

機関番号：12061
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19406006
 研究課題名（和文） SV40の腫瘍ウイルスとしての意義の解明。日本・アジアにおける分子疫学。
 研究課題名（英文） SV40 as a human oncogenic virus. Molecular epidemiology in Japan and Asia.
 研究代表者
 深山 正久（FUKAYAMA MASASHI）
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：70281293

研究成果の概要（和文）：

SV40の腫瘍ウイルスとしての意義を解明するため、日本、韓国、台湾における悪性中皮腫、髄膜腫症例を対象にSV40-DNAの存在をPCR法によって検討した。悪性中皮腫では、PQ、SV、NKフラグメントは日本35症例中7、0、0症例に検出された。韓国4、台湾5症例ではすべて陰性であった。髄膜腫では、PCR増幅が安定しているNK断片で検討した場合、検出率は日本3.1%（5/159）、韓国2.5%（6/244）であった。日本、韓国、台湾における中皮腫におけるSV40の関与は共通して乏しいが、髄膜腫については日本、韓国ともに低頻度ではあるが関与の可能性があり、分子疫学的検討がさらに必要である。

研究成果の概要（英文）

The significance of SV40 as an oncogenic virus was evaluated in mesothelioma and meningioma of Japan, Korea, and Taiwan by PCR of SV40-DNA. PQ, SV and NK fragments of SV40-DNA were amplified in 7, 0 and 0 cases of 35 Japanese mesotheliomas, Four Korean and five Taiwan mesotheliomas showed no amplification of three fragments of SV40. On the other hand, NK fragments were amplified in low frequencies, 3.1% (5/159) in Japanese and 2.5% (6/244) in Korean meningiomas. SV40 has little relationship with mesotheliomas in Japan, Korea, and Taiwan. On the other hand, SV40 has definite relationship with meningiomas in Japan and Korea with low frequencies, suggesting necessity for further molecular epidemiologies on this topic.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2008年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2009年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2010年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 11,700,000 | 3,510,000 | 15,210,000 |

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：医歯薬学A・人体病理学

キーワード：SV40, DNAウイルス, 悪性中皮腫, 髄膜腫, 分子疫学, 日本, アジア, PCR

1. 研究開始当初の背景

simian virus 40 (SV40) は、ポリオマウイルス科に属する環状2重鎖のDNAウイルスである。1960年に発見されてまもなく、SV40

感染によってハムスターに中皮腫などの腫瘍が発生すること、ヒト初代培養細胞をトランスフォームすることが見いだされた。さらに、SV40ウイルスのlarge T antigen (Tag)

が、P53, Rb に関連した蛋白と結合し、これらを不活化すること、テロメラーゼあるいは増殖因子などを活性化することなどが明らかになっている。

ヒト腫瘍との関連性については、米国で1955年から62年までに接種されたポリオワクチンにSV40が混入していたことから、1970年代に疫学的に検討された。当時は、血清中の抗体を指標に検討され、ワクチン接種者からの癌発生の危険性は非接種者に比べ高くなっていることはない、と結論された。しかし、これらの研究で用いられた抗体の特異性は低く、SV40以外のポリオーマウイルス、BK virus (BKV) や JC virus (JCV) を認識するもので、癌との関連性を否定するには不十分な検討であった。しかもその後の研究により、SV40は汚染ワクチン接種の有無に関わらず10%程度のヒトに不顕性感染を認めるとも言われている。ちなみに、BKVはヒトに普遍的に感染が見られ、臓器移植後などで免疫不全状態に陥ると出血性膀胱炎をきたす。感染部位は主には腎臓である。また、JCVは成人の健常人において70%程度に不顕性感染がみられ、免疫不全状態になると進行性多巣性白質脳症を引き起こす。

1990年代に入り、PCR法によってSV40の遺伝子断片が種々のヒト脳腫瘍に高率に検出されるという報告(Bergsagel DJ et al. N Engl J Med 326:988, 1992)が契機となって、SV40とヒト腫瘍の関連性が再び注目を浴びるようになった。これまでに検出率が高いとされた腫瘍は、脳腫瘍(脈絡叢乳頭腫、上衣腫、髄芽腫)、悪性中皮腫、骨肉腫、そして非ホジキンリンパ腫などである(Vilchez RA, Butel JS, Clin Microbiol Rev 17:495, 2004)。脳腫瘍に関しては、SV40によってトランスフォームした培養細胞を扱っていた科学者に髄膜腫が発生、その組織内のSV40の塩基配列が培養細胞内のSV40の配列と同一であったことから、実験室内で感染し発症した可能性が高い、というショッキングな症例報告もある(Arrington AS et al. Oncogene 23:2231, 2004)。

社会的影響という点では、悪性中皮腫との関連性が重要である。悪性中皮腫と石綿(crocidolite)との関係は1960年来ほぼ確立されているが、実際、悪性中皮腫が発生するのは、アスベスト暴露歴のある人の5%に過ぎない。このため、アスベストとは別の付加的な因子の存在が想定されていたが、1994年にCarboneらは、悪性中皮腫においてSV40 DNAが60%と高率に検出されることを報告した(Oncogene 9:1781, 1994)。

2. 研究の目的

疫学的調査を含め、SV40の腫瘍ウイルスとしての意義について検討することを目的と

した。とくに、脳腫瘍(髄膜腫)、悪性中皮腫について日本のみならず、アジア(韓国、台湾など)諸国と比較することにより新たな知見が得られる可能性があると考えた。

なお、研究開始後に新たなポリオーマウイルス、メルケル細胞癌ポリオーマウイルス(merkel cell carcinoma polyoma virus, MCPyV)が発見された。MCPyVは皮膚のメルケル細胞癌に高率に検出され、腫瘍化に関わっている可能性が示唆されている(Feng et al. Science 319:1096, 2008)。その存在についても検討を追加した。

3. 研究の方法

(1) 資料収集:

日本、韓国、台湾の諸施設に資料収集について協力を要請し、症例はすべて匿名化した上で、ホルマリン固定パラフィン包埋材料を収集した。研究の協力に際しては、各施設において倫理委員会に申請を行い、許可を得た。

中皮腫細胞株については、ATCCよりMST0211H, NCI-H226, NCI-H2452, NCI-H28, NCI-H2052の5株、理研よりRIKEN2292, RIKEN2293の2株を購入した。

(2) SV40の検出:

Manfrediらの方法に準拠し(Cancer Res 65:2005), Primer PQ (5027-4911), Primer SV (4476-4372), Primer N' K' (3106-2966)の三フラグメントの増幅でSV40の有無を検討する。

SV40ウイルスのDNAフラグメント検出に関する技術的な問題については、Poulin DL, DeCaprioの総説(J Clin Oncol 26:4356, 2006)に詳述されている。図1の黒、赤矢頭で示したフラグメントが、実験室で頻用されているプラスミドベクターに組み込まれており、偽陽性の原因となり得る。

今回、我々の対象がホルマリン固定、パラフィン包埋標本された材料であることから、増幅フラグメントの長さを200bp以下に設定しておく必要がある。このため、プライマーの設計については、Manfrediらの方法に準拠することにした(Cancer Res 65:2005)。図2に示すように、これまでの多くの研究はSV.for3, SV.revで挟まれたlarge T antigen (LTA) 105bpフラグメントを増幅している。

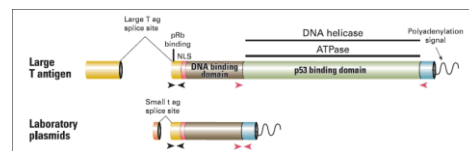


図1 SV40LTAと隣接するウイルスDNA

この部位は図1に示す黒矢頭の部位で、Rb 蛋白と結合する部位に相当するが、同時に偽陽性となり得る部位である。

一方、この部位以外にも、SV40のトランスフォーメーションに重要な部位が3箇所存在し、今回採用する方法では、増幅の標的が2箇所追加された形になっている(P/Q, N' /K')。増幅されたフラグメントについては、塩基配列決定による確認を行った。PQ, SV, N' K' フラグメントの長さは、各々、117, 105, 141bpである。

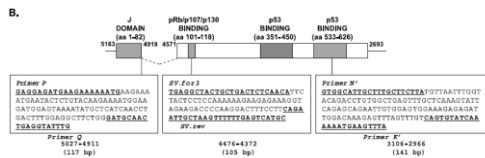


図2 SV40-DNA 検出のためのプライマー

PCRの条件については、SV40-SVのアニーリング温度 58℃、30秒であり、SV-PQ, SV-N' K' は 53.5℃、30秒とし、すべて60cycleで行った。

なお、cdc25フラグメント(100bp)の増幅を同時に行い、増幅の可能であった検体について評価を行った。

(3) DNAメチル化との関係：

Toyookaらの報告(Oncogene 21:4340, 2002)によれば、SV40の感染を認める中皮腫細胞株では癌関連遺伝子のプロモーター領域にメチル化が高率に生じているとしている。この点についてもメチル化特異的PCR(MS-PCR)を用い検討を加えた。

(4) メルケル細胞癌ポリオマウイルス(MCPyV)

MCPyVの検出について、Katanoらの方法(J Med Virol 81:1951, 2009)を採用し、6箇所の配列を標的としてPCRを行うこととした。メルケル細胞癌組織を陽性対照としてPCRによる検出条件を設定し、その特異性を確認した。

4. 研究成果

(1) 資料収集：

平成20, 21年度には国内、自治医科大学、愛知がんセンターに協力を要請した。韓国、台湾については、平成20年度(2008年8月18-20日)、平成21年度(2009年6月25-27日)韓国啓明大学病理学教室を訪問、また平成21年度(2010年3月8-11日)台湾彰化基督教医院を訪問した。さらに平成22年度(2010年10月6-8日)に韓国ソウル大学病

理学教室を訪問した。

以上の結果、中皮腫に関しては、東大12症例、自治医科大学10症例、愛知がんセンター14症例、韓国啓明大学4症例、台湾彰化基督教医院5症例のホルマリン固定パラフィン包埋材料を得た。また、髄膜腫については、東大164症例、韓国啓明大学32症例、韓国ソウル大学225症例を対象とした。

(2) 中皮腫における検討：

① SV40-DNA断片の検出：

Manfrediらの方法に準拠し、Primer PQ(5027-4911)、Primer SV(4476-4372)、Primer N' K'(3106-2966)の3つの領域のDNAフラグメントの増幅によりSV40の有無を検討した。

まず、中皮腫細胞株について検討した。陽性コントロールとしてSV40-LTAをトランスフェクションしたcos7、HEK297細胞株を用いた。検索した7株、3フラグメントすべてについて陰性であった。Toyookaらの報告では、NCI-H28、NCI-H2052ではSV40-DNAフラグメントの存在が報告されているが、異なる結果となった。

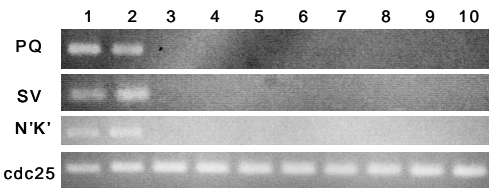


図3 中皮腫細胞株におけるSV40-DNA

1: CMV-SV40ベクターをトランスフェクションしたcos7、2: CMV-SV40ベクターをトランスフェクションしたHEK297、3-10: 中皮腫細胞株(MST0211H, NCI-H226, NCI-H2452, NCI-H28, NCI-H2052, RIKEN2292, RIKEN2293)

次に、悪性中皮腫臨床検体について、日本(東大、自治医大、愛知がんセンター)36例、韓国4例、台湾5症例のホルマリン固定パラフィン材料より抽出したDNAを用い、SV40-DNAの存在について検討した(表1)。

表1 悪性中皮腫におけるSV40-DNAの検出

| | 症例数 | PQ | SV | N' K' |
|-------|-------------|----|----|-------|
| 東大 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| 自治医大 | 10 | 3 | 0 | 0 |
| 愛知がんセ | 13 (1) * | 4 | 0 | 0 |
| 韓国啓明 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 台湾彰化 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 計 | 44 | 7 | 0 | 0 |

*: 括弧内の数字は外数。cdc25増幅がみられなかったため除外。

PQ フラグメントが増幅される検体が少数認められたが、SV フラグメント、N' K' フラグメントについては、すべて陰性であった。

②DNA メチル化との関係：

Toyooka らの報告 (Oncogene 21:4340, 2002) によれば、SV40 の感染を認める中皮腫細胞株では癌関連遺伝子のプロモーター領域にメチル化が高率に生じている。NCI-H28, NCI-H2052 において RASSF1A のメチル化を検討したところ、彼らの報告と同様、メチル化が確認できたが、SV40 の感染は確認できなかった。

③メルケル細胞癌ポリオーマウイルス (MCPyV)

MCPyV は新たなポリオーマウイルスで皮膚のメルケル細胞癌に高率に検出され、腫瘍化に関わっている可能性が示唆されている。そこで、MCPyV の存在についても検討を加えた (表 2)。

表 2 悪性中皮腫における MCPyV-DNA の検出

| | 症例数 | ST | LT1 | VP1 |
|-------|-------------|----|-----|-----|
| 東大 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| 自治医大 | 9 (1) * | 1 | 0 | 0 |
| 愛知がんセ | 13 (1) * | 0 | 0 | 1 |
| 韓国啓明 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 台湾彰化 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 計 | 43 | 1 | 0 | 1 |

*：括弧内の数字は外数。cdc25 増幅がみられなかったため除外。

表 2 に挙げたの ST, LT1, VP1 フラグメントに加え 3 箇所を検討を行っているが、全例、全箇所、陰性であった。陽性となる検体は極めて少なく、1 フラグメント片のみの陽性であることから、関与の可能性は極めて低いと考えられた。

④中皮腫に関するまとめ

以上の検討から、SV40-DNA の PQ フラグメントが散発的に増幅されることがあったが、SV, N' K' フラグメントの陽性例はみられなかったことから、SV40 の関与は日本、韓国、台湾での中皮腫発生への関与の可能性は極めて低い、と考えられた。

(3) 髄膜腫における検討：

東大 164 症例、韓国啓明大学 32 症例、韓国ソウル大学 212 症例を対象とし、中皮腫と同様に PCR による SV40-DNA の検出を行った (表 3)

今回の結果では、PQ, SV フラグメントの増

幅が施設によって違いが大きかった。東京大学、韓国啓明大学症例では通常のパラフィン切片、韓国ソウル大学は組織マイクロアレイ切片からの DNA 抽出であった。このような材料の処理の違いが影響していた可能性もある。今後、PCR 条件に関して再検討を要する結果となった。

表 3 髄膜腫における SV40-DNA の検出

| | 症例数 | PQ | SV | N' K' |
|-------|--------------|----|----|-------|
| 東大 | 159 (5)* | 50 | 4 | 4 |
| 韓国啓明 | 32 | 5 | 2 | 1 |
| 韓国ソウル | 212 (13)* | 13 | 95 | 5 |

*：括弧内の数字は外数。cdc25 増幅がみられなかったため除外。

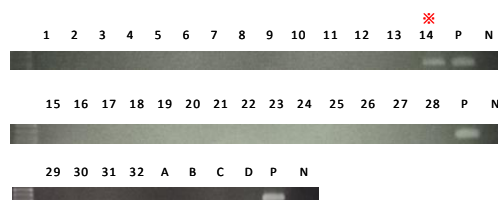


図 4 韓国髄膜腫における SV40-N' K' 検出

SV40-N'K'フラグメントを検出した。1-32: 髄膜腫、A-D: 中皮腫、P: 陽性コントロール、N: 陰性コントロール

増幅が安定していると考えられた N' K' フラグメント増幅の結果から推定すると、東大 3.1% (4/159)、啓明大学 3.1% (1/32)、ソウル大学 2.4% (5/212) であった。低頻度であるが、SV40 の関与が否定できないものと考えられる。今後更に検討が必要である。

(4)まとめ：

日本、韓国、台湾における中皮腫における SV40 の関与は共通して乏しいが、髄膜腫については日本、韓国ともに低頻度ではあるが関与の可能性があり、分子疫学的検討がさらに必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Goto A, Li C-P, Ota S, Niki T, Ohtsuki Y, Kitajima S, Yonezawa S, Koriyama C, Akiba, Uchima H, Lin Y-M, Yeh K-T, Koh J-S, Kim C-W, Kwon K-Y, Nga ME, Fukayama M. Human papillomavirus infection in a subset

of lung and esophageal cancers-An analysis of 485 Asian cases. J Med Virol 掲載確定 (印刷中) (査読有)

② Miyazaki H, Goto A, Hino R, Ota S, Okudaira R, Murakawa T, Nakajima J, Fukayama M. Pleural cavity angiosarcoma arising in chronic expanding hematoma after pneumonectomy. Hum Pathol 掲載確定 (印刷中) (査読有)

③ Morita S, Goto A, Sakatani T, Ota S, Murakawa T, Nakajima J, Maeda E, Fukayama M. Multicystic mesothelioma of the pericardium. Pathol Int, 61:319-321, 2011 (査読有)

④ 後藤明輝, 深山正久. 【肺・胸膜腫瘍 分類と診断 UPDATE】大細胞癌の組織診断 (大細胞神経内分泌癌を除く). 病理と臨床 28:156-161, 2010 (査読無)

⑤ 本多正幸, 森川鉄平, 山口泰弘, 谷真理子, 山口潔, 飯島勝矢, 秋下雅弘, 深山正久, 大内尉義. 超高齢男性に発症した原発性滲出液リンパ腫の1例. 日本老年医学会雑誌 46:551-556, 2009, (査読有)

[学会発表] (計3件)

① Fukayama M. Pathology research based on the partnership of Korea and Japan. Keimyung Cancer Center Symposium on Human Resource Bank, June 26, 2009, Daegu, Korea

③ 森田茂樹, 太田聡, 吉田幸弘, 前田恵理子, 稲生信一, 渡谷岳行, 中島淳, 深山正久. 心膜原発 multicystic mesothelioma の一例. 第97回日本病理学会総会, 2008年5月17日, 金沢市 (もてなしドーム地下広場)

② 宮崎秀幹, 日野るみ, 太田聡, 深山正久. 肺癌手術後の膿胸関連血管肉腫の一剖検例 第97回日本病理学会総会, 2008年5月15日, 金沢市 (ホテル日航金沢)

[図書] (計1件)

① 深山正久 (編) がんプロフェッショナル養成講座腫瘍病理学, 文光堂, 2008, 総頁数 406 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深山 正久 (FUKAYAMA MASASHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70281293

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

柴原 純二 (SHIBAHARA JUNJI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60334380
(H19:研究分担者 → H20)

森川 鉄平 (MORIKAWA TEPPEI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80451772
(H19:研究分担者 → H20)

太田 聡 (OTA SATOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90324342
(H19:研究分担者 → H20 - H22)

後藤明輝 (GOTO AKITERU)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90317090
(H21, H22)