

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860829

研究課題名(和文)悪性腫瘍における新規癌ウイルス感染実態の解析と発癌との関連について

研究課題名(英文)Prevalence of tumor viruses in malignancies and their possible role in the oncogenesis

研究代表者

谷口 亜裕子(Taniguchi, Ayuko)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：30403885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メルケル細胞ポリオマウイルス(MCPyV)はヒトポリオマウイルスとしては初めての癌ウイルスである。本研究では多様な悪性腫瘍におけるMCPyVの蔓延性を調べた。その中で、脳腫瘍の中でも悪性度の高い膠芽種において得られた知見を述べる。近年、欧米において膠芽腫症例の大部分でヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の感染が認められるとの報告があり、病因との関与が指摘された。今回の我々の結果は、MCPyVおよびHCMV感染と膠芽腫との間に因果関係は示されなかった。その一方で、ハイリスク型のヒトパピローマウイルス(HPV)感染が一部の膠芽腫に認められ、HPVが膠芽腫の病態形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is the first polyomavirus that induces human malignancies. In this study, we investigate the prevalence of MCPyV in various malignancies. We described here our new findings on relationship between various viruses and glioblastoma multiforme (GBM), the most aggressive primary brain tumor. Recent studies stemmed from American and European populations showed that human cytomegalovirus (HCMV) DNA sequences were detected in a large portion of GBM, suggesting the pathogenetic role of HCMV in the development of GBM. The present study showed that any of our patients with GBM did not carry MCPyV in the tumors. In contrast with previous reports, our results did not support the association between HCMV and GBM. However, our investigations demonstrated the presence of the viral genome and protein of high-risk-type human papillomavirus (HPV) in a subset of Japanese patients with GBMs. Thus, HPV infection may play a potential etiological role in gliomagenesis.

研究分野：感染症学

キーワード：ウイルス 腫瘍 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

多くの悪性腫瘍の発症にウイルスが関係していることが知られており、ウイルスの潜伏感染、持続感染が腫瘍への発展に関与する。

従来、以下に示す6つの癌ウイルスが知られていた。

- ◇ EBウイルス(EBV)
- ◇ B型/C型肝炎ウイルス(HBV/HBC)
- ◇ ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)
- ◇ ヒトパピローマウイルス(HPV)
- ◇ ヒトヘルペスウイルス8型(HHV-8)

2008年、ヒトに癌を惹起する第7番目の癌ウイルスとして、メルケル細胞癌(MCC)からメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)が報告された。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として注目を浴びている。しかし、MCC以外の腫瘍についての蔓延性、発癌機序、細胞指向性などについては明らかにされていない現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では多様な悪性腫瘍におけるMCPyVの蔓延性を調べた。造血器悪性腫瘍の中で、これまでMCPyVと関連性があると報告された慢性リンパ性白血病、およびMCPyVが単球系白血病(急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、慢性骨髄単球性白血病)におけるMCPyV感染の有無を調べた。いずれの腫瘍においても、直接的なMCPyVの関連性は見出されなかった。

ここでは脳腫瘍、特に膠芽種において得られた知見を述べる。膠芽腫は神経膠細胞由来の悪性腫瘍(神経膠腫)の中でも未分化で増殖能の高い腫瘍である。脳腫瘍全体の約1割を占め、極めて進行が早く、最も悪性度の高い脳腫瘍である。病因は不明であり、現在までに効果的な治療法は確立されておらず、その病態全容の解明が求められている。

ポリオーマウイルスは以前より、脳腫瘍の成因に直接的あるいは間接的に関係するとの報告がなされているが、その関連性についてはいまだ十分な知見が得られていないのが現状である。そこで新規癌ポリオーマウイルスであるMCPyVと膠芽腫の関係を調べることが目的とした。

その一方で、近年、欧米において膠芽腫の90%以上でヘルペスウイルスに属するヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の感染が認められるとの報告があり、病因との関与が指摘された。既にHCMVに対する抗ウイルス薬を用いた膠芽腫の治療が始められており、大幅な予後改善が認められているとの報告もなされた(Söderberg-Nauclér et al. N Engl J Med, 369: 985-986, 2013)。しかしながら、膠芽腫とHCMV感染との関連性に疑問を呈する報告もあり、その実態は未解決のままである。これらの報告の大部分は欧米からのもの

であり、日本人を含めたアジア人症例での研究報告は極めて少ない。したがって、本研究では、本邦の膠芽腫でのHCMVの感染実態を明らかにするとともに、HCMV以外の種々のウイルスの関与の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象としたウイルス

HCMV EBV HPV ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6) HHV-8 MCPyV  
ヒトポリオーマウイルス7型(HPyV7) ヒトポリオーマウイルス9型(HPyV9) JCウイルス(JCV) BKウイルス(BKV)の10種のウイルスについて、膠芽腫との関係を調べた。

### (2) 症例

本邦の膠芽腫症例39例について解析した。内訳は男性22例、女性17例で、年齢は4歳から88歳で、その中央値は68歳であった。

### (3) DNA抽出

31例のパラフィン包埋切片および8例の凍結組織よりDNAを抽出した。パラフィン包埋切片からのDNA抽出にはReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega)を、凍結組織からのDNA抽出にはQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。

### (4) ウイルスの検出と定量

200 ngのDNAを鋳型として、定量的リアルタイムPCRによりウイルスの検出を行った。StepOne Plus Real-Time PCR Systemを使用し、TaqManプローブ法で解析した。ウイルスコピー数の算出に必要な標準曲線を描くために、標準サンプルのプラスミドを作成した。この検量線をもとに細胞あたりのウイルス量を算出した。

$$\text{ウイルスDNA量} = \text{ウイルスDNAコピー数} / \text{ヒトRNaseP(細胞DNA)コピー数}$$

### (5) 免疫組織染色

ウイルスDNAが検出された症例では、ビオチン-アビジン法で免疫組織染色を行い、ウイルス由来抗原の発現があるかどうかを調べた。

## 4. 研究成果

まず5種類のポリオーマウイルスの検出を行った。調べた全ての症例で、MCPyV、HPyV7、HPyV9、JCV、BKVは検出されなかった。したがって、本邦発症の膠芽腫の病因にポリオーマウイルスは関係していないとの結論に至った。

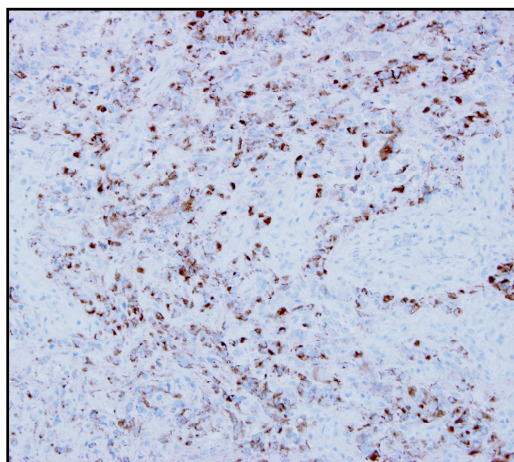
次に、4種類のヘルペスウイルス(HCMV、EBV、HHV-6、HHV-8)について調べた。欧米の膠芽腫症例において、高頻度で検出されると報告されているHCMVについて詳細に解析した。定量的リアルタイムPCR法では、異なる2つのHCMVゲノム領域(immediate early: IEとglycoprotein B: gB)を標的にして定量を行った。我々が樹立した検出系では、少なくとも1.5 HCMVコピーのゲノムを検出するこ

とが可能であった。これは 0.0008 コピー/cell に相当する感度である。陽性コントロールとして、HCMV 陽性肺炎、HCMV 陽性腸炎、HCMV 陽性肺炎のパラフィン包埋切片を使用した。調べた 39 例の膠芽腫において、HCMV IE 遺伝子、HCMV gB 遺伝子はいずれも検出されなかった。また、さらに検出感度を上げるために、gB 遺伝子を標的に nested PCR 法で HCMV の検出を試みたが、同様に陽性例は認められなかった。これらの結果は、本邦発症の膠芽腫とポリオマウイルス感染に因果関係が認められないことを示すものであった。この知見は欧米からの報告とは異なるものであるが、膠芽腫における HCMV の感染率の相違は人種差による可能性も残された。実際、膠芽腫の発生頻度はアジア人より欧米人（ヨーロッパ祖先）に多いことが報告されている。我々の知見は、HCMV 感染と膠芽腫の関係について、世界的な研究調査が必要であることを強調するものである。

EBV と HHV-8 は癌ウイルスとして知られているウイルスである。HHV-6 は突発性発疹の原因となるヘルペスウイルスであるが、脳腫瘍との関係を示唆する報告もある。定量的リアルタイム PCR 法で、EBV、HHV-8、HHV-6 とともに、膠芽腫において、検出されなかった。

HPV は子宮頸癌や中咽頭癌を惹起する癌ウイルスである。HPV が膠芽腫で検出されるかどうかを調べた。HPV16 型と HPV18 型が検出可能な定量的リアルタイム PCR で、膠芽腫 39 症例中 3 例（7.7%）で HPV が検出された。内 1 例は HPV16 型で、ウイルスコピー数は 0.13/PCR reaction であった。あとの 2 例は HPV18 型であり、そのウイルスコピー数は 0.05/PCR reaction と 0.18/PCR reaction であった。これらの結果を受けて、HPV16 型と HPV18 型以外の HPV ゲノタイプに感染している膠芽腫症例が存在する可能性を考え、nested PCR で HPV ゲノムの検出を試みた。その結果、膠芽腫 39 症例中 8 例（21%）で陽性となった。いずれも 16 型、18 型のハイリスク型の HPV であった。その内訳は、6 例が HPV16 型で、2 例が HPV18 型であった。

HPV が一部の膠芽腫症例で検出されたことを踏まえ、次にこれらの症例で HPV 由来蛋白が発現されているかを免疫組織染色で調べた。ここで用いた抗体は K1H8 で、これは HPV6、11、16、18、31、33、42、51、52、56、58 型のカプシド蛋白に反応する抗体である。PCR 法で HPV 陽性となった症例の内、3 例が免疫組織染色による解析が可能であった。3 例共に HPV カプシド蛋白の発現が腫瘍細胞の核に認められた。その結果の代表例を「図」に示す。3 例共に HPV カプシド蛋白の発現が腫瘍細胞の核に認められた。これらの結果は、一部の膠芽腫では HPV のゲノムの存在のみならず、HPV が腫瘍細胞で複製し、ウイルス由来蛋白を発現していることを示している。



(図の解説) HPV カプシド蛋白に対するモノクローナル抗体 (K1H8) を使った免疫組織染色の結果。腫瘍細胞の核に陽性シグナル(茶色)が認められる。ヘマトキシリンにて対比染色を行っている。

以上まとめると、新規癌ウイルスの MCPyVをはじめ、種々のポリオマウイルス (HPyV7、HPyV9、JCV、BKV) およびヘルペスウイルス (HCMV、EBV、HHV-6、HHV-8) と膠芽腫との間に因果関係は認められなかった。その一方で、ハイリスク型の HPV 感染が一部の膠芽腫に認められ、HPV が膠芽腫の病態形成に関与する可能性が示唆された。最近、Vidone らは、イタリア人の膠芽腫症例 52 例中 12 症例（23%）で HPV DNA が検出されたと報告した (Neuro-Oncology, 16: 298-302, 2014)。HPV 検出率は我々の結果（21%）とほぼ同様であった。一方、Vidone らの報告では、HPV 陽性例のゲノタイプの内訳は 3 例が HPV16 型で、9 例がローリスク型の HPV6 型であった。これは、我々の結果はすべてハイリスク型の HPV が検出されたことと異なる所見であった。今回、我々は発生頻度が人種差で異なる膠芽腫において、アジアで初めて HPV の関連性を示すことができた。今後、膠芽腫の病因および病態修飾に関わる HPV 感染について、世界的な研究調査が望まれる。

## 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7件)

Ayuko Taniguchi, Yumiko Hashida, Yuiko Nemoto, Hisanori Machida, SungGi Chi, Takayuki Ikezoe, Akihito Yokoyama, Masanori Daibata. Epstein-Barr virus-positive pyothorax-associated lymphoma arising from a posttraumatic empyema. Acta Haematologica. 査読有. 134:155-160, 2015. DOI: 10.1159/000380809.

Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, Masanao Murakami, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, Masanori Daibata. Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infectious Agents and Cancer*. 査読有. 10: 3, 2015. DOI: 10.1186/1750-9378-10-3.

谷口 亜裕子, 池添 隆之, 竹内 麻子, 砥谷 和人, 吉本 光広, 谷岡 克敏, 北岡 裕章, 横山 彰仁. 多発性冠動脈内血栓症を併発しエクリズマブが著効した発作性夜間ヘモグロビン尿症 (Successful eculizumab treatment for multiple coronary thrombosis complicated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) *臨床血液*. 査読有. 55: 965-969, 2014. URL: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/55/8/55\\_965/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/55/8/55_965/_article/-char/ja/)

Yumiko Hashida, Masayuki Imajoh, Mikio Kamioka, Ayuko Taniguchi, Naoto Kuroda, Kazuhiko Hayashi, Hideki Nakajima, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata. Phylogenetic analysis of Merkel cell polyomavirus based on full-length *LT* and *VP1* gene sequences derived from neoplastic tumors in Japanese patients. *Journal of General Virology*. 査読有. 95: 135-141, 2014. DOI: 0.1099/vir.0.058149-0.

Takayuki Ikezoe, Asako Takeuchi, SungGi Chi, Masato Takaoka, Kazuki Anabuki, Tsukie Kim T, Mizu Sakai, Ayuko Taniguchi, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. Effect of recombinant human soluble thrombomodulin on clinical outcomes of patients with coagulopathy after hematopoietic stem cell transplantation. *European Journal of Haematology*. 査読有. 91: 442-447, 2013. DOI: 10.1111/ejh.12188.

Yumiko Hashida, Masayuki Imajoh, Ayuko Taniguchi, Mikio Kamioka, Masanori Daibata. Absence of Merkel cell polyomavirus in monocytic leukemias. *Acta Haematologica*. 査読有. 130: 135-137, 2013. DOI: 10.1159/000347174

Ayuko Taniguchi, Yumiko Hashida, Yuiko Nemoto, Takahiro Taguchi, Yoshito Iwahara, Masanori Daibata.

Pyothorax-associated lymphoma (PAL) with biclonal Epstein-Barr virus infection: characterization of a novel PAL cell line with unique features. *Leukemia Research*. 査読有. 37: 1545-1550, 2013. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.07.033.

[学会発表](計11件)

Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, Moe Tanaka, Masanao Murakami, Mikio Kamioka, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, and Masanori Daibata. Virus infection in glioblastoma multiforme (GBM): Possible association of human papillomavirus with pathogenesis of GBM. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015年11月22日~2015年11月24日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Masakazu Mori, Takayuki Ikezoe, Makoto Hiroi, Sunggi Chi, Yu Arakawa, Mizu Sakai, Ayuko Taniguchi, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. Incidence and prophylaxis of herpes zoster in patients with myeloma in the era of novel agents. 第77回日本2015年10月血液学会学術総会 2015年10月16日~18日. 石川県立音楽堂, ANA クラウン プラザホテル金沢, ホテル日航金沢, ホテル金沢, 金沢市アートホール, もてなしドーム(石川県・金沢市)

荒川 悠, 窪田 哲也, 谷口 亜裕子, 横山 彰仁. 好中球減少期に起こった *Streptococcus mitis* 菌血症の検討. 第85回日本感染症西日本地方会学術集会. 2015年10月15日~2015年10月17日. 奈良春日野国際フォーラム 麓~I・RA・KA・奈良ホテル(奈良県・奈良市)

山本 ゆい, 森 正和, 弘井 誠, 荒川 悠, 池成 基, 酒井 瑞, 谷口 亜裕子, 砥谷 和人, 池添 隆之, 横山 彰仁. 急激な経過で両手指の虚血性壊死をきたしたリンパ形質細胞性リンパ腫. 第55回日本リンパ網内系学会総会. 2015年7月9日~2015年7月11日. 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

橋田 裕美子, 八幡 俊男, 村上 雅尚, 谷口 亜裕子, 上岡 樹生, 上羽 哲也, 大畑 雅典. 膠芽腫におけるウイルス感染の調査. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10~2014年11月12日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

SungGi Chi, Takayuki Ikezoe, Masato Takaoka, Tsukie Tsukuda, Mizu Sakai, Asako Takeuchi, Ayuko Taniguchi, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. Biosimilar filgrastim is comparable to reference products in managing neutropenia in lymphoma cases. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年10月31日~2014年11月2日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

Yu Arakawa, Asako Takeuchi, SungGi Chi, Masato Takaoka, Tsukie Tsukuda, Kazuki Anabuki, Mizu Sakai, Shigeo Kawase, Ayuko Taniguchi, Hiroshi Ohnishi, Takayuki Ikezoe, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. A case of MDS with pulmonary manifestation and pathergy reaction test positive Sweet's disease. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年10月31日~2014年11月2日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

江田 雅志, 谷口 亜裕子, 竹内 麻子, 砥谷 和人, 池添 隆之, 吉本 光広, 谷岡 克敏, 北岡 裕章, 横山 彰仁. 発作性夜間ヘモグロビン尿症に併発した繰り返す冠動脈内血栓症に対してエクリツマブが著効した一例. 第53回日本血液学会中国四国地方会. 2014年3月1日. 徳島大学蔵本キャンパス大塚講堂 (徳島県・徳島市)

Hiroshi Ohnishi, Kazuto Togitani, Mizu Sakai, Ayuko Taniguchi, Takayuki Ikezoe, Tetsuya Kubota, Akihito Yokoyama. Pulmonary complications as an independent prognostic factor in patients with hematologic malignancies. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013年11月11日~2013年11月14日, Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan)

Sunggi Chi, Takayuki Ikezoe, Asako Takeuchi, Kazuki Anabuki, Tsukie Kim, Mizu Sakai, Ayuko Taniguchi, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. Recombinant thrombomodulin improves clinical outcome in patients with coagulopathies after HSCT. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月11日~2013年10月13日, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市)

谷口 亜裕子, 池添 隆之, 砥谷 和人, 佐藤 哲也, 大畑 雅典, 横山 彰仁. A case of Hodgkin lymphoma associated

with chronic active Epstein-Barr virus infection. 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2013年8月29日~2013年8月31日, 仙台国際センター、東北大学百周年記念会館川内萩ホール (宮城県・仙台市)

〔図書〕(計1件)

谷口 亜裕子, 大畑 雅典. 医薬ジャーナル社. 血液フロンティア. EBウイルスが関与するホジキンリンパ腫. 2016年. 148 (47-53).

〔その他〕

ホームページ等

高知大学医学部血液・呼吸器内科

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~hs\\_intr3/](http://www.kochi-ms.ac.jp/~hs_intr3/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 亜裕子 (TANIGUCHI, AYUKO)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号: 30403885