

20020160

平成14年度

厚生労働科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ウイルス感染によるヒトがん発病機構の解明と
予防・治療に関する研究

研究報告書

平成15年3月

主任研究者 佐多徹太郎
(国立感染症研究所)

目 次

1. ウイルス感染によるヒトがん発病機構の解明と予防・治療に関する研究	
総括研究報告書（平成 14 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. HHV-8 関連疾患における癌化関連遺伝子および蛋白の解析	7
分担研究者：佐多 徹太郎（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 LMP1 蛋白が TGF- β 1 の細胞増殖抑制作用を阻止する－	11
分担研究者：西連寺 剛（国立感染症研究所感染病理部）	
4. EBNA-LP 変異体による EBV 発癌遺伝子の解析	15
分担研究者 原田志津子（国立感染症研究所ウイルス第 1 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	17
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 細胞白血病発症予防法の開発	23
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. ウイルス感染によるヒトがん発病機構の解明と 予防・治療に関する研究

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)、そして成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) について研究を行った。1) HHV-8 関連遺伝子が腫瘍の発生と増殖にどのように関わっているかを検討する目的で、カボジ肉腫組織中における HHV-8 関連癌化関連遺伝子の発現について TaqMan RT-PCR 法を用いて検討した。検討した遺伝子のなかで vIL-6 の発現が有意に高いことが判明した。2) EBV の潜在膜蛋白 (LMP-1) が TGF- β 1 シグナルを阻止することを明らかにした。TGF- β 1 感受性細胞株 HSC-39 へ LMP-1 遺伝子を導入後に LMP-1 発現クローン細胞を得、TGF- β 1 感受性、シグナル伝達及びその細胞性状の変化を解析した。HSC-39 では TGF- β 1 により MAPK(Erk1, 2 のリン酸化及び p21 発現が誘導されたが LMP-1 の発現クローン細胞では、全てに Erk1, 2 の恒常的リン酸化が見られ、TGF- β 1 耐性で、TGF- β 1 による Erk1, 2 リン酸化及び p21 発現は誘導されなかった。LMP-1 発現クローン細胞は NF- κ B を恒常的に活性化し、低血清 (0.1%FBS) 培地での細胞増殖能を獲得した。3) EB ウイルス感染による B 細胞増殖形質転換いわゆる試験管内発癌に不可欠のウイルス核蛋白が EBNA-2 と EBNA-LP である。EBNA-LP 変異体による導入遺伝子量とドミナントネガティブ効果との相関を確認した。さらに EBNA-LP 自体の多量体形成能と EBNA-2 との相互作用能を見いだした。4) 子宮頸部扁平上皮癌発生に関与するヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 遺伝子型を特定するために、294 症例の生組織検体を 38 種の皮膚型 及び 48 種の性器型 HPV を検出可能なサザンブロットハイブリダイゼーション法で調べた。181 例 (62%) に性器型 HPV の全長遺伝子が検出された。50 例 (17%) に同定出来ない性器型 HPV が、残りの 63 例 (21%) には何れの HPV 型も認められなかった。子宮頸部扁平上皮癌の殆どは HPV16 グループに起因すると結論され、HPV 陰性の癌もこのグループによって引き起こされるがウイルス DNA が消失したものと推測された。5) HTLV-I 感染無症候性キャリアー (AC) からの ATL 発症を予防する方策の確立をめざし、HTLV-I ウイルス保有者の CD8 陽性 T 細胞の性状および抗原提示細胞として有能な末梢単球由来樹状細胞 (DC) の性状を解析した。AC 患者末梢 CD4 陽性 T 及び CD8 陽性 T 細胞はともに HTLV-I 抗原パルス DC の刺激を受けて大量の IFN- γ を産生した。AC 患者由来 DC を CD40 リガンドで刺激すると bio-active な IL-12 p70 を産生した。HTLV-I 抗原パルスおよび非パルス DC を用いて CD8 陽性 T 細胞を刺激すると細胞内にパーフォリンを産生し、キラー T 細胞に分化することが判明した。従って AC 患者末梢 CD8 陽性 T 細胞は樹状細胞刺激をうけてキラー T 細胞に容易に分化し、ATL 発症予防に有用な手段となりうると想定された。

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

原田志津子 国立感染症研究所・ウイルス第1部主任研究官

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

ヒトがんと関連するウイルスには、ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8)、エプスタインバールウイルス (EBV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、そして成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) がある。これらウイルス感染によるがん化機構について、ウイルスおよび宿主側因子の探索とその分子機構を解明し、予防と治療に役立つ研究を行なう。

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するものと考えられる。

1) HHV-8 関連悪性リンパ腫である原発性体液性リンパ腫 (PEL) からは培養細胞株が樹立され、これを用いた *in vitro* の実験系では LANA のみならず、HHV-8 自身にコードされる関連細胞因子ホモログが腫瘍の発生・増殖と関連していることを示唆する報告がある。そこで TaqMan RT-PCR を用いて実際の腫瘍組織における HHV-8 関連細胞因子ホモログの mRNA を検索し、カポジ肉腫の発生や増殖との関連を探索する目的で検討を行った。

2) EBV 発がん機構を明らかにする目的で細胞の増殖を阻止する TGF- β 1 に焦点を絞り、EBV 感染細胞の TGF- β 1 耐性について LMP-1 遺伝子導入細胞を用いて解析した。

3) EB ウイルス感染による B 細胞増殖形質転換 (発癌) に不可欠の二つの核蛋白 EBNA-2 と EBNA-LP について、発癌における機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とし、さらに核蛋白機能を抑制することができる蛋白変異体の利用によりリンパ腫細胞などの腫瘍細胞の増殖を押さえ癌治療効果があるかどうかを検討する。

4) これまで多様なヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型と種々の婦人科腫瘍；子宮腔部異形成、子宮頸部異形成、子宮頸部腺癌及び腺扁平上皮癌との病因学的関連を明らかにして来た。本年度は CIN を前駆病変とする子宮頸部扁平上皮癌の病因 HPV 遺伝子型を特定することを目的とした。

5) 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 HTLV-I キャリアー末梢単球由来樹状細胞の抗原提示能および T 細胞の抗原刺激応答能を検索した。

B. 研究方法

1) HHV-8 : PEL 細胞株は TY-1 および BCBL-1 である。TaqMan RT-PCR のプライマーは ORF73 (潜伏感染タンパクで LANA)、ORF50、vIL-6、vBCL-2、vGPCR、vIRF-1、ORF26 を増幅するように設定した。内部対照として TBP を用い、各 mRNA コピー数はこれをもとに算出した。PEL 細胞株および凍結カポジ肉腫から Total RNA を抽出し、oligo dT プライマーで cDNA を合成し、ABI7700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystem) で解析した。カポジ肉腫組織のホルマリン固定標本は免疫染色しウイルスタンパク発現細胞を検討した。

2) EBV: 胃組織から樹立された細胞株 GT38、GT39 及び TGF- β 1 感受性コントロール細胞株 HSC-39 を用いた。TGF- β 1 mRNA はノーザンブロットティング、細胞増殖は MTT アッセイにより定量した。Erk1、2 のリン酸化をウェスタンブロットティングで、p21 発現はウェスタンブ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。NF- κ B の活性は NF- κ B プロモーター活性を測定した。

3) EBV: EBNA-2 と EBNA-LP の発現プラスミドおよび EBNA-2 依存プロモーターを持ったリポーター遺伝子プラスミドを構築した。共発現によるリポーターアッセイ、導入遺伝子量をかえた発現強度の検討、EBNA-LP の一部領域と GST 融合蛋白を 8 種類作製しこれらと EBNA-LP 発現細胞などのライセートをつかった pull-down アッセイ、そして EBNA-2 との相互作用について EBNA-2 の一部を GST と融合させた蛋白を使った実験で検討した。

4) HPV: SCC 検体は採取時に分割し、ホルマリン固定後パラフィン包埋して病理組織学的検査を行ない、凍結組織より全 DNA を抽出し、種々の HPV 型をプローブとし異なる反応条件でハイブリダイゼーションを行った。

5) 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。HTLV-I 抗原は HTLV-I 持続感染細胞 MT-2 を sonicate して、その細胞上清を回収して得た。DC の細胞表面の解析および細胞内 パーフォリン産生は、FACS Calibur を用いて行なった。

(倫理面への配慮)

実験に用いたカポジ肉腫組織、胃癌組織、子宮腔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コンセントを得て採取された。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: PEL 細胞株の培養液に TPA を加えて 80 時間まで mRNA を検討した。時間とともに vIL-6 と vIRF-1 のコピー数が増加した。TPA(-)時の各 mRNA と TPA(+)で誘導された mRNA 量を比較すると、ウイルス増殖に一致する mRNA が誘導された。カポジ肉腫皮膚組織ないしカポジ肉腫があるリンパ節組織、および患者の PBMC について TaqMan RT-PCR を行った。HHV-8 DNA 陰性例（陰性対照）およびカポジ肉腫患者の PBMC では HHV-8 関連 mRNA は検出されなかったが、HHV-8 DNA 陽性例である 3 例の皮膚組織と 1 例のリンパ節で vIL-6 の mRNA のコピー数が 5-10 程度に検出され、ほかの mRNA ではほとんど検出できなかった。これらの組織では LANA 抗原は多くの腫瘍細胞の核に検出できたが、vIL-6 はほとんど検出できなかった。

2) EBV: HSC-39 細胞へ LMP-1 遺伝子を導入し、LMP-1 発現クローン細胞を数個得た。全ての LMP1 発現 HSC-39 クローン細胞は、GT38 と同様に TGF- β 1 耐性となり、Erk1、2 の恒常的リン酸化が見られた。LMP1 発現 HSC-39 クローン細胞は NF- κ B の恒常的活性化が見られ、低血清（0.1%FBS）培地での増殖能を獲得した。LMP1 発現クローン細胞は、MAPK、及び NF- κ B 阻害剤による増殖抑制の感受性が増大した。

3) EBV: EBNA-LP は EBNA-2 の転写活性化を上昇させる補助因子機能を持つことと、その機能のない変異体が存在することを確認した。その変異体を野生型と同時に発現させる実験系では、転写活性化の上昇が見られないドミナントネガティブの効果が認められた。ドミナントネガティブの効果は EBNA-2 を直接介して影響を与えるものではないこと、また導入遺伝子量に相関し、Dose dependent であった。

EBNA-LP は self-association をすることが免疫沈降実験や pull-down アッセイで示された。EBNA-2 の転写活性化に重要な領域と EBNA-LP の変異体が相互作用すること、そしてその領域は EBNA-LP の W2 から Y2 にかけてと考えられた。

4) HPV：分離同定されている全ての HPV の塩基配列を CLUSTAL W で比較した。同一グループの HPV は 64%以上の高い類似性を持つこと、また近似の GC 含量を有することが判った。そこで所有する各グループのクローン DNA を用いて再構築実験を行ない、同一グループの HPV は一つの HPV 型をプローブとした Tm-30 C でのプロットハイブリダイゼーションで一細胞当たり 1 コピー以上の感度で検出可能なことを見出した。そこで 294 症例の SCC についてプロットハイブリダイゼーションを行なった。181 例 (62%)に性器型 HPV を同定出来、SCC には 5 コピー以上の全長ウイルス遺伝子が存在していると考えられた。一方、何れの HPV とも一致しないものが 50 例 (17%) に認められたが、HPV16 グループのプローブに強く反応する事から、HPV DNA が再構成されたものと思われた。しかし、残りの 63 例 (21%) には皮膚型、性器型何れの HPV も検出されず、一細胞当たり 1 コピー以上の HPV DNA は存在していない事が明らかとなった。

5) HTLV-1：AC 患者末梢 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を HTLV-I 抗原パルス DC を用いて 4 日間刺激すると、HTLV-I 抗原量依存性に大量の IFN- γ を産生した。正常健常者と AC 患者を比較すると、AC 患者において有意に高い IFN- γ が産生された。AC および正常健常者 DC を可溶性 CD40 リガンドで刺激したところ AC 患者で有意に高い IL-12 p70 (bioactive form) が産生された。両者の DC 表面抗原を解析すると、AC 患者では CD1a 抗原の発現が増強していることが明らかとなった。AC 患者 CD8 陽性 T 細胞を IL-2 存在下でウイルス抗原非パルス DC で 7 日間刺激したところ、細胞内にパーフォリンを産生し、外来性ウイルス抗原非存在下でキラー T 細胞に分化することが可能であった。

D. 考 察

1) HHV-8：従来、*in vitro* で PEL 細胞株を用いた腫瘍発生機序等について解析が行われてきたが、カポジ肉腫組織での検討報告はない。今回 TaqMan RT-PCR 法で検出できた vIL-6 mRNA のコピー数は *in situ* hybridization 法の検出限界以下であるが有意な上昇を示したので、PEL と同様に vIL-6 が腫瘍の発生や増殖に関わる可能性が考えられた。しかしながら、検討対象例はいまだ不十分であること、また vIL-6 mRNA の発現がどのように腫瘍発生や増殖に関わっているのかについて検討していきたい。

2) EBV：EBV 感染細胞は、LMP-1 により TGF- β 1/MAPK/ p21 シグナル伝達異常を来し、TGF- β 1 耐性能を獲得し、多量の TGF- β 1 存在下でも増殖できるという EBV 発がんにおける LMP-1 の機能が明らかにされた。本モデルは LMP-1 を発現する潜伏感染 II 型 (上咽頭癌、ホジキンリンパ腫) や III 型 (免疫低下リンパ腫) の発がんに適用が考えられ、それらの腫瘍での TGF- β 1 産生及び耐性の検討が今後の課題である。

3) EBV：EBNA-LP のある変異体が、野生型の持つ転写活性化補因子機能を持たず、かつ野生型の機能を疎外するドミナントネガティブ効果を持つことが確認された。導入遺伝子量との相関関係と self-association を示すデータから、そのメカニズムを考えると、補因子機能をあらわすためには EBNA-LP が多量体を形成することが重要である。EBNA-2 との相互作用が変異体でみられたことから、なんらかの因子を介した間接的な相互作用が野生型では重要な働きをしていると考えられた。

4) HPV：本研究結果は「HPV16 と 18 が子宮頸癌の高度危険型である」とする長い間認知されてきた“事実”と相反するものである。PCR 法による多数の報告があるが、正常頸部にも種々の HPV 型が検出されるので、多様な HPV が存在している。従って、HPV 感染から発癌に至る長い期間を考慮すれば、PCR 法で癌組織に検出された HPV を即く癌の起因子とするのは危険である。HPV 陰性の 21% の SCC については HPV の関与は不明である。HPV 陽性

例でも検体によりウイルスコピー数が著しく異なることから SCC では HPV DNA は不可欠ではないと思われる。さらにほとんどの CIN III に 10 コピー以上の HPV が存在する事から、SCC への進行過程でウイルス DNA が消失すると考えられた。HPV 陰性 SCC は病期、年齢分布と無関係な事から、その消失は癌形成過程および形成後のいかなる時点でもある頻度で起きると考えられる。

5) HTLV-1: HTLV-I は、乳幼児期に感染し感染者の多くはウイルスキャリアーとして無症候性に経過し、ATL の発症には 40~60 年の長期を要するのが一般的である。ウイルスの増殖に伴い CD8 陽性 T 細胞を活性化させることで、ATL 細胞の腫瘍性増強を抑制すると想定されている。本研究では、末梢単球由来樹状細胞に焦点をあてて、CD8 陽性 T 細胞の活性化機構について検討を加えた。AC 患者 CD8 陽性 T 細胞は、正常健常者に比し IL-2 に対する反応性が増大していたが、DC もまた *in vivo* において HTLV-I 抗原の影響を強く受けていて、いわゆる感作状態にあると想定されていた。AC 患者 DC 細胞表面においては HAM 患者 DC のそれと異なり HTLV-Igag 抗原の発現は陰性であったが、今後種々の抗原と DC の関係について検討する必要が考察された。

E. 結 論

1) TaqMan RT-PCR 法を用いてカポジ肉腫組織内の HHV-8 関連細胞因子ホモログの発現を検討したところ、vIL-6 mRNA の発現が高いことが明らかとなった。PEL と同様、腫瘍発生や増殖との関連が示唆された。

2) EBV 感染細胞の TGF- β 1 耐性機構は LMP-1 を導入した細胞で同様に起ることが確認できた。

3) EBNA-LP の補因子機能を低下させ消失させてしまう EBNA-LP 変異体が確認され、EBNA-2 と共同で上昇させていた遺伝子の活性化を押さえられることが明らかとなった。

4) 子宮頸部扁平上皮癌は性器型 HPV により引き起こされる CIN III を前駆病変とするが、ウイルス遺伝子は必ずしも癌に継続して存在

するものではない。子宮頸部扁平上皮癌発生への関与により、HPV は 3 グループに分類できた。

5) HTLV-1 キャリアーに末梢 CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞に自己の樹状細胞刺激を受けてタイプ 1 T 細胞に分化した。ATL 発症予防法を構築する上で重要な知見が得られた。

F. 健康危険情報

とくにない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katano H, Sato Y, 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.
- 2) Dilinur P, Katano H, Wang Z, Kudo M, Osakabe Y, Sata T, Ebihara Y: Classic Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 51: 845-852, 2001.
- 3) Ayuthaya PI, Katano H, Inagi R, Auwanit W, Sata T, Kurata T, Yamanishi K: The seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in the thai population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33: 297-305, 2002.
- 4) Hoshikawa Y, Satoh Y, Murakami M, Maeta M, Kaibara N, Ito H, Kurata T, Sairenji T: Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J Med Virol* 66: 351-359, 2002.
- 5) Fukuda M, Kurosaki W, Yanagihara K, Kuratsune H, Sairenji T: A mechanism in Epstein-Barr virus oncogenesis: Inhibition of transforming growth factor- β 1-mediated induction of MAPK/p21 by LMP1. *Virology* 302: 310-320, 2002.
- 6) Agawa H, Ikuta K, Minamiyama Y, Inoue M, Sairenji T: Down-Regulation of spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in the P3HR-1 cell line by L-Arginine. *Virology* 304: 114-124, 2002.
- 7) Satoh T, Fukuda M, Sairenji T: Distinct patterns of mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt's lymphoma cell lines versus B lymphoblastoid cell lines. *Virus Genes* 25: 15-21, 2002.
- 8) Jiang R, Kanamori M, Satoh Y, Fukuda M,

- Ikuta K, Murakami M, Sairenji T: Contrasting effects of hydroxyurea on cell growth and reduction in Epstein-Barr virus (EBV) genomes in EBV-infected epithelioid cell lines versus Burkitt's lymphoma cell lines. *J Med Virol* (in press).
- 9) Kazufumi I, Saiga K, Deguchi M, Sairenji T: Epstein-Barr virus DNA is detected in peripheral blood mononuclear cells of EBV-seronegative infants with infections mononucleosis-like symptoms. *Virus Genes* (in press).
- 10) Ashida M, Ueda M, Kunisada M, Ichihashi M, Terai M, Sata T, Matsukura T: Protean manifestations of human papillomavirus type 60 infection on the extremities. *Brit J Dermatol* 146: 385-890, 2002.
- 11) Kawamura M, Naito T, Ueno M, Akagi T, Hiraishi K, Takai I, Makino M, Serizawa T, Sugimura K, Akashi M, Baba M: Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J Med Microbiol* 66: 291-298, 2002.
- 12) Maeda Y, Makino M, Crick DC, Mahapatra S, Srisungnam S, Takii T, Kashiwabara Y, Brennan PJ: Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immunity* 70: 4106-4111, 2002.
- 13) Shimokubo S, Wakamatsu S, Maeda Y, Baba M, Makino M: Fusion of Mature Dendritic Cells and Human T-Lymphotropic Virus Type-I-Infected T cells: its Efficiency as an Antigen-Presenting Cell. *Virology* 301: 13-20, 2002.
- 14) Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M: *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. *Infect Immunity* 70: 5167-5176, 2002.
- 15) Umemura M, Nishimura H, Yajima T, Wajjwalk W, Matsuguchi T, Takahashi M, Nishiyama Y, Makino M, Nagai Y, Yoshikai Y: Overexpression of interleukin-15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome. *FASEB* 16: 1755-1763, 2002.
- 16) Nomaguchi H, Mukai T, Takeshita F, Matsuoka M, Maeda Y, Aye TM, Jahan N, Yogi Y, Endo M, Sato Y, Makino M: Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 73: 182-190, 2002.
- 17) Han I, Xue Y, Harada S, Orstavik S, Skålhegg B, Kieff E: Protein Kinase A associates with HA95 and affects transcriptional co-actvation by Epstein-Barr virus nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 22: 2136-2146, 2002.
2. 学会発表
省略（各分担研究報告書参照）。
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

II. 分担研究報告書

2. HHV-8 関連疾患における癌化関連遺伝子および蛋白の解析

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 尾崎泰子、佐藤由子（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨 HHV-8 関連遺伝子が腫瘍の発生と増殖にどのように関わっているかを検討する目的で、カポジ肉腫組織中における HHV-8 関連癌化関連遺伝子の発現について TaqMan RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、検討した遺伝子のなかで vIL-6 の発現が有意に高いことが判明した。腫瘍組織での免疫組織化学法による検討では潜伏感染タンパクである LANA 以外はほとんど検出されなかったが、カポジ肉腫の腫瘍の発生と増殖に vIL-6 の発現が関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

カポジ肉腫は、その臨床型にかかわらずヒトヘルペス 8 (HHV-8) が検出されるため、腫瘍の発生および増殖に HHV-8 が関与していると考えられている。これまで HHV-8 の潜伏感染、前初期、初期および後期タンパクの抗体を用いた免疫組織化学で、カポジ肉腫には潜伏感染タンパクである LANA (ORF73) が腫瘍細胞の核内に検出され、ほかのタンパクはごく一部を除いてほとんど検出されなかった。そのため腫瘍の発生や増殖には LANA タンパクがなんらかの関与をしていると考えられる。一方、HHV-8 関連悪性リンパ腫である原発性体液性リンパ腫(PEL)からは培養細胞株が樹立され、これを用いた *in vitro* の実験系では LANA のみならず、HHV-8 自身にコードされる関連細胞因子ホモログが腫瘍の発生・増殖と関連していることを示唆する報告がある。しかしカポジ肉腫組織、つまり *in vivo* でこれらの細胞因子ホモログがどのように発現しているかどうかについてはほとんど報告がない。そこで TaqMan RT-PCR を用いて実際の腫瘍組織における HHV-8 関連細胞因子ホモログの mRNA を検索し、カポジ肉腫の発生や増殖との関連を探索する目的で検討を行った。

B. 研究方法

1) PEL 細胞株には HHV-8 が潜伏持続感染しており、TPA を培養液中加入することで融解感染を誘導することができる。今回用いた PEL

細胞株は TY-1 および BCBL-1 の二種である。

2) TaqMan RT-PCR のプライマーは ORF73 (潜伏感染タンパクで LANA) は 143bp、ORF50 (前初期タンパク) は 99bp、初期タンパクとして vIL-6 は 72bp、vBCL-2 は 75bp、vGPCR は 84bp、後期タンパクとして vIRF-1 は 63bp、そして ORF26 は 74bp を増幅するように設定し、内部にプローブを設定した。ORF73、ORF50、ORF26 のプライマーとプローブは文献から作製した。いずれも標的塩基長が短いのはあとでパラフィン包埋切片からの RT-PCR を行うことを想定したことおよび増幅効率を増加させる目的である。また内部対照として TBP を用い、各 mRNA コピー数はこれをもとに算出した。標準対照は RT-PCR で増幅したそれぞれの標的核酸の DNA 量を測定し 10 倍希釈系列を作製して用いた。

3) PEL 細胞株および凍結カポジ肉腫から SV Total RNA isolation kit(Promega)を用いて Total RNA を抽出した。凍結組織は事前にマルチピーズショッカーで組織を破砕して RNA 抽出操作を行った。

4) Real Time PCR は、まず oligo dT プライマーで Poly-A を有する mRNA から cDNA を合成した。その後、プライマーとプローブそして QuantiTect Probe PCR kit (Qiagen)を用いて、ABI7700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystem)で解析した。PCR 条件は 95°C 15 分後に 94°C 15 秒、60°C 1 分のサイクルを 45 サイクル行った。

プライマーおよびプローブ

	Primer sequence (5' → 3')		TaqMan Probe	bp	Spliced
	Forward	Reverse	(5'FAM → 3'TAMRA)		
Human					
TBP DNA	agtgaattcttggttgtaaaattgaccta	agacacggcgagaggagacaaa	agaccattgcaatttcgtgccga	132	
TBP mRNA	gattgtacccgcagctgcaa	cagcaaacccgcttgggatt	agaccattgcaatttcgtgcccga	116	Yes
HHV-8					
ORF73	ccgaggagcgaatggaagtg	ggtagatgtttcgtgtacatagogg	acaanaattgcagtagcccaaccaggaga	142	No (1)
ORF50	ccacaaaaatggcgcaagatga	tggtagaggttgggccttcagtt	agaagcttcgggggtctctg	99	Yes (2)
vIL-6	cagagaactcaattggatgctatgg	cgagatgcgcgttacggtaac	tcgatgaatgcttcggcgacctc	72	No
vBcl-2	ccatgttggotaattgagatttc	cgctaacctgcagcatgct	cagcaaccacggcgataaacacagatt	75	No
vGPCR	ggtaacctcctggtggcatatto	ttaacagtgcacgggatgtca	cgttctctggcccaagaagatcc	84	No
vIRF-1	acccgotttcgatatccagtt	cccgctctctgcgcatt	ccctcgccgacccctgttttg	63	No
ORF26	ctcgtcccggtttgc	tgctgaagaatagcgtgac	ccatggtcgtgcgcagca	74	No (3)

- (1) Lallemand, F. et al. (2000) *J.Clin.Microb.* 38:1404-1408.
- (2) Fakhari, F.D. et al. (2002) *J.Virol.* 76:6213-6223.
- (3) White, J.E. et al. (2000) *J.Clin.Microb.* 38:1992-1995.

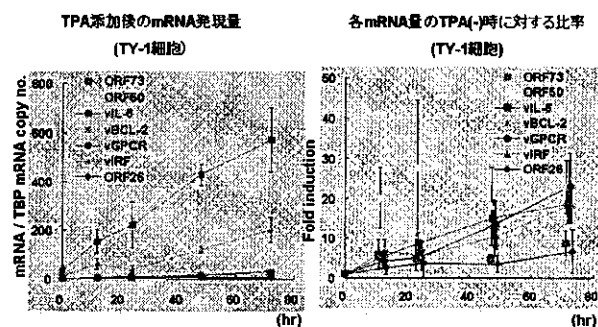
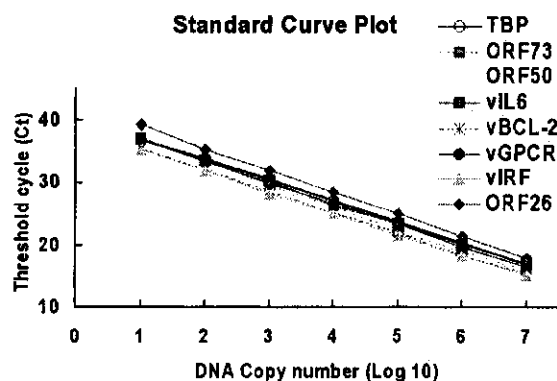
Primer Express (Perkin-Elmer Applied Biosystems)

5) カポジ肉腫組織は凍結検体およびホルマリ
ン固定検体があるもので、ホルマリン固定検体
はパラフィン包埋し LANA、ORF50、vIL-6、
ORF59、K8、ORF65 に対する抗体で免疫染色
し、これらの発現細胞を検討した。また凍結検
体から DNA を抽出し ORF26 (KSBam233) と K1
(KSVR1) の部分を増幅し HHV-8 が存在するこ
とを確認した。

C. 研究結果

1) TBP ほか HHV-8 のプライマーの検出感度について PCR で増幅した遺伝子断片を用いて検討した。その結果、10 倍から 10^7 まで希釈した遺伝子断片の標準曲線はほぼ同様の検出感度を示した。

2) PEL 細胞株、TY-1 と BCBL-1 を使い、培養液に TPA を加えて 80 時間まで 5 検体についてそれぞれの mRNA を検討した。時間とともに vIL-6 と vIRF-1 のコピー数が増加したが、ほかの mRNA の増加は軽度にとどまった。しかし TPA(-)時の各 mRNA と TPA(+)で誘導された mRNA 量を比較すると、まず前初期タンパクの ORF50 mRNA が誘導され、つぎに初期タンパクである mRNA が誘導され、最後に後期タンパクの mRNA が誘導された。潜伏感染タンパクの LANA mRNA の増加は軽度にとどまった。TY-1 および BCBL-1 とともに同様の結果を示した。したがって従来報告されているように TPA で融解感染が誘導され、なかでも vIL-6 と vIRF-1 がもっとも多く誘導された。

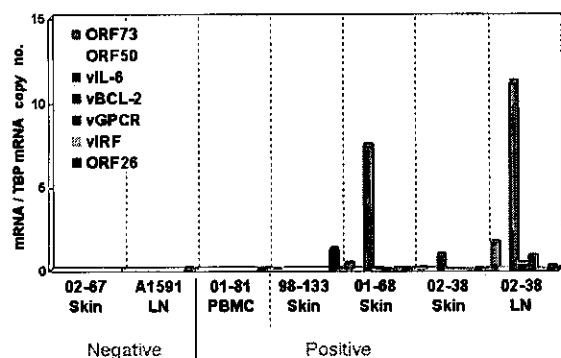


3) カポジ肉腫皮膚組織ないしカポジ肉腫があるリンパ節組織、および患者の PBMC について TaqMan RT-PCR を行った。その結果、HHV-8 DNA 陰性例（陰性対照）およびカポジ肉腫患者の PBMC では HHV-8 関連 mRNA は検出されなかったが、HHV-8 DNA 陽性例である 3 例の皮膚組織と 1 例のリンパ節で vIL-6 の mRNA のコピー数が 5-10 程度に検出され、ほかの mRNA ではほとんど検出できなかった。これらの組織では LANA 抗原は多くの腫瘍細胞の核に検出できたが、vIL-6 はほとんど検出できなかった。

カポジ肉腫例の臨床検体

	Number	Gender	Age	HIV	KS	Sample	mRNA copy No.	
							TBP	ORF73
1	02-67	M	43	-	-	Skin	967	0
2	A1591			+	-	LN	320	0
3	01-81			+	+	PBMC	2944	0
4	98-133	M	60	+	+	Skin	33	0
5	01-68	M	52	+	+	Skin	2561	1208
6	02-38	M	49	+	+	Skin	711	127
7						LN	842	1466

臨床検体での HHV-8 mRNA 検出



D. 考 察

従来、in vitro で PEL 細胞株を用いた腫瘍発生機構等について解析が行われてきた。カポジ肉腫では細胞培養実験系が不十分であり、また HHV-8 が培養 3 継代後には抜けてしまうという特徴があり、必ずしも in vivo の状態を反映していないという欠点があった。これまでわれわれはカポジ肉腫組織を用いて HHV-8 の PCR や免疫組織化学で解析を行ってその特徴を明らかにしてきた。その結果、腫瘍組織にはほとんど HHV-8 が存在すること、潜伏感染タンパ

クである LANA が腫瘍細胞の核に発現しているがウイルス増殖に伴うウイルスタンパクの発現がごくわずかであること、腫瘍組織では P53 タンパクの発現があるものの wild type であり遺伝子変異は認められないこと、臨床的には宿主の免疫状態の改善とともに自然寛解する例がありこれに CTL が関与している可能性があることなどを明らかにしてきた。そのためカポジ肉腫は真の腫瘍とは言い難いものであると考えられた。

PEL での実験により腫瘍発生・増殖に関わると考えられている HHV-8 の細胞遺伝子ホモログ mRNA の状況を in vivo のカポジ肉腫組織で知ることができれば、腫瘍発生機構のみならず、腫瘍治療への応用が可能となると考えられる。

今回の検討で免疫組織化学でのウイルスタンパクの発現と mRNA の発現について解離がみられた。過去に RNA プローブを用いた in situ hybridization 法で vIL-6 や LANA などのメッセージについて検討したがいずれも検出できなかったため、腫瘍細胞内のコピー数は少ないと考えた。免疫組織化学でもウイルス関連タンパクを検出できなかったため細胞内に存在するものより細胞外に遊離するものが多いのではないかと考えた。今回 TaqMan RT-PCR 法で検出できた vIL-6 mRNA のコピー数は in situ hybridization 法の検出限界以下であるが有意な上昇を示したので、PEL と同様に vIL-6 が腫瘍の発生や増殖に関わる可能性が考えられた。しかしながら、検討対象例はいまだ不十分であること、また vIL-6 mRNA の発現がどのように腫瘍発生や増殖と関わっているのかについて検討していきたい。

E. 結 論

TaqMan RT-PCR 法を用いてカポジ肉腫組織内の HHV-8 関連細胞因子ホモログの発現を検討したところ、vIL-6 mRNA の発現が高いことが明らかとなった。PEL と同様、腫瘍発生や増殖との関連が示唆された。

F. 健康危機情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katano H, Sato Y, 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.
- 2) Dilinur P, Katano H, Wang Z, Kudo M, Osakabe Y, Sata T, Ebihara Y.: Classic Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 51: 845-852, 2001.
- 3) Ayuthaya PI, Katano H, Inagi R, Auwanit W, Sata T, Kurata T, Yamanishi K: The seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in the thai population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33: 297-305, 2002.

3. EB ウイルス(EBV)と発がん:EBV LMP1 蛋白が TGF- β 1 の細胞増殖抑制作用を阻止する

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 我々は本研究で EBV の潜在膜蛋白 (LMP-1) が TGF- β 1 シグナルを阻止することを明らかにした。EBV 感染細胞株 GT38 及び GT39 は、TGF- β 1 を産生するが、TGF- β 1 で増殖が抑制されない (TGF- β 1 耐性) ことから、EBV がん遺伝子である LMP-1 の役割を検討した。TGF- β 1 感受性細胞株 HSC-39 へ、LMP-1 遺伝子を導入し、LMP-1 発現クローン細胞を得、TGF- β 1 感受性、シグナル伝達及びその細胞性状の変化を解析した。HSC-39 では TGF- β 1 により MAPK (Erk1, 2) のリン酸化及び p21 発現が誘導されたが LMP-1 の発現クローン細胞では、全てに Erk1, 2 の恒常的リン酸化が見られ、TGF- β 1 耐性で、TGF- β 1 による Erk1, 2 リン酸化及び p21 発現は誘導されなかった。LMP-1 発現クローン細胞は NF- κ B を恒常的に活性化し、低血清 (0.1%FBS) 培地での細胞増殖能を獲得した。

A. 研究目的

EBV 発がん機構を明らかにする目的で細胞の増殖を阻止する TGF- β 1 に焦点をしぼり、EBV 感染細胞の TGF- β 1 耐性について LMP-1 遺伝子導入細胞を用いて解析する。

B. 研究方法

胃組織から樹立された細胞株 GT38、GT39 及び TGF- β 1 感受性コントロール細胞株 HSC-39 を用いた。TGF- β 1 mRNA は、ノーザンブロッティング、細胞増殖は、MTT アッセイにより定量した。Erk1, 2 のリン酸化をウェスタンブロッティングで、p21 発現は、ウェスタンブロッティング及び 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。NF- κ B の活性は NF- κ B プロモーター活性を測定した。

(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. HSC-39 細胞へ LMP-1 遺伝子を導入し、LMP-1 発現クローン細胞を数個得た。

2. 全ての LMP1 発現 HSC-39 クローン細胞は、GT38 と同様に TGF- β 1 耐性となり、Erk1, 2 の恒常的リン酸化が見られた。
3. LMP1 発現 HSC-39 クローン細胞は NF- κ B の恒常的活性化が見られ、低血清 (0.1%FBS) 培地での増殖能を獲得した。
4. LMP1 発現クローン細胞は、MAPK、及び NF- κ B 阻害剤による増殖抑制の感受性が増大した。

D. 考 察

本研究により EBV 感染細胞は、LMP-1 により TGF- β 1/MAPK/ p21 シグナル伝達異常を来し、TGF- β 1 耐性能を獲得し、多量の TGF- β 1 存在下でも増殖できるという EBV 発がんにおける LMP-1 の機能が明らかにされた。本モデルは LMP-1 を発現する潜伏感染 II 型 (上咽頭癌、ホジキンリンパ腫) や III 型 (免疫低下リンパ腫) の発がんに応用が考えられ、それらの腫瘍での TGF- β 1 産生及び耐性の検討が今後の課題である。

E. 結 論

EBV 感染細胞の TGF- β 1 耐性機構は LMP-1 を導入した細胞で同様に起ることが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jiang, R., Kanamori, M., Satoh, Y., Fukuda, M., Ikuta, K., Murakami, M., and Sairenji, T.: Contrasting effects of hydroxyurea on cell growth and reduction in Epstein-Barr virus (EBV) genomes in EBV-infected epithelioid cell lines versus Burkitt's lymphoma cell lines. J. Med. Virol. (in press).
- 2) Ikuta, K., Saiga, K., Deguchi, M., and Sairenji, T.: Epstein-Barr virus DNA is detected in peripheral blood mononuclear cells of EBV-seronegative infants with infectious mononucleosis-like symptoms. Virus Genes (in press).
- 3) Agawa, H., Ikuta, K., Minamiyama, Y., Inoue, M. and Sairenji, T.: Down-Regulation of spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in the P3HR-1 cell line by L-Arginine. Virology 304: 114-124, 2002.
- 4) Fukuda, M., Kurasaki, W., Yanagihara, K., Kuratsune, H. and Sairenji, T.: A mechanism in Epstein-Barr virus oncogenesis: Inhibition of transforming growth factor- β 1-mediated induction of MAPK/p21 by LMP1. Virology 302: 310-320, 2002.
- 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. 66: 351-359, 2002.
- 6) Satoh, T., Fukuda, M. and Sairenji, T.: Distinct patterns of mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt's lymphoma cell lines versus B lymphoblastoid cell lines. Virus Genes 25: 15-21, 2002.
- 7) 星川淑子、西連寺 剛: 胃癌と EB ウイルス、血液・腫瘍科 (掲載予定)
- 8) 阿川英之、西連寺 剛: 「EB ウイルス」 ウイルスの活性化: 高田賢蔵 (監修)、柳井秀雄、清水則夫 (編集) 診断と治療社 (掲

載予定)

- 9) 西連寺 剛: EB ウイルスとヒト発がん—胃癌との関わり— 日本皮膚科学雑誌 112: 1757-1759, 2002.
- 10) 西連寺 剛: EB ウイルス感染と発がん ウイルス 52: 259-265, 2002.
- 11) 西連寺 剛、村上正尚: EB ウイルスによる胃癌発生のメカニズム 医学のあゆみ 203: 231-235, 2002.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Sairenji T, Fukuda M, Ikuta K, Yanagihara K, Tajima M: Effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the cell growth in EBV-infected epithelial cell lines: the latent membrane protein-1 (LMP-1) blocks TGF- β 1-mediated MAPK/p21 signaling. 10th International Symposium on Epstein-Barr virus & Associated Malignant Diseases. Cairns, July 16-21, 2002.

国内学会

- 1) 西連寺 剛: EB ウイルス感染とヒト発がんとの関わり. 第 101 回日本皮膚科学会総会 (熊本) 2002.6.
- 2) 生田和史、斎鹿杏子、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 12 回 EB ウイルス感染症研究会 (東京) 2002.
- 3) 大橋 誠、星川淑子、西連寺 剛: パーキットリンパ腫細胞株 Raji 細胞における EBV 再活性化の一酸化窒素による抑制機構. 第 18 回中国・四国ウイルス研究会 (岡山) 2002.
- 4) 黒崎 創、福田 誠、西連寺 剛: パーキットリンパ腫細胞株 Akata 細胞における TGF- β 1 II 型レセプターの欠損と TGF- β 1 に対する非応答性機構について. 第 18 回中国・四国ウイルス研究会 (岡山) 2002.
- 5) 堀江和峰、佐藤幸夫、西連寺 剛: Cos-1 細胞における vIL-10 の発現誘導の検討. 第 18 回中国・四国ウイルス研究会 (岡山) 2002.

- 7) 星川淑子、金森美紀子、村上雅尚、貝原信明、井藤久雄、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 BZLF-1 の遺伝子変異. 第 61 回日本癌学会総会（東京）2002.10.
- 8) 村上雅尚、柳原五吉、西連寺 剛：印環胃癌細胞株における EB ウイルス感染の成立（第二報）. 第 61 回日本癌学会総会（東京）2002.10.
- 9) 西連寺 剛、柳原五吉：EBV 感染細胞株における TGF- β 1 細胞増殖抑制に対する耐性機構の解析. 第 61 回日本癌学会総会（東京）2002.10.
- 10) 生田和史、西連寺 剛、宗川吉汪：慢性疲労症候群患者において 2, 5A 合成酵素（2.5AS）活性の異常高値が認められる. 第 50 回日本ウイルス学会（札幌）2002.10.
- 11) 黒崎 創、福田 誠、西連寺 剛：Burkitt's リンパ腫細胞株 Akata 細胞における TGF- β 1 II 型レセプター欠損による TGF- β シグナル伝達異常. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
- 12) 村上雅尚、森 多佳子、佐藤幸夫、星川淑子、柳原五吉、西連寺 剛：印環細胞胃癌細胞株へ EB ウイルスは効率よく感染する. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
- 13) Jiang Ru, Kanamori Mikiko, Satoh Yukio, Fukuda Makoto, Ikuta Kazufumi, Murakami Masanao, Sairenji Takeshi: Reduction of Epstein-Barr virus (EBV) genomes by Hydroxyurea (HU) in EBV-infected cell lines. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.

4. EBNA-LP 変異体による EBV 発癌遺伝子の解析

分担研究者 原田志津子 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨 EB ウイルス感染による B 細胞増殖形質転換いわゆる試験管内発癌に、不可欠のウイルス核蛋白が EBNA-2 と EBNA-LP である。EBNA-2 は転写活性化因子としてウイルス、細胞の遺伝子を活性化し、EBNA-LP は EBNA-2 の転写活性化を促進する補因子機能を持つことを申請者らは報告してきた。EBNA-2 と EBNA-LP の共発現で細胞周期が動くことが示唆されており、これら核蛋白の機能抑制が腫瘍細胞の細胞周期停止に繋がる可能性を持っている。我々はすでに転写活性化にドミナントネガティブ効果を持つ EBNA-LP 変異体の存在を発見していたので、本研究の前半では導入遺伝子量とドミナントネガティブ効果との相関を確認した。さらに作用機作解析の課程で、EBNA-LP 自体の多量体形成能と EBNA-2 との相互作用能を見いだした。今後はこの変異体の EBV 潜伏感染細胞増殖への影響について、誘導発現細胞を作成して解析し、リンパ腫細胞増殖抑制と癌治療効果の可能性を検討したい。

A. 研究目的

EB ウイルス感染による B 細胞増殖形質転換（発癌）に不可欠の二つの核蛋白 EBNA-2 と EBNA-LP について、発癌における機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらには、核蛋白機能を抑制することができる蛋白変異体の利用によって、リンパ腫細胞などの腫瘍細胞の増殖を押さえ癌治療効果があるかどうかを検討する。

B. 研究方法

EBNA-2 と EBNA-LP の発現プラスミド、および EBNA-2 依存プロモータを持ったリポーター遺伝子プラスミドを構築した。共発現によるリポーターアッセイを行った。導入遺伝子量をかえて発現強度をしらべた。

EBNA-LP の一部領域と GST 融合蛋白を 8 種類作った。これらと EBNA-LP 発現細胞などのライゼートをつかった pull-down アッセイを行った。EBNA-2 との相互作用については、上述と同様の実験の他、EBNA-2 の一部を GST と融合させた蛋白を使用した実験で検討した。

(倫理面の配慮)

臨床材料や動物実験を対象としていないので、特に倫理面の配慮を必要としていない。

C. 研究結果

1. EBNA-LP は EBNA-2 の転写活性化を上昇させる補助因子機能を持つことと、その機能のない変異体が存在することを確認した。
2. その変異体を野生型と同時に発現させる実験系では、転写活性化の上昇が見られないドミナントネガティブの効果が認められた。
3. ドミナントネガティブの効果は EBNA-2 を直接介して影響を与えるものではないことが示された。
4. ドミナントネガティブ効果は、導入遺伝子量に相関し、Dose dependent である。
5. EBNA-LP は self-association をすることが、免疫沈降実験や pull-down アッセイで示された。
6. EBNA-2 の転写活性化に重要な領域と EBNA-LP の変異体が相互作用する結果が

示された。

7. その領域は EBNA-LP の W2 から Y2 にかけてと考えられた。

D. 考 察

EBNA-LP のある変異体が、野生型の持つ転写活性化補因子機能を持たず、かつ野生型の機能を疎外するドミナントネガティブ効果を持つことが確認された。導入遺伝子量との相関関係と self-association を示すデータから、そのメカニズムを考えると、補因子機能をあらわすためには EBNA-LP が多量体を形成することが重要であることを意味していた。EBNA-2 との相互作用が変異体では見られたことから、なんらかの因子を介した間接的な相互作用が野生型では重要なはたらきをしているのではないかと考えられた。

EBNA-2 と EBNA-LP の同時発現が細胞周期に関わる遺伝子を活性化するという報告は追試されていないが、本研究の EBNA-LP 変異体をもちいて機能低下をさせることで、細胞の増殖を制御できるかどうかを検討することが重要である。今後、変異体 EBNA-LP の誘導発現細胞名度を作成し、細胞増殖への影響を調べる計画である。

E. 結 論

EBNA-LP の補因子機能を低下させ消失させてしまう EBNA-LP 変異体を確認され、EBNA-2 と共同で上昇させていた遺伝子の活性化を押さえられることが明らかとなった。そのドミナントネガティブ効果のメカニズムは、EBNA-LP が多量体を形成して補因子機能をあらわしているためであると考えられた。

F. 研究発表

- 1) Han I, Xue Y, Harada S, Orstavik S, Skalhegg B, Kieff E: Protein Kinase A associates with HA95 and affects transcriptional co-actovation by Epstein-Barr virus nuclear proteins. Mol Cell Biol 22: 2136-2146, 2002.

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

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 子宮頸部扁平上皮癌発生に関与するヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 遺伝子型を特定するために、294 症例の生組織検体を 38 種の皮膚型 及び 48 種の性器型 HPV を検出可能なサザンブロットハイブリダイゼーション法で調べた。その結果、181 例 (62%) に性器型 HPV の全長遺伝子が一細胞当たり 5 コピー以上検出された。HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67 が 173 例に、HPV 18, 39, 56, 82 が 8 例に同定された。一方、50 例 (17%) に同定出来ない性器型 HPV が検出された。しかし、残りの 63 例 (21%) には何れの HPV 型も認められなかった。此の事から、子宮頸部扁平上皮癌の殆どは HPV16 グループに起因すると結論された。さらに、HPV 陰性の癌もこのグループによって引き起こされるがウイルス DNA が消失したものと推測された。

A. 研究目的

これまで我々は多様なヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) 遺伝子型と種々の婦人科腫瘍；子宮腔部異形成、子宮頸部異形成 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN)、子宮頸部腺癌及び腺扁平上皮癌との病因学的関連を明らかにして来た。本研究では CIN を前駆病変とする子宮頸部扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma: SCC) の病因 HPV 遺伝子型を特定する事を目的とした。

B. 研究方法

SCC 検体は採取時に分割し、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を行なった。一方、凍結保存した組織より全 DNA を抽出し、各々 PstI, BanI, および MspI 酵素処理後、アガロースゲル電気泳動してニトロセルロース膜に転写した。そして種々の HPV 型をプローブとし異なる反応条件でハイブリダイゼーション行つた。此の方法は、従来繁用されている PCR 法と異なり、癌組織に存在する HPV 遺伝子型、その遺伝子の長さ及びコピー数を同時に検索可能な方法である。

(倫理面への配慮)

当該医師によって倫理面の配慮がなされている。

C. 研究成果

まず、現在までに分離同定されている 38 種の皮膚型と 48 種の性器型 HPV を効率良く検出可能なブロットハイブリダイゼーション条件を確立する為、GenBank に登録されている全ての HPV の塩基配列を CLUSTAL W で比較した。表 1 に 48 種の性器型を 11 のグループ (G1a から G3) に分類して全長遺伝子の類似性を示した。同一グループの HPV は 64% 以上の高い類似性を持つ事、また近似の GC 含量を有する事が判った。そこで所有する各グループのクローン DNA を用いて再構築実験を行ない、同一グループの HPV は一つの HPV 型をプローブとした Tm-30°C でのブロットハイブリダイゼーションで一細胞当たり 1 コピー以上の感度で検出可能な事を見出した。また、38 種の皮膚型は 8 のグループに分類され同様に検出される事を確認した。

そこで、294 症例の SCC について、1-10 µg の全 DNA を PstI, BanI, ないし MspI 酵素処理し、全てのグループから少なくとも一種の HPV 型をプローブとしてブロットハイブリダイゼーションを行なった。図 1 に 50 症例の SCC を PstI パターン解析した結果を示した。実験は HPV 16 と 58 をプローブとして Tm-30°C で行なった。標準型 HPV の切断パターンと比較する事により、一部の SCC に存在する HPV 型が同定された。しかし、正常な切