

200/0152

厚生労働省  
平成13年度

ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と  
免疫学的治療法の開発に関する研究班

研究報告書

平成14年3月

主任研究者 佐多徹太郎  
(国立感染症研究所感染病理部)

## 目 次

1. ヒト癌ウイルスによる発癌の分子機構と免疫学的治療法の開発に関する研究  
総括研究報告書（平成 13 年度） . . . . . 1  
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所 感染病理部長）
  
2. ヒトヘルペスウイルス 8 の病原性に関する研究 . . . . . 8  
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）  
共同研究者：片野 晴隆、佐藤 由子（国立感染症研究所感染病理部）
  
3. EB ウイルス (EBV) と発がん：EBV 感染上皮細胞株の TGF- $\beta$ 1 に対する非応答機構の  
解析に関する研究 . . . . . 14  
分担研究者：西連寺 剛（国立感染症研究所感染病理部）
  
4. アダプター型癌遺伝子 Crk による発癌機構に関する研究 . . . . . 17  
分担研究者：松田 道行（国立感染症研究所感染病理部）
  
5. 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 . . . . . 19  
分担研究者：松倉 俊彦（国立感染症研究所ウイルス 2 部）
  
6. 成人 T 細胞白血病に対する免疫療法および免疫予防法の開発 . . . . . 21  
分担研究者：牧野 正彦（国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部）

# I. 総括研究報告書

# 1. ヒトがんウイルスによる発癌の分子機構と免疫学的治療法の開発

主任研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

**研究要旨：**ヒトウイルスが発癌に及ぼす影響、発癌機構、さらに免疫系による腫瘍細胞排除機構を解析することを目的とし、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、Epstein-Barrウイルス（EBV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）、そしてCT10レトロウイルスのCrk癌遺伝子に関する研究を行った。その結果、1) HHV-8関連疾患におけるHHV-8の潜伏感染タンパクLANAとp53の関連、およびHHV-8の前初期タンパクORF50の発現について検討し、HHV-8関連腫瘍では、p53が高発現しているにも拘わらずこれらの病変部にはアポトーシスが起きていないことを示した。2) 胃組織由来EBV感染上皮細胞株GT38及びGT39が、多量のTGF- $\beta$ 1を産生し、TGF- $\beta$ 1による増殖抑制及びアポトーシスに対して非応答性を示すが、高濃度でEBV再活性化が誘導されることを見出した。細胞増殖抑制の非応答機構として、GT38ではErk1,2の恒常的リン酸化及びp21発現が見られた。このGT38で見られるTGF- $\beta$ 1/MAPK経路の異常はEBVがん遺伝子蛋白LMP-1の発現によって誘導されることを明らかにした。3) 子宮頸部腺癌及び腺扁平上皮癌とヒト乳頭腫ウイルス（HPV）遺伝子型との病因学的関連を明確にするためにHPV DNAの存在を調べた。全ての方法で検出されたのは腺癌34例1例、腺扁平上皮癌9例中3例に過ぎず、何れもHPV16型の全長遺伝子が一細胞当たり200コピー以上検出された。in situ hybridization法による組織内分布は、腺癌の一部の癌細胞の核のみが陽性であり、腺扁平上皮癌では何れも扁平上皮様癌部が陽性で、腺様細胞癌部は陰性であったため、腺癌発生にHPVの関与は少ないものと結論された。4) 成人T細胞白血病（ATL）患者末梢血単球由来樹状細胞（DC）の機能異常を補うため、DCと抗原であるHTLV-I感染T細胞を融合させ、その抗原提示能を検索した。fusion DC-T細胞はHTLV-I感染DCに比し、MHC class IおよびCD86抗原を強く発現し、自己のCD4およびCD8 T細胞を強く活性化させた。さらに、HTLV-I感染T細胞を8-Azaguanine存在下で作成すると、HTLV-I抗原をより強く発現し、DCと融合させるとより強くCD8 T細胞活性化させた。従って、fusion DC-T細胞はATLに対する免疫療法として有効である可能性が示唆された。5) CT10レトロウイルスの癌遺伝子Crkの活性化機構を解析するために、Crkの活性化を調べるバイオプローブを改良し、細胞内でのCrkのリン酸化の様子を画像化した。今後これらの成果を発展させ、上記目的を達したい。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

佐多徹太郎 国立感染症研究所・感染病理部長  
西連寺 剛 国立感染症研究所・感染病理部研究員  
松田 道行 国立感染症研究所・感染病理部研究員  
松倉 俊彦 国立感染症研究所・ウイルスII部主任研究官  
牧野 正彦 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター病原微生物部長

## A. 研究目的

ヒトウイルスが発癌に及ぼす影響、発癌機構、さらに免疫系による腫瘍細胞排除機構を解析すること

を目的とする。研究対象としたウイルスは、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、Epstein-Barrウイルス（EBV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）、そしてCT10レトロウイルスで、それぞれ癌の発生と関与することが示されてきている。

ウイルスが関与する癌は免疫学的ないしウイルス学的手法により、予防治療を確立することが可能と考えられる。そのためにはウイルスが癌の発生にどのような役割を果たしているかを明らかにすることが必要で、ウイルス感染と癌化との因果関係が明らかにされれば、ウイルスはワクチンにより予防可能

となり、関連癌におけるウイルス抗原の発現検出は癌の早期発見にも役立つ。高齢化社会においてこれらのウイルスが関与する癌の発生が増加することが予想されるので、本研究は国民の健康と医療費の削減に寄与しうるものと考えられる。

ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) は 1994 年にエイズに合併するカポジ肉腫から発見された新しい  $\gamma$  2 ヘルペスウイルスであり、カポジ肉腫や原発性体腔液性リンパ腫 primary effusion lymphoma から高率に検出され、これらの悪性腫瘍の原因ウイルスと考えられている。HHV-8 の潜伏感染タンパクである ORF73 (latency-associated nuclear protein, LANA) はカポジ肉腫と PEL の細胞には必ず発現しており、このことは HHV-8 関連悪性腫瘍では HHV-8 は常に潜伏感染状態にあり、LANA が HHV-8 関連悪性腫瘍の形成に関与していると考えられる。p53 と LANA の関連について明らかにされてきたことは全て *in vitro* の実験系であり、カポジ肉腫の組織で p53 と LANA の発現と細胞死の関連を検索した報告はない。そこでカポジ肉腫、PEL、HHV-8 関連固形リンパ腫の組織を用いて、p53、LANA の発現と細胞死の関連を検索した。

胃癌における EBV の発がんにおける役割を明らかにする目的で、EBV 関連胃癌における感染細胞の増殖を調節する因子として TGF- $\beta$  1 の作業仮説をたて、それを胃 (癌) 組織から樹立された細胞株 GT38 及び GT39 を用いて解析を試みた。

子宮頸部腺癌及び腺扁平上皮癌に存在するヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus : HPV) を種々の DNA 検出法を用いて検索し、病因 HPV 型を同定した。

成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する免疫療法の開発を目的として樹状細胞 (DC) に着目し、ATL 患者において DC は機能低下状態にあることを明らかにしてきた。DC を用いた ATL に対する免疫療法を開発するには、DC の抗原提示能を改善することが不可欠である。そこで DC と抗原である HTLV-I 感染 T 細胞を *in vitro* で人為的に融合させ (fusion DC-T 細胞)、その抗原提示能を検索した。

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ために、Crk の活性化が生細胞でどのように起きるかを観察できるバイオプローブを開発し、Crk の活性の様子を画像化した。

## B. 研究方法

1) **HHV-8** : カポジ肉腫 26 例、HHV-8 関連固形リンパ腫 1 例、PEL 細胞株 3 株、免疫不全マウスに移植してできた HHV-8 関連固形リンパ腫 1 例につき、免疫組織化学染色で LANA と p53 の局在、および、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法でアポトーシスの存在を調べた。患者検体は全てホルマリン固定・パラフィン包埋病理標本で、LANA の検出にはウサギポリクローナル抗体を、p53 の検出にはマウスモノクローナル抗体 DO-7 を用いた。HHV-8 陽性細胞株 (TY-1, BCBL-1, KS-1) では蛍光免疫染色法を用いて LANA、p53 を検出した。細胞内での LANA と p53 の局在を調べるために、一次抗体反応後に FITC または Texas Red 標識の二次抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

また、カポジ肉腫 16 例、HHV-8 関連固形リンパ腫 1 例および PEL 細胞株より DNA を抽出し、HHV-8 DNA の存在の確認と p53 の変異を検索した。HHV-8 DNA の存在の確認には HHV-8 の KS330 の領域のうち 233bp を PCR 法で、また p53 の変異については p53 DNA の exon5-6 と exon7-9 を別々に PCR で増幅し、その産物につき direct sequence 法にて核酸配列を決定した。

2) **EBV** : GT38、GT39 細胞株及び TGF- $\beta$  1 感受性 HSC-39 胃癌細胞株を用いた。TGF- $\beta$  1 mRNA はノザンプロットティング、TGF- $\beta$  1 の活性は、HSC-39 細胞へ添加培養し細胞増殖が抑制される割合を、MTT アッセイにより定量した。TGF- $\beta$  1 によって誘導される JunB、PAI-1 mRNA の発現をノザンプロットティング、TGF- $\beta$ /MAPK 経路活性化は、Erk1、2 のリン酸化をウェスタンプロットティングで、p21 発現は、ウェスタンプロットティング及び p21 プロモーター連結ルシフェラーゼ活性により解析した。

3) **HPV** : 子宮頸部腺癌 34 例及び腺扁平上皮癌 9 例の組織検体を各々二分割し、一部から DNA を抽出し、HPV の L1 遺伝子を認識する異なる二種類のプライマー系 (MY と LC) を用いた PCR を行い、産物の RFLP と sequencing で HPV 型を同定した。また、Southern blot hybridization を行い HPV 遺伝子の長さ及び存在様式を調べた。一方、ホルマリン固定しパラフィン包埋した組織切片を用い HPV DNA の組織内極在を *in situ* hybridization 法により調べた

4) **HTLV-1** : 正常健常者末梢リンパ球の供与を受け

リンパ球を分離した後、プラスチック付着性単球を得て、recombinant (r) GM-CSF と rIL-4 を用い DC を分化誘導した。DC の抗原提示能は、自己の T 細胞の活性化能で検索した。各 T 細胞サブセットは、magnetic beads 付着モノクローナル抗体を用いて negative selection 法で精製した。DC と HTLV-I 感染 T 細胞は、50% ポリエチレングリコール存在下で融合させた (fusion DC-T 細胞の作成)。DC・T 細胞および fusion DC-T 細胞表面抗原の解析は、FACScalibur (Becton-Dickinson) を用いて行った。

5) CT10 レトロウイルスの Crk 癌遺伝子：緑色蛍光蛋白 (GFP) の黄色変異体 (YFP) および青色変異体 (CFP) を Crk の両側に結合させた分子プローブ Picchu については昨年度に報告した。この Picchu の C 末端に K-Ras 蛋白の CAAX ドメインを融合させた分子プローブを、定法に従い作成し、Picchu-X と命名した。サル腎由来の COS 1 細胞に pPicchu および pPicchu-X をトランスフェクトし、24 時間後から血清飢餓を 6 時間かけたのちに、上皮細胞増殖因子受容体を 10 ng/ml になるように加え、タイムラプス蛍光顕微鏡にて解析した。上記 COS 1 細胞を、オリンパス共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

実験に用いたカボジ肉腫組織、胃癌組織、子宮膣頸部組織そして末梢血は、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明しインフォームド consent を得て採取された。胃癌組織については鳥取大学医学部倫理委員会承認済で、直接患者とは関らないこと、およびデータないし細胞株に関して個人が特定されないよう配慮した。また、遺伝子組換え実験は当該施設 (国立感染症研究所) の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

### C. 研究結果

1) **HHV-8**: カボジ肉腫の腫瘍細胞には LANA の発現が高率に認められた。p53 の発現は CSA 法を用いた免疫組織染色では結節期カボジ肉腫細胞の 3 割以上腫瘍細胞に高発現していることがわかった。一方、非腫瘍部分の細胞には検出されなかった。また同じ標本において、カボジ肉腫細胞および HHV-8 関連固形リンパ腫においても TUNEL 法でアポトーシスは全く検出されなかった。さらに LANA と p53 の発現

とその細胞内における局在を確かめるために、HHV-8 感染リンパ腫細胞株で免疫蛍光染色を行った。その結果、HHV-8 感染リンパ腫細胞株 TY-1 では LANA の発現部位は p53 の発現部位に含まれ、HHV-8 感染細胞内における LANA と p53 の関連を示唆した。また本細胞株に血清非添加培地を用いた培養を行いアポトーシスを誘導すると、LANA が高発現する細胞では p53 も同様に局在が一致したまま高発現した。さらにアポトーシスに陥ってしまった細胞では LANA も p53 もともに発現が低下し、どちらか一方だけが発現している細胞は見られない。またカボジ肉腫、リンパ腫、細胞株において p53 DNA の変異を検索したところ、変異型 p53 に頻繁に認められる exon5-9 の変異はまったくみられなかった。

2) **EBV**: GT38、GT39 は TGF- $\beta$  1 レセプターを発現するが、TGF- $\beta$  1 に対して細胞増殖が抑制されず、アポトーシスもほとんど起らないが、高濃度の TGF- $\beta$  1 により潜在 EBV が再活性化された。両細胞株は TGF- $\beta$  1 を産生し、培養上清は自身の細胞増殖は抑制しないが TGF- $\beta$  1 感受性 HSC-39 の増殖を抑制した。その抑制は抗 TGF- $\beta$  1 抗体により部分的に阻害された。TGF- $\beta$  1 のシグナル伝達において HSC-39 は TGF- $\beta$  1 刺激により JunB 及び PAI-1 mRNA の発現が増強された。しかし、GT38 は JunB mRNA の発現は増強されたが、PAI-1 mRNA の発現なく、そのシグナル伝達の異常が示された。さらに GT38 には、Erk1、2 の恒常的リン酸化及び p21 の発現がみられたが、TGF- $\beta$  1 刺激でそれらの増強が見られなかった。この TGF- $\beta$  1 に依存する増殖抑制に対する非応答性機構は、TGF- $\beta$  1/MAPK 経路の恒常 (異常) 発現による p21 発現誘導低下の関与が示された。TGF- $\beta$  1/MAPK/p21 のシグナル伝達の異常は LMP1 Erk. 1, 2 の恒常的リン酸化を誘導する ras 変異蛋白 (Ras 12V) を導入した HSC-39 で全く同様に起こることが明らかにされた。TGF- $\beta$  1 による EBV 再活性化は、U0126 で抑制されないことから、EBV 再活性化は TGF- $\beta$  1/MAPK/p21 以外の経路を介すと考えられた。

3) **HPV**: MY プライマーにより、18 例の腺癌に 8 種類の HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 33, 52, 58, 61) が、7 例の腺扁平上皮癌に 3 種の HPV (HPV 16, 18, 58) が単独ないし複数同定された。一方、LC プライマーにより、22 例の腺癌に 14 種類の HPV (HPV 6, 16, 18, 33, 34, 35, 45, 52, 53, 56, 59, 61, 62, 82) が、8 例の腺

扁平上皮癌に3種のHPV (HPV 16, 18, 53) が同様に検出された。PCR法で検出されたHPV型をプローブとしてSouthern blot hybridization法で検索した結果、一例の腺癌と3例の腺扁平上皮癌にのみ、何れもHPV 16型が検出された。4例とも一細胞当たり200コピー以上のHPV全長遺伝子を保持していて、1例の腺扁平上皮癌を除き、細胞DNAに組み込まれていない遊離状態であった。1症例当たり可能な限り多くの異なるパラフィン組織切片について、PCR法で検出された全てのHPV型をプローブとしてin situ hybridizationを行った。その結果、Southern blot hybridization法でもHPV16型陽性の4症例は何れも明瞭な陽性反応を示した。腺癌の1例にあつては癌部の細胞の核が濃染されたが、全ての癌部癌細胞ではなかった。また腺扁平上皮癌の3例では何れも腺様癌細胞は陰性であったが、扁平上皮様癌細胞の核が濃染された。一方、PCR法によってのみ検出された多数の他のHPV型は数症例で一部の癌細胞の核が点状に染色されたにすぎなかった。さらに、特筆すべきは、PCR法によりHPV18型が検出された9例の腺癌において、腺・扁平上皮移行部の正常腺細胞の核のみが点状に染色された。

4) HTLV-1 : DCとHTLV-I感染T細胞の融合効率をCD2抗原の発現により検索した結果、融合効率は50%と考えられた。fusion DC-T細胞表面を解析すると、抗原提示に関わるほぼ全ての抗原を発現し、MHC class IおよびCD86抗原がより強く発現していた。fusion DC-T細胞の抗原提示能を検索すると、自己のCD4およびCD8陽性T細胞を活性化させた。さらにPHA刺激活性化T細胞とDCを融合させたが、T細胞は活性化しなかった。従って、fusion DC-T細胞はHTLV-I抗原特異的にT細胞を活性化させると考えられた。また、代謝拮抗剤である8-Azaguanine存在下でHTLV-I感染細胞を作成したところ、感染T細胞上のHTLV-Igag抗原の発現は増強し、DCと融合させるとfusion DC-T細胞の抗原提示能はさらに増強した。

5) CT10レトロウイルスのCrk癌遺伝子 : PicchuをCOS細胞に発現させ、血清飢餓の後、上皮細胞増殖因子にて刺激した。すると、刺激後5分をピークとするCrkリン酸化が、細胞質全体に現れ、30分以上持続したが、HT1080細胞ではすみやかにリン酸化が消失していった。この実験においてはCrkのリン酸化がどこで始まっているのかは明らかではな

かった。そこで、PicchuのC末端側にRasのCAAXボックスを結合させたPicchu-Xを作成した。これはプローブを細胞膜にとどめることにより、リン酸化がどこでおきるのかを識別しやすくする目的と、細胞質のプローブを除くことによりS/N比を向上させるという目的がある。Picchu-XをCOS細胞に発現させ、上皮細胞増殖因子で刺激した。今度は、細胞の辺縁部よりCrkのリン酸化が始まり核へ向けてリン酸化が進んでいくのが観察された。逆に、脱リン酸化は核周囲から始まり、辺縁部の細胞膜でのリン酸化は最後まで残った。20 ng/mlの上皮細胞増殖因子で刺激した場合、Picchuを用いた観察ではCrkのリン酸化は9分で最高に達したのに対し、Picchu-Xでは3分で最高に達した。以上の結果はPicchu-XがS/N比、時空間解像度ともに昨年開発したPicchuよりも向上していることを示している。

#### D. 考察

1) HHV-8 : HHV-8感染細胞ではLANAとp53の局在が一致している状態で発現していることが明らかになった。またHHV-8関連悪性腫瘍内ではp53の変異は認められずアポトーシスがまれであることが示された。これらのデータはこれまで発表されてきたLANAがp53と結合し、p53関連のアポトーシスを抑制するとした*in vitro*の実験データを*in vivo*においても支持するものである。また今までカポジ肉腫におけるp53の発現は初期病変のみであるとするものや結節期病変に強発現とする報告などがあり明らかではなかった。CSA法を用いた我々の研究ではp53はカポジ肉腫のどの段階でも正常細胞と比べると発現が強いことが明らかになった。ここで発現されているp53は変異がない正常型のものであり、本来であればp53はアポトーシスを誘導する方向に働く。しかしHHV-8関連悪性腫瘍ではアポトーシスはほとんど起きていない。このことはウイルスタンパクがp53のアポトーシスを間接的あるいは直接的に抑制していることが考えられ、LANAがもっともその有力な候補であることが示唆された。ウイルスタンパクでこのような多彩な働きを持つタンパクは他に報告がなく、HHV-8の造腫瘍性における特殊な機構かもしれない。

2) EBV : 胃組織由来EBV感染上皮系細胞株が、TGF- $\beta$ 1を産生し、TGF- $\beta$ 1による増殖抑制に非応答性を示す一方、潜在EBVはTGF- $\beta$ 1により再活性化

が起ることが明らかにされた。本結果は、細胞は EBV 感染によりシグナル伝達異常を来し、TGF- $\beta$ 1 増殖抑制に耐性を獲得し、TGF- $\beta$ 1 存在下で増殖し、TGF- $\beta$ 1 を産生することにより TGF- $\beta$ 1 感受性細胞の増殖を抑制する。しかし、TGF- $\beta$ 1 は感受性細胞 EBV 再活性化を伴い排除され、感染細胞のクローナル選択的増殖が誘導されるという我々の仮説を支持する。EBV 発がんにおける TGF- $\beta$ 1 の関りと、TGF- $\beta$ 1 のシグナル伝達を抑制する LMP1 蛋白の機能が明らかにされた。

3) HPV：子宮頸癌は組織型を問わず HPV が起因子とされ、特に腺癌は HPV18 型が引き起こすと考えられ、その根拠とされる研究は *in situ hybridization* 法か PCR 法のどちらかによつてのみ示されてきた。これらの方法では HPV の遺伝子の長さ、コピー数、存在様式を知る事は出来ない。一方 PCR 法では正常頸部にも種々の HPV 型が検出され、婦人下部性器に多様な HPV が遍在している事は明らかである。HPV の感染から発癌に至る長期の過程を考慮すれば、PCR 法で癌組織に検出された HPV が癌の起因子とするのは危険であろう。最近、世界保健機構はワクチンによる頸癌撲滅に動きだし、HPV 16 型と共に我々が日本人の頸癌からクローニングした HPV58 型を含む多価ワクチンの開発研究が始まった。今後、子宮頸部扁平上皮癌の病因 HPV 型を明らかにすることが有効なワクチンの作成、さらには HPV による発癌機構の解明に最重要課題と考える。

4) HTLV-1：HTLV-I キャリアーでは cytotoxic T lymphocytes (CTL) が働き、ATL 細胞の増殖を抑制していると考えられるので、ATL の免疫療法として最も有効と想定される方法は効率良い CTL の誘導であり、CTL の活性化には抗原提示細胞の存在が不可欠である。しかし、ATL においては DC の機能低下が観察されているので、本研究では DC の機能を修復する目的で成熟化 DC と HTLV-I 感染 T 細胞との融合細胞 (fusion DC-T 細胞) を作成した。DC とこのウイルス感染 T 細胞の融合効率は 50% と高く、DC に抗原をパルスするには充分な方法と考えられた。また、fusion DC-T 細胞は HTLV-I 感染 T 細胞より MHC class I および CD86 抗原を強く発現し、CD8 T 細胞の活性化に適していた。また、8-Azaguanine 存在下で HTLV-I を感染させると T 細胞へのウイルス抗原の発現を増強することが可能であったので、本研究で用いたシステムは、ATL に対する免疫療法

の一つとして有効であるものと考えられた。

5) CT10 レトロウイルス：癌遺伝子の研究はこれまで遺伝学的手法と生化学的手法を用いて進められてきたが、細胞内でのいつ、どこで癌遺伝子の活性が変化しているのかを捉えることはできなかった。FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を用いた分子プローブは、蛋白の構造変化を捉えることができるため、癌遺伝子の活性を生きた細胞で観察するのに至適なツールとなる。Picchu を用いたリン酸化 Crk の分布は、Crk が細胞膜からリン酸化されると速やかに細胞質内に拡散するというこれまでの生化学的な予想とほぼ同じであった。本年度はさらに、リン酸化がどこで起きているか、を明らかにするためにプローブの改良を行い、CAAX ボックスをつけることにより Crk のリン酸化が細胞膜で起きている様子を画像ができた。このことは、プローブを細胞内の限局した場所のみ発現させることが S/N 比向上のために重要であることを改めて示した。Crk は癌遺伝子 Abl により高い効率でリン酸化されることから、このプローブは将来的には、慢性白血病など Abl の活性化が認められる癌において診断に使える可能性もあるので現在検討中である。

## E. 結論

- 1) HHV-8 LANA の発現が腫瘍細胞の細胞死を防ぎ、腫瘍化に関連することが *in vivo* でも明らかになった。これらの結果は HHV-8 の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与える知見である。
- 2) EBV 感染上皮細胞株は TGF- $\beta$ 1 産生し TGF- $\beta$ 1 耐性を示す。その耐性は TGF- $\beta$ 1 からの MAPK/Erk1, 2/p21 シグナル伝達の異常であり、それは EBV 遺伝子蛋白 LMP1 によって誘導される。
- 3) 子宮頸部腺癌発生に HPV の関与は少ない事が明確になった。また、腺扁平上皮癌においても腺様癌部発生に HPV の関与はないと考えられた。
- 4) ATL 患者樹状細胞の機能障害を改善するためには、DC と HTLV-I 感染 T 細胞の融合細胞が有効であった。
- 5) CT10 ウイルスの癌遺伝子 Crk の産物のリン酸化状態を生細胞でモニターするプローブを改良し、Crk リン酸化の様子を画像化した。

## F. 健康危険情報

とくにない。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Foreman, K.E., Friborg, J., Chandran, B., Katano, H., Sata, T., Mercader, M., Nabel, G.J. and Nickoloff, B.J. Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions. *J Dermatol Sci* 26: 182-93, 2001.
- 2) Dilnur, P., Katano, H., Wang, Z.H., Kudo, M., Osakabe, Y., Sata, T. and Ebihara, Y. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 51: 845-852, 2001.
- 3) Nuvor, S.V., Katano, H., Ampofo, W.K., Barnor, J.S. and Sata, T. Higher prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 362-4, 2001.
- 4) Meng, Y.X., Sata, T., Stamey, F.R., Voevodin, A., Katano, H., Koizumi, H., Deleon, M., De Cristofano, M.A., Galimberti, R. and Pellett, P.E. Molecular Characterization of Human Herpesvirus 8 Strains from Japan, Argentina, and Kuwait. *J Gen Virol* 82: 499-506, 2001.
- 5) Katano, H., Sato, Y. and Sata, T. Expression of p53 and human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen (LANA) with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* 92: 3076-3084, 2001.
- 6) Sakurada, S., Katano, H., Sata, T., Ohkuni, H., Watanabe, T. and Mori, S. Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission. *J Virol* 75: 7717-22., 2001.
- 7) Sato-Matsumura, K.C., Matsumura, T., Nabeshima, M., Katano, H., Sata, T. and Koizumi, H. Serologic and Immunohistochemical Detection for Human Herpesvirus-8 Encoded ORF59 and ORF73 protein in Kaposi's sarcoma after Immunosuppressive Therapy for Bullous Pemphigoid. *Br J Dermatol* 145: 633-7, 2001.
- 8) Satoh, M., Toma, H., Sato, Y., Futenma, C., Kiyuna, S., Shiroma, Y., Kokaze, A., Sakurada, S., Sata, T. and Katano, H. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 54: 125-6, 2001.
- 9) Shimizu, S., Katano, H., Sata, T., Chen, K.R., Tagami, H., Hanabusa, H. and Shimizu, H. Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection. *Arch Dermatol Res* 293: 380-1, 2001.
- 10) Katano, H., Ogawa-Goto, K., Hasegawa, H., Kurata, T. and Sata, T. Human-Herpesvirus-8-Encoded K8 Protein Colocalizes with the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Bodies and Recruits p53 to the PML Bodies. *Virology* 286: 446-55, 2001.
- 11) Suda, T., Katano, H., Delsol, G., Kakiuchi, C., Nakamura, T., Shiota, M., Sata, T., Higshihara, M. and Mori, S. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated Multicentric Castleman's Diseases. *Pathol Int* 51: 671-9, 2001.
- 12) Katano, H., Sata, T. and Mori, S. AIDS lymphoma: its virological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 258: 121-38, 2001.
- 13) Katano, H., Sato, Y., Itoh, H. and Sata, T. Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded immediate early protein, open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases. *J Hum Virol* 4: 96-102, 2001.
- 14) Tanaka, S., Katano, H., Tsukamoto, K., Jin, M., Nishihara, H., Sawa, H., Tarumi, T., Sawada, K., Sata, T., Fujioka, Y. and Nagashima, K. HHV8-negative primary effusion lymphoma in the peritoneal cavity with distinct immunohistochemical phenotype. *Pathol Int* 51: 293-300, 2001.
- 15) Katano, H., Sato, Y. and Sata, T. Expression of p53 and human Herpesvirus-8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* 92: 3076-3084, 2001.
- 16) Gao, X., Ikuta, K., Tajima, M., and Sairenji, T.: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF- $\kappa$ B and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Virology* 286: 91-99, 2001.
- 17) Fukuda, M., Ikuta, K., Yanagihara, K., Tajima, M., Kuratune, H., Kurata, T., and Sairenji, T.: Effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on the cell growth and Epstein-Barr virus reactivation in EBV-infected epithelial cell lines. *Virology* 288: 109-118, 2001.
- 18) Kanamori, M., Murakami, M., Takahashi, T., Kamada, N., Tajima, M., Okinaga, K., Miyazawa, Y., Kurata, T., and Sairenji, T.: Spontaneous reduction of Epstein-Barr virus (EBV) DNA copy number in EBV-infected epithelial cell lines. *Microbes and Infection* 3: 1085-1091, 2001.
- 19) Sairenji, T., Tajima, M., Takasaka, N., Gao, X., Kanamori, M., Murakami, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Ito, H., Miyazawa, Y., and Kurata, T.: Characterization of EBV-infected epithelial cell lines from gastric cancer bearing tissues. In: Epstein-Barr virus and human cancer. Current Topics in Microbiology and Immunology 258, pp. 185-198. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg. New York), 2001.
- 20) Mitsuishi, T., Kawashima, M., Matsukura T. and Sata T. Human papillomavirus type 58 in Bowen's disease of the elbow. *Brit J Dermatol* 144: 384-386, 2001.

- 21) Matsukura, T. and Sugase M. Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology* 283: 139-147. 2001.
- 22) Nomaguchi, H., N. Jahan, B. C. Mandal, Y. Yogi, K. Kawatsu, Y. Yoshizawa, H. Okamura, and M. Makino. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Jpn J Leprosy* 70: 113-119, 2001.
- 23) Umemura, M., K. Hirose, W. Wajjwaiku, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection. *J Leukoc Biol* 69: 138-148, 2001.
- 24) Kurokawa K, Mochizuki N, Ohba Y, Mizuno H, Miyawaki A, Matsuda M.: A pair of FRET-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. *J Biol Chem* 276: 31305-31310, 2001.

## 2. 学会発表

省略（各分担研究報告書参照）。

## II. 分担研究報告書

## 2. ヒトヘルペスウイルス8の病原性に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部)

共同研究者 片野 晴隆、佐藤 由子 (国立感染症研究所感染病理部)

**研究要旨** HHV-8関連疾患につき、HHV-8の潜伏感染タンパクLANAとp53の関連、および、HHV-8の前初期タンパクORF50の発現について検討した。HHV-8感染細胞ではLANAはp53と結合し、p53依存性アポトーシスを阻害することが*in vitro*の実験ですでに明らかになっているが、われわれはカポジ肉腫やHHV-8感染固形リンパ腫、体液性リンパ腫において、p53が高発現しているにも関わらずこれらの病変部にはアポトーシスが起きておらず、同時にLANAが高発現していることを示した。これにより、LANAの発現が腫瘍細胞の細胞死を防ぎ、腫瘍化に関連することが*in vivo*でも明らかになった。また、これら腫瘍細胞においてHHV-8の前初期タンパクORF50の発現が抑制され、潜伏感染が維持されることも明らかにした。これらの事実はHHV-8の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与えるものである。

### A. 研究目的

ヒトヘルペスウイルス8 (HHV-8) は1994年にエイズに合併するカポジ肉腫から発見された新しいウイルスであり、カポジ肉腫や原発性体腔液性リンパ腫primary effusion lymphoma (PEL) などから検出される。近年、HHV-8は一部の固形リンパ腫にも検出されることがわかり、これらの悪性腫瘍の病因とHHV-8感染の関連が指摘されている。HHV-8の造腫瘍性についてはまだ明らかになっていない部分が多いが、HHV-8は80以上のopen reading frameを持っており、その中にはいくつかのオンコプロテインらしきものが含まれる。また、オンコプロテインかどうかはまだはっきりしないが、HHV-8の潜伏感染タンパクであるORF73 (latency-associated nuclear protein, LANA) はカポジ肉腫などのHHV-8関連悪性腫瘍の形成に重要な働きをすると考えられている。一方、HHV-8のウイルスタンパクはその発現から前初期タンパク、初期タンパク、後期タンパクに分類される。前初期タンパクの一つであるORF50タンパクは他の初期タンパクを誘導し、感染細胞を潜伏感染から増殖性感染に誘導する上で重要な働きを持つ。カポジ肉腫などにおけるHHV-8感染ではLANAやウイルスのオンコプロテインが働き細胞を腫瘍化するという面と、一方で、HHV-8の潜伏感染状態が維持されることで、LANA以外のタンパクの発現を抑え、LANAの発現が安定するという側面がある。今回のわれわれの研究では腫瘍化におけるLANAの働きに関して、LANA、p53の発現と細胞死の関連を明らかにし、

また、潜伏感染を維持させる機構に関して、前初期タンパクのORF50の発現について検索した。

#### 1. HHV-8関連悪性腫瘍におけるLANA、p53の発現と細胞死の関連について

LANAはカポジ肉腫とPELの細胞には必ず発現しており、このことはHHV-8関連悪性腫瘍ではHHV-8は常に潜伏感染状態にあり、LANAがHHV-8関連悪性腫瘍の形成に関与していることを示す。これまでLANAについてはいくつかの重要な機能が報告されている。一つはLANAが細胞分裂を通してHHV-8の遺伝子を娘細胞に伝播する働きを持っている点である。このことはLANAが有糸分裂期を含むすべての時期の宿主染色体DNAと結合し、さらにHHV-8のDNAもLANAの局在に一致していることから示された。2つめの働きはp53と結合し、その転写活性を抑制する点である。p53は腫瘍形成の過程で重要な働きを持つタンパクの一つであることは有名である。野生型p53は正常細胞においては傷害されたDNAを修復し、ダメージの大きい細胞では細胞周期の停止や細胞死を誘導する。一方で変異型p53は腫瘍細胞において細胞死を抑制し、その結果、細胞の不死化という現象をもたらす。ウイルスタンパクの中にはp53と結合し、その機能を抑制するものがいくつか知られている。これらのウイルスタンパクがp53の機能を抑制するメカニズムは2つ考えられており、一つはp53とウイルスタンパクが直接結合することによりp53の機能を不活化するというもので、このタイプにはアデノウイルスのE1BやSV40のLarge T antigenが該当する。

もう一つのタイプはユビキチンを介するもので、ヒトパピローマウイルスのE6はユビキチンリガーゼであるE6APとともにp53に結合し、p53をユビキチン化することによりp53を不活化する。LANAは前者のタイプで、p53と直接結合することが免疫沈降法やGST-pull down assayの結果から示唆されており、さらにLANAがp53依存性細胞死を抑制することがin vitroの実験から明らかになっている。

これらの事実から、p53とLANAの関連がHHV-8の造腫瘍性において重要なものであることは間違いない。しかし、これまで明らかにされてきたことは全てin vitroの実験系であり、これまでカポジ肉腫の組織でp53とLANAの発現と細胞死の関連を検索した報告はない。また、カポジ肉腫組織におけるp53の発現量は報告によりまちまちで一定しない。そこでわれわれは、カポジ肉腫、PEL、HHV-8関連固形リンパ腫の組織を用いて、p53、LANAの発現と細胞死の関連を検索した。

## 2. HHV-8の前初期タンパクORF50の発現について

ORF50タンパクはエプスタイン・バーウイルスの転写活性化因子Rtaタンパクと相同性があり、HHV-8の前初期タンパクとして考えられている。事実、ORF50タンパクをHHV-8感染リンパ腫細胞株に高発現させるとK8、vIL-6などの初期タンパクが誘導され、ウイルスの複製がはじまる。このことからORF50タンパクはHHV-8の複製において重要な転写活性化因子と考えられている。カポジ肉腫、PELなどのHHV-8関連悪性腫瘍ではK8、ORF59、ORF65などのHHV-8増殖性感染関連タンパクの発現は抑えられており、これらの細胞はそのほとんどがLANAを発現していることから、HHV-8が潜伏感染していることが報告されている。K8、ORF59、ORF65などの増殖性感染関連タンパクの抑制されていることは潜伏感染維持には都合がよい。ORF50タンパクはこれらの増殖性感染関連タンパクの発現を誘導する働きを持っていることから、ORF50タンパクの発現も抑制されていることが考えられるが、これまでのところ、ORF50タンパクがカポジ肉腫などのHHV-8関連疾患でどれだけ発現しているか明らかにした報告はない。ORF50タンパクの発現を検索することによりHHV-8の増殖性感染タンパクの発現の抑制がORF50タンパクの発現の抑制によるものかあるいはORF50タンパクよりも下流の転写活性化機構が抑えられているのかを知ることができる。

カポジ肉腫、PELでORF50タンパクの発現を知ることとはもう一つの意味がある。他のヘルペスウイルスでは前初期タンパクは細胞の中でウイルス複製の開始点にいち早く発現し、ウイルス複製の場の環境を整える働きを行う。たとえば単純ヘルペスウイルスやヒトサイトメガロウイルスでは感染直後にその前初期タンパクICP0あるいはIE1が宿主細胞核内のpromyelocytic leukemia protein (PML) bodyと呼ばれる場所に発現し、PML bodyの構成タンパクをPML bodyから解離させ、ウイルス複製の場を提供するのに役立つ。本邦で前年度、我々が報告したようにHHV-8でPML bodyに関連するタンパクはK8タンパクであるが、これは初期タンパクであり、PML bodyに対しては局在は一致するもののIE1のような効果を与えない。HHV-8の前初期タンパクであるORF50タンパクがPML bodyと局在が一致するか、あるいはPML bodyにどのような影響を与えるかはまったく報告がない。

そこで、われわれは、これらHHV-8関連疾患においてORF50タンパクの発現を検索するとともに、PEL細胞においては増殖性感染を誘導した際のPML bodyとORF50タンパクの関連についても調べた。

## B. 研究方法

(1) HHV-8関連悪性腫瘍におけるLANA、p53の発現と細胞死の関連について

カポジ肉腫26例、HHV-8関連固形リンパ腫1例、PEL細胞株3株、免疫不全マウスに移植してできたHHV-8関連固形リンパ腫1例につき、免疫組織化学染色でLANAとp53の局在、および、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)法でアポトーシスの存在を調べた。患者検体は全てホルマリン固定、パラフィン包埋標本で、LANAの検出にはLANAのN末端のタンパクを抗原としたウサギポリクローナル抗体をp53の検出にはマウスモノクローナル抗体D0-7(ダコジャパン、京都)を用いた。3つのHHV-8陽性細胞株(TY-1、BCBL-1、KS-1)では蛍光免疫染色法を用いてLANA、p53を検出した。細胞内でのLANAとp53の局在を調べるために、一次抗体反応後にFITCまたはTexas Red標識の二次抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

また、カポジ肉腫16例、HHV-8関連固形リンパ腫1例およびPEL細胞株よりDNAを抽出し、HHV-8 DNAの存在の確認とp53の変異を検索した。HHV-8 DNAの

存在の確認にはHHV-8のKS330の領域のうち233bpをPCRで増幅し、アガロースゲル電気泳動でその産物の確認を行った。P53の変異はp53 DNAのexon5-6とexon7-9を別々にPCRで増幅し、その産物につきdirect sequence法にて核酸配列を決定した。

#### (2) HHV-8の前初期タンパクORF50の発現について

HHV-8感染原発性体液性リンパ腫細胞株であるTY-1よりORF50のDNA断片(1.9kbp)を増幅し、pGEX5X-2 vectorに組み込んだあと、大腸菌内でGST融合タンパクを作製した。カラム精製後、この融合タンパクを抗原としてウサギに免疫、その抗血清を採取した。カポジ肉腫、HHV-8関連固形リンパ腫、多巣性キャスルマン病の組織はホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた。さらにHHV-8関連固形リンパ腫のモデルとしてHHV-8感染原発性体液性リンパ腫細胞株を重度免疫不全マウスに移植して得られた固形リンパ腫を採用した。免疫組織化学染色はlabeled streptavidin-biotin (LSAB) 法によった。また、原発性体液性リンパ腫細胞株におけるORF50タンパクの局在は免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。PMLの検出には抗PMLマウスモノクローナル抗体PG-M3(サンタクルーズ、米国カリフォルニア州)を用い、細胞内でのPMLとORF50タンパクの局在は一次抗体反応後にFITCまたはTexas Red標識の二次抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

実験に用いた全ての臨床検体はインフォームドコンセントを得て採取されている。また、遺伝子組換え実験は当該施設(国立感染症研究所)の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

### C. 研究結果

#### (1) HHV-8関連悪性腫瘍におけるLANA, p53の発現と細胞死の関連について

カポジ肉腫の腫瘍細胞にはLANAの発現が認められた。一方、p53の発現は通法であるLSAB法では弱いものであったが、CSA法を用いた免疫組織染色では腫瘍細胞に高発現していることがわかった。P53の発現は結節期カポジ肉腫細胞の3割以上に認められ、一方、非腫瘍部分の細胞には検出されなかった。このことから、p53はカポジ肉腫細胞では正常細胞に比べ発現が高まることがわかった。また、同じ標本

においてTUNEL法を用いて、アポトーシスの検索を行ったが、カポジ肉腫細胞においてはアポトーシスは全く検出されなかった。同様の所見はHHV-8関連固形リンパ腫においても認められた。われわれはさらにLANAとp53の発現とその細胞内における局在を確認するために、HHV-8感染リンパ腫細胞株を用い、免疫蛍光染色を行った。その結果、HHV-8感染リンパ腫細胞株TY-1ではLANAの発現部位はp53の発現部位に含まれることが明らかになった。このことはLANAの発現がp53の発現部位に限局して発現することを意味し、HHV-8感染細胞内におけるLANAとp53の関連を示唆する。また、本細胞株に血清非添加培地を用いた培養を行い、アポトーシスを誘導するとLANAが高発現する細胞ではp53も同様に局在が一致したまま高発現する。さらに、アポトーシスに陥ってしまった細胞ではLANAもp53もともに発現が低下し、どちらか一方だけが発現している細胞は見られない。また、これらの実験に用いた、カポジ肉腫、リンパ腫、細胞株においてp53のDNAの変異を検索したところ、変異型p53に頻繁に認められるexon5-9の変異はまったく見られなかった。

#### (2) HHV-8の前初期タンパクORF50の発現について

HHV-8 ORF50タンパクの精製に成功し、これを免疫したウサギから採取したポリクローナル抗体はHHV-8感染細胞株の溶解液と約110kDaの大きさのタンパクと特異的に反応した。この抗体を一次抗体に用いた免疫組織染色を行ったところ、カポジ肉腫、HHV-8関連固形リンパ腫の組織ではORF50タンパク発現細胞はきわめてまれであることが明らかになった。また、多巣性キャスルマン病の組織では他の増殖関連タンパク同様、リンパ濾胞暗殻内に陽性細胞が散在していた。

さらにORF50タンパクの細胞内での局在を詳しく見るためにHHV-8感染リンパ腫細胞株において免疫蛍光染色を行ったところ、ORF50タンパクは細胞核内に点状、またはびまん性に発現していることが明らかになった。PMLとの関連を蛍光二重染色で調べたところ、一部は一致するものの、その大部分は異なる局在を示した。

### D. 考察

#### (1) HHV-8関連悪性腫瘍におけるLANA, p53の発現と細胞死の関連について

本研究ではHHV-8感染細胞においてLANAとp53が

局在が一致している状態で発現していることが明らかになった。また、HHV-8関連悪性腫瘍内ではp53の変異は認められず、アポトーシスがまれであることが示された。これらのデータはこれまで発表されてきたLANAがp53と結合し、p53関連のアポトーシスを抑制するとした*in vitro*の実験データを*in vivo*においても支持するものである。

これまでのところ、カポジ肉腫におけるp53の発現は初期病変のみであるとするものや結節期病変に強発現するとする報告などがあり、はっきりとしなかった。これらの研究はすべて、通法であるLSAB法で行われているので、低いレベルの発現は検出できない。CSA法を用いた我々の研究ではp53はカポジ肉腫のどの段階でも正常細胞と比べると発現が強いことがあきらかになった。ここで発現されているp53は変異がない正常型のものであり、本来であれば、p53はアポトーシスを誘導する方向に働く。しかし、HHV-8関連悪性腫瘍ではアポトーシスはほとんど起きていない。このことはウイルスタンパクがp53のアポトーシスを間接的あるいは直接的に抑制していることが考えられ、これまでの研究と本研究の結果を考えあわせるとLANAがもっともその有力な候補であり得ることが示唆された。ウイルスタンパクでこのような多彩な働きを持つタンパクはほかに報告がなく、HHV-8の造腫瘍性における特殊な機構かもしれない。

我々はさらにHHV-8の前初期タンパクであるORF50タンパクがHHV-8関連腫瘍において、発現が抑制されていることを示した。LANAの様な潜伏感染タンパクが安定して発現していくためには細胞そのものが増殖性感染に進まないことが必要であるが、ORF50タンパクの発現の抑制はHHV-8が持続潜伏感染していく機構の一つと考えられる。また、MCDにおいては他の増殖感染タンパクと同様、リンパ濾胞暗核内に発現が見られたことはMCDはカポジ肉腫やPELと異なりウイルスが増殖感染に入るためにおこる、いわば反応性病変であることを示唆する。今後の課題としてはORF50の発現を抑制する因子の検索が必要であろう。

さらに今回の研究ではORF50タンパクはPML bodyとは局在が一致しないことがわかった。PML bodyが他のヘルペスウイルスではウイルスの複製開始点になっていることを考えるとこのことはHHV-8が感染後どのように潜伏感染を維持してい

るかの解明に重要な手がかりになる。

## E. 結論

HHV-8 LANAの発現が腫瘍細胞の細胞死を防ぎ、腫瘍化に関連することが*in vivo*でも明らかになった。また、HHV-8感染腫瘍細胞においてHHV-8の前初期タンパクORF50の発現が抑制され、潜伏感染が維持されることを明らかにした。これらの結果はHHV-8の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与える知見である。

## F. 健康危険情報

現在のところHHV-8に関して健康危険情報として報告しなければならない情報は無い。

## G. 研究発表

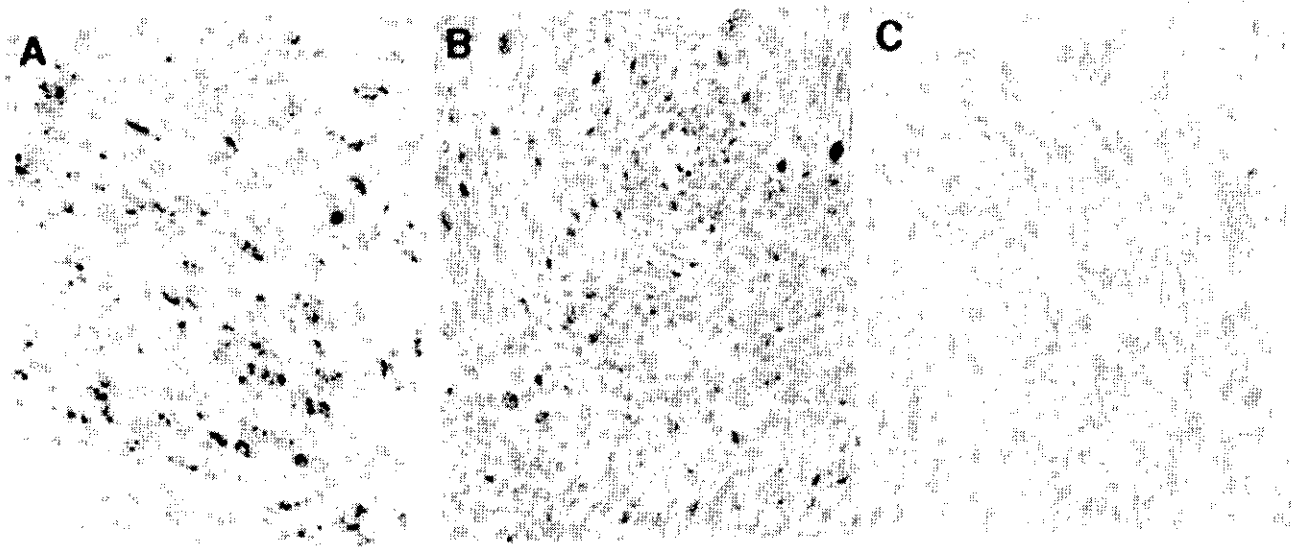
### 1. 論文発表

1. Foreman, K.E., Friborg, J., Chandran, B., Katano, H., Sata, T., Mercader, M., Nabel, G.J. and Nickoloff, B.J. Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions. *J Dermatol Sci* 26, 182-93., 2001
2. Dilmur, P., Katano, H., Wang, Z.H., Kudo, M., Osakabe, Y., Sata, T. and Ebihara, Y. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* (in press), 2001
3. Nuvor, S.V., Katano, H., Ampofo, W.K., Barnor, J.S. and Sata, T. Higher prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 362-4., 2001
4. Meng, Y.X., Sata, T., Stamey, F.R., Voevodin, A., Katano, H., Koizumi, H., Deleon, M., De Cristofano, M.A., Galimberti, R. and Pellett, P.E. Molecular Characterization of Human Herpesvirus 8 Strains from Japan, Argentina, and Kuwait. *J Gen Virol* 82, 499-506, 2001
5. Katano, H., Sato, Y. and Sata, T. Expression of p53 and human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen (LANA) with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* (in press), 2001
6. Sakurada, S., Katano, H., Sata, T., Ohkuni, H., Watanabe, T. and Mori, S. Effective human

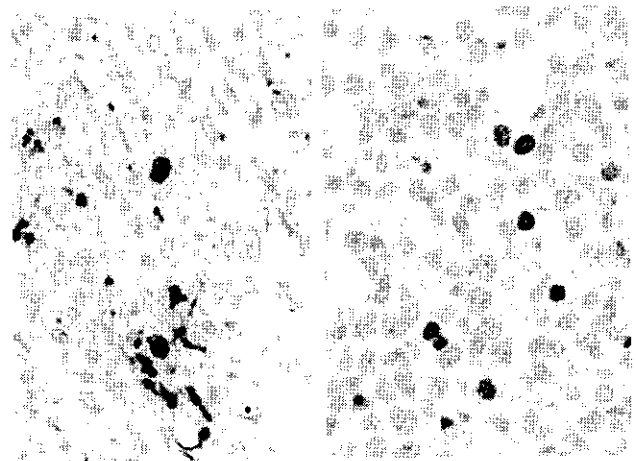
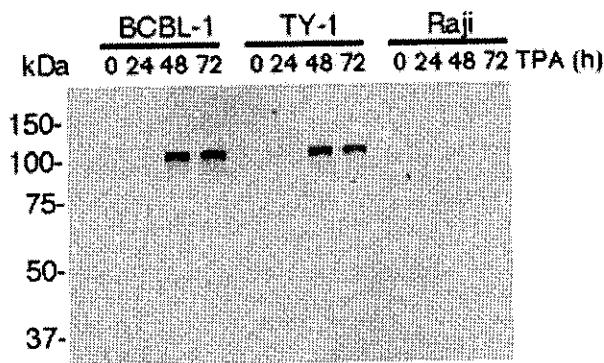
- herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission. *J Virol* 75, 7717-22., 2001
7. Sato-Matsumura, K.C., Matsumura, T., Nabeshima, M., Katano, H., Sata, T. and Koizumi, H. Serologic and Immunohistochemical Detection for Human Herpesvirus-8 Encoded ORF59 and ORF73 protein in Kaposi's sarcoma after Immunosuppressive Therapy for Bullous Pemphigoid. *Br J Dermatol* (in press), 2001
  8. Satoh, M., Toma, H., Sato, Y., Futenma, C., Kiyuna, S., Shiroma, Y., Kokaze, A., Sakurada, S., Sata, T. and Katano, H. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 54, 125-6., 2001
  9. Shimizu, S., Katano, H., Sata, T., Chen, K.R., Tagami, H., Hanabusa, H. and Shimizu, H. Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection. *Arch Dermatol Res* 293, 380-1., 2001
  10. Katano, H., Ogawa-Goto, K., Hasegawa, H., Kurata, T. and Sata, T. Human-Herpesvirus-8-Encoded K8 Protein Colocalizes with the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Bodies and Recruits p53 to the PML Bodies. *Virology* 286, 446-55., 2001
  11. Suda, T., Katano, H., Delsol, G., Kakiuchi, C., Nakamura, T., Shiota, M., Sata, T., Higshihara, M. and Mori, S. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated Multicentric Castleman's Diseases. *Pathol Int* (in press), 2001
  12. Katano, H., Sata, T. and Mori, S. AIDS lymphoma: its virological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 258, 121-38., 2001
  13. Katano, H., Sato, Y., Itoh, H. and Sata, T. Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded immediate early protein, open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases. *J Hum Virol* 4, 96-102., 2001
  14. Tanaka, S., Katano, H., Tsukamoto, K., Jin, M., Nishihara, H., Sawa, H., Tarumi, T., Sawada, K., Sata, T., Fujioka, Y. and Nagashima, K. HHV8-negative primary effusion lymphoma in the peritoneal cavity with distinct immunohistochemical phenotype. *Pathol Int* 51, 293-300, 2001

2. 学会発表  
なし。





(図1) カポジ肉腫におけるLANA (A), p53 (B) の発現およびアポトーシス (C)  
 カポジ肉腫細胞の核内にはLANAの点状の発現が認められる。また、多くの細胞がp53を発現しているのがわかるが、一方で、これらの細胞にアポトーシスはまったく検出されない。



(図2) 抗ORF50抗体を用いたウエスタンブロット (左) およびカポジ肉腫 (中)、HHV-8関連固形リンパ腫におけるORF50タンパクの発現。(右)

### 3. EBウイルス (EBV) と発がん : EBV 感染上皮細胞株の TGF- $\beta$ 1 に対する非応答機構の解析

分担研究者名 西連寺 剛 国立感染症研究所研究員

**研究要旨** 我々は胃組織由来 EBV 感染上皮細胞株 GT38 及び GT39 が、多量の TGF- $\beta$ 1 を産生し、TGF- $\beta$ 1 による増殖抑制及びアポトーシスに対して非応答性を示すが、高濃度で EBV 再活性化が誘導されることを見出した。TGF- $\beta$ 1 による細胞増殖抑制の非応答機構として、TGF- $\beta$ 1/MAPK/サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21 経路を介するシグナル伝達について解析した。TGF- $\beta$ 1 感受性細胞株 HSC-39 では TGF- $\beta$ 1 により Erk1, 2 のリン酸化及び p21 発現が速やかに誘導された。しかし、GT38 では、Erk1, 2 の恒常的リン酸化及び p21 発現が見られ、TGF- $\beta$ 1 による新たな Erk1, 2 リン酸化及び p21 発現の誘導は起こらなかった。この GT38 で見られる TGF- $\beta$ 1/MAPK 経路の異常は EBV がん遺伝子蛋白 LMP-1 の発現によって誘導されることが明らかにされた。

#### A. 研究目的

我々は、胃癌における EBV の発がんに於ける役割を明らかにする。EBV 関連胃癌における感染細胞の増殖を調節する因子として TGF- $\beta$ 1 の作業仮説をたて、それを胃 (癌) 組織から樹立された細胞株 GT38 及び GT39 を用いて解析を試みる。

#### B. 研究方法

GT38、GT39 細胞株及び TGF- $\beta$ 1 感受性 HSC-39 胃癌細胞株を用いた。TGF- $\beta$ 1 mRNA は、ノザンプロットティング、TGF- $\beta$ 1 の活性は、HSC-39 細胞へ添加培養し、細胞増殖が抑制される割合を、MTT アッセイにより定量した。TGF- $\beta$ 1 によって誘導される JunB、PAI-1 mRNA の発現をノザンプロットティング、TGF- $\beta$ /MAPK 経路活性化は、Erk1, 2 のリン酸化をウェスタンプロットティングで、p21 発現は、ウェスタンプロットティング及び p21 プロモーター連結ルシフェラーゼ活性により解析した。

#### (倫理面への配慮)

鳥取大学医学部倫理委員会承認済。データ及び細胞株などに関して、一切患者名 (それを暗示する記号) を用いない。情報公開により、患者の人権を侵すことは全くない。

#### C. 研究結果

1. GT38、GT39 は、TGF- $\beta$ 1 レセプターを発現するが TGF- $\beta$ 1 に対して細胞増殖が抑制されず、アポトーシスもほとんど起らない。しかし、高濃度の TGF- $\beta$ 1 により潜在 EBV が再活性化される。

2. GT38、GT39 は、TGF- $\beta$ 1 を産生する。それらの培養上清は、自身の細胞増殖は抑制しないが TGF- $\beta$ 1 感受性 HSC-39 の増殖を抑制した。その抑制は、抗 TGF- $\beta$ 1 抗体により部分的に阻害された。

3. TGF- $\beta$ 1 のシグナル伝達において HSC-39 は、TGF- $\beta$ 1 刺激により JunB 及び PAI-1 mRNA の発現が増強された。しかし、GT38 は、JunB mRNA の発現は増強されたが、PAI-1 mRNA の発現なく、そのシグナル伝達の異常が示された。

4. HSC-39 は、TGF- $\beta$ 1 により、Erk1, 2 のリン酸化及び p21 の発現が速やかに誘導され、それらは MAPK 特異的阻害剤 U0126 により抑制された。GT38 は、Erk1, 2 の恒常的リン酸化及び p21 の発現が見られたが、TGF- $\beta$ 1 刺激でそれらの増強が見られなかった。この TGF- $\beta$ 1 に依存する増殖抑制に対する非応答性機構は、TGF- $\beta$ 1/MAPK 経路の恒常 (異常) 発現による p21 の発現誘導の低下の関与が示された。

5. TGF- $\beta$ 1/MAPK/p21 のシグナル伝達の異常は LMP1 Erk. 1, 2 の恒常的リン酸化を誘導する ras 変異蛋白 (Ras 12V) を導入した HSC-39 で全く同様に起こることが明らかにされた。

6. TGF- $\beta$ 1 による EBV 再活性化は、U0126 で、抑制されない事から、EBV 再活性化は、TGF- $\beta$ 1/MAPK/p21 以外の経路を介すと考えられた。

## D. 考 察

本研究により胃組織由来EBV感染上皮系細胞株が、TGF- $\beta$ 1を産生し、TGF- $\beta$ 1による増殖抑制に非応答性を示す一方、潜在EBVはTGF- $\beta$ 1により再活性化が起ることが明らかにされた。本結果は、細胞は、EBV感染によりシグナル伝達異常を来し、TGF- $\beta$ 1増殖抑制に耐性を獲得し、TGF- $\beta$ 1存在下で増殖し、TGF- $\beta$ 1を産生することによりTGF- $\beta$ 1感受性細胞の増殖を抑制する。しかし、TGF- $\beta$ 1は感受性細胞EBV再活性化を伴い排除され、感染細胞のクローナル選択的増殖が誘導されるという我々の仮説を支持する。EBV発がんにおけるTGF- $\beta$ 1の関りと、TGF- $\beta$ 1のシグナル伝達を抑制するLMP1蛋白の機能が明らかにされた。しかし、本モデルはLMP1が発現される潜伏感染IIやIII型のがん化には適用されるが、胃癌でのEBV感染は、LMP1が発現しないI型であり、このモデルでは説明できない。

## E. 結 論

EBV感染上皮細胞株はTGF- $\beta$ 1産生しTGF- $\beta$ 1耐性を示す。その耐性はTGF- $\beta$ 1からのMAPK/Erk1, 2/p21シグナル伝達の異常であり、それはEBV遺伝子蛋白LMP1によって誘導される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Gao, X., Ikuta, K., Tajima, M., and Sairenji, T.: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF- $\kappa$ B and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Virology* 2001, 286: 91-99.
- 2) Fukuda, M., Ikuta, K., Yanagihara, K., Tajima, M., Kuratune, H., Kurata, T., and Sairenji, T.: Effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on the cell growth and Epstein-Barr virus reactivation in EBV-infected epithelial cell lines. *Virology* 2001, 288: 109-118.
- 3) Kanamori, M., Murakami, M., Takahashi, T., Kamada, N., Tajima, M., Okinaga, K., Miyazawa, Y., Kurata, T., and Sairenji, T.: Spontaneous reduction of Epstein-Barr virus (EBV) DNA copy number in EBV-infected epithelial cell lines. *Microbes and Infection* 2001, 3: 1085-1091.
- 4) Sairenji, T., Tajima, M., Takasaka, N., Gao, X., Kanamori, M., Murakami, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Ito, H., Miyazawa, Y., and Kurata, T.: Characterization of EBV-infected epithelial cell lines from gastric cancer bearing tissues. In: Epstein-Barr virus and human cancer. *Current Topics in*

*Microbiology and Immunology* 258, pp. 185-198. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg. New York), 2001.

- 5) Hoshikawa, Y., Satoh, Y., Murakami, M., Maeta, M., Kaibara, N., Ito, H., Kurata, T. and Sairenji, T.: Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J. Med. Virol.* (in press).
- 6) Ohsawa, T., Morimura, T., Hagari, Y., Kawakami, T., Mihara, M., Hirai, K., Ikuta, K., Murakami, M., Sairenji, T., and Mihara, T.: A case of exaggerated mosquito hypersensitivity with Epstein-Barr virus positive inflammatory cells in the bite lesion. *Acta Derm-Venereol* (in press).

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Fukuda, M., Yanagihara, K., Tajima, M., and Sairenji, T.: Effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on the cell growth and Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in EBV-infected epithelial cell lines. The 21<sup>st</sup> international symposium of the Sapporo cancer seminar foundation. Epstein-Barr virus and human cancer. Sapporo/Hokkaido, Japan. Program, p. 75. July 4-6, 2001.
- 2) Murakami, M., Kaibara, N., Ito, H., and Sairenji, T.: Characterization of Epstein-Barr virus positive cell lines from a gastric tissue with carcinoma. The 21<sup>st</sup> international symposium of the Sapporo cancer seminar foundation. Epstein-Barr virus and human cancer. Sapporo/Hokkaido, Japan. Program, p. 79. July 4-6, 2001.
- 3) Murakami, M., Luo, B., Fukuda, M., Fujioka, A., Yanagihara, K., and Sairenji, T.: Epstein-Barr virus infection on a human signat ring cell gastric carcinoma cell line HSC-39. 10<sup>th</sup> international conference on immunobiology and prophylaxis of human herpesvirus infections. Osaka, Japan. Program, p.28. November 21-23, 2001.
- 4) Ikuta, K., Saiga, K., Deguchi, M., and Sairenji, T.: Demonstration of Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood mononuclear cells from the seronegative infants with infectious mononucleosis-like symptoms. 10<sup>th</sup> international conference on immunobiology and prophylaxis of human herpesvirus infections. Osaka, Japan. Program, p.29. November 21-23, 2001.
- 5) Fukuda, M., Yanagihara, K., Tajima, M., and Sairenji, T.: Epstein-Barr virus-infected epithelial cell lines have the defectiveness of signaling pathways of p21/WAF1/Cip1 via transforming growth factor- $\beta$ 1. 10<sup>th</sup> international conference on immunobiology and prophylaxis of human herpesvirus infections. Osaka, Japan. Program, p.32. November 21-23, 2001.

## 国内学会

- 1) 生田和史、大西英子、西連寺 剛、倉恒弘彦、宗川吉汪、山西弘一、木谷照夫、渡辺恭良：慢性疲労症候群患者リンパ球における 2, 5A 合成酵素 (2.5AS) 活性について. 第 6 回慢性疲労症候群 (CFS) 研究会 (熊本) 2001.
- 2) 斎鹿杏子、生田和史、西連寺 剛、出口雅経：小児 IM 様疾患における EB ウイルス感染実態の検討. 第 17 回中国・四国ウイルス研究会 (米子) 2001.
- 3) 阿川英之、生田和史、西連寺 剛：培地中の L-arginine により NO は合成され細胞内 EBV 再活性化を抑制する. 第 17 回中国・四国ウイルス研究会 (米子) 2001.
- 4) 星川淑子、佐藤幸夫、村上雅尚、前田迪朗、貝原信明、井藤久雄、西連寺 剛：EBV 陽性胃癌では EBV-DNA Bam HI-*I* 領域の制限酵素断片長多型が高頻度に検出される. 第 17 回中国・四国ウイルス研究会 (米子) 2001.
- 5) 福田 誠、田島マサ子、西連寺 剛：胃組織由来 EBV 感染上皮細胞株における TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達と細胞周期関連蛋白の解析. 第 17 回中国・四国ウイルス研究会 (米子) 2001.
- 6) 西連寺 剛：EB ウイルス感染と胃癌. 第 2 回感染分子と病態形成を考える会：感染病態と発癌 (別府) 2001.
- 7) 斎鹿杏子、生田和史、西連寺 剛、出口雅経：小児 IM 様疾患における EB ウイルス感染の評価. 第 11 回 EB ウイルス感染症研究会 (東京) 2001.
- 8) 西連寺 剛、村上雅尚、柳原五吉：印環胃癌細胞株 HSC-39 におけるユニークな EB ウイルス感染の成立. 第 60 回日本癌学会 (横浜) 2001.
- 9) 村上雅尚、貝原信明、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛：非胃癌部組織由来細胞株 (PN) の性状解析. 第 60 回日本癌学会 (横浜) 2001.
- 10) 生田和史、斎鹿杏子、西連寺 剛：EB ウイルス抗体陰性で伝染性単核症を呈する小児の末梢血リンパ球における EB ウイルス感染の証明. 第 49 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2001. 星川淑子、佐藤幸夫、金森美紀子、西連寺 剛：EBV 陽性胃癌において高頻度に検出される EBV 前初期遺伝子 BZLF1 領域の変異. 第 49 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2001.
- 11) 福田 誠、田島マサ子、西連寺 剛：EBV 感染上皮細胞株における TGF- $\beta$ 1 増殖抑制に対する非応答機構の解析. 第 49 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2001.
- 12) 村上雅尚、斎藤夕絵、森 多佳子、佐藤幸夫、星川淑子、金森美紀子、倉田 毅、西連寺 剛：胃癌組織由来 EBV 陽性 PT および PN 細胞株の解析. 第 49 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2001.