<原 著>

ウッドチャック肝細胞癌培養株 (WH257GE10) における c-myc 遺伝子の染色体上の局在部位の解析

水野 恭嗣* 大野 真介** 松下 文昭* 鵜浦 雅志*
 小林 健一* 右田 俊介** 服部 信* 村上 清史***

要 旨: ウッドチャック肝細胞癌培養株 (WH257GE10) におけるウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) DNA の組み込みと c-myc 遺伝子との関係を明らかにするために, ^3H (トリチウム) 標識ウッドチャック c-myc 遺伝子を probe として, in situ hybridization 法を用いて, c-myc 遺伝子の WH257GE10 染色体上の局在部位を解析した。その結果, c-myc 遺伝子は, WHV DNA の組み込み部位 (第 8 染色体長腕部 31 領域, 8q31) の近傍である第 8 染色体長腕部 32 領域 (8q32) に局在していた。c-myc 遺伝子が WHV DNA の組み込み部位の近傍に局在することから, c-myc 遺伝子は, WHV DNA の組み込み後の肝細胞癌の発生に際して, 何らかの役割を果たしている可能性が推測された。

索引用語: ウッドチャック肝細胞癌培養株 (WH257GE10) c-myc 遺伝子
 WHV DNA in situ hybridization 法

緒 言

我々は, ウッドチャック正常細胞の染色体構成 ($2n: 38, XY, \text{♀}: 38, XX$) を G-バンド法を用いて初めて解析し¹⁾, Unoura ら²⁾ によって樹立されたウッドチャック肝細胞癌培養株 (WH257GE10) について, 染色体異常 ($36, X, -5, -13, -13, -Y, +M_1, +M_2$) が存在することを明らかにした³⁾。さらに, ウッドチャック染色体の標準 G-バンドパターン⁴⁾の模式図を初めて決定し, WH257GE10 では, 第 6 染色体長腕部 33 領域 (6q33) と第 8 染色体長腕部 31 領域 (8q31) の 2 箇所にウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) DNA が組み込まれていることを明らかにした⁵⁾。しかし, WH257GE10 における WHV DNA の組み込みと染色体異常との関連性については明らかではない。

一方, パスツール研究所 (フランス) の Dr. Buendia ら⁶⁾ の研究グループによれば, ウッドチャック肝細胞癌では, c-myc 遺伝子の再編成や発現の増大が認められており, WHV DNA の組み込みにより, c-myc 遺伝子が活性化され, 癌化が引き起こされる可能性が示唆

されている。

今回, 我々は, WH257GE10 における WHV DNA の組み込みと, c-myc 遺伝子との関係を明らかにするために, WH257GE10 における c-myc 遺伝子の染色体上の局在部位を解析した。

方 法

I. 染色体標本の作製および染色体解析

WH257GE10 について, Matsushita ら⁷⁾ の方法に準じ, トリプシン・ギムザ・バンド法 (G-バンド法) によって染色体標本を作製し, 染色体の核型を解析した。

II. In situ hybridization 法

1. 染色体標本の前処置

まず, WH257GE10 の G-バンド標本の写真撮影を行った。ついで, この標本を 1% 塩酸-99% エタノール溶液にて脱色後, 室温にて乾燥させた。次に試料細胞中に存在する RNA を除くため, RNase A ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma, 米国) にて 37°C , 60 分間処理し, 0.3M 塩化ナトリウム-0.03M クエン酸ナトリウム (pH 7.0) 溶液 ($2\times\text{SSC}$) にて 2 回洗浄後, 70% エタノールにて 2 回, 100% エタノールにて 1 回洗浄し, 室温にて乾燥させた。さらに, 染色体 DNA を変性させるため, 70% ホルムアミド- $2\times\text{SSC}$ 溶液 (pH 7.0) にて 70°C 3 分間熱処理し, 氷冷した 0.015M 塩化ナトリウム

* 金沢大学医学部第 1 内科

** 金沢大学がん研究所分子免疫部

*** 金沢大学がん研究所生物物理部門

<受付日 1989 年 12 月 14 日>

—0.0015M クエン酸ナトリウム溶液(0.1×SSC)にて急冷後, 70%, 100%エタノールにてそれぞれ1回ずつ洗浄し, 室温にて乾燥させた。

2. プローブ DNA の作製

Fig. 1 に, パスツール研究所の Dr. Buendia らより分与されたウッドチャック c-myc 遺伝子の制限酵素地図 (restriction map)⁵⁾を示す。c-myc 遺伝子は3個の exon により構成されており, プラスミド pGEM1 に組み込まれた8kb の c-myc 遺伝子 Hind III fragment を, Multiprime labelling 法により³H-4dNTP にて標識し, プローブとした。プローブの比活性は $1 \sim 2 \times 10^7$ cpm/ μ g DNA であった。プローブ DNA は, 室温にて 0.2N NaOH で15分間アルカリ変性を行い, 次いで, 2M Tris·HCl (pH 7.0) にて中和処理した。さらに, 0.3M NaCl, 60mM Tris·HCl (pH 8.0), ×5 Denhardt 溶液(0.1%ウシ血清アルブミン(生化学工業株式会社, 東京), 0.1%ポリビニールピロリドン(Sigma, 米国), 0.1%フィコール(Sigma, 米国)), 10%硫酸デキストラン, 1mM EDTA, 50%ホルムアミド, 250 μ g/ml 変性サケ精子 DNA(Boehringer·Mannheim, 西ドイツ) からなる hybridization 溶液とゆっくり混合した。

3. プローブ DNA との hybridization

スライドガラス上にプローブ DNA を含んだ hybridization 溶液を滴下(40~50 μ l/スライドガラス)し, シリコン処理をしたカバーガラスを滴下した溶液の上にそっとのせ, 湿気のあるスライドケースの中に入れ密封した後, 42℃17時間 hybridization を行った。その後, 50%ホルムアミド-2×SSC 溶液中に hybridization 反応の終わったスライドガラスを浸し, カバーガラスをはずした。次に, 50%ホルムアミド-2×SSC 溶液にて40℃, 30分間の洗浄を3回行い, 洗浄液を2×SSC にかえて40℃, 30分間の洗浄を3回行った。さらに, 70%, 100%エタノールにて脱水し, 室温にて乾燥

させた。

4. Autoradiography

暗室で, あらかじめ45℃に加温した蒸留水に対し, 等量の Kodak NTB2を加え, かくはんし, 塗布用の乳剤とした。この乳剤にスライドガラスを浸すことにより, スライドガラス上に乳剤を塗布し, 風乾させた後, シリカゲルの入った暗箱に入れ密封し, 4℃にて7日間 autoradiography を行った。次に, スライドガラス上の乳剤フィルムを20℃にてコニドール X (小西写真工業 KK)で5分間現像し, 定着液 F-5にて約5分間定着した。安全光にてフィルムが透明になっていることを確認した後, 軽く水洗し, 再びギムザ染色を行い, 顕微鏡下にて銀粒子の染色体上の局在部位を観察した。銀粒子の染色体上の局在部位は, in situ hybridization を行う前に, あらかじめ写真撮影をしておいた G-バンド染色体領域に, 顕微鏡下でプロットすることにより同定した。以上の解析は計104個の metaphase plates について行った。

III. 統計学的処理

χ^2 検定を用いて行った。

成 績

In situ hybridization 法により WH257GE10の分裂中期染色体上に認められた銀粒子の分布を Table 1 に示した。第6染色体短腕部(6p)では, 期待値11.2 に対し観測値は20, 第6染色体長腕部(6q)では, 期待値14.9に対し観測値は29, さらに第8染色体短腕部(8p)では, 期待値12.1に対し観測値は35, 第8染色体長腕部(8q)では期待値14.0に対し観測値は161でありこれらの観測値は統計学的に有意であった。このうち8qにおける銀粒子の観測値は危険度 10^{-5} 以下と最も高い有意差を認めた。なお, 全銀粒子数570個のうち, 第8染色体には196個(34.4%)の銀粒子の集積が認められた (Table 1, Fig. 2)。

Fig. 1 Restriction map of a woodchuck c-myc gene⁵⁾. The woodchuck c-myc gene carries the exon-1, 2, 3.

Table 1 Distribution of silver grains on WH257GE10 metaphase chromosomes after in situ hybridization with the c-myc probe.

Chromosomes		% of haploid genome	Number of silver grains			P values* of positive deviations
			Observed	Expected	χ^2	
1	p	2.45	7	14.0	3.50	
	q	4.57	14	26.0	5.54	
2	p	2.12	18	12.1	2.88	
	q	4.57	26	26.0	0	
3	p	3.27	18	19.6	0.13	
	q	4.57	20	26.0	1.38	
4	p	2.12	7	12.1	2.15	
	q	4.25	21	24.2	0.42	
5	p	2.45	5	14.0	5.79	
	q	3.76	7	24.4	12.41	
6	p	1.96	20	11.2	6.91	$<10^{-2}$
	q	2.61	29	14.9	13.34	$<10^{-3}$
7	p	1.63	9	9.3	0.01	
	q	3.43	14	19.6	1.60	
8	p	2.12	35	12.1	43.34	$<10^{-4}$
	q	2.45	161	14.0	1543.50	$<<10^{-5}$
9	p	1.14	3	6.5	1.87	
	q	2.94	18	16.8	0.086	
10	p	1.14	4	6.5	0.96	
	q	2.45	15	14.0	0.07	
11	p	0.65	3	3.7	0.13	
	q	1.96	8	11.2	0.91	
12	p	0.98	6	5.6	0.029	
	q	1.30	5	7.4	0.78	
14		5.88	14	33.5	11.35	
15		5.39	13	30.7	62.03	
16		4.09	18	23.3	1.21	
17		4.09	17	23.3	1.70	
18		2.94	10	16.8	2.75	
X	p	2.45	4	14.0	7.14	
	q	5.07	10	28.9	12.36	
M ₁		5.23	8	29.8	15.95	
M ₂		3.92	2	22.3	18.48	

*P value was determined from the χ^2 value for one degree of freedom

また、分裂中期染色体 G-バンド領域における銀粒子の分布では、8q の特定のサブバンド領域に銀粒子の集積のピークが認められた (Fig. 2)。これに対して、銀粒子の有意な集積が認められた 6p, q や 8p, および銀粒子数の観測値が期待値より高値を示したその他の染色体 (2p, 9q, 10q, 12p) では、特定のサブバンド領域への銀粒子の集積のピークは認められなかった (Table 1, Fig. 2)。

次に、第 8 染色体の autoradiography をその G-バンドと比較対応させ Fig. 3 に示した。銀粒子は第 8 染色体上の特定の領域、すなわち第 8 染色体長腕部 32 領

域 (8q32) に局在していることが示されている。

さらに、第 8 染色体について、G-バンド、autoradiography および標準バンドパターンの模式図を対応させ、サブバンド領域における銀粒子の分布を Fig. 4 に示した。第 8 染色体では、196 個の銀粒子のうち 110 個 (56.1%) が長腕部 32 領域 (8q32) に集積していた。その他のサブバンド領域では、銀粒子の集積はいずれも 10 個以下であった。

以上の成績より、WH257GE10 の c-myc 遺伝子は 8q32 に局在すると結論された。

Fig. 2 Distribution of autoradiographic silver grains on the G-banded 104 metaphase chromosome spreads after in situ hybridization with the c-myc probe. Of 570 silver grains associated with the chromosomes, 196 (34.4%) were located on chromosome 8.

考 察

ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) に類似したゲノム構造を有するヘパドナウイルスに属し、最も発癌性が高い WHV によるウッドチャック肝細胞癌の発生機序の解析は、HBV 関連ヒト肝細胞癌の発生機序解明の格好のモデル系となっている⁶⁾。ウッドチャック肝細胞癌の発生については、肝細胞 DNA への WHV DNA の組み込みによる近傍の宿主遺伝子の活性化が

Fig. 3 Autoradiography of the chromosome 8. In situ hybridization of the c-myc probe maps the oncogene to the chromosome 8q32. (A) G-band structure and (B) Distribution of autoradiographic silver grains.

重要な要因である可能性が示唆されている⁷⁻⁹⁾。ウッドチャック肝細胞癌の発生機序解明のステップとして、我々はこれまでに、WH257GE10における染色体異常の存在¹⁾と、WHV DNA の染色体上の組み込み部位⁹⁾を明らかにしてきたが、両者の関連性については、

Fig. 4 Distribution of autoradiographic silver grains on chromosome 8 after in situ hybridization with the c-myc probe. Of 196 autoradiographic silver grains, 110 (56.1%) were concentrated in 8q32.

WHV DNA の組み込み部位と染色体異常の認められる部位とが一致していないことから、明らかではなかった。

細胞内発癌遺伝子 (c-onc) による癌化のメカニズムに関しては、ウイルス感染により、c-onc の近傍にウイルス由来のプロモーターが組み込まれ、c-onc の転写が促進されることにより癌化が引き起こされたり¹⁰⁾、染色体転座あるいは部分欠損などの transposition により、c-onc がある種の遺伝子プロモーターやエンハンサーの近傍に移動するか、逆にプロモーターやエンハンサーが移動することにより、c-onc が活性化され癌化が引き起こされる¹¹⁾ことなどが推測されている。発癌に関する c-onc の研究のうち c-myc 遺伝子では、マウスの形質細胞腫やヒトの Burkitt リンパ腫において、染色体転座による c-myc 遺伝子の活性化が指摘されている^{12,13)}。すなわち、マウスの形質細胞腫では、c-myc 遺伝子を担う第15染色体と Ig 遺伝子を担う第12、もしくは第6染色体間の相互転座が、また、ヒトの Burkitt リンパ腫では、c-myc 遺伝子を担う第8染色体と Ig 遺伝子を担う第14、第2、第22染色体間とのいずれかひとつの相互転座がそれぞれ起こり、c-myc 遺伝子が活性化され、癌化が引き起こされるとするものである。

一方、ウッドチャック肝細胞癌における c-onc の発現に関する研究では、パスツール研究所 (フランス) の Mööröy ら⁴⁾は、WHV 陽性のウッドチャック肝細胞癌9例中3例が癌部で非癌部に比し5~50倍の c-myc の発現増大を示し、この3例の肝細胞癌から抽出した DNA の解析の結果、c-myc 遺伝子の再編成が、c-myc の5'近傍もしくは第1イントロン内に生じていることを明らかにした。さらに Hsu ら⁵⁾は、その後の研究で、ウッドチャック肝細胞癌2例において、WHV DNA が c-myc の近傍に組み込まれているとともに、c-myc の発現増大が認められることを示し、WHV DNA の組み込みにより c-myc が活性化され、癌化が引き起こされる可能性を推測している。

WH257GE10では、WHV DNA は6q33および8q31に組み込まれている³⁾。さらに、今回明らかにされたごとく、WH257GE10では、c-myc 遺伝子は8q32に局在していた。In situ hybridization 法の解析精度から推測すると、WHV DNA および c-myc 遺伝子は、第8染色体長腕部上で互いにきわめて近い位置に存在するものと考えられる。

ウッドチャック正常細胞における c-myc 遺伝子の

局在部位については、現在解析中であるが、以上の知見は、WH257GE10において、WHV DNA が c-myc 遺伝子の近傍に組み込まれた可能性を示し、ウイルス DNA の組み込みによる c-myc 遺伝子の活性化、すなわち、肝細胞癌発生の一機構を示唆するものと推測される。

WH257GE10における c-myc RNA の発現に関しては、現在、Northern blot 法を用いて解析中である。今後、WH257GE10の c-myc RNA に発現量の増大が認められるか否か、そしてウッドチャック正常細胞と WH257GE10において c-myc 遺伝子の染色体上の局在部位が一致しているか否かという点が明らかとなり、ウッドチャック肝細胞癌の発生機構解明にとって重要なステップとなることが期待される。

結 論

ウッドチャック肝細胞癌培養株 (WH257GE10) における c-myc 遺伝子の染色体上の局在部位を in situ hybridization 法により解析した。その結果、WH257GE10の c-myc 遺伝子は第8染色体長腕部32領域 (8q32) に局在していた。c-myc 遺伝子が WHV DNA の組み込み部位 (第8染色体長腕部31領域 (8q31)) の近傍に局在することから、c-myc 遺伝子は、WHV DNA の組み込み後の発癌に際して何らかの役割を果たしている可能性が推測された。

稿を終えるにあたり、ウッドチャック c-myc 遺伝子を分与していただいたパスツール研究所 (フランス) の M.-A. Buendia 博士らに深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第25回日本肝臓学会総会 (1989年6月、金沢) にて発表した。

文 献

- 1) Matsushita F, Ohno S, Unoura M, et al: Analysis of the chromosomal abnormalities of a woodchuck hepatocellular carcinoma-derived cell line (WH257GE10). *Int J Cancer* 40: 711-714, 1987
- 2) Unoura M, Kobayashi K, Fukuoka K, et al: Establishment of a cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 5: 1106-1111, 1985
- 3) Mizuno Y, Murakami S, Ohno S, et al: Chromosomal assignment of woodchuck hepatitis virus (WHV) DNA integration sites in a woodchuck hepatocellular carcinoma-derived cell line (WH257GE10). *Int J Cancer* 43: 652

- 657, 1989
- 4) Möröy T, Marchio A, Buendia M-A, et al: Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature* 324: 276—279, 1986
 - 5) Hsu T, Möröy T, Buendia M-A, et al: Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* 55: 627—635, 1988
 - 6) Summers J, Smolec JM, Snyder RL, et al: A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4533—4537, 1978
 - 7) Summers J, Smolec JM, Werner BG, et al: Hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus are members of a novel class of DNA viruses. *In: Viruses in Naturally Occurring Cancers*, Edited by Essex M, Todaro G, zur Hansen H. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980, p459—470
 - 8) Mitamura K, Hoyer BH, Ponzetto A, et al: Woodchuck hepatitis virus DNA in woodchuck liver tissues. *Hepatology* 2: 47s—50s, 1982
 - 9) Snyder RL, Summers J: Woodchuck hepatitis virus and hepatocellular carcinoma. *In: Viruses in Naturally Occurring Cancers*, Edited by Essex M, Todaro G, zur Hansen H. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980, p447—457
 - 10) Hayward WS, Neel BG, Astrin SM: Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290: 475—480, 1981
 - 11) Carins J: The origin of human cancers. *Nature* 289: 353—357, 1981
 - 12) Klein G: Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell* 32: 311—315, 1983
 - 13) Ohno S, Migita S, Wiener F, et al: Chromosomal translocations activating myc sequences and transduction of v-abl are critical events in the rapid induction of plasmacytomas by pristane and Abelson virus. *J Exp Med* 159: 1762—1777, 1984

Chromosomal assignment of the c-myc proto-oncogene in a woodchuck hepatocellular carcinoma-derived cell line (WH257GE10)

Yasutsugu MIZUNO*, Shinsuke OHNO**, Fumiaki MATUSHITA*, Masashi UNOURA*,
Ken-ichi KOBAYASHI*, Shunsuke MIGITA**, Nobu HATTORI*
and Seishi MURAKAMI***

The chromosomal site of the c-myc proto-oncogene was identified in a woodchuck hepatocellular carcinoma-derived cell line (WH257GE10) by the in situ hybridization technique using a ³H-labelled woodchuck c-myc gene (8.0 kb Hind III fragment) as a probe to investigate the relationship between woodchuck hepatitis virus (WHV) DNA integration and the c-myc proto-oncogene. The c-myc proto-oncogene was located at 32' region of the long arm of chromosome 8 (8q32): in the vicinity of one of WHV DNA integration sites (8q31). These findings suggest that the c-myc gene assigned closed to WHV DNA integration site may play some role in the pathogenesis of woodchuck hepatocellular carcinoma.

* First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University (Kanazawa)

** Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, Kanazawa University (kanazawa)

*** Division of Biophysics, Cancer Research Institute, Kanazawa University (Kanazawa)