

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461162

研究課題名(和文) 感染・炎症に関連して発生する呼吸器腫瘍の病態および腫瘍化機構の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis and tumorigenesis of respiratory neoplasm occurring in infection and inflammation

研究代表者

上岡 樹生 (Kamioka, Mikio)

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：00274374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん関連死亡率の中で多数を占める肺癌の発症に喫煙は最大の原因であることはよく知られているが、近年、非喫煙者の中での肺癌が増加している。本研究では、皮膚の神経原性腫瘍であるメルケル細胞腫から検出されたメルケル細胞ポリオームウイルスに着目し、非喫煙者における肺癌発症の原因となり得るかを検討している。欧米型のウイルスベクターとアジア型のウイルスベクターによる肺癌由来の細胞株への感染実験を行い、その感染性に差異の認められることを見出した。欧米型とアジア型の2つの感染肺癌細胞株における発現遺伝子のプロファイリングを行い、その差を比較することで、病態との関連性を明らかにすることが必要である。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is a leading cause of cancer-related mortality. Although smoking is the major risk factor for the development of lung cancer, the number of lung cancer occurring in never smokers has increased in recent times. In this study, we focused on Merkel cell polyoma virus (MCPyV) detected in Merkel cell tumor, a neurogenic tumor of the skin. We examined that Merkel cell polyoma virus is factor of lung cancer in never smokers. Transfection analyses to lung cancer cell lines derived from Caucasian or Asian virus vectors were performed and detected to be different in infectious form.

It is necessary to profile the expression in the MCPyV-transformed lung cancer cell lines and clarify the relationship with the pathogenesis and tumorigenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：呼吸器悪性腫瘍 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、地球的規模で肺癌が増加し続けており、世界で年間 130 万人ほどの肺癌死亡がみられる。わが国においても肺癌死亡は一貫増え続けており、癌死亡の第一位を占め、危惧すべきいわば国民病とも言える。喫煙は肺癌の最大の原因であるが、非喫煙者の非小細胞肺癌 (NSCLC) は近年増加し、NSCLC の約 20% 以上は喫煙以外に、遺伝的素因、環境因子、ウイルスの関与が示唆されてきたが、最近の世界的疫学研究結果は喫煙以外の因子の関わりを強く示している。また日本においても一部の肺癌の発症に地域差がみられ、ウイルス関与の可能性は残されたままである。

世界中において、ウイルスや細菌の持続感染が起因となる癌 (= 感染癌) は、全癌の約 20% も占める。呼吸器悪性腫瘍における腫瘍ウイルスの関与については、Human papillomavirus (HPV)、Epstein-Barr virus (EBV)、および simian virus 40 (SV40) や JC virus (JCV) などのポリオーマウイルスで報告があるが、その関与については世界で地域差がある。しかし、本邦におけるウイルスに関する研究報告は欧米に比べ十分なデータが蓄積されているとは言えないのが現状である。

2008 年に皮膚癌の一種であるメルケル細胞癌 (MCC) からメルケル細胞ポリオーマウイルス (MCPyV) が検出された。MCPyV は SV40 や JCV と同じポリオーマウイルスに属するが、ヒトポリオーマウイルスとしては初めての「癌ウイルス」として認められた。現在、MCC 以外の腫瘍でも発癌に関係するのか世界中で注目を浴びている。これまでに我々は、一部の NSCLC において MCPyV のゲノムや蛋白を検出した。しかも検出されたウイルスが野生型ではなく、腫瘍特異的感染形態をとって存在することを突き止めた。皮膚癌の一種であるメルケル細胞癌以外の癌で、このような感染形態を証明したのは初めてであった。

2. 研究の目的

悪性腫瘍の発症において、ウイルスや細菌の持続感染が直接あるいは間接的に関与している事実を探求する。この中で近年、非喫煙者において増加の傾向にある非小細胞肺癌を取り上げ、喫煙以外の何らかの環境因子としてウイルス感染が関わっている可能性について検討する。これまで申請者は新規癌ウイルスである MCPyV に着目し、NSCLC における MCPyV の発癌性を突き止めた。この結果をさらに発展させることにより、「肺癌と MCPyV」に関する研究の先駆的役割を担う成果を目指す。

3. 研究の方法

「感染・炎症を基盤に発症する呼吸器悪性腫瘍」の腫瘍化機序と病態解析を明らかにするため、新規腫瘍ウイルス MCPyV の未解決点を解明する。すなわち、非小細胞肺癌における蔓延性、発癌性の証明、腫瘍と MCPyV の遺伝子型との関係、感染に伴う (宿主) 側遺伝子の発現、ウイルス陽性例の臨床学的特徴について調べる。

MCPyV が発癌に関係することを論じるため、MCPyV ゲノムの検出に加えて、以下の方法を用いた。検体については、当該大学倫理委員会で定められた規則に従い (すでに承認済み) 手術摘出凍結標本およびパラフィン包埋ブロックから DNA を抽出し、MCPyV LT 領域と VP1 領域を標的にした通常の PCR を行い、次に申請者らが既に構築している定量的リアルタイム PCR 法を用いて、ウイルスゲノムのコピー数を測定した。更に、MCPyV Small T 領域を標的にした標準曲線と RNaseP の内部標準を基に算定した。

潜伏持続感染を維持するために、LT 遺伝子の特定領域に変異あるいは欠失が生じ、MCPyV DNA ヘリカーゼが失活する、つまり溶解感染への移行がないことを明らかにする。MCPyV LT 遺伝子領域の全配列を決定するために、PCA 法あるいは複数のプライマーをつなぎ合

わせて PCR 法を繰り返し、得られた産物のシーケンスを解析に供する。その塩基配列を野生型（非腫瘍型）MCPyV と比較し、LT 遺伝子の変異を解析する。

MCPyV 宿主細胞の染色体に組み込まれることを明らかにするため、DIPS(detection of integrated papilloma sequences)-PCR 法で解析する。

MCPyV の腫瘍化賦与と細胞（宿主側）遺伝子の発現解析

申請者らは MCPyV 発現ベクター（ウイルス全ゲノムを有し、ウイルス粒子産生可能）を既に作製した。このベクターを様々なヒト気管支上皮細胞やヒト肺線維芽細胞へ導入し、MCPyV の遺伝子発現がみられるかを解析し、本ウイルスの細胞指向性を明らかにする。また MCPyV 導入後に細胞増殖能亢進など、悪性形質が獲得されるかを調べる。さらに cDNA マイクロアレイや次世代シーケンサー解析にて、ウイルス感染特異的に発現変化する細胞遺伝子の特定を行う。

4. 研究成果

メルケル細胞ポリオーマウイルスが非小細胞肺癌細胞に感染し得ることを確認するために、既に得られているクローニングされた全塩基配列を有する欧米由来のメルケル細胞ポリオーマウイルスプラスミドを、Lipofectamine 3000 (Invitrogen)により、非小細胞肺癌細胞株 H1299 に導入した。その後、ウイルス由来 mRNA と蛋白が発現されているかを RT-PCR 法とウエスタンブロット法で解析した。その結果、メルケル細胞ポリオーマウイルス DNA 導入肺癌細胞 H1299 において、ウイルス mRNA のみならず、ウイルス由来蛋白の large T antigen (LT) と viral protein 1 (VP1) の発現が起きることを見出した。これらの所見は、メルケル細胞ポリオーマウイルスが非小細胞肺癌細胞に感染し、複製できることを示唆するものである。神経

原性腫瘍由来細胞株 PFSK-1 についても、LT と VP1 の発現を確認することが出来た。同様の感染実験をヒト非小細胞肺癌細胞株 H460, H520, 胃癌細胞株 AGS, ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549, ホジキンリンパ腫由来細胞株 HD70, 慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 など様々な細胞株に行ったが、VP1 の発現が確認できたのは A549, AGS, K562 であった。

当該研究者はこれまでに、肺癌症例で 5 番染色体(5q23)、11 番染色体(11q25)に MCPyV の組み込みを証明している。今回、MCPyV ベクターを感染させた H1299 細胞について、DIPS-PCR 法にて検出を試みたが、有意な PCR 産物は得ることが出来なかった。

この時点までに用いたウイルスベクターについては欧米人患者由来のベクターであった。当該研究者らは肺癌発症の地域格差に MCPyV の遺伝情報に関する差が、反映されている可能性について言及している。この点を明らかにするため、感染実験で用いるプラスミドをアジア型と欧米型に分けて検討した。欧米由来の MCPyV ベクターと、当該施設でクローニングされた全塩基配列を有する日本人由来のアジア型メルケル細胞ポリオーマウイルスベクターを用いた感染実験を行った。H1299 では欧米型でもアジア型でも RT-PCR において感染が確認できたが、A549, PFSK-1, K562, AGS では欧米型のみ RT-PCR で感染が確認できたが、アジア型では感染は確認できなかった。さらに、蛋白発現に関しては H1299 の欧米型ウイルス感染のみで確認できた。これらの結果により、アジア型ウイルスと欧米型ウイルスでは感染形態に差がある可能性が考えられた。

この考えを進めるため、非小細胞肺癌細胞において、メルケル細胞ポリオーマウイルスの欧米型とアジア型で感染形態が異なる可能性を検討するために、感染によって得られた H1299 における発現遺伝子のプロファイリン

グを行い、病態との関連性を明らかにすることを試みた。H1299 への感染実験で得られた RNA のプロファイリングを cDNA subtraction により解析することで、アジア型と欧米型それぞれのウイルス感染で起こる発現の差を検討した。この結果、欧米型では MALAT1 という non-coding RNA の発現が多くみられた。MALAT1 は文献的には肺癌の発症とは大きな関連性はないとの報告が多く、また non-coding RNA であるため蛋白産生は起こらない遺伝子であるため、発癌について有意な遺伝子とは考えにくく、今後マイクロアレイ、RNAseq などの方法による検討を加えていく必要がある。

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 6 件)

Intravascular hemolysis in patients with mitral regurgitation: Evaluation by erythrocyte creatine: Sugiura T, Okumiya T, Kamioka M, Kubo T, Hirakawa Y, Hisahara T, Matsumura Y. J Cardiol. 査読有 2018 Apr;71(4):414-418. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.10.006.

Sugiura T, Kamioka M, Yamanaka S, Hisahara T, Hirakawa Y, Matsumura Y: Relationship between matrix metalloproteinase-3 serum level and pulmonary artery systolic pressure in patients with rheumatoid arthritis Heart Vessels. 査読有 2018 Feb;33(2):191-197 doi: 10.1007/s00380-017-1045-9.

Differential gene expression profiling linked to tumor progression of splenic marginal zone lymphoma: Higuchi T, Hashida Y, Taniguchi A, Kamioka M, Daibata M. Sci Rep. 査読有 2017 Sep 8;7(1):11026. doi:

10.1038/s41598-017-11389-5.

Hashida Y, Kamioka M, Tanaka M, Hosokawa S, Murakami M, Nakajima K, Kikuchi H, Fujieda M, Sano S, Daibata M: Ecology of Merkel Cell Polyomavirus in Healthy Skin Among Individuals in an Asian Cohort. J Infect Dis. 査読有 2016 June;213:1708-16. doi: 10.1093/infdis/jiw040.

Sugiura T, Yamanaka S, Takeuchi H, Morimoto N, Kamioka M, Matsumura Y: Autoimmunity and pulmonary hypertension in patients with Graves' disease. Heart Vessels. 査読有 2015 Sep;30(5):642-6. doi: 10.1007/s00380-014-0518-3.

Murakami M, Hashida Y, Imajoh M, Maeda A, Kamioka M, Senda Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H, Daibata M: PCR array analysis of gene expression profiles in chronic active Epstein-Barr virus infection. Microbes Infect. 査読有 2014 Jul;16(7):581-6. doi: 10.1016/j.micinf.2014.04.004.

[学会発表](計 7 件)

上岡樹生, 宮尾恵示, 竹内啓晃, 久原太助, 岡崎瑞穂, 杉浦哲朗, 山中茂, 松村敬久: 頸動脈病変による幼若血小板分画への影響 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会、2017.11 月 16-19 日 国立京都国際会館(京都市)

上岡樹生, 橋田裕美子, 大畑雅典, 竹内啓晃, 杉浦哲朗, 松村敬久: 膠芽腫におけるウイルス感染 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会、2016.9 月 1-4 日 神戸国際会議場(神戸市)

吉良瑞喜, 岡崎亜美, 森本徳仁, 上岡樹生,

松村敬久, 杉浦哲朗, 竹内啓晃 : 同一患者における *Helicobacter pylori* の生化学的および遺伝子多様性の検討, 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会、2016.9 月 1-4 日 神戸国際会議場 (神戸市)

橋田裕美子、村上雅尚、細川世奈、田中望紅、八幡俊男、谷口亜裕子、上岡樹生、弘井誠、上羽哲也、大畑雅典 : Virus infection in glioblastoma multiforme (GBM): Possible association of human papillomavirus with pathogenesis of GBM 膠芽腫とウイルス感染 : ヒトパピローマウイルスとの関連について 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015、11 月 22-24 日 福岡国際会議場 (福岡市)

上岡樹生・橋田裕美子・松村敬久・大畑雅典・杉浦哲朗 : 非小細胞肺癌発症におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの関与 第 62 回臨床検査医学会学術集会、2015 年 11 月 19-22 日 長良川国際会議場、岐阜都ホテル (岐阜市)

Masanao Murakami, Yumiko Hashida, Mikio Kamioka, Yoshihiro Kawasaki, Kazuyosi Yanagihara, Shigetoshi Matsuzasi, Tetsu Akiyama, and Masanori Daibata : Nm23-H1 regulates cell migration via interaction with Asef1 and Asef2. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10 月 8-10 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)

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 2014.11 月 10-12 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

〔その他〕
ホームページ等
高知大学医学部病態情報診断学講座
http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_cIncl/acc

ess.html
高知大学微生物学講座
http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_mcrbi/gyouseki.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上岡樹生 (KAMIOKA Mikio)
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 : 00274374

(2) 研究分担者

大畑雅典 (DAIBATA Masanori)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授
研究者番号 : 50263976

(3) 研究分担者

村上雅尚 (MURAKAMI Masanao)
高知学園短期大学・医療衛生学科医療検査専攻・准教授
研究者番号 : 80571017