

令和元年6月13日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19612

研究課題名(和文)皮膚に常在するヒトポリオーマウイルスのエコロジー：疾患との関係を探る

研究課題名(英文) Ecology of human polyomaviruses residing in the skin: Exploration of its relationship with cutaneous diseases

研究代表者

橋田 裕美子 (Hashida, Yumiko)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：00767999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：人の皮膚には多くの微生物が常在しており、微生物叢を形成している。本研究では、皮膚に常在するウイルスに着目し、皮膚ウイルス叢を構成する各種ウイルスの感染状況が加齢とともにどのように変化するのか、その変化と皮膚疾患との関連性を探求した。その結果、皮膚常在ポリオーマウイルスであるメルケル細胞ポリオーマウイルス・ヒトポリオーマウイルス6・ヒトポリオーマウイルス7の健常者における感染量を各年代ごとに初めて明らかにすることができた。また皮膚癌患者や炎症性皮膚疾患患者における感染状況を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

常在微生物に関する研究は、腸内細菌然り細菌叢に注目されることが多く、ウイルス叢に関する知見は不足している。本研究では、皮膚常在ウイルスに注目することにより、不足して皮膚常在ウイルスに関する情報蓄積への貢献ができた。また、健常者の各年代における皮膚常在ウイルスの感染量・ゲノム情報などを得ることができた。このように、今後の皮膚常在ウイルス叢研究の基盤となるデータを得ることができたことは、社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The human skin, which functions as the barrier between the body and outside environment, is inhabited by diverse microorganisms. In this study, we focused on the skin virome and explored the relationship between infection status of viruses residing in the skin and cutaneous diseases. This study provides the first data on age-specific prevalence and infection levels of some human polyomaviruses, including Merkel cell polyomavirus, human polyomavirus 6 and human polyomavirus 7, in the skin of healthy individuals as well as the skins of patients with skin cancers and patients with inflammatory skin diseases.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 皮膚常在 微生物 疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人の皮膚には多くの微生物が常在しており、微生物叢(マイクロバイオーム)を形成している。近年では、皮膚常在細菌叢とアレルギー疾患との関連性が報告され、大きな話題となった。このように、これまでの皮膚マイクロバイオーム研究は主に細菌叢が注目され、皮膚に常在するウイルスについては不明な点が多い現状であった。皮膚にも多くのウイルスが不顕性感染しており、ウイルス叢(ウイローム)を形成していることが明らかとなってきた。このウイロームを形成する各種ウイルスの疫学や疾患との関連性については十分に解明されていなかった。

人に感染するポリオーマウイルスの中でも皮膚指向性を示すものとして、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)、ヒトポリオーマウイルス6(HPyV6)、ヒトポリオーマウイルス7(HPyV7)が報告されていた。MCPyVは皮膚癌の一種であるメルケル細胞癌を惹起する一方で、健常者の皮膚からも検出されることが報告されていた。また、HPyV6およびHPyV7は、健常者の皮膚スワブから発見されたが、皮膚掻痒性角化症などの皮膚疾患に關与することが報告されていた。これらのポリオーマウイルスは皮膚ウイロームを構成する一方で皮膚疾患とも関連すると考えられたが、健常者や皮膚疾患患者の皮膚における各年代のウイルス分布状況やウイルス量などの感染実態は不明なままであった。

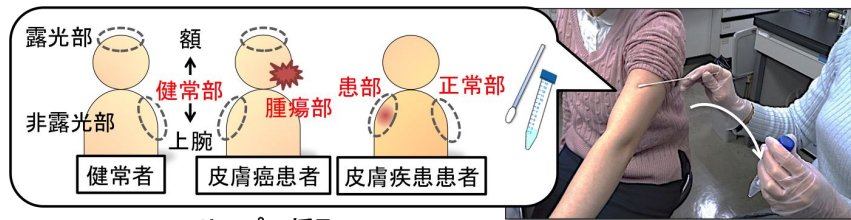
2. 研究の目的

本研究では、皮膚ウイロームを構成するウイルスの中でもポリオーマウイルスに着目し、各種ポリオーマウイルスの皮膚における感染状況が年齢とともにどのように変化するのか、その変化と皮膚疾患との関連性を探求することとした。

3. 研究の方法

(1) 皮膚スワブの収集およびDNAの抽出

2~98歳の健常者ボランティアを募り、PBSで浸した清潔綿棒で対象部位を擦過することで、皮膚スワブを採取した(右図: サンプル採取)。



サンプル採取

採取部位は日光露光部として額、日光非露光部として上腕とした。採取した皮膚スワブからフェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出し、皮膚スワブDNAとして解析に用いた。

MCPyVが關与する皮膚癌であるメルケル細胞癌の患者、その比較として他の皮膚癌(基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫)の患者から皮膚スワブを採取した。採取部位は、日光露光部の額部と日光非露光部の上腕とし、いずれも病変の認められない健常な部位を擦過した。

皮膚疾患症例として代表的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎および乾癬の患者を対照とし、皮膚スワブを採取した。採取部位は病変部(患部)と非病変部(正常部)とし、コントロールは年齢を合致させた健常者の健常皮膚スワブDNAとした。

皮膚癌症例または炎症性皮膚疾患症例1例あたり、健常者3例を対象として解析を行った。収集した全ての例において、書面にて同意が得られた者のみから採取した。

(2) ウイルス検出率およびウイルス量の測定

メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)、ヒトポリオーマウイルス6(HPyV6)、ヒトポリオーマウイルス7(HPyV7)の各々MCPyV ST領域、HPyV6 LT領域、HPyV7 LT領域にプライマーを設定した。皮膚スワブDNAを用いて定量的リアルタイムPCR法によりウイルスゲノムの検出を行ない、ウイルス検出率およびDNAあたりのウイルスゲノム量を算出した。定量限界であるCt値(Threshold Cycle)が40を超えない量を陽性として検出率を算定した。

(3) 遺伝子変異解析

ウイルスゲノムが検出された例では、PCRダイレクトシーケンシング法によりウイルスゲノム配列の同定を行った。MCPyVにおいてはLT遺伝子領域全長配列の同定を試み、変異の無い「野生型」か、腫瘍特異的な変異を有する「腫瘍型」かを判別した。

4. 研究成果

(1) 皮膚に常在するポリオーマウイルスの感染実態

小児から高齢までの健常者において皮膚スワブを採取し、MCPyVゲノムの検出と定量を行った。その結果、皮膚におけるMCPyV感染率とウイルス量は年齢とともに増加し、高齢者で高い傾向が明らかになった(図1)。また、非露光部である上腕に比べ、日光露光部である額でウイルス量が多いことが示された。上腕と額ともに、特に40歳以上でウイルス量が有意に多いことが明らかとなった。このことから、MCPyVは幼少期から感染し、加齢に伴いウイルスの蓄積が生じると考えられた。

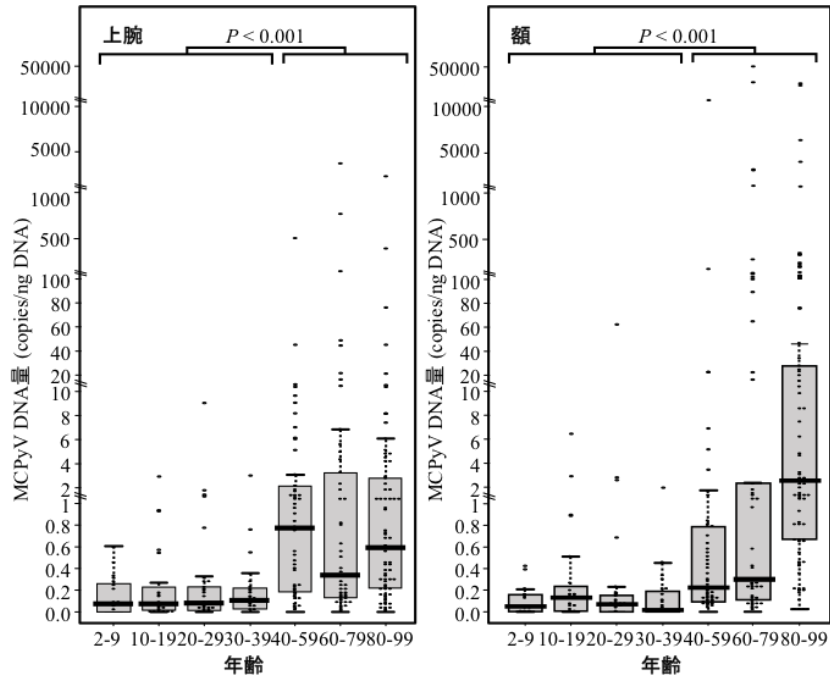


図 1

同様に HPyV6 および HPyV7 について健常者皮膚における感染状況を調査した。その結果、HPyV6 と HPyV7 の感染率とウイルス量は年齢とともに増加し、特に 80 歳以上の高齢者で高い傾向が明らかになった (図 2)。一方で 20 歳未満の小児皮膚でのウイルス量は、成人の皮膚よりも有意に低かった。また、MCPyV は、非露光部である上腕よりも露光部である額においてウイルス量が多かったが、HPyV6 と HPyV7 では有意なウイルス量の差は認められなかった。このことから、HPyV6 と HPyV7 の感染は日光曝露に影響されない可能性が示唆された。以上のことから、HPyV6 と HPyV7 の感染は高齢者で増加していることが明らかとなり、老化により免疫抑制状態になることが HPyV6 と HPyV7 の感染を活発化することが示唆された。

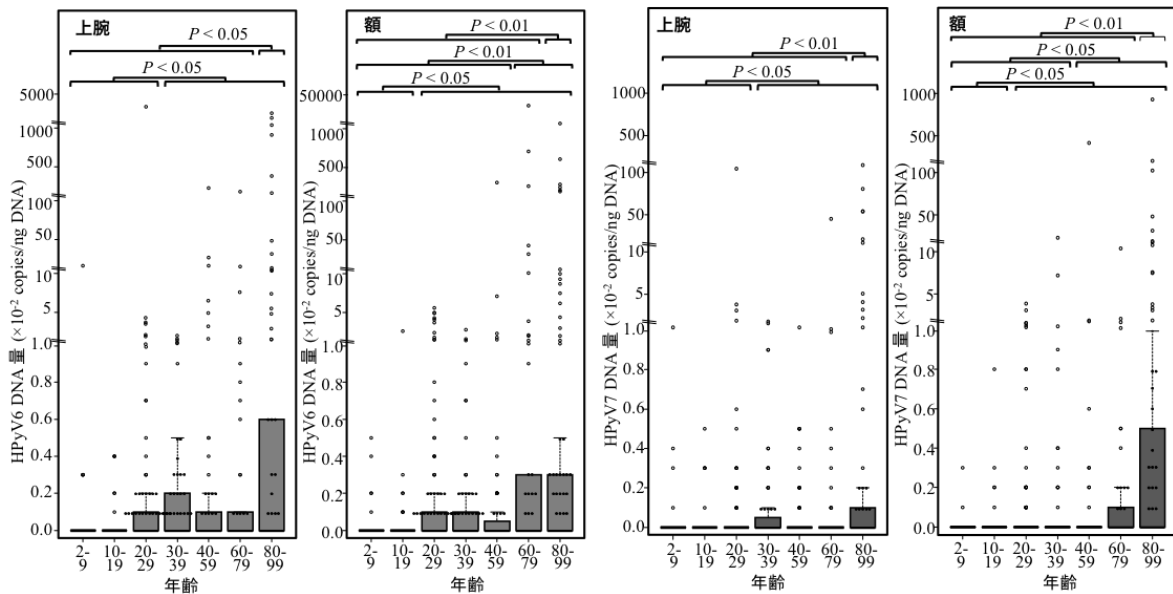


図 2

本研究により、皮膚でのポリオーマウイルス研究において重要な指標となる健常者の年代別の感染実態データを得ることができた。不明であった皮膚常在ウイルスの感染状況の一端を明らかにすることができ、今後の研究の基盤を強固にすることができた。

(2) メルケル細胞癌 (MCC) 患者での MCPyV 感染の実態

一般的に MCC は、白人種の高齢者に多い皮膚癌であり、特に日光に晒される部位 (顔・頭部) において頻発する。そして、ほとんどの MCC 腫瘍組織から MCPyV が検出され、その LT 遺伝子には腫瘍特異的な変異が導入されており、発癌促進との密接な関連が報告されている。これらのことを踏まえ、MCC 患者と他の皮膚癌患者の非病変部皮膚と健常者における健常皮膚での MCPyV 感染実態の違いを検討した。

解析の結果、MCC 患者では他の皮膚癌患者または健常者と比べて有意に MCPyV 感染量が多いことが示され、特にその露光部である額でウイルス量が多い結果が得られた(図3)。さらに、MCPyV ゲノムが検出された各症例において MCPyV の癌遺伝子である LT 遺伝子の配列同定および変異解析を行った。その結果、MCC 患者の腫瘍部組織からは特徴的な変異を有する「腫瘍型」の MCPyV LT 遺伝子が検出されたが、MCC 患者の正常皮膚や健常者の皮膚からは変異の無い「野生型」が検出された。MCC 患者では、高 MCPyV 量を保持するところに、長い年月をかけて日光・紫外線に晒されることにより MCPyV LT 遺伝子に腫瘍特異的な変異が導入され、発癌へと至ることが示唆された。

以上のことから、皮膚 MCPyV 量が多い状態は発癌へのリスクファクターとなることが考えられ、日光暴露を長期間にわたり受けることが MCC 発症への重要な素因であることが示唆された。

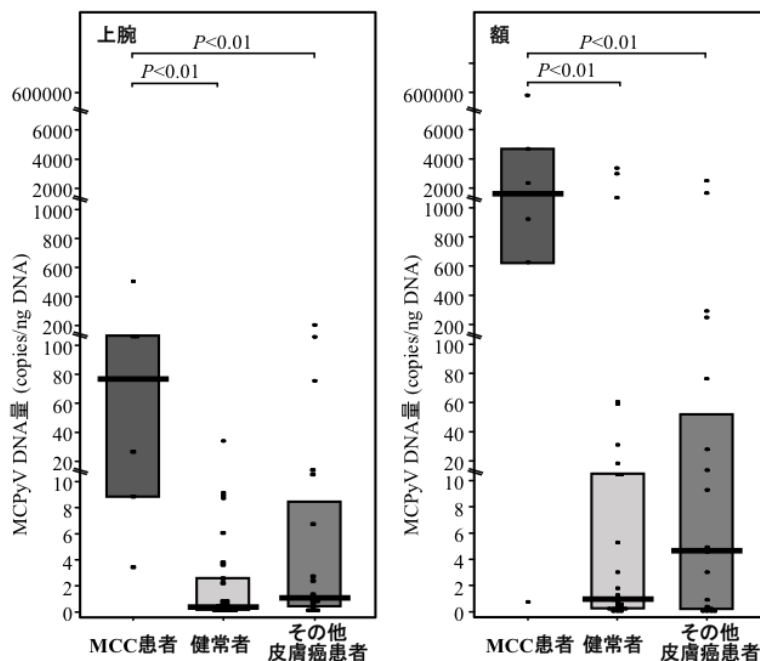


図3

(3) 皮膚ポリオマウイルス感染と疾患との関連性

皮膚疾患患者から皮膚スワブを採取し、病変部と非病変部におけるMCPyV・HPyV6・HPyV7の感染状況を検討した。その結果、アトピー性皮膚炎患者と乾癬患者においてHPyV6の検出率とウイルス量が有意に高いことが明らかとなり、同様の傾向がHPyV7でも認められた。一方でMCPyVは、健常者の健常皮膚と比べ、アトピー性皮膚炎患者および乾癬患者においては検出率とウイルス量ともに有意に低いことが明らかとなった。患者の病変部と非病変部の間では、検出率とウイルス量ともに有意な変化は認められなかった。以上のことから、これらの皮膚疾患においては患者個体全身レベルでウイルス感染状況が変化していることが示唆された。

本研究により、皮膚ウイルス感染状況の変動は炎症性皮膚疾患患者と健常者との間で明らかな相異があることが示された。これにより今後の皮膚疾患治療方針への貢献が期待できると考えられる。今後はさらに症例数を増やし、ウイルスの感染状況を詳細に解析していくことで、皮膚疾患と皮膚常在ウイルス叢との関連性を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Kikuchi H, Higuchi T, Hashida Y, Taniguchi A, Kamioka M, Taguchi T, Yokoyama A, Murakami I, Fujieda M, Daibata M. Generation and characteristics of a novel "double-hit" high grade B-cell lymphoma cell line DH-My6 with *MYC/IGH* and *BCL6/IGH* gene arrangements and potential molecular targeted therapies. *Oncotarget*. 査読有. 2018. 9:33482-33499. doi: 10.18632/oncotarget.26060.

Murakami I, Wada N, Nakashima J, Iguchi M, Toi M, Hashida Y, Higuchi T, Daibata M, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Horie Y, Nagata K, Hayashi K, Oka T, Yoshino T, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F. Merkel cell polyomavirus and Langerhans cell neoplasm. *Cell Commun Signal*. 査読有. 2018. 16:49. doi: 10.1186/s12964-018-0261-y.

Hashida Y, Higuchi T, Matsui K, Shibata Y, Nakajima K, Sano S, Daibata M. Genetic Variability of the Noncoding Control Region of Cutaneous Merkel Cell Polyomavirus: Identification of Geographically Related Genotypes. *J Infect Dis*. 査読有. 2018. 217:1601-1611. doi: 10.1093/infdis/jiy070.

Hashida Y, Higuchi T, Matsuzaki S, Nakajima K, Sano S, Daibata M. Prevalence and Genetic

Variability of Human Polyomaviruses 6 and 7 in Healthy Skin Among Asymptomatic Individuals. J Infect Dis. 査読有. 2018. 217:483-493. doi: 10.1093/infdis/jix516.

Higuchi T, Hashida Y, Taniguchi A, Kamioka M, Daibata M. Differential gene expression profiling linked to tumor progression of splenic marginal zone lymphoma. Sci Rep. 査読有. 2017. 7:11026. doi: 10.1038/s41598-017-11389-5.

Hashida Y, Nakajima K, Nakajima H, Shiga T, Tanaka M, Murakami M, Matsuzaki S, Naganuma S, Kuroda N, Seki Y, Katano H, Sano S, Daibata M. High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. J Clin Virol. 査読有. 2016. 82:101-107. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.011.

Hashida Y, Kamioka M, Tanaka M, Hosokawa S, Murakami M, Nakajima K, Kikuchi H, Fujieda M, Sano S, Daibata M. Ecology of Merkel Cell Polyomavirus in Healthy Skin Among Individuals in an Asian Cohort. J Infect Dis. 査読有. 2016. 213:1708-1716. doi: 10.1093/infdis/jiw040.

〔学会発表〕(計 11 件)

Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Kiyohiko Matsui, Masanori Daibata. Genetic variability of the noncoding control region of cutaneous Merkel cell polyomavirus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 2018 年

Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata. Quantification of MCPyV DNA loads in the tumor tissues and nonlesional skins of patients with Merkel cell carcinoma. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年

Tomonori Higuchi, Hiroaki Kikuchi, Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Mikio Kamioka, Takahiro Taguchi, Ichiro Murakami, Masanori Daibata. Antiproliferative effects of MYV/PLK1 inhibitions in a cell line derived from lymphoma with MYC/BCL6 rearrangements. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年

Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Shigenobu Matsuzaki, Kimiko Nakajima, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata. High load of MCPyV in the nonlesional skin of patients with Merkel cell carcinoma and among a cohort of asymptomatic elderly individuals. 日本研究皮膚科学会第 42 回年次学術大会. 2017 年

Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata. The relationship between loads of Merkel cell polyomavirus and carcinogenesis. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年

Tomonori Higuchi, Yumiko Hashida, Mikio Kamioka, Ayuko Taniguchi, Masanori Daibata. PLK1 upregulation promotes cell proliferation and survival in transformed-aggressive splenic marginal zone lymphoma. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017 年

Yumiko Hashida, Moe Tanaka, Masanao Murakami, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata. Epidemiological study of Merkel cell polyomavirus in healthy skin among healthy individuals in Japan. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年

Moe Tanaka, Yumiko Hashida, Masanao Murakami, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata. Phylogenetic analysis of Merkel cell polyomavirus based on full-length LT and VP1 sequences derived from normal skin of healthy individuals. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年

Ichiro Murakami, Junko Nakashima, Yumiko Hashida, Masanori Daibata, Michiko Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Masako Kato, Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi, Takashi Oka, Tadashi Yoshino, Toshihiko Imamura, Akira Morimoto, Shinsaku Imashuku, Jean Gogusev, Francis Jaubert. Ecology of Merkel Cell Polyomavirus in Healthy Skin Shows a Close Agreement with Interleukin-1 Loop Model in Langerhans Cell Histiocytosis. 32nd Annual Meeting of the Histiocyte Society. 2016.

Kimiko Nakajima, Yumiko Hashida, Yuka Shibata, Takeo Shiga, Hideki Nakajima, Masanori Daibata, Shigetoshi Sano. High burden of Merkel cell polyomavirus DNA in the nonlesional, sun-exposed skin of patients with Merkel cell carcinoma. 46th Annual ESDR Meeting. 2016.

Kimiko Nakajima, Yumiko Hashida, Yuka Shibata, Takeo Shiga, Hideki Nakajima, Masanori Daibata, Shigetoshi Sano. High burden of Merkel cell polyomavirus DNA in the sun-exposed skin of elder adults. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference. 2016.

〔その他〕

ホームページ

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_mcrbi/

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。