

Thesis

各種Epstein-Barr virus 関連Bリンパ芽球様細胞株の比較解析

埼玉医科大学小児科学教室
(指導：佐々木 望教授)

益田 倫夫

Molecular-Biological Analysis of Various Epstein-Barr Virus Related B Lymphoblastoid Cell Lines. A Comparative Study with Burkitt Lymphoma Cell Lines

Tomoo Masuda (Department of Pediatrics, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan, National Defense Medical College, Department of Forensic Science, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan)

To clarify the mechanism of malignant transformation associated with Epstein-Barr virus (EBV) infection, we established EBV related B lymphoblastoid cell lines that transformed spontaneously during long term culture of peripheral blood lymphocytes obtained from patients with infectious mononucleosis (spontaneous-BLCLs). The characteristics of spontaneous-BLCLs which were subcultured for more than ten years were compared with those of Burkitt lymphoma cell lines (BL-CLs). In this study, spontaneous-BLCLs and BL-CLs were examined by expression of p53 and sequence of *p53 mRNA*, determination of telomere length and telomerase activity, and comprehensive analysis of mRNA by the differential display method. The results showed that, (1) there were mixed cell population with or without *p53 mRNA* mutation in spontaneous-BLCLs, while there were only one type of cells with *p53 mRNA* mutation in BL-CLs. (2) Immortalization of spontaneous-BLCLs and BL-CLs was not associated with telomere length and telomerase activity. However, there was correlation between telomerase activity and the logarithm of telomere length in spontaneous-BLCLs and BL-CLs ($r = -0.85$). (3) There were 45 genes related to the oncogenes and the cell cycle regulatory genes which were analyzed by differential display method. In the 45 genes, genes expressed only in BL-CLs were *Ras*, *Raf*, *RCK/p54* etc, and the genes expressed only in spontaneous-BLCLs were *MM-1*, *XP-G*, *p58/HHR23B* etc, and the genes expressed in both BL-CLs and spontaneous-BLCLs were *HDM-2*, activators of RB pathway, etc. Mutant-p53 was only detected in part in immortalized spontaneous-BLCLs, while it was detected in all cell population of BL-CLs with immortalization and malignant transformation. Different oncogenes were expressed between insufficiently tumorigenic spontaneous-BLCLs and sufficiently tumorigenic BL-CLs. With above mentioned finding, we concluded that the expression of mutant-p53 has no role in immortalization of spontaneous-BLCLs, on the other hands, the activation of Rb pathway has major role in immortalization of spontaneous-BLCLs. Suppression of *MM-1* and *Xp* gene and/or activation of mutant-p53 and *Ras/Raf* were probably required in malignant transformation of spontaneous-BLCLs.

Keywords: Epstein-Barr virus, B lymphoblastoid cell lines, p53, telomerase, Rb pathway

第1章 緒言

Epstein-Barr virus (EBV)¹⁾ が関与する疾患は、infectious mononucleosis (IM) 等の良性疾患から、Burkitt lymphoma (BL), nasopharyngeal carcinoma

医学博士 乙第947号 平成16年6月25日 (埼玉医科大学)
現 防衛医科大学校法医学講座

等の悪性疾患まで多彩な臨床像を呈することが知られている。しかしEBVがこれら多彩な臨床像を惹き起こす機序については、不明な点が多く未だ解明されていない。そこで我々はEBV関連疾患の癌化機構を解明するために、そのin vitroモデルとして、良性疾患であるIM患児の末梢血リンパ球より spontaneous に transform したEBV関連Bリンパ

芽球様細胞株 (IM由来spontaneous-BLCL) を樹立した後10年間以上継代して、その性状をBurkittリンパ腫由来細胞株 (BL-CL) と比較検討してきた²⁾。その結果、spontaneous-BLCLは、t (1; 16) やt (2; 12) 等の染色体構造異常や数値異常を持ち^{2,3)}、p53蛋白⁴⁾や*c-myc*遺伝子⁵⁾を発現し、EBV-DNAの染色体内への組み込みを認め⁶⁾、ヌードマウスへの腫瘍復元実験において腫瘍形成能を確認した²⁾。しかしIM由来spontaneous-BLCLにおけるこれら性状はBL-CLの性状に近いものであるにもかかわらず、BL及びBL-CL特有の(8q24)を含む染色体異常を認めなかった²⁾。またIM由来spontaneous-BLCLは、EBNA1~6及びLMP1等のEBV関連蛋白、及びbcl-2蛋白の発現からimmunoblastic sarcoma型のpost transplant lymphoproliferative disorder (PT-LPD) に近い性状を示した³⁾。これらの結果よりIM由来spontaneous-BLCLは不死化を獲得したが癌化を完全には獲得するには至っていない前癌状態の性状を持つ細胞株であると考え、IM由来spontaneous-BLCLが、不死化を獲得しながらも癌化獲得能においてBL及びBL-CLの性状と差異を認めている機序についてmRNAレベルでの解析を行うことを計画した。すなわち

- 1) 細胞周期制御に関与する*p53*遺伝子のmRNAレベルでの解析。
- 2) 不死化獲得に必要と考えられているtelomerase activity及びtelomere lengthの解析。
- 3) 異なる細胞間のmRNAの発現量の差異を検出するDifferential Display (DD) 法⁷⁾を用いた各種Bリンパ芽球様細胞株 (BLCL) の解析。

以上3項目について検討し、その結果よりEBV関連疾患の不死化・癌化機構におけるkey geneを推定し、不死化および癌化を獲得した機序を明らかにしようと試みた。

第2章 対象及び方法

第1節 IM由来spontaneous-BLCLの樹立と継代方法

IM患児の末梢血にFicoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals) 液を等量重層し1500回転、30分間遠心分離し単核細胞を採取した。採取した単核細胞を $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ cell/mlに調整し、20%馬血清 (GIBCO), 10^{-4} M 2-mercaptoethanol (GIBCO), $50 \mu\text{g/ml}$ penicillin, $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, $10^{-4} \sim 10^{-7}$ M hydrocortisoneを含んだ10ml RPMI1640培地で 37°C 5% CO_2 /95% air下にて培養を開始した。培地は週に1回培養液の50%を交換し継代している (2004年現在で13年間継代中)。またBL-CLもIM由来spontaneous-BLCLと同様の培養法にて継代している。

第2節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLからのcDNA作成方法

IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLをpH7.4

Phosphate buffer saline (PBS) 溶液で3回洗浄した後、細胞数を 1×10^6 cell/mlに調整した。調整した細胞からacid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法を利用したISOGEN (ニッポンジーン) にてtotal RNAを抽出した後、RQ1 DNase (Promega) にて混入したDNAを除去し精製した。精製したtotal RNAに対して、Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) を用いたオリゴ (dT) プライマーによる逆転写反応にて、各細胞株細胞からのcDNAを作成した。

第3節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLを対象とした*p53*タンパク質の検出方法

IM由来spontaneous-BLCL 5株 (Table 1) 及びBL-CL 1株 (Raji cell line) を免疫組織化学染色 (labeled streptavidin-biotin) 法により*p53*タンパク質を検出した。抗*p53*抗体 (DAKO, DO-7抗体) を1次抗体とし、ビオチン化2次抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させDAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) で発色した。なお核染色はヘマトキシリンで行った。

Table 1. Characteristics of spontaneous-BLCLs

Sample number	Established date	Subculturing period
1	1990. 6. 6	13 y
2	1992. 11. 5	11 y
3	1990. 8. 29	13 y
4	1993. 3. 13	10 y
5	1992. 11. 5	11 y

(As of 2003.10.1)

第4節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLを対象とした*p53*遺伝子のmRNA塩基置換・欠失の解析方法

抗*p53*抗体陽性IM由来spontaneous-BLCL 5株 (Table 1) 及びBL-CL 1株 (Raji cell line) のcDNAをtemplateとし、Forward primer 5'-TTTCCACG-ACGGTGACACGC-3', reverse primer 5'-GACGCACACCTATTGCA AGCA-3'を用いて*p53* mRNA領域をPCR法 (denature 95°C 15s, annealing 60°C 1min, extension 72°C 1min, 40 cycles) にて増幅した。増幅したPCR産物をdye-terminator法を用いたBigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) にてdirect sequencingを行い、ABI PRISM 377XL シーケンサーの自動解析にて塩基の欠失、置換部位を検索した。

第5節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLを対象としたtelomerase activity, telomere lengthの解析方法⁸⁾

IM由来spontaneous-BLCL 5株 (Table 1) 及びBL-CL 1株 (Raji cell line) のtelomerase activityをtelomeric repeat amplification protocol (TRAP) 法⁹⁾に

よる TeloTAGGG telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics) を用いて測定した. すなわち, 各細胞株細胞を 300 cell に調整したチューブ内で TRAP 反応を行い, ビオチン化 PCR 産物を生成した. 生成した PCR 産物を digoxigenin (DIG) 標識 telomere repeat probe と hybridization した後, ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレートに固相化した. 検出は peroxidase 標識抗 DIG 抗体で行い, 発色後マイクロプレートリーダーで測定した. 解析方法はキット内 control template により検出された telomerase activity を基準値とした半定量法 (relative telomerase activities: RTA) で行った. また上記株の telomere length は, Non RI assay を用いた TeloTAGGG telomere length assay (Roche Diagnostics) を用いて測定した. すなわち, 各細胞株細胞から DNA を抽出し 1 μ g に調整した後, 制限酵素 *Hinf I*, *Rsa I* で断片化し (terminal restriction fragment: TRF), southern blot を行った. blot した断片化 DNA を DIG 標識 telomere repeat probe と hybridization した後, alkaline phosphatase (AP) 標識抗 DIG 抗体と結合させ, AP 高感度発光基質である CDP-Star (Tropix Inc.) で可視化しフィルムに感光し検出した. 解析方法は感光したフィルムをデンストメーターでスキャンした後, 発光部位 (TRF) サイズと発光量の積算から発光部位の平均サイズを計算しその値を telomere length とした.

第6節 DD法を用いたIM由来spontaneous-BLCL, BL-CL及び末梢血CD20陽性細胞mRNAの種類・量的差異の検出方法

DD法は異なる細胞間の mRNA の発現量の差異を検出する方法で, mRNA を下流プライマーとなるオリゴ (dT) プライマーで逆転写反応後, 種々のランダムな配列からなる上流プライマーと組み合わせて PCR 法にて増幅し, ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりバンドを検出し, そのバンドパターンの差異から比較解析を行うものである. 今回は, 第2節に従い spontaneous-BLCL, BL-CL 及びコントロールとして末梢血 CD20 陽性細胞の total RNA を抽出・精製し, Fluorescence Differential Display Kit (TaKaRa) を用いて DD 法を行った. すなわち, 各試料の total RNA 量を 300ng に調整した後, 9 種類の蛍光 Downstream primer (Table 2) を用いて逆転写反応を行った. 生成した 9 種類の cDNA を template として, 24 種類の Upstream primer (Table 2) と逆転写反応で使った 9 種類の蛍光 Downstream primer を組み合わせて PCR 法 (denature 94°C 30s, annealing 38°C 2 min, extension 72°C 1 min, 34 cycles) にて増幅し, 合計で 216 種類の PCR 産物を生成した. その後 PCR 産物に熱変性を加え一本鎖とし, 7M 尿素含有 4.5% ポリアクリルアミドゲルにて 40W 90 分間電気泳動を行い, FluorImager (Amersham Biosciences) を用いて検出し, 各試料間の泳動パターンの差異について比較検討した (Fig. 1).

Table 2. Sequences of primers used by differential display method

	No.	sequence	No.	sequence
Upstream primers	1	5'GATCATAGCC	13	5'TGGATTGGTC
	2	5'CTGCTTGATG	14	5'GGAACCAATC
	3	5'GATCCAGTAC	15	5'GATCAATCGC
	4	5'GATCGCATTG	16	5'TCGGTCATAG
	5	5'CTTGATTGCC	17	5'GATCTGACTG
	6	5'AGGTGACCGT	18	5'TCGATACAGG
	7	5'GATCATGGTC	19	5'TACAACGAGG
	8	5'TTTTGGCTCC	20	5'GATCAAGTCC
	9	5'GTTTTCGCAG	21	5'GATCTCAGAC
	10	5'GTTGCGATCC	22	5'AGCCAGCGAA
	11	5'GATCTGACAC	23	5'CAAACGTCGG
	12	5'CTGATCCATG	24	5'CTTCTACCC
	No.	sequence n=13-16		
Downstream primers	1	5'Fluorescein labeled-TnAA		
	2	5'Fluorescein labeled-TnAC		
	3	5'Fluorescein labeled-TnAG		
	4	5'Fluorescein labeled-TnCA		
	5	5'Fluorescein labeled-TnCC		
	6	5'Fluorescein labeled-TnCG		
	7	5'Fluorescein labeled-TnGA		
	8	5'Fluorescein labeled-TnGC		
	9	5'Fluorescein labeled-TnGG		

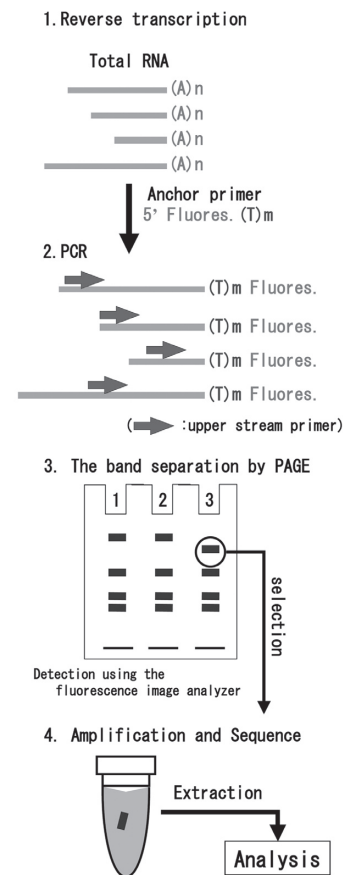


Fig. 1. The differential display method.

第7節 DD法においてIM由来spontaneous-BLCL, BL-CL及び末梢血CD20陽性細胞に差異が認められたmRNAの同定

第5節において差異が認められた各試料のバンドをポリアクリルアミドより切り出し、熱抽出を行った。抽出した溶液をtemplateとして再度同じprimerでPCR法 (denature 94°C 30 s, annealing 38°C 2 min, extension 72°C 1 min, 15 cycles) による増幅を行い、1 U/ml H.A.-Yellow (TaKaRa) 添加 3% NuSieve 3:1 (TaKaRa) アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、FluorImager (Amersham Biosciences) にて検出し、再度差異が認められたバンド部分を切り出し、Freeze'N Squeeze スピンカラム (BIO-RAD) でPCR産物を回収した。回収したPCR産物を上記の Upstream primer・Downstream primer (Table 2) にアンカーを付した新しいprimer (Cloning-Sequencing Primer Set for FDD: TaKaRa) で再度PCR法 (denature 94°C 30 s, annealing 60°C 30 s, extension 72°C 30 s, 40 cycles) による増幅を行い、1 U/ml H.A.-Red (TaKaRa) 添加 3% NuSieve 3:1 (TaKaRa) アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後エチジウムブロマイド染色を行い、バンド部分を切り出しFreeze'N Squeeze スピンカラム (BIO-RAD) でPCR産物を回収した。回収したPCR産物をアンカー部位に相当するprimer (Cloning-Sequencing Primer Set for FDD: TaKaRa) を用いた BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) による direct sequencingを行い、ABI PRISM 377XL シーケンサーの自動解析にて塩基配列を決定した。塩基配列が決定したPCR産物を遺伝子データベース Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) から検索し、各試料間で差異が認められたmRNAの同定を行った。

第3章 結 果

第1節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLのp53検出とp53 mRNA塩基配列結果

IM由来spontaneous-BLCLは5株とも抗p53抗体陽性細胞を含んでいたが (Fig. 2), mRNAにおいて塩基置換を認めたのが2株のみで、他の3株にはmRNA塩基配列に異常を認めなかった。この2株の変異部位は、1株が codon 134 TTTがTAA, codon140ACCがACGに (Fig. 3), もう1株がcodon 278 CCTがCTTに変異していた。またこの2株について、更に3年継代した後、再度抗p53抗体による免疫組織化学染色とmRNA塩基配列を解析したところ、2株とも抗p53抗体陽性細胞を認めたが、mRNA塩基配列には異常を認めず (Fig. 3), 上記変異部位は正常塩基配列に復していた。またBL-CLでは、codon 213 CGAがCAAに変異しており (Fig. 4)¹⁰⁾, 更に3年継代した後も同様の塩基置換を認めた。

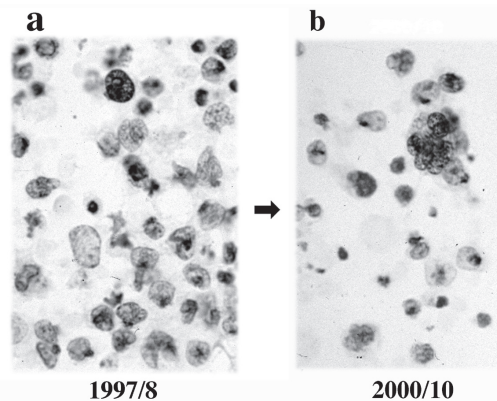


Fig. 2. Immunohistochemical stains of spontaneous-BLCL with anti-p53 antibody. (a) This immunohistochemical stain was carried out in 1997/8. (b) This figure is an immunohistochemical stains carried out in 2000/10 after subculturing the spontaneous-BLCL for three years. There are almost no differences between both immunohistochemical stains.

第2節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLのtelomerase activity, telomere lengthの測定結果

IM由来spontaneous-BLCL 5株とBL-CL1株のRTA及びtelomere lengthの測定結果をTable 3及びFig. 5に示した。また各細胞株のRTAとtelomere lengthとの相関関係を検討するために、RTAとlog (telomere length) の散布図をFig. 6に示した。上記結果からRTAとlog (telomere length) の相関係数は $r = -0.85$ で負の相関を認めた (有意水準5%)。

第3節 IM由来spontaneous-BLCL, BL-CL及び末梢血CD20陽性細胞において差異を認めたmRNAの同定

Fig. 7に Upstream primer 24種類, Downstream primer 9種類より生成された216種類のPCR産物ポリアクリルアミドゲル電気泳動像の一部 (3種類のPCR産物の電気泳動像) を示した。BL-CL, IM由来spontaneous-BLCL, 末梢血CD20陽性細胞間で肉眼的に差異を認めたバンド (Fig. 7 Arrow) は1263部位認めた。その部位をポリアクリルアミドゲルより切り出し精製分離することにより1407種のフラグメントを検出した。この1407フラグメントのうち、ダイレクト・シーケンシング法で塩基配列解析できなかったフラグメントが492種、塩基配列解析後、遺伝子データベース (BLAST) 検索で同一遺伝子もしくは同一遺伝子の一部であることを確認したフラグメントが511種、BLAST検索で遺伝子同定できなかったフラグメントが57種あり、最終的に遺伝子同定ができたフラグメントは347種であった。この347種のフラグメントのうち、発現は確認されているが機能的に未知な遺伝子が84種あり、機能が解明されている遺伝子が263種であった。またこの347種のフラグメントを関連する遺伝子群ごとに分類すると、癌化・細

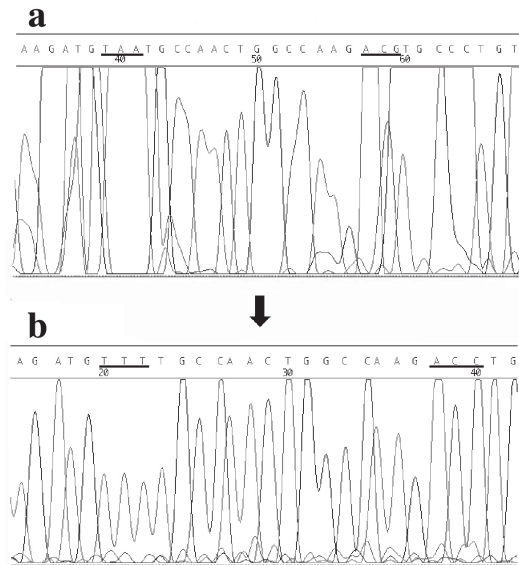


Fig. 3. Sequence analysis of *p53* mRNA in spontaneous-BLCL determined by immunohistochemical method. (a) This sequence data was carried out in 1997/8. Underlines indicate *p53* mRNA point mutation (codon134 TTT→TAA, codon140 ACC→ACG). (b) This figure is a sequence data carried out in 2000/10 after subculturing the spontaneous-BLCL for three years. Underlines indicate *p53* mRNA mutation replaced into wild-type (codon134 TAA→TTT, codon140 ACG→ACC).

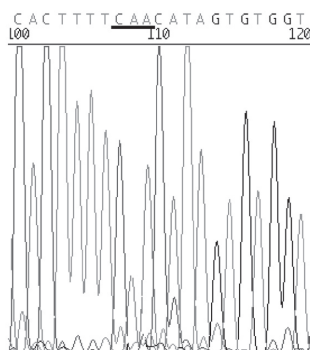


Fig. 4. Sequence analysis of *p53* mRNA in BL-CL. Underline indicates *p53* mRNA point mutation (codon213 CGA→CAA). This mutation is the same as the mutation reported by Edward RH.

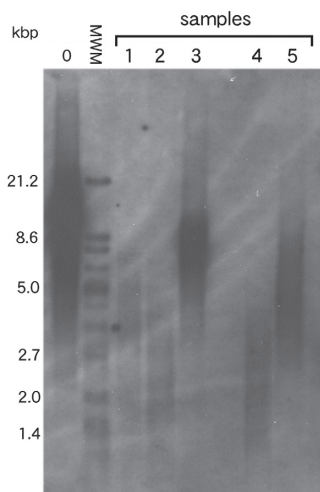


Fig. 5. The chemiluminescent detections of terminal restriction fragment (TRF) in spontaneous-BLCLs. Lane 0; positive control, lane 1-5; spontaneous-BLCLs. The mean TRF length is defined as the telomere length. Each spontaneous-BLCLs had different telomere length.

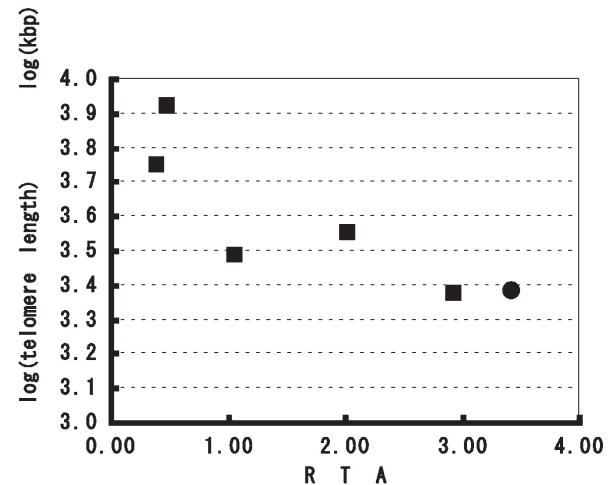


Fig. 6. Correlation between relative the telomerase activity (RTA) and the logarithm of telomere length in various BLCLs. Square indicates spontaneous-BLCLs data. Circle indicates BL-CL data. The correlation coefficient was $r = -0.85$.

Table 3. RTA and telomere length of various BLCLs. RTA ; relative telomerase activities

Samples number	RTA	Telomere length
1	2.02	3612 kbp
2	1.05	3078 kbp
3	0.48	8440 kbp
4	2.92	2384 kbp
5	0.39	5682 kbp
BL-CL	3.42	2415 kbp

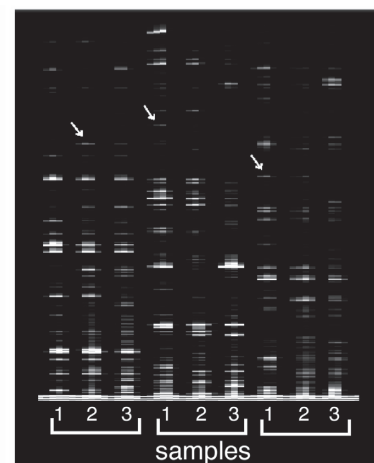


Fig. 7. A polyacrylamide gel electropherogram of spontaneous-BLCL products by the differential display (DD) method. This figure is a part of results that analyzed various BLCLs by DD method. Lane 1: BL-CL, lane 2: spontaneous-BLCL, lane 3: CD20 positive mononuclear leukocyte. The arrows indicate bands that had differential bands between various BLCLs and that were separated by polyacrylamide gel.

胞周期関連遺伝子が97種、蛋白転写合成関連遺伝子が86種、各種酵素関連遺伝子が41種、リボゾーム関連遺伝子が13種、ミトコンドリア関連遺伝子(DNAを含む)が47種、EBV関連遺伝子が8種類、Bリンパ球以外のリンパ球関連遺伝子が18種、DNAの一部と考えられる遺伝子が7種、その他の遺伝子が30種であった(Table 4)。次に発現を認めた細胞株と機能が解明されている遺伝子263種との関連をTable 5に示した。このうち癌化・細胞周期関連遺伝子は、BL-CLのみに発現している遺伝子が14種、IM由来spontaneous-BLCLのみに発現している遺伝子が7種、BL-CLとIM由来spontaneous-BLCLのみが発現している遺伝子が18種、IM由来spontaneous-BLCLとCD20陽性リンパ球のみが発現している遺伝子が6種であった(Table 6)。

第4章 考 察

第1節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLのp53 mRNA塩基配列について

p53は、cyclin-dependent kinase inhibitorであるp21を誘導することによりRbのリン酸化を阻害し細胞をG1期に停止させるとともに^{11, 12)}、セリン46のリン酸化によりアポトーシス誘導遺伝子を活性化させる¹³⁾。このため、p53遺伝子の変異・欠失による細胞制御機構の破綻は、細胞の癌化機構に重要と考えられており、実際各種悪性疾患において最も多く発現しているタンパク質である¹⁴⁾。このp53遺伝子異常はBL-CLについても報告されており^{10, 15)}、このことから我々はBL-CLに性状が近く、かつ抗p53抗体陽性細胞であるIM由来spontaneous-BLCLにおいても同様のp53遺伝子異常が存在すると考え報告した⁶⁾。この報告では、抗p53抗体免疫染色像において抗p53抗体陽性細胞と抗p53抗体陰性細胞が混在するpolyclonalであること(Fig. 2 Left)、p53遺伝子変異がheterogeneousであることから(Fig. 3 Upper)、IM由来spontaneous-BLCLはp53遺伝子が正常から異常へと変化している途中であり、不死化細胞から癌化細胞への移行段階であると結論づけた⁶⁾。しかしその後、経時的にIM由来spontaneous-BLCLの抗p53抗体免疫染色像を観察し続けたところ抗p53抗体陽性細胞の割合が増加することなく、またBL-CLの抗p53抗体陽性細胞像(Fig. 8)のように核全体に均一な染色像を呈する細胞も少数であった(Fig. 2 Right)。このことから我々はIM由来spontaneous-BLCLが不死化細胞のまま癌化細胞に移行せず継代を続けている可能性を考え、報告したIM由来spontaneous-BLCLを更に3年間継代した後p53遺伝子塩基配列を検索した。その結果、報告した箇所の塩基配列変異は正常に復しており(Fig. 3 Lower)、また他の箇所で新たに塩基配列変異をheterogeneousに認めたが、更に6ヶ月継

代した後では正常に復していた。p53は遺伝子の損傷をトリガーとしてその修復とアポトーシスに参与しているが、p53が自らの遺伝子損傷に対してその修復とアポトーシスを引き起こしたという報告例は我々が調べた限り認めていない。一方、本検討のようなheterogeneousな遺伝子群の塩基配列変異の決定に蛍光によるdirect sequencing法を用いた場合、全体の割合に比して極めて少ないtemplate量の遺伝子群の変異を隠してしまうことが知られている。本検討において、変異を認めた塩基配列がすべてheterogeneousであったこと、継代ごとに塩基配列の変化を認めたこと、IM由来spontaneous-BLCLがpolyclonalな細胞株であることから、我々はp53遺伝子異常を持つ細胞株群とp53遺伝子異常を持たない細胞株群の割合が継代ごとに変化しtemplate量の差がp53塩基配列の変異に影響をもたらしたと考えた。また通常免疫染色法では検出されない野生型p53が、細胞ストレス時には安定して存在し検出されることが知られている^{16, 17)}。今回IM由来spontaneous-BLCLに複数の抗p53抗体免疫染色像を認めたことは変異型p53と野生型p53を同時に検出した可能性が考えられた。このことはspontaneous-BLCLがp53遺伝子異常の有無にかかわらず継代し続けられるという可能性を示唆しており、p53遺伝子異常以外にも他のcell cycle acceleratorsの関与により不死化を獲得することが可能であると考えた。さらにEBV関連悪性疾患やBL-CLにおいてp53遺伝子異常が報告されていることは¹⁴⁾、EBV関連BLCLの癌化機構にはp53遺伝子異常の関与を必要とすると考えた。

第2節 IM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLのtelomerase activity, telomere lengthについて

細胞の寿命は分裂回数が有限であることに起因し¹⁸⁾、その回数を決定しているのがtelomere lengthの短縮である¹⁹⁾。よって無限増殖能を有する不死化・癌化細胞においてtelomeraseの発現は必要であると言える²⁰⁾。実際、不死化した培養細胞(株化細胞)は十分なtelomerase activityを有しており、telomere lengthが安定化している²¹⁾。しかし多くの癌細胞と異なり²²⁾株化細胞は、様々な長さのtelomere lengthで安定化しており、それはM1期のtelomere lengthを無視しcrisisが起こるといわれているM2期の2 kbp前後から、正常細胞が有するtelomere lengthをはるかに越えた20 kbp以上まで存在している²¹⁾。そこで我々は、10年以上継代し続けたIM由来spontaneous-BLCL及びBL-CLのtelomere lengthとtelomerase activityが如何なる状態で安定化しているのかを検討した。その結果、IM由来spontaneous-BLCLはおおよそ2.3 kbpから8.5 kbpと比較的に短く、また予想に反してrelative telomerase activity (RTA) は、telomere lengthが短い細胞株ほど活性が高かった(Table 3)。またtelomerase activity

Table 4. 347 fragments which were able to analyze sequence

	known-function gene	unkown-function gene	total
Oncogene / cell cycle regulatory gene	45	52	97
Protein transcription/synthesis gene	54	32	86
Enzyme related gene	41	0	41
Ribosomal RNA	13	0	13
Mitochondrial gene	47	0	47
EBV-related gene	8	0	8
Lymphocyte(except for B cell) related gene	18	0	18
DNA	7	0	7
etc.	30	0	30
total	263	84	347

Table 5. The classification of 263 fragments analyzed as known-function gene. (+/- +/ - +/-) ; (BL-CL spontaneous-BLCL CD20-positive-leukocyte)

Detection of mRNA of various BLCLs	(+ - -)	(- + -)	(- - +)	(+ + -)	(+ - +)	(- + +)	total
Oncogene/cell cycle regulatory gene	14	7	0	18	0	6	45
Protein transcription/synthesis gene	9	15	2	28	0	0	54
Enzyme related gene	12	11	1	14	0	3	41
Ribosomal RNA	3	4	0	6	0	0	13
Mitochondrial gene	11	12	0	16	2	6	47
EBV related gene	1	2	0	5	0	0	8
Lymphocyte(except for B cell) related gene	0	0	18	0	0	0	18
DNA	2	1	0	4	0	0	7
etc.	0	0	22	0	1	7	30
total	52	52	43	91	3	22	263

Table 6. The identifications of the oncogene and the cell cycle regulatory gene with different expression among various BLCLs

BL-CL (+), spontaneous-BLCL (-), CD20 (-)	BL-CL (+), spontaneous-BLCL (+), CD20 (-)
<i>CD74</i>	<i>BAP37</i> (prohibitone)
<i>HEM-1</i> (hematopoietic protein 1)	<i>c-myc</i>
<i>histone acetyltransferase 1</i>	<i>Dp-2</i> (E2F dimerization partner2)
<i>Jaw1</i> (lymphoid-restricted membrane protein)	<i>D-prohibitin</i>
<i>lipocortin 1</i>	<i>E2F</i>
<i>MLTK-alpha</i> (MAPKKK)	<i>EEA1</i> (early endosome antigen)
<i>NF-kappa B</i>	<i>Fte1</i> (ribosomal protein S3a)
<i>CDR2</i> (paraneoplastic antigen)	<i>HDM2</i> (p53 binding protein)
<i>PP1</i> (protein phosphatase 1)	<i>IKK</i> (I-kappa-B kinase)
<i>PRMT5</i> (methyltransferase type2)	<i>inosine triphosphate pyrophosphatase</i>
<i>Raf</i>	<i>MAGE</i> (melanoma antigen)
<i>Ras</i>	<i>MLL3</i> (mixed-lineage leukemia 3)
<i>RCK/ p54</i> (c-myc activator)	<i>MUC4</i> (mucin4)
<i>ribosomal protein S2</i>	<i>p53</i>
	<i>ribosomal protein S6</i>
	<i>TAB3</i> (TAK1-binding protein 3)
	<i>transferrin receptor</i> (CD71)
	<i>UBA2</i> (ubiquitin association 2)
BL-CL(-), spontaneous-BLCL(+), CD20(-)	BL-CL(-), spontaneous-BLCL(+), CD20(+)
<i>BAG-1</i> (Bcl-2-binding protein)	<i>ataxin-2</i>
<i>ERCC5</i> (XP-G)	<i>Int-6</i> (translation initiation factor eIF3 p48 subunit)
<i>FLI-1</i> (friend leukemia virus integration 1)	<i>receptor-interacting protein</i>
<i>MM-1</i> (c-myc binding protein)	<i>Nap2</i> (nucleosome assembly protein 2)
<i>p58/HHR23B</i> (factor of stabilizing XP-C)	<i>TLK1</i> (tousled-like kinase 1)
<i>RBPI</i> (RB-binding protein)	<i>zinc finger protein (a part of WTI ?)</i>
<i>syntaxin binding protein 2</i>	

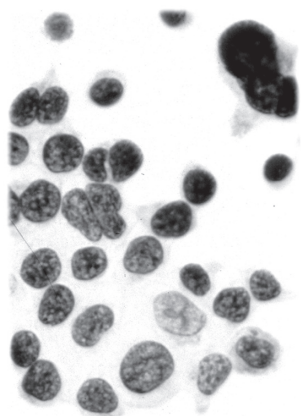


Fig. 8. Immunohistochemical stains of BL-CL with anti-p53 antibody. Unlike spontaneous-BLCL, most cells of BL-CL had a core of homogeneous positive stain.

と telomere length の関係を見るために RTA と log (telomere length) のグラフをプロットすると相関係数が $r = -0.85$ と負の相関を認めた (Fig. 6). 通常, 株化細胞の telomere length は transform した時点を反映していると言われており, その制御は telomeric repeat binding factor (TRF) 1, 2 が行っている^{23, 24}. また株化細胞の telomerase はこの telomere length を維持するためにだけ発現しており, telomerase activity の強弱が telomere length のサイズに影響しないと考えられている²⁴. しかしこれら株化細胞, 特に EBV 関連 BLCL において, 本検討に用いた IM 由来 spontaneous-BLCL のように 10 年以上安定して継代してきた細胞での報告は皆無であり⁸, crisis までの期間が長い培養細胞を検討した結果である可能性は否定できない. 今回の結果において IM 由来 spontaneous-BLCL の RTA と log (telomere length) に相関が認められたことは, 少なくとも EBV 関連 BLCL において, 最も安定した telomere length を維持するために最も安定した telomerase activity 値が存在し, その値は at random でなく間接的にでも telomere length もしくは TRF1, 2 の影響下にあると考えた. また RTA と telomere length が直接ではなく対数を介することにより相関する機序については報告例もなく不明であるが, 一つの仮説として telomere length の計測に発光量の積算平均を使用したことが関与するのではないかと考えた. 次に IM 由来 spontaneous-BLCL と telomerase activity との関係であるが, IM 由来 spontaneous-BLCL telomerase activity は RTA の最低値が 0.39, 最高値 2.92 と IM 由来 spontaneous-BLCL 間で約 7.5 倍の差があり, IM 由来 spontaneous-BLCL ごとに大きく異なるという結果を得た. 不死化細胞の telomere length は telomerase が発現した時点での telomere length を反映しており, telomerase activity はその telomere length を維持する

のに必要な活性値のみを持つという報告⁸があるが, この報告は各 IM 由来 spontaneous-BLCL ごとに異なる telomere length と telomerase activity を持つという本結果を支持するものであった. しかし一方, EBV により transform した細胞株の telomerase activity は不死化前では低く不死化後は高い活性を維持するという報告^{25, 26}もあり, 本結果とは異なっていた. 我々はこの報告と本結果との異なりは 2 つの要素, すなわち in vivo で直接 EBV に感染させて樹立した BLCL と in vitro でマーマセト由来 B95-8 細胞上清中 EBV に感染させて樹立した BLCL²⁷ (EBV-infected BLCL) の性状の違いと, 不死化の定義の違いにより生じたと考えた. 実際数年継代してもある日突然増殖が止まることが多い EBV-infected BLCL の性状や EBV-infected BLCL を数年間継代もしくは 160 PDL 以上から不死化細胞と定義している点は, 10 年以上安定して継代してきた IM 由来 spontaneous-BLCL の性状とは異なると考えられ, その性状の違いの一つに telomerase activity があると推察した. 今後, 現在継代している EBV-infected BLCL が IM 由来 spontaneous-BLCL と同様 10 年以上安定して継代が可能になった時点で再度追試を行いたいと考えている. 上記結果より我々は IM 由来 spontaneous-BLCL の telomere length と telomerase activity は, 互いに相関関係を持ちながら, その BLCL が最も安定する telomere length を維持していると考えた.

第3節 IM 由来 spontaneous-BLCL, BL-CL 及び末梢血 CD20 陽性細胞の発現遺伝子の差異について

IM 由来 spontaneous-BLCL は, *c-myc* 癌遺伝子や *bcl-2* アポトーシス抑制タンパク質を発現しているが³, 第1節で考察したように *p53* 癌抑制遺伝子はほぼ正常に機能していた. 通常 *p53* 遺伝子異常は不死化・癌化機構の key gene であり, IM 由来 spontaneous-BLCL が不死化を獲得していることから, *p53* 関連遺伝子もしくは他のアポトーシス抑制機構・細胞増殖機構が発現しているはずであると考えた. また最近の遺伝子解析から癌関連遺伝子の多くが転写調節因子であることが判り, それぞれの因子がカスケードのようにコネクションを形成していることから癌化機構を解明するためには包括的に発現遺伝子を解析する必要があると考えた. そこで我々は DD 法を用いて IM 由来 spontaneous-BLCL, BL-CL, control (末梢血 CD20 陽性細胞) の遺伝子発現の差異をすべて同定することを計画した. その結果 1407 種のフラグメントを分離したが, 解析可能なフラグメントは 347 種であり, 残りの 1060 種は単離不能なフラグメント, 同一遺伝子, PCR error 等であった. このうち単離不能なフラグメントについてはサブクローニングによる解析を計画中である. さて同定が可能だった 347 種のフラグメントのうち癌化・細胞周期関連遺伝子は 97 種で, このうち 52 種が novel gene として 2004.1.31 現

在報告されているものであった。これら novel gene の報告例のうち、24種が neuroblastoma より解析された遺伝子であり、続いて ovarian carcinoma, Wilms tumor, lymphoma の順であった。また novel gene 以外の機能的に既知な45種の遺伝子は、BL-CLに発現を認めIM由来spontaneous-BLCL・controlに発現を認めなかった群が14種、IM由来spontaneous-BLCLに発現を認めBL-CL・controlに発現を認めなかった群が7種、BL-CL・IM由来spontaneous-BLCLに発現を認めcontrolに発現を認めなかった群が17種、IM由来spontaneous-BLCL・controlに発現を認めBL-CLに発現を認めなかった群が6種であった (Table 6)。それぞれの群について以下のように検討した。

1) BL-CLに発現を認めIM由来spontaneous-BLCL・controlに発現を認めなかった群

BL-CLにのみ発現を認めた遺伝子群のうち非常に特徴的なのは、c-myc 関連 accelerator が多かったことである。RCK/P54はc-mycの転写開始因子であり²⁸⁾、Ras, Raf, MLTK- α ²⁹⁾の発現は古典的MAPKカスケードの活性状態が高いことを意味し、そして histone acetyltransferase1は転写のコアアクチベーターを介したヒストンのアセチル化を促進し転写オン状態を恒常化させることにより、c-mycの転写活性・増殖を助長していた。また抗アポトーシス関連遺伝子では、TNFで誘導されるアポトーシスを抑制する lipocortin 1³⁰⁾、EBV LMP1によって活性化を受ける NF- κ B³¹⁾の発現を認めた。その他にも、変位型p53に関連して過剰発現を認める ribosomal protein S2³²⁾、tumor antigen としての paraneoplastic antigen、造血系調節因子 HEM-1³³⁾、リンパ系細胞株調節因子 Jaw1³⁴⁾、EBV関連細胞表面抗原 CD74^{35, 36)}が発現していた。しかし転写抑制因子である PRMT5³⁷⁾、脱リン酸酵素である PPIも発現しており、細胞増殖の負の制御も関与していると考えられた。

2) IM由来spontaneous-BLCLに発現を認めBL-CL・controlに発現を認めなかった群

IM由来spontaneous-BLCLにのみ発現を認めた遺伝子群のうち非常に興味深いのは、c-myc抑制タンパク質である MM-1³⁸⁾が発現していたことである。このことはc-mycの転写活性・増殖を助長させる遺伝子を多く発現していたBL-CLとは大きく異なる点で、EBV関連BLCLの癌化機構にc-mycの発現が重要であるという我々の仮説³⁾を支持するものとなった。また ERCC5³⁹⁾と p58/hHR23B⁴⁰⁾という除去修復遺伝子が発現していることも特徴的で、BL-CLと異なりIM由来spontaneous-BLCLはDNA損傷の自己修復機構により癌化を防いでいる可能性が考えられた。その他にも、Ewing sarcoma由来の癌抑制遺伝子と考えられている FLI-1⁴¹⁾、Rb転写活性調整因子 RBPI^{42, 43)}、PI3Kリン脂質によるタンパク質活性制御因子と考えられている syntaxin binding protein 2⁴⁴⁾が発現し、自己修復機構に

対応して転写を制御していると考えた。一方アポトーシスに対しては、bcl-2を介した抗アポトーシス作用を持つ BAG-1⁴⁵⁾の発現を認め、野生型p53を持つIM由来spontaneous-BLCLのアポトーシスへの移行を阻止していると考えた。

3) BL-CL・IM由来spontaneous-BLCLに発現を認めcontrolに発現を認めなかった群

BL-CLとIM由来spontaneous-BLCLに発現を認めcontrolに発現を認めなかった遺伝子群の特徴は、Rb経路のS期転写因子である E2F, Dp-2の過剰発現を認めたことからRb増殖抑制機構の破綻が想定できること、p53経路の HDM2⁴⁶⁾の過剰発現を認めたことからG1期チェックポイント機構・アポトーシス誘導機構の破綻が想定できること、c-mycの過剰発現を認めたことから転写活性が亢進し自律的増殖が可能であることであった。また癌関連遺伝子では、proto-oncoprotein である MLL3⁴⁷⁾、ribosomal protein S6⁴⁸⁾、v-fos transformation effector gene である FTE1⁴⁹⁾、lymphoma 関連表面抗原である CD71⁵⁰⁾、tumor antigen ではあるが lymphoma との関係性が薄い MAGE⁵¹⁾、MUC4⁵²⁾の発現を認め、抗アポトーシス関連遺伝子では NF- κ B 活性タンパク質である I κ -B κ , TAB3⁵³⁾の発現を認めた。しかし細胞増殖を負に制御する因子も発現しており、E2Fの転写活性を不活化しアポトーシスへ誘導する prohibitin⁵⁴⁾、BAP37(prohibitone)⁵⁵⁾、ユビキチン関連タンパク質である UBA2⁵⁶⁾、リン脂質によるタンパク質活性制御因子である EEA1⁵⁷⁾、ITPA⁵⁸⁾を認めた。

4) IM由来spontaneous-BLCL・controlに発現を認めBL-CLに発現を認めなかった群

IM由来spontaneous-BLCLとcontrolに発現を認めBL-CLに発現を認めなかった遺伝子群で非常に興味深いことは、S期に活性を持ちDNA損傷により急速に活性を失う TLK1^{59, 60)}がIM由来spontaneous-BLCLとcontrolで発現していることである。つまり TLK1を発現していないBL-CLはDNA損傷を有しており、またIM由来spontaneous-BLCLに TLK1が発現しておりその発現がcontrolの発現と差異がなかったことは、DNA損傷がBL-CLに比べて軽微もしくは皆無であることを示しており、IM由来spontaneous-BLCLがDNA自己修復機構を有することを支持するものであった。またその他の遺伝子群はすべて細胞増殖を負に制御する因子であり、癌抑制遺伝子の WT1, INT-6⁶¹⁾、アポトーシス誘導因子 ataxin-2⁶²⁾、receptor-interacting protein⁶³⁾、ヒストンシャペロンである NAP2⁶⁴⁾が発現していた。

田矢らによるとヒト細胞の癌化はRb経路とp53経路の変化により起こると報告している⁶⁵⁾。RB経路のうちRB, p16はそれぞれ約25%、約50%のヒト癌で失活しており、いずれの失活も認めないヒト癌ではサイクリンDが過剰発現してE2F発現による転写活性を促進

している。またp53経路のうち変異型p53がヒト癌の約50%に認められ、変異型p53を認めないヒト癌ではMDM2の過剰発現やATMの失活を認め、抗アポトーシスとして作用している。本結果において、BL-CLと同様IM由来spontaneous-BLCLに*E2F*と*MDM2*の過剰発現を認めたことは、IM由来spontaneous-BLCLが癌化に十分な条件を持っていることが示唆できた。しかし不死化細胞を癌化させるのに必要であると報告されている*Ras*⁶⁶⁻⁶⁸がIM由来spontaneous-BLCLに認めなかったことは、IM由来spontaneous-BLCLが癌化しない原因の一端を担っていると考えた。またEBV関連の癌化機構に必要とされる*c-myc*⁶⁹がBL-CLとIM由来spontaneous-BLCLに発現を認めたが、それと同時にBL-CLでは*c-myc*転写開始因子*RCK/P54*を認め、IM由来spontaneous-BLCLでは*c-myc* binding proteinである*MM1*の発現を認めた。この結果は、BLとEBV関連細胞株とにおいて*c-myc*の発現量が異なるという報告⁷⁰を支持するものであり、少なくとも*MM1*の発現量が少ないBL-CLよりIM由来spontaneous-BLCLの方が*c-myc*の作用は弱く癌化へ移行し難いと考えた。次にIM由来spontaneous-BLCLにのみ認めたユニークな遺伝子としてDNA修復機能を呈するXP関連遺伝子が発現していた結果であるが、EBV関連細胞株においてXP関連遺伝子との関係を報告した例はなかった。しかしIM由来spontaneous-BLCLとBL-CLの発現量に差を認めたことは自己修復による癌化抑制の関与が考えられ、今後XP関連遺伝子についてIM由来spontaneous-BLCLとBL-CLを中心に検討をする予定である。

以上の結果から我々はBLCLの不死化・癌化について以下のように考えた (Fig. 9, 10)。

- 1) IM由来spontaneous-BLCLの不死化にはRb経路の転写活性の亢進が必要である。
- 2) IM由来spontaneous-BLCLには自己修復遺伝子が発現しており癌化抑制に関与している。
- 3) IM由来spontaneous-BLCLの癌化には、*MM1*の発現抑制、変異型p53の発現、*Ras*, *Raf*の発現を同時に (いずれかが) 認めることが必要である。

第5章 結 論

- 1) IM由来spontaneous-BLCL *p53*遺伝子の欠失・変異はIM由来spontaneous-BLCLの不死化に影響を及ぼさない。
- 2) IM由来spontaneous-BLCLのtelomere lengthとtelomerase activityは、互いに相関関係を持ちながら、そのBLCLが最も安定するtelomere lengthを維持している。
- 3) IM由来spontaneous-BLCLの不死化にはRb経路の転写活性の亢進が必要であり、また癌化には*MM1*の発現抑制、*Xp gene*の発現抑制、変異型p53の発現、

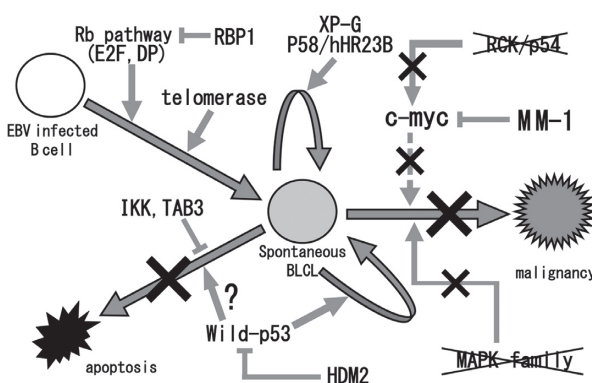


Fig. 9. A presumptive model of transformation of spontaneous-BLCL. We suppose that expression of transcriptional activation of the Rb pathway and telomerase activity were associated with the immortalization of spontaneous-BLCL, and that expression of *MM-1* (*c-myc* suppressor gene), *P58/hHR23B* and *XP-G* (nucleotide excision repair gene), wild type *p53* are associated with the suppression of oncogenicity of spontaneous-BLCL.

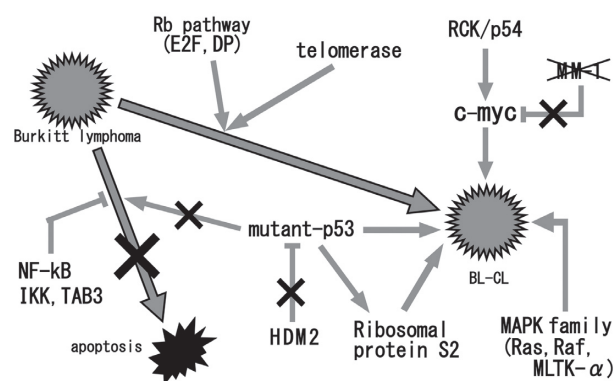


Fig. 10. A presumptive model of malignant transformation of BL-CL. We suppose that expressions of mutant type *p53*, *c-myc* and *MAPK* family (transcriptional activator gene) are associated with the malignant transformation of BL-CL.

Ras and/or *Raf*の発現を同時にもしくはいずれかを認めることが必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました埼玉医科大学小児科学教室 佐々木望教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、EBVの不思議な能力を教示して下さった防衛医科大学校関根勇夫病院長、本研究に多大な支援をして頂いた防衛医科大学校法医学講座 向田政博教授、松崎雄三助手に深謝いたします。また各種EBV関連細胞株の培養・継代を行い続けて頂いた防衛医科大学校小児科学講座 田中真樹子技官、川瀬博子技官に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;15:702-3.
- 2) Sekine I. Characteristics of EBNA positive B lymphoblastoid cell line (BLCL): A comparative study of spontaneously transformed BLCL and EBV-infected BLCL. *Dokkyo J Med Sci* 1985;12:43-65.
- 3) 関根勇夫. Burkittリンパ腫, EBV関連悪性リンパ腫とEBウイルス. *日児誌*1999;103:627-30.
- 4) 益田倫夫, 関根勇夫, 広井禎之, 吉岡重威, 鳥潟親雄. Epstein-Barrウイルス関連Bリンパ芽球様細胞株におけるp53遺伝子の解析. *日児誌* 1997;101:1651-9.
- 5) 関根勇夫. Epstein BarrウイルスによるB-リンパ芽球様細胞の癌化機構の解明. 第3回川野小児医学助成研究報告集 1993;1-10.
- 6) 益田倫夫, 関根勇夫, 広井禎之, 冠木智之, 竹下誠一郎, 子川和宏, 他. EB virus関連Bリンパ芽球様細胞株 (BLCL) の性状 - 第8報 - Fluorescent in situ hybridizationを用いての検討 -. *小児がん* 1994;31:94-7.
- 7) Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-71.
- 8) 井出利憲, 檜山英三, 檜山桂子. *がんとテロメア・テロメラーゼ*. 東京: 南山堂; 1999.
- 9) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.
- 10) Edwards RH, Raab-Traub N. Alterations of the p53 gene in Epstein-Barr virus-associated immunodeficiency-related lymphomas. *J Virol* 1994; 68:1309-15.
- 11) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
- 12) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
- 13) Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53 *Cell* 2000; 102:849-62.
- 14) Beroulet C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat* 2003;21:176-81.
- 15) Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutation in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5413-7.
- 16) Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 function as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 2000;14: 278-88.
- 17) Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 2000; 14:289-300.
- 18) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Cell Res* 1961;25:585-621.
- 19) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts *Nature* 1990;345:458-60.
- 20) Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:90-2.
- 21) Counter CM, Botelho FM, Wang P, Harley CB, Bacchetti S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 1994;68:3410-4.
- 22) Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*1997;33:787-91.
- 23) van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997;385:740-3.
- 24) van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998;92:401-3.
- 25) Toda T, Sugimoto M, Omori A, Matsuzaki T, Furuichi Y, Kimura N. Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis* 2000;21:1814-22.
- 26) Takahashi T, Kawabe T, Okazaki Y, Itoh C, Noda K, Tajima M et al. In vitro establishment of tumorigenic human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus DNA *Cell Biol* 2003;22:727-35.
- 27) Miller G, Lipman M. Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 1973;138:1398-412.
- 28) Akao Y, Yoshida H, Matsumoto K, Matsui T, Hogetu K, Tanaka N, et al. A tumour-associated

- DEAD-box protein, rck/p54 exhibits RNA unwinding activity toward c-myc RNAs in vitro. *Genes Cells* 2003;8:671-6.
- 29) Gotoh I, Adachi M, Nishida E. Identification and characterization of a novel MAP kinase kinase, MLTK. *J Biol Chem* 2001;276:4276-86.
 - 30) Wu YL, Jiang XR, Lillington DM, Newland AC, Kelsey SM. Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Br J Haematol* 2000;111:807-16.
 - 31) Luftig M, Yasui T, Soni V, Kang MS, Jacobson N, Cahir-McFarland E, et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:141-6.
 - 32) Loging WT, Reisman D. Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:1011-6.
 - 33) Hromas R, Collins S, Raskind W, Deavean L, Kaushansky K. Hem-1, a potential membrane protein, with expression restricted to blood cells *Biochim Biophys Acta* 1991;1090:241-4.
 - 34) Behrens TW, Jagadeesh J, Scherle P, Kearns G, Yewdell J, Staudt LM. Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 1994;153:682-90.
 - 35) Marti GE, Zenger V, Brown M, Marti DM, Melo JV, Crescenzi M, et al. Antigenic expression of B-cell chronic lymphocytic leukemic cell lines. *Leuk lymphoma* 1992;7:497-504.
 - 36) Trivedi P, Takazawa K, Zompetta C, Cuomo L, Anastasiadou E, Carbone A, et al. Infection of HHV-8+ primary effusion lymphoma cells with a recombinant Epstein-Barr virus leads to restricted EBV latency, altered phenotype, and increased tumorigenicity without affecting TCL1 expression. *Blood* 2004;103:313-6.
 - 37) Fabbri E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee JH, et al. Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep* 2002;3:641-5.
 - 38) Mori K, Maeda Y, Kitaura H, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. MM-1, a novel c-Myc-associating protein that represses transcriptional activity of c-Myc. *J Biol Chem* 1998;273:29794-800.
 - 39) Mudgett JS, MacInnes MA. Isolation of the functional human excision repair gene ERCC5 by intercosmid recombination. *Genomics* 1990;8:623-3.
 - 40) Sugawara K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 1998;2:223-32.
 - 41) Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, et al. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999;23:222-7.
 - 42) Lai A, Marcellus RC, Corbeil HB, Branton PE. RBP1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription. *Oncogene*. 1999;18:2091-100.
 - 43) Lai A, Lee JM, Yang WM, DeCaprio JA, Kaelin WG Jr, Seto E, et al. RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:6632-41.
 - 44) Ziegler SF, Mortrud MT, Swartz AR, Baker E, Sutherland GR, Burmeister M, et al. Molecular characterization of a nonneuronal human UNC18 homolog. *Genomics* 1996;37:19-23.
 - 45) Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, et al. Cloning and functional analysis of BAG1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995;80:279-84.
 - 46) Lane DP, Hall PA. MDM2-arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem Sci* 1997;22:372-4.
 - 47) Ruault M, Brun ME, Ventura M, Roizes G, De Sario A. MLL3, a new human member of the TRX/MLL gene family, maps to 7q36, a chromosome region frequently deleted in myeloid leukaemia. *Gene* 2002;284:73-81.
 - 48) Hoyer KK, French SW, Turner DE, Nguyen MT, Renard M, Malone CS, et al. Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14392-7.
 - 49) Kho CJ, Wang Y, Zarbl H. Effect of decreased fte-1 gene expression on protein synthesis, cell growth, and transformation. *Cell Growth Differ* 1996;7:1157-66.
 - 50) Dolcetti R, Quaia M, Gloghini A, De Re V, Zancai P, Carlati R, et al. Biologically relevant phenotypic changes and enhanced growth properties induced in B lymphocytes by an EBV strain derived from a histologically aggressive Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1999;80:240-9.
 - 51) van der Bruggen, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on

- a human melanoma. *Science* 1991;254:1643-7.
- 52) Choudhury A, Moniaux N, Ulrich AB, Schmied BM, Standop J, Pour PM, et al. MUC4 mucin expression in human pancreatic tumours is affected by organ environment: the possible role of TGF β 2. *Br J Cancer* 2004;90:657-64.
- 53) Jin G, Klika A, Callahan M, Faga B, Danzig J, Jiang Z, et al. Identification of a human NF- κ B-activating protein, TAB3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2028-33.
- 54) Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, Chellappan SP. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:459-66.
- 55) Coates PJ, Jamieson DJ, Smart K, Prescott AR, Hall PA. The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* 1997;7:607-10.
- 56) Azuma Y, Tan SH, Cavenagh MM, Ainsztein AM, Saitoh H, Dasso M. Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *FASEB J* 2001;15:1825-7.
- 57) Kutateladze T, Overduin M. Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science* 2001;291:1793-6.
- 58) Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J Biol Chem* 2001;276:18695-701.
- 59) Groth A, Lukas J, Nigg EA, Sillje HH, Wernstedt C, Bartek J, et al. Human Tosl-like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J* 2003;22:1676-87.
- 60) Krause DR, Jonnalagadda JC, Gatei MH, Sillje HH, Zhou BB, Nigg EA, et al. Suppression of Tosl-like kinase activity after DNA damage or replication block requires ATM, NBS1 and Chk1. *Oncogene* 2003;22:5927-37.
- 61) Hoareau Alves K, Bochard V, Rety S, Jalinot P. Association of the mammalian proto-oncoprotein Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome. *FEBS Lett* 2002;527:15-21.
- 62) Wiedemeyer R, Westermann F, Wittke I, Nowock J, Schwab M. Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2003;22:401-11.
- 63) Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1403-8.
- 64) Rodriguez P, Munroe D, Prawitt D, Chu LL, Bric E, Kim J, et al. Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics* 1997;44:253-65.