2 種類の上咽頭癌モデル細胞 (NPC-KT, A2L/AH) の EBV DNA 解析

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 梅田良三教授)

滝 元 徹, 宮 崎 為 夫, 岩 脇 淳 一, 石 川 滋
田 中 佐一良, 桝 田 耕, 吉 崎 智 一

ANALYSIS OF THE DNAs OF EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV)
DERIVED FROM TWO EBV GENOME-POSITIVE EPITHELIAL/HYBRID
CELL LINES (NPC-KT AND A2L/AH)

TORU TAKIMOTO, M.D., TAMEO MIYAZAKI, M.D., JUNICHI IWAWAKI, M.D.,
SHIGERU ISHIKAWA, M.D., SAICHIROH TANAKA, M.D., KOH MASUDA, M.D.,
and TOMOKAZU YOSHIKAWA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa

The authors recently reported the establishment of two Epstein-Barr virus (EBV)-producing epithelial/hybrid cell lines (A2L/AH and NPC-KT), A2L/AH cells were derived from the fusion of epithelial cell line (Ad-AH) with non-producer EBV genome-positive lymphoblastoid cells transformed with the B95-8 strain of EBV. NPC-KT cells were derived from the fusion of Ad-AH cells with primary nasopharyngeal carcinoma cells. In this study, viral DNAs derived from A2L/AH and NPC-KT cells were analyzed in comparison with viral DNA derived from B95-8 cells by use of the restriction endonuclease EcoRI and Hind III and separation of fragments in 0.4 % agarose. The digestion fragments of these two viral DNAs were obviously similar, but could be distinguished each other. The molecular weight of DNA of virus from NPC-KT cells was approximately 181 K base pairs (Kb), which was 12 Kb larger than that of B95-8 virus DNA.

Key words : NPC-KT, A2L/AH, Epstein-Barr virus, DNA

A90-1177-51360

緒 言

ヘルペスウイルス群に属する Epstein-Barr virus (EBV) は頭頸部領域の悪性腫瘍の 1 つである上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma ; NPC) の発生に密接な関連性を有していることが知られている¹⁾。現在知られている EBV の主なる生物学的活性はヒト B リンパ球を容易にトランスフォームする能力である²⁾。唯一の例外としてバーキットリンパ腫由来 P3HR-1 細胞から産生する EBV があり、このウイルスはトランスフォーミング能を欠いているが、逆に他の EBV 株と違って EBV

持続感染 Raji 細胞に重感染し EBV 早期抗原 (early antigen ; EA) を誘導する能力を有している³⁾。

NPC に関して、その癌細胞由来 EBV ゲノム保有上皮系細胞株を樹立化することはこれまで多くの研究者の努力にもかかわらず成功せず、その癌細胞由来の EBV の生物学的特徴に関する研究は進んでいないのが現状であった。以前、我々は上咽頭癌のモデル細胞を作るべく、ヒトアデノイド由来上皮系細胞株 (Ad-AH) とトランスフォーム能を有する伝染性単核症由来 EBV (マーモセット由来 B95-8 細胞由来 EBV) 感染ヒトアデノ

イド由来リンパ球 (A2L) との細胞融合により, EBV ゲノム保有上皮系雑種細胞 (A2L/AH) の樹立化に成功した⁴⁾. この細胞は親株である B95-8 細胞由来 EBV と同様, トランスフォーミング能を有する EBV 産生可能であることを最近報告した⁵⁾. また, 我々は上咽頭癌初代培養細胞と Ad-AH 細胞との細胞融合により EBV ゲノム株保有上皮系細胞株 (NPC-KT) を樹立化することに成功した⁶⁾. かかる NPC-KT 細胞は A2L/AH 細胞と同様 EBV 産生が可能であるが, その後の詳細なるこのウイルスの生物学的活性の検討により, このウイルスは A2L/AH ウイルスと異なっており, トランスフォーミング能のみならず, EA 誘導能, 及び細胞溶解活性能の 3 つの能力を有しており, 従来の伝染性単核症, バーキットリンパ腫由来の EBV と異なった性質を有していることがわかってきた^{7,8,9)}.

本研究では, この 2 種類の NPC モデル細胞から産生する EBV の DNA をサザンブロットング法を用いて解析を行ったのでここに報告する.

材料および方法

I. 使用細胞と培養条件

B95-8 細胞⁹⁾ は 10% 牛胎児血清加 RPMI1640 培養液 (RF-10) を用い, 37°C で増殖させた. A2L/AH⁴⁾ と NPC-KT 細胞⁶⁾ は 10% 牛胎児血清加 minimum essential medium 培養液 (EF-10) を用い, 37°C で増殖させた.

II. ウイルスの分離

B95-8 ウイルスは RF-10 培地に B95-8 細胞を 37°C, 7 日間培養し, その培養液を集めた. A2L/AH と NPC-KT ウイルスは 5-iododeoxyuridine (IUDR) を 60 µg/ml 含む EF-10 培地でさらに 37°C, 7 日間培養して培養液を集めた. その各上清を孔径 0.45 µm のメンブランフィルターを用いて濾過後, タイプ 21 ローターで 25000 ×g, 2 時間超遠心し, その沈査を培養液の 100 分の 1 量の RPMI1640 に浮遊, 調整を行った.

III. ウイルス遺伝子 DNA の解析

ウイルス遺伝子 DNA の解析はサザンブロットング法にて行った¹⁰⁾. 濃縮 B95-8, A2L/AH 及び NPC-KT ウイルスをさらに 10% から 30% デキストランを用いた密度勾配遠心法により SW55Ti ローターで 76000 ×g, 1 時間超遠心後, ウイルスのバンドをパスツールピペットで吸引することにより精製した. 精製ウイルスを 100 µg/ml のプロテナーゼ K, 0.5% サルコシルを含む 200 mM EDTA (pH 7.4) 中で 50°C, 5 時間消化後, フェノール抽出を 2 回行い, ウイルス DNA を得た. つい

で 0.1 µg のウイルス DNA を 20 単位の DNA 制限酵素 EcoRI と Hind III でそれぞれ 37°C, 2 時間消化後, 0.4 % アガロースゲルにて各々電気泳動を行った. このゲルを 0.6 M NaCl を含む 0.2 N NaOH で 30 分処理後, 0.6 M NaCl を含む 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で中和した. その後, ウイルス DNA をニトロセルロース膜に移し, 80°C, 5 時間熱処理後, ³²P 標識 NPC-KT ウイルス DNA と 65°C, 14 時間ハイブリダイズさせ, オートラジオグラフィーにて検出した. プローブは 0.1 µg の NPC-KT ウイルス DNA を 100 µCi の ³²P-dCTP を用いたニックトランスレーションにより標識したものを利用した.

結 果

図 1 は B95-8, A2L/AH, NPC-KT ウイルス DNA を制限酵素 EcoRI と Hind III での切断パターンを示している. なお B95-8 ウイルス DNA の制限酵素 EcoRI と Hind III での切断による切片の記号ならびに分子量は Given と Kieff の方法¹¹⁾ に従って決定し, NPC-KT と A2L/AH ウイルス DNA の 2 つの制限酵素切断による断片は彼らの方法に準じて決定した. その結果, B95-8 と A2L/AH ウイルス DNA では 2 つの制限酵素切断パターンともウイルス間の相違はみられなかった.

一方 NPC-KT と B95-8 (または A2L/AH) ウイルス DNA は A2L/AH ウイルス DNA と非常に類似したパターンを示した. しかし, 2 つの制限酵素による切断とも両ウイルス間にいくつかの相違がみられた. すなわち, EcoRI の切断により生じた NPC-KT C フラグメントは B95-8C フラグメントより 12 キロ塩基対 (K base pair; Kb) 長く, E フラグメントは, 0.5 Kb 短く, また, B95-8 ウイルスの H フラグメントに対応するバンドは NPC-KT ウイルスでは 2 本みられた.

Hind III による切断では A フラグメントにおいて NPC-KT ウイルス DNA は B95-8 ウイルス DNA より 7.2 Kb 短かった. D フラグメントでは, NPC-KT ウイルス DNA は 2 つに分かれ, L フラグメントは NPC-KT ウイルス DNA は B95-8 ウイルス DNA より 0.2 Kb 短かった.

なお, NPC-KT ウイルス DNA の全塩基対は, B95-8 ウイルス DNA の 169 Kb に対して 181 Kb であった.

考 察

以前の研究において, すでに B95-8 と P3HR-1 ウイルス遺伝子 DNA の制限酵素を用いた解析がなされてい

図1 NPC-KT, A2L/AH, B95-8 EBV DNA
のサザンブロッティング法による解析
N: NPC-KT EBV DNA A: A₂L/AH
EBV DNA
B: B95-8 EBV DNA

る¹²⁾。この2つのウイルスDNAの主な特徴としては、B95-8ウイルスDNAでは、1.2Kbの欠損があることであり、P3HR-1ウイルスDNAではheterogeneous DNA (het DNA) が存在し、このhet DNAが、Raji細胞への重感染によるEA発現誘導に密接な関連性を有しているのではないかと報告がなされてきている¹³⁾。

本研究において、我々の教室で樹立化に成功した2つのEBV DNA保有上皮細胞の1つであるA₂L/AH細胞から産生するEBV DNAとB95-8ウイルスDNAは2つの制限酵素を用いた解析において一致した。A₂L/AH細胞はB95-8ウイルスによるトランスフォームしたリンパ芽球様細胞(A2L)とAd-AH細胞との細胞融合により作られた細胞であり⁴⁾、A₂L/AHウイルスDNAとB95-8ウイルスDNAが一致するのは当然の結果であった。一方、NPC-KTウイルスDNAとB95-

8ウイルスDNAの制限酵素を用いたウイルスDNA遺伝子の解析においては一部に違いがみられ、NPC-KTウイルスDNAはB95-8ウイルスDNAより12Kb長かった。しかし、この相異にいかなる意義があるかは現在のところ明らかではない。この問題に関して、このNPC-KTウイルスのDNAのクローニングを現在行っており、さらに検討中である。

ところで、NPC-KTウイルスDNAの2つの制限酵素を用いた解析により、P3HR-1ウイルスDNAと異なりhet DNAの存在は否定できた。以前、我々はNPC-KTウイルスが、その生物学的活性においてトランスフォーミング能のみならずP3HR-1ウイルスと同様EA誘導能を有する新種のEBV株であることを報告した⁷⁾⁸⁾⁹⁾。しかも、このウイルスDNAはP₃HR-1ウイルスと異なりhet DNAが存在しないにもかかわらず、EA誘導が可能である。このことは、NPC-KTウイルスはP₃HR-1ウイルスと異なったEA誘導のメカニズムが働いている可能性を示唆している。

最後に、これまで我々はNPCのモデル細胞としてNPC-KTとA₂L/AH細胞を樹立化に成功したが、A₂L/AH細胞と違ってNPC-KT細胞はNPC細胞由来の細胞であり、しかもそのウイルスの生物学的活性ならびにウイルス遺伝子DNAが従来報告されているEBVと異なっていた。これはEBVとNPCの関連性をさらに追求するにあたってNPC-KT細胞は非常に有用なNPCモデル細胞であると考えられた。

ま と め

我々の教室で樹立化に成功した2種類のNPCモデル細胞(A₂L/AH, NPC-KT)から産出するEBVのDNAをサザンブロッティング法を用いて解析した。

1. A₂L/AH EBV DNAの2つの制限酵素(EcoRI, Hind III)を用いたDNA解析パターンは伝染性単核症由来B95-8EBV DNAと完全に一致したのに対し、NPC-KT EBV DNAでは、いずれの制限酵素による切断においても一部に違いがみられた。

2. NPC-KT EBV DNAは181Kbの分子量を有し、A₂L/AH EBV DNAと比較して12Kb長く、het DNAを含まなかった。

参 考 文 献

- 1) Takimoto T et al: Nasopharyngeal carcinoma in Japan. Clinical evaluation of EBV serology and EBV-associated nuclear antigens test. ANL

- (Tokyo) 9 : 151-163, 1982.
- 2) Miller G et al : Difference between strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 4006-4010, 1974.
 - 3) Henle W et al : Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* 169 : 188-190, 1970.
 - 4) Takimoto T et al : Epstein-Barr virus nuclear antigen-positive nasopharyngeal hybrid cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93 : 166-169, 1984.
 - 5) Takimoto T et al : Rescue of a biologically active Epstein-Barr virus (EBV) from nonproducer cells. *Cancer Res* 46 : 2085-2087, 1986.
 - 6) Takimoto T et al : Establishment of Epstein-Barr virus (EBV)-associated nuclear antigen (EBNA)-positive nasopharyngeal carcinoma hybrid cell line (NPC-KT). *Arch Otorhinolaryngol* 239 : 87-92, 1984.
 - 7) Takimoto T et al : A new strain of Epstein-Barr virus derived from nasopharyngeal carcinoma hybrid cells. *Gann* 75 : 947-949, 1984.
 - 8) Takimoto T et al : 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.
 - 9) Sato H et al : Heterogeneity of Epstein-Barr virus derived from a nasopharyngeal carcinoma which has transforming and lytic properties. *J Natl Cancer Inst* 76 : 1019-1024, 1986.
 - 10) Southern EM : Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 : 503-517, 1975.
 - 11) Given D et al : DNA of Epstein-Barr virus. IV. Linkage map of restriction enzyme fragments of the B95-8 and W91 strains of Epstein-Barr virus. *J Virol* 28 : 524-542, 1978.
 - 12) Bornkamm GW et al : Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *J Virol* 35 : 603-618, 1980.
 - 13) Miller G et al : Epstein-Barr Virus with heterogeneous DNA disrupt latency. *J Virol* 50 : 174-182, 1984.
-
- 本論文の要旨の一部は、第10回日本頭頸部学会において発表した。稿を終えるに際し、共同研究者として佐藤博博士(金沢大ガン研ウイルス部)と Glaser 教授(オハイオ州立大学)並びに御校閲をいただいた梅田教授に深謝致します。
-

(原稿受付 昭和61.9.13日)

別刷請求先 〒920 金沢市宝町13-1

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 滝元 徹