

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21590520

研究課題名（和文）メルケル細胞ポリオーマウイルスの感染病理に関する研究

研究課題名（英文）Pathology of Merkel cell polyomavirus

## 研究代表者

片野 晴隆 (KATANO HARUTAKA)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：70321867

研究成果の概要（和文）：メルケル細胞ポリオーマウイルスの発癌のメカニズムを解明するとともに、診断、治療に役立つ知見を得ることを目的に研究を行った。メルケル細胞癌に large T 抗原が発現することを明らかにし、Large T の核局在シグナルを同定し、遺伝子変異との関連を明らかにした。また、2010 年に発見された新たなヒトポリオーマウイルスである HPyV6 と HPyV7 の検出系を開発した。

研究成果の概要（英文）：Merkel cell polyomavirus-DNA was detected in 6 of 11 (55%) Japanese cases of Merkel cell carcinoma by real-time PCR. Immunohistochemistry using a rabbit polyclonal antibody revealed that large T antigen was expressed in the nuclei of Merkel cell carcinoma cells. Deletion mutant analyses identified a nuclear localization signal in large T antigen. Real-time PCR analysis revealed that Merkel cell polyomavirus replication is associated with host immunity, and that circulation of human polyomavirus-6 and -7 in the serum is rare.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	0	1,500,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性

## 1. 研究開始当初の背景

メルケル細胞癌は高齢者の顔面や皮膚にまれに発症する癌である。米国では年間 1,000 例程度の発症があり、主に白人に多い。再発や転移の頻度が高く、患者は高齢者が多いことから予後はきわめて悪い。2008 年 2 月米国ピッツバーグ大学のグループが、このメルケル細胞癌の検体から新しいヒトポリオーマウイルスを発見したと報告した (Science 319:1096-100)。メルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus, MCPyV, MCV) と名付けられたこのウイルスは、Science の報

告によるとメルケル細胞癌の 8 割に検出され、一部の癌細胞では MCPyV がゲノムに integration されていることから、MCPyV が新しいヒト発癌ウイルスである可能性が示唆された。一方で、コントロールとして検索した健常者の臓器や生検検体からも約 10%、カポジ肉腫のサンプルでは 20% の陽性率が示されており、MCPyV は米国では広く蔓延しているウイルスであることが予想された。その後、ヨーロッパのグループもメルケル細胞癌から MCPyV が検出されたことを報告している。

日本ではわれわれが 10 例のメルケル細胞癌の検体を収集し、PCR により 5 例から MCPyV を検出したのが最初の報告である(2008 年第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山)。さらに、われわれはエイズに関連したカボジ肉腫 49 例中 3 例から MCPyV を検出し、そのうちの 1 例から MCPyV 遺伝子全長のクローニングを行った。われわれがクローニングした MCPyV は米国の株と 97% の相同性を持っていたが、随所で変異や挿入が見られ、これまで報告されている 3 株と比較すると最長の 5,418bp であった。

MCPyV は JC ウイルスや SV40 など、他のポリオーマウイルスと同様に small T, large T, VP1-3 のタンパクをコードしている。large T は C 末に pRb binding site を保持しているなど、SV40 との遺伝子構造の類似性から large T 単独で transformation 活性を持っている可能性が高い。MCPyV はヒトポリオーマウイルスとしては初めての癌ウイルスである可能性が高く、MCPyV は健常者でどの程度蔓延しているか、MCPyV がどのようにメルケル細胞に感染するか、MCPyV によるメルケル細胞の癌化の分子機構などが解明すべき課題である。

また、2010 年には健常者のヒト皮膚から新しいヒトポリオーマウイルス (human polyomavirus, HPyV) 6, 7 が発見され、新たなヒトポリオーマウイルスに加わった。人に対する病原性などに関しては一切明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では米国でメルケル細胞癌から新しく発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)について、メルケル細胞癌や他の疾患との関連、日本における感染疫学を明らかにし、さらに新たなヒト癌ウイルスとしての病原性を分子レベルで解明し、診断、治療に役立つ知見を得ることを目的とする。

具体的には下記の項目を解明する。

### (1) メルケル細胞癌における MCPyV 感染細胞の同定

メルケル細胞癌の発癌と MCPyV 感染の関連を証明するには、メルケル細胞癌の細胞そのものに MCPyV が感染していることを示す必要がある。MCPyV に対する抗体を作成し、メルケル細胞癌の病理組織標本上で MCPyV 感染細胞の同定を行うことで、MCPyV の病理学的診断法の開発を行う。また、作成した抗体でさまざまな疾患の病理組織標本を検索し、抗体の特異性の確認を行うとともに、他の MCPyV 関連疾患の発見に努める。

### (2) MCPyV の病原性の検討

MCPyV は他のポリオーマウイルスと同様に large T 抗原をコードしている。MCPyV Large T 抗原の明らかな腫瘍原性はまだ示さ

れていないが、large T 抗原遺伝子中に停止コドンが存在することが示されている。メルケル細胞癌における MCPyV の遺伝子変異と病原性について、臨床検体を用いて検討する。

### (3) 新しいポリオーマウイルスの感染疫学

血清中の抗 MCPyV 抗体を検出できる ELISA や IFA 等の血清学的診断法の開発し、日本人健常者における抗体陽性率を明らかにするとともに、高感度な real-time PCR の検出系を確立し、メルケル細胞癌や他の疾患における抗体陽性率を調査する。また、多くの原因不明疾患の血清をスクリーニングすることにより、初感染に関連する疾患を調査する。2010 年に健常者のヒト皮膚からた新しいヒトポリオーマウイルス (human polyomavirus, HPyV) 6, 7 についても同様の検索を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 材料: メルケル細胞癌、及びその他の疾患の組織、血清などの検体は、国立感染症研究所感染病理部にコンサルテーションされ、保存された検体を用いた。ヒト検体を用いた研究は国立感染症研究所倫理委員会の承認を得た。(承認番号 149, 192, 273)

(2) 核酸抽出: 血清は DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen)、ホルマリン固定パラフィン包埋組織は Qiaamp FFPE DNA extraction kit (Qiagen)、凍結組織は the DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。

(3) DNA real-time PCR: real-time PCR (Applied Biosystems) にて MCPyV (Katano H et al. J Med Virol 2009;81:1951-8)、HPyV6 VP1、HPyV6 small T (ST)、HPyV7 VP1、HPyV7 ST の DNA の定量を行った。また、内因性コントロールとして  $\beta$  アクチンの DNA の定量を行った (Kuramochi H et al. Clin Cancer Res 2006;12:29-33)。

(4) 免疫組織化学: MCPyV large T 抗原に対する抗体を一次抗体として、LSAB 法による免疫組織化学を行った。

(5) プラスミド、遺伝子導入: pCXN2-mRFP ベクターに large T 抗原の各欠損変異体を挿入した。Fugene 6 (Roche) で 293T 細胞に遺伝子導入し、RFP の発現から発現タンパクの局在を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) メルケル細胞癌および他の疾患からの MCPyV の検出

日本のメルケル細胞癌の症例から、はじめて MCPyV を検出し、報告した。11 例のメルケル細胞癌の症例のホルマリン固定パラフィン標本から DNA を抽出し、MCPyV の各遺伝子を nested PCR で検索した結果、6 例 (55%) で MCPyV が陽性であった。この陽性率は欧米諸国の報告と比べると低い。細胞

あたりのウイルスコピー数は 0.04-0.43 コピーであり、低いコピー数の症例も存在していた。同時に検索した、200 を超える他の疾患の病理組織標本では、3 例のカボジ肉腫症例から MCPyV が検出された。しかし、カボジ肉腫では MCPyV のコピー数がきわめて低く、疾患との関連は薄いものと考えられた。

(2) MCPyV large T 抗原の抗体の作成と病理組織検体における検索

Large T 抗原の遺伝子をクローニングし、GST 融合蛋白を作成し、ウサギに免疫することでポリクローナル抗体を作成した。これを 1 次抗体として、メルケル細胞癌組織で免疫組織化学を行った。メルケル細胞癌細胞の核内に陽性シグナルを認め、メルケル細胞癌で large T 抗原が発現していることが明らかになった。

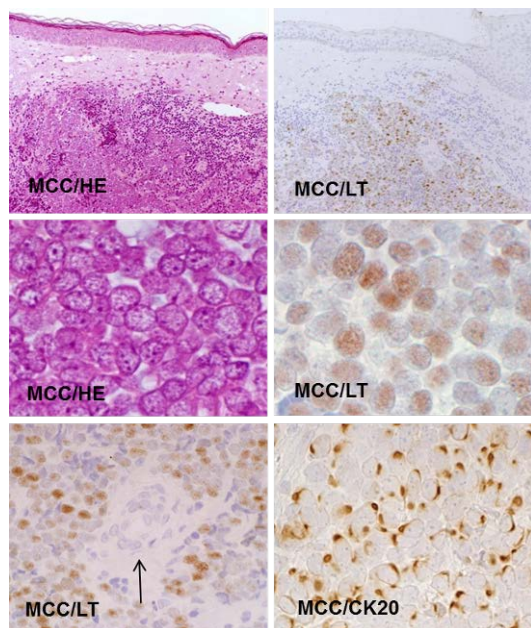


図 1 メルケル細胞癌組織における MCPyV large T 抗原の発現。Large T 抗原はメルケル細胞癌 (MCC) の核内に発現している。

(3) large T 抗原における核局在化シグナルの同定：日本人由来の MCPyV の large T 抗原をクローニングし、欠損変異体を作成することによって、large T 抗原の核局在化シグナルを同定した。メルケル細胞癌の臨床検体ではこの核局在化シグナルの下流に停止コドンを持った変異が入ることで発癌することが明らかとなり、日光露出部位におけるウイルス発癌の機構を明らかにした。

(4) 血液中の MCPyV, HPyV6, HPyV7 の検出  
血液サンプルにおいては健常者の 1 割程度に MCPyV が定量的 PCR で検出され、とくにエイズなどの免疫不全患者では 9 割程度のサンプルに MCPyV の DNA が検出された。こ

れらの結果から、MCPyV の感染は健常者の間でもまれではなく、ヒト体内における MCPyV の複製は宿主の免疫能と関連している可能性が示唆された。また、2010 年に発見された新しいヒトポリオーマウイルス (human polyomavirus, HPyV) 6, 7 について、同様の検索を行ったが、エイズ患者の血清でも定量的 PCR での陽性率は 1%程度と、検出はまれであった。これは、HPyV6,7 の感染が日本ではまれである可能性と、HPyV6,7 は皮膚に限定して増殖し、ウイルス血症の頻度が高くない可能性が含まれる。

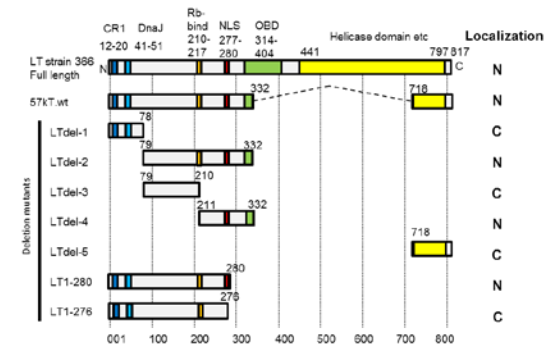


図 2 MCPyV large T 抗原の核局在化シグナルの同定。欠損変異体を作成することにより、277-280 の Arg-Lys-Arg-Lys を核局在化シグナルとして同定した。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文] (計 8 件)
- ① Kamiyama T, Ohshima N, Satoh H, Fukumoto H, Katano H, Imakado S: Metachronous merkel cell carcinoma on both cheeks, *Acta Derm Venereol* 2012, 92:54-56. doi: 10.2340/00015555-1185
  - ② Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol* 2011, 175, 1-9. doi: 10.3389/fmicb.2011.00175
  - ③ Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, *J Med Virol* 2011, 83:322-330. doi: 10.1002/jmv.21962
  - ④ Kaibuchi-Noda K, Yokota K, Matsumoto T, Sawada M, Sakakibara A, Kono M, Tomita Y, Watanabe D, Fukumoto H, Katano H, Akiyama M: Detection of Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma before occurrence of Merkel cell carcinoma, *J Am Acad Dermatol* 2011, 65: e152-154. doi: 10.1016/j.jaad.2011.06.026
  - ⑤ Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H,

Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T, Katano H: Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma, *Virology* 2010, 398:273-279. doi: 10.1016/j.virol.2009.12.024

- ⑥ Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, Tsuji T, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T: Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma, *J Med Virol* 2009, 81:1951-1958. doi: 10.1002/jmv.21608
- ⑦ 中村智之、片野晴隆 メルケル細胞ポリオーマウイルスとメルケル細胞癌。ウイルス 2009 59:37-42. doi: 10.2222/jsv.59.37
- ⑧ 片野晴隆 ポリオーマウイルス感染と病態—メルケル細胞ポリオーマウイルスを中心に 化学療法の領域 2010 26: 1251-1258.  
[https://www.iyaku-j.com/index.php?main\\_page=index&cPath=5\\_1\\_16\\_3279](https://www.iyaku-j.com/index.php?main_page=index&cPath=5_1_16_3279)

[学会発表] (計2件)

- ① 中村智之、佐藤由子、渡辺大輔、伊東秀記、下ノ原望、辻 隆裕、中島典子、鈴木良夫、松尾光馬、中川秀巳、小島直也、佐多徹太郎、片野晴隆 メルケル細胞ポリオーマウイルスlarge T抗原の核発現と発癌の関連 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月25日 東京
- ② 片野晴隆、中島典子、辻 隆裕、鈴木良夫、佐多徹太郎 メルケル細胞ポリオーマウイルスlarge T抗原の核発現 第99回日本病理学会総会 2010年4月29日 東京

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www0.nih.go.jp/niid/pathology/MCPyV.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

片野 晴隆 (KATANO HARUTAKA)  
国立感染症研究所・感染病理部・室長  
研究者番号：70321867

### (2)研究分担者

なし。

### (3)連携研究者

佐多 徹太郎(SATA TETSUTARO)  
国立感染症研究所・感染病理部・部長  
研究者番号：00162397

佐藤 由子 (SATO YUKO)  
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官  
研究者番号：なし

福本 瞳 (FUKUMOTO HITOMI)  
国立感染症研究所・感染病理部・協力研究員  
研究者番号：なし

菅野 隆行 (KANNO TAKAYUKI)  
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官  
研究者番号：50272563

中村 智之 (NAKAMURA TOMOYUKI)  
国立感染症研究所・感染病理部・研究生  
研究者番号：なし

坂本 康太 (SAKAMOTO KOUTA)  
国立感染症研究所・感染病理部・研究生  
研究者番号：なし

武内 恵梨香 (TAKENOUCHI ERIKA)  
国立感染症研究所・感染病理部・研究生  
研究者番号：なし