Epstein-Barr Virus (EBV) Polymorphisms in Japanese Patients with EBV-associated Hematological Diseases

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9487

Epstein-Barrウイルス関連疾患における ウイルスの遺伝子多型に関する研究

金沢大学医学部医学科小児科学講座（主任：小泉晶一教授）
武　井　健　吉

Epstein-Barrウイルス (EBV) は正常成人の多くに感染しており，潜伏感染の状態で終生持続する．EBV初感染は原則として血液細胞中ではBリンパ球に限局して起こると考えられているが，最近 ごくまれにTリンパ球やナチュラル・キラー (natural killer, NK) 細胞などBリンパ球以外の細胞への感染を認める症例が知られてきている．さらに，血球貪食症候群 (hemophagocytic syndrome, HPS) や慢性活動性EBV感染症 (chronic active EBV infection, CAEBV) や鼻咽頭癌，ホジキン病，胃癌などの悪性疾患の発症や病態形成にEBV感染が関与していることが明らかにされつつある．このようなEBV関連疾患の病態の多様性には，EBV感染標的細胞の相違や潜伏感染様式の差異，個体のEBV感染細胞増殖制御機構の異常に加え，EBV関連抗原遺伝子自体の変異の関与が示唆されており，EBV感染細胞膜蛋白 (latent membrane protein, LMP)-1，EBV特異的核内抗原 (EBV determined nuclear antigens, EBNA)-1，EBNA-2，EBNA-4 (3B) などのEBV関連蛋白の構造変化がキラーT細胞による感染細胞認識に影響を与え，細胞傷害活性を抑制している可能性が考えられている．本研究では，EBV関連血液疾患の病因を解明するために，HPS，CAEBV，伝染性単核症 (infectious mononucleosis, IM) を始めとする日本人のEBV関連血液疾患より分離されたEBVにおいて，LMP-1，EBNA-1，EBNA-2，EBNA-4 (3B) の遺伝子多型をPCR法を用いて検討した．EBV関連血液疾患より分離したEBVの大多数はI (A)型 (91％，30/33)，LMP-1は30bp欠失型 (78％，29/37)，EBNA-1はバリン変異型 (76％，25/33) であり，EBV関連各疾患間や感染標的細胞分画間でこれら3つの遺伝子変異の頻度に有意な差異は認められなかった．一方，EBNA-4の変異は分離された36症例中7例 (19％) に認められた．感染細胞分画別にみると，B細胞に感染しているEBVでは23例中2例 (9％) に変異を認め，NK細胞に感染している8例では，全く変異が認められなかった．それに対し，T細胞に感染しているEBVでは50％ (5/10) と高率に変異が検出された．この結果から，T細胞へのEBV感染を伴うCAEBV発症機序の少なくとも一部にはEBNA-4変異が関与している可能性が示唆された．EBNA-4 を始めとしたEBV関連蛋白遺伝子変異に伴う免疫応答変化の機序を明らかにするために，今後のさらなる詳細な検討が必要である．

Key words Epstein-Barr virus, EBV determined nuclear antigens-4, chronic active EBV infection, hemophagocytic syndrome, T cell

Epstein-Barrウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は1964年にEpsteinら[1]により，アフリカの小児に多発するバーキットリンパ腫由来の培養細胞株より初めて発見されたガンマヘルペスウイルスである．通常，EBVは咽頭粘膜上皮への初感染後，Bリンパ球に潜伏感染し，生涯持続感染の状態でその個体内に存在する[2)3)]．EBV初感染の大部分は不顕性感染に終わると考えられるが，顕性となると伝染性単核症 (infectious mononucleosis, IM) を発症し，その大部分が特に治療を必要とせずに自然治癒する．しかし一部の症例ではEBV感染により，血球貪食症候群 (hemophagocytic syndrome, HPS) のような急性重症型や慢性活動性EBV感染症 (chronic active Epstein-Barr virus infection, CAEBV) のような慢性型など多彩な病態を呈し，致死的経過を呈することもあることが明らかとなっている．また近年，EBV感染により致死的経過を呈するX連鎖性リンパ増殖性症候群や家族性貪食性リンパ組織球症では，その病因がT細胞の活性化に関与するSLAM関連蛋白 (SLAM-associated protein, SAP) 遺伝子変異[4)]およびパーフォリン遺伝子変異[5)]によるEBV排除機能の欠損によることが報告されている．さらにこれらの疾患に加え，バーキットリンパ腫を始めとし，鼻咽腔癌[6)]，ホジキン病[7)~9)]，胃癌[10)11)]，免疫不全者に発生する平滑筋肉腫[12)13)]，Tリンパ球増殖性疾患[14)~16)]，ナチュラル・キラー (natural killer, NK) 細胞性白血病[17)]などの多くの悪性疾患の発症や病態におけるEBVの関与が示唆されている．

通常EBVが感染する咽頭上皮やB細胞に加え，これらのEBV関連疾患においては，T細胞[15)]，NK細胞[18)]などのB細胞以外の末梢血リンパ球分画や，悪性化した腫瘍細胞[6)~13)]など種々の細胞内にウイルス遺伝子の存在が証明され，さらに培養系における実験から濾胞内樹状細胞[19)]や血管内皮細胞[20)]への

平成12年7月25日受付，平成12年9月6日受理

Abbreviations：Ala, alanine; CAEBV, chronic active Epstein-Barr virus infection; EBNA, Epstein-Barr virus determined nuclear antigens; EBV, Epstein-Barr virus; HLA, human leukocyte antigen; HPS, hemophagocytic syndrome; IM, infectious mononucleosis; LCL, lymphoblastoid cell line; Leu, leucine; LMP, latent membrane protein;

EBV感染の可能性が指摘され，EBV感染細胞の多様性と臨床病態との関連性が示唆されている．

EBVの宿主への潜伏感染様式は，ウイルス遺伝子発現のパターンにより潜伏感染様式Ⅰ～Ⅲに分類される[21)~24)]．EBV形質転換B細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) やEBV関連日和見リンパ腫では，核抗原であるEBV特異的核内抗原 (EBV determined nuclear antigens, EBNA)-1, -2, -3, -4, -5, -6と膜表面抗原であるEBV感染細胞膜蛋白 (latent membrane protein, LMP)-1, -2A, -2Bの合計9個のEBV関連遺伝子がすべて発現し，潜伏感染様式Ⅲと称される．これに対し，バーキットリンパ腫や胃癌などでは発現しているEBV遺伝子はEBNA-1とLMP-2Aのみ，上咽頭癌，T細胞性悪性リンパ腫，ホジキン病ではEBNA-1，LMP-1，LMP-2が発現し，それぞれ潜伏感染様式Ⅰ，Ⅱに分類される．こうした潜伏感染様式の多様性，すなわちEBV関連遺伝子の発現抑制により，EBVは宿主の免疫を逃れ，潜伏感染し続けていると考えられている[25)26)]．

近年，EBVが宿主から排除されずに潜伏感染し続けるための戦略として上述のような遺伝子発現抑制以外に，EBV遺伝子自体の変異によって宿主からの免疫による認識，排除を逃れ，感染細胞の悪性形質の発現に関与している可能性，すなわちEBV自体の遺伝子変異が各種の疾患を引き起こしている可能性が示唆されている．EBNA-2はEBVによる感染細胞の不死化において中心的役割を果たす遺伝子であり，*Bam*H Ⅰ制限酵素断片のU2領域，すなわちEBNA-2のC末端における塩基配列の違いによりEBVはⅠ型とⅡ型，もしくはA型とB型に分類され[27)]，種々のEBV関連疾患について検討されている[28)~36)]．LMP-1はラット線維芽細胞やヒト上皮細胞をがん化する活性をもつことが知られているが[37)]，このLMP-1の亜型，中でもC末端の30塩基対欠失を伴うLMP-1が感染細胞のがん化に重要である可能性が示唆されている[38)~41)]．またEBVプラスミドの複製と維持に関与しEBNAやLMP-1のプロモーターに対してエンハンサーとして働くEBNA-1のC末端の多型によるEBV亜型と各種疾患の関係も検討されている[42)~47)]．さらに主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス1の一つであるHLA-A11拘束性細胞障害性T細胞の認識部位となるEBNA-4の変異により，HLA-A11拘束性細胞傷害性T細胞の攻撃を免れている可能性も示されている[48)~54)]．

本研究では，IM，EBV関連HPS，CAEBVやEBV関連悪性リンパ腫，白血病についてLMP-1，EBNA-1，EBNA-2，EBNA-4の遺伝子多型を検討することで日本におけるEBV亜型を詳細に解析し，さらにこれらのEBV亜型とEBV関連疾患の違いおよびEBV感染標的細胞分画との関連につき検討を加えた．

対象および方法

Ⅰ．培養細胞株

方法の基礎的検討のため，EBV陽性細胞株としてEBV産生マーモセット由来細胞株B95.8，ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株Daudi，Jijoye，ヒト多発性骨髄腫リンパ芽球由来細胞株IM-9，LCL，悪性リンパ腫由来のNK細胞株YTN10，NK細胞性白血病由来NK細胞株NK-TSを，EBV陰性細胞株としてヒト急性リンパ芽球性白血病由来細胞株Molt4を用いた．B95.8は埼玉県小児医療センター小児科　大石勉先生より，YTN10は京都大学ウイルス研究所生体応答学研究部門淀井淳司教授よりそれぞれ供与を受けた．またIM-9は日本癌研究リサーチ・リリースバンク (東京)，Daudiは東北大学・加齢医学研究所・癌細胞保存施設 (仙台)，Molt4は理化学研究所ジーンバンク・細胞銀行 (筑波)，Jijoyeは，American Type Culture Collection (USA) から購入した．LCLはインフォームドコンセントを得た正常人ヘパリン加末梢静脈血より，フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法にて単核球を分離し，PBSにて3回洗浄した後ヒツジ赤血球Eロゼット法により分離して得たB細胞に，EBV浮遊液としてB95.8細胞株の培養上清を加え，10％非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum)，25mM HEPES，2×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール，0.3mg/ml グルタミン，200U/mlペニシリンG，10mg/mlゲンタマイシンを含むRPMI 1640培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) にて，5％ CO_2，37℃の条件下で4週間以上培養し樹立した．インフォームドコンセントを得た金沢大学医学部附属病院小児科および関連施設に通院している白血病患児あるいはIM患児より分離した末梢血B細胞からB95.8上清を添加せずに自然に自立増殖するようになった自律性LCL (spontaneous LCL, sLCL) を，EBV関連NK細胞性白血病細胞よりインターロイキン2依存性細胞株NK-TSを樹立した．

Ⅱ．臨床検体

インフォームドコンセントの得られたIM 33例，HPS 11例，CAEBV 13例，白血病/リンパ腫8例，移植後リンパ増殖症候群1例の計66例を対象とし，患者より採取した末梢血から分離したリンパ球，末梢血および骨髄より分離したリンパ球サイトスピン標本，パラフィン包埋病理組織標本を用いた (表1)．

Ⅲ．培養細胞，末梢血リンパ球，サイトスピン標本からのDNA抽出

末梢血リンパ球，分離細胞および培養細胞のDNA抽出はヨウ化ナトリウム法[55)]により行った．すなわち，細胞5×10^6個をリン酸緩衝液200μlに再浮遊し，ヨウ化ナトリウム溶液 [7.4M NaI, 16mM EDTA, 32mM Tris-HCl (pH8.0), グリコーゲン40μg/ml] 250μl，30％N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム溶液5.4μlを加えて撹拌後，45℃で15分間保温した．続いて，イソプロピルアルコール450μlを加え撹拌し，室温に15分間静置後，15000rpm，15分間，4℃で遠心した．その後上清を除き，33％イソプロピルアルコール400μl，35％イソプロピルアルコール750μlで2回洗浄し乾燥後，1×Tris-EDTA緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)] 50μlに溶解した．サイトスピン標本からのDNA抽出は，標本4枚の上にヨウ化ナトリウム溶液をそれぞれ50μlずつのせ，37℃の恒温槽内に10分間静置後，マイクロチューブに回収し，以後上記の方法に準じて抽出した．DNA濃度は260nmの吸光度を測定し算出した．

Ⅳ．パラフィン包埋切片からのDNA抽出

パラフィン包埋組織を5μmの厚さに切断した切片3枚に対しTakara DEXPAT (宝酒造，東京) を0.5ml添加し，100℃で10分間加熱後，12,000rpm，10分間，4℃で遠心し，DNAが溶解

MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocytes; Pro, proline; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease; sLCL, spontaneous lymphoblastoid cell line; SSP, sequence specific polymerase chain reaction; Thr, threonine; Val, valine

している水層を得た．

Ⅴ．PCR法によるEBVの遺伝子多型の解析

EBVの遺伝子多型について各遺伝子特異的プライマーを用いたPCR法にて解析した．使用したプライマーの塩基配列とアニーリング温度，PCR産物のサイズを表2に示す．内部コントロールとしてベータアクチンを使用した．これらのプライマーはフナコシ株式会社（東京）に合成委託した．抽出したDNA 0.2μgを鋳型として，最終0.4μMの各プライマー，各200μMの4種類のdNTP，PCR反応緩衝液［10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 2.0mM $MgCl_2$］，Taq DNAポリメラーゼ（Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA）1.25単位を加え，全量50μlでPCRを行った．反応は，GeneAmpTM PCR System 9600-Rを用い，94℃，5分間の初期変性の後，95℃，30秒の変性，52～58℃，30秒のアニーリング，72℃，30秒の伸長反応を35～45サイクル行った．反応終了後，10分の1容量のタイプⅡ泳動緩衝液［0.25％ブロモフェノールブルー，0.25％キシレンシアノール，15％フィコール400］を加え，10μlを1.5～2.0％アガロースゲル（H14-Takara，宝酒造）に泳動し，エチジウムブロマイド染色後，紫外線照射装置（トランスイルミネーター，フナコシ）上で観察した．

Table 1. Summary of patients and samples

Disease	Type of samples	No. of samples
IM	Cytospin	11
	PBL	22
HPS	Cytospin	3
	PBL	8
CAEBV	Paraffin	1
	Cytospin	3
	PBL	9
Leukemia/Lymphoma	Paraffin	3
	Cytospin	2
	PBL	3
PTLD	Cytospin	1
Total		66

IM, infectious mononucleosis; HPS, hemophagocytic syndrome; CAEBV, chronic active EBV infection; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease; PBL, peripheral blood lymphocytes.

Ⅵ．EBNA-1，EBNA-4遺伝子の塩基配列の決定

EBNA-1遺伝子，EBNA-4遺伝子についてはPCR法により増幅したDNA断片を用い塩基配列を同定した．PCR産物を2.0％アガロースゲルに泳動し，QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン，東京）にて抽出したものを鋳型とし，DNA Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) を用いてシークエンス反応を行った．シークエンスプライマーとして各PCRプライマーをそのまま使用した．反応はCATALYST Turbo 800 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) を使用し，96℃，20秒，50℃，30秒，60℃，4分のサイクルを25回繰り返し，反応終了後にエタノール沈殿にて回収した反応産物をABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) にて塩基配列を解析した．

Ⅶ．EBV感染細胞亜群の同定

末梢血あるいは骨髄より分離した末梢血単核球をフルオレッセン・イソチオシアン酸（fluorescein isothiocyanate, FITC）標識抗CD4モノクローナル抗体，抗CD8モノクローナル抗体，抗CD16モノクローナル抗体，抗CD20モノクローナル抗体（オーソ・クリニカルダイアグノスティクス，東京），抗TCR-$\gamma\delta$抗体（Becton Dickinson, San Jose, USA）にて染色した後，細胞分画採取装置EPICS Elite（日科機，東京）を用いて単離した特定のリンパ球亜群のサイトスピン標本を作成し，EBV-encoded small RNA-1プローブ（Yatoron）を使用した生体内局所ハイブリダイゼーション法（in situ hybridization）によりEBV感染細胞を同定した．

Ⅷ．HLA-A座の決定

DNAのHLA-A座の決定は，シークエンス特異的PCR法

Table 2. Oligonucleotide Primers Used in PCR Analysis

Gene	Oligonucleotide Sequence	Ta (℃)	Product size (bp)
EBNA-2 (U2 region)			
5'	5'-TTCACCAATACATGAACC-3'	57	type I; 378
3'	5'-TGGCAAAGTGCTGAAAGCAA-3'		type II; 483
LMP-1			
5'	5'-GCGACTCTGCTGGAAATGAT-3'	52	Prototype; 260
3'	5'-GACATGGTAATGCCTAGAAG-3'		30 bp-deletion type; 230
EBNA-1-C terminal			
5'	5'-GAAATTTGAGAACATTGCAGAAGG-3'	58	214
3'	5'-GGGTCCAGGGGCCATTCCAAA-3'		
EBNA-4			
5'	5'-GAGGAGGAAGACAAGAGTGG-3'	58	230
3'	5'-GATTCAGGCGTGGCTCTTGG-3'		
Beta actin			
5'	5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATG-3'	56	415
3'	5'-GATCTTCATTGTGCTGGGTG-3'		

Ta, annealing temperature.

(sequence specific PCR, SSP) によって行った．このSSP法には，Dynal SSP Kit (ベリタス，東京) を用いた．反応終了後，10分の1容量のタイプII泳動緩衝液を加えて10μlを2.0％アガロースゲルに泳動し，エチジウムブロマイド染色後に紫外線照射装置上で観察した．

結　　果

I．LMP-1遺伝子の多型

LMP-1遺伝子の解析は臨床検体37例で可能であった．B95.8原型と，病的意義を持つ可能性があると言われているLMP-1 C末端30bp欠失型は，図1に示すように，PCR産物の長さの差として区別できた．各種細胞株での検討では，B95.8，LCL，Daudi，JijoyeではB95.8原型であり，sLCL，IM-9，YTN10，NK-TSでは30bp欠失型であった．臨床検体の検討では，検出されたEBVは37例中29例（78％）が30bp欠失型であった(表3)．各疾患毎に解析してもCAEBVにおいて原型がやや多い傾向があるものの30bp欠失型は62－100％を占め，疾患による偏りは認められなかった (表3)．EBVが感染しているリンパ球分画ごとに見るとB細胞に感染しているEBVでは30bp欠失型が86％，T細胞に感染しているEBVでは90％，NK細胞に感染している例では62％が30bp欠失型であり (表4)，ややNK細胞感染例に少ない傾向であった．B95.8原型と30bp欠失型が同時に存在する症例は認めなかった．

II．EBNA-2遺伝子の多型

*Bam*H I制限断片のU2領域，すなわちEBNA-2遺伝子のC末端に設定したプライマーを用いたPCR法による解析にてEBVはI (A)型とII (B)型に分類できる[28]．細胞株ではB95.8，LCL，sLCL，IM-9，YTN10，NK-TSがI (A)型，JijoyeはII (B)型，

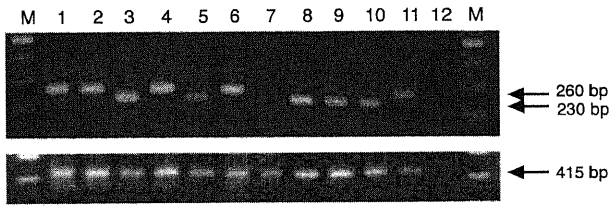

Fig. 1. PCR analysis of LMP-1 gene. DNA isolated from cell line or lymphocytes from patients were amplified with primers specific for LMP-1 gene (upper panel) or β-actin (lower panel) and PCR products were electrophoresed on 3% agarose gels. Specific bands were visualized by ethidium bromide staining. Each arrow indicates a PCR product size. M, size marker; Lane 1, B95.8; Lane 2, LCL; Lane 3, spontaneous LCL; Lane 4, Daudi; Lane 5, IM-9; Lane 6, Jijoye; Lane 7, Molt-4; Lane 8, YTN10; Lane 9, NK-TS; Lane 10, CAEBV; Lane 11, CAEBV; Lane 12, H_2O.

Table 3. Distribution of LMP-1 subtypes in different diseases

Disease	LMP-1	
	Prototype (%)	30 bp-deletion type (%)
Reactive LNs	0 (0)	1 (100)
IM	2 (13)	13 (87)
HPS	1 (20)	4 (80)
CAEBV	3 (38)	5 (62)
Leukemia/Lymphoma	2 (29)	5 (71)
PTLD	0 (0)	1 (100)
Total	8 (22)	29 (78)

IM, infectious mononucleosis; HPS, hemophagocytic syndrome; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease.

Table 4. Distribution of LMP-1 subtypes in different cell populations

Type of infected cells	LMP-1	
	Prototype (%)	30 bp-deletion type (%)
B cell	3 (14)	18 (86)
T cell	1 (10)	9 (90)
NK cell	3 (38)	5 (62)
Unknown	1 (50)	1 (50)
Total	8 (20)	33 (80)

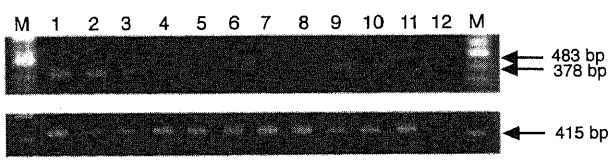

Fig. 2. EBV typing of virus-infected cell lines and samples from HPS patients. DNA was extracted from the cells or cytospins and subjected to PCR amplification for EBNA2 (U2region) with appropriate primers designed to discriminate between type A (378bp) and type B (483bp) EBV. M, size marker; Lane 1, B95.8; Lane 2, LCL; Lane 3, spontaneous LCL; Lane 4, Daudi; Lane 5, IM-9; Lane 6, Jijoye; Lane 7, Molt-4; Lane 8, YTN10; Lane 9, NK-TS; Lane 10, HPS; Lane 11, HPS; Lane 12: H_2O.

DaudiではPCR産物は認められなかった (図2). 臨床検体で解析可能であった全EBV33例中30例, 91%がⅠ(A)型であった (表5). 急性EBV感染症であるIMでは, 15例中2例 (13%), 急性重症EBV感染症のHPSでは3例中1例 (33%) がⅡ(B)型であったのに対し, CAEBV8例や白血病・リンパ腫6例では全てがⅠ(A)型でありⅡ(B)型EBVは検出されなかった. また, どのリンパ球分画においてもⅠ(A)型が大多数を占め, 感染細胞分画によるⅠ, Ⅱ型の偏りの傾向は認められなかった (表6).

Ⅱ. EBNA-1遺伝子の多型

EBNA-1遺伝子C末端のコドン466から527までの塩基配列によりB95.8を原型として, EBVは487番目のコドンに従って5つの亜群, すなわち原型であるアラニン原型 (prototype-alanine, P-Ala), スレオニン原型 (prototype-threonine, P-Thr), 変異タイプであるバリン変異型 (variant-valine, V-Val), プロリン変異型 (variant-proline, V-Pro), ロイシン変異型 (variant-leucine, V-Leu) に分類される[42)43)].

細胞株においてはB95.8産生EBV由来であるLCLがP-Ala, DaudiがP-Thr, Jijoye, IM-9がV-Leu, YTN10, NK-TS, sLCLがV-Valであった. 臨床検体においては, P-Ala, P-Thr, V-Val, V-Leuの4つの型が認められたが, V-Proは認めなかった (図3). 解析可能であった33検体中P-Alaが5例 (15%), P-Thrが1例 (3%), V-Leuが2例 (6%), V-Valが25例 (76%) であった (表7).

Table 5. Distribution of EBV types in different diseases

Disease	EBV type	
	Ⅰ(A) (%)	Ⅱ(B) (%)
IM	13 (87)	2 (13)
HPS	2 (67)	1 (33)
CAEBV	8 (100)	0 (0)
Leukemia/Lymphoma	6 (100)	0 (0)
PTLD	1 (100)	0 (0)
Total	30 (91)	3 (9)

Type of EBV was determined by PCR amplification for EBNA2 (U2 region) with appropriate primers designed to discriminate between type I (A) and type II (B) EBV. IM, infectious mononucleosis; HPS, hemophagocytic syndrome; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease.

Table 6. Distribution of EBV type in different cell populations

Type of infected cells	EBV type	
	Ⅰ(A) (%)	Ⅱ(B) (%)
B cell	16 (89)	2 (11)
T cell	8 (100)	0 (0)
NK cell	7 (100)	0 (0)
Unknown	1 (50)	1 (50)
Total	32 (91)	3 (9)

Type of EBV was determined by PCR amplification for EBNA2 (U2 region) with appropriate primers designed to discriminate between type I (A) and type II (B) EBV.

Table 7. Distribution of EBNA-1 carboxy-terminal subtypes in different disease

Disease	EBNA-1 carboxy-terminal subtypes			
	P-Ala (%)	P-Thr (%)	V-Leu (%)	V-Val (%)
IM	1 (8)	0 (0)	2 (15)	10 (77)
HPS	3 (37)	1 (13)	0 (0)	4 (50)
CAEBV	1 (14)	0 (0)	0 (0)	6 (86)
Leukemia/Lymphoma	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)
PTLD	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Total	5 (15)	1 (3)	2 (6)	25 (76)

EBNA-1 carboxy-terminal variations is classified according to the amino acid at codon 487. IM, infectious mononucleosis; HPS, hemophagocytic syndrome; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease.

Table 8. Distribution of EBNA-1 carboxy-terminal subtypes in different cell populations

Type of infected cells	EBNA-1 carboxy terminal subtypes			
	P-Ala (%)	P-Thr (%)	V-Leu (%)	V-Val (%)
B cell	2 (11)	0 (0)	2 (11)	15 (78)
T cell	1 (13)	0 (0)	0 (0)	7 (87)
NK cell	2 (29)	0 (0)	0 (0)	5 (71)
Unknown	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)
Total	5 (13)	1 (3)	2 (6)	28 (78)

EBNA-1 carboxy-terminal variations is classified according to the amino acid at codon 487.

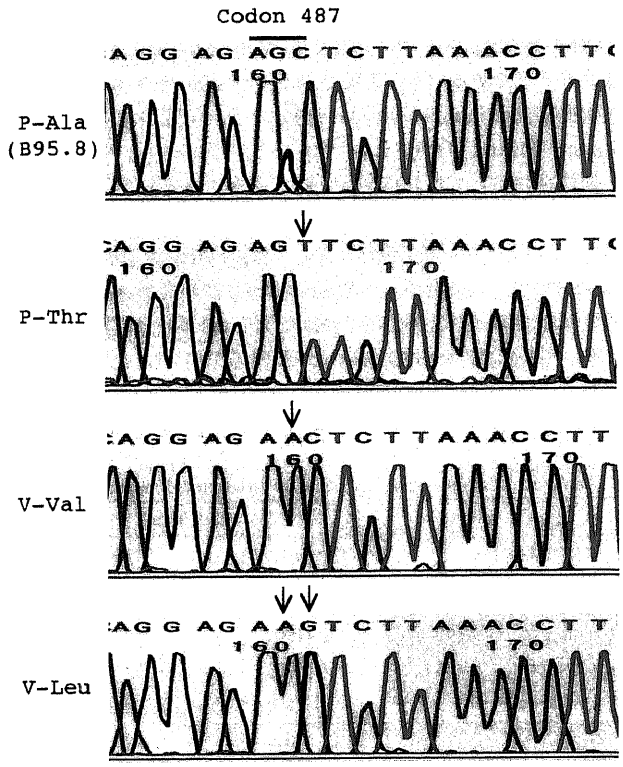

Fig. 3. Examples of sequencing data representing part of the carboxy terminus of EBNA-1. Minus strands of the PCR products are shown. Arrows indicate the mutation at codon 487.

臨床診断別の解析ではV-ValがIMにおいて77％，CAEBVで86％，白血病・悪性リンパ腫で100％と大多数を占めたが，HPSにおいてP-Ala3例，P-Thr1例を認め，V-Valの比率がやや低い傾向があった．同一症例の検体からP-AlaとV-Val，V-LeuとV-Valをそれぞれ HPS2例，IM2例から検出された．EBV感染リンパ球分画毎に検討したが，どのリンパ球分画においてもV-Valが優位であった(表8)．

Ⅳ．EBNA-4遺伝子の多型

細胞株での検討では，LCL，Jijoye，Daudi，YTN10，NK-TS，sLCLは全てB95.8原型であったが，IM-9はコドン399，400，417，424の4カ所にそれぞれAlaからSer，ValからLeu，ValからLeu，LysからArgへの変異が認められた (図4)．解析可能であった臨床検体36例中7例 (19％) に変異が認められた(表9)．EBNA-4遺伝子に変異が認められたのはIM2例，HPS1例，CAEBV3例，T細胞性悪性リンパ腫1例であった (図4)．IM2例での変異はいずれもコドン424のLysからThrへの変異であった．T細胞に感染していたHPSではコドン420のPheからLeu，CAEBV例ではそれぞれコドン424のLysからGln，コドン417のValからIle，さらに残りの1例ではコドン406のAspからGluとコドン417のValからLeuへの変異が同時に認められた．CAEBV例に認められたコドン406のAspからGluへの変異とコドン424のLysからGlnへの変異は，これまでの報告にない新しい変異であった．T細胞リンパ腫例で認められた変異はIM例と同じコドン424のLysからThrへの変異であった (図4)．

興味深いことに，EBNA-4遺伝子の変異は，T細胞に感染しているEBV10例中5例 (50％) で認められ，B細胞に感染して

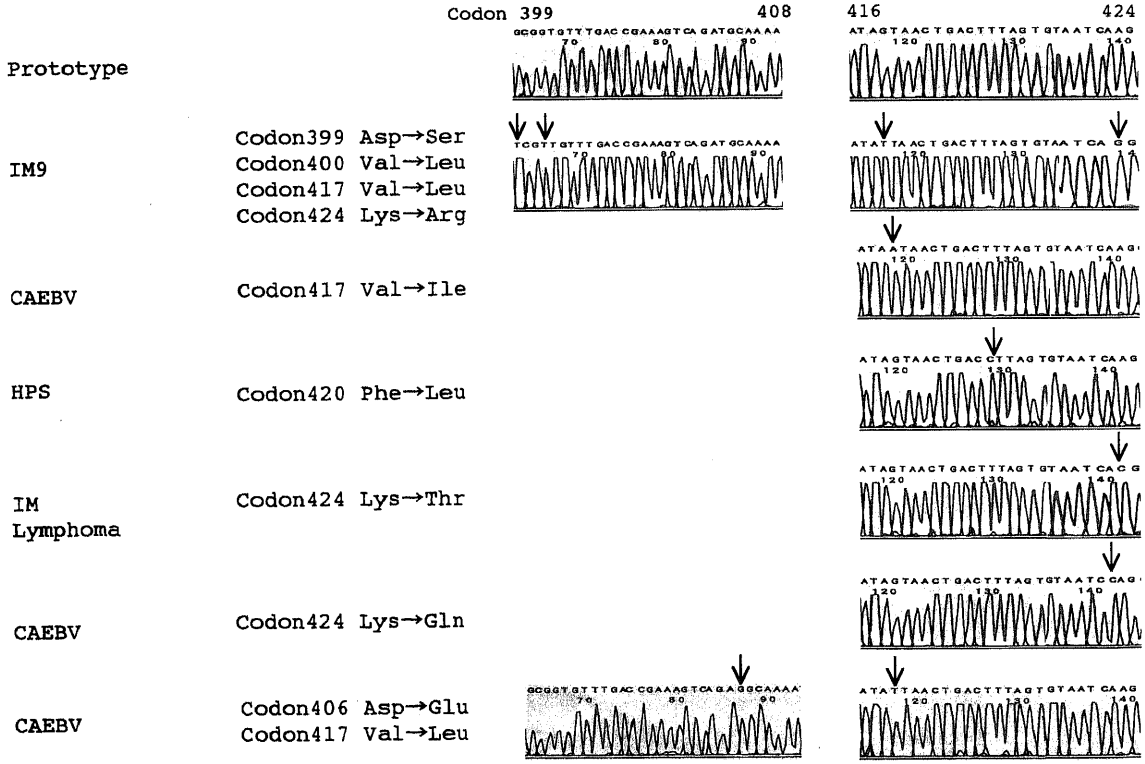

Fig. 4. Sequence analysis of 399-408 and 416-424 residues of EBNA4. Corresponding nucleotides of prototype B95.8 are shown at the top. Arrows indicate the site of point mutation. IM, infectious mononucleosis; HPS, hemophagocytic syndrome; CAEBV, chronic active EBV infection.

Table 9. Distribution of EBNA-4 variants in epitopes 399-408 and 416-424 of HLA-A11 restricted EBNA-4 epitopes in different diseases

Disease	EBNA-4	
	Prototype (%)	Variant (%)
IM	16 (89)	2 (11)
HPS	1 (50)	1 (50)
CAEBV	7 (70)	3 (30)
Leukemia/Lymphoma	4 (80)	1 (20)
PTLD	1 (100)	0 (0)
Total	32 (91)	7 (19)

IM, infectious mononucleosis; HPS, hemophagocytic syndrome; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease.

Table 10. Distribution of EBNA-4 variants in epitopes 399-408 and 416-424 of HLA-A11 restricted EBNA-4 epitopes in different cell populations

Type of infected cells	EBNA-4	
	Prototype (%)	Variant (%)
B cell	21 (91)	2 (9)
T cell	5 (50)	5 (50)
NK cell	8 (100)	0
Total	34 (83)	7 (17)

Table 11. HLA-A locus genotype of patients that EBV of EBNA-4 mutation was found

Disease	Type of infected cells	Mutation of EBNA-4	HLA-A locus genotype
IM	B	Codon 424 AAG→ACG (Lys→Thr)	A26/26
IM	B	Codon 424 AAG→ACG (Lys→Thr)	A26/26
HPS	T (CD8)	Codon 420 TTT→CTT (Phe→Leu)	A31/66
CAEBV*	T (CD4, CD8)	Codon 424 AAG→CAG (Lys→Gln)	A11/31
CAEBV*	T (TCR γδ)	Codon 406 GAT→GAG (Asp→Glu) Codon 417 GTA→TTA (Val→Leu)	A26/31
CAEBV**	T (CD4)	Codon 417 GTA→ATA (Val→Ile)	A 2/26
Lymphoma	T (CD4)	Codon 424 AAG→ACG (Lys→Thr)	A 2/24

* With malignant transformation to T cell type lymphoma.
** With TCR rearrangement without morphologically malignant change.

いるEBV23例中2例 (9%)，NK細胞へ感染しているEBV8例中0例 (0%) と比較し，明らかに高率であった (表10)．CAEBVについてのみ検討するとNK細胞感染6例全てがB95.8原型であったが，T細胞感染例は4例中3例 (75%) が変異型であった．T細胞感染例のうちCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の両細胞亜群にEBV感染を認めた1例と，T細胞受容体γδ鎖陽性T細胞にEBV感染を認めた1例ではともにT細胞性リンパ腫に移行し，CD4陽性T細胞にEBV感染を認めた残る1例も臨床的には悪性化の所見は認められないものの，T細胞受容体の再構成が認められている (表11)．

Ⅴ．EBNA-4遺伝子に変異が認められた症例におけるHLA-A遺伝子座の遺伝子型

EBNA-4遺伝子のコドン399-408，416-424に変異の認められた7症例について，SSPによりHLA-A遺伝子座の遺伝子型を決定した (表11)．HLA-A11は7例中1例 (14%) にしか認められず，日本人におけるHLA-A11陽性率の17%[56]とほぼ同頻度であった．

考　　察

1964年にアフリカのバーキットリンパ腫内に発見されて以来[1]，EBVは最初のヒトがんウイルスとして注目されてきた．1980年代後半からは様々な癌や悪性腫瘍とEBVとの関連が指摘されるようになったが，未だに不明の点が多い．

EBVが宿主の免疫機構を逃れて潜伏感染し続けるために，ウイルス遺伝子の発現を制限することにより宿主免疫に認識されにくくすることが知られていたが[21)-26)]，近年，ウイルス遺伝子発現抑制以外に，EBV遺伝子自体の変異によって宿主からの免疫による認識，排除を逃れ，感染細胞の悪性形質発現に関与する可能性が示唆されている[32)33)35)38)-43)47)51)52)54)]．

LMP-1はラット線維芽細胞やヒト上皮細胞をがん化する活性をもつことが知られているが[37)]，LMP-1のC末端の30bp欠失によりEBVの腫瘍原性が高まる可能性が示唆されている[38)-41)]．しかし，逆にLMP-1のC末端の30bp欠失は腫瘍原性とは無関係であるとする報告も多く[56)-60)]，その意義については不明な点が多い．今回の検討では，B95.8原型株が感染している割合は極めて少なく，解析可能であった37例中29例 (78%) が30bp欠失株であり，EBV感染細胞亜群や臨床病態による差は見出されなかった．

*Bam*H I制限酵素断片のU2領域，すなわちEBNA-2のC末端における塩基配列の違いにより分類されるEBVの亜型の解析では，中央アフリカ，ニューギニアの正常人ではⅡ(B)型が多く，バーキットリンパ腫組織から分離されたEBVの40%がⅡ(B)型であることが報告され[61)]，さらにヒト免疫不全ウイルス関連非ホジキンリンパ腫において検出されたEBV10例中5例がⅡ(B)型EBVであったことから，免疫不全状態ではⅡ(B)型EBVが極めて重要な病原ウイルスとなる可能性が示唆されている[32)33)]．しか

し台湾においてはT細胞性リンパ腫で分離されたEBVの19例中18例がⅠ(A)型で欧米やアフリカとは異なり，IMや健常人から検出されたEBVと比較してⅡ(B)型の検出頻度は高率ではなく[31]，Ⅱ型EBVの病的意義は少なくとも日本を含めた東アジアにおいては認められていない．培養系での検討でもⅡ(B)型のEBVはⅠ(A)型のEBVと比較し形質転換能力が低いことが示され[62]，直接的にはⅡ型EBVのEBV関連疾患への関連は明らかではない．日本人における検討でもⅠ(A)型が90％以上を占め，疾患との関連はなかったと報告されている[30)63]．今回の検討でもⅠ(A)型が優位であり，EBNA-2多型性によるEBV亜型の感染細胞の違いにおける検討でも明らかな関連は認められなかった．

EBNA-1は，潜伏感染様式に関係なくあらゆるEBV関連疾患において発現が認められる唯一の蛋白であり，EBVプラスミドの複製と維持に関与していると考えられている[64)~67)]．そのC末端は多型性に富み，EBNA-1のC末端における亜型と各種疾患の関連も検討されている[42)~47)]．1996年にBhatiaらは，健常人32名の末梢血リンパ球とバーキットリンパ腫組織36検体より分離されたEBVについてEBNA-1のC末端のコドン466から527までの塩基配列を解析し，B95.8原型と比較した結果，487番目のコドンに従って，P-Ala，P-Thr，V-Pro，V-Leuの4種類のEBV亜型が存在することを見出した．アメリカ人のバーキットリンパ腫組織では12例中11例がV-Leuであったと報告し[42]，さらに健常人の末梢血リンパ球，口腔内洗浄液と鼻咽頭癌，バーキットリンパ腫組織内のEBVについて検討した結果，新たにV-Valが存在することを見出した[43]．EBNA-1のC末端における亜型については，正常人の末梢血に潜伏感染しているEBVは変異型単独では存在し得ず，原型との混合感染でのみ認められ[42]，さらにV-Leuは健康人の末梢血からは検出されず，バーキットリンパ腫では高率 (12例中11例) に検出された[42]と報告されている．また，鼻咽頭癌や胃癌では高率にV-Valが検出されるが，末梢血からは検出されない[43)46)]との報告もあり，EBNA-1亜型が異なる細胞へのEBVの感染しやすさや腫瘍原性に関与する可能性が示されている[43]．しかし，EBV関連胃癌と反応性リンパ組織における比較検討ではV-ValやV-Leuの両疾患における頻度の差がないことから，悪性化への関与は少ないと考えられる[46]．日本人の胃癌，反応性増殖リンパ組織の解析でも全例がV-Valであると報告され[46]，今回，分離された通常の急性感染症であるIMにおいても77％がV-Valであり，EBVが病的意義をもつHPSやCAEBVと比較しても違いは認められなかった．またEBV感染細胞亜群についても特定の亜型の偏在傾向はないことから，これらの疾患における発症や病態に変異型のV-Valの病的意義は大きくなく，自然界のEBV亜型をそのまま反映している可能性が示唆された．

日本におけるEBNA-4遺伝子変異をもつ頻度については胃癌と反応性リンパ節組織について解析され，各々28％，25％にEBNA-4変異が同定されている[54]．しかしながら，上記疾患以外のEBV関連疾患における解析は文献上見あたらない．今回の検討では分離された全てのEBVにおけるEBNA-4の頻度は既報告と比較しやや低い傾向であった．既報告はすべて病理組織標本から分離したEBVにおける解析であることや対象疾患が違うことから比較検討は難しいが，通常自然治癒するIMから分離されるEBV多型が自然界におけるEBVをほぼ反映しているとすれば，自然界のEBVにおけるEBNA-4変異の頻度も同程度と推察される．

EBVは，EBV遺伝子発現蛋白がMHCクラス1と複合体を形成して細胞表面に提示されることによりMHC拘束性細胞傷害性CD8陽性T細胞に認識され，ウイルス感染細胞は活性化された細胞傷害性T細胞に排除されると考えられる[21]．EBNA-4のコドン399-408，416-424の部位は，MHCクラス1の一つであるHLA-A11拘束性細胞傷害性T細胞に認識されることが培養細胞系の実験で示されており[68)~70)]，HLA-A11を持つ宿主にEBNA-4に変異を持ったEBVが感染するとHLA-A11拘束性細胞傷害性T細胞による排除がうまく機能せず，異常なEBV感染症もしくは悪性腫瘍発症へとつながるという仮説が提唱されている[48)~53)68)69)]．Chuら[54]は，アメリカ，ブラジル，日本におけるEBV関連悪性腫瘍でEBNA-4変異を28症例に見出したが，その内，HLA-A11が陽性であったのは2例に過ぎなかったと報告した．今回の検討結果でもEBNA-4に変異の認められた7例中HLA-A11陽性は1名 (14％) のみであったことから，EBV関連疾患の病態にEBNA-4変異に起因するHLA-A11拘束性細胞傷害性T細胞を介する排除機構の異常が直接的に関与する可能性は低いと考えられる．しかしながら，現在まで明らかとなっていないEBNA-4を認識するMHCクラスⅠ抗原が存在する可能性があり，今後の検討が必要と考えられる．

本研究では各リンパ球分画におけるEBV感染を同定し，EBNA-4を含むウイルス遺伝子変異の頻度を解析した．LMP-1，EBNA-2 U2領域やEBNA-1のC末端における多型にはEBV感染細胞分画の違いによる偏りは認められなかったが，EBNA-4の解析にて通常のB細胞へのEBV感染と考えられるIM18例で2例 (11％)，B細胞全体では23例中2例 (9％) に遺伝子変異を認めたのに対し，T細胞10例中5例 (50％) にEBNA-4の変異が認められた．一方異常と考えられるNK細胞への感染例ではEBNA-4変異はまったく検出されず，今回の結果からT細胞とNK細胞とではEBV潜伏感染を制御する機構あるいは感染機構に相違がある可能性が示唆された．また，CAEBVの中でT細胞感染4例中3例にEBNA-4変異が認められたが，この内2例は最終的にTリンパ腫に移行し，残る1例においても臨床的に悪性所見はないもののT細胞受容体遺伝子の再構成が認められている．CAEBV全体として悪性リンパ腫への移行が高率に認められるが，今回の検討した症例においてT細胞に感染しているもののEBNA-4に変異のないHPSやIM症例の中でリンパ腫へ移行した症例は現時点で認められないことから，EBNA-4の変異を有するEBVの悪性化への関与の可能性も示唆される．

HPSやCAEBVにおいては，自然治癒するIMや不顕性感染後に認められる通常のB細胞への潜伏感染と異なり，T細胞やNK細胞への異常なEBV感染が認められ，その病態との関連が示唆されるが[14)~18)]，このような異常なT細胞やNK細胞へのEBVの持続感染機構については不明な点が多い．EBNA-4遺伝子変異を有するEBVがT細胞に高率に持続感染する理由について今回の研究では明らかではないが，現在まで多くの疾患においてEBVの関連性が指摘され，SAP遺伝子変異によるX連鎖性リンパ増殖症候群[4]やパーフォリン遺伝子変異による家族性血球貪食性リンパ組織球症のような遺伝的感染防御機構の異常[5]に加え，EBV感染症の多様性を規定する因子のひとつとしてEBV自体の異常が関与することが想定されてきた．精力的なEBV関連遺伝子の解析によっても現在のところEBV自体の遺伝子変異と病原性との関連性は明らかではない．しかし今回の

検討でT細胞感染例とNK細胞感染例におけるEBNA-4変異を有するEBVの頻度が異なり，とくにCAEBVと考えられる症例においてはT細胞感染例にのみ変異が認めたことより，少なくともCAEBVにおいてはNK細胞感染例とT細胞感染例では異なるEBVが関与している可能性が示唆される．EBNA-4変異を持つ亜型のEBVが未だに同定されていない変異を複数同時に有するためにEBV感染性や形質転換能力が増強・変化する可能性もあると推察され，今回検討したEBV遺伝子以外に近年LMP-2A[70)~74)]やEBNA-6[75)76)]における遺伝子変異のEBV関連疾患への関与が指摘され，これらの遺伝子変異の検索も今後必要と考えられる．

結　論

EBV関連疾患において，EBVの多型を検討し以下の結果を得た．

1．EBNA-2，LMP-1 C末端，EBNA-1 C末端の多型性の検討では，日本人におけるIM，HPS，CAEBV，白血病/リンパ腫ではI(A)型が91％，LMP-1のC末端30塩基対欠失型が78％，EBNA-1 C末端はV-Valが76％と大多数を占めていた．

2．HLA-A11拘束性細胞傷害性T細胞に認識されるEBNA-4のコドン399-408，416-424に変異が認められたのは36例中7例(19％)であった．その内HLA-A11陽性者は7例中1例(14％)のみであった．

3．T細胞へEBVが感染していた10例中5例(50％)にEBNA-4変異が認められ，B細胞(2/23，9％)やNK細胞(0/8，0％)への感染に比較し高率であった．病的意義があると考えられるB細胞以外へのEBV感染において，T細胞とNK細胞での感染EBVの相違が明らかとなり，EBNA-4変異を有するEBVのEBV関連疾患における重要性が示唆された．

謝　辞

稿を終えるにあたり，研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座小泉晶一教授，金沢大学医学部保健学科谷内江昭宏教授に深甚なる感謝の意を表します．また，本研究の遂行に際し終始，御指導，御助言を頂きました同教室笠原善仁助教授に深く御礼申し上げます．さらに御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部小児科学講座の皆様に心から感謝したします．また，貴重な臨床検体を供与下さいました金沢大学第三内科高見昭良先生，同耳鼻咽喉科塚谷才明先生，同皮膚科森　俊典先生，富山医科薬科大学金兼弘和先生，北海道大学遺伝子治療学崎山幸雄先生，国立療養所南福岡病院柴田留実子先生，柏原病院小児科石原重彦先生に深く御礼申し上げます．

文　献

1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1: 702-703, 1964

2) Liebowitz D, Kieff E. Epstein-Barr virus. *In* Roizman B, Whitley RJ, Lopez C (eds), The human herpesviruses, 2nd ed, p107-172, Raven Press, New York, 1993

3) Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. *In* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), Fields Virology, 3rd ed, p2397-2446, Raven Press, New York, 1996

4) Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G, Terhorst C. The X-linked lymphopreliferrative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. Nature 395: 462-469, 1998

5) Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Science. 286: 1957-1959, 1999

6) Young LS, Dawson CW, Clark D, Rupani H, Busson P, Tursz T, Johnson A, Rickinson AB. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. J Gen Virol 69: 1051-1065, 1988

7) Weiss LM, Movahed LA, Warenke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med 320: 502-506, 1989

8) Pallensen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. Lancet 337: 320-322, 1991

9) Weiss LM, Chen YY, Liu XF, Shibata D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase reaction study. Am J Pathol 139: 1259-1265, 1991

10) Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Am J Pathol 139: 469-474, 1991

11) Imai S, Koizumi S, Sugiura M, Tokunaga M, Uemura Y, Yamamoto N, Tanaka S, Sato E, Osato T. Gastric carcinoma: Monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9131-9135, 1994

12) McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, Dicarlo FJ, Chadwick EG, Murphy SB. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. N Engl J Med 332: 12-18, 1995

13) Lee ES, Locker J, Nalesnik M, Reyes J, Jaffe R, Alashari M, Nour B, Tzakis A, Dickman PS. The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. N Engl J Med 332: 19-25, 1995

14) Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. N Engl J Med 318: 733-741, 1988

15) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. Lancet 335: 128-130, 1990

16) Su IJ, Hsieh HC, Lin KH, Uen WC, Kao CL, Chen CJ, Cheng AL, Kadin ME, Chen JY. Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA: A clinicopathologic and molecular analysis. Blood 77: 799-808, 1991

17) Kawa-Ha K, Ishihara S, Ninomiya T, Yumara-Yagi K, Hara J, Murayama F, Tawa A, Hirai K. CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. J Clin Invest 84: 51-55, 1989

18) Kanegane H, Yachie A, Miyawaki T, Tosato G. EBV-NK

cells interactions and lymphoproliferative disorders. Leuk Lymphoma 29: 491-498, 1998
19) Lindhout E, Lakeman A, Mevissen MLCM, de Groot C. Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. J Exp Med 179: 1173-1184, 1994
20) Jones K, Rivera C, Sgadari C, Franklin J, Max EE, Bhatia K, Tosato G. Infection of human endothelial cells with Epstein-Barr virus. J Exp Med 182: 1213-1221, 1995
21) Klein G. Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. Cell 77: 791-793, 1994
22) Tierney RJ, Steven N, Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: Analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. J Virol 68: 7374-7385, 1994
23) Chen F, Zou JZ, Di Renzo L, Winberg G, H L-F, Klein E, Klein G, Ernberg I. A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. J Virol 69: 3752-3758, 1995
24) Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. Cell 80: 593-601, 1995
25) Sample J, Brooks L, Sample C, Young L, Rowe M, Gregory C, Rickinson A, Kieff E. Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6343-6347, 1991
26) Schaefer BC, Woisetschlager M, Strominger JL, Speck SH. Exclusive expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Burkitt lymphoma arises from a third promoter, dintinct from the promoters utilized in latently infected lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6550-6554, 1991
27) Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. Proc Natl Acad Sci USA 81: 7632-7636, 1984
28) Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, Desgranges C, Wittmann P, Freese U, Schneider U, Bornkamm GW. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. Virology 154: 56-66, 1986
29) Khanim F, Yao QY, Niedobitek G, Sihota S, Rickinson AB, Young LS. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. Blood 88: 3491-3501, 1996
30) Kunimoto M, Tamura S, Tabata T, Yoshie O. One-step typing of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: predominance of type 1 virus in Japan. J Gen Virol 73: 455-461, 1992
31) Wu S, Lay J, Chen C, Chen J, Liu M, Su I. Genomic analysis of Epstein-Barr virus in nasal and peripheral T-cell lymphoma: a comparison with nasopharyngeal carcinoma in an endemic area. J Med Virol 50: 314-321, 1996
32) Borisch B, Henning I, Laeng RH, Ernst R, Rainer K, Laissue J. Association of the subtype 2 of Epstein Barr virus with T cell non-Hodgkin's lymphoma of the midline granuloma type. Blood 82: 858-864, 1993
33) Boyle MJ, Sewell WA, Seulley TB, Apollini A, Turner JJ, Swanson CE, Penny R, Cooper DA. Subtype of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin lymphoma. Blood 78: 3004-3011, 1991
34) Lung LM, Chang GC. Detection of distinct Epstein-Barr virus genotypes in NPC biopsies from Southern Chinese and Caucasians. Int J Cancer 52: 34-37, 1992
35) Lung LM, Lam WP, Chan KH, Li S, Shan J, Choy D. Direct detection of Epstein-Barr virus in peripheral blood and comparison of Epstein-Barr virus genotypes present in direct specimens and lymphoblastoid cell lines established from nasopharyngeal carcinoma patients and healthy carriers in Hong Kong. Int J Cancer 52: 174-177, 1992
36) Miyashita T, Kawaguchi H, Asada M, Mizutani S, Ibuka T. Epstein-Barr virus type B in patients with T-cell lymphoma. Lancet 337: 1045-1046, 1991
37) Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. Cell 43: 831-840, 1985
38) Chen ML, Tsai CN, Liang CL, Shu CH, Huang CR, Sulitzeanu D, Liu ST, Chang YS. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. Oncogene 11: 2131-2140, 1992
39) Jeng KC, Hsu CY, Liu MT, Chung TT, Liu ST. Prevalence of Taiwan variant of Epstein-Barr virus in throat washings from patients with head and neck tumors in Taiwan. J Clin Microbiol 1: 28-31, 1994
40) Hu LF, Chen F, Zheng X, Ernberg I, Cao SL, Christensson B, Klein G, Winberg G. Clonality and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. Oncogene 6: 1575-1583, 1993
41) Hu LF, Zabarovsky ER, Chen F, Cao SL, Ernberg I, Klein G, Weinberg G. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. J Gen Virol 72: 2399-2409, 1991
42) Bhatia K, Raj A, Gutierrez MI, Judde JG, Spangler G, Venkatesh H, Magrath IT. Variation in the sequence of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas. Oncogene 1: 177-181, 1996
43) Gutierrez MI, Raj A, Spangler G, Sharma A, Hussain A, Judde JG, Tsao SW, Yuen PW, Joab I, Magrath IT, Bhatia K. Sequence variations in EBNA-1 may dictate restriction of tissue distribution of Epstein-Barr virus in normal and tumour cells. J Gen Virol 78: 1663-1670, 1997
44) Dee K Snudden, Paul R Smith, Daniel Lai, Mun-Hong Ng, Beverly E Griffin. Alterations in the structure of the EBV nuclear antigen, EBNA1, in epithelial cell tumours. Oncogene 10: 1545-1552, 1995
45) Gutierrez MI, Spangler G, Kingma D, Raffeld M, Guerrero I, Misad O, Jaffe ES, Magrath IT, Bhatia K. Epstein-Barr virus in

nasal lymphomas contains multiple ongoing mutations in the EBNA-1 gene. Blood 92: 600-606, 1998

46) Chen Y, Chang KL, Chen W, Shibata D, Hayashi K, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen-1 carboxy-terminal gene sequences in Japanese and American patients with gastric carcinoma. Lab Invest 78: 877-882, 1998

47) Chang KL, Chen Y, Chen W, Hayashi K, Bacchi C, Bacchi M, Weiss LM. EBNA-1 gene sequences in Brazilian and American patients with Hodgkin's disease. Blood 94: 244-250, 1999

48) Kanno H, Ohsawa M, Hashimoto M, Iuchi K, Nakajima Y, Aozasa K. HLA-A alleles of patients with pyothorax-associated lymphoma: anti-epstein-barr virus (EBV) host immune responses during the development of EBV latent antigen-positive lymphomas. Int J Cancer 82: 630-634, 1999

49) Campos-Lima PO, Levitsky V, Brooks J, Lee SP, Hu LF, Rickinson AB, Masucci MG. T cell responses and virus evolution: loss of HLA A11-restricted CTL epitopes in Epstein-Barr virus isolates from highly A11-positive populations by selective mutation of anchor residues. J Exp Med 179: 1297-1305, 1994

50) Gavioli R, Campos-Lima PO, Kurilla MG, Kieff E, Klein G, Masucci MG. Recognition of the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigens EBNA-4 and EBNA-6 by HLA-A11-restricted cytotoxic T lymphocytes: implications for down-regulation of HLA-A11 in Burkitt lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 89: 5862-5866, 1992

51) Campos-Lima PO, Gavioli R, Zhang Q, Wallace LE, Dolcetti R, Rowe M, Rickinson AB, Masucci MG. HLA-A11 epitope loss of Epstein-Barr virus from a highly A11+ population. Science 260: 98-100, 1993

52) Burrows JM, Burrows SR, Poulsen LM, Sculley TB, Moss DJ, Khanna R. Unusually high frequency of Epstein-Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition: implications for virus evolution. J Virol 70: 2490-2496, 1996

53) Gavioli R, Kurilla MG, Campos-Lima PO, Wallace LE, Dolcetti R, Murray RJ, Rickinson AB, Masucci MG. Multiple HLA A11-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-4. J Virol 67: 1572-1578, 1993

54) Chu PG, Chang KL, Chen W, Chen Y, Shibata D, Hayashi K, Bacchi C, Bacchi M, Weiss LM. Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen (EBNA) -4 mutation in EBV-associated malignancies in three different populations. Am J Pathol 155: 941-947, 1999

55) Ishizawa M, Kobayashi Y, Miyamura T, Matsuura S. Simple procedure of DNA isolation from human serum. Nucleic Acids Res 20: 5792, 1991

56) Yasuda N, Tsuji K, Aizawa M, Itakura K, Inou T. HLA antigens in Japanese populations. Am J Hum Genet 28: 390-399, 1976

57) Itakura O, Yamada S, Narita M, Kikuta H. High prevalence of a 30-base pair deletion and single base mutations within the carboxy terminal end of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the Japanese population. Oncogene 13: 1549-1553, 1996

58) Sandvej K, Gratama JW, Munch M, Zhou X, Bolhuis RL, Andresen BS, Gregersen N, Hamilton-Dutoit S. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: Identification of four variants among wild-type EBV isolates. Blood 90: 323-330, 1997

59) Berger C, Rothenberger S, Bachmann E, McQuain C, Nadal D, Knecht H. Sequence polymorphisms between latent membrane proteins LMP1 and LMP2A do not correlate in EBV-associated reactive and malignant lympho-proliferations. Int J Cancer 81: 371-375, 1999

60) Edwards RH, Seillier-Moiseiwitsch F, Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. Virology 261: 79-95, 1999

61) Young LS, Yao QY, Rooney CM, Sculley TB, Moss DJ, Rupani H, Laux G, Bornkamm GW, Rickinson AB. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. J Gen Virol 68: 2853-2862, 1987

62) Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA2 on the growth phenotype of virus transformed B cells. J Virol 61: 1310-1317, 1987

63) Oshima M, Azuka H, Okuno A. High prevalence of Epstein-Barr virus type A strain with the 30 b.p. deletion of the latent membrane protein-1 gene in a Japanese. Pediatr Intern 41: 490-495, 1999

64) Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. Proc Natl Acad Sci USA 81: 3806-3810, 1984

65) Yates JL, Warren N, Sugden B Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature 313: 812-8155, 1985

66) Lupton S, Levine AJ. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. Mol Cell Biol 5: 2533-2542, 1985

67) Reisman D, Sugden B. trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. Mol Cell Biol 6: 3838-3846, 1986

68) Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, Thomas WA, Rowe M, Kieff E, Rickinson AB. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): Implications for the immune control of EBV-positive malignancies. J Exp Med 176: 157-168, 1992

69) Khanna R, Burrows SR, Kurilla MG, Jacob CA, Misko IS, Sculley TB, Kieff E, Moss DJ. Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: Implications for vaccine development. J Exp Med 176: 169-176, 1992

70) Lee SP, Thomas WA, Murray RJ, Khanim F, Kaur S, Young LS, Rowe M, Kurilla M, Rickinson AB. HLA A2.1-restricted

cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2. J Virol 67: 7428-7435, 1993

71) Bryden H, MacKenzie J, Andrew L, Alexander FE, Angus B, Krajewski AS, Armstrong AA, Gray D, Cartwright RA, Kane E, Wright DH, Taylor P, Jarrett RF. Determination of HLA-A*02 antigen status in Hodgkin's disease and analysis of an HLA-A*02-restricted epitope of the Epstein-Barr virus LMP-2 protein. Int J Cancer 72: 614-618, 1997

72) Murray PG, Constandinou CM, Crocker J, Young LS, Ambinder RF. Analysis of major histocompatibility complex class I, TAP expression, and LMP2 epitope sequence in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease. Blood 92: 2477-2483, 1998

73) Tanaka M, Kawaguchi Y, Yokofujita J, Takagi M, Eishi Y, Hirai K. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP2A gene in gastric carcinoma in Japan. Virus Genes 19: 103-111, 1999

74) Lee SP, Tierney RJ, Thomas WA, Brooks JM, Rickinson AB. Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: a potential target for CTL-based tumor therapy. J Immunol 158: 3325-3334, 1997

75) Munch M, Hvas J, Christensen T, Moller-Larsen A, Haahr S. A single subtype of Epstein-Barr virus in members of multiple sclerosis clusters. Acta Neurol Scand 98: 395-399, 1998

76) Falk K, Linde A, Johnson D, Lennette E, Ernberg I, Lundkvist A. Synthetic peptides deduced from the amino acid sequence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 6 (EBNA 6): antigenic properties, production of monoreactive reagents, and analysis of antibody responses in man. J Med Virol 46: 349-357, 1995

Epstein-Barr Virus (EBV) Polymorphisms in Japanese Patients with EBV-associated Hematological Diseases

Kenkichi Takei, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109,** 279 — 290 (2000)

Key words Epstein-Barr virus, EBV determined nuclear antigens-4, chronic active EBV infection, hemophagocytic syndrome, T cell

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is prevalent among adult population and persists in latent forms throughout life. Although the primary infection of EBV is principally restricted to B lymphocytes among hematopoietic cells, it has been recognized recently that T lymphocytes or natural killer (NK) cells can be the targets of EBV infection in rare occasions. In addition, increasing numbers of illness are now known to be associated with this particular herpes virus, such as hemophagocytic syndrome (HPS), chronic active EBV infection (CAEBV) and various malignant neoplasms, including nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease and gastric carcinoma. It has been suggested by studying these diseases that the cellular targets of viral infection, the modes of the latency of viruses, abnormalites in host T cell regulatory responses and the mutation in EBV-associated genes greatly modify the pathogenesis of EBV-related illnesses. Mutations in EBV-associated genes of latent membrane protein (LMP)-1, EBV-associated nuclear antigen (EBNA)-1, EBNA-2 and EBNA-4 serve as the targets of host killer T lymphocyte recognition and any alteration in these protein structure may significantly attenuates the cytotoxic responses. To elucidate the pathogenesis of these EBV-related diseases, mutations in LMP-1, EBNA-1, EBNA-2 and EBNA-4 were examined. The variations in EBV isolates from Japanese patients with EBV-associated diseases including HPS, CAEBV and IM were evaluated using PCR method. The carboxy terminal deletion in LMP-1 and type I (A) subtype were recognized in 78% (29/37) and 91% (30/33) of whole EBV isolates, respectively. Sequence analysis of EBNA-1 revealed the dominance of valine-variant form as a whole (76%, 25/33). Frequencies of these mutations or variations were compared among different disease categories or among different target cell populations. There was no significant differences in frequencies of LMP-1 deletion, EBV subtype or EBNA-1 variations. On the other hand, EBNA-4 mutations were detected in 19% (7/36) of total cases and high prevalence of mutations (50%, 5/10) were detected in cases with EBV-infected T lymphocytes, but the mutations were infrequent among EBV isolates from B lymphocytes (9%, 2/23) or NK cells from CAEBV (0%, 0/8). These results suggested that EBNA-4 mutations play certain roles, at least partly, in the pathogenesis of CAEBV with abnormal proliferation of EBV-infected T lymphocytes. Further studies are necessary to delineate the mechanism of altered immune responses associated with EBNA-4 mutations.