

Analysis of the Mechanism of Epstein-Barr Virus (EBV) Genome Replication in Epithelial Cells

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/2297/8092

上皮系細胞における Epstein-Barr ウイルス 遺伝子複製機構の解析

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 梅田良三教授)

田 中 佐 一 良

(平成1年1月26日受付)

NPC-KT 細胞は上咽頭癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株 Ad-AH との細胞融合によって樹立化された Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) 産生上皮系細胞株であり、NPC-KT 細胞のサブクローンである S61 細胞はさらに EBV 高産生性である。A2L/AH 細胞は、B95-8 細胞由来 EBV によってトランスフォームしたリンパ芽球様細胞株と Ad-AH 細胞との細胞融合によって樹立化された EBV 産生上皮系細胞株である。S61 細胞では 5-ヨードデオキシウリジン (5-iododeoxyuridine, IUdR) 処理によって巨大融合細胞、封入体形成といったヘルペスウイルス増殖に特異的な細胞変性像が観察され、S61 細胞は B 細胞系 EBV 産生細胞株とは異なり細胞破壊性に EBV を産生することが推測された。ウイルス増殖に伴う上皮系細胞での EBV ゲノム複製機構を検討するため、EBV 産生上皮系細胞株である NPC-KT, S61, および A2L/AH 細胞を用いてサザンプロット法にて EBV DNA 末端構造の解析を行った。上記 3 細胞内のウイルス環状 DNA の末端反復配列 (terminal repeat, TR) のコピー数は均一であったが、IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると種々のコピー数の TR を有するウイルス線状 DNA の形成がみられた。またこのように種々のコピー数の TR を有する線状 DNA を含むウイルスによってトランスフォームしたリンパ芽球様細胞株においては、その内在するウイルス DNA は EBV 産生細胞内環状 DNA と異なり種々のコピー数の TR を有していた。EBV 産生細胞内ウイルス環状 DNA とトランスフォームした細胞内ウイルス DNA の TR のコピー数の相違を検討した結果、ウイルス増殖に伴う上皮系細胞での EBV ゲノム複製機構は DNA コンカテマー (concatemer) を複製中間体とするローリングサークルモデルによるものであることが推測された。EBV DNA のクローン化 DNA によるサザンプロット法にて EBV 産生細胞とトランスフォームした細胞が保有するウイルス DNA の比較解析を行ったところ、両者のウイルス DNA は TR のコピー数を除いて同一であることが確認され、また NPC-KT 細胞と S61 細胞内の EBV DNA は同一であった。A2L/AH 細胞と B95-8 細胞内の EBV DNA も TR のコピー数を除いて同一であったが、これらの EBV DNA は NPC-KT 細胞内ウイルス DNA とは異なるものであった。

Key words Epstein-Barr virus, terminal repeat, epithelial cell, DNA replication

1964年 Epstein ら¹⁾によってパーキットリンパ腫の培養細胞から発見された Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は伝染性単核症の病原ウ

イルスとして知られており、さらにまた、パーキットリンパ腫および上咽頭癌患者血清中の EBV 関連抗体が高値を示すことや、その腫瘍細胞内に EBV ゲノム

Abbreviations: CBL, cord blood lymphocyte; cccDNA, covalently closed circular DNA; CSA, cyclosporin A; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; EA, early antigen; EBNA, EBV-associated nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; IUdR, 5-iododeoxyuridine; kb, kilobase pairs; LCL,

が存在し EBV 核内抗原 (EBV-associated nuclear antigen, EBNA) の発現がみられることなどから, EBV がパーキットリンパ腫および上咽頭癌発症に深く関与していることが示唆された²⁻⁹.

EBV はヘルペスウイルス科に属し, ウイルス粒子は162個のカプソメアからなる正20面体のヌクレオカプシッドとそれをとりまくエンベロープから成る. EBV ゲノムはウイルス粒子内では約170キロ塩基対 (kilobase pairs, kb) の2本鎖線状 DNA であり, その両端には約 0.5kb の末端反復配列 (terminal repeat, TR) を1~12個程度有する¹⁰. また上咽頭癌細胞などの EBV ゲノム陽性細胞内では, 両端の TR 同士が融合して閉環状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) となって存在している⁹⁻¹⁰.

EBV 粒子内線状 DNA 両端の TR のコピー数は一般に不均一であるため, EBV 感染によって生じたウイルス cccDNA 中の TR のコピー数も各々異なることが予想されることから, Raab-Traub ら¹¹ は上咽頭癌のクローン性のマーカーとして TR のコピー数に注目した. TR 近傍の DNA をプローブとして腫瘍組織から抽出した DNA をサザンブロット法にて検索したところ, 6例の上咽頭癌において TR のコピー数は各々すべて均一であったことから, すでに腫瘍化した細胞に EBV が感染したのではなく一つの EBV 感染細胞が腫瘍化したこと, すなわち上咽頭癌の単クローン性および EBV 感染の上咽頭癌発症への関与が示唆されたと報告している.

EBV は, *in vitro* にてヒトおよびマーマセットなどの新世界ザルの B細胞に感染しこれを容易にトランスフォーム (不死化, immortalization) することができるため¹², 一般的には B細胞好性と考えられてきた. しかし, トランスフォームした B細胞内ではウイルス複製は宿主細胞に厳格に制御されている. 一方, *in vivo* においては EBV ゲノムの複製およびウイルス産生は咽頭上皮あるいは耳下腺組織においてみられることから¹³⁻¹⁵ B細胞ではなく上皮系細胞が真の EBV 増殖の場と考えられるようになった. しかし, 樹立化された EBV 産生細胞株はすべて B細胞系であり EBV 産生上皮系細胞株の報告は皆無であるため, *in vitro* における上皮系細胞での EBV 増殖機構の解明はなされてない.

当教室にて樹立化された NPC-KT 細胞は, 上咽頭

癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株との細胞融合によって樹立化されたもので, 唯一の上咽頭癌由来 EBV 産生上皮系細胞株である¹⁶.

本研究では, 当教室にて樹立化された EBV 産生上皮系細胞内ウイルス DNA, およびこれらから産生された EBV によって *in vitro* にてトランスフォームした B細胞内ウイルス DNA の末端構造を分子生物学的手法にて解析し, ウイルス増殖に伴う上皮系細胞内での EBV ゲノム複製機構および上咽頭癌の単クローン性発生に関して検討した.

材料および方法

I. 使用細胞

1. NPC-KT 細胞

上咽頭癌 (未分化癌) 初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株 Ad-AH 細胞との細胞融合によって樹立化された EBV ゲノム陽性上皮系細胞株であり, 10%牛胎児血清 (Hyclone, Utah, USA) 加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日水, 東京) にて34°Cで培養した.

2. S61 細胞

NPC-KT 細胞のクローニングによって得られた EBV 高産生上皮系細胞株であり, NPC-KT 細胞と同様の条件にて培養した.

3. B95-8 細胞

伝染性単核症由来 EBV によってトランスフォームしたマーマセットリンパ球系細胞株であり, 10%牛胎児血清加 RPMI-1640 培養液 (日水) にて37°Cで培養した.

4. A2L/AH 細胞

B95-8 細胞産生ウイルス (B95-8 ウイルス) によってトランスフォームしたリンパ芽球様細胞株である A2L 細胞と Ad-AH 細胞との細胞融合によって樹立化された EBV ゲノム陽性ウイルス産生上皮系細胞株であり¹⁷, 10%牛胎児血清加 DMEM にて34°Cで培養した.

II. ウイルス抗原の観察

1. EBNA

標本をアセトン固定した後, 56°Cで30分間非働化した抗 EBNA 抗体陽性の健康成人血清と抗 EBV 抗体陰性補体用健康成人血清を用いて, Reedman ら¹⁸ の方法に準じて蛍光抗体補体法にて EBNA の観察を

lymphoblastoid cell line; PBL, peripheral blood lymphocyte; PBS, phosphate buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; TPA, 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TR, terminal repeat; VCA, viral capsid antigen

行った。

2. 早期抗原 (early antigen, EA) およびウイルスカプシド抗原 (viral capsid antigen, VCA)

抗核抗体, 抗細胞質抗体陰性の上咽頭癌患者血清 (抗 EA-IgG 抗体価, 1:320; 抗 VCA-IgG 抗体価, 1:1280) を用いて, Henle ら¹⁹⁾の方法に準じて蛍光抗体間接法にて EA および VCA の観察を行った。

また, 一部の標本ではヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色にて細胞形態の観察を行った。

III. ウイルス液の調整

NPC-KT, S61, A2L/AH 細胞は共に 1.0×10^5 cells/ml の細胞濃度にて培養を開始し24時間培養後, $80 \mu\text{g/ml}$ の濃度に 5-ヨードデオキシウリジン (5-iododeoxyuridine, IUdR) (Sigma, St. Louis, USA) を加え 34°C 3日間培養しさらに培養液を交換して3日から7日間培養後, 培養液を回収し冷却遠心機モデル 50A-7 (佐久間, 東京) にて $4,000 \times g$ 20分間遠心して細胞成分を除去した。ついで上清を $13,000 \times g$ 3時間遠心した後, その沈査を培養液の約百分の一量の DMEM に浮遊して孔径 $0.8 \mu\text{M}$ のメンブランフィルター, タイプ AA (Millipore, Bedford, USA) にて濾過しウイルス濃縮液とした。

B95-8 細胞は, 20ng/ml の濃度の 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Sigma) を含む培養液にて細胞濃度 2.0×10^5 cells/ml から培養を開始し, 14日後に同様の操作にてウイルス濃縮液を調整した。

IV. EBV による B 細胞トランスフォーメーション

1. リンパ球の分離

ヘパリン採血した臍帯血および健康成人末梢血から, Conray-Ficoll 法²⁰⁾にしたがい単核球の分離を行った。分離後, 細胞を RPMI-1640 培養液にて洗浄し, 20%牛胎児血清加 RPMI-1640 培養液 (RF-20) にて 2.0×10^6 cells/ml の濃度で 37°C 24時間培養した。その後, 浮遊している単核細胞をリンパ球として使用した。

2. リンパ芽球様細胞株の樹立

リンパ球 2.0×10^6 cells あたりウイルス濃縮液を $20 \sim 50 \mu\text{l}$ 加え 37°C にて 2時間吸着させ, その後 RPMI-1640 培養液にて洗浄し, 小試験管にて RF-20 液 1ml で培養を開始した。ただし, 成人リンパ球の培養においては $1.0 \mu\text{g/ml}$ のシクロスポリン A (cyclosporin A, CSA) (サンド, 大阪) を含む RF-20 液を使用した。

試験管にて 1週間培養し, ついで24穴マイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に移しさらに 1週間培養をつづけた。細胞が十分増殖し細胞凝集塊の形

成がみられた系をさらに培養瓶に移して培養をつづけた。ウイルス感染後 4週間以上増殖をつづけたものを EBV によってトランスフォームしたリンパ芽球様細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) とした。

V. 高分子 DNA の抽出

細胞を 0.8% NaCl, 0.02% KCl を含む 10mM リン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) (phosphate buffered saline, PBS) にて 2回洗浄し, 10^7 cells あたり 1ml の 0.5% サルコシル, $100 \mu\text{g/ml}$ プロティナーゼ K (Merck, Darmstadt, FRG) を含む 0.5M エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetate, EDTA) 溶液 (pH 8.0) を加え 50°C 5時間消化後, 等量のフェノールおよび CIAA (クロロホルムとイソアミルアルコールを 24:1 の割合で混合したもの) にて 2回抽出した後, 水層を回収して 10mM EDTA (pH 8.0), 10mM NaCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) にて 24時間透析を行った。ついで $100 \mu\text{g/ml}$ のリボヌクレアーゼ A (RNase A) (Sigma) を加え 37°C 3時間処理し, フェノール, CIAA にて 2回抽出した後, 水層を回収して TE (1 mM EDTA (pH 8.0) を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)) にて 24時間以上透析した。十分に透析した液を DNA 溶液として 4°C にて保存し, 260nm の吸光度を測定し DNA 濃度を求めた。

VI. cccDNA の抽出

Griffin ら²¹⁾ のアルカリ法に準じて以下のごとく行った。細胞 5.0×10^6 cells に 0.5ml の 2 mM EDTA, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) を含む 50mM NaCl 溶液 (pH 12.4) を加え溶解し, 10分間以上つよく混和した後 30°C にて 30分間以上静置した。ついで 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.1) $25 \mu\text{l}$, 5 M NaCl 溶液 $60 \mu\text{l}$ を加えた後, $100 \mu\text{g/ml}$ のプロティナーゼ K にて 37°C 30分間消化を行った。その後 20°C にて 10分間冷却し 0.2M NaCl を含む 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で飽和したフェノールにて抽出し, さらに $8 \sim 10^\circ\text{C}$ にて 10分間冷却した。冷却後遠心して水層を回収し, エタノール沈澱を行った。回収した DNA を $100 \mu\text{g/ml}$ の RNase A にて処理しフェノール, CIAA にて抽出した後, 再度エタノール沈澱を行った。回収した DNA は TE $30 \mu\text{l}$ に溶解し, cccDNA 溶液とした。

VII. サザンプロット法

ウイルス DNA の解析はサザンプロット法²²⁾を用いた。高分子 DNA $2.5 \sim 5.0 \mu\text{g}$, cccDNA 溶液 $15 \mu\text{l}$ を制限酵素 BamHI あるいは EcoRI (東洋紡績, 大阪) にて 37°C 3時間消化し, $1 \mu\text{g/ml}$ のエチジウムブロマイドを含む 0.4ないし 0.6% のアガロースゲルにて

電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとしては HindIII 消化入 ファージ DNA 断片 (東洋紡績) を用いた。泳動終了後、0.6M NaCl を含む 0.2M NaOH 溶液中にてゲルをアルカリ処理し、ついで 0.6M NaCl を含む 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて中和を行った。その後、 $6 \times \text{SSC}$ ($20 \times \text{SSC}$ は 3 M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム溶液) にてニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell, Dassel, FRG) に DNA を移した。その後、フィルターを $2 \times \text{SSC}$ にて洗い風乾し、 80°C 5 時間熱処理して DNA をフィルターに固定した。

VIII. DNA プロブの作成

本実験において使用したプロブはすべて、金沢大学がん研究所ウイルス部、佐藤 博博士から供与を受けた。XhoI プロブは、線状 EBV DNA 右末端 BamHI 切断部位と右端 TR との間から制限酵素 XhoI (東洋紡績) によって切り出した 1.9kb の DNA 断片である。EcoRI I プロブは、EBV DNA 左末端 BamHI 切断部位と左末端 EcoRI 切断部位との間の 4 kb の DNA 断片である (図 1)¹⁹。コスミッドクローニング DNA であるクローン 1, 20, 35, 39 は、それぞれ NPC-KT 細胞産生ウイルス (NPC-KT ウイルス) DNA のコスミッドクローニングによって得られた DNA であり、これら四つのプロブによって EBV DNA はその両末端部分を除いてすべて検出可能である (図 2)^{20,24}。これら DNA 0.1~0.5 μg をニックトランスレーションキット (宝酒造, 京

都) を用いて、100 μCi の [α - ^{32}P] dCTP (アマージャムジャパン, 東京) にて標識した。すなわち、25 μl の DNA 水溶液に 10 μl の [α - ^{32}P] dCTP, 4 μl の $\times 10$ ニックトランスレーション用緩衝液および 1 μl の酵素溶液 (DNA ポリメラーゼ I, DNase I を含む) を加え、 15°C 2 時間反応させ標識を行った。反応終了後フェノールにて抽出し水層を回収し、セファデックス G-50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) スピнкаラムにて未反応 [α - ^{32}P] dCTP を除去した。実験には 1.0×10^8 cpm/ μg 以上の比活性をもつものを使用した。

IX. ハイブリダイゼーション

DNA を固定したフィルターを $3 \times \text{SSC}$ にて 65°C 30 分間、ついで $3 \times \text{SSC}$, $1 \times \text{Denhardt}$ 液 ($5 \times \text{Denhardt}$ 液は 1% ウシ血清アルブミン, 1% フィコール, 1% ポリビニールピロリドン溶液) にて 65°C 1 時間、さらに $1 \times \text{Denhardt}$ 液, 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 熱変性サケ精子 DNA (和光, 大阪) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて 65°C 30 分間以上前処理した。前処理後ハイブリダイゼーション液 ($1 \times \text{Denhardt}$ 液, 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 熱変性サケ精子 DNA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中にて熱変性した ^{32}P 標識プロブと 65°C 14 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを $2 \times \text{SSC}$ にて洗浄後 0.1% SDS を含む $0.1 \times \text{SSC}$ にて 50°C 30 分間以上インキュベートした (この操作を

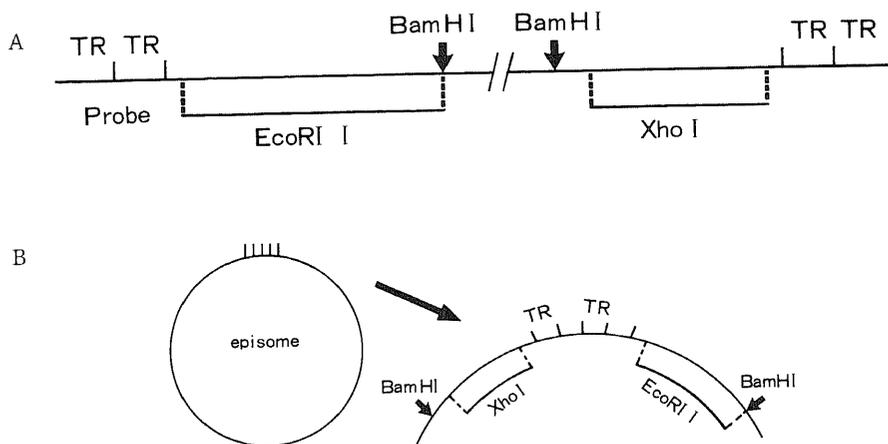


Fig. 1. The structure of termini of EBV. The positions of the XhoI probe and EcoRI I probe are designated. The XhoI 1.9kb fragment represents unique DNA adjacent to the right terminal repeats and the EcoRI I 4kb fragment represents unique DNA adjacent to the left terminal repeats. A, linear form; B, circular form.

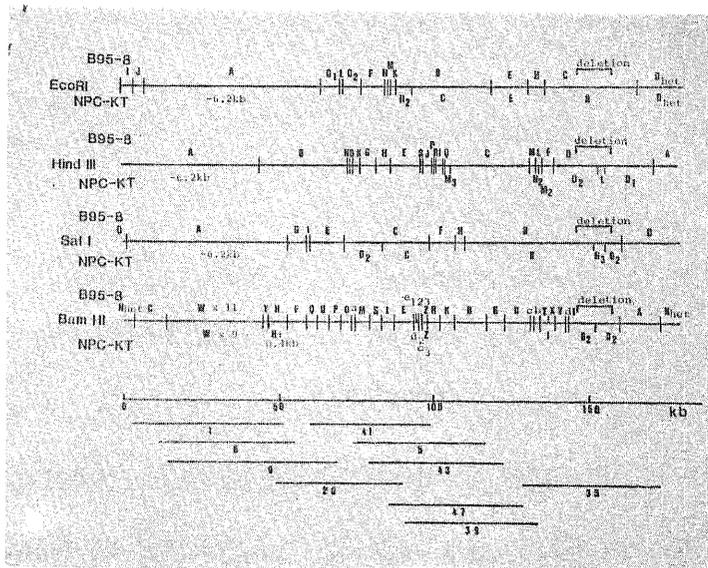


Fig.2. Restriction enzyme linkage map of NPC-KT virus compared with B95-8 virus. The EcoRI, HindIII, Sal I, BamHI restriction enzyme fragments of NPC-KT viral DNA were mapped in comparison with B95-8 viral DNA. The map positions of the NPC-KT cosmid clones (1, 5, 6, 9, 20, 35, 39, 41, 43, 47) which were used in determining the restriction enzyme maps are indicated.

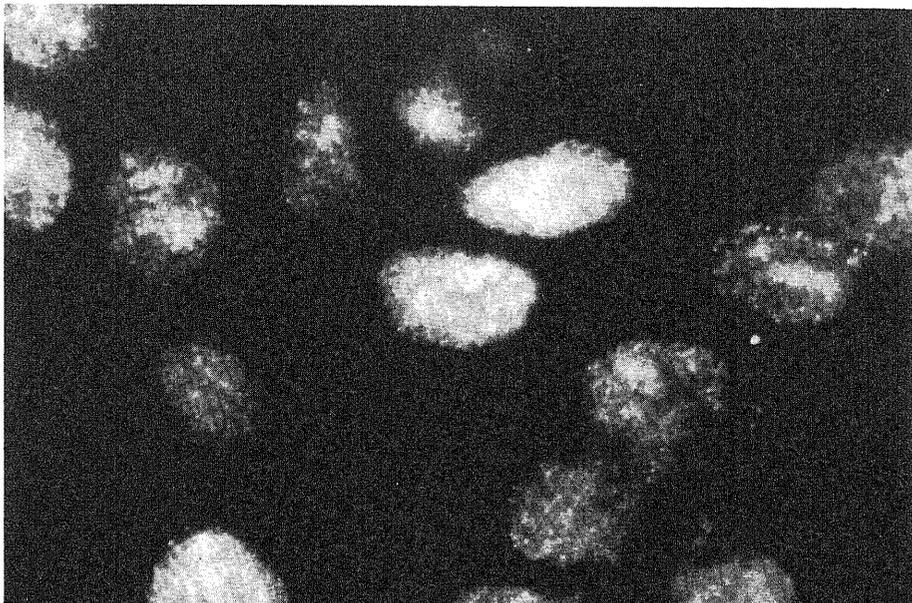


Fig. 3. A

2回以上繰り返した)。処理後、フィルターの水気を取りサランラップにはさんで、X線フィルム X-Omat AR フィルム XAR-5 (Kodak, New York, USA) にて -70°C でオートラジオグラフィーを行った

成 績

I. 蛍光抗体法および HE 染色による観察
NPC-KT, A2L/AH 細胞は共に、蛍光抗体補体法

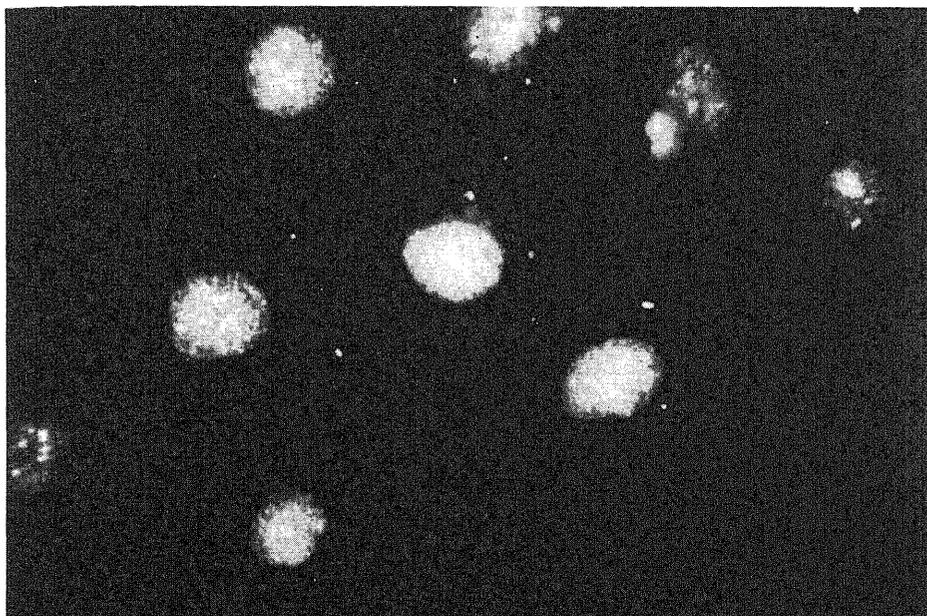


Fig. 3. B

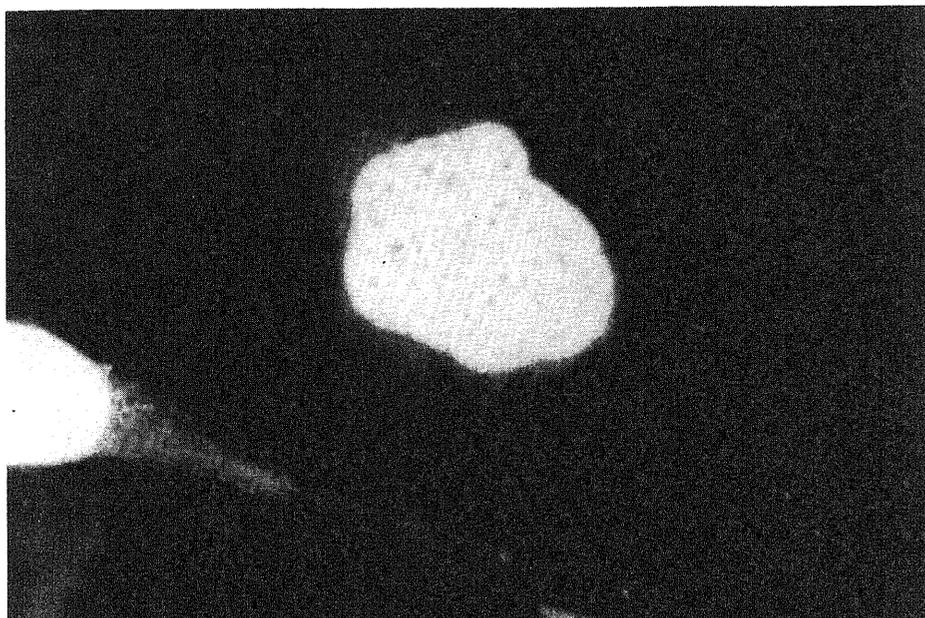


Fig. 3. C

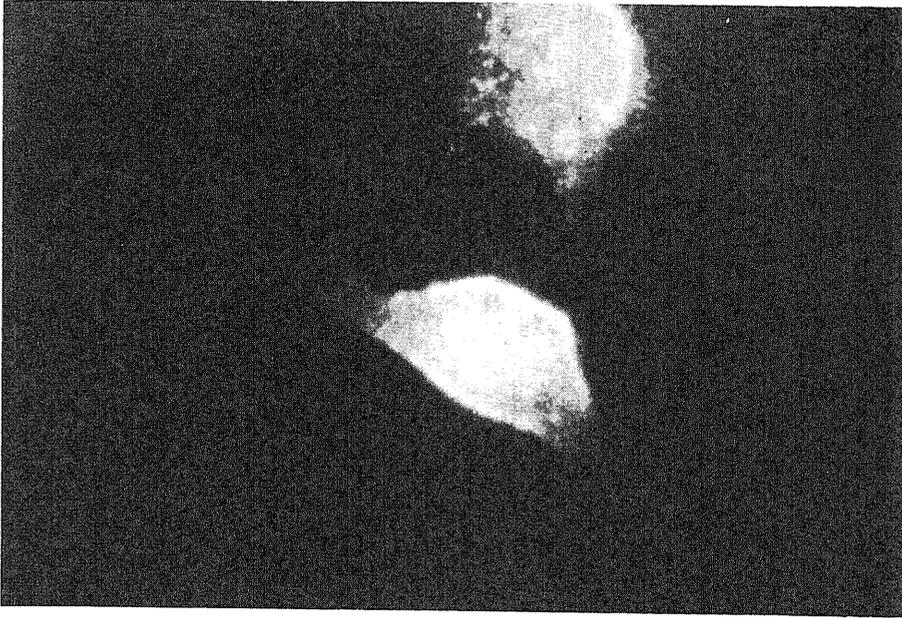


Fig. 3. D

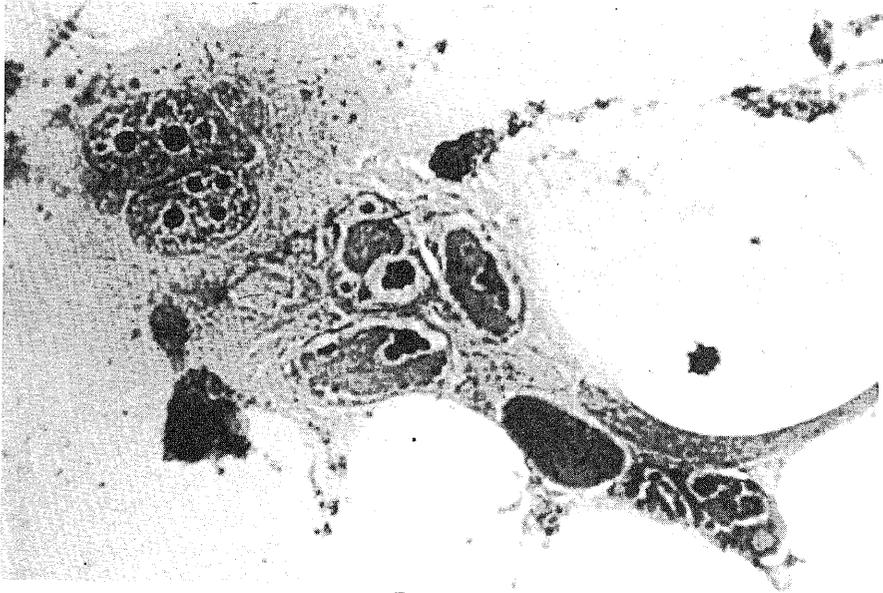


Fig. 3. E

- Fig. 3. Immunofluorescence and Hematoxylin-Eosin staining photomicrographs.
- A. EBNA localized in the nuclei of NPC-KT cells ($\times 200$).
 - B. EBNA localized in the nuclei of A2L/AH cells ($\times 200$).
 - C. EA and VCA localized in the nuclei and cytoplasm of NPC-KT cells treated with $80 \mu\text{g/ml}$ of IUDR for 3 days ($\times 400$).
 - D. EA and VCA localized in the nuclei and cytoplasm of A2L/AH cells treated with $80 \mu\text{g/ml}$ of IUDR for 3 days ($\times 400$).
 - E. Hematoxylin-Eosin staining of S61 cells treated with $80 \mu\text{g/ml}$ of IUDR for 3 days ($\times 400$).

によって EBNA 陽性であることが確認された (図 3-A, B). また, 上記細胞を IUdR 処理することによって EA および VCA が発現することが蛍光抗体間接法にて確認された (図 3-C, D).

NPC-KT 細胞のサブクローンである S61 細胞を IUdR にて処理すると, IUdR 除去後 2 日目に細胞融合による多核巨細胞が多数みられ, 細胞内には核内封入体および細胞質内封入体様構造物がみられた (図 3-E).

II. EBV DNA 末端構造の解析

制限酵素 BamHI 消化による EBV 線状 DNA 右端断片は 1 コピー以上の TR および約 3.5kb のユニーク DNA からなり, 左端断片は 1 コピー以上の TR および約 4.0kb のユニーク DNA からなる. したがって, EBV DNA を BamHI にて消化後 BamHI 右端断片のユニーク DNA と相補性がある XhoI プローブ

にてハイブリダイゼーションを行った場合, 8.0kb 以上の BamHI 断片は線状 DNA が同一分子内で両端の TR にて融合した環状 DNA, あるいは複数の線状 DNA が TR 同士で連結したコンカテマー (concatemer) に由来すると思われる (fused termini), 7.5kb 以下の断片は線状 DNA の BamHI 末端断片である. BamHI 左端断片のユニーク DNA と相補性がある EcoRI I プローブによるハイブリダイゼーションにて同様である.

1. NPC-KT 細胞内 EBV DNA 末端構造の解析
未処理 NPC-KT 細胞の高分子 DNA および cccDNA の BamHI 断片中, XhoI プローブとハイブリダイズするものとして 9.4kb の断片のみが検出された. 同様に BamHI 左端断片を検出する EcoRI I プローブにて 9.4kb の断片のみが検出された. これらの結果から, 未処理 NPC-KT 細胞内には 4 コピーの

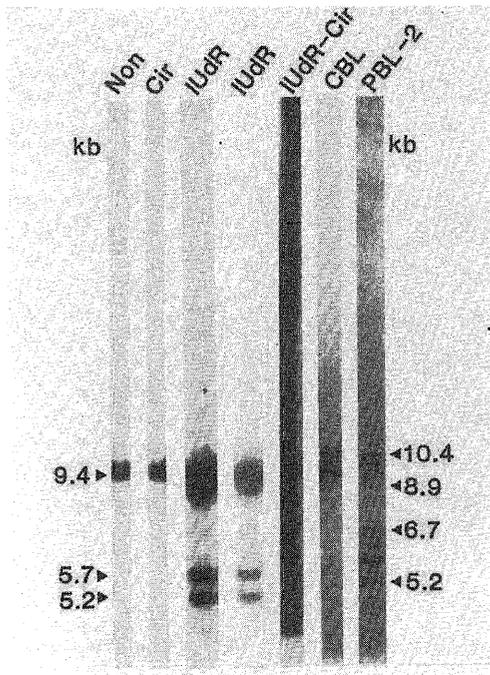


Fig. 4. Southern blot analysis of viral genomic termini in NPC-KT cells and lymphoblastoid cells transformed by virus from NPC-KT cells (NPC-KT virus). High molecular DNAs from non-treated NPC-KT cells (lane Non), NPC-KT cells treated with IUdR (lane IUdR), cord blood lymphocytes transformed by NPC-KT virus (lane CBL), and two different peripheral blood lymphocytes (PBLs) transformed by NPC-KT virus (lane PBL-1, PBL-2), or cccDNAs from non-treated NPC-KT cells (lane Cir) and NPC-KT cells treated with IUdR (lane IUdR-Cir) were digested with BamHI, subjected to electrophoresis through 0.4% agarose gel, transferred to nitrocellulose filters and hybridized with ³²P-labeled XhoI probe (right panel) or EcoRI I probe (left panel).

TR をもつ 1 種類のウイルス cccDNA が保有されていることが明らかとなった (図 4, レーン Non, Cir). IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると, 高分子 DNA において, XhoI プローブでは 9.4kb の fused termini 以外に新たに 8.9, 8.4, 5.2, 4.7kb の断片が検出され, EcoRI I プローブでは 9.4kb 断片以外に 8.9, 8.4, 5.7, 5.2kb の断片が検出された (レーン IUdR). XhoI, EcoRI I プローブ共に 9.4, 8.9, 8.4kb 断片と反応したことから, これらはウイルス線状 DNA の両端が融合した fused termini と思われた. XhoI プローブで検出された 5.2, 4.7kb 断片および EcoRI I プローブで検出された 5.7, 5.2kb 断片は, それぞれウイルス線状 DNA の BamHI 右端および左端断片と考えられた. cccDNA の解析では未処理 NPC-KT 細胞と同じ 9.4kb の断片のみが検出され, 高分子 DNA の解析で検出された 8.9, 8.4kb の断片は検出されなかった (レーン IUdR-Cir).

NPC-KT ウイルスによってトランスフォームした臍帯血由来 LCL では, XhoI プローブによって 8.9, 9.4, 9.9, 10.4kb の四つの BamHI 断片が検出され, EcoRI I プローブによっても同じサイズの断片が検出

された (レーン CBL). これらはウイルス環状 DNA に由来する fused termini と思われた. 成人末梢血由来 LCL にても同様の fused termini とされる断片がみられたが (レーン PBL-1), それ以外に XhoI プローブでは 4.7, 5.2, 5.7, 6.2kb, EcoRI I プローブでは 5.2, 5.7, 6.2, 6.7kb の断片が検出され, これらはウイルス線状 DNA の BamHI 右端および左端断片と思われた (レーン PBL-2).

2. S61 細胞内 EBV DNA 末端構造の解析

未処理 S61 細胞の高分子 DNA では, XhoI プローブによって 9.4, 5.2, 4.7kb の BamHI 断片が検出され, EcoRI I プローブによって 9.4, 5.7, 5.2kb の断片が検出された (図 5, レーン Non). cccDNA では, 両プローブによって共に 9.4kb の断片のみが検出された (レーン Cir). これらの結果から, 9.4kb の断片はウイルス cccDNA 由来であり, 未処理 S61 細胞は 4 コピーの TR をもつ 1 種類のウイルス cccDNA を保有することが判明した. その他の断片はウイルス線状 DNA の BamHI 末端断片と思われた. IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると, 高分子 DNA では, XhoI プローブによって 8.9, 9.4, 9.9, 10.4kb

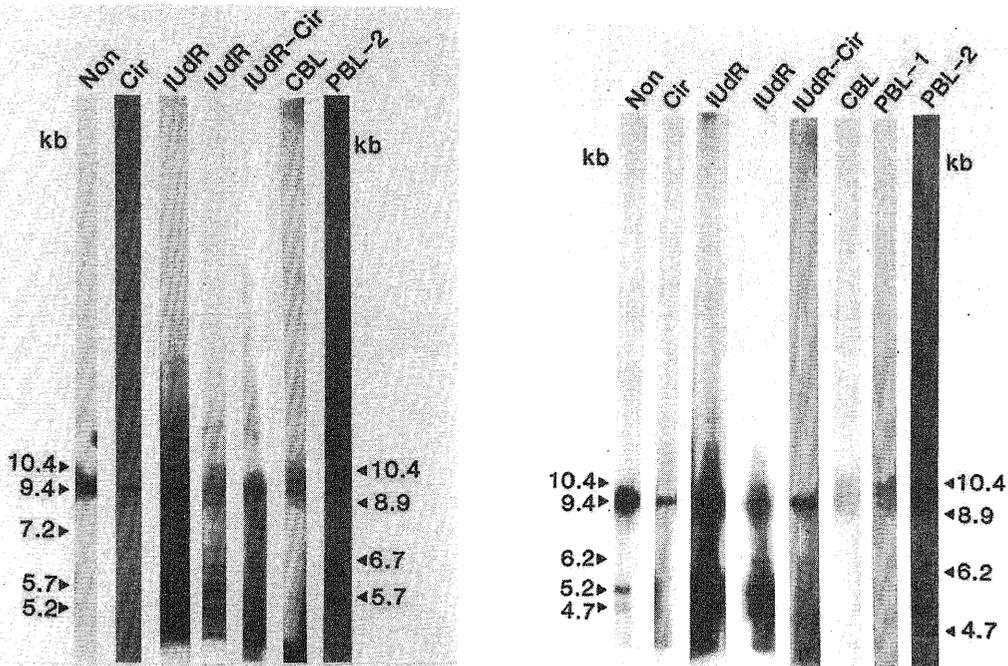


Fig. 5. Southern blot analysis of viral genomic termini in S61 cells and lymphoblastoid cells transformed by virus from S61 cells (S61 virus). Right and left panels show hybridization with XhoI and EcoRI I probes, respectively. Lanes are designated as described in Fig. 4.

の四つの断片および4.7, 5.2, 5.7, 6.2kbの四つの断片が検出され, EcoRI I プローブによって8.9~10.4 kbの四つの断片および5.2, 5.7, 6.2, 6.7, 7.2kbの五つの断片が検出された(レーン IUdR). 両プローブによって共に検出された8.9~10.4kbの断片は fused termini 由来であり, その他の断片はウイルス線状 DNA の BamHI 末端断片と思われた. cccDNA では, 両プローブによって共に9.4kbの断片のみが検出された(レーン IUdR-Cir).

S61 細胞産生 EBV によってトランスフォームした臍帯血由来 LCL では, 両プローブによって共に8.9, 9.4, 9.9, 10.4kbの四つの断片が検出され, これらはウイルス環状 DNA 由来の fused termini と思われた(レーン CBL). 成人末梢血由来 LCL では, 8.9~10.4kbの断片以外に XhoI プローブによって4.7, 5.2, 5.7, 6.2kbの四つの断片が検出され, EcoRI I プローブによって5.7, 6.2, 6.7kbの三つの断片が検出されたが, これらはウイルス線状 DNA の BamHI 末端断片と思われた(レーン PBL-2).

3. A2L/AH 細胞内 EBV DNA 末端構造の解析 未処理 A2L/AH 細胞の高分子 DNA および

cccDNA では, XhoI プローブおよび EcoRI I プローブによって16.9kbの BamHI 断片のみが検出されたことから, 未処理 A2L/AH 細胞は19コピーのTRをもつ1種類のウイルス cccDNA を保有することが明らかとなった(図6, レーン Non, Cir). IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると, 高分子 DNA では, XhoI プローブによって16.9kbの断片以外に4.7~13.9kbの断片が約0.5kb きざみに検出され, EcoRI I プローブによって16.9kbの断片以外に5.2~13.9kbの断片が約0.5kb きざみに検出された(レーン IUdR). cccDNA では, 両プローブによって共に16.9kbの断片のみが検出された(レーン IUdR-Cir).

A2L/AH 細胞産生 EBV によってトランスフォームした臍帯血由来 LCL では, 両プローブによってともに8.9~22.4kbの断片が約0.5kb きざみに検出され, これらはウイルス環状 DNA 由来の fused termini と思われた(レーン CBL). 成人末梢血由来 LCL では, 両プローブによって共に4.7~22.4kbの断片が約0.5kb きざみにみられ, これら断片の一部はウイルス線状 DNA の BamHI 末端断片と思われた(レーン PBL-2).

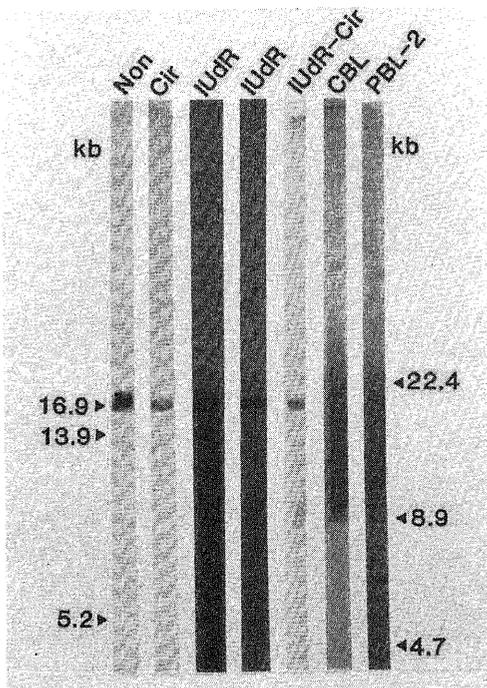


Fig. 6. Southern blot analysis of viral genomic termini in A2L/AH cells and lymphoblastoid cells transformed by virus from A2L/AH cells (A2L/AH virus). Right and left panels show hybridization with XhoI and EcoRI I probes, respectively. Lanes are designated as described in Fig. 4.

4. B95-8 細胞内 EBV DNA 末端構造の解析

未処理 B95-8 細胞の高分子 DNA および cccDNA では、両プローブによって共に 8.9kb の BamHI 断片のみが検出されたことから、未処理 B95-8 細胞は 3 コピーの TR をもつ 1 種類のウイルス cccDNA を保有することが明らかとなった (図 7, レーン Non, Cir). TPA 処理によってウイルス産生を誘導すると、高分子 DNA では、XhoI プローブによって 8.9kb および 4.7kb の断片が検出され、EcoRI I プローブによって 8.9kb および 5.2kb の断片が検出された (レーン TPA). 8.9kb の断片は fused termini 由来であり、4.7, 5.2kb の断片はウイルス線状 DNA の BamHI 末端断片と思われた. cccDNA では、両プローブによって共に 8.9kb の断片のみが検出された (レーン TPA-Cir).

B95-8 ウイルスによってトランスフォームした臍帯血由来 LCL では、両プローブによって共に 8.9, 9.4 kb の 2 つの断片が検出され、これらはウイルス環状 DNA 由来の fused termini と思われた (レーン CBL). 成人末梢血由来 LCL では、8.9, 9.4kb の断片以外に XhoI プローブによって 4.7, 5.2kb の断片

が検出され、EcoRI I プローブによって 5.2, 5.7kb の断片が検出されたが、これらはウイルス線状 DNA の BamHI 末端断片と思われた (レーン PBL-2).

III. コスミッドクローン化 DNA による EBV DNA の解析

各 EBV 産生細胞が保有する EBV ゲノムと、それぞれの EBV によってトランスフォームした LCL が保有する EBV ゲノムの同一性をみるため、各細胞から抽出した DNA を制限酵素 BamHI および EcoRI にて消化し、コスミッドクローン化 DNA であるクローン 1, 20, 35, 39 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行いウイルス DNA を比較解析した.

四つのクローン化 DNA による解析の結果、NPC-KT, S61 細胞、およびこれらの細胞から産生された EBV によってトランスフォームした LCL がそれぞれ保有する EBV DNA は、BamHI 消化および EcoRI 消化においてすべて同一の制限酵素切断部位を有していた (図 8~11). 同様に A2L/AH, B95-8 細胞、およびこれらの細胞から産生された EBV によってトランスフォームした LCL がそれぞれ保有する EBV DNA も、BamHI 消化および EcoRI 消化にお

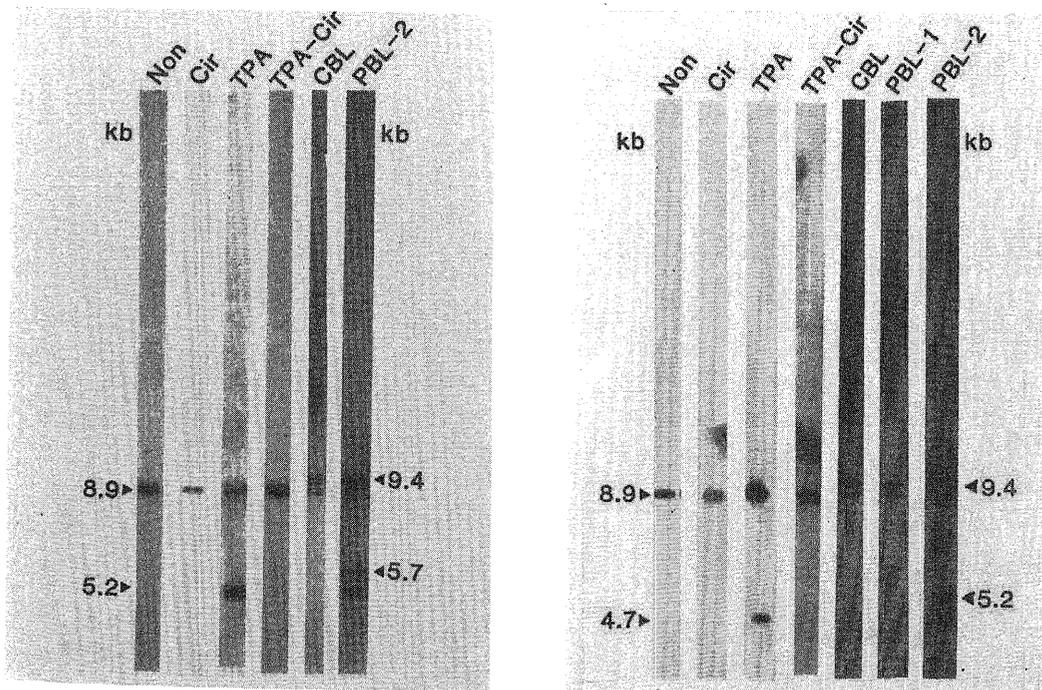


Fig. 7. Southern blot analysis of viral genomic termini in B95-8 cells and lymphoblastoid cells transformed by virus from B95-8 cells (B95-8 virus). Right and left panels show hybridization with XhoI and EcoRI I probes, respectively. Lanes are designated as described in Fig. 4.

いてすべて同一の制限酵素切断部位を有していた。

NPC-KT ウイルス DNA は B95-8 ウイルス DNA とは明らかに異なっていた。クローン35によって検出された NPC-KT ウイルス DNA の EcoRI B 断片は、同じプローブによって検出された B95-8 ウイルス DNA の EcoRI C 断片よりも 12kb 大きかった(図10, 左パネル)。これは B95-8 ウイルス DNA の EcoRI C 断片中に 12kb の欠損があるためである。また、クローン35によって検出された NPC-KT ウイルス DNA の BamHI B2 および D2 断片に相当する部分は、B95-8 ウイルス DNA において 12kb の欠損があるため BamHI I 断片として検出された。さらに NPC-KT ウイルス DNA の BamHI I 断片は、B95-8 ウイルス DNA において BamHI T および X 断片として検出された(図10, 右パネル)。クローン39によって検出された B95-8 ウイルス DNA の EcoRI

B 断片に相当する部分は、NPC-KT ウイルス DNA において EcoRI C および H2 断片として検出された(図11, 左パネル)。これは、B95-8 ウイルス DNA の EcoRI B 断片中に、NPC-KT ウイルス DNA ではさらにもう 1 箇所 EcoRI 切断部位があるためである。

考 察

EBV は伝染性単核症およびパーキットリンパ腫に深く関与していること、また *in vitro* では容易にヒト B 細胞をトランスフォームすることから B 細胞好性と考えられてきた。しかし EBV でトランスフォームした B 細胞内では、ウイルス増殖は宿主細胞に厳格に制御されている¹²⁾

in vivo においては、伝染性単核症患者の咽頭上皮内に多量の EBV DNA が存在すること¹³⁾、および伝染性単核症患者や EBV 抗体陽性者の口腔咽頭に EBV

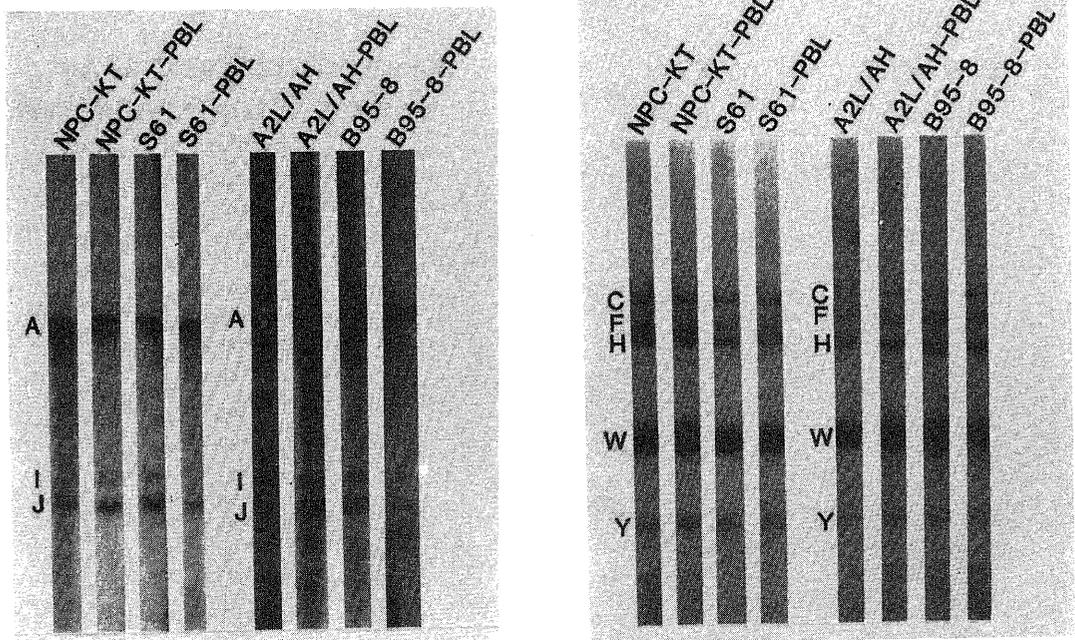


Fig. 8. Southern blot analysis of EBV DNA in virus-producer cell lines and EBV-transformed lymphoblastoid cells with cosmid clone 1 probe. High molecular DNAs from NPC-KT cells treated with IuDr (lane NPC-KT), PBLs transformed by NPC-KT virus (lane NPC-KT-PBL), S61 cells treated with IuDr (lane S61), PBLs transformed by S61 virus (lane S61-PBL), A2L/AH cells treated with IuDr (lane A2L/AH), PBLs transformed by A2L/AH virus (lane A2L/AH-PBL), B95-8 cells treated with TPA (lane B95-8), and PBLs transformed by B95-8 virus (lane B95-8-PBL) were digested with BamHI (right panel) or EcoRI (left panel), subjected to electrophoresis through 0.4 or 0.6% agarose gel, transferred to nitrocellulose filters and hybridized with ³²P-labeled cosmid clone 1. Letters of alphabet at the left side of lanes in Figs. 8 to 11 indicate BamHI or EcoRI fragments of EBV DNA (Refer to Fig. 2).

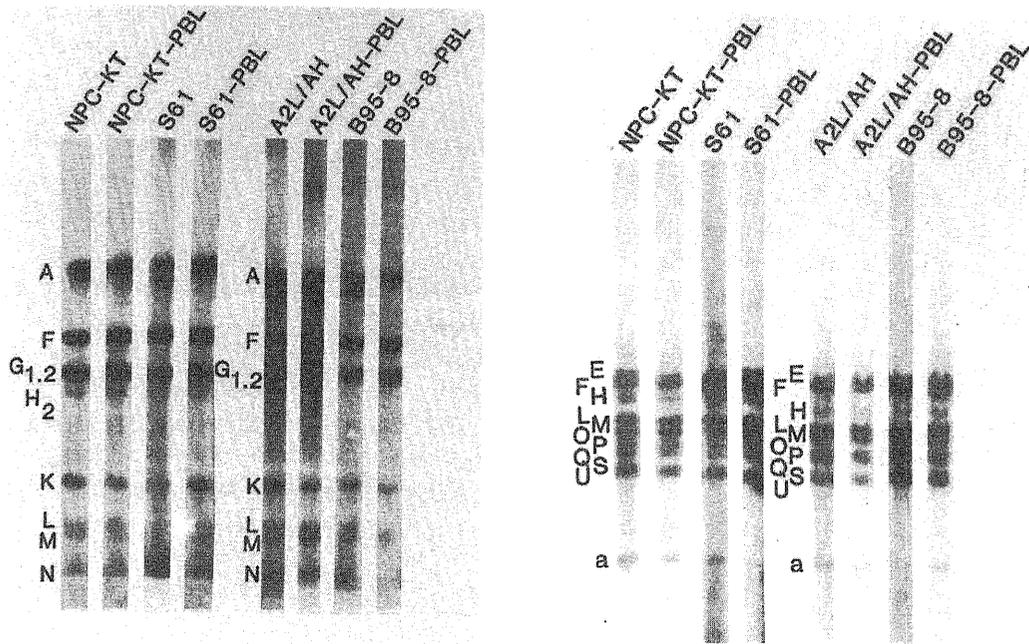


Fig. 9. Southern blot analysis of EBV DNA in virus-producer cell lines and EBV-transformed lymphoblastoid cells with cosmid clone 20 probe. High molecular DNAs were digested by BamHI (right panel) or EcoRI (left panel) and hybridized with cosmid clone 20. Lanes are designated as described in Fig. 8.

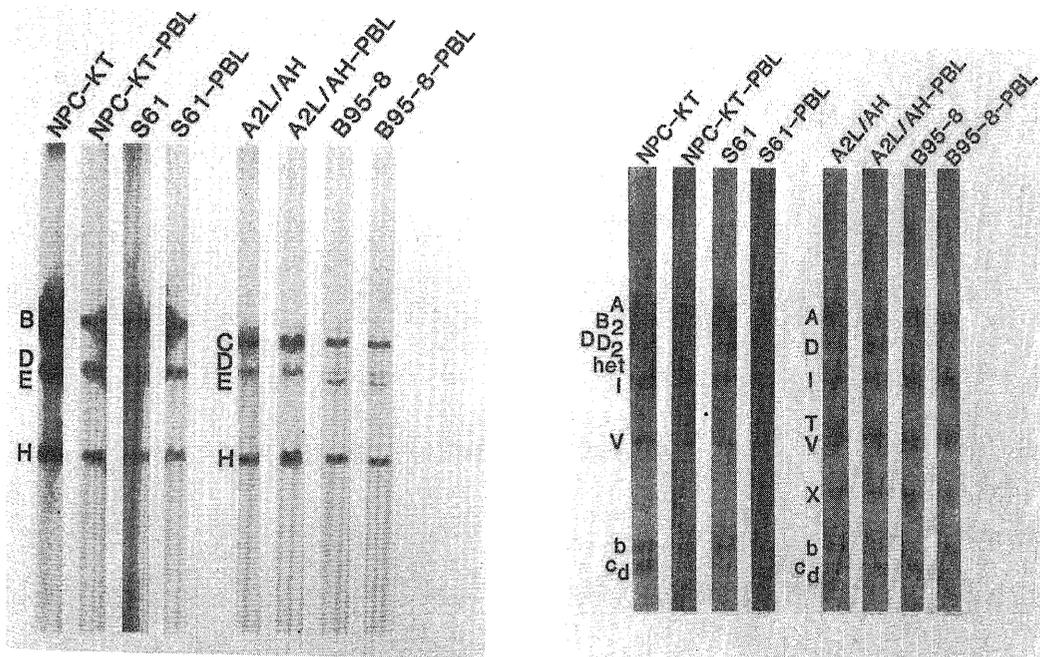


Fig. 10. Southern blot analysis of EBV DNA in virus-producer cell lines and EBV-transformed lymphoblastoid cells with cosmid clone 35 probe. High molecular DNAs were digested by BamHI (right panel) or EcoRI (left panel) and hybridized with cosmid clone 35. Lanes are designated as described in Fig. 8.

が排出されること²⁹⁾から咽頭上皮における EBV 増殖が示唆された。唾液中にも EBV の存在が知られており¹⁴⁾, Wolf ら¹⁵⁾は健康人の耳下腺組織内に EBV ゲノムが存在することを報告した。また, 上皮系悪性腫瘍である声門上部癌や扁桃癌の未分化癌あるいは低分化癌において EBV DNA が検出されることがあり^{26,27)}, 抗ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 抗体陽性男性同性愛者にみられることがある口腔毛様白斑症 (oral hairy leukoplakia) では上皮系細胞内に EBV 線状 DNA が認められた²⁸⁾。以上から, *in vivo* における EBV 増殖の場合は B 細胞系より,むしろ咽頭上皮あるいは耳下腺組織 (特に導管上皮) などの上皮系細胞と推測される。

in vitro における上皮系細胞への EBV 感染は困難なことが多いが, EBV DNA のトランスフェクション²⁹⁾, ミクロ注入³⁰⁾や EBV レセプターの移植³¹⁾によって上皮系細胞への EBV 感染が可能である。Sixbey ら³²⁾は, 伝染性単核症患者の咽頭ぬぐい液中に存在する EBV 野生株は子宮頸部上皮初代培養細胞に直接感染し, EBNA の発現がみられ EA および VCA も誘導されたと報告した。また Trumper ら³³⁾は, ヌードマウス継代上咽頭癌細胞において自然にウイルス増殖

がおこりウイルス粒子の形成がみられたことを報告した。以上の点からも, 上皮系細胞において EBV 感染, ウイルス DNA 複製およびウイルス産生が可能であると思われる。

滝元らによって樹立化された NPC-KT 細胞は, 上咽頭癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株 Ad-AH 細胞との融合細胞で, EBV 産生上皮系細胞株である¹⁶⁾。この細胞は表面免疫グロブリン, Fc レセプター, 補体レセプター (CR1, CR2) などの B 細胞関連表面マーカーは陰性であり, EBV によってトランスフォームした B 細胞との融合細胞ではないことが証明された³⁴⁾。また, 上咽頭粘膜および上咽頭癌組織において上皮系細胞とリンパ球の細胞融合が電顕的に観察されたこと³⁵⁾に注目し, EBV ゲノム陽性リンパ芽球様細胞株と上皮系細胞株の細胞融合によって, あるいは B 細胞と上皮系細胞株の融合後 EBV が感染することによって, 上皮系細胞が EBV ゲノムを保有することが実験的に証明された³⁶⁾⁻³⁸⁾。A2L/AH 細胞は, B95-8 ウイルスによってトランスフォームしたヒトアデノイド由来リンパ芽球様細胞株 A2L とヒトアデノイド由来上皮系細胞株 Ad-AH との融合細胞で, EBV 産生上皮系細胞株である¹⁷⁾。

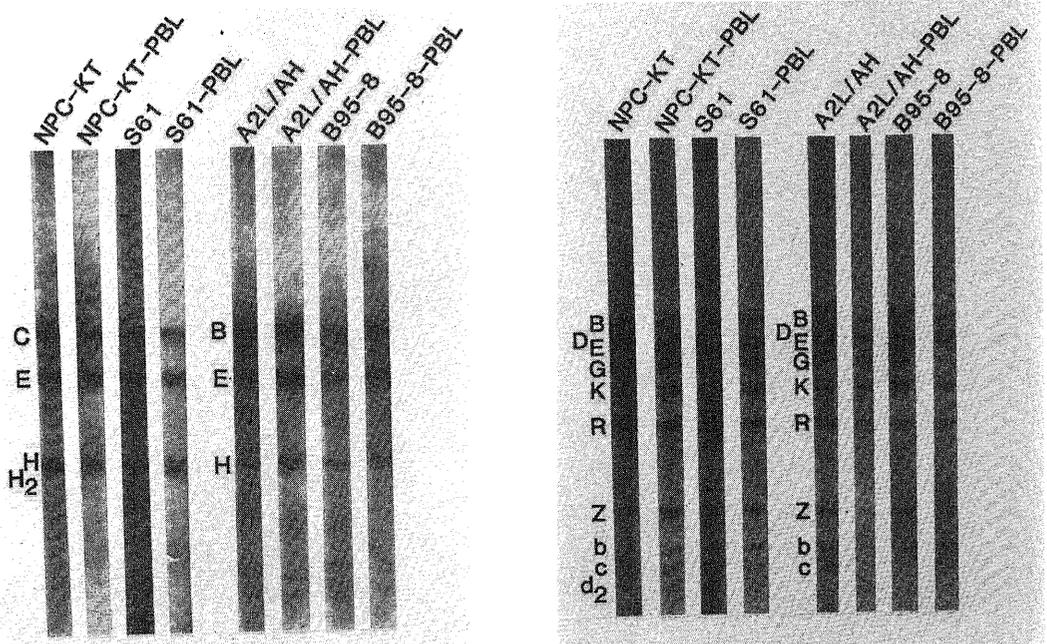


Fig.11. Southern blot analysis of EBV DNA in virus-producer cell lines and EBV-transformed lymphoblastoid cells with cosmid clone 39 probe. High molecular DNAs were digested by BamHI (right panel) or EcoRI (left panel) and hybridized with cosmid clone 39. Lanes are designated as described in Fig. 8.

現在までのところ *in vitro* で樹立化された EBV 産生細胞株はすべて B 細胞系であり、EBV 産生上皮系細胞株の報告は皆無であった。したがって、上記 2 細胞、特に NPC-KT 細胞は上皮系細胞における EBV 増殖過程を検討する上できわめて有用な実験系である。また NPC-KT 細胞のサブクローンである S61 細胞では、IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると細胞融合による多核巨細胞の形成および核内封入体が観察された。これは他のヘルペスウイルス増殖時にみられる細胞変性像 (cytopathic change) を思わせる所見であり、S61 細胞は他の B 細胞系 EBV 産生細胞株とは異なり細胞破壊性に EBV を産生することが推測された。したがって、S61 細胞は *in vivo* における EBV 産生細胞に非常に近いモデル細胞といえる。

ところで、上咽頭癌が単クローン性であるか、多クローン性であるかという点、および発癌と EBV 感染の関連性、すなわち上咽頭癌は EBV 感染細胞が腫瘍化したものであるのか、あるいはすでに腫瘍化した細胞に EBV が感染したものであるのかという点は、発癌機構を解明する上で重要な点である。

腫瘍のクローン性を反映するマーカーに関してはいろいろと検討されてきたが、最近、B 細胞系腫瘍では免疫グロブリン遺伝子再構成、T 細胞系腫瘍では T 細胞抗原特異的レセプター遺伝子再構成がクローン性のマーカーとして有用であることが報告された^{39,40}。また Fialkow ら⁴¹は、グルコース 6 リン酸脱水素酵素アイソザイムおよび表面 IgM の検索からパーキットリンパ腫は単クローン性であると報告した。これに対して、上皮系悪性腫瘍においては有用なマーカーがなくクローン性の検討は十分なされていない。

EBV 粒子内線状 DNA はその両端に種々のコピー数の TR を有するが、細胞内ではその両端の TR 部分にて融合した cccDNA として存在するため、cccDNA 中の TR のコピー数もまた不均一であることが予想される。Raab-Traub ら¹³は、TR のコピー数の不均一性が EBV ゲノム陽性である上咽頭癌のクローン性を反映すると推測し、6 例の上咽頭癌組織において EBV DNA の TR のコピー数はすべて均一であったことからウイルスの単クローン性が示唆され、上咽頭癌は EBV が感染した一つの細胞が腫瘍化、増殖したものであると結論した。また Brown ら⁴²も、免疫グロブリン遺伝子再構成の検索によって単クローン性であることが証明された EBV ゲノム陽性悪性リンパ腫腫瘍組織において、EBV DNA の TR のコピー数が均一であったことから、TR はクローン性のマーカーとして有用であると報告した。

しかし、上皮系細胞でのウイルス産生から感染成立に至るまでの過程における EBV DNA の TR のコピー数の変化を詳細に比較検討し、EBV によってトランスフォームした細胞内での TR の不均一性の有無に関して実験的に追求した報告はない。そこで今回、上咽頭癌のクローン性のマーカーとして TR が有用であることを確認するため、また同時に、ウイルス増殖に伴う上皮系細胞における EBV ゲノム複製機構を解析する上でも有用な情報が得られると考え、EBV 産生上皮系細胞株である NPC-KT、S61、A2L/AH 細胞、および各細胞から産生された EBV によってトランスフォームした LCL が保有する EBV DNA の末端構造を解析し、TR のコピー数の不均一性の有無を検討した。

XhoI、EcoRI I プローブによる解析では、NPC-KT、S61、A2L/AH 細胞はそれぞれ TR のコピー数が均一なウイルス cccDNA を保有しており、S61 細胞では線状 DNA もみられ自然にウイルス増殖がおこっていることが推測された。IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると、各細胞において TR 同士が融合した fused termini がウイルス DNA 複製中間体として検出されたが、これらはアルカリ法によって抽出されなかったことから cccDNA ではなく、切断点 (nick) の入った環状 DNA あるいは線状 DNA 同士が連結したコンカテマーと考えられた。また各細胞において種々のコピー数の TR を有する線状 DNA の形成がみられ、ウイルス増殖が示唆された。各細胞由来の EBV によってトランスフォームした LCL においては種々のコピー数の TR を有するウイルス DNA の形成がみられ、ウイルス DNA としては多クローン性であった。これらの結果から、上皮系細胞が保有するウイルス環状 DNA の TR のコピー数が均一であったとしても、ウイルス増殖過程において種々のコピー数の TR を有するウイルスが産生され、そのウイルスが感染した細胞においてもウイルス DNA は種々のコピー数の TR を有することが証明された。したがって上咽頭癌組織の EBV DNA の TR のコピー数が均一であったことは、すでに腫瘍化した細胞に EBV が感染したのではなく、ひとつの EBV 感染細胞が腫瘍化したことを示唆しており、上咽頭癌のクローン性のマーカーとして TR は有用であるものと思われた。

B 細胞系 EBV 産生細胞株である B95-8 細胞のウイルス cccDNA の TR のコピー数も均一であり、TPA 処理によってウイルス産生を誘導するとウイルス線状 DNA の形成がみられた。またトランスフォー

ムした LCL の EBV DNA は種々のコピー数の TR を保有していた。

2本鎖環状 DNA の複製機構としては、ローリングサークルモデルとシータ型中間体モデルが知られている⁴⁹⁾(図12)。

ローリングサークルモデルとは、以下のようなものである。一方の DNA(+鎖) の特定の部位 (origin of replication) に切断点が生じ、一鎖を DNA 合成の鋳型として DNA 合成酵素によって+鎖の 3' 末端にヌクレオチドの付加反応が始まり+鎖が合成される。合成が進んだ+鎖は 5' 末端側から環状 DNA を離れ (roll out) それを鋳型として-鎖の合成が始まる。DNA 合成が十分進むと特定の部位で切断され1単位の DNA が遊離する。

シータ型中間体モデルとは、環状 DNA の形を保持したまま DNA 複製が進むもので、複製開始点において高次コイル (supercoil) がほどけてそこから両方向に DNA 合成が進み二つの環状 DNA が形成されるものである。複製過程において電頭的にシータ (θ) 型の中間体が観察されることからこう呼ばれる。

ヘルペスウイルスの多くはローリングサークルモデルによって DNA 複製が進むことが知られているが⁴⁹⁾、EBV DNA の複製機構は十分には解明されていない。EBV 産生細胞では TPA などによってウイルス DNA 合成を誘導するとウイルス由来 DNA 合成酵素が誘導されることから、ウイルス産生過程における DNA 複製にはウイルス由来 DNA 合成酵素が関与している⁴⁹⁾。これに対して、ウイルス由来 DNA 合成酵素を特異的に阻害するアシクロビル (acyclovir) の存在下でも、B細胞は EBV によってトランスフォームし複数の EBV ゲノムを保有することから、ウイルス

cccDNA の複製には宿主細胞由来の DNA 合成酵素が関与していると思われる⁴⁹⁾。

Shaw⁴⁹⁾は、EBV 産生株 P3HR-1 細胞が保有するウイルス cccDNA はウイルス由来 DNA 合成酵素阻害剤であるアシクロビルやフォスフォノ酢酸 (phosphonoacetic acid PAA) 処理によって減少し、逆に TPA 処理によって増幅することから、ウイルス産生過程における DNA 複製はシータ型中間体モデルによるものであると報告している。これに対して、今回の実験における EBV 産生細胞内ウイルス cccDNA とトランスフォームした細胞内ウイルス DNA の TR のコピー数の相違からウイルス産生過程における DNA 複製機構を検討した。NPC-KT 細胞、S61 細胞内ウイルス DNA は4コピーの TR のみを有するが、これらの細胞から産生された EBV によってトランスフォームした LCL が保有するウイルス DNA は3~6コピーの TR を有していた。また A2L/AH 細胞内ウイルス DNA は19コピーの TR を有するが、A2L/AH 細胞産生ウイルスによってトランスフォームした LCL が保有するウイルス DNA は3~30コピーの TR を有していた。

シータ型中間体モデルは、環状 DNA が複製中間体であり TR において1箇所または複数の部位で切断をうけ線状 DNA となり、感染によって再び環状 DNA となるものである。TR において複数の部位で切断をうけた場合、種々のコピー数の TR をもつウイ

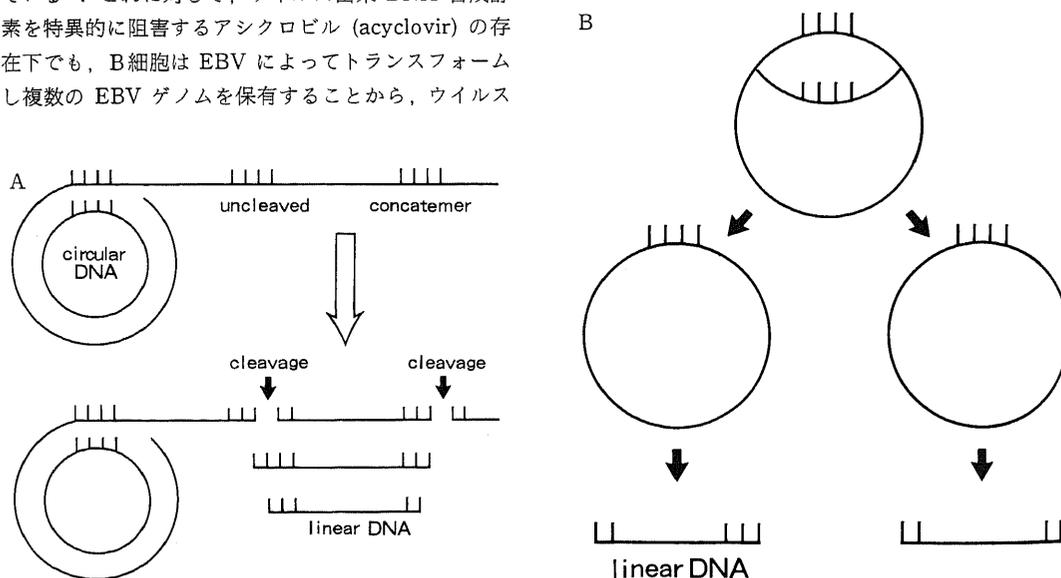


Fig. 12. Schemes of rolling circle model (A) and theta-shaped intermediate model (B).

ルス線状 DNA が形成されるが、その両端にある TR のコピー数は未処理ウイルス産生細胞が保有する環状 DNA の TR のコピー数よりも増えることはありえない。

これに対してローリングサークルモデルでは、ウイルス線状 DNA が連結したコンカテマーが複製中間体であり、TR において任意の部位で切断をうけることによって種々のコピー数の TR を両端に有する線状 DNA が形成される。したがって、このような線状 DNA を有するウイルスによってトランスフォームした LCL では、未処理ウイルス産生細胞が保有する環状 DNA の TR のコピー数を中心とした種々のコピー数の TR をもつ環状 DNA が形成される。これは本実験結果と一致するものであり、したがって EBV DNA の末端構造の解析から、ウイルス産生過程における EBV DNA の複製は他のヘルペスウイルスと同様にローリングサークルモデルによって行われるものと思われた。

また S61 細胞では、IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると線状 DNA 以外に 3～6 コピーの TR を有するウイルス DNA が形成されウイルス DNA 複製中間体と考えられた。NPC-KT 細胞でも、IUdR 処理によって 4 コピーの TR を有するもの以外に 2 または 3 コピーの TR を有する中間体が認められた。しかし、これらの複製中間体は 4 コピーの TR を有するものを除いて cccDNA のみを抽出するアルカリ法では抽出されなかったことから、ニックのはいった環状 DNA またはコンカテマーであることが推測された。しかもこの中間体は、細胞内で一旦形成された 1 単位のウイルス線状 DNA が再び環状化したものか、あるいは 1 単位の線状 DNA 同士が再度連結したものである可能性が考えられた。

また A2L/AH 細胞内ウイルス DNA はもともと B95-8 細胞由来であるが TR のコピー数は 19 コピーであり、B95-8 細胞内ウイルス DNA が 3 コピーの TR を有することに比べて著しく多数の TR を有していた。これからも、細胞内で一旦形成された線状 DNA がウイルス粒子の形成に関わらず再び環状化している可能性が示唆された。

コスミッドクローン化 DNA によるウイルス DNA の解析では、EBV 産生細胞とその細胞由来の EBV によってトランスフォームした LCL が保有するウイルス DNA は TR を除いて同一のものであることが証明された。また、NPC-KT、S61 細胞が保有するウイルス DNA は同一のものであり、同じく A2L/AH、B95-8 細胞が保有するウイルス DNA も同一の

ものであった。

EBV の生物学的活性はウイルス株によって異なり、多くは B95-8 ウイルスに代表される B 細胞トランスフォーム活性をもつ。P3HR-1 細胞産生ウイルス (P3HR-1 ウイルス) ではトランスフォーム活性はみられないが、EBV 持続感染細胞である Raji 細胞に重感染し EA およびウイルス DNA 合成を誘導できる。これに対して、NPC-KT ウイルスは B 細胞トランスフォーム能、細胞溶解能をもち、さらに Raji 細胞に重感染し EA を誘導できる特異なウイルスである⁴⁸⁾⁴⁹⁾。ウイルス DNA の制限酵素地図が作成され、NPC-KT ウイルスは単一のウイルスであり P3HR-1 ウイルスにみられる欠損不均一 DNA (defective heterogeneous DNA) はみられないことが証明された²⁹⁾。このように活性の大きく異なる NPC-KT ウイルスと B95-8 ウイルスの DNA を比較検討すると、B95-8 ウイルス DNA の EcoRI C 断片に 12kb の欠損がみられること⁵⁰⁾以外には大きな相違はみられなかった。今後は、生物学的活性の相違が何に起因するものであるか検討する必要があると思われた。

今回の実験においては、成人末梢血由来リンパ球をトランスフォームする際に免疫抑制剤である CSA を使用した。成人の大部分は抗 EBV 抗体陽性であり、このようなドナーでは T 細胞を除去せずにリンパ球に EBV を感染させても 1～2 週間は EBNA 陽性 B 細胞の増殖がみられるが、その後 EBV 特異的細胞障害性 T 細胞によって B 細胞は破壊され (regression) リンパ芽球様細胞株は樹立化されない⁵¹⁾。これに対して、T 細胞機能を特異的に阻害する CSA と共に培養を行うと regression はおこらないことが報告された⁵²⁾⁵³⁾。今回の感染実験においても効率よくトランスフォーメーションがみられ、CSA の有効性が確認された。

また成人末梢血由来 LCL の EBV DNA 解析において、ウイルス線状 DNA の形成がみられるものがあった。Hurley ら⁵⁴⁾は、EBV 感染 B 細胞では感染後 10～14 日間は線状 DNA がみられるがその後は消失し環状 DNA ののみみられると報告しており、今回の実験において線状 DNA がみられた LCL ではウイルス産生がおこっていることが推測された。しかし、EBV によってトランスフォームした B 細胞内ではウイルス複製は宿主細胞に厳格に制御されているためウイルス産生はほとんどみられず、自然にウイルス産生がみられる頻度は臍帯血では 0～1%、成人末梢血では 0～3%、マーマセットリンパ球では 0～10% である¹²⁾。これに対して、今回成人末梢血由来 LCL の 3 分の 1 近くにウイルス線状 DNA がみられ頻度としてはかな

り高いものであった。これが何に起因するものであるかは不明であるが、*in vivo* では、臓器移植の際の CSA 使用による免疫抑制状態で EBV の活性化がみられること⁵⁹⁾や抗 HIV 抗体陽性者にみられる口腔毛様白斑症において EBV 線状 DNA の形成がみられることから²⁰⁾、CSA による影響も考えられ今後さらに検討する必要があると思われた。

結 論

上咽頭癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株との細胞融合によって樹立化された EBV 産生上皮系細胞株 NPC-KT 細胞、NPC-KT 細胞をサブクローニングして得られた EBV 高産生クローン S61 細胞、および B95-8 ウイルスによってトランスフォームしたヒト B 細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株との細胞融合によって樹立化された EBV 産生上皮系細胞株 A2L/AH 細胞、さらにこれらの細胞から産生された EBV によってトランスフォームしたリンパ芽球様細胞株を用いて、細胞内ウイルス環状および線状 DNA の末端構造を解析し、EBV DNA 複製および EBV 感染に伴う EBV DNA 末端構造の変化について以下の成績を得た。

1. EBV 高産生 S61 細胞では、IUdR 処理によってウイルス産生を誘導すると多核巨細胞および核内封入体が観察されたことから、EBV は他のヘルペスウイルスと同様に上皮系細胞において細胞破壊性に増殖可能であることが示唆された。

2. 各 EBV 産生細胞が保有するウイルス環状 DNA の TR のコピー数は均一であったが、IUdR 処理によって種々のコピー数の TR を有するウイルス線状 DNA の形成がみられ、それぞれの EBV によってトランスフォームした LCL では種々のコピー数の TR を有するウイルス DNA の形成がみられた。

3. EBV 産生細胞内ウイルス環状 DNA とトランスフォームした LCL 内ウイルス DNA の TR のコピー数の相違を検討した結果、ウイルス増殖に伴う上皮系細胞での EBV DNA 複製機構は DNA コンカテマーを複製中間体とするローリングサークルモデルによるものであることが推測された。

4. コスミッドクローン化 DNA によるウイルス DNA の解析結果から、EBV 産生細胞とそのウイルスによってトランスフォームした LCL が保有するウイルス DNA は TR のコピー数を除いて同一であることが証明された。また、NPC-KT 細胞と S61 細胞は同一のウイルス DNA を保有し、A2L/AH 細胞と B95-8 細胞も TR のコピー数を除いて同一のウイル

ス DNA を保有していたが、NPC-KT ウイルス DNA は B95-8 ウイルス DNA とは異なるものであった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師梅田良三教授に衷心より謝意を表するとともに、終始御指導、御助力を賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤 博博士、耳鼻咽喉科学講師滝元 徹博士に深謝致します。また、貴重な御助言を賜りました微生物学教室中村信一教授、がん研病態生理部山本健一教授、ウイルス部田中淳之助教授に感謝致します。さらに、御協力を賜りました耳鼻咽喉科学教室の諸先生方にも感謝致します。

文 献

- 1) Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703 (1964)
- 2) Epstein, M. A. & Achong, B. G.: The relationship of the virus to Burkitt's lymphoma. *In* M. A. Epstein & B. G. Achong (eds.), *The Epstein-Barr Virus*, 1st ed., p321-337, Springer-Verlag, Berlin, 1979.
- 3) Kawamura, A. Jr., Takada, M., Gotoh, A., Hamajima, T., Sanpe, T., Murata, M., Ito, Y., Takahashi, T., Yoshida, T., Hirayama, T., Tu, S., Liu, C., Yang, C. & Wang, C.: Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma by fluorescent antibody techniques with cultured Burkitt lymphoma cell. *Gann*, **61**, 55-71 (1970).
- 4) Zur Hausen, H., Shulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Clifford, P. & Samtessen, L.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, **228**, 1056-1058 (1970).
- 5) Huang, D. P., Ho, J. H. C., Henle, W. & Henle, G.: Demonstration of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. *Int. J. Cancer*, **14**, 580-588 (1974).
- 6) Kintner, C. R. & Sugden, B.: The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell*, **17**, 661-671 (1979).
- 7) Heller, M., Dambaugh, T. & Kieff, E.: Epstein-Barr virus DNA. IX. Variation among viral DNAs from producer and nonproducer infected cells. *J. Virol.*, **38**, 632-648 (1981).

- 8) Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G. W., Kaschka-Dierich, C. & Jehn, U.: Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J. Mol. Biol.*, **102**, 511-530 (1976).
- 9) Kaschka-Dierich, C., Adams, A., Lindahl, T., Bornkamm, G. W., Bjursell, G., Klein, G., Giovanella, B. C. & Singh, S.: Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumour cells in vivo. *Nature*, **260**, 302-306 (1976).
- 10) Given, D., Yee, D., Griem, K. & Kieff, E.: DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.*, **30**, 852-862 (1979).
- 11) Raab-Traub, N. & Flynn, K.: The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*, **47**, 883-889 (1986).
- 12) Kieff, E., Dambaugh, T., Hummel, M. & Heller, M.: Epstein-Barr virus transformation and replication. In G. Klein (ed.), *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, 1st ed., p133-182, Raven Press, New York, 1983.
- 13) Lemon, S. M., Hutt, L. M., Shaw, J. E., Li, J. L. H. & Pagano, J. S.: Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis. *Nature*, **268**, 268-270 (1977).
- 14) Niederman, J. C., Miller, G., Pearson, H. A., Pagano, J. S. & Dowaliby, J. M.: Infectious mononucleosis: Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N. Eng. J. Med.*, **294**, 1355-1359 (1976).
- 15) Wolf, H., Haus, M. & Wilmes, E.: Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J. Virol.*, **51**, 795-798 (1984).
- 16) Takimoto, T., Kamide, M. & Umeda, R.: Establishment of Epstein-Barr virus (EBV)-associated nuclear antigen (EBNA)-positive nasopharyngeal carcinoma hybrid cell line (NPC-KT). *Arch. Otorhinolaryngol.*, **239**, 87-92 (1984).
- 17) Takimoto, T., Furukawa, M., Hatano, M. & Umeda, R.: Epstein-Barr virus nuclear antigen-positive nasopharyngeal hybrid cells. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **93**, 166-169 (1984).
- 18) Reedman, B. M. & Klein, G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, **11**, 499-520 (1973).
- 19) Henle, W., Henle, G., Zajac, B., Pearson, G., Waubke, R. & Scriba, M.: Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science*, **169**, 188-190 (1970).
- 20) 中川俊郎: ヒトリンパ球の調整法. リンパ球機能検索法 (矢田純一, 藤原道夫編), 第1版, 15-24頁, 中外医学社, 東京, 1980.
- 21) Griffin, B. E., Bjorck, E., Bjursell, G. & Lindahl, T.: Sequence complexity of circular Epstein-Barr virus DNA in transformed cells. *J. Virol.*, **40**, 11-19 (1981).
- 22) Southern, E. M.: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 23) Sato, H., Takimoto, T., Hatano, M., Raab-Traub, N. & Pagano, J. S.: Epstein-Barr virus with transforming and early antigen-inducing ability originating from nasopharyngeal carcinoma: Mapping of the viral genome. *J. Gen. Virol.* (in press).
- 24) Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N. & Kieff, E.: Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: Molecular cloning and detailed mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2999-3003 (1980).
- 25) Miller, G., Niederman, J. C. & Andrews, L. L.: Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *N. Eng. J. Med.*, **288**, 229-232 (1973).
- 26) Brichacek, B., Hirsch, I., Sibl, O., Vilikusova, E. & Vonka, V.: Association of some supraglottic laryngeal carcinomas with EB virus. *Int. J. Cancer*, **32**, 193-197 (1983).
- 27) Brichacek, B., Hirsch, I., Sibl, O., Vilikusova, E. & Vonka, V.: Presence of Epstein-Barr virus DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 809-811 (1984).
- 28) Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Petersen, V. & Freese, U. K.: Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "Hairy"

- leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N. Eng. J. Med.*, **313**, 1564-1571 (1985).
- 29) **Grogan, E., Miller, G., Henle, W. & Niederman, J. C.**: Expression of Epstein-Barr viral early antigen in monolayer tissue cultures after transfection with viral DNA and DNA fragments. *J. Virol.*, **40**, 861-869 (1981).
- 30) **Graessmann, A., Wolf, H. & Bornkamm, G. W.**: Expression of Epstein-Barr virus genes in different cell types after microinjection of viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 433-434 (1980).
- 31) **Volsky, D. J., Shapiro, I. M. & Klein, G.**: Transfer of EBV receptors to receptor-negative cells permits virus penetration and antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5433-5457 (1980).
- 32) **Sixbey, J. W., Vesterinen, E. H., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Walton, L. A. & Pagano, J. S.**: Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature*, **306**, 480-483 (1983).
- 33) **Trumper, P. A., Epstein, M. A., Giovanella, B. C. & Finerty, S.**: Isolation of infectious EB virus from the epithelial tumour cells of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, **20**, 655-662 (1977).
- 34) **Takimoto, T., Sato, H., Ogura, H., Miyawaki, T. & Glaser, R.**: Superinfection of epithelial hybrid cells (D98/HR-1, NPC-KT, and A2L/AH) with Epstein-Barr virus and the relationship to the C3d receptor. *Cancer Res.*, **46**, 2541-2544 (1986).
- 35) **Gazzolo, L., de The G., Vuillaume, M. & Ho, H. C.**: Nasopharyngeal carcinoma. II. Ultrastructure of normal mucosa, tumor biopsies, and subsequent epithelial growth in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**, 73-86 (1972).
- 36) 古川 俊: 2, 3 のヒト組織由来培養細胞への EB ウイルスゲノムの移行. 十全医会誌, **84**, 190-210 (1975).
- 37) 滝元 徹: EBV in vitro 感染による上咽頭癌発生機序の実験的研究. 日耳鼻, **82**, 119-135 (1979).
- 38) 森下和男: 上咽頭癌と Epstein-Barr virus (EBV) との病因論的関連性について. 耳鼻臨床, **74**, 2783-2805 (1981).
- 39) **Arnold, A., Cossman, J., Bakhshi, A., Jaffe, E. S., Waldmann, T. A. & Korsmeyer, S. J.**: Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N. Eng. J. Med.*, **309**, 1593-1599 (1983).
- 40) **Waldmann, T. A., Davis, M. M., Bongiovanni, K. F. & Korsmeyer, S. J.**: Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *N. Eng. J. Med.*, **313**, 776-783 (1985).
- 41) **Fialkow, P. J., Klein, E., Klein, G., Clifford, P. & Singh, S.**: Immunoglobulin and glucose-6-phosphate dehydrogenase as markers of cellular origin in Burkitt lymphoma. *J. Exp. Med.*, **138**, 89-102 (1973).
- 42) **Brown, N. A., Liu, C., Wang, Y. & Garcia, C. R.**: B-Cell lymphoproliferation and lymphomagenesis are associated with clonotypic intracellular terminal regions of the Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **62**, 962-969 (1988).
- 43) **Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A. & Weiner, A. M.**: *Molecular Biology of the Gene*, Vol. 1: General Principles, 4th ed., p286-302, Benjamin/Cummings, California, 1987.
- 44) **Roizman, B. & Batterson, W.**: Herpesviruses and their replication. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman & R. E. Shope (eds.), *Virology*, 1st ed., p497-526, Raven Press, New York, 1985.
- 45) **Datta, A. K., Feighny, R. J. & Pagano, J. S.**: Induction of Epstein-Barr virus-associated DNA polymerase by 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5120-5123 (1980).
- 46) **Sixbey, J. W. & Pagano, J. S.**: Epstein-Barr virus transformation of human B lymphocytes despite inhibition of viral polymerase. *J. Virol.*, **53**, 299-301 (1985).
- 47) **Shaw, J. E.**: The circular intracellular form of Epstein-Barr virus DNA is amplified by the virus-associated DNA polymerase. *J. Virol.*, **53**, 1012-1015 (1985).
- 48) **Takimoto, T., Ogura, H., Sato, H., Umeda, R. & Hatano, M.**: Isolation of transforming and early antigen-inducing Epstein-Barr virus from

nasopharyngeal carcinoma hybrid cells (NPC-KT). *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 57-59 (1985).

49) Sato, H., Takimoto, T., Ogura, H., Tanaka, J., Hatano, M. & Glaser, R.: Heterogeneity of Epstein-Barr virus derived from a nasopharyngeal carcinoma that has transforming and lytic properties. *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 1019-1024 (1986).

50) Raab-Traub, N., Dambaugh, T. & Kieff, E.: DNA of Epstein-Barr virus VIII: B95-8, the previous prototype, is an unusual deletion derivative. *Cell*, **22**, 257-267 (1980).

51) Tosato, G.: The Epstein-Barr virus and the immune system. *Adv. Cancer Res.*, **49**, 75-125 (1987).

52) Bird, A. G., McLachlan, S. M. & Britton, S.: Cyclosporin A promotes spontaneous outgrowth in vitro of Epstein-Barr virus-induced B-cell lines. *Nature*, **289**, 300-301 (1981).

53) Rickinson, A. B., Rowe, M., Hart, I. J., Yao, Q. Y., Henderson, L. E., Rabin, H. & Epstein, M. A.: T-cell-mediated regression of "spontaneous" and of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in vitro: Studies with cyclosporin A. *Cell. Immunol.*, **87**, 646-658 (1984).

54) Hurley, E. A. & Thorley-Lawson, D.: Circularization of a single genome is sufficient to establish latent EBV infection. Abstracts of the Papers presented at the 12th International Herpesvirus Workshop, p337, 1987.

55) Cleary, M. L., Dorfman, R. F. & Sklar, J.: Failure in immunological control of the virus infection: Post-transplant lymphomas. *In* M. A. Epstein & B. G. Achong (eds.), *The Epstein-Barr Virus: Recent Advances*, 1st ed., p163-181, William Heinemann Medical Books, London, 1986.

Analysis of the Mechanism of Epstein-Barr Virus (EBV) Genome Replication in Epithelial Cells Saichiro Tanaka, Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, **98**, 139—160 (1989)

Key words EBV, terminal repeat, epithelial cell, DNA replication

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV)-producing epithelial nasopharyngeal carcinoma (NPC) hybrid cell line, NPC-KT, had been established by the fusion of primary NPC cells with the epithelial cell line derived from human adenoid tissue (Ad-AH). The S61 cell line is a subclone derived from NPC-KT cells, which has a higher EBV-producing ability compared with parental NPC-KT cells. The EBV-producing epithelial hybrid cell line, A2L/AH, had been established by the fusion of lymphoblastoid cell line transformed by EBV derived from B95-8 cells and Ad-AH cells. S61 cells exhibited cytopathic changes characteristic of herpes virus replication comprising the formations of multinucleated giant cells and inclusions, when EBV replication was induced by 5-iododeoxyuridine (IUdR). These findings indicated that lytical virus replication occurred in S61 cells unlike in B cells. In order to examine the mechanism of EBV genome replication in epithelial cells in the process of virus production, the terminal structure of EBV genome was analyzed by Southern blot analysis in these EBV-producing epithelial cell lines. The copy numbers of terminal repeat (TR) in viral circular genomes were homogeneous in each cell line. However, viral linear DNAs with heterogeneous copy numbers of TR were synthesized when viral DNA synthesis was induced by IUdR. Viral DNAs in lymphoblastoid cell lines transformed by EBV from these cell lines had heterogeneous copy numbers of TR.

The detailed analysis of copy numbers of TR in viral DNAs in EBV-producing cells and transformed lymphoblastoid cell lines suggested that EBV-linear DNA would be synthesized by virus-associated DNA polymerase through viral DNA concatemer as replicative intermediate by rolling circle mechanism. It was confirmed by Southern blot analysis with recombinant DNA probes covering whole EBV genome except for terminal fragments that EBV DNAs from virus-producing cell lines were identical except for terminal structures with those from lymphoblastoid cells transformed by EBV from each cell line. Viral DNA from NPC-KT cells was identical with that from S61 cells. The viral DNAs from B95-8 and A2L/AH cells were undistinguishable. However, they were different from those from NPC-KT and S61 cells.