

ヒトアデノウイルス12型誘発腫瘍における E1領域遺伝子の組み込みと発現

香川医科大学病理学講座第一病理学 (指導: 大森正樹教授)

森 川 智 子

(平成元年12月6日受稿)

Key words: ヒトアデノウイルス12型, E1領域
C3Hf/OK マウス, ウィルス発癌

結 言

ヒトアデノウイルス12型 (Ad12)¹⁾ は強発癌性の DNA ウィルスで, 新生ハムスターに高率に腫瘍を誘発し, また他のげっ歯類に対しても造腫瘍能を持っている^{2,3)}. 発癌遺伝子の局在部位はウィルス左端部1.3~11.2マップ単位に位置する E1 領域であり, Ad12誘発腫瘍あるいはトランスフォーム細胞では宿主細胞 DNA 中に少なくとも E1 領域遺伝子が組み込まれている^{2,3)}. 本実験では, Ad12を C3Hf/OK⁴⁾ マウス新生仔に接種して得られた腫瘍 IC 株, D 株における E1 領域遺伝子の組み込みと発現について Southern, Northern 及び in situ hybridization 法により検討した.

材料および方法

腫瘍組織

C3Hf/OK マウス新生仔の脳内及び皮下に Ad12 (Huie 株)¹⁾ を接種して得られた腫瘍を同系のマウスの皮下に継代維持している IC 株 (143代), D 株 (416代)⁵⁾ を用いた. 対照として C3Hf/OK マウスに自然発生した肝癌を同系に継代維持している P 株 (196代)⁵⁾ 及び同系成熟マウス肝組織を用いた.

DNA probe の作成

Ad12の E1 領域に対する probe は, 成書の方法^{6,7)} を一部変更し, がん研究振興財団 (JCRB) より入手した plasmid gARC⁸⁾ より作成した. Plasmid を含む E. coli は HE 培地

(yeast extract 10g, KH₂PO₄ 34g, KOH 8.4 g, glucose 10g/l) で培養した. CsCl による超遠心により分離した plasmid DNA を EcoRI, BamHI (TOYOBO) にて切断後0.9% agarose gel で泳動し, E1 領域を含む DNA (EcoRI-C fragment) を DNA CELL (草野科学器械製作所) を用いてゲルより分離, 精製した. 得られた DNA 1 μ g 相当は nick translation kit (BRL) を用いて biotin-11-dUTP (BRL) で標識, Cephadex-G 50カラム (Pharmacia) を通して精製し, Southern hybridization あるいは in situ hybridization に使用した. また, ³²P-dCTP (Amersham) を用いて同様に標識, 精製し (0.56 $\times$ 10⁸cpm/1 μ g DNA) Northern hybridization に使用した.

Ad12 whole genome に対する probe は, 10% calf bovine serum (Flow Laboratories) 加 Eagle MEM (阪大微生物病研究会) で培養した HeLa 細胞 (Flow Laboratories) に10^{6.5} TCID₅₀/ml の Ad12 Huie 株 (岡山大学矢部教授より付与された) を感染増殖させ, そのウィルスを分離し DNA を抽出した⁹⁾. 得られた Ad12 DNA 1 μ g をnick translation kit を用い ³²P-dCTP で標識, Cephadex-G 50 カラムを通して精製し (0.68 $\times$ 10⁸ cpm/1 μ g DNA) Southern hybridization に使用した.

DNA 及び RNA の精製

IC, D, P 株の腫瘍及びマウス肝臓を, 0.5M Tris. Cl, 20mM EDTA, 10mM NaCl, 1% SDS, 0.4mg/ml proteinase K で37℃一晩処理

した。終濃度100 μ g/mlになるように RNase を加え、37 $^{\circ}$ C、1時間 incubate 後、フェノール、クロロフォルムによる抽出、エタノール沈澱を行い、T₁₀E₁ buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA) に溶解し、試料 DNA とした。

また、IC、D 株の腫瘍およびマウス肝、Ad12 感染 HeLa 細胞の RNA をグアニジンチオシアネート法⁶⁾により抽出した。

Southern blot hybridization

試料 DNA 20 μ g を制限酵素 EcoRI, BamHI, PstI (TOYOBO) で切断後0.9% agarose gel で泳動し、ニトロセルロース膜に blotting を行った^{6,7)}。また、対照として二倍体細胞 DNA あたり1, 5, 10, 20, 50コピーに相当する Ad12 DNA を20 μ g のマウス肝 DNA と混合して泳動した。20 μ g DNA 中に含まれる二倍体細胞あたりのウ

イルス DNA 量は、細胞1個あたりの総 DNA 量を13pg, アデノウィルス塩基数を35,000bp, 1塩基対を600g/mol として算出した⁹⁾。

ビオチン化 probe を用いた場合、blotting 後 prehybridization solution (50% deionized formamide, 5xSSC, 5xDenhardt's solution, 25 mM Sodium phosphate (pH 6.5), 0.5mg/ml freshly denatured shared herring sperm DNA) 中で42 $^{\circ}$ C、4時間反応させた。Prehybridization solution を除き、hybridization solution (45% deionized formamide, 5xSSC, 1xDenhardt's solution, 20mM sodium phosphate (pH 6.5), 5% dextran sulfate, 0.2mg/ml freshly denatured herring sperm DNA, 0.1~0.5 μ g/ml freshly denatured probe DNA) 中で42 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。2 xSSC, 0.1% SDS で室温

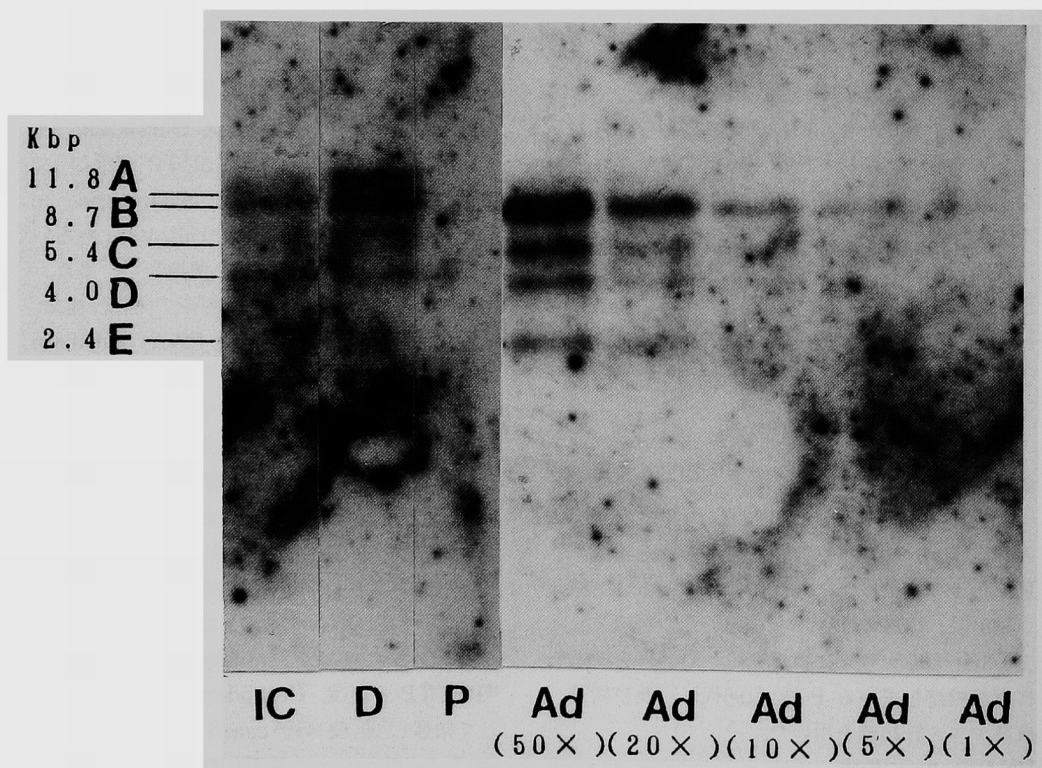


Fig. 1 Integration patterns of Ad12 DNA in Ad12-induced mouse tumors. Ad12 DNA (1, 5, 10, 20, 50 genome equivalent per cell) was mixed with each 20 μ g of mouse liver DNA. DNA from tumors and Ad12 DNA were cleaved with EcoRI restriction nuclease. The ³²P-labeled Ad12 fragment was used as hybridization probe. (A, B, C, D, E : Ad12 EcoRI fragment, IC : IC tumor, D : D tumor, P : P tumor, Ad : Ad12)

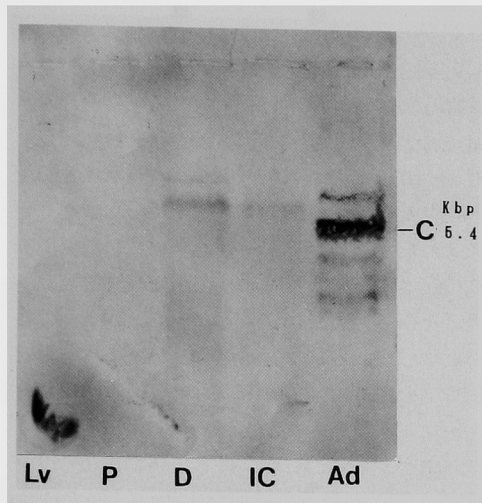


Fig. 2 Southern hybridization of DNA from tumors using the biotinylated Ad12 EcoRI-C fragment as hybridization probe. DNA from tumors was cleaved with EcoRI. (Lv: mouse liver tissue)

3分2回, 0.2xSSC, 0.1% SDS で室温3分2回, 0.16xSSC, 0.1% SDS で50℃15分2回洗浄後2xSSCで洗浄し, Blu GENE kit (BRL) により発色させた。

^{32}P で標識した Ad12 whole genome を probe とした場合, 成書に従い hybridization を行った⁶⁾。オートラジオグラフィー後, クロマトスキャナー (Schimadzu) による対照のバンドとの比較により, 組み込まれているウィルスゲノム数を推定した。

Northern blot hybridization

20 μg の IC 株, D 株, マウス肝臓 RNA 及び 5 μg の Ad12感染 HeLa 細胞 RNA を0.9% agarose gel で泳動, blotting を行った⁶⁾。Blotting 後, ^{32}P で標識した Ad12 EcoRI-C fragment を probe とし Southern 法と同様に hybridization を行った。クロマトスキャナーにより, IC 株, D 株の mRNA の発現量も比較した。

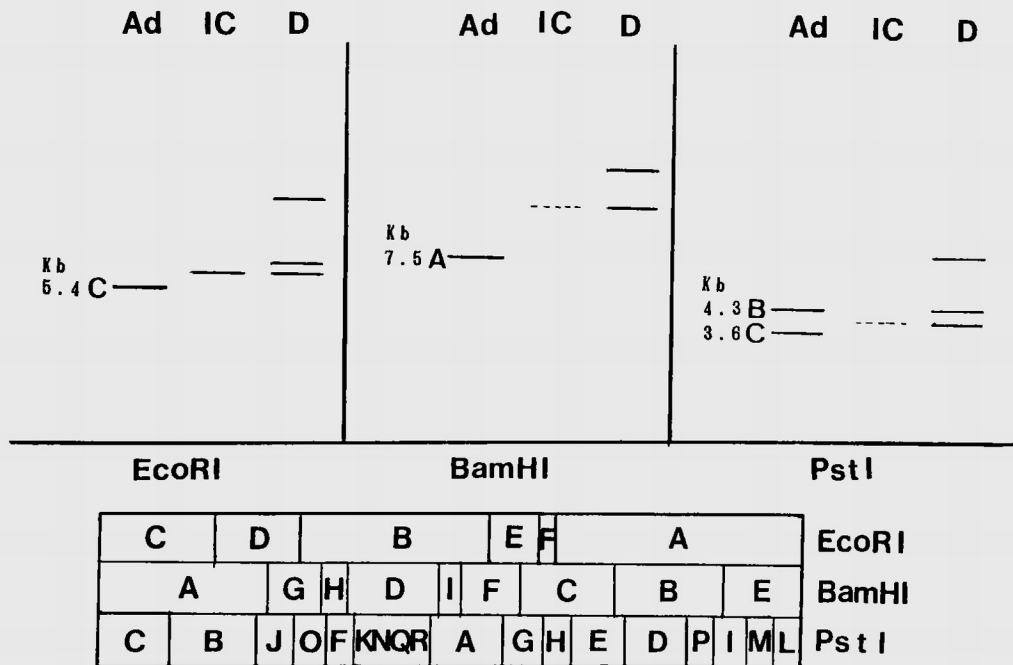


Fig. 3 Schematic representation of Ad12 E1 region specific sequences in EcoRI, BamHI and PstI-cleaved DNA from tumors. The biotinylated Ad12 EcoRI-C fragment was used as hybridization probe.

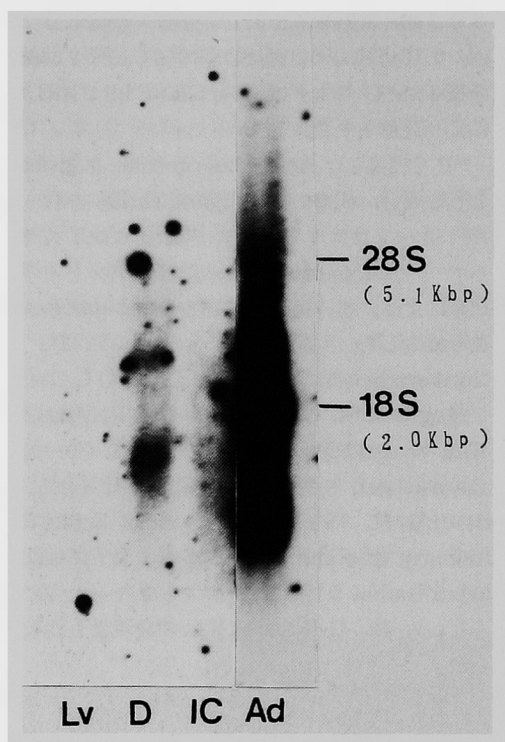


Fig. 4 E1 region specific mRNA in IC, D tumors and HeLa cells infected with Ad12. The ^{32}P -labeled Ad12 EcoRI-C fragment was used as hybridization probe.

In situ hybridization

IC, D, P 株腫瘍の凍結切片を作成した。対照として chamber slide (Miles Scientific) 中で 10% calf bovine serum 加 Eagle MEM を用いて培養し、Ad12 を感染、増殖させた Ad12 感染 HeLa 細胞を用いた。切片及び培養細胞は 4% paraformaldehyde で固定し¹⁰⁾、藤多らの方法¹¹⁾に従って hybridization を行った。一部 0.2 mg/ml proteinase K 処理を行い、proteinase K 処理による効果も比較した。発色は peroxidase conjugated streptavidin あるいは alkaline phosphatase conjugated streptavidin を用いて行った。Alkaline phosphatase を用いた場合、Blu GENE kit を用いて発色させた。Peroxidase を用いた場合、N. V. Naoumov らの方法¹²⁾に従ったが、ウサギ抗ヒオチン IgG 処理後は Stravigen kit (ニチレイ) を用い発色させた。

結 果

Southern blot hybridization

Ad12 whole genome を probe としたサザン法では、IC 株、D 株とも EcoRI fragment B, D, E, と一致したバンドが認められたが、EcoRI C fragment と一致するバンドは認められず、対照のバンド以外の部分にバンドが認められた。B, C, D, E のバンドに相当する領域と反応したことから、IC, D 株いずれもウィルスゲノムの 60% 以上の領域が組み込まれていることが確認できた。尚、A あるいは C 未確認の約 20 Kbp のバンドが認められた。組み込まれているウィルスゲノム数は、IC 株では二倍体細胞あたり平均約 9 コピー、D 株では約 23 コピーであった (Fig. 1)。

Ad12 EcoRI-C fragment を probe とした Southern 法において、IC 株 DNA の EcoRI 断片では約 6.4 Kb の部分に、D 株 DNA の EcoRI 断片では約 5.8, 6.4, 14.0 Kb の部分にバンドが認められた (Fig. 2)。IC 株 DNA の BamHI, PstI 断片ではそれぞれ約 13Kb, 4.0Kb の部分に弱くバンドの形成がみられた。D 株 DNA の BamHI 断片では約 13.0, 21.0Kb, PstI 断片では約 4.0, 4.4, 7.6Kb の部分にバンドの形成がみられた (Fig. 3)。PstI 断片の 4.4Kb のバンド以外はいずれも対照の Ad12 自体の DNA のバンドと一致しない off-size bands として認められた。対照として用いた P 株、マウス肝では Ad12 whole genome 及び EcoRI-C fragment との反応は認められなかった (Fig. 1-2)。

Northern blot hybridization

D 株、IC 株では 1.2~6.4Kb の部分にスメア一状に陽性所見が得られ、D 株では 1.5~1.8Kb の部分で特に強い反応が認められた。D 株の発現量は IC 株の約 1.4 倍であった。なお、対照の Ad12 を感染させた HeLa 細胞の mRNA では、1.3~3.2Kb の位置に 4 本のバンドを認めた (Fig. 4)。

In situ hybridization

IC, D 株では、明かな陽性所見は得られなかった。Ad12 感染 HeLa 細胞では、個々の細胞

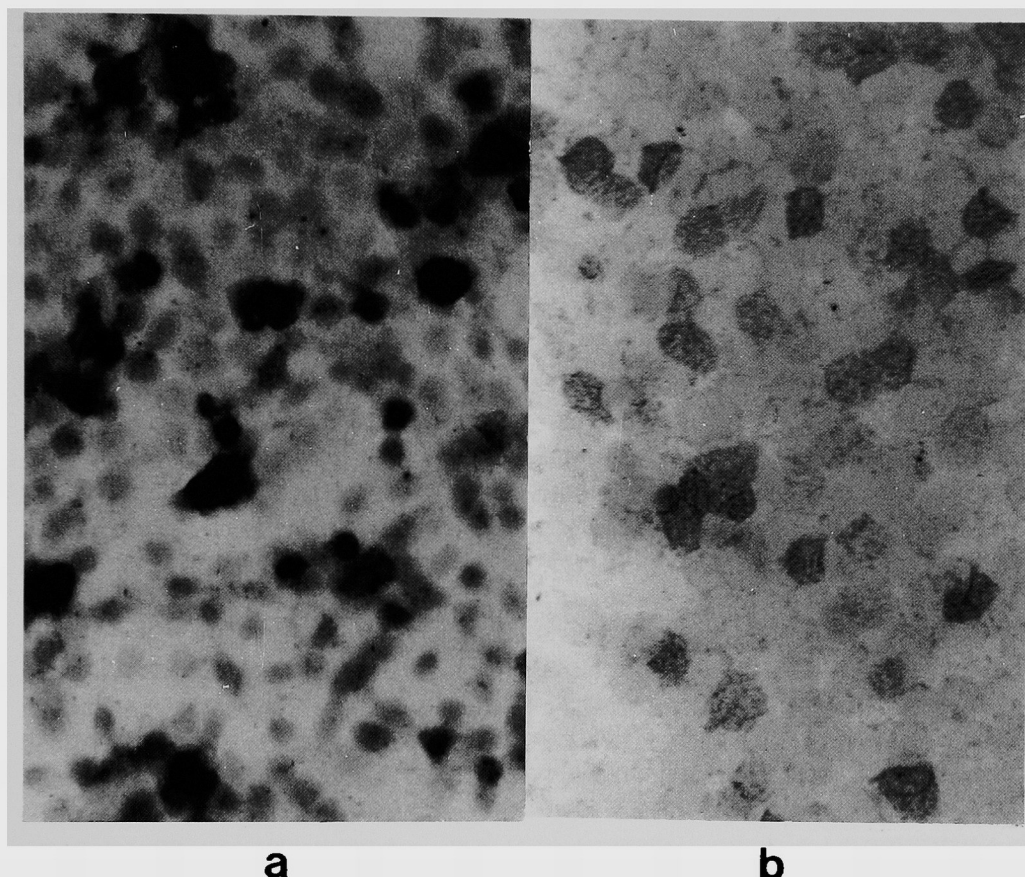


Fig. 5 In situ hybridization of HeLa cells infected with Ad12 using the biotinylated Ad12 EcoRI-C fragment as hybridization probe.

a) Detection by alkaline phosphatase ($\times 360$).

b) Detection by peroxidase ($\times 360$).

によって染色状態に差があったが、核内および細胞質内に陽性像がみられた。CPE の強い細胞が特に強く染まっていた。Alkaline phosphatase, peroxidase どちらを使用しても Ad12 感染 HeLa 細胞はほぼ同程度の発色であった (Fig 5 a, b)。

考 察

アデノウイルスは、直鎖状 2 本 DNA (約 35,000 塩基対, 分子量約 2.3×10^7 ダルトン) をゲノムとして持つ中型サイズの DNA ウィルスである。1962 年にヒトアデノウイルスによりハムスターに腫瘍を誘発できること^{13,14)}、また、1964 年にはハムスターの培養細胞をトランスフォームでき

ること^{15,16)}が報告され、その後アデノウイルスの腫瘍原性について種々の研究がなされてきた^{3,17,18)}。ヒトアデノウイルスでは、発癌遺伝子の局在部位はウィルス遺伝子左端の 1.3~11.2 マップ単位に位置する E1 領域であることが明らかになっている^{3,17,18)}。アデノウイルス発癌では、細胞 DNA にアデノウイルスゲノムが組み込まれるが、ゲノム全域が組み込まれる場合や、ゲノムの一部分が組み込まれる場合があり、組み込まれるゲノム数もさまざまである^{3,17)}。げっ歯類の Ad12 誘発腫瘍では、腫瘍細胞 DNA 中にウィルス DNA のほぼ全域が 1~20 コピー程度含まれている場合が多いと報告されている

が^{3,9,17,19,20}), われわれの実験でも, IC 株, D 株いずれにもウィルスゲノムの60%以上の領域が組み込まれており, 組み込まれているゲノム数は二倍体細胞あたり IC 株では約9コピー, D 株では約23コピーであった。E1 領域を probe とした Southern 法では, Ad12誘発腫瘍では E1 領域の probe と反応するバンドが対照の Ad12 E1 領域のバンドより分子量の大きい off-size bands として認められ, ウィルス左端部で細胞 DNA と結合していることが報告されている⁹。また, Ad12誘発ハムスター腫瘍あるいは Ad5, Ad2 でトランスフォームしたラット細胞では, 組み込まれているウィルスゲノム数に比して off-size bands の数が少ないことから, 左端部を含むウィルス DNA とそれに連なる細胞 DNA が反復している可能性が示唆されている^{9,17,21,22}。今回検索した Ad12誘発マウス腫瘍でも同様の様式で組み込まれ, 反復している可能性が考えられた。

アデノウィルス誘発腫瘍あるいはトランスフォーム細胞では, E1 領域及び一部の他の初期遺伝子の mRNA への発現が報告されているが^{19,22,23,24}), IC 株, D 株においても E1 領域の発現が認められた。ラットあるいはハムスターの Ad12誘発腫瘍やトランスフォーム細胞では, 細胞 DNA 中に組み込まれている Ad12ゲノム数と発現される mRNA 量との間には明かな相関関係はなく, ウィルス DNA の発現には DNA のメチレーションあるいは未知の他の因子が関与していることを示唆した報告がある^{17,24}。IC 株, D 株の比較においては, 組み込まれているゲノム数の多い D 株のほうが IC 株よりも mRNA の発現量は多く, より多くのウィルス DNA が mRNA に転写されている可能性も考えられた。

IC 株, D 株の特徴は, 細胞内に C 型粒子及び小胞体内 A 型粒子の顕著な産生がみられることである^{25,26}。化学物質で誘発した腫瘍²⁷や自然発生した腫瘍^{28,29}、あるいは他種の動物に Ad12を接種して得られた腫瘍³⁰では, これらのウィルス粒子は認められないか認められても少量であるので, C3Hf/OK マウスにおける内在性ウィルス粒子の発現には Ad12が何らかの形で関与していると考えられている^{26,29}。アデノウィ

ルス E1 領域は, ハムスターの Ad12誘発腫瘍において小胞体内 A 型粒子遺伝子の近傍に組み込まれていたという報告があり³¹), また, アデノウィルス E1 A タンパクが小胞体内 A 型粒子や HTLV-I, II, HIV のLTR を活性化するという報告もある^{32,33,34}。我々の維持している腫瘍においても, 組み込まれたアデノウィルス遺伝子が C 型ウィルス及び小胞体内 A 型粒子の内在性遺伝子の発現に対して cis に働いているのか, trans に働いているのかは興味深い点であり, さらに検討すべき問題である。

Southern, Northern 法により腫瘍細胞中に E1 領域遺伝子の組み込みと発現が確認されたが, ビオチン化 probe を用いた in situ hybridization 法においては, IC 株, D 株においては明かな陽性所見を得ることはできなかった。ビオチン化 probe を用いた検出では感度の点で問題があったのかもしれないが, より短い probe を用いるなどするとまだ手技的にも検出感度が向上するかもしれない。しかし, 対照の Ad12感染 HeLa 細胞では陽性所見を認め, 病理組織学的にウィルスの増殖は検出できるという結果が得られた。発色には alkaline phosphatase を用いた方が感度がよいという報告や³⁵), peroxidase を用いた方が感度がよいという報告があるが³⁶), 今回の実験においてはほぼ同程度であった。Alkaline phosphatase を用いた場合には通常の対比染色としてよく使われるヘマトキシリンやギムザ染色と色調が似ているため, やや難点があると思われる。また, パラフィン切片の場合は hybridization の前処置として界面活性剤処理のみで充分であるとの報告があったが³¹), Ad12を感染させた HeLa 細胞の場合は proteinase K 処理を加えたほうが鮮明な像を得ることができた。ビオチン化 probe はやや感度の面で問題はあるが, 実験場所の制約を受けず, 人体への影響もなく, 長期間安定で手軽に使用でき, 病理組織学的にも応用の可能性が考えられる。

結 論

アデノウィルス誘発マウス腫瘍移植継代株 IC, D に於けるアデノウィルス発癌遺伝子 E1 領域の組み込みと発現について検討した。腫瘍 DNA

中にはウィルスゲノムのほぼ全域が IC 株では二倍体細胞あたり約 9 コピー、D 株では約 23 コピー組み込まれていた。ウィルスゲノム左端部は細胞 DNA と結合しており、少なくとも 3 種類以上の構造の異なる細胞 DNA との結合様式があり、E1 領域を含むウィルス DNA とそれに連なる細胞 DNA が反復している可能性が示唆された。両株ともウィルス DNA の発現を示していたが、より多いウィルスゲノムが組み込まれていた D 株では IC 株の約 1.4 倍量の発現

が認められた。

本研究において終始御指導を賜った大森正樹教授、御助言、激励を頂いた小林省二助教授をはじめ第一病理学の諸先生に深甚なる謝意を表します。また、DNA の取扱いをご指導頂いた本学微生物学講座の松下治先生、片山誠一先生に深謝致します。

(本論文の要旨は平成元年 10 月、第 48 回日本癌学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Kibrick S, Meléndez L and Enders JF: Clinical associations of enteric viruses with particular reference to agents exhibiting properties of the echo group. *Ann N Y Acad Sci* (1957) **67**, 311—325.
- 2) Huebner RJ: Adenovirus-directed tumor and T antigens; in Pollard M (ed) *Perspectives in Virology*, Vol 5, Academic, New York (1967) pp. 147—166.
- 3) 山下利春, 沢田幸治, 藤永 恵: アデノウィルスのトランスフォーム遺伝子。ウィルス (1986) **36**(1), 79—111.
- 4) Ohmori M: Present status and history of the mouse colony of Okayama University Medical School. *Acta Med Okayama* (1981) **35**(4), 293—306.
- 5) 佐藤 博: 日本で維持されている可移植性腫瘍株一覧表。癌と化療 (1984) **11**(3), PART II, 1—9 2.
- 6) 口野嘉幸, 平井久丸, 櫻林郁之介編: 遺伝子・タンパク質実験操作プロットティング法, ソフトサイエンス社 (1987)
- 7) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
- 8) Shiroki K, Hashimoto S, et al.: Expression of the E4 gene is required for establishment of soft-agar colony-forming rat cell lines transformed by the adenovirus 12 E1 gene. *J Virol* (1984) **50**(3), 854—863.
- 9) Stabel S, Doerfler W and Friis RR: Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells. *J Virol* (1980) **36**(1), 22—40.
- 10) Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, et al.: Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* (1983) **126**, 32—50.
- 11) 藤多和信, 渡辺 格, 大野典也: 放射性同位元素を用いない DNA および RNA の解析法。細胞工学 (1985) **4**(10), 893—900.
- 12) Naoumov NV, Alexander GJM, Feddleston ALW and Williams R: In situ hybridization in formalin fixed, paraffin wax embedded liver specimens: method for detecting human and viral DNA using biotinylated probes. *J Clin Pathol* (1988) **41**, 793—798.
- 13) Trentin JJ, Yabe Y and Taylor G: The quest for human cancer viruses. *Science* (1962) **137**, 835—841.
- 14) Huebner RJ, Rowe WP and Lane WT: Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus type 12 and 18. *Proc Natl Acad Sci* (1962) **48**, 2051—2058.

- 15) Pope JH and Rowe WP : Immunofluorescent studies of adenovirus 12 tumors and of cells transformed or infected by adenoviruses. *J Exp Med* (1964) **120**, 577—587.
- 16) McBride WD and Wiener A : In vitro transformation of hamster kidney cells by human adenovirus type 12. *Proc Soc Exptl Biol Med* (1964) **115**, 870—874.
- 17) 安江 博, 石橋正英 : アデノウィルスの腫瘍原生. 蛋・核・酵 (1982) **27**(16), 2476—2491.
- 18) 藤永 憲 : がん遺伝子の分子生物学. 講談社 (1985) pp. 72—91.
- 19) Ibelgaufits H, Doerfler W, Scheidtmann KH and Wechsler W : Adenovirus type 12-induced rat tumor cells of neuroepithelial origin : persistence and expression of the viral genome. *J Virol* (1980) **33**(1), 423—437.
- 20) Starzinsky-Powitz A, Schulz M, Esche H, Mukai N and Doerfler W : The adenovirus type 12-mouse cell system : permissivity and analysis of integration patterns of viral DNA in tumor cells. *EMBO J* (1982) **1**(4), 493—497.
- 21) Sutter D, Westphal M and Doerfler W : Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell* (1978) **14**, 569—585.
- 22) Green M, Wold WSM and Büttner W : Integration and transcription of group C human adenovirus sequences in the DNA of five lines of transformed rat cells. *J Mol Biol* (1981) **151**, 337—366.
- 23) Lewis JB and Mathews MB : Viral messenger RNAs in six lines of adenovirus-transformed cells. *Virology* (1981) **115**, 345—360.
- 24) Schirm S and Doerfler W : Expression of viral DNA in adenovirus type 12-transformed cells, in tumor cells, and in revertants. *J Virol* (1981) **39**(3), 694—702.
- 25) 栄 勝美 : マウス内在性腫瘍ウィルスとマウス乳癌ウィルスとの相関性について. 細胞核病理誌 (1979) **17**(1), 17—24.
- 26) Ohmori M : Activated endogenous viruses of tumor induced by human adenovirus : an electron microscope study. *Exp Mol Pathol* (1978) **29**, 260—271.
- 27) Liebelt RA, Suzuki S, Liebelt AG and Lane M : Virus-like particles in chemically induced sarcomas in high- and low-leukemia strains of mice. *Cancer Res* (1970) **30**, 2438—2448.
- 28) Wivel NA and Smith GH : Distribution of intracisternal A-particles in a variety of normal and neoplastic mouse tissues. *Int J Cancer* (1971) **7**, 167—175.
- 29) Ohmori M, Ohtsuki Y and Kobayashi S : Activation of an endogenous oncogenic virus by human adenovirus in mice. *J Cancer Res Clin Oncol* (1979) **93**, 45—56.
- 30) 大森正樹 : 内在性腫瘍ウィルスの活性化 : 動物種及び系統による差異について. 細胞核病理誌 (1982) **19**(1—2), 1—7.
- 31) Lichtenberg U, Zock C and Doerfler W : Insertion of adenovirus type 12 DNA in the vicinity of an intracisternal A particle genome in syrian hamster tumor cells. *J Virol* (1987) **61**(9), 2719—2726.
- 32) Luria S and Horowitz M : The long terminal repeat of the intracisternal A particle as a target for transactivation by oncogene products. *J Virol* (1986) **57**(3), 998—1003.
- 33) Chen ISY, Cann AJ, Shah NP and Gaynor RB : Functional relation between HTLV-II x and adenovirus E1A proteins in transcriptional activation. *Science* (1985) **230**, 570—573.
- 34) Nabel GJ, Rice SA, Knipe DM and Baltimore D : Alternative mechanisms for activation of human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *Science* (1988) **239**, 1299—1302.
- 35) Larsson L-I, Christensen T and Dalbøge H : Detection of proopiomelanocortin mRNA by in situ hybridization, using a biotinylated oligodeoxynucleotide probe and avidin-alkaline phosphatase histochemistry. *Histochemistry* (1988) **89**, 109—116.

- 36) Bhatt B, Burns J, Flannery D, McGee JO'D : Direct visualization of single copy genes on banded metaphase chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. Nucl Acids Res (1988) 16(9), 3951—3961.

Integration and expression of E1 region DNA in human adenovirus type 12-induced tumors

Tomoko MORIKAWA

Department of Pathology,

Kagawa Medical School,

Kagawa 761-07, Japan

(Director : Prof. M. Ohmori)

Integration and expression of human adenovirus type 12 (Ad12) were studied on two Ad12-induced tumor lines of C3Hf/OK mouse origin (IC and D tumors). Southern hybridization using whole Ad12 genome as probe demonstrated that DNA of IC and D tumors contained about 9 and 23 copies, respectively, of the entire Ad12 genome equivalent per diploid cell. Left ends of Ad12 DNA appeared as off-size bands, indicating their linkage to different cellular DNAs. Southern hybridization using an Ad12 EcoRI-C fragment containing the E1 region as a probe revealed that integration sites were much fewer than presumed numbers of integrated Ad12 genomes. These results suggested that the viral and cellular DNA complex was repeated at integration sites. Northern hybridization using an Ad12 EcoRI-C fragment as a probe showed that the E1 region was transcribed in both IC and D tumors. Much more intensive expression in the D tumor suggested possible dependence of the expression of the E1 region on the copy numbers of Ad12 genomes.