

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591631

研究課題名(和文) 沖縄に多発する血管肉腫の発症に関与する病因ウイルス・外来遺伝子断片の探索

研究課題名(英文) The exhaustive search of foreign DNAs as the pathogenic factor of angiosarcoma.

## 研究代表者

高橋 健造 (TAKAHASHI, Kenzo)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80291425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県に多発する血管肉腫の発症に関わる遺伝子断片を探索した。動物感染性のヘルペスウイルス群に共通する遺伝子配列を選択し、PCR増幅を多様なアニール温度で試みたが、既知や新規のヘルペスウイルスは全く増幅されなかった。サブトラクションスクリーニングからも、未知の外来遺伝子の発現は確認されなかった。患者腫瘍組織よりトランスクリプトーム解析により、ヒトゲノムに合致しない転写産物を解析したが、毛包虫、表皮常在菌、カンジダ菌などの病態に関与がないと思われる微生物の遺伝子配列のみが観察された。結果的に患者腫瘍組織より、血管肉腫の発症原因となるウイルスなどの外来生成物の存在の有無を決定するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We planned to look for the gene fragment of pathogenic virus for hemangiosarcoma, which occur frequently in Okinawa prefecture. Although the gene sequences common to zootrophic herpesvirus group were chosen and used for PCR amplification with various annealing temperatures, the herpesvirus of known or a de novo was not amplified at all. The presence of any foreign gene was not detected by the subtraction screening. Only the gene sequences of the organism those were considered to have no intervention in pathogenesis, such as a demodex, normal cutaneous inhabitant, or candida were found to be transcribed, even though RNA was directly extracted from angiosarcoma tissue and their transcriptomes were determined exhaustively. Thus, we could not come to determine the existence of the foreign microbes those might lead to the onset of hemangiosarcoma.

研究分野：分子生物学、皮膚病態学、ウイルス発癌、ゲノム解析

キーワード：血管肉腫 発癌ウイルス トランスクリプトーム解析 ヘルペスウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

沖縄・宮古島地方では、ウイルスがその発症に関与すると考えられる特徴的な幾つかの皮膚腫瘍・悪性腫瘍の発症率が世界的にも顕著に高い。中でも、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) による皮膚型の成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATL) とともに、カポシ肉腫と悪性血管内皮細胞肉腫 (血管肉腫) という、他地域では極めて稀な2つの血管性・リンパ管性の腫瘍の発症率が、非常に高いことが挙げられる。近年の HIV 依存性のカポシ肉腫にせよ、沖縄県に多い高齢者の古典型のカポシ肉腫にせよ、カポシ肉腫各型の発症にはヒトヘルペス 8 型 (HHV8) ウイルスの関与が知られている。この HHV8 への感染率が沖縄県、中でも宮古島では高いが、疫学的に非常に高率なカポシ肉腫の発生を説明しうるに十分な感染率とはいえず、沖縄県でのカポシ肉腫の高発生は、HHV-8 の潜在感染率が非常に高いためなのか、HHV8 以外にも発症に大きく寄与する因子が存在するためなのかは理解されていない。

今回の研究課題である、より激しい臨床経過をとる悪性血管内皮細胞肉腫 (血管肉腫) には、HHV8 の感染は病因としては関与せず、その病因となるウイルス・病原体の存在は全く同定されていない。実際に当科での解析においても、HHV-8 ウイルスや既存のヘルペスウイルス遺伝子断片は、この腫瘍細胞において遺伝子増幅されてこない。

この悪性血管内皮細胞肉腫 (血管肉腫) は、高齢者の顔部・頭部に小さな紫斑・皮下出血斑として発症し、数週から数ヶ月の経過で結節化・潰瘍化し、急速に拡大し顔貌を破壊すると共に、肺転移を頻発し肺や局所からの出血により死に至る。皮膚腫瘍、さらにはヒトの固形腫瘍の中でも最も悪性度が高く、現代医療でも手の施すすべのない腫瘍である。他地域との比較を念頭に置いた疫学的な解析は完成していないが、日常の臨床上の印象では、沖縄県以外の大学病院皮膚科においては、その新規発症患者は紹介を含め1年に1人程度であるが、琉球大学においては、1-2ヶ月に1人ほどの新規発症患者の診断・治療に当たっている。しかしながら診断確定後の平均生存日数は年に及ばない。

## 2. 研究の目的

本課題では、沖縄県・宮古島地方に多発する、悪性血管内皮細胞肉腫 (血管肉腫) の発症に関わる病原体・原因ウイルスの遺伝子断片の

探索を目的とする。琉球大学に数多い血管肉腫患者や疾患コントロールとしてのカポシ肉腫の組織を用い、血管肉腫患者の組織に共通して存在する、既知あるいは未知のウイルス遺伝子や外来遺伝子断片の存在を明らかにするのが一義的な目標である。本課題は、血管肉腫の原因ウイルス・外来性遺伝子の断片を発見し病態への糸口をつかみ、将来の診断法や治療法の開発にまでの発展を目的とする。

真皮の微小血管を発生母地とする腫瘍にはカポシ肉腫とこの血管肉腫が挙げられるが、両腫瘍とも沖縄・宮古島地方には非常に高率に発症する。この偏った地域発症性と、高齢者に多中心的に急速に発症する経過より、今回の研究対象である血管肉腫の発症にも、HHV8 以外の直接寄与する発癌ウイルスの存在を強く考える。

また診断的な面からも、このような血管肉腫に共通した遺伝子断片、さらには発現蛋白・特異蛋白の存在を見いだすことで、初期においてはしばしば病理診断に苦慮する血管肉腫の診断が、より迅速に確実に断定的に可能になり、さらには腫瘍特異的な免疫療法へ向けた1ステップになるかと考える。

## 3. 研究の方法

血管肉腫の発症メカニズムの解明の糸口となる、腫瘍組織内の外来遺伝子・病因ウイルスの可能性のある遺伝子断片を探索することが本研究課題の目標である。

### PCR による解析:

カポシ肉腫の発症には HHV-8 ウイルスが原因であることが知られている。本研究課題の対象である血管肉腫には、その病因となりうるウイルスの存在は未だは同定されていないが、一般にヘルペスウイルス一群は血管指向性が強い高腫瘍性ウイルスであることも知られている。そこで、まずこの血管肉腫の発症誘因の可能性として、ヘルペスウイルス全般の DNA を増幅しうる、degenerate タイプのプライマーを数種用意し、多様なアニール温度、塩濃度の条件で数人の血管肉腫患者の組織を幾度か PCR による遺伝子増幅を行った。

### ゲノム上でのサブトラクションによるスクリーニング:

ゲノム上での DNA サブトラクションクローニングは、RNA (cDNA) サブトラクションよりは遙かに困難であることは知られているが、最近では別種の皮膚腫瘍であるメルケル腫瘍において完遂され、その原因ウイルスである

メルケル細胞ポリオーマウイルス (MCV) が同定されている。

以下に、従来のゲノムサブトラクション法に若干の改良を加え解析を行う。

具体的なゲノムサブトラクション法として、新規血管肉腫患者の腫瘍組織より全DNAを抽出する。その全DNAを用いたサブトラクションを行う。沖縄地方からは遠い出身者の末梢血ゲノムDNAを対象として用いる。比較数倍量をピオチンラベルしたコントロール遺伝子断片と、腫瘍由来DNAを熱処理後にアニールシストレプトアビジンで沈降、上清のピオチンラベルされないDNA分画を回収するという手法を数回繰り返す。最終的に残存するDNA分画は非常に微量となり、そのままのライブラリー化は困難であると考えられる。サブトラクトされたDNA断片に均一性の高いPCR増幅をかけ、通常のプラスミドベクターにサブクローンシランダムで配列を決定する。

#### **cDNA サブトラクションによるスクリーニング:**

ゲノムでのサブトラクションとともに、血管肉腫、カポシ肉腫、正常ヒト培養血管内皮細胞 (HUVEC) の組織、細胞よりRNAを抽出し、型どおりcDNA化しサブトラクションライブラリーを作製しランダムシーケンズからノザンプロット法により発現プロファイルを決定する。このcDNAサブトラクション法により、血管肉腫・カポシ肉腫さらに正常ヒト培養血管内皮細胞の高度悪性、中等度悪性、正常の3種の血管内皮細胞に関して、遺伝子発現の変化を追跡する。真皮の微小血管が悪性化していく過程で、活性化されていく遺伝子群の単離・グループ化を行い、その腫瘍化ステップに必須の遺伝子発現のプロファイルを決定する副次的な目標がある。通常のマイクロアレー法を用いてしまうと、ヒトゲノム上に確定している遺伝子以外の、本研究課題の目的である外来性の遺伝子配列は、全く同定されることはなく探索し得ないため、旧来の手法であるサブトラクション法によるスクリーニングを行う。

#### **サブトラクト遺伝子断片のダイレクトシーケンズ**

プラスミドベクターへサブクローンした後の通常のシーケンズによる選別以外にも、同時にこの濃縮されたPCR断片を、直接新世代シーケンサーで解析する手法を考えている。サブトラクトの過程により有効に濃縮されていれば、全ゲノム配列の数十分の1のカバー率で情報が得られると考えられ、コ

スト的にも可能なレベルかと考える。沖縄県内には使用可能な新世代シーケンサーが数台設置されている。

#### **探索された遺伝子断片の腫瘍間の確認**

随時、確認された遺伝子断片の遺伝子配列は、その性状を遺伝子バンクで確認し、血管肉腫の組織に特異的に単離された断片については、他の血管肉腫組織由来のDNAを用い、PCRやザンプロット法により、疾患特異性を確認する。そのための血管肉腫組織由来のDNA、mRNAは十数検体より抽出されて保存されている。

#### **4. 研究成果**

##### **PCRによる解析**

既知の8種のヒトヘルペスウイルス遺伝子や、数十種類以上のヒト以外の動物感染性のヘルペスウイルス群に共通する遺伝子配列を選択し、イノシン残基を組み込み、アニール温度を数段階に調節することで、既知のヘルペスウイルスファミリーは全て増幅しえる遺伝子プライマーの組み合わせを数カ所に設定し、血管肉腫患者組織のDNAをテンプレートとして、PCR増幅を多様なアニール温度で試みた。しかし、HHV8を含め既知ヘルペスウイルスは全く増幅されず、ヘルペス群や新規のウイルスと思われる遺伝子配列の増幅は数例の血管肉腫の組織遺伝子より全く生じなかった。この解析より血管肉腫の原因ウイルスとして既知のヘルペス群に近い外来病原体の可能性は低いと考えた。一方、疾患コントロールであるカポシ肉腫の腫瘍組織からはHHV8ウイルス断片が容易に増幅・検出された。

##### **ゲノム上でのサブトラクションによるスクリーニング**

このサブトラクションライブラリーからも、未知の外来遺伝子の発現は確認されなかった。

患者腫瘍組織より直接RNAを抽出し、分画することなく全てを次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析用のライブラリーの基質とし、逐次、RNAとなっている遺伝情報を解析した。トランスクリプトーム情報より、ソフト解析により、ヒトのゲノム情報と一致する遺伝配列は自動的に除外し、ヒトゲノムに合致しない遺伝情報を集積した。

しかし毛包虫、表皮常在菌、カンジダ菌などの病態に関与がないと思われる微生物の遺伝子配列のみが観察された。結果的に患者腫瘍組織より直接的な遺伝子採取による全ト

ランスクリプトーム解析では、皮膚腫瘍においては、夾雑物としての表在性細菌、真菌などの予想以上に多数のヒト以外のゲノム情報に混在してしまい、血管肉腫の発症原因となるウイルスなどの外来生成物の存在の有無を決定するには至らなかった。

そこで、現在は血管肉腫患者の生検組織の余剰部位を用いて、培養細胞株の樹立を試みている。血管肉腫細胞株の樹立により、外来生成物の存在の有無を、主に次世代シーケンサーによるランスクリプトーム解析により決定する。さらに、腫瘍細胞株における遺伝子発現の動向をマイクロアレーとランスクリプトームの情報を合わせて解析することで、樹状細胞による免疫療法を目指した、腫瘍細胞抗原特異的な免疫賦活療法へ向けての、腫瘍抗原の同様に用いる。

上記の目的のため、現時点で、各種培養用の培地、血清の有無、培養へ導入する際の腫瘍組織の血管内皮細胞マーカーCD31, CD34 などの腫瘍細胞の濃縮方法などの確立をめざしている。

#### 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 16 件)

1. Primary cutaneous mucormycosis caused by *Mucor irregularis* in an elderly person. Yamaguchi S, Okubo Y, Katano A, Sano A, Uezato H, Takahashi K. *J Dermatol.* 2015 ;42(2):210-4. 査読有 doi:10.1111/1346-8138.12736.
2. An imported case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) donovani* in Japan. Ito K, Takahara M, Ito M, Oshiro M, Takahashi K, Uezato H, Imafuku S. *J Dermatol* 2014;41(10):926-8. 査読有 doi:10.1111/1346-8138.12609.
3. A case of mucocutaneous leishmaniasis diagnosed by serology. Okumura Y, Yamauchi A, Nagano I, Itoh M, Hagiwara K, Takahashi K, Uezato H, Maeda M, Seishima M. *J Dermatol.* 2014 ;41(8):739-42. 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12564.
4. Varicella zoster virus encephalopathy in a patient with psoriatic arthritis

treated with anti-TNF agents. Miyagi T, Yamaguchi S, Yamamoto Y, Ohira A, Yasumura R, Nakasone N, Uezato H, Takahashi K. *Eur J Dermatol.* 2014 May-Jun;24(3):398-9. 査読有 doi: 10.1684/ejd.2014.2331.

5. Glossal pigmentation caused by the simultaneous uptake of iron and tea. Yuriko KASUYA, Sayaka YAMAGUCHI, Yu-ichi YAMAMOTO, Hiroshi UEZATO, Kenzo TAKAHASHI *Eur. J. Dermatol.* 24(4) 1-2, 2014 査読有 doi: 10.1684/ejd.2014.2371.
6. CD8<sub>+</sub> tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma. Fujii H, Arakawa A, Utsumi D, Sumiyoshi S, Yamamoto Y, Kitoh A, Ono M, Matsumura Y, Kato M, Konishi K, Shiga T, Sano S, Sakaguchi S, Miyagawa-Hayashino A, Takahashi K, Uezato H, Miyachi Y, Tanioka M. *Int J Cancer.* 2014 ;134(10):2393-402 査読有 doi: 10.1002/ijc.28581.
7. Case of Darier's disease-associated skin eruption only at the site of heat stimulation with a heating pad. Sakurai K, Kitoh A, Takahashi K, Miyachi Y, Kabashima K. *J Dermatol.* 2013 ;40(5):407-8. 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12156.
8. Fixed eruption due to quinine in tonic water: A case report with high-performance liquid chromatography and ultraviolet A analyses. Ohira A, Yamaguchi S, Miyagi T, Yamamoto YI, Yamada S, Shiohira H, Hagiwara K, Uno T, Uezato H, Takahashi K. *J Dermatol.* 2013;40(8):629-31 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12195.
9. Case of palmoplantar keratoderma with sensorineural deafness and mental retardation that may be another variant of syndromic palmoplantar keratoderma. Utsumi D, Hanashiro F, Miyagi T, Yamamoto Y, Uezato H, Takahashi K. *J Dermatol.* 2013;40(7):579-80. 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12156.
10. Dissemination of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus in Okinawa, Japan. Mine Y, Nakasone I, Yamamoto Y, Utani A, Yamane N, Uezato H, Takahashi K. J Dermatol. 2013 ;40(1):34-8. 査読有  
doi:10.1111/j.1346-8138.2012.01569.x.

11. Mycobacterium smegmatis soft tissue infection. Shimizu F, Hatano Y, Okamoto O, Katagiri K, Fujiwara S, Sato S, Kato A, Uezato H, Asato Y, Takahashi K. Int J Dermatol. 2012;51(12):1518-20. 査読有  
doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04835.x.

12. Re-exacerbation of cutaneous lesions in Bazex syndrome (acrokeratosis paraneoplastica) without tumor recurrence. Ono S, Takahashi K, Miyachi Y, Kabashima K. Eur J Dermatol. 2012 ;22(6):809-11 査読有  
doi: 10.1684/ejd.2012.1877.

13. Case of Conradi-Hünemann-Happle syndrome with alopecia: Histological examination of affected follicles. Yajima M, Muroga E, Nomura T, Arakawa A, Takahashi K, Matsubara K, Kabashima K, Miyachi Y. J Dermatol.2012;39(12): 1059-60. 査読有  
doi: 10.1111/1346-8138.12113.

14. Treatment and prognosis of angiosarcoma of the scalp and face: a retrospective analysis of 48 patients K OGAWA, K TAKAHASHI, Y ASATO, Y YAMAMOTO, K TAIRA, S MATORI, S IRAHA, N YAGI, A YOGI, S HARANAGA, J FUJITA, H UEZATO and S MURAYAMA The British Journal of Radiology, 2012 ;85(1019):e1127-33 査読有  
doi: 10.1259/bjr/31655219.

15. Systemic lupus erythematosus complicated with protein-losing enteropathy: a case report and review of the published works. Awazawa R, Yamamoto Y, Mine Y, Nakamura I, Kishimoto K, Kinjyo F, Hagiwara K, Fujita J, Uezato H, Takahashi K. J Dermatol 39: 454-61, 2012. 査読有  
doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01404.x.

16. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism secondary to co-administration of thalidomide and oral corticosteroid in a

patient with leprosy. Yamaguchi S, Yamamoto Y, Hosokawa A, Hagiwara K, Uezato H, Takahashi K. Dermatol. 2012 ;39(8):711-4. 査読有り  
doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01404.x.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 21 件)

1. アミロイドーシス 皮膚疾患 最新の治療 2015-2016. 高橋健造 p153 渡辺晋一、古川福実編 南江堂 2015年.
2. 遺伝性皮膚疾患の発症メカニズム- (1) 高橋健造 西日本皮膚科 第76巻 2号 p131-139, 2014.
3. 遺伝性皮膚疾患の発症メカニズム- (2) 高橋健造 西日本皮膚科 第76巻 76巻3号 p230-241, 2014.
4. 掌蹠角化症の診断の決め手-診断名が分からないときの解決法は? 高橋健造 苦手な皮膚科外来100の解決法 p112-113 宮地良樹編集 2014年.
5. 毛孔性苔癬治療の決め手-尿素軟膏が効かないときの解決法は? 高橋健造 苦手な皮膚科外来100の解決法 p116-117 宮地良樹編集 2014年
6. イミキモドクリーム的作用機序 高橋健造 日本小児皮膚科学会雑誌 p73-74 第32巻 第3号 2013年.
7. 先天性角化不全症 Dyskeratosis Congenita :Zinsser-Cole-Engman 症候群 高橋健造 皮膚科臨床アセット 15 :母斑と母斑症 pp325-329 古江増隆 総編集 中山書店 2013年.
8. 角化症 : 毛孔性苔癬、魚鱗癬、掌蹠角化症 高橋健造 今日の治療と看 pp01098-1099 永井良三、大田 健 総編集 南江堂 2013年.
9. ネザートン症候群 : アトピー性皮膚炎として誤診 高橋健造 誤診されている皮膚疾患 pp040-043 宮地良樹編 メディカルビュー社 2013年.

10. 先天性表皮水疱症：靴づれとして誤診  
高橋健造 誤診されている皮膚疾患 宮地良  
樹編 pp.340-343 メディカルビュー社  
2013年.

11. 思春期の皮膚のトラブル QOL 総論 1  
思春期における皮膚の特徴は？高橋健造 P  
2-7 宮地良樹編 診断と治療社 2012年.

12. 思春期の皮膚のトラブル QOL 各論 1  
5 Gibert ばら色秕糠疹への対処法は？  
高橋健造 P2137-139 宮地良樹編 診断と治  
療社 2012年.

13. 今日の治療と看護 (改訂第3版)  
病名：角化症(毛孔性苔癬、魚鱗癬、掌蹠角  
化症など) 4枚(図を含む) 高橋健造

14. 今日の治療指針 2013年版- わたしは  
こう治療している。ウイルス性疣贅(イボ)  
と伝染性軟属腫(水いぼ) Viral wart and  
Molluscum Contagiosum 高橋健造

15. 女性の皮膚のトラブル QOL 第2章、女  
性の特有の皮膚疾患 Q8 更年期角化症と  
は？ 高橋健造 Pp112-118 宮地良樹編  
診断と治療社 2012年.

16. ダリエー病の治療薬の 開発に向けての  
工夫 その過程で感じたこと、教わったこと  
など 第26回角化症研究会 記録集  
高橋健造 pp128-133 協和企画 2012年.

17. プライマリ・ケアのための鑑別診断のポ  
イント 毛孔性角化を主徴とする疾患  
Diseases manifesting follicular keratosis  
高橋健造 今日の皮膚疾患治療指針 第4版  
pp96-98 塩原哲夫、宮地良樹、渡辺晋一、佐  
藤伸一編 医学書院社 2012年.

18. 治療 ダリエー病の治療薬の探索と病  
態の理解 高橋健造 皮膚病診療 2012  
Vol.34 No.3 p305-310.

19. What 's New in 皮膚科学 2012-13  
生物製剤におけるパラドックス反応  
高橋健造 pp62-63 宮地良樹編 メディカル  
レビュー社 2012年2月18日発行

20. 日本皮膚科学会第62回西部支部学術大会  
印象記 高橋健造 西日本皮膚科 第73巻3号

21. 扁平苔癬 Lichen Planus 高橋健造  
今日の治療指針 2012年 pp1036-1037  
山口徹、北原光夫、福井次矢 総編集  
医学書院 2012年.

〔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：  
出願年月日：  
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

高橋健造 (TAKAHASHI Kenzo)  
琉球大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80291425

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし