

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

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

ウイルス感染によるヒトがん発病機構の解明と  
予防・治療に関する研究班  
班員名簿

| 氏 名   | 所 属                       |
|-------|---------------------------|
| 佐多徹太郎 | 国立感染症研究所感染病理部             |
| 西連寺 剛 | 国立感染症研究所感染病理部             |
| 原田志津子 | 国立感染症研究所ウイルス1部            |
| 松倉 俊彦 | 国立感染症研究所ウイルス2部            |
| 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 |

## 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 15 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 関連疾患における癌化関連遺伝子および蛋白の解析・・・・・・・・ 5  
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）発がん治療へ向けての基礎研究・・・・・・・・・・・・ 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・・・・・・・・・・・・ 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. 成人型 T 細胞白血病の新しい免疫学的治療法の開発・・・・・・・・・・・・ 24  
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）

# 1. 総括研究報告書

## 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）

研究要旨 ヒトヘルペスウイルス8が体液性リンパ腫のほか固形リンパ腫を起こすことを見だし、固形リンパ腫では潜伏感染タンパクだけでなく、他の溶解感染性ウイルスタンパクを発現していることがわかった。EBウイルス腫瘍の治療戦略としてヒドロキシウレア（HU）の効果を検討し、バーキットリンパ腫（BL）細胞株はHU高感受性でEBV DNAも脱落・減少し、上皮細胞株はHU低感受性でEBV DNAも低減少を示したので、HUのBL治療への可能性を示した。EBウイルスの核蛋白EBNA-LPはEBNA-2の転写活性化を昂進する補因子機能を持ち、B細胞の増殖形質転換に重要な働きをしている。EBウイルス潜伏感染細胞にEBNA-LP変異体を発現させると細胞増殖に影響を与える結果が得られ、EBNA-LPの感染細胞増殖への関与が初めて実験的に示された。子宮頸部扁平上皮癌250例に存在するHPVをPCR法で調べた結果、240例（96%）にHPVの遺伝子が検出された。また、29例（12%）には異なる二種類HPV型が同定された。HTLV-I感染無症候性キャリアー（AC）からのATL発症予防に必要なウイルス抗原特異的メモリーCD8陽性T細胞は、末梢単球由来樹状細胞刺激によって産生された。このT細胞は再刺激を受けて、容易にウイルス感染細胞を殺戮するキラー細胞へ分化した。

### 分担研究者

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・ウイルス第2  
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

ヒトがんに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しうるものと考えられる。

そこで、対象としたウイルスについて下記の目的をもって本年度の研究を行った。

HHV-8 関連リンパ腫として原発性体液性リンパ腫と固形リンパ腫が知られているが、本邦の固形リンパ腫6例について検索した。また HHV-8 関連液性リンパ腫および固形リンパ腫実験動物モデルを作成することを目的とした。

ハイドロキシウレア (HU) は白血病の治療に古くから使用され、最近では慢性活動性EBV 感染症の治療にも用いられている。EBV はプラスミド状態で細胞内に潜伏し、感染細胞を不死化するが、EBV ゲノムを失った細胞は増殖できない。そこでHU 処理により EBV 感染BL 細胞からEBV ゲノムが容易に排除できかどうかについて検討した。

EB ウイルスによる発がんはウイルスの潜伏感染の成立に由来する。B 細胞増殖形質転換 (試験管内発癌) に不可欠な二つの核蛋白 EBNA-2 と EBNA-LP に注目し、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。これら核蛋白機能を抑制することができる蛋白変異体を発見したので、これを利用し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ことを目的とした。

子宮頸部扁平上皮癌 (squamous cell

carcinoma: SCC) に存在するヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) をプロットハイブリダイゼーション法で昨年度調べたが、294 例中 63 例 (21%) は陰性だった。そこで、この陰性例を含む 250 例について PCR 法で再検査し、検索法による差異を明らかにすることを目的とした。

成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-I 感染後長い潜伏期間を経て発症する。無症候性キャリア一期には、CD8 陽性キラー T 細胞が作動して、種々の原因で産生された白血化 CD4 陽性 T 細胞を対外に排除していると想定されている。そこで、AC 患者 DC は自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激し、メモリータイプ CD8 陽性 T 細胞を産生し得るか検討した。

## B. 研究方法

各分担研究者の報告に詳細な方法の記載があるので参照。倫理面への配慮についても記載した。

## C. 研究結果

1) HHV-8: 6 例の固形リンパ腫につき病理組織学的検索とウイルス蛋白の発現を調べた。症例はすべて HIV 陽性の男性患者で、カポジ肉腫や PEL, MCD を合併している症例が多い。固形リンパ腫の組織型は diffuse large B cell lymphoma で、細胞表面マーカーは CD20 が陰性のものが多く、CD30 陽性の症例が 4 例あった。5 例は HHV-8 の単独感染である。細胞溶解性蛋白はリンパ腫細胞の 2-5% 程度の細胞で陽性であった。また、SCID マウスに HHV-8 陽性 PEL 細胞株である TY-1 を腹腔内に接種した。2 ヶ月後、腹腔内に固形リンパ腫が観察された。びまん性大細胞型リンパ腫で LANA 陽性、ほか細胞溶解性蛋白を発現していた。一方、腹水の貯留とともに液性リンパ腫を認めた。接着因子は、細胞株の段階

の細胞では LFA-1 の発現は全くないのに対し、マウスの腹腔に形成された固形リンパ腫の組織では LFA-1 の発現が亢進している細胞がみられた。

2) EBV : HU の効果を EBV 感染 BL 細胞株及び胃上皮細胞株で検討した。BL 細胞株は、胃上皮細胞株に比べ HU 高感受性を示し、HU 処理により容易に EBV ゲノムが脱落した。胃上皮細胞株は HU 低感受性で EBV ゲノムの減少割合も低かった。HU で長期間処理した BL 細胞株 Raji で HU 耐性細胞の出現を認め、耐性細胞クローンでは RR 活性サブユニット 2 蛋白の発現上昇が見られた。

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を確認し、その機能のない変異体は、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認められた。EBNA-LP 変異体を EB ウイルス感染細胞に発現させると、細胞の増殖速度が低下した。発現細胞の cyclin D3 や cdk4 などの発現レベルの低下が見られることなどから、ある細胞周期が延長されていることが示唆された。

4) HPV : プロットハイブリダイゼーション法で HPV 型が同定された 142 例のうち、PCR 法では同じ HPV 型が同定され場合と異なる HPV 型が検出される場合があった。また、同一検体に異なる二種の HPV 型が認められるものもあった。一方、プロットハイブリダイゼーション法で HPV 陰性の 60 例では HPV 6, 16, 18 などがみられ、重複する HPV がみられた症例もある。また PCR 法で検出された HPV のコピー数は 0.05 コピー以下であることが明らかとなった。

5) HTLV-I : AC 患者 DC は、外来性ウイルス抗原非存在下で自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激し、大量の IFN- $\gamma$  を産生した。その程度は正常健常者由来 DC に比し有意に強かった。そこで、AC 患者 DC を用いて自己の CD8 陽性 T 細胞を 10 日間刺激したところ、CD45RA<sup>-</sup>・CD45RO<sup>+</sup>のメモリー T 細胞が得られた。これらメモリー T 細胞の産生には、DC の CD40 リガンド処理が不可欠であった。そこで、HTLV-I 持続感染細胞をターゲットとし、CTL assay を行った結果、エフェクター細胞は HTLV-I 持続感染細胞を効率よく殺戮し、アポトーシスを誘導した。

#### D. 考 察

1) HHV-8 : 米国において HHV-8 関連固形リンパ腫 3 例についておおむね同様の特徴を備えていた報告があった。今後、性格が明らかになっていくものと思われる。また本研究で実験的に一つの細胞株から固形リンパ腫と液性リンパ腫という二つの病変を形成することができる動物モデルを作成した。この二つの病変部をさらに詳細に比較検討することにより、HHV-8 の発癌と PEL の発症機構に関する発見が期待できる。

2) EBV : HU 処理で EBV ゲノムが失われるが、他方 HU で細胞増殖が抑制されず、EBV ゲノムも脱落しない薬剤耐性細胞が出現する。HU 耐性を解決することで HU より EBV 関連腫瘍治療の可能性が開ける。

3) EBV : EB ウイルス感染細胞に EBNA-LP ドミナントネガティブ変異体を発現すると細胞増殖を低下させたことから、EBNA-LP が感染細胞増殖に正の関与をしていることを初めて示した。今後はリンパ腫細胞増殖抑制と癌治療効果の可能性を検討するとともに

に、発現細胞で変化した細胞性遺伝子の解析から、潜伏感染を制御するターゲット遺伝子に対する阻害剤などの検索の可能性も探りたい。

4) HPV：今回 PCR 法で同定された HPV 型と昨年度報告した 294 例の SSC にプロットハイブリダイゼーション法で検出された HPV 型を比較した。HPV 6, 18, 16 等が PCR 法で異常な頻度で検出されていることがわかった。そこで塩基配列解析に用いたプライマーと PCR 及びプロットハイブリダイゼーション法で検出された標準 HPV 遺伝子型の該当する部分の塩基配列を比較した。その結果、PCR 法での検索成績は使用したプライマーの特異性を強く反映した結果と考えられた。

5) HTLV-1：ATL はウイルス感染から 40～60 年の長期を経て発症するが、この間、CD8 陽性 T 細胞が偶発的に産生された白血化細胞の排除に当たっていると想定されている。機能的 CD8 陽性 T 細胞を十分量維持することが、現行では最も有効な ATL 発症予防法と考えられる。DC を用い自己 CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、やがてはキラー T 細胞へ分化し得るメモリー T 細胞を産生することが可能であった。この DC は自己 T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  を産生したことから、活性化 CD4 陽性 T 細胞のみが産生する CD40 リガンドを供給することも可能と考えられた。

## E. 結論

HHV-8 関連固形リンパ腫の特徴を明らかにし、また液性リンパ腫と固形リンパ腫の動物モデルを作成し固形リンパ腫では LFA-1 の発現が亢進していたことがわかった。HU による EBV ゲノムの排除を明らかにした。EB ウイルス潜伏感染細胞に EBNA-LP 変異体を

発現させると細胞増殖に影響を与える結果が得られ、EBNA-LP の感染細胞増殖への関与が初めて実験的に示された。ほぼ全例の子宮頸部扁平上皮癌に性器型 HPV DNA が PCR 法で認められたが、組織内ウイルス量が少ないので検出された HPV を癌の起因子とするのは問題があると考えられた。ATL 発症予防法確立の糸口が見つかった。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
各分担研究者の報告を参照。
2. 学会発表  
各分担研究者の報告を参照。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
各分担研究者の報告を参照。
2. 実用新案登録  
なし

## 2. ヒトヘルペスウイルス 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)

共同研究者 片野 晴隆、佐藤 由子、長谷川 秀樹 (国立感染症研究所感染病理部)

**研究要旨** HHV-8 はカポジ肉腫のほかに primary effusion lymphoma (PEL, 原発性体液性リンパ腫) と呼ばれる特殊なリンパ腫からも検出される。PEL は他のリンパ腫と異なり固形腫瘍を作らず、胸水や腹水などの体腔液のなかに浮遊した状態で存在するリンパ腫である。一方で、HHV-8 はまれではあるが固形リンパ腫からも検出されることがあり、これらは HHV-8 関連固形リンパ腫といわれる。HHV-8 固形リンパ腫は PEL と細胞の性状が似ており、PEL と同様の発症機構が考えられるが、なぜ固形腫瘍とならないかは明らかになっていない。われわれは HHV-8 のリンパ腫発症機構を解明するため、HHV-8 関連固形リンパ腫 6 例を詳細に解析し疾患概念を確立するとともに、HHV-8 陽性リンパ腫細胞株を重度免疫不全マウスに移植することにより、液性リンパ腫と固形リンパ腫の動物モデルを作成した。HHV-8 陽性 PEL 細胞株では細胞接着因子である LFA-1 の発現は抑えられていたが、マウスに形成された固形リンパ腫ではその発現が亢進していた。現在、HHV-8 のどの蛋白が接着因子の発現に関与しているかを検索中である。

### 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。PEL はきわめてまれなリンパ腫で同性愛の男性でカポジ肉腫を合併しているエイズ患者に発症する。細胞系統を示す細胞表面マーカーの発現が抑制されていることが多いが、イムノグロブリン遺伝子に遺伝子再構成が見られることから B 細胞性リンパ腫であることがわかっている。BCL-6 が陰性で、形質細胞のマーカーが陽性になることから post-germinal center B cell が起源と考えら

れる。すべての細胞に HHV-8 が検出され、エプスタイン・バーウイルスもしばしば検出されている。PEL のもっとも特徴的な病態は固形腫瘍を作らず、胸水や腹水などの体腔液のなかに培養細胞のように浮遊した状態で存在する点である。通常のリンパ腫はその細胞表面に接着因子が高発現し、固形腫瘍を形成するが、PEL には接着因子の発現が抑制されており、固形腫瘍を作らない。HHV-8 がその病因に関連していることは間違いないが、なぜ、そうした特殊な形のリンパ腫ができるか、HHV-8 がその発症機序にどのような役割を果たしているかなど、そのリンパ腫発症の機序はまだ明らかでない。



一方で、HHV-8 はまれではあるが固形リンパ腫からも検出されることがあり、これらは HHV-8 関連固形リンパ腫といわれる。HHV-8 固形リンパ腫はやはり、同性愛の男性エイズ患者に合併する非常にまれなリンパ腫で、他にカポジ肉腫や PEL, 多巣性キャッスルマン病 (Multicentric Castleman's disease, MCD) など、HHV-8 関連疾患を合併していることが多い。PEL と細胞の性状が似ており、PEL と同様の発症機構が考えられるが、なぜ PEL と異なり、固形腫瘍を形成するのかは明らかになっていない。このように HHV-8 関連リンパ腫は PEL (液性リンパ腫) と固形リンパ腫という、二つの対照的な病変を形成する可能性があり、リンパ腫形成の過程で HHV-8 がどのような役割を果たしているのか、不明な点が多い。本研究では HHV-8 のリンパ腫発症機構を解明することを目的とする。そのためにはまず、(1) HHV-8 関連固形リンパ腫の症例を集め、その疾患概念を確立すること、(2) HHV-8 関連液性リンパ腫および固形リンパ腫実験動物モデルを作成することを目指す。

#### 1) HHV-8 関連固形リンパ腫 6 例の解析

HHV-8 関連固形リンパ腫は 2000 年にわれわれが 3 例を報告したのが最初で、その後、国内外からの症例報告が相次いでいる (Katano et al. *Modern Pathol.* 2000;13:77-85)。したがって、HHV-8 関連固形リンパ腫が存在することは確実といえるが、個々の症例報告における症例数自体はきわめて少なく、まれなリンパ腫であることは間違いないので、多くの症例からその概観をつかむことは難しい。われわれも 2000 年の症例報告後さらに 3 例の HHV-8 関連固形リンパ腫の症例を経験し、合計 6 例が解析可能であった。そこでこの 6 例につき、ウイルス学的、病理学的解析を加え、HHV-8 関連固形リンパ

腫の疾患概念を確立するとともに、PEL との差がどこにあるのかを詳細に検討する。

#### 2) HHV-8 関連液性リンパ腫および固形リンパ腫実験動物モデル

PEL からはすでに HHV-8 感染リンパ腫細胞株が樹立されている。われわれは 1999 年に PEL に HHV-8 関連固形リンパ腫が合併した患者の PEL から HHV-8 感染リンパ腫細胞株を樹立している。さらに、この細胞株を重度免疫不全マウス (severe combined immunodeficiency mice, SCID mice) の腹腔内に接種すると、2 ヶ月後にはマウスの腹腔内に固形腫瘍が形成されることもすでに観察している。このシステムが、液性リンパ腫と固形リンパ腫の両方を含む HHV-8 関連リンパ腫の実験動物モデルとして適当かどうかを検討する。

### B. 研究方法

#### 1) 免疫染色

ホルマリン固定、パラフィン包埋標本に HHV-8 の各蛋白に対する抗体を一次抗体として、免疫染色を行った。使用した抗 HHV-8 抗体は潜伏感染蛋白 latency-associated nuclear antigen (LANA)、細胞溶解性感染蛋白 ORF59, ORF50 に対するウサギのポリクローナル抗体で一部の染色には catalyzed signal amplification (CSA) kit (DAKO 社、京都) を用いシグナルを増強した。

#### 2) HHV-8 関連固形リンパ腫の動物モデルの作成

HHV-8 感染原発性体液性リンパ腫細胞株である TY-11 x 10<sup>7</sup> 個を SCID マウスの腹腔内に接種した。

## C. 研究結果

### 1) HHV-8 関連固形リンパ腫 6 例の解析

固形リンパ腫のうち免疫染色で HHV-8 の LANA が検出された症例 6 例につき、病理組織学的検索を行い、ウイルス蛋白の発現を調べた (表)。症例はすべて HIV 陽性の男性患者に発症しており、病歴、問診などから多くの患者で同性愛の傾向があることが考えられた。患者の年齢は 30 歳から 59 歳で平均 43 であった。発症部位は肺、皮膚、リンパ節などで多発性の症例も見られた。合併症として HHV-8 関連疾患であるカポジ肉腫や PEL, MCD を合併している症例が多く、6 例中 5 例はカポジ肉腫、PEL, MCD のいずれかの病変を発症していた。これら合併症にも HHV-8 は検出される。1 例では肺に固形リンパ腫とカポジ肉腫の組織像が隣接する像が認められ、衝突癌のような組織像を呈していた。その症例ではカポジ肉腫、リンパ腫ともに HHV-8 の LANA が陽性であり、HHV-8 が二つの病変の病因に関与していることが示唆される。さらに別の 1 例では PEL 発症後に皮膚に HHV-8 関連固形リンパ腫が見られた。イムノグロブリン遺伝子の遺伝子再構成を調べた結果、二つの病変部 (液性腫瘍と固形腫瘍) は異なるクローナリティーである可能性が示唆された。検索した 6 例の固形リンパ腫の組織型は diffuse large B cell lymphoma で核異型が強く、核小体が明瞭で、広い細胞質を持つ大型の異型リンパ球がびまん性に浸潤している像が見られ、anaplastic variant か immunoblastic variant に分類されるものが多いと考えられる。細胞表面マーカーは B 細胞のマーカーである CD20 が陰性のものが多く、CD30 陽性の症例が 6 例中少なくとも 4 例あった。エプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の検索では 6 例中 1 例が EBV-encoded small RNAs (EBER) 陽性であり、5 例は HHV-8 の単独感染

と考えられる。

ウイルス蛋白の発現を免疫染色で調べた結果、HHV-8 の潜伏感染蛋白 LANA は固形リンパ腫細胞のすべての細胞の核内に点状のシグナルとして認められた (図 1)。また、他の細胞溶解性蛋白である ORF59, ORF50 の免疫染色ではリンパ腫細胞の 2-5% 程度の細胞が陽性であった。カポジ肉腫ではこれらの蛋白は通常 1% 以下の細胞しか発現していない点と比べると HHV-8 関連固形リンパ腫では多くの細胞が細胞溶解性蛋白を発現していることになる。

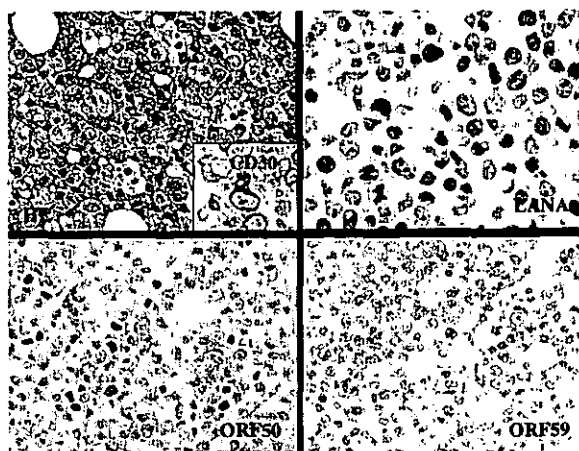


図 1 : HHV-8 関連固形リンパ腫における HHV-8 関連蛋白の発現

### 2) HHV-8 関連液性リンパ腫および固形リンパ腫実験動物モデル

HHV-8 関連固形リンパ腫 6 例の解析から HHV-8 が液性リンパ腫と固形リンパ腫の両方の病因に関与することが明らかであるが、つぎになぜ一種類のウイルスが液性と固形といった異なる病態に関与するかという点が疑問となる。液性リンパ腫と固形リンパ腫が合併した症例の解析からはこの二つの腫瘍は異なるクローンである可能性も示唆されている。

そこで、われわれはもともと一つのクローンであった PEL の細胞株から固形リンパ腫と液性リンパ腫が作成できないかと考え、SCID マウスに HHV-8 陽性 PEL 細胞株である TY-1 を腹腔内に接種した。2 ヶ月後、マウスの腹部は

膨満し、解剖の結果、腹腔内に固形リンパ腫が形成されていることが観察された。この固形リンパ腫を解析したところ、びまん性大細胞型リンパ腫の組織像を採り、ウイルス蛋白の発現も HHV-8 関連固形リンパ腫と同様、すべての細胞が LANA 陽性で、そのほか、ORF50 や ORF59 の様な細胞溶解性蛋白を発現している細胞もしばしば認められた (図 2)。腹腔へ TY-1 を接種したマウスの一部は固形リンパ腫のみならず、腹水の貯留を認め、その腹水内に液性リンパ腫の細胞を認めた。これらの腫瘍細胞は TY-1 の細胞形質を保ち、CD30 の発現も認められた。固形腫瘍には一般に LFA-1 の様な接着因子の発現が見られ、腫瘍細胞が固形化するのに寄与していると考えられている。そこでマウスの腹腔内に形成された固形リンパ腫と細胞株における接着因子の発現を比較検討した。その結果、細胞株の段階の細胞では LFA-1 の発現は全く見られないのに対し、マウスの腹腔内に形成された固形リンパ腫の組織では LFA-1 の発現が亢進している細胞が見受けられた (図 3)。このことは PEL 細胞株がマウスの腹腔内

に入り、何らかの刺激を受け、形質転換した結果、接着因子が発現し、固形腫瘍を形成するに到ったと考えられる。どのような因子が接着因子の発現に関わっていたのかを現在検索中である。

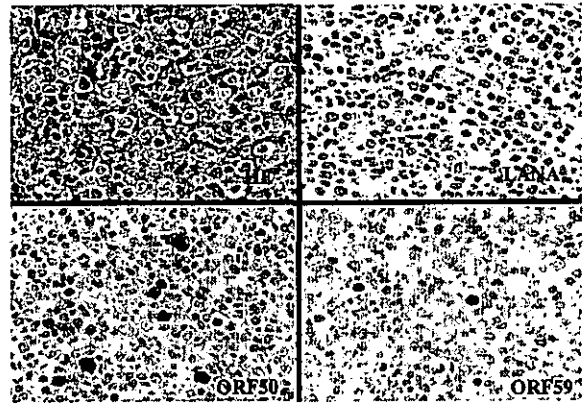


図 2 : HHV-8 関連固形リンパ腫の動物モデルにおける HHV-8 関連蛋白の発現

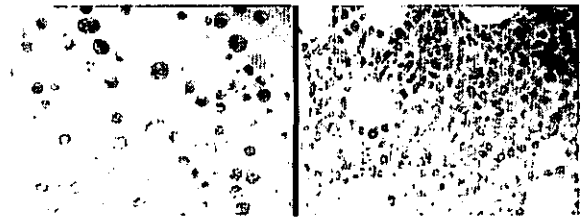


図 3 : HHV-8 感染リンパ腫細胞株 (左) と HHV-8 関連固形リンパ腫の動物モデル (右) における細胞接着因子 LFA-1 の発現

| Case | Age | Sex | HI | Site  | Histology | EBV | Complications | Phenotype                       |
|------|-----|-----|----|-------|-----------|-----|---------------|---------------------------------|
| 1    | 59  | M   | +  | Lung  | ALCL-like | -   | KS            | CD20-, CD45RO+, CD30+           |
| 2    | 45  | M   | +  | Skin  | ALCL-like | +   | PEL           | CD20-, CD45RO-, CD30+           |
| 3    | 30  | M   | +  | Skin  | ALCL-like | -   | MCD           | CD20-, CD45RO-, CD30+           |
| 4    | 30  | M   | +  | LN    | ALCL-like | -   | KS            | CD20-, CD45RO+, CD30+           |
| 5    | 46  | M   | +  | Lung  | ALCL-like | -   | KS            | CD20-, CD45RO-, CD30(ND)        |
| 6    | 50  | M   | +  | Liver | DLBCL     | -   | no            | CD20+, CD45RO-, CD30-,<br>BCL6+ |

表 : HHV-8 関連固形リンパ腫 6 例の解析

#### D. 考 察

2000年にわれわれがHHV-8関連固形リンパ腫を提唱して以来、われわれだけでなく、各国から症例報告がなされ、現在ではこの疾患が存在すること自体は疑いの余地がない。ここで示した自験例6例の観察から、HHV-8関連固形リンパ腫の特徴として、(1)エイズに合併するまれなB細胞性リンパ腫で同性愛男性に発症すること、(2)びまん性大細胞性リンパ腫の組織型を採ること、(3)B細胞のマーカーが落ちているがCD30陽性であることが多いこと、(4)EBVの関与する例も見られるが、HHV-8単独感染例が多いこと、(5)HHV-8のLANAが全リンパ腫細胞に検出されること、(6)HHV-8の細胞溶解性感染関連蛋白を発現している細胞がしばしば見られること、があげられる。最近、米国においてやはりHHV-8関連固形リンパ腫3例の報告があったが、おおむねこの特徴を備えている(Engels EA et al. *Modern Pathology* 2003; 16:424-99)。今後症例が集積されることにより、さらにこの疾患の正確な性格が明らかになっていくものと思われる。

PELの病態でもっとも特異な点は液性リンパ腫を形成する点である。接着因子であるLFA-1はほとんどの白血球により発現され、リンパ腫などの腫瘍細胞ではその発現が亢進する。しかし、PEL細胞ではこのLFA-1の発現は全く見られない。この接着因子を発現しないことがPELが固形病変を作らない最大の理由と考えられるが、本研究で明らかになったとおり、PEL細胞はSCIDマウスに移植すると固形リンパ腫を作り、その中ではLFA-1の発現も認められる。このことはPEL自体はもともとLFA-1を発現する機構を持っているのだが、何らかの機序により、その発現が常に抑えられていることを意味する。すなわち、LFA-1の発現を抑える機構がPEL細胞の中で働いており、

それはHHV-8関連蛋白が関与している可能性がある。HHV-8とおなじガンマヘルペスウイルスに属するEBVはウイルス蛋白であるlatent membrane protein 1 (LMP-1)がLFA-1の発現を亢進することが明らかにされている。このことはEBV関連エイズリンパ腫が節外性の病変を形成する説明の一つとされている。このように、LFA-1の発現を亢進させている機構は他にも明らかになっているが、LFA-1の抑制が直接病態と関係している例はPELのほかにはない。したがって、LFA-1の発現抑制機構を解明することはリンパ球接着の生理的機能の解明、ないしはリンパ腫全体の発症機構に直接関係するかも知れない重要な問題である。われわれは本研究で実験的に一つの細胞株から固形リンパ腫と液性リンパ腫という二つの病変を形成することができる動物モデルを作成した。この二つの病変部をさらに詳細に比較検討することにより、HHV-8の発癌とPELの発症機構、ないしはリンパ腫全体に共通する普遍的な発症機構に関与する発見が期待できる。

#### E. 結 論

HHV-8関連固形リンパ腫6例を詳細に解析し、その疾患概念を確立した。HHV-8関連固形リンパ腫にはエイズに合併するまれなびまん性大細胞性B細胞性リンパ腫で同性愛男性に発症すること、HHV-8の細胞溶解性感染関連蛋白を発現している細胞がしばしば見られることなどの特徴があることがわかった。液性リンパ腫と固形リンパ腫の動物モデルを作成し、固形リンパ腫ではLFA-1の発現が亢進していたことがわかった。

(倫理面に対する配慮)

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、

動物実験は当該施設（国立感染症研究所）の動物実験委員会の承認の後、動物実験ガイドラインに沿って行われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M: Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with myeloid cell nuclear differentiation antigen induced by interferon  $\alpha$ . *Virus Gene* 2003, 27: 237-47.
- 2) Katano H, Sata T.: Human herpesvirus 8 (HHV-8). *Antimicrobial Therapy and Vaccine*. 2nd Ed. By Yu VL, Weber R, Raoult D. 2002, pages 1243-1247, Apple Trees Productions, LLC.
- 3) Rosales CM, McLaughlin MD, Sata T, Katano H, Veno PA, De Las Casas LE, Miranda RN.: AIDS presenting with cutaneous Kaposi's sarcoma and bacillary angiomatosis in the bone marrow mimicking Kaposi's sarcoma. *AIDS Patient Care and STDs* 2002, 19: 573-577.

### 3. EB ウイルス (EBV) 発がん治療へ向けての基礎研究

EBV 感染細胞からウイルスゲノムの除去/siRNA による EBV 再活性化の抑制/上皮系細胞へ EBV 感染/EBV 感染細胞における TGF-β1 レセプターの欠損

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** EBV 腫瘍の発がんから治療を目指して以下の研究を行った。(1) ヒドロキシウレア (hydroxyurea: HU) の EBV 感染細胞及び細胞内 EBV の存在における影響を検討した。Burkitt's リンパ腫 (BL) 細胞株は、HU 高感受性を示し、HU 処理で細胞から容易に EBV ゲノムが減少・脱落した。胃上皮細胞株は HU 低感受性で EBV ゲノムの減少も低かった。細胞内 EBV 遺伝子は、HU により除去できることを確認した。更に HU 存在下で長期培養した BL 細胞で EBV ゲノムの減少していない HU 耐性細胞の出現を認めた。

#### A. 研究目的

EBV 発がん機構および治療へ向けての研究を推進する。HU による細胞内潜伏 EBV 遺伝子の除去を解析する。

#### B. 研究方法

細胞株は、胃組織由来 GT38、GT39、PN 及び印環胃癌細胞株 HSC-39、KATO8、Burkitt's リンパ腫 (BL) 細胞株 Akata、Daudi、Raji、P3HR-1、EB1 や EBV 不死化 B リンパ球細胞株を用いた。組織・細胞内 EBV 遺伝子検出は、PCR 及び FISH 法、EBV 遺伝子発現は EBER in situ hybridization 法、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法を用いた。mRNA は、RT-PCR、ノーザンブロット法、細胞増殖は、MTT アッセイにより定量した。Erk1、2 のリン酸化や p21 発現はイムノブロット法で、NF-κB の活性は NF-κB プロモータールシフェラーゼ活性を測定した。

#### (倫理面への配慮)

「EBV 関連疾患における EBV の病因的役割に関する研究」に関して鳥取大学医学部倫理委員会承認済。癌組織及び細胞株などに関して、一切患者名 (それを暗に示す記号) を学会、論文発表に用いない。データの情報公開により、検体提供者の人権を侵害することは決して行なわない。

#### C. 研究結果

細胞内潜伏 EBV ゲノムは HU によって排除される：リボニクレオチドリダクターゼ (RR) 阻害剤である HU の影響を EBV 感染 BL 細胞株及び胃上皮細胞株で検討した (Jiang et al., J. Med. Virol. 70:244, 2003)。BL 細胞株は、胃上皮細胞株に比べ HU 高感受性を示し、低濃度の HU 処理により細胞増殖が抑制され、容易に EBV ゲノムが脱落した。一方胃上皮細胞株は HU 低感受性で高濃度の HU で細胞増殖が抑制され、EBV ゲノムの減少割合も低かった。HU 存在下で長期間培養

した Raji 細胞株で HU 耐性細胞クローンの出現を認めた (Jiang et al., submitted)。HU 耐性クローンは、EBV ゲノム 50 コピー/細胞と HU 未処理の Raji に比べ同様にウイルスゲノムの減少はなく、しかも HU による細胞増殖阻止濃度 (ID50/ml) は 8 倍も高い。耐性細胞クローンでは HU によって特異的に阻害される酵素 RR の活性サブユニット蛋白 2 の発現に 5 倍以上の上昇が見られた。

#### D. 考 察

HU は白血病の治療に古くから用いられ、最近では慢性活動性 EBV 感染症の治療にも使用され始めている。EBV はプラスミド状態で細胞内に潜伏し、細胞を不死化するが、EBV ゲノムを失った細胞は増殖できない。HU 処理により EBV 感染 BL 細胞から EBV ゲノムが容易に排除できることを確認した。HU 処理で EBV ゲノムが失われるが、他方 HU で細胞増殖が抑制されず、EBV ゲノムも脱落しない薬剤耐性細胞が出現する。HU 耐性を解決することで HU より EBV 関連腫瘍の治療が開ける。

#### E. 結 論

EBV 腫瘍及び感染症の治療に向けて、HU は感染細胞から EBV ゲノムを排除できることから治療に期待できる。HU 耐性細胞の出現をどのように抑制するかが、今後の課題である。

#### 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.* 70: 244-252, 2003.
- 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* 26: 165-173, 2003.
- 3) Ikuta K., Yamada T., Shimomura T., Kuratsune H., Kawahara R., Ikawa S., Ohnishi E., Sokawa Y., Fukushi H., Hirai K., Watanabe Y., Kurata T., Kitani T., and Sairenji T.: Diagnostic evaluation of 2', 5'-oligoadenylate synthetase activities and antibodies against Epstein-Barr virus and *Coxiella burnetii* in patients with chronic fatigue syndrome in Japan. *Microbes and Infection* 5: 1096-1102, 2003
- 4) Shimizu H., Masuta K., Asada H., Sugita K., and Sairenji T.: Characterization of molecular forms of probrain natriuretic peptide in human plasma. *Clinica Chimica Acta* 334: 233-239, 2003.
- 5) 星川淑子、西連寺 剛：胃がんと EB ウイルス：血液・腫瘍科 46: 307-313, 2003.
- 6) 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 91-100, 2003.
- 7) 生田和史、西連寺 剛：慢性疲労症候群における 2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素活性および RNA 分解酵素 L の異常。医学のあゆみ 204: 409-412, 2003.
- 8) Yamada T., Ikuta K., Kawahara R., and Sairenji T.: Increased activity of 2', 5'-oligoadenylate synthetase in peripheral blood mononuclear cells of patients with major

- depressive disorder. *Yonago Acta medica* 47: 1-5, 2004.
- 9) Luo B., Murakami M., Fukuda M., Fujioka A., Yanagihara K., and Sairenji T.: Characterization of Epstein-Barr virus infection in a human signet ring cell gastric carcinoma cell line HSC-39. *Microbes and Infection* (in press).
  - 10) Kase S., Adachi H., Osaki M., Murakami M., Sairenji T., Hashimoto K., Teramoto H., Yamamoto S., Makino H., Shimizu E., Watanabe T., Ohasawa T., Hagari Y., Mihara M., and Ito H.: Epstein-Barr virus infected malignant NK/T-cell lymphoma in a patient with hypersensitivity to mosquito bites. *Int. J. Surg. Pathol.* (in press).
  - 11) 西連寺 剛、下村登規夫、生田和史、阿川英之、山田武史：生活習慣病・慢性疾患と男性更年期：慢性疲労症候群とは。総合臨床 53: 564-568, 2004.
  - 12) 西連寺 剛：胃癌の治療に役立つ基礎知識：胃癌の発生－Epstein-Barr virus. 臨床消化器内科（掲載予定）
2. 学会発表
- 国内学会
- 1) 西連寺 剛：EB ウイルス (EBV) の発がん機構：EBV 蛋白 LMP1 による TGF- $\beta$ 1 シグナルの抑制。第 76 回日本細菌学会総会（阿蘇）2003.
  - 2) 西連寺 剛：EB ウイルス。第 8 回慢性疲労症候群 (CFS) 研究会（米子）2003.
  - 3) 下村登規夫、小谷和彦、下村文代、猪川嗣朗、生田和史、西連寺 剛：慢性疲労症候群患者における頭痛の検討。第 8 回慢性疲労症候群 (CFS) 研究会（米子）2003.
  - 4) 山田武史、川原隆造、西連寺 剛：抗うつ薬のサイトカインに対する作用の検討。第 8 回慢性疲労症候群 (CFS) 研究会（米子）2003.
  - 5) 蔣 茹、金森美紀子、佐藤幸夫、福田誠、生田和史、村上雅尚、西連寺 剛：Effects of hydroxyurea on cell growth and elimination of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in EBV-infected epithelioid cell lines and Burkitt's lymphoma cell lines. 第 3 回日本分子生物学会春季シンポジウム（米子）2003.
  - 6) 黒崎 創、福田 誠、西連寺 剛：Burkitt's リンパ腫細胞株 Akata における TGF- $\beta$ 1-型レセプター欠損による TGF- $\beta$  シグナル伝達異常。第 3 回日本分子生物学会春季シンポジウム（米子）2003.
  - 7) 阿川英之、生田和史、西連寺 剛：NO は L-Arginine により合成され EBV 再活性化を抑制する。第 3 回日本分子生物学会春季シンポジウム（米子）2003.
  - 8) 阿川英之、生田和史、西連寺 剛：EBV 再活性化は L-Arginine から合成される NO により抑制される。第 18 回ヘルペスウイルス研究会（小豆島）2003.
  - 9) 黒崎 創、福田 誠、西連寺 剛：EBV 感染細胞株における TGF-1 シグナル伝達異常の解析。第 18 回ヘルペスウイルス研究会（小豆島）2003.
  - 10) 森多佳子、村上雅尚、西連寺 剛：EBV ゲノム陰性バーキットリンパ腫細胞株における P3HR-1 EBV 遺伝子発現の解析。第 19 回中国四国ウイルス研究会（観音寺）2003.
  - 11) 大橋 誠、星川淑子、西連寺 剛：Tet-on system を用いた EB ウイルス再活性化誘導系の構築の試み。第 19 回中国・四国ウイ



- ルス研究会（観音寺）2003.
- 12) 西連寺 剛、金森美紀子、村上雅尚：ヒドロキシウレアによる EB ウイルスゲノムの除去. 第 62 回日本癌学会総会（名古屋）2003.
  - 13) 阿川英之、西連寺 剛：L-Arginine は NO を介して EB ウイルス再活性化を抑制する. 第 62 回日本癌学会総会（名古屋）2003.
  - 14) 蔀 茹、佐藤幸夫、西連寺 剛：Hydroxyurea induces resistance in Burkitt's lymphoma cell line Raji. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003.
  - 15) 森多佳子、西連寺 剛：EB ウイルス（EBV）ゲノム陰性 Ramos および BJAB 細胞株における P3HR-1 EBV 遺伝子発現の解析. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003.
  - 16) 阿川英之、西連寺 剛：インターフェロン-a による EB ウイルス再活性化抑制機構の解析. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003.

## 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我々は報告してきた。我々は昨年度までに、野生型の転写活性化補因子機能に対しドミナントネガティブ効果を持つ EBNA-LP 変異体を発見し、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。メカニズムの解析の過程でさらに 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が、今年度は相互作用の領域を詳細に解析し、EBNA-2 の酸性アミノ酸領域と EBNA-LP の作用が重要であることを明らかにした。これにより EBNA-2 と EBNA-LP の相互作用が協調的転写活性化の基になっていることを初めて実験的に証明した。さらにこの EBNA-LP 変異体を EBV 潜伏感染細胞に発現させ、細胞増殖が低下する結果を得つつあるが、これは EBNA-LP が感染細胞において増殖に関与している事を示す初めての知見である。この蛋白の発現による増殖低下と細胞死や細胞周期との関連についての詳細解析を、誘導発現細胞を作成して進めている。

### A. 研究目的

EB ウイルスによる発がんの基は EB ウイルスの潜伏感染の成立である。この機能、すなわち B 細胞増殖形質転換（試験管内発癌）に不可欠の二つの核蛋白 EBNA-2 と EBNA-LP に注目し、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。これら核蛋白機能を抑制することができる蛋白変異体を発見したので、これを利用し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。さらに機能抑制に伴って発現変化の見られる宿主遺伝子を同定してこれをターゲットとした抗腫瘍薬の検索可能性を探る。

### 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。一部アミノ酸の変異を入れた融合蛋白も作製した。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 融合または His タグ蛋白を使用した実験で検討した。

EB ウイルス潜伏感染細胞はリンパ芽球細胞株を用い、遺伝子発現はプラスミド導入による一過性発現、または tet 発現誘導系を用いた細胞株樹立によった。細胞増殖分析は W S T 試薬を用いた比色反応によった。発現の確認および解析は蛍光抗体法またはウエスタンブロット法を中心に行った。

#### (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。組換え DNA 実験は所属研究所の許可を受け、実験指針に沿って行った。

#### 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を確認し、その機能のない変異体は、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る。その効果は 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。〔図 4 参照〕
- 2) EBNA-LP は W 領域で 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。〔図 1 参照〕
- 3) 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。〔図 2 参照〕
- 4) その領域は EBNA-LP の W 2 から Y 2 にかけての 31 アミノ酸と考えられた。〔図 1 参照〕
- 5) EBNA-LP の self-association と EBNA-2 との相互作用の重要部位は異なる。〔図 3 参照〕
- 6) EBNA-LP の補助因子機能には EBNA-2 の酸性アミノ酸領域が必須であるが、それ単独の分子には機能を発揮しない。
- 7) EBNA-LP 変異体を EB ウイルス感染細胞

に発現させると、細胞の増殖速度が低下した。

- 8) 発現細胞の cyclin D3 や cdk4 などの発現レベルの低下が見られることなどから、ある細胞周期が延長されていることが示唆された。
- 9) DNA チップを用いた網羅的な遺伝子発現解析を開始した。幾つかの候補遺伝子があがっている。

(図 1-4 は、発表論文 PNAS, 2004 より抜粋した)

#### D. 考察

EBNA-LP のある変異体が、野生型の持つ転写活性化補助因子機能を持たず、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を昨年報告した。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、補助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。バクテリア産生蛋白では明らかに EBNA-LP の W 領域と EBNA-2 との相互作用が確認された。B 細胞系では C 末端欠損の変異体で EBNA-2 との作用が見られたことから、細胞内での核蛋白の修飾や何らかの細胞因子を介した間接的な相互作用が機能の表現上、重要なはたらきをしていると考えられた。

EB ウイルス感染細胞にドミナントネガティブ変異体を発現することによって細胞増殖を低下させることが示唆されたことは、EBNA-LP が感染細胞増殖に正の関与をしていることを初めて示したことになる。EBNA-LP の機能解析では、自身の特殊な転写メッセージの関係からノックアウト実験(組換えウイルス・RNAi など)ができない

事情があるが、本研究では、EBNA-LP ドミナントネガティブ変異体をもちいて EBNA-LP の機能解析を可能にした点で画期的である。今後はリンパ腫細胞増殖抑制と癌治療効果の可能性を検討するとともに、発現細胞で変化した細胞性遺伝子の解析から、潜伏感染を制御するターゲット遺伝子に対する阻害剤などの検索の可能性も探りたい。

#### E. 結論

EBNA-LP と EBNA-2 の協調的転写活性化機能には、EBNA-LP と EBNA-2 との相互作用が基盤となっていることが示され、細胞内でのこれら核蛋白の修飾（リン酸化など）が関係した細胞性因子との直接作用に依存することが示唆された。EBNA-2 の転写活性化を昂進させる野生型の EBNA-LP の機能を抑制するドミナントネガティブ EBNA-LP 変異体は EBNA-2 と効率よく相互作用した。EB ウイルス潜伏感染細胞にこの変異体を発現させることによって細胞増殖に影響が現れる結果が得られ、EBNA-LP の感染細胞増殖への関与が初めて実験的に示された。

#### F. 発表

##### 1. 論文発表

- 1) 原田志津子：基礎編 1. EB ウイルスの構造と遺伝子 2) EBNA、「EB ウイルス」（高田賢蔵監修）診断と治療社 p23-32、2003
- 2) Harada S, Kamata Y, Ishii Y, Eda H, Kitamura R, Obayashi M, Ito S, Ban F, Kuranari J, Makamura H, Kuze T, Hayashi M, Okabe N, Senpuku H, Miyasaka N, Nakamura Y, Kanegane H, and Yanagi K: Maintenance of serum immunoglobulin G antibodies to Epstein-Barr virus (EBV)

nuclear antigen 2 in healthy individuals from different age groups in Japanese population with a high childhood incidence of asymptomatic primary EBV infection. Clin Diag Lab Immunol 11(1):123-130, 2004

- 3) Peng C-W, Xue Y, Zhao B, Johanssen E, Kieff E and Harada S: Direct interactions between Epstein-Barr virus leader protein (EBNALP) and the EBNA2 acidic domain underlie cooperative transcriptional regulation. Proc Natl Acad Sci USA 101(4):1033-1038, 2004

##### 2. 学会発表

- 1) Peng C-W, Harada S, Xue Y, Zhao B, Kieff E: EBNA-LP cooperates with EBNA-2 through two novel domains. #28 International Herpesvirus Workshop (Madison, USA). 2003.7.
- 2) 原田志津子, 伴文彦, 北村亮, 岡部信彦, 中村良子, 柳壺夫: 健康人成人層における EB ウイルス核蛋白 EBNA-2 に対する抗体価の分析. 第 51 回日本ウイルス学会 2003.10.27
- 3) Harada S, and Kieff E: The Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA) 2 acidic domain binds to EBNA-LP. (EBNA-LP と EBNA-2 酸性アミノ酸領域との結合) 第 26 回日本分子生物学会年会 2003.12.10