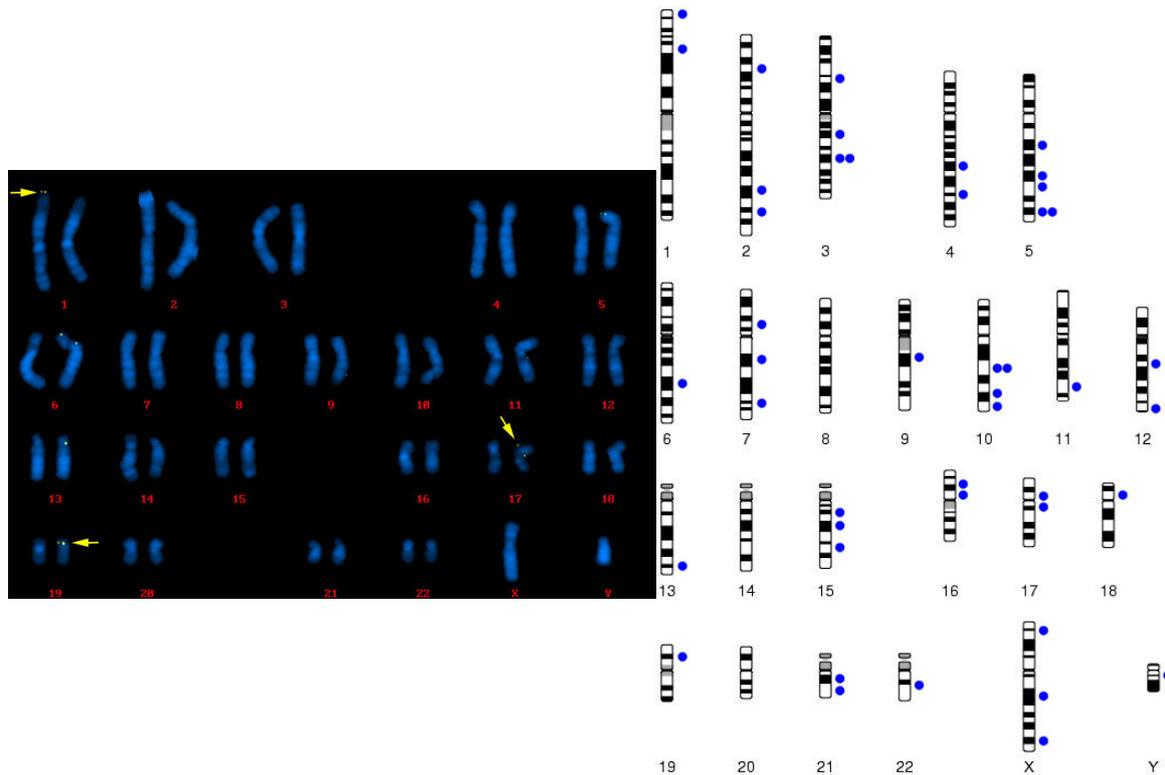


Fig. 4

(4) NBNC 型 HCC 例のリンパ球からのヒト染色体上の HBV ゲノムの組み込みの検出

Fig. 6 に case 5 の case 5 の 1 細胞あたりの Ideogram と 12 細胞分の解析結果の Karyogram を提示する。染色体上に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する (矢印)。

Fig. 7 に HBc 抗体陰性の 10 症例、各々 12 細胞分の karyogram のまとめを同様に提示する。同一染色体上のほぼ同一部位に、HBV ゲノムの組み込みを認めた。しかしながら HCV 抗体陽性例でも同様に、大多数は 4 細胞以下であり、ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、ランダムに HBV ゲノムの組み込みがあることが確認された。

現在までに得られた結果をまとめると、HBc 抗体陰性例では、1p35 (6)、1q22 (4)、1q31 (4)、1q41 (11)、1q42 (6)、2q32 (5)、2q34 (5)、3p21 (8)、3q24 (6)、3q26.1 (4)、3q28 (6)、5q13 (7)、5q31 (5)、5q32 (4)、6q24 (5)、7p21 (5)、7q11.2 (4)、7q21 (4)、7q22 (5)、7q33 (4)、8p22 (5)、8q23 (4)、9q22 (4)、9q31 (4)、9q33 (5)、10p14 (4)、10q25 (8)、11p14 (4)、12q13

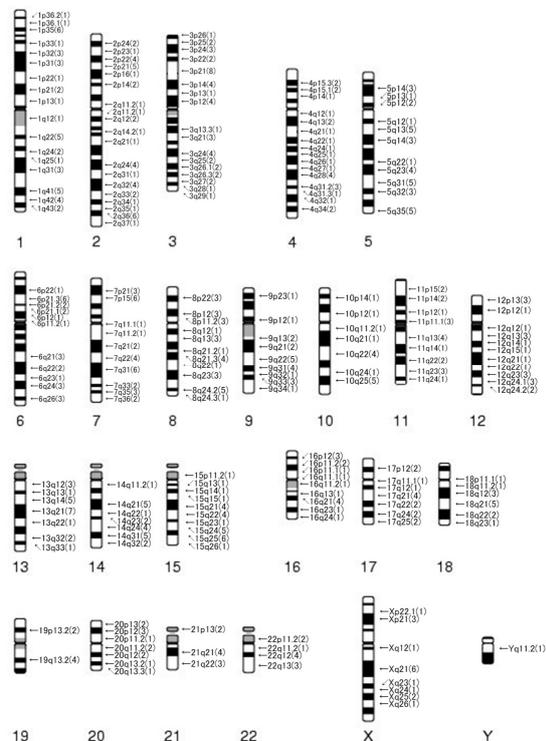


Fig. 5

に HBV ゲノムの組み込みがあることが確認された。

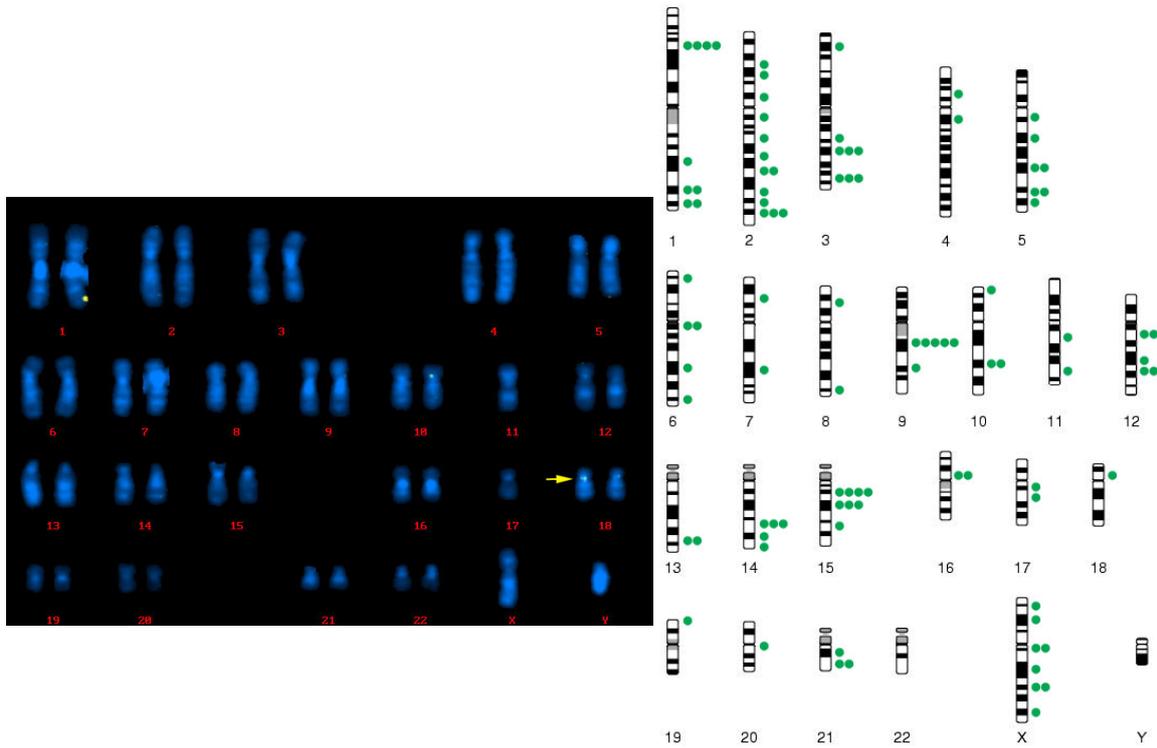


Fig. 6

(11), 20q11.2 (4), 20q13.2 (4), 21q21 (4), 22q12 (5), などにHBVゲノムの組み込みを認めた。

HBc抗体陽性例では、6q24 (4), 11q13 (4), などにHBVゲノムの組み込みを認めた。しかしながらC型と同様に、組み込み頻度はHBc抗体陰性例に比較して明らかに少なく認められた。

(5)次世代高速シーケンサーを用いたヒトゲノム解析

次世代高速シーケンサー (Illumine Hisex 2000) のランの委託は、実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。このdataを感染症ゲノム実験室に設置してある高性能ワークステーションと解析ソフトウェアを用いて、HBVゲノムの組み込み部位の同定を行った。しかしながら、現在までの検索では、HBVゲノムの組み込み部位は認められていない。考察すると、10 foldのrunでは欠失が多く、100 fold以上に読み込みを増加する必要があると思われる。可能であれば平成26年度に施行する予定である。

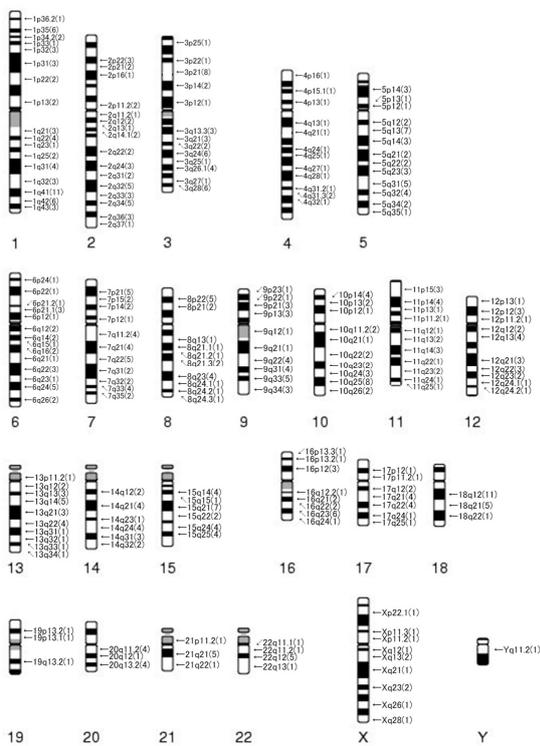


Fig. 7

(4), 13q14 (5), 13q22 (4), 14q21 (4), 14q24 (4), 15q14 (4), 15q21 (7), 15q24 (4), 15q25 (4), 16q23 (6), 17q21 (4), 17q22 (4), 18q12

4. 考 察

Fish法の結果では、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら、ヒト染色体上への特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは今のところ認められていない。

HBs抗原陽性例におけるHBVゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。

一方HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性例およびNBNC型HCC例においても、HBs抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。

今までのところ、HBs抗原陽性例と同一の特定部位へのHBVゲノムの組み込みは確定されていないが、HCV抗体陽性のいわゆるC型HCCにおいても、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C型慢性肝炎・肝硬変からのHCC発生には、HBVが関与していることも考慮すべきであることが示唆された。同様にNBNC型HCCの発生においてもHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込みがHCC発生に関与している可能性が推測された。

現在、組み込み部位と発癌に関与する遺伝子発現の有無など背景因子について、次世代高速シーケンサーを用いて検討中である。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金総合研究（総12-012）による助成を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.
- 2) Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanou T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2005 Aug; 54 (8): 1162-8.
- 3) Wang J, Lin J, Chang Y, et al. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and its implication in hepatocarcinogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30: 425-429.
- 4) Ding D, Lou X, Hua D, Yu W, Li L, Wang J, Gao F, Zhao N, Ren G, Li L, Lin B. Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet*. 2012; 8 (12): e1003065.
- 5) Toh ST, Jin Y, Liu L, Wang J, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Ronaghi M, Toh HC, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis*. 2013 Apr; 34 (4): 787-98.
- 6) Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2009; 51: 352-361.