

厚生省  
平成11年度

ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と  
免疫系による癌細胞排除機構の解明に関する研究班

# 研究報告書

平成11年3月

主任研究者 松田 道行  
(国立感染症研究所感染病理部)

厚生省  
平成11年度

ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と  
免疫系による癌細胞排除機構の解明に関する研究班

# 研究報告書

平成11年3月

主任研究者 松田 道行  
(国立感染症研究所感染病理部)

ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と  
免疫系による癌細胞排除機構の解明に関する研究班

研究者名	分担	所属	役職
松田 道行	班 長	国立感染症研究所感染病理部	研 究 員
西連寺 剛	班 員	国立感染症研究所感染病理部	研 究 員
松倉 俊彦	班 員	国立感染症研究所ウイルス第2部	主任研究官
葛西 正孝	班 員	国立感染症研究所免疫部	主任研究官
牧野 正彦	班 員	国立感染症研究所細菌・血液製剤部	研 究 員
山本 三郎	班 員	国立感染症研究所細菌・血液製剤部	室 長

## 目 次

1. ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と免疫系による癌細胞排除機構の解明に関する研究  
総括研究報告書（平成 11 年度）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
主任研究者：松田 道行（国立感染症研究所 感染病理部研究員）
2. アダプター型癌遺伝子 C r k による発癌機構・・・・・・・・・・・・・・・・ 7  
分担研究者：松田 道行（国立感染症研究所感染病理部）
3. EB ウイルス(EBV)感染胃癌組織由来細胞株 GT38 及び GT39 細胞の解析・・・・・・・・ 9  
分担研究者：西連寺 剛（国立感染症研究所感染病理部）
4. 婦人科腫瘍とヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型に関する研究・・・・・・・・ 1 4  
分担研究者：松倉 俊彦（国立感染症研究所ウイルス 2 部）
5. 発癌遺伝子領域の染色体脆弱部位の分子機序に関する研究・・・・・・・・ 1 6  
分担研究者：葛西 正孝（国立感染症研究所免疫部）
6. 成人型 T 細胞白血病の新しい免疫学的治療法の開発・・・・・・・・ 1 9  
分担研究者：牧野 正彦（国立感染症研究所細菌・血液製剤部）
7. パリンドローム・オリゴ DNA の抗がん活性の機序に関する研究・・・・・・・・ 2 3  
分担研究者：山本 三郎（国立感染症研究所細菌・血液製剤部）

# I. 総括研究報告

# 1. ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と免疫系による癌細胞排除機構の解明に関する研究

主任研究者 松田 道行 国立感染症研究所 感染病理部研究員

**研究要旨** EBウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルスについての研究と、癌遺伝子による癌化及び転座の基礎的研究を平行して進めた。本年は、EBウイルスがごく少数の細胞にのみ存在する胃癌を見出した。この症例はEBVのhit-and-run説を支持するものである。子宮頸部異形成（CIN）と性器関連ヒト乳頭腫ウイルス（human papillomavirus：HPV）との関連を、新鮮凍結組織を用いサザンブロッティングにより検索した。その結果、322例中304例のCINに各々一種のHPV型を検出出来た。これらの材料においてはCINの異型度とHPV型とに良い相関が見出せる。ATLに対する免疫療法の開発をめざし、樹状細胞の機能解析を行った。HTLV感染により単球に機能異常が生じ、樹状細胞の成熟が阻害されており、このことが樹状細胞の病原体の細胞内取り込みやMHC class II抗原の発現が低下しているらしい。CT10レトロウイルスの癌遺伝子v-Crkによる癌化の機構を解析し、v-Crkがグアニンヌクレオチド交換因子C3Gを介してJNKを活性化することが癌化に必要であることを見出した。転座部位に結合するトランスリン蛋白が、細胞の分裂や増殖と密接に関連していることに注目して研究を行った結果、トランスリン遺伝子の発現がMEK/MAPK経路の活性化によって制御されていることを明らかにした。MY-1は新鮮NK細胞に直接作用してIFN- $\gamma$ 産生を誘導するが、新鮮T細胞には作用しないことを見出した。抗腫瘍活性を有するオリゴヌクレオチドMY-1添加によってNK細胞から産生されるIFN- $\gamma$ 量は、DNA非添加時のIFN- $\gamma$ 産生量に依存していることを見出した。

## 分担研究者

1. 松田道行 国立感染症研究所研究員
2. 西連寺剛 国立感染症研究所研究員
3. 松倉俊彦 国立感染症研究所主任研究員
4. 葛西正孝 国立感染症研究所主任研究員
5. 牧野正彦 国立感染症研究所研究員
6. 山本三郎 国立感染症研究所室長

## A. 研究目的

ウイルスの関与する癌は、ウイルス学的免疫学的手法により、予防および治療法の確立が可能である。従って日本人のどの癌に、どのウイルスが、どういう役割を果たしているのかを明らかにし、それに対する予防治療策を開発する必要がある。本年度は以下の目標を掲げて研究した。①EBV関連胃癌の解明へ向けて外科材料よりEBV感染胃癌細胞株の樹立を行い、それらの細胞株について細胞の性状及びウイルス感染の関わりを解析する。②子宮頸部異型上皮に存

在するHPV型を検索し、異型の程度とHPV型の関連を明らかにする。③ATL患者の末梢血単球由来のDCの機能を解析し、その機能異常の発現機序を明らかにする。④アダプター型癌遺伝子Crkによる癌化の機構を明らかにする。⑤染色体転座部位に結合するトランスリン蛋白の制御機構を解明する。⑥オリゴDNAの抗腫瘍効果が個体により異なる原因を明らかにする。

## B. 研究方法

### (1) 胃癌におけるEBウイルス感染に関する研究

患者からの胃癌組織について、①癌部をヌードマウスへ移植、形成された腫瘍をin vitroで培養した。②同組織の非癌部を直接in vitroで培養した。腫瘍原性はSCIDマウスでの造腫瘍性で調べた。EBV-encoded RNA (EBER)はin situ hybridization法、EBV nuclear antigen (EBNA)は蛍光抗体補体法、EBV-DNAはその末端繰り返し配列 (terminal repeat) をプローブとしたサザンブ

ロット法、EBV蛋白のはウエスタンブロット法を用い検出した。腫瘍組織はHE染色にて観察した。

#### (2) 婦人科腫瘍とヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型

検体は採取時に二分割し、一部はホルマリン固定後パラフィン包埋して、通常の病理組織学的検査により、軽・中・高度異形成(CIN I・CIN II・CIN III)に三分類した。凍結した残りの組織よりDNAを抽出し、PBM-58法を用いてHPVDNA検出及び型同定をおこなった。報告されている80種のHPV型うち41種の性器関連HPV型を対象とした。

#### (3) 成人T細胞性白血病の発症機序解明と治療法開発に関する研究

ATL患者11名および正常健康人10名より末梢血リンパ球(PBMC)の供与を受けた。プラスチック附着性単球は、PBMCを60分間培養した後非附着性細胞を除去して得た。DCの分化誘導には、recombinant (r)GM-CSFとr-IL-を用いた。単球およびDCの細胞表面抗原の解析は、市販の抗体を用いて行った。Immature DCの病原体取り込み能は、FITC-dextranをモデル抗原として用い測定した。正常健康人およびATL患者由来のMature DCおよびHTLV-I感染単球より分化誘導したMature DCの抗原提示能は、自己のCD4およびCD8 T細胞の増殖応答能にて検索した。

#### (4) アダプター型癌遺伝子v-Crkによる発癌機構

細胞にGST-JNKおよび様々なG蛋白の発現ベクターを導入する。24時間後にGST-JNKを回収して、その活性をc-Junを基質として測定する。RasファミリーG蛋白の交換因子、Sos、RasGRF、CalDAG-GEFI、CalDAG-GEFII、Epac、C3GがJNKを活性化するかを同様に293T細胞を用いて観察する。C3Gがどういう経路でJNKを活性化しているかを明らかにするために、C3Gとともに、R-Ras、Mik2のドミナントネガティブ変異体を発現させて、JNKの活性化を調べる。NIH3T3細胞にv-Crk癌遺伝子産物を発現させ癌化した細胞を作成した。この細胞にR-Rasのドミナントネガティブ変異体を導入し、細胞株を樹立し、その形態を観察する。

#### (5) 染色体脆弱化と転座の分子機構

PC12細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、ウサギ抗トランスリン抗体とマウス抗ブロムデオキシウリジン(BrdU)抗体で二重染色した。更に、Alexa 546ヤギ抗ウサギIgG抗体とAlexa 488ヤギ抗マウスIgG抗体で一次抗体の結合を検出した。また、核染色はDAPIでおこなった。次に、ラット脳組織の染色は、Wistarラット(P2, P18, P56)を4%パラホルムアルデヒドと0.2%ピクリン酸で心臓灌流後、脳組織の凍結切片をウサギ抗トランスリン抗体と反応させた。更に、ビオチン標識抗ウサギIgGとアビジン標識ペルオキシダーゼで反応させた後、0.05%ジアミノベンチジン(DAB)と0.01%過酸化水素水で発色させた。

#### (6) オリゴDNAの有する抗癌作用

健康人末梢血単核球から血小板、単球、B細胞を部分除去し、パーコール不連続濃度勾配法によって低比重細胞群と高比重細胞群に分けた。低比重細胞群より、NK細胞を免疫磁気ビーズ法でCD56-positive selectionあるいはCD3/CD14/CD19 negative selectionし精製した。T細胞は高比重細胞群よりCD56/CD14/CD19 negative selectionにて分離精製した。これ等の細胞を、CD16抗体、ダイナビーズM-450-CD3、IL-2、IL-12の存在下又は非存在下にMY-1を加え、10%FCS添加RPMI(エンドトキシン濃度;< 5pg/ml)で20~40時間培養した。オリゴDNAの抗腫瘍活性は、マウスにIMCを生着させた後、オリゴDNAを腫瘍内に週1回連続5週間300μgずつ注射することによる腫瘍径および腫瘍重量に及ぼす影響を調べた。

#### (倫理面への配慮)

当該内科医、外科医および産婦人科医によって全ての研究対象者の十分なインフォームドコンセントを得ている。また、発表時には個人が特定できないように配慮している。動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

#### C. 研究結果

##### (1) 胃癌におけるEBV感染に関する研究

非定型EBV感染胃癌の検出：本研究により従来のEBV胃癌(全ての胃癌細胞がEBER陽性)と

異なる非定型EBV胃癌の存在が見出された。PCRでのEBV DNAシグナルも弱く、EBER陽性細胞はその胃癌にわずかに散在した。癌部を移植したヌードマウスで腫瘍(PT)が形成されそれを培養して上皮様細胞株が得られた。非癌部の培養からは、4ヵ月で突然活発な細胞増殖が起り、上皮または繊維芽細胞様形態の細胞株(PN)が樹立された。EBV感染状態：ヌードマウスでの腫瘍(PT)はEBNA陰性、in vitro継代3ヵ月後陽性へと転じ、継代9ヵ月後は再びEBNA陰性となった。PNは樹立当時から陽性である。PNでEBV前初期蛋白(ZEBRA)、EBV早期抗原(EA-D)の発現が常に少数の細胞に検出された。PTでは継代3ヵ月でZEBRA、EA-Dの発現が見られたがその後、それらは全く検出されなかった。継代3ヵ月後PT、PNで環状プラスミドEBV DNAが検出された。PNではEBV増殖を示す線状DNAが検出された。腫瘍原性：PNまたはPT移植SCIDマウスで腫瘍が形成された。PTはヌードマウスで継代可能である。

#### (2) 婦人科腫瘍とヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型

322例のCINを調べた結果、304例に一種のHPV型を検出した。CIN Iは96%、CIN II及びIIIは各々94%と93%であった。CINに検出された全てのHPV型を3群・10グループに分類し整理したところ、各群が異形の程度と相関した状況で検出されている事が判明した。即ち、I群はCIN Iにのみ検出され、II群はCIN I及びCIN IIに存在するが、CIN IIIにはほとんど検出されなかった。一方、III群はすべてのステージにわたってに検出された。この事から、CINの異形の程度は感染しているHPV型によつて支配されることが強力に示唆され、限られたHPV型がCIN IIIに関与していると考えられた。

#### (3) 成人T細胞性白血病の新しい免疫学的・遺伝子学的治療の開発に関する研究

患者より得たmature DCの機能は、正常健常人より得たallogenic T細胞の刺激能により機能低下を示すものが3例中1例にあった。一方、immature DCは検索した3例全例で機能が低下していた。ATL患者単球はCD14抗原およびMHC class II抗原の発現低下を認めた。従って、ATLでは単球に器質的異常が存在し、DCへの分化が妨げられ

ているらしい。正常健常人より供与された単球にcell-free virusおよびMT-2細胞を添加すると、単球は容易にHTLV-I感染し、サイトカインを用いimmature DCを誘導すると、機能の低下が認められた。従って、HTLV-I感染単球より誘導したimmatureおよびmature DCは明らかな機能低下を示し、ATL患者DCの機能異常の発現機序の一つと考えられた。さらに、正常健常人より得たT細胞にMT-2細胞を用いHTLV-Iを感染させると、アポトーシスを起こすことを見出した。

#### (4) アダプター型癌遺伝子による発癌機構の解析

v-Crkに結合するグアニンヌクレオチド交換因子C3GはRap1およびR-Rasを活性化する。そのどちらがJNKを活性化するのかを調べた。その結果、293T細胞およびNIH3T3細胞ではR-RasはJNKをH-RasやRacと同様にJNKを活性化することがわかった。しかし、R-RasやH-RasはCOS細胞ではJNKを活性化せず、JNKの活性化は細胞特異的である可能性が示唆された。次に、H-Ras、Rap1、R-Rasのドミナントネガティブ変異体を用いて、v-CrkおよびC3G依存性のJNK活性化が抑制できるかを調べたところ、R-Ras変異体はv-CrkおよびC3GのいずれによるJNK活性化も抑制した。さらにMLK(mixed lineage kinase)のドミナントネガティブ変異体がR-Ras依存性のJNK活性化を抑制することを見出した。

#### (5) 染色体脆弱化と転座の分子機構の解明

トランスリン蛋白の発現量と細胞増殖速度と間に正の相関にあることに注目し、脳神経系と造血細胞系をモデルとして次のような研究をおこなった。ラット小脳におけるトランスリン蛋白の発現量を調べてみると、胎生17日(E17)から生後18日(P18)まで徐々に減少することが判明した。哺乳類の小脳では、急速に分裂する神経前駆細胞はexternal germinal layer (EGL)に存在し、分化に伴ってinternal granular layer (IGL)に移行して細胞分裂を停止することが知られている。そこで、トランスリンの発現が、発生過程にある小脳の特定領域に局在しているのかどうかを明らかにするために免疫組織染色による解析をおこなった。その結果、トランスリン蛋白は、EGLの増殖の盛んな神経前駆細胞に強く発現しているが、生後急速に減少し、P18ではIGLにわずか



に残るのみであった。更に、トランスリン蛋白の発現と神経前駆細胞の分裂増殖との関連を明らかにするために、NGF (nerve growth factor) によるPC12 (phenochromocytoma cell line) 細胞の分化との関連を調べたところ、PC12 の神経細胞への分化に伴う細胞分裂の停止と一致してトランスリン蛋白の発現が減少することが観察された。

#### (6) オリゴDNAの有する抗癌作用

抗腫瘍活性を有するオリゴDNAであるMY-1は、新鮮NK細胞に直接作用してIFN $\gamma$ 産生を誘導するが新鮮T細胞からは誘導できない。健常人NK細胞のMY-1に対する反応性には固体差があり、IFN $\gamma$ の産生量を指標に分類すると低反応群と高反応群に分けられた。低反応群ではMY-1非添加培養液中にIFN $\gamma$ が検出できなかったのに対し高反応群では高く検出され、生体内で既に活性化されたNK細胞もMY-1に反応することが示唆された。そこでNK細胞をin vitroで活性化し、IFN $\gamma$ 誘導能の高いG10GACGAと共培養したところ、活性化NK細胞のIFN $\gamma$ 産生は強く亢進された。G10GACGAの亢進作用はIL-2と相乗した。次にT細胞をダイナビーズM450-CD3で刺激し、そのIFN $\gamma$ 産生に対するMY-1の作用を検討したところ、MY-1は活性化T細胞のIFN $\gamma$ 産生を亢進し得ることが明らかにされた。更に、NK細胞のIFN $\gamma$ 産生に対し強い活性を示したG10GACGAは活性化T細胞のIFN $\gamma$ 産生に対しても強い亢進作用のあることが示された。

#### D. 考 察

EBV感染胃癌（全胃癌の7%）は、全ての癌細胞がEBV陽性であるのに対し、本研究で示した胃癌はほとんどの癌細胞がEBV陰性である。この胃癌はEBVの "hit and run"発癌の仮説を支持する。非胃癌部からのEBV感染細胞株（PN）が樹立されたことは、GT38及び GT39 (Tajima et al., Jpn. J. Cancer Res. 89: 262, 1998)と類似し、また細胞株におけるEBV感染も潜伏感染3型で、胃癌に於ける潜伏感染1型とは異なっている。これらの細胞株の起源細胞は不明であるが、胃組織中に存在したEBVによりある標的細胞がin vitroでトランスフォームした可能性も考えられる。

CINとHPV型の関連については長い間追求されてきているが未だに明確にされていない。その理由として、ほとんどの研究がスメア一検体をPCR法によつて解析してきた事があげられる。こうした検索では一検体に複数のHPV型が同定されていて、病変部位に関与するHPV型を特定する事が出来ない。また、PCRに用いるプライマーにより特定のHPV型が検出されない事も分かつてきている。本研究で示した様に凍結新鮮組織を対象としたコピー数の情報を含む詳細なHPV型同定研究が世界中で行われCINの異形の程度とHPV型の関連について明確な判断が下されるものと考えられる。

HTLV-I感染症は、ウイルス抗原に対する高免疫応答が原因となって発症するHAM/TSPと、免疫応答能の低下が原因となって発症するATLがある。ATLにおける免疫不全症の発症機構は未だ明らかにされていない。我々は、HAM/TSP患者の末梢血単球由来DCは、正常健常人に比し成熟化が進行しており、in vivoにおいて細胞表面にウイルス抗原を保持し、T細胞の活性化および病変発症に重要な役割を果たしていることを示してきた。ATL患者immature DCが明らかな機能異常を示し、抗原取り込み能力が低下していた。この機能異常は、単球に内在性の異常が存在する可能性が高いと考えられる。また、単球はin vivoにおいてもin vitroにおいてもHTLV-I感染性を示すため、単球へのウイルス感染の影響を調べた。その結果、HTLV-Iが単球に感染すると、正常な機能を持ったimmature DCもmature DCも分化誘導できないことが判明した。機能異常を示すDCと接触したT細胞は不十分に刺激され、その結果として抗原特異的不応答に入る可能性も想定される。従って、ATLにおいてはHTLV-Iが単球に感染し、抗原提示細胞およびT細胞の免疫不全をもたらす病変発症を誘導する可能性があると考えられた。

アダプター型癌遺伝子産物v-Crkによる癌化機構は、長い間不明であったが、本研究により、v-Crkに結合するC3GがR-Rasを介してJNKを活性化することにより、癌化を誘導していることが明らかになった。v-CrkはC3G以外にもDOCK180に結合することが知られている。このDOCK180は

Racを介してJNKを活性化することが知られているので、v-CrkはDOCK180とC3Gの二つの蛋白、その下流因子であるRacとR-Rasとを介してJNKを活性化し、これが癌化を誘導するらしい。このことはC3GやDOCK180単独では癌化を誘導できないことを考えると、v-Crkによる癌化にはRacとR-Rasの二つの経路が必要なこと、JNK以外の経路も癌化の誘導に関与することを示唆する。

トランスリンの遺伝子発現や細胞内局在に細胞周期やDNA傷害が深く係わっていることが明らかにされたことは、今後の研究の方向性と発展性を明確にただけでなく、トランスリン蛋白の機能を解析する上で重要な手掛かりを与えてくれるものと期待される。

B C G由来DNA画分はヒトNK及びT細胞に直接作用してIFN- $\gamma$ 産生を誘導した。その作用は活性化細胞で顕著でありIL-2産生を伴わなかった。IFN- $\gamma$ 産生を誘導するモチーフはC G-パ lindロームで構成され、活性化細胞特異配列の存在も示唆された。MY-1やC G-パ lindロームには、上記NK活性亢進作用に加えて、マウス脾細胞やヒト末梢血単核球のIFN- $\gamma$ 産生を誘導する作用がある。従って、これらオリゴDNAは生体内でTh1型免疫反応を惹起すると考えられる。

## E. 結 論

- ① 非定型EBV胃癌の存在が明らかになった。
- ② CINの異型度と性器関連HPV型との関連が3群に分類された。
- ③ HTLV感染単球の機能不全がATL発症の原因の一つと考えられる。
- ④ v-Crk癌遺伝子産物はC3GとR-Rasを介してJNKを活性化し、癌化を誘導する。
- ⑤ トランスリンの発現は増殖と密接に関連している。
- ⑥ 抗腫瘍オリゴDNAは活性化NK/T細胞に作用してIFN $\gamma$ の産生を亢進し得る。

## F. 研究発表

1. Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, Y., Ozaki, Y., Kitabatake, A.,

Nagashima, K., and Matsuda, M. Activation of ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G $\alpha$ . *Nature* 400:891-894. 1999.

2. Ichiba, T., Hashimoto, Y., Nakaya, M., Kuraishi, Y., Tanaka, S., Kurata, T., Mochizuki, N., and Matsuda, M. Activation of C3G Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rap1 by Phosphorylation of Tyrosine 504. *J. Biol. Chem.* 274:14376-14381. 1999.
3. Nishihara, H., Kobayashi, S., Hashimoto, Y., Ohba, F., Mochizuki, N., Kurata, T., Nagashima, K., and Matsuda, M. Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1452:179-187. 1999.
4. Katayama, H., Hashimoto, Y., Kiyokawa, E., Nakaya, M., Sakamoto, A., Machinami, R., Kurata, T., Mochizuki, N., and Matsuda, M. EGF-dependent dissociation of Crk proto-oncogene product from the epidermal growth factor receptor in human glioma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 90:1096-1103. 1999.
5. Sairenji, T. Epstein-Barr virus (EBV) infection and gastric carcinoma: The approach through EBV infected epithelial cell lines. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 110-112, 1999.
6. Gao, X., Tajima, M. and Sairenji, T. Nitric oxide down-regulates Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology* 258: 375-381, 1999.
7. Izawa, M., Mori, T., Satoh, T., Teramachi, A. and Sairenji, T.: Identification of an alternative form of caspase-9 in human gastric cancer cell lines: a role of a caspase-9 variant in apoptosis resistance. *Apoptosis* 4: 321-325, 1999.
8. Terai, M., Takagi, M., Matsukura, T. and Sata, T. Oral wart associated with human papillomavirus type 2. *J. Oral Pathol. Med.* 28:137-140, 1999
9. Kino, N., Sata, T., Sato, Y., Sugase, M. and Matsukura, T. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a novel human papillomavirus (type 82) associated with vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin. Diagn. Lab.*

- Immunol. 7:91-95, 2000.
10. Yu, P., Morawetz, R. A., Chattopadhyay, S., Makino, M., Kishimoto, T., and Kikutani, H. CD40-deficient mice infected with the defective murine leukemia virus LP-BM5def do not develop murine AIDS but produce IgE and IgG1 in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 29:615-625, 1999.
  11. Makino, M., Azuma, M., Wakamatsu, S., Suruga, Y., Izumo, S., Yokoyama, M. M., and Baba, M. Marked suppression of T cells by a benzothiophene derivative in patients with Human T-lymphotropic virus type I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 6(3):316-322, 1999.
  12. Makino, M., Shimokubo, S., Wakamatsu, S., Izumo, S., and Baba, M. The role of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected dendritic cells in the development of HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J. Virol.*, 73(6): 4575-4581, 1999.
  13. Wakamatsu, S., Makino, M., Tei, C., and Baba, M. Monocytes Drived Activation Induced Apoptotic Cell Death of HTLV-I-Infected T Cells. *J. Immunol.*, 163:3914-3919, 1999.
  14. Aoki, K., Ishida, R., and Kasai, M. The DNA binding activity of Translin is mediated by a basic region in the ring-shaped structure conserved in evolution. *FEBS Letters*, 443, 61363-61366. 1999.
  15. Tokunaga, T., Yamamoto, T. and Yamamoto, S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 1-11, 1999.
  16. Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequence with internal 5'-CG-3' directly act on human natural killer and activated T cells to induce IFN- $\gamma$  production in vitro. *J. Immunol.* 163: 3642-3652, 1999.
  17. Fujieda, S., Iho, S., Kimura, Y., Sunaga, H., Ikara, H., Sugimoto, C., Yamamoto, S. and Saito, H. DNA from *Mycobacterium bovis* BCG(MY-1) inhibits the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4-stimulated human lymphocytes. *Am. J. Respiratory Crit. Care Med.* 160: 2056-2061, 1999.
  18. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. *Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA* 247:23-39, 1999.
  19. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribo-nucleotides with 5'- ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. *Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA* 247:23-39, 1999.
  20. Yamamoto, S., Umemori, K., Nojima, Y., Atsumi, S., Ohishi, K., Takahashi, Y., Inoue, M., Iguchi, Y., Toyoo, S., and Yamamoto, T.: Immunoadjuvant effect of oligodeoxynucleotides. *Proc. US-Japan Cooperative Medical Program on Tuberculosis and Leprosy Research.* 34: 282, 1999.

## II. 分担研究報告

## 2. アダプター型癌遺伝子Crkによる発癌機構

分担研究者 松田 道行 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** ウイルスによる癌化のメカニズムを解析する目的で、CT10レトロウイルスの癌遺伝子Crkによる癌化の機構を解析した。特に、Crkに結合する蛋白として単離したグアニンヌクレオチド交換因子C3Gが癌化を誘導するメカニズムを明らかにした。C3GはRasファミリーG蛋白のうち、Rap1とR-Rasを活性化する。この二つの経路のうち、C3GはR-Rasを介してJNKを活性化することにより癌化を誘導していた。

### A. 研究目的

ウイルスによる癌化のメカニズムを解析する目的で、アダプター型癌遺伝子Crkによる癌化の機構を明らかにする。特に、Crkに結合する蛋白として同定したC3Gの機能はJNKを介して癌化を誘導するが、それがどのG蛋白によって引き起こされているかを明らかにする。

### B. 研究方法

G蛋白によるJNK活性の測定： 293T細胞、COS細胞、NIH3T3細胞にGST-JNKおよび様々なG蛋白の発現ベクターをリン酸カルシウム法あるいはFuGeneを用いて導入する。24時間後にGST-JNKを回収して、その活性をc-Junを基質として測定する。

グアニンヌクレオチド交換因子群によるJNKの活性化： RasファミリーG蛋白の交換因子、Sos、RasGRF、CalDAG-GEFI、CalDAG-GEFII、Epac、C3GがJNKを活性化するかを同様に293T細胞を用いて観察する。

ドミナントネガティブ変異体によるJNK活性化の阻害： C3Gがどういう経路でJNKを活性化しているかを明らかにするために、C3Gとともに、R-Ras、Mlk2のドミナントネガティブ変異体を発現させて、JNKの活性化を調べる。

v-Crk依存性の癌化の抑制： NIH3T3細胞にv-Crk癌遺伝子産物を発現させ癌化した細胞を作成した。この細胞にR-Rasのドミナントネガティブ変異体を導入し、細胞株を樹立し、その形態を観察する。

### C. 研究結果

C3GはRap1およびR-Rasを活性化する。そのどちらがJNKを活性化するのかを調べた。その結果、293T細胞およびNIH3T3細胞ではR-RasはJNKをH-RasやRacと同様にJNKを活性化することがわかった。しかし、R-RasやH-RasはCOS細胞ではJNKを活性化せず、JNKの活性化は細胞特異的である可能性が示唆された。

次に、H-Ras、Rap1、R-Rasのドミナントネガティブ変異体を用いて、v-CrkおよびC3G依存性のJNK活性化が抑制できるかを調べたところ、R-Ras変異体はv-CrkおよびC3GのいずれによるJNK活性化も抑制した。さらにMLK(mixed lineage kinase)のドミナントネガティブ変異体がR-Ras依存性のJNK活性化を抑制することを見出した。

さらに、C3GがR-Ras依存性にJNKを活性化させている証拠を得るために、さまざまなRasファミリーグアニンヌクレオチド交換因子によるJNKの活性化を調べた。表に示す如く、RasあるいはR-Rasを活性化する交換因子はJNKを活性化できるが、Rap1のみを活性化する交換因子はJNKを活性化できないことがわかった。

交換因子	標的G蛋白	JNK活性化
Sos	Ras	+
RasGRF	Ras、R-Ras	+
C3G	Rap1、R-Ras	+
CalDAG-GEFI	Rap1	-
CalDAG-GEFII	Ras、R-Ras	+
Epac	Rap1	-

次に、v-Crkで癌化したNIH3T3細胞にR-Rasのドミナントネガティブ変異体を導入したところ、顕著な形態復帰が認められた。

#### D. 考察

アダプター型癌遺伝子産物v-Crkによる癌化機構は、長い間不明であったが、本研究により、v-Crkに結合するC3GがR-Rasを介してJNKを活性化することにより、癌化を誘導していることが明らかになった。v-CrkはC3G以外にもDOCK180に結合することが知られている。このDOCK180はRacを介してJNKを活性化することが知られているので、v-CrkはDOCK180とC3Gの二つの蛋白、その下流因子であるRacとR-Ras、とを介してJNKを活性化し、これが癌化を誘導するらしい。このことはC3GやDOCK180単独では癌化を誘導できないことを考えると、v-Crkによる癌化にはRacとR-Rasの二つの経路が必要なこと、JNK以外の経路も癌化の誘導に関与すること、を示唆する。最近、RasファミリーG蛋白の制御機構が注目され、とくにRasの抑制因子として知られるRap1がどういう活性を有するのかに興味が集まっている。我々のグループは、Rap1の抑制因子rap1GAPIIが細胞増殖を正に制御することを示しているが、C3GがRap1もR-Rasも活性化することを考えると、癌化の際に、細胞増殖を正に制御するシグナルのみならず、負に制御するシグナルも出ていることを示唆している。

#### E. 結論

v-Crk癌遺伝子産物はC3GとR-Rasを介してJNKを活性化することにより癌化を誘導する。

#### F. 研究発表

1. Mochizuki, N., Y. Ohba, E. Kiyokawa, T. Kurata, Y. Murakami, Y. Ozaki, A. Kitabatake, K. Nagashima, and M. Matsuda. 1999. Activation of ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G $\alpha$ i. *Nature* 400:891-894.
2. Ichiba, T., Y. Hashimoto, M. Nakaya, Y. Kuraishi, S. Tanaka, T. Kurata, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 1999. Activation of C3G

Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rap1 by Phosphorylation of Tyrosine 504. *J.Biol.Chem.* 274:14376-14381.

3. Nishihara, H., S. Kobayashi, Y. Hashimoto, F. Ohba, N. Mochizuki, T. Kurata, K. Nagashima, and M. Matsuda. 1999. Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1452:179-187.
4. Katayama, H., Y. Hashimoto, E. Kiyokawa, M. Nakaya, A. Sakamoto, R. Machinami, T. Kurata, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 1999. EGF-dependent dissociation of Crk proto-oncogene product from the epidermal growth factor receptor in human glioma cells. *Jpn.J.Cancer Res.* 90:1096-1103.

### 3. EB ウイルス (EBV) 感染胃癌組織由来細胞株 GT38 及び GT39 細胞の解析

分担研究者 西連寺 剛 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** 従来の EBV 胃癌 (EBV が全ての癌細胞に感染) と異なる胃癌 (EBV が少数の癌細胞に感染) が見出され、その摘出組織の癌部及び非癌部から性状の異なる 2 つの EBV 感染細胞株が樹立された。非定型 EBV 胃癌の存在、及び新しい EBV 感染細胞株の樹立は、胃癌と EBV の関連を解析する貴重な材料となる。

#### A. 研究目的

EBV 関連胃癌の解明へ向けて EBV 感染胃癌細胞株の樹立を行い、それらの細胞株について細胞の性状及びウイルス感染の関わりを解析する。

#### B. 研究方法

##### 1. 方法

患者からの胃癌組織について、(1)癌部をヌードマウスへ移植、形成された腫瘍を *in vitro* で培養した。(2)同組織の非癌部を直接 *in vitro* で培養した。腫瘍原性は SCID マウスでの造腫瘍性で調べた。EBV-encoded RNA (EBER) は *in situ* hybridization 法、EBV nuclear antigen (EBNA) は蛍光抗体補体法、EBV-DNA はその末端繰り返し配列 (terminal repeat) をプローブとしたサザンブロット法、EBV 蛋白のはウエスタンブロット法を用い検出した。腫瘍組織は HE 染色にて観察した。

##### 2. 倫理面への配慮

我々は手術で摘出された胃癌細胞を外科医から分与受け、直接患者と関わらない。データ及び細胞株などに関しては、患者名 (またはそれを示唆する名) を用いない。情報公開 (学会や論文発表) により、患者の人権を侵害することはない。

#### C. 研究結果

1. 非定型 EBV 感染胃癌の検出: 本研究により従来の EBV 胃癌 (全ての胃癌細胞が EBER 陽性) と異なる非定型 EBV 胃癌の存在が見出された。

PCR での EBV DNA シグナルも弱く、EBER 陽性細胞はその胃癌にわずかに散在した。

2. 細胞株の樹立: (1)癌部を移植したヌードマウスで腫瘍 (PT) が形成されそれを培養して上皮様細胞株が得られた。(2)非癌部の培養からは、4 ヶ月で突然活発な細胞増殖が起り、上皮または繊維芽細胞様形態の細胞株 (PN) が樹立された。

3. EBV 感染状態: (1) EBNA 発現: ヌードマウスでの腫瘍 (PT) は EBNA 陰性、*in vitro* 継代 3 ヶ月後陽性へと転じ、継代 9 ヶ月後は再び EBNA 陰性となった。PN は樹立当時から陽性である。(2) EBV 再活性化: PN で EBV 前初期蛋白 (ZEBRA)、EBV 早期抗原 (EA-D) の発現が常に少数の細胞に検出された。PT では継代 3 ヶ月で ZEBRA, EA-D の発現が見られたがその後、それらは全く検出されなかった。(3) 内在 EBV DNA: 継代 3 ヶ月後 PT, PN で環状プラスミド EBV DNA が検出された。PN では EBV 増殖を示す線状 DNA が検出された。

4. 腫瘍原性: PN または PT 移植 SCID マウスで腫瘍が形成された。PT はヌードマウスで継代可能である。

#### D. 考察

1. EBV 感染胃癌 (全胃癌の 7%) は、全ての癌細胞が EBV 陽性である。本胃癌はほとんどの癌細胞が EBV 陰性である。このような EBV 胃癌が全胃癌に於てどのくらい存在するのかわかりにすることは今後の課題である。

2. 本 EBV 胃癌は EBV の "hit and run" 発癌の仮

説が示唆される。本胃癌及び、マウス腫瘍 PT では EBV 感染が極めて低いが、in vitro 継代 3 ヶ月で EBV 再活性化が見られ、再び EBV 感染が検出限界以下となった。この変化の過程を解析中である。

3. 非胃癌部からの EBV 感染細胞株 (PN) が樹立されたことは、GT38 及び GT39 (Tajima et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 262, 1998) と類似し、また細胞株における EBV 感染も潜伏感染 3 型で、胃癌に於ける潜伏感染 1 型とは異なっている。これらの細胞株の起源細胞は不明であるが、胃組織中に存在した EBV によりある標的細胞が in vitro でトランスフォームした可能性も考えられる。

## E. 結 論

非定型 EBV 胃癌の存在が明らかになった。その癌部及び非癌部から性状の異なる EBV 感染細胞株 (PT, PN) が樹立された。胃癌細胞及び EBV 感染上皮系細胞株を用いた EBV 発癌の研究モデルになると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Satoh, Y., Takasaka, N., Hoshikawa, Y., Osaki, M., Ohfuji, S., Ito, H. and Sairenji, T.: Pretreatment with restriction enzyme or bovine serum albumin for PCR amplification of Epstein-Barr virus DNA extracted from paraffin-embedded gastric carcinoma tissue. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3423-3425, 1998.
2. Yamauchi, Y., Tachibana, Y., Maeda, A., Wakiguchi, H., Usui, M., Kurata, T., and Sairenji, T.: Evaluation of antibodies to the Epstein-Barr virus immediate early gene product, ZEBRA by a new enzyme linked immuno-sorbent assay. *Intervirology* 41: 278-284, 1998.
3. Sairenji, T., Ohnishi, E., Inoue, S. and Kurata, T.: Induction of interleukin-10 on activation of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV infected B cell lines. *Viral Immunol.* 11: 221-231, 1998.

4. Takasaka, N., Tajima, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Katsumoto, T., Kurata, T. and Sairenji, T.: Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome-positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* 247: 152-159, 1998.
5. Satoh, T., Hoshikawa, Y., Satoh, Y., Kurata, T. and Sairenji, T.: The interaction of mitogen-activated protein kinases to Epstein-Barr virus activation in Akata B cells. *Virus Genes* 18: 57-64, 1998.
6. Sairenji, T. and Kurata, T.: Immune responses against Epstein-Barr virus infection. *Herpesvirus and Immunity*. Edited by Medveczky, P.G., Friedman, H., and Bendinelli, M. Plenum Press., NY and London, pp191-206, 1998.
7. 西連寺 剛: EB ウイルス: その普遍性と病原性をめぐって *米子医学雑誌* 49: 231-238, 1998.
8. Sairenji, T.: Epstein-Barr virus (EBV) infection and gastric carcinoma: The approach through EBV infected epithelial cell lines. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 110-112, 1999.
9. Gao, X., Tajima, M. and Sairenji, T.: Nitric oxide down-regulates Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology* 258: 375-381, 1999.
10. Izawa, M., Mori, T., Satoh, T., Teramachi, A. and Sairenji, T.: Identification of an alternative form of caspase-9 in human gastric cancer cell lines: a role of a caspase-9 variant in apoptosis resistance. *Apoptosis* 4: 321-325, 1999.
11. Kanamori, M., Tajima, M., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Miyazawa, Y., Okinaga, K., Kurata, T. and Sairenji, T.: Differential effects of TPA on cell growth and Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines derived from gastric tissues and B cell line Raji. *Virus Genes* (in press).
12. Ikuta, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y. and Sairenji, T.: Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy



adults and children. *Microbes and Infection* (in press).

13. Fukuda, M., Satoh, T., Takanashi, M., Hirai, K., Ohnishi, E., and Sairenji, T.: Inhibition of cell growth and Epstein-Barr virus(EBV) reactivation by CD 40 stimulation in EBV-transformed B cells. *Viral Immunol.*(in press).
14. 西連寺 剛: EB ウイルスの B 細胞内活性化機構、臨床と微生物 26: 471-475, 1999

## 2. 学会発表 国際学会

1. Sairenji, T., Tajima, M., Okinaga, K., Takasaka, N., Satoh, Y., Hoshikawa, Y. and Kurata, T.: "Characterization of Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-genome positive epithelial like cell lines derived from gastric tissues. "International Symposium Tumor Associated Herpesviruses. 8th International meeting of the EBV association (Program & Abstracts, p. 89), Stockholm, Sweden. June 12-16, 1998.
2. Sairenji, T.: "Epstein-Barr virus infection and lympho-proliferative diseases." The 5th Meeting of Transplantation and Immuno-regulation 21(Program & Abstracts, p. 26-36), Tokyo. November 7, 1998.
3. Sairenji, T., Takasaka, N., Murakami, M., Gao, X., Kanamori, M., Tajima, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Itoh, H. and Kurata, T.: "Epstein-Barr virus (EBV)-genome positive epithelial cell lines derived from gastric tissues and EBV infection." Herpesviruses and Human Cancer (U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Seminar) (Program & Abstracts, p.12), Hawaii, USA. January 24-25, 1999.
4. Sairenji, T.: "Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV - genome positive epithelial cell lines and the tumorigenesis in SCID mouse."
5. Second NHRI Conference on Tumor Associated Herpesviruses (Program & Abstracts, p. 8), Tayouan, Taiwan. May 8-9, 1999.

## 国内学会

1. 西連寺 剛: "B 細胞向性 EB ウイルスの潜伏感染と再活性化"

第 37 回日本血液学会中国四国地方会プログラム・抄録集, p. 7, (米子) 1998 年 1 月

2. 西連寺 剛: "EB ウイルスの潜伏・再活性化と生体応答"  
第 8 回 EB ウイルス感染症研究会プログラム・抄録集, p. 13, (東京) 1998 年 5 月
3. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: "EB ウイルス感染実態の PCR 法による検討"  
第 8 回 EB ウイルス感染症研究会プログラム・抄録集, p. 21, (東京) 1998 年 5 月
4. 西連寺 剛、高坂典子、佐藤幸夫、星川淑子、田島マサ子: "EBV 感染胃癌組織由来上皮系細胞株について"  
第 15 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 9, (徳島) 1998 年 5 月
5. 金森美紀子、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: "EBV 感染胃癌組織由来細胞株の増殖性の解析"  
第 15 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p.9, (徳島) 1998 年 5 月
6. 村上雅尚、星川淑子、佐藤幸夫、井藤久雄、田島マサ子、西連寺 剛: "EBV 感染胃癌組織由来上皮系細胞株の SCID マウスにおける移植性"  
第 15 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 9, (徳島) 1998 年 5 月
7. 佐藤幸夫、西連寺 剛: "EB ウイルス DNA の末端繰り返し配列の解析"  
第 15 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 10, (徳島) 1998 年 5 月
8. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: "EBV 感染の PCR 法を用いた検索"  
第 15 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 10, (徳島) 1998 年 5 月
9. 福田 誠、佐藤智久、西連寺 剛: "CD40 刺激による EBV 感染 B 細胞株の増殖抑制効果"  
第 15 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 10, (徳島) 1998 年 5 月
10. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: "PCR 法での EB ウイルス感染の検出について"  
第 13 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 21, (富山) 1998 年 5 月
11. 福田 誠、佐藤智久、高梨正勝、平井莞二、

- 大西英子、西連寺 剛:"B 細胞表面 CD40 シグナル伝達を介する細胞増殖の抑制と EB ウイルスの活性化機構"  
第 13 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p49, (富山) 1998 年 5 月
12. 佐藤智久、福田 誠、西連寺 剛:"EB ウイルス感染細胞株における MAP キナーゼのリン酸化様式"  
第 13 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p50, (富山) 1998 年 5 月
13. 村上雅尚、星川淑子、佐藤幸夫、田島マサ子、冲永功太、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛:"EB ウイルス感染上皮系細胞株の SCID 及びヌードマウスにおける移植性"  
第 13 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 51, (富山) 1998 年 5 月
14. 佐藤幸夫、星川淑子、倉田 毅、西連寺 剛:"EBV DNA の末端繰り返し配列 (TR) からのウイルスの潜伏及び増殖性の解析"第 46 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集 p. 256 (東京) 1998 年 10 月
15. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺剛:"健康人における EB ウイルス感染実態の検討"  
第 46 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 258 (東京) 1998 年 10 月
16. 村上雅尚、星川淑子、田島マサ子、佐藤幸夫、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛:"胃癌組織由来 EB ウイルス感染上皮系細胞株の SCID マウス皮下への移植"  
第 46 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 261 (東京) 1998 年 10 月
17. 佐藤智久、福田 誠、西連寺 剛:"B 細胞における EBV 感染と MAPK のリン酸化"  
第 46 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 279 (東京) 1998 年 10 月
18. 福田 誠、佐藤智久、高梨正勝、平井莞二、大西英子、西連寺 剛:" EBV 感染 B 細胞における CD40 からの細胞増殖抑制と EBV 再活性化機構"  
第 46 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 279 (東京) 1998 年 10 月
19. 金森美紀子、佐藤幸夫、星川淑子、田島マサ子、西連寺 剛:"EBV 感染上皮様細胞株の細胞生物学的及びウイルス学的性状"  
第 46 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 281 (東京) 1998 年 10 月
20. 西連寺 剛:"EBV の潜伏感染と再活性化"  
第 9 回感染研シンポジウムプログラム・抄録集, p. 5 (東京) 1999 年 5 月
21. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛:"健康人における EB ウイルス感染の再評価"  
第 9 回 EB ウイルス感染症研究会プログラム・抄録集, p. 8 (東京) 1999 年 5 月
22. 西連寺 剛、大西英子、小山佳久、山西弘一、倉恒弘彦、倉田 毅:"慢性疲労症候群 (CFS) と EB ウイルス感染の関わりについて"  
第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 20 (広島) 1999 年 5 月
23. 星川淑子、佐藤幸夫、村上雅尚、金森美紀子、西連寺 剛、貝原信明、井藤久雄:"胃癌における EBV の感染実態とその感染様式"  
第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 20 (広島) 1999 年 5 月
24. 金森美紀子、高橋朋子、田中公夫、鎌田七男、田島マサ子 西連寺 剛:"FISH 法を用いた細胞内 EBV DNA の解析"  
第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 21 (広島) 1999 年 5 月
25. Xiangrong Gao、田島マサ子、西連寺 剛:"Nitric Oxide Down-Regulates Epstein-Barr Virus Reactivation in Epithelial Cell lines"  
第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 21 (広島) 1999 年 5 月
26. 斎藤夕絵、星川淑子、村上雅尚、西連寺 剛:"EBV 前初期遺伝子蛋白 ZEBRA の 186 番目セリンのアラニンへの置換と EBV 活性化誘導能の消失について"  
第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 22 (広島) 1999 年 5 月
27. 福田 誠、田島マサ子、西連寺 剛:"胃癌組織由来 Epstein-Barr ウイルス感染上皮細胞株に対する transforming growth factor- $\beta$  の及ぼす影響について"  
第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 23 (福岡) 1999 年 6 月
28. 金森美紀子、高橋朋子、田中公夫、田島マサ

- 子、鎌田七男、西連寺 剛: "EBV 感染上皮細胞株における EB ウイルスの存在様式"  
第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 24 (福岡) 1999 年 6 月
29. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: "健康人における EB ウイルス感染の多様性"  
第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 42 (福岡) 1999 年 6 月
30. 村上雅尚、星川淑子、貝原信明、井藤久雄、倉田毅、西連寺 剛: "胃癌組織からの新たな EBV ウイルス感染上皮様細胞株の樹立とその性状"  
第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 53 (福岡) 1999 年 6 月
31. 金森美紀子、鎌田七男、田島マサ子、沖永功太、宮澤幸久、西連寺 剛: "EBV 感染上皮細胞株における EB ウイルス DNA コピー数の変動"  
第 58 回日本癌学会総会プログラム・抄録集, p. 438 (広島) 1999 年 9 月~10 月
32. 村上雅尚、貝原信明、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛: "胃癌組織由来の新たな EBV 感染上皮細胞株の樹立 "  
第 58 回日本癌学会総会プログラム・抄録集, p. 439 (広島) 1999 年 9 月~10 月
33. 天白 晶、佐藤幸夫、原田信志、西連寺 剛: "EB ウイルスエンベロップ蛋白 gp350/220 遺伝子 BLLF-1 の欠失について"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 93 (横浜) 1999 年 11 月
34. 福田 誠、田島マサ子、西連寺 剛: "胃癌組織由来 EBV 感染上皮細胞株に対する TGF- $\beta$  1 刺激による細胞増殖及び潜伏感染 EBV 再活性化に及ぼす影響"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 100 (横浜) 1999 年 11 月
35. 星川淑子、佐藤幸夫、村上雅尚、金森美紀子、井藤久雄、西連寺 剛: "EBV 陽性胃癌における EBV 遺伝子発現"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 101 (横浜) 1999 年 11 月
36. 金森美紀子、田島マサ子、佐藤幸夫、星川淑子、宮澤幸久、沖永功太、倉田 毅、西連寺 剛: "TAP は低濃度で細胞増殖を促進し、高濃度で EB ウイルスを活性化する"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 102 (横浜) 1999 年 11 月
37. 高 祥栄、田島マサ子、西連寺 剛: "上皮系細胞株に恒常的に発見される NO は EBV の再活性化を抑制する"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 102 (横浜) 1999 年 11 月
38. 斎藤夕絵、星川淑子、佐藤幸夫、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛: "186 番目セリン変異体 ZEBRA における EBV 活性化誘導能の消失とエレクトロポレーションによる EBV 再活性化"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 103 (横浜) 1999 年 11 月
39. 村上雅尚、星川淑子、佐藤幸夫、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛: "一つの胃癌組織から樹立された 2 つの EB ウイルス感染細胞株について"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. (横浜) 1999 年 11 月
40. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: "EB ウイルス感染の唾液、血清中抗体及び末梢リンパ球からの検討"  
第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 255 (横浜) 1999 年 11 月
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

## 4. 婦人科腫瘍とヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型に関する研究

分担研究者 松倉 俊彦 国立感染症研究所・主任研究官

**研究要旨** 子宮頸部異形成 (CIN) と性器関連ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus : HPV) との関連を、新鮮凍結組織を用い、PBM-58 法により検索した。その結果、322 例中 304 例 (94%) の CIN に各々一種の HPV 型を検出出来た。更に、CIN の異形の程度と 41 種の HPV 型との関連を調べた結果、HPV は 3 群に分類された。I 群 : HPV6,7,11,13,32,40,42,43,44,55, 61,62,71,72,74,81,83 は CIN I にのみ検出された。II 群 : HPV 18,26,30,34,39,45,51,53,54, 56,59,66,68,69,70,73,82 は CIN I 及び II に検出されたが、CIN III には稀であった。III 群 : HPV16,31,33,35,52,58,67 はほとんどの CIN III に検出された。このことから、限られた HPV 型のみが CIN III に関与していると考えられた。

### A. 研究目的

子宮頸部癌及びその前癌病変の検出は厚生行政の一幹として、癌検診によつて成されている。しかし、これらの病変にヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus : HPV) が関与することが明らかにされつつある現在、HPV 検索が従来の細胞診を補強する手段、あるいは、より確実な手段と考えられている。しかしながら、多様な性器関連 HPV 型と種々の子宮頸部異形成 (CIN) との関連は明確にされていない。

本研究は CIN に存在する HPV 型を検索し、異形の程度と HPV 型の関連を明らかにする事を目的とした。

### B. 研究方法

検体は採取時に二分割し、一部はホルマリン固定後パラフィン包埋して、通常の病理組織学的検査により、軽・中・高度異形成(CIN I・CIN II・CIN III)に三分類した。

一方、凍結した残りの組織より DNA を抽出し、PBM-58 法を用いて HPV DNA 検出及び型同定をおこなった。報告されている 80 種の HPV 型うち 41 種の性器関連 HPV 型を対象とした。また、全塩基配列の比較によつて、これらの HPV 型を 3 群・10 グループに分類し、データを整理した (表—1)。

(倫理面への配慮)

当該産婦人科医によつて全ての研究対象者のインフォームドコンセントは得られている。

### C. 研究成果

322 例の CIN を調べた結果、304 例 (94%) に各々一種の HPV 型を検出した。その内、CIN I は 84/87 (96%)、CIN II 及び III は各々 85/90(94%)、135/145(93%) であつた。いずれの HPV 型もプロトタイプ of PstI, BanI, および MspI 切断パターンを保持していたことから、HPV の全長遺伝子が安定した状態で病変組織中で増幅し、一細胞当たり少なくとも 50 コピーは存在しているものと考えられた。

一方、CIN に検出された全ての HPV 型を 3 群・10 グループに分類し整理したところ、各群が異形の程度と相関した状況で検出されている事が判明した (図—1)。即ち、I 群 (HPV6,7,11,13,32,40,42,43,44,55,61,62,71,72,74,81,83) は CIN I (11/84, 13%) にのみ検出された。また、II 群 (HPV18,26,30,34,39,45,51,53,54,56,59,66,68,69,70,73,82) は CIN I (35/85, 40%) 及び CIN II (18/85, 21%) に存在するが、CIN III にはほとんど検出されなかつた (7/135, 5%)。一方、III 群 (HPV16,31,33,35,52,58,67) のみがほとんどの CIN III (128/135, 95%) に検出された。この事から、CIN の異形の程度は感染している HPV 型によつて支配されることが強力に示唆され、限られた HPV 型が CIN III に関与していると考えられた。

### D. 考察

CIN と HPV 型の関連については長い間追求されてきているが未だに明確にされていない。その理由として、ほとんどの研究がスメア—検体を PCR 法によつて解析してきた事があげられる。こうした検索では一検体に複数の HPV 型が同定されていて、病変