

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590389

研究課題名(和文)ポリオーマウイルス関連腫瘍の腫瘍発生の機序解明：メルケル細胞ウイルスから迫る

研究課題名(英文) Analysis of polyoma virus related tumor: Merkel cell polyomavirus infection and tumor genesis

研究代表者

太田 聡 (Ota, Satoshi)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90324342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：メルケル細胞ポリオーマウイルスは、日光露出部の高悪性度腫瘍であるメルケル細胞癌で近年腫瘍化に関連しているとして報告された。メルケル細胞癌を含めた皮膚腫瘍においてこのウイルスの関与に関して検討した。古典的PCR、最近開発されたデジタルPCR、免疫組織化学的検討を施行した。メルケル細胞癌全例と基底細胞癌1例が上記の3つの方法で陽性となった。古典的PCR法陽性になった光線性角化症はデジタルPCR、免疫組織化学的検討をあわせた検討では総合的に陰性と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Merkel cell polyomavirus (MCPyV) has recently been identified in Merkel cell carcinoma (MCC), an aggressive cancer that occurs in sun-exposed skin. We performed quantitative analyses of the MCPyV copy number in various skin tumor tissues, including MCC and other sun exposure-related skin tumors. In a conventional PCR analysis, MCPyV DNA was detected in all 9 MCCs, 1 Basal cell carcinoma, and 3 Actinic Keraotitis. The viral copy number per haploid genome was estimated to be around 1 in most MCC tissues, and there were marked differences between the MCC and AK groups by digital PCR technology. PCR-positive BC C tissue showed a similar viral load as MCC tissue. Immunohistochemistry with a monoclonal antibody against the MCPyV T antigen demonstrated positive nuclear localization in most of the high-viral-load tumor groups, but not in the low-viral-load or PCR-negative tumor groups. These results demonstrated that MCPyV infection is possibly involved in a minority of sun-exposed skin tumors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理

キーワード：メルケル細胞ポリオーマウイルス 皮膚腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

メルケル細胞癌は稀で、高悪性度の原発性皮膚腫瘍で、免疫不全患者や高齢者の日光露光部に好発するとされている。2008年に、メルケル細胞癌は新規ポリオーマウイルス、メルケル細胞ポリオーマウイルスのモノクローナルな感染が報告された (Science 2008,319:1096-1100)。PCRや免疫染色による報告ではメルケル細胞癌の約80%にこのウイルスの感染が確認され、メルケル細胞ポリオーマウイルスが腫瘍発生に関与していることが示唆されている。

メルケル細胞癌ウイルスは、他のポリオーマウイルスと同様に、潜伏感染していると考えられている。全身の様々な腫瘍、非腫瘍部、または疾患を有さない人の口腔粘膜などをPCRにて検出する系では11-76%で陽性に検出される (Int. J Cancer 2010 126:2991-2996 など)。ただし、腫瘍由来組織であってもqPCRの検出ではウイルスのコピー数はメルケル細胞癌と比較し相対的に少ないこと、免疫染色での腫瘍陽性像が得られていないことなどから、腫瘍で検出された場合でも非腫瘍部のリンパ球やマクロファージに感染し、腫瘍細胞には感染してなく、さらには腫瘍化にはかかわっていないと考えられている。メルケル細胞癌ウイルスは他のポリオーマウイルスと同様にLarge T (LT) を有する。1980年代に動物実験または培養細胞の系で、LTはポリオーマウイルスの代表であるSV40における腫瘍化に重要であることが報告されている (Nature 1982 296:671-672 など)。LTの領域に関しては、潜伏感染の状態とメル

ケル細胞癌での検出したウイルスを比較すると、非腫瘍部からのウイルスに変異は観察されないが、メルケル細胞癌から検出したウイルスでは突然変異が見られ、結果LT抗原の3'側のヘリケース領域が欠失または不完全の蛋白が形成されるとの報告があり、感染後にこの変異が加わることが、腫瘍化に重要な要素でないかとの報告がある。(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2008 105:16272-16277)

## 2. 研究の目的

最新のウイルス関連腫瘍として発表されたメルケル細胞癌ウイルスの腫瘍発生メカニズムは未知である。メルケル細胞癌に特異的であり、他の腫瘍との関連はないのか？他の腫瘍ウイルスであるEpstein-Barr virusのように複数の腫瘍の腫瘍化、炎症、悪性化との関連はないのかなど疑問点が多い。病理組織学的検討を基盤にその腫瘍化のメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学による発現評価

メルケル細胞ポリオーマウイルスをはじめに報告した研究チームが開発したこのウイルスへの特異的抗体「CM2B4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)」はコマーシャルベースで入手することができ、組織学的検討を免疫組織化学で検出することができる (Am J Surg Pathol 2009 33:1378-1385)。この抗体は他のポリオーマウイルスへの交叉反応はない特異的な領域を認識するために特異度が高いとされている。東京大学医学部附属病院、千葉大学医学部附属病院

の皮膚腫瘍や、虎の門病院のメルケル細胞癌を用いた検討をした。

### (2) 古典的 PCR によるスクリーニング

メルケル細胞ポリオーマウイルスの検出のための PCR を用いた多くの報告がある。今回は既報うち、Katano ら 6 つの Nested PCR のセットと条件を利用し(J. Med. Virol. 81:1951-1958)、多くの皮膚腫瘍、リンパ増殖病変に対してスクリーニングとして検討する。

### (3) Copy number variation の評価

copy 数解析は古典的 PCR 法によると、感度が低く、2 倍の違いを検出するのが限界であった。つまり low throughput scanning technology である real time PCR (quantitative PCR) や、Comparative genome hybridization や遺伝子配列解析、microarray-based SNP など感度と解像度が低い technology を使用しており、既報のメルケル細胞癌とメルケル細胞ポリオーマウイルスの検討でも使用されていた。今研究では、6copy と 7copy の違いも区別することができる新規のチップ技術を採用した nanofluidic platform を用い解析する。使用するチップは 12.765(12 サンプル)または 48.770(48 サンプル)の反応を検出することができる。

## 4 . 研究成果

東京大学医学部附属病医院の皮膚腫瘍や、虎の門病院のメルケル細胞癌を用いた検討をした。メルケル細胞ウイルスが病変に検出できるか否かを、PCR は Katano ら 6 つの Nested PCR のセット

と条件を利用した(J. Med. Virol.

81:1951-1958)。PCR の系ではメルケル細胞癌 9 例(9/9)、基底細胞癌 1 例(1/46)、光線性角化症 3 例(3/52)が陽性であった。ただし、他の代表的皮膚腫瘍は陰性であった。(ボーエン病(0/34)、悪性黒色腫(0/5)、母斑(0/7)、脂漏性角化症(0/5)、原発性皮膚未分化大型リンパ腫(0/5)。また皮膚原発の神経内分泌癌であるメルケル細胞癌と比較のため他の臓器の代表的神経内分泌腫瘍である肺小細胞癌の皮膚転移の症例も検討したが陰性であった(0/4)。6つのPCRのうち、large T抗原でのC末端側に相当するLT2の領域の検出率が低く、メルケル細胞癌(4/9)、基底細胞癌(1/1)、光線性角化症(2/3)であった。既報では、広範囲の欠失突然変異は報告されていないため、メルケル細胞ポリオーマウイルスの同部位の遺伝子配列の解析を検討した。LT2の5'側の、既報における遺伝子変異の多い領域を検討した。LT2の増幅が検出できなかったメルケル細胞癌5例のPCRで増幅されず、基底細胞癌は微小病変であるため、サンプルの残存がなく検討できなかったが、メルケル細胞癌4例、光線性角化症3例は一定の領域で検討できた。メルケル細胞癌の2例では既報と同様、または新規のTruncation mutationが検出された。C末端が欠損したlarge T抗原が細胞内で発現することは腫瘍の癌化に重要な役割を果たす仮説が考えられており、今後さらなる解析を進めたい。Satoshi Ota, PLoS One. 2012;7(6):e39954.

非常に多義に渉る皮膚腫瘍の変化をより幅広く捉えるために、症例数や疾患数を増やす目的で、千葉大学医学部附属病院での皮膚腫瘍を検討した。

千葉大学医学部附属病院にて切除さ

れた腫瘍性もしくは腫瘍様病変における解析では、メルケル細胞癌 7 例、光線性角化症 22 例、ボーエン病 44 例、基底細胞癌 112 例、悪性黒色腫 29 例、血管肉腫 10 例、リンパ腫（濾胞性リンパ腫 6 例と血管内大細胞リンパ腫 2 例）、毛包上皮腫 11 例、木村病 13 例である。

メルケル細胞癌以外では、追加検討した症例における腫瘍細胞自体はいずれも陰性であった。腫瘍部またはその周囲の領域の背景細胞としてのリンパ球に陽性像が観察された症例が、光線性角化症 2 例、ボーエン病 5 例、基底細胞癌 8 例、悪性黒色腫 3 例、毛包上皮腫 1 例で、リンパ増殖病変としては濾胞性リンパ腫 6 例中 5 例、木村病 13 例中 8 例が陽性になった。集塊状の陽性像は木村病と濾胞性リンパ腫であった。

木村病で特徴的な好酸球浸潤近傍のリンパ濾胞間のリンパ球に高率にメルケル細胞ポリオーマウイルス陽性細胞の集簇が見られ、リンパ濾胞部やマントル層にはごくわずかに観察されるのみである。木村病の組織像の特徴であるリンパ濾胞胚中心の好酸球膿瘍形成部では、濾胞胚中心に陽性細胞が多数観察される。木村病の特徴である好酸球の分布と同じく、メルケル細胞ポリオーマウイルス陽性細胞が観察されることは、病態形成に関わっている可能性を示唆する。さらにこのメルケル細胞ポリオーマウイルス陽性リンパ球のサブセット解析を、リンパ球マーカーを用いて検討した。CD3 陽性で T 細胞と考えられる。その他のマーカーとしては CD5 陽性、CD4 陽性、CD8 陰性、CD10 陰性、Bcl-6 陰性、GranzymeB 陰性、TIA1 陰性であった。木村病の背景リンパ球に観察される、ポリオーマウイルス陽性細胞は CD4 陽性のヘルパー T 細胞であること

がわかった。今後その病変形成への関与について解析する予定である。

## 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 2 件 )

1. Yamanouchi D, Oshitari T, Nakamura Y, Yotsukura J, Asanagi K, Baba T, Nizawa T, Kishimoto T, Yonemori Y, Ota S, Yamamoto S. Primary neuroendocrine carcinoma of ocular adnexa. Case Rep Ophthalmol Med. 2013; 2013: 281351.
2. Satoshi Ota, Shumpei Ishikawa<sup>2</sup>, Yutaka Takazawa, Akiteru Goto, Takeshi Fujii, Ken-ichi Ohashi, Masashi Fukayama. Quantitative Analysis of Viral Load per Haploid Genome Revealed the Different Biological Features of Merkel Cell Polyomavirus Infection in Skin Tumor. PLoS One. 2012;7(6):e39954.

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

第 100 回日本病理学会総会  
平成 23 年 4 月 28-30 日 横浜  
ワークショップ 「口演」  
最近注目される腫瘍ウイルスのトピックス  
メルケル細胞ポリオーマウイルスと腫瘍  
太田聡, 石川俊平, 深山正久

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

太田 聡 .【感染症と癌、病理からのメッセージ】 ポリオーマウイルスとヒト腫瘍 Merkel 細胞ポリオーマウイルスを中心に . 病理と臨床 2013;31 巻 2

号 :159-165

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

太田 聡 （Ota, Satoshi）

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90324342

### (2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

### (3)連携研究者

（ ）

研究者番号：