

氏名(本籍)	まつもと 尚志 (茨城県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	博甲第560号
学位授与年月日	昭和63年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	B型肝炎ウイルス (HBV) キャリアの肝細胞癌組織に組み込まれた HBVDNA とその近傍の細胞 DNA の解析
主査	筑波大学教授 医学博士 滝田 齊
副査	筑波大学教授 医学博士 河野 邦雄
副査	筑波大学教授 医学博士 濱口 秀夫
副査	筑波大学助教授 医学博士 深尾 立
副査	筑波大学助教授 医学博士 森 尚義

論 文 の 要 旨

a. 目的

HBV の持続感染と肝細胞癌 (以下肝癌と略す) との関連性は、疫学および臨床的に認められていたが、近年、遺伝子組み換え技術の進歩により HBVDNA がクローン化され、これを用いた Southern blot 法によって肝癌が遺伝子レベルで解析されるようになった。

その結果、HBV キャリアに発生した肝癌の細胞 DNA には高率に HBVDNA が組み込まれていることが判明し、HBV の肝癌の病因としての可能性が強く推定されている。

そこで著者は、HBV と肝癌との関連性、とくに HBVDNA の肝癌細胞 DNA への組み込みと発癌との病因的関係を究明することを目的として、HBV キャリアの肝癌組織を用い、分子クローニング法により組み込まれた HBVDNA とその近傍の細胞 DNA の構造を解析した。

b. 対象

50歳の女性 HBV キャリアから手術時に採取された肝癌組織および非癌部肝組織を用いた。

c. 方法

肝癌組織 DNA を *Hind* III で消化後、lambda phage vector L47.1 に組み込み、HBVDNA を含むクローンを選び出し、制限酵素地図を作成し、HBVDNA の subgenomic fragment を probe とした Southern blot 法によって解析した。HBVDNA-細胞 DNA 結合部位の塩基配列は dideoxy chain ter-

mination 法で決定した。Unique cellular flanking probe を用いて HBVDNA の組み込み部位近傍の細胞 DNA の構造を正常細胞 DNA と比較した。

d. 結果

1) 肝癌組織 DNA を *Hind* III (HBVDNA には切断部位がない) で消化後, HBVDNA を probe として Southern blot 法を行ったところ, 8 kb と 16kb の 2 本のバンドが認められ, 細胞 DNA の 2 か所に HBVDNA が組み込まれていることが示された。デンストグラムによる測定では, 8 kb のバンドの濃度は 16Kb のそれに比し 7~10 倍強かった。

2) 同一患者の非癌部肝組織には HBVDNA の組み込みは認められなかった。

3) 肝癌組織から 2 種類のクローン, λ YH 8 (8 kb のインサートをもつ) および λ YH16 (16Kb のインサートをもつ) が得られ, λ YH 8 には pre-S(1) から S 遺伝子にかけて約 1.4Kb の HBVDNA が, λ YH16 には S 遺伝子の中部から X 遺伝子にかけての約 1.3Kb の HBVDNA が組み込まれていることが確認された。組み込まれた HBVDNA には組み込みによる再編成は認められなかった。

4) λ YH16 の HBVDNA の組み込み部位近傍の細胞 DNA の構造を正常細胞 DNA のそれと比較したところ, 組み込み部位近傍の細胞 DNA では, 組み込まれた HBVDNA の長さに相当する制限酵素切断部位の移動がみられたが, 欠失や転座などの変異は認められなかった。

5) λ YH 8 の HBVDNA は, 制限酵素地図上, 右側で *Alu family sequences* と結合しており, ヒトのアルブミン遺伝子のイントロンの塩基配列との相同が認められた。

6) λ YH 8 と λ YH16 には, *abl*, *bcr*, *erb-B*, *fes*, *C-fms*, *fos*, *myb*, *C-myc*, *raf*, *Ha-ras*, *Ki-ras*, *sis*, *src* などの既知の癌遺伝子は認められなかった。

以上の結果から, 著者は, 肝癌細胞 DNA に組み込まれた HBVDNA は近傍の細胞 DNA とともに増幅していると結論づけている。また, 他の多くのヒトの腫瘍でプロトオンコジーンが増幅が報告されていることから, この肝癌細胞で増幅している DNA 断片に未知の癌遺伝子が存在し, 発癌に関与している可能性もあると述べている。

審 査 の 要 旨

第二の国民病といわれる HBV 感染症の未解決の問題の中で, 臨床的に最も重要な HBV と肝癌との病因的関連性を分子生物学的手法を用いて遺伝子レベルで検討した研究であり, 周到な準備, 丹念に行われた実験および無理のない結論の導き方がまず評価された。

ついで, HBVDNA が肝癌細胞 DNA に組み込まれる時期, 組み込まれた HBVDNA による発癌機序, 発癌に関与する HBVDNA 領域, これらのことと肝硬変から肝癌への臨床経過および肝癌の家族集積性との関係, 肝癌発症の作業仮説等について審査委員から質疑があり, すべてに対する的確な回答が得られたため, 著者は研究者として自立して研究活動を行うに必要な高度の技能および知識を有するものと評価された。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。