3. B型肝炎ウイルスと肝発がん

小池 克郎

(癌研究会癌研究所・遺伝子研究施設部)

はじめに

わが国における肝癌死亡者数は年々増加しており、癌による全死亡者の約1割が肝癌である。疫学的には肝癌の9割以上がウイルス性といわれ、その約1/4についてはB型肝炎ウイルス (HBV: Hepatitis B virus) の持続感染が発症に密接に関係しているといわれている。HBVがオーストラリア抗原として発見されてから30年になる。HBV持続感染者は非感染者と比べ100倍以上も肝癌発生率が高い¹⁾。また、アルコール性肝炎などと比較してもB型肝炎からの発癌率が高いことから、ただ単にHBVの起こす肝炎が癌化の原因になっているのではなく、HBV自身がなんらかの癌原因因子を持っていることが考えられる。HBV関連の肝癌は通常、ウイルスに感染してから20~50年という長期にわたる慢性肝炎期を経たのち発症するので、HBVの遺伝子産物が単独で癌を起こすのではなく、宿主側にその後の複数の遺伝子変化を誘発する、いわゆる多段階発癌の初期過程に関与すると考えられる。

1. HBVの遺伝子と転写

感染性ウイルス粒子 (Dane粒子) は直径が約42nmの球状構造をしており、S抗原 (HBsAg) からなるエンベロープ、C抗原 (HBcAg) とウイルスDNAなどの複合体であるコアから構成されている。また、固有のDNAポリメラーゼを含んでいる。S抗原はウイルス遺伝子がコードしている複雑な抗原であり、大きく4つのサブタイプ (adw, adr, ayw, ayr) に分けられている。ウイルスDNA (サブタイプadr) は、全長3,215塩基のマイナス鎖とその50%~100%の長さを持つプラス鎖が、245塩基の付着末端を介して結合した結果、一部に一本鎖DNAをもつ特殊な環状構造をとっている (図1)^{2,3)}。両鎖の5'端は11塩基の繰り返し配列であるDR1, DR2の位置に対応し、マイナス鎖の5'端にはタンパク分子が結合している。プラス鎖上には4種類の遺伝子 (S抗原遺伝子, C抗原遺伝子, X遺伝子, P遺伝子) が部分的に重なり合って存在し、4種類のサブタイプ間できわめてよく保存されている。

S抗原遺伝子は、226個のアミノ酸をコードし、P22蛋白質とgp26糖蛋白質の産生に関与している。さらにこの上流には、preS (preS1-preS2) と呼ばれる領域が同じフレームで接続している。preS2は55個のアミノ酸をコードし、preS全体からは163個のアミノ酸がコードされ、preS2-S抗原およびpreS-S抗原が少量産生される。

C抗原遺伝子は183個のアミノ酸をコードしている。この抗原蛋白質のC末端にはアルギニンに富む配列が存在し、核蛋白の性状を示している。この上流に、preC領域 (29個のアミノ酸をコード) が同じフレームで接続している。PreCのN末端2/3は、シグナル配列と考えられている。e抗原はシグナル配列を欠いたC抗原のN末端側から149個のアミノ酸よりなっており、可溶性抗原として血中に遊離される。

P遺伝子は、843個のアミノ酸をコードしているウイルス固有のDNAポリメラーゼ遺伝子で、他の3つの遺伝子とフレームをずらして重なり合っている。この酵素はDNA依存DNAポリメラーゼ活性に加えて、逆転写酵素活性とRNaseH活性を持ち、さらにマイナス鎖の5'端に結合しているプライマー蛋白としても働いている⁴⁾。

X遺伝子がコードする154個のアミノ酸からなるX蛋白質は、DNA結合能を持たないが、ウイルス自身および細胞の遺伝子の発現に対してトランス活性化作用を示し^{5~7)}、肝発癌に深く関係していることが指摘されている。

HBV由来の主なmRNAは3.5kb, 2.5kb, 2.1kb, および0.8kbである⁸⁾。HBV DNA上にはおのこのmRNAに対応し、4ヵ所に転写のプロモーターが存在する (図1)。また、X遺伝子の上流にはエンハンサーIが存在し、0.8kb, 2.1kb, 3.5kb mRNAの転写を促進することが明らかにされている^{5,9)}。このエンハンサーに結合する因子が多数検出されている。さらに、C遺伝子の上流にエンハンサーIIが同定されている。転写終結シグナルはHBVゲノム上に1ヵ所だけ存在し、全てのmRNAがここで終結している。

3.5kb mRNAはプレゲノムRNA (ウイルスDNA

図1 HBV ゲノムの構造と転写マップ

◄ はプロモーター, □ の I および II はエンハンサーの位置を, ● は一鎖の 5' 端に結合したプライマー蛋白を示している。DR 1 および DR 2 は一鎖および+鎖の 5' 端に位置する 11bp の繰り返し配列である。外側には 4 種類の mRNA とそのスタートおよび終了が示され, ~~~ はポリ A を示している。

合成の鋳型となる), C 抗原の mRNA, および P 遺伝子の mRNA に対応すると考えられる。2.1kb mRNA は PreS2-S 抗原と S 抗原の発現に, 2.5kb mRNA は PreS-S 抗原の発現に関与している。

2. HBV ゲノムの変異と劇症肝炎

従来のハイブリダイゼーション法では判明が難しかったタイプの HBV による感染が, PCR 法で同定されるようになった。その結果, S 抗原, C 抗原あるいは preC 領域の一部が変異したウイルスが見つけた。e 抗原/C 抗原は細胞性免疫の主ターゲットであると考えられ, 急性および慢性活動性肝炎でのウイルス排除に際してみられる肝障害に密接に関係している。e 抗体への seroconversion はウイルス除去を表しているが, 慢性肝炎でも e 抗体が見られることがある。最

近, これが preC の変異と関係していることが分かってきた¹⁰⁾。この HBV の preC 変異ウイルス(停止コードン変異により e 抗原の分泌が阻止されている)の感染が, e 抗体を持つ持続感染キャリアに起こることが分かり, e 抗原産生能のない HBV がより悪性な肝炎や劇症肝炎を引き起こすことがある。それ故, C 変異を伴う慢性肝炎期での preC 変異は, とくに強い細胞障害を伴う e 抗体陽性の肝臓病を生じることが考えられる。

3. HBV 遺伝子の発現と発癌

最近, 培養細胞を用いた系で X 遺伝子に発癌誘導能のあることが報告され始めている^{11,12)}。勿論, X 遺伝子の機能の発現や悪性化の効率は宿主側の要因にも依存している。このことを裏づけたのが X 遺伝子を導入し

図2 X蛋白質の機能ドメイン

下の■はトランス活性化に重要であることが明らかにされている部分。□はトランス活性化に必要でないことが明らかにされている部分を表わす。その他、本文参照。

たトランスジェニックマウスの実験である¹³⁾。他方、HBVと近縁のウイルスであるDHBV (Duck hepatitis B virus) はX遺伝子を欠いており、このウイルスは肝炎は発症するが発癌性がないと報告されている¹⁴⁾。これまでに、多くの研究者によりHBVDNAの全体あるいは一部分を導入したトランスジェニックマウスが作製されているが、X遺伝子が強く発現しているケース以外では全く発癌していない。この事実は、HBVDNAが組み込まれ、仮に宿主DNAの欠失や再編成が起こったとしても、X遺伝子の発現がなければ発がんすることがほとんどないことを示している。Xトランスジェニックマウスの場合、発がんを誘導するにはX遺伝子が強く発現され、かつ、維持されることが重要であることを示唆しており、ヒトでのX遺伝子の作用メカニズムと少し異なるかも知れない。

また一方では、HBVDNAを導入して作製したトランスジェニックマウスの中で、肝細胞中にpreS-S大蛋白質を過剰発現して蓄積する系統に肝障害が起こり、肝細胞癌が発症することが報告されている¹⁵⁾。しかしながら、トランスジェニックマウスと異なり、ヒトではこのような大蛋白質のHBV感染肝組織中での蓄積はまれである。

4. X遺伝子の転写活性化機能

・ トランス活性化の標的遺伝子

X蛋白質はウイルス自身のみならず細胞遺伝子の発現調節領域にトランスに作用し、転写を活性化する^{5,6,7,17,18,19)}。標的となる細胞遺伝子の中にはRNAポ

リメラーゼIIおよびIII、c-myc、c-fos、IL-8などの増殖関連遺伝子がある。

DNA結合能を持たないX蛋白質がどのようにして転写活性化を行うのであろうか？多くの実験からX遺伝子に応答するDNA配列(X応答エレメント：XRE)としてNFκB様配列^{6,18,19)}、AP-1とAP-2配列⁶⁾、HBVエンハンサーのXRE²⁰⁾などが同定され、その応答はきわめて多様である。それゆえ、X蛋白質は細胞内の複数のタンパク質と相互作用し、増殖関連遺伝子の発現をトランス活性化し、その結果、発癌のイニシエーションに関与しているのではないかと考えられる。

b. X蛋白質と細胞蛋白質の相互作用

X蛋白質は小さい塩基性の蛋白質(17kDa)である。X蛋白質のアミノ酸配列のホモロジー検索から、その一部がKunitz型セリンプロテアーゼインヒビターの活性に重要なKunitzドメインと相同性があることが見出された(図2)²¹⁾。この相同性を示す領域のアミノ酸配列に変異を入れるとトランス活性化能が全く失われる。またさらに、X蛋白質が細胞内の特定のセリンプロテアーゼを阻害し、さらに、このKunitzドメイン様構造が細胞タンパク質との相互作用にも重要な部分であることが明らかにされた^{22,23)}。このようにX遺伝子は、転写因子などの安定化により細胞遺伝子の発現異常をもたらしている可能性がある。

5. HBVDNA の組み込みの重要性

HBV 関連の慢性肝炎組織では、ほぼ全例に HBVDNA の細胞 DNA への組み込みが認められている²⁴⁾。組み込みはウイルスの生活環に必須ではないが、感染が起こるとランダムな組み込みが速やかに起こる。組み込み型 HBVDNA 中の X 遺伝子の多くがトランス活性機能を保持し、かつ、細胞遺伝子の終結シグナルを持った X-細胞融合遺伝子となっている²⁴⁻²⁶⁾。

慢性肝炎組織中でのウイルスの存在状態について経時的に調べた報告はないが、肝組織において多量のウイルス複製が起こる活動期には、X 蛋白質は遊離のウイルス DNA から発現される。しかし、ウイルス複製が起こり C 抗原を発現する細胞は、細胞障害性 T 細胞により破壊されてしまう運命にある。それゆえ、生き残る細胞はウイルス複製のない、組み込み型 HBVDNA のみを持つ細胞ではないかと考えられる。免疫系からののがれた細胞の DNA 中に組み込まれた X 遺伝子の方が、より持続的に発癌のイニシエーションに関与できるかもしれない。

おわりに

慢性肝炎の時期に HBV の X 遺伝子とそのセリンプロテアーゼインヒビター活性および転写活性化機能により発癌のイニシエーションに主役として関与している可能性について述べてきた。しかし、プログレッションを含めた多段階発癌の過程では c-myc, p53 などのいくつかの細胞遺伝子の変化が起こっていると考えられる。ウイルス感染との対応が記載されていないが、多くの進行肝癌の遺伝子解析から、c-myc 遺伝子を持つ第 8 番染色体短腕の一部欠失²⁷⁾や癌抑制遺伝子 p53 遺伝子を含む第 17 番染色体短腕の一部欠失や、p53 の発現異常（多くの場合、変異を伴っている）を示すデータが発表されている²⁸⁾。ヒトの癌では、c-myc の活性化や増幅、p53 あるいは Rb を含む染色体の特定領域の欠失などの遺伝子変化がよく見いだされている。しかしながら、早期の肝癌ではこのような変異は検出されていない。

ちなみに p53 は DNA 結合能を有し、細胞周期を負に調節しているが、最近私達は、p53 の転写抑制機能を X 遺伝子が干渉し打ち消していることを見いだすことが出来た²⁹⁾。この事実は、早期の肝癌では p53 の変異が検出されない知見と合致する。X 遺伝子による発がんの誘発作用を考えると、これは非常に興味深い知見であり、今後の詳細な検討が待たれる。

文 献

- 1) Beasley, R. P., Lin, C.-C., Hwang, L.-Y., Chien, C. S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet* ii : 1129-1133, 1981.
- 2) Kobayashi, M. and Koike, K. Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus DNA of subtype adr and its conserved gene organization. *Gene* 30 : 227-232, 1984.
- 3) Koike, K., Shirakata, Y., Yaginuma, K., Nakamura, I., Hayashi, Y., Kawada, M., Kobayashi, M. Oncogenic potential of hepatitis B virus. *Mol. Biol. Med.* 6 : 151-160, 1989.
- 4) Wang, G. H. and Seeger, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71 : 663-670, 1992.
- 5) Spandau, D. F. and Lee, C. Trans-Activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 62 : 427-434, 1988.
- 6) Twu, J. S. and Schloemer, R. H. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.* 61 : 3448-3453, 1987.
- 7) Seto, E., Yen, T. S. B., Peterlin, B. M., Ou, J. Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by the hepatitis B virus X protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 8286-8290, 1988.
- 8) Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M., and Koike, K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 2678-2682, 1987.
- 9) Bulla, G. A. and Siddiqui, A. The hepatitis B virus enhancer modulates transcription of the hepatitis B virus surface antigen gene from an internal location. *J. Virol.* 62 : 1437-1441, 1988.
- 10) Carman, W. F. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in the patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* ii : 588-591, 1989.
- 11) Shirakata, Y., Kawada, M., Fujiki, Y., Sano, H., Oda, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M., Koike, K. The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic trans-formation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn. J. Cancer. Res.* 80 : 617-621, 1989.
- 12) Hohne, M., Schaefer, S., Scifer, M., Feitelson, M. A., Paul, D., Gerlich, W. H. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocyte after transfection with hepatitis B virus DNA. *Embo J.* 9 : 1137-1145, 1990.

- 13) Kim, C., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Gilbert, J. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351 : 317-320, 1991.
- 14) Cova, L., Trepo, C. : 私信
- 15) Chisari, F. V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H. A., Sell, S., Pinkert, C. A., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59 : 1145-1156, 1989.
- 16) Zahm, P., Hofschneider, P. H. and Koshy, R. The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 3 : 169-177, 1988.
- 17) Aufiero, B., and Schneider, R. J. The hepatitis B virus X-gene product transactivates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J.* 9 : 497-504, 1990.
- 18) Mahe, Y., Mukaida N., Kuno, K., Akiyama, M., Ikeda, N., Matsushima, K. and Murakami, S. Hepatitis b virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/Enhancerbinding protein-like cis-elements *J. Biol. Chem.* 266 : 13759-13763, 1991.
- 19) Siddiqui, A., Gaynor, R., Srinivasan, A., Mapoles, J. and Farr, R. W. Trans-activation of viral enhancers including long terminal repeat of the human immunodeficiency virus by the hepatitis B virus X protein. *Virology* 169 : 479-484, 1989.
- 20) Faktor, O. and Shaul, Y. The identification of hepatitis B virus X gene responsive elements reveals functional similarity of X and HTLV-1 tax. *Oncogene* 5 : 867-872, 1990.
- 21) Takada, S. and Koike, K. X protein of hepatitis B virus resembles a serineprotease inhibitor. *Jpn. J. Cancer. Res.* 81 : 1191-1194, 1990.
- 22) Takada, S., Kido, H., Fukutomi, A. Mori, T. and Koike, K. Interaction of hepatitis B virus X protein with a serine protease, trypsin TL₂ as an inhibitor. *Oncogene* 9 : 341-348, 1994.
- 23) Takada, S. and Koike, K. 投稿中
- 24) Takada, S. and Koike, K. Trans-activation function of 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 5628-5632, 1990.
- 25) Takada, S. and Koike, K. B型肝炎ウイルスと肝発癌. 蛋・核・酵. 35 : 2089-2099, 1990.
- 26) Wollersheim, M., Debelka, U., Hofschneider, P. H. A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene* 3 : 545-552, 1988.
- 27) Emi, M., Fujiwara, Y., Ohta, H., Tsuda, H., Hirohashi, S., Koike, M., Miyaki, K., Monden, M. and Nakamura, Y. Allelic loss at chromosome band 8p21.3-p.22 is associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 7 : 152-157, 1993.
- 28) Bressan, B., Galvin, K. M. and Liang, T. J. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 1973-1977, 1990.
- 29) Takada, S., Mori, T., Kido, H., Nakamura, I., Yaginuma, K., Tsuchida, K., and Koike, K. Contribution of HBV X gene expression to hepatic carcinogenesis. In *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, Springer-Verlag, Tokyo, pp.753-756, 1994.