

平成 29 年 9 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460433

研究課題名(和文)メルケル細胞癌のMCPyV陽性群と陰性群の発癌機序比較に基づく治療法探索

研究課題名(英文) Analysis on the differences of tumorigenesis between MCPyV-positive and -negative Merkel cell carcinomas and its application to therapy

研究代表者

林 一彦 (Hayashi, Kazuhiko)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30180962

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)：MCPyV陽性症例群とMCPyV陰性症例群が形態学的に異なり、MCPyV陽性群よりMCPyV陰性群の方が予後不良であり、MCPyV陽性群はMCPyV-LTがRbの機能を抑制して細胞回転を促進するのに対して、MCPyV陰性群はp53遺伝子の変異が多い。

今回、Akt/mTOR/4E-BP1 Pathway Signal発現や接着因子CADM1の発現が予後と相関し、免疫グロブリンがMCPyV陽性群のみに発現する等、両者の発癌機構に相違があることを示した。Langerhans cell histiocytosis症例で高率にMCPyVが検出できることや新規の抗体やISH法の開発等を報告してきた。

研究成果の概要(英文)：Different mechanism of carcinogenesis between MCPyV-positive and -negative Merkel cell carcinoma (MCC) is suggested because expressions of Akt/mTOR/4E-BP1 Pathway Signals or CADM1 and MAL were associated with MCPyV infection or prognosis, and immunoglobulin expression was observed only in MCPyV-positive MCC. MCPyV-DNA was frequently detected in Langerhans cell histiocytosis or Langerhans cell sarcoma. A new in situ hybridization and immunohistochemistry with a novel antibody to detect small T-antigen expressions of MCPyV was developed. Phylogeny of MCPyV genomes obtained from Japanese MCPyV-infected MCCs revealed that MCPyV strains in Japanese MCCs are distinct from Caucasian type MCPyVs.

研究分野：病理学

キーワード：メルケル細胞癌 ポリオーマウイルス がん遺伝子 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

2008年にFengらによりメルケル細胞癌に新種のポリオマウイルス(MCPyV)が感染して腫瘍細胞のゲノムにクロールに組み込まれているとの報告がされて以来、新たなウイルス関連腫瘍として注目され、多くの研究が進行中である。国や人種によってMCPyVの罹患率に相違があるが、成人するまでに健常人の半数以上はMCPyVに対する抗体を持ち、既感染であり、また、メルケル細胞癌症例の約80%前後に感染して腫瘍細胞がウイルス蛋白を発現し、MCPyV陰性メルケル細胞癌より予後が良いことが知られている。我々も、日本人のメルケル細胞癌を収集して、MCPyV陽性症例群とMCPyV陰性症例群が形態学的に異なり、H.E.染色標本の観察によって高い精度で鑑別できること(Human Pathol 42:632-40, 2011, Hum Pathol 44: 1912, 2013)、さらに、MCPyV陽性症例群よりMCPyV陰性症例群の方が予後不良であり、MCPyV陽性症例群はMCPyV-LTがRbの機能を抑制して細胞回転を促進するのに対して、MCPyV陰性症例群はp53遺伝子の変異が多い等、両者の発癌機構に相違があること(Hum Pathol 43:2282-91, 2012)、剖検材料で皮膚を主体として全身の臓器からもこのウイルスDNAが検出されること(Intervirolology 56:1-6, 2013)、日本人由来のMCPyV株の遺伝子配列が欧米人の株と異なること(J. General Virol. in press, 2013)、Langerhans cell histiocytosis症例で高率にこのウイルスが検出できること(Hum Pathol in press, 2013)等を報告してきた。しかし、メルケル細胞癌のMCPyV陽性群と陰性群の詳細な病態・発癌機構の詳細な相違は不明で有効な標的治療法も未確立である。さらに、MCPyVの感染伝搬様式やlife cycleは不明であり、MCPyVを産生する培養細胞株も樹立されていない。

## 2. 研究の目的

研究目標は、メルケル細胞癌の病態・発癌機序をMCPyV感染陽性群と陰性群に分けて比較検討して解明し、それぞれに適切な治療法開発に役立てることである。

(1)メルケル細胞癌のMCPyV陽性群と陰性群における病態・発癌機序の比較検討:

MCPyV陽性症例群の腫瘍細胞がMCPyV陰性症例群に比べてN/C比の高い円形の均一な形態を示す分子機構の解明:

MCPyV陽性症例群の腫瘍細胞のみに免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)が発現し、特に軽鎖はIg鎖のみが発現してIgが発現しない病態機序の解明:

PI3K-Act-mTOR系のシグナル伝達機構の発現や変異について比較検討:

両群のmRNA発現プロファイリングに基づく発癌機序の違いの解明と治療標的の選

択:  
次世代シーケンサーによる両群遺伝子変異の違いの解明:

(2)MCPyV感染の検出法・感染実験系と予防法の開発

メルケル細胞癌におけるMCPyV感染の新しい検出法開発:

MCPyVの感染機序の解明と有効なワクチン開発:

(C)未知のMCPyV関連疾患の探索等

新しいMCPyV関連疾患・腫瘍の同定、免疫不全疾患との相関:

扁平上皮癌等を合併するメルケル細胞癌症例で、両腫瘍の起源(clonality)の解明:

## 3. 研究の方法

(1)方法:MCPyV遺伝子large T抗原(LT), small T抗原(ST)の発現産物(mRNA, 蛋白)とNotch-1のreceptor, mRNA, 蛋白発現の関係をメルケル細胞癌のウイルス陽性と陰性の両群で比較検討する。

(2)方法:MCPyV遺伝子の宿主の腫瘍細胞ゲノムへの組み込み部位をDIPS-PCR (detection of integrated papilloma

sequences)法で明らかにし、Ig 遺伝子発現との関連をみる。

- (3) 方法：メルケル細胞癌の MCPyV 陽性群 (30 例) と MCPyV 陰性群 (30 例) より RNA を抽出して PI3K-Akt 系の *mTOR*, *Akt*, *TSC1*, *TSC2*, *4E-BP1* 等遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR で定量して比較検討する。
- (4) 方法：メルケル細胞癌の FFPE 材料よりマイクロダイセクションで得た RNA サンプルおよび MCPyV 陽性と陰性のメルケル細胞株から抽出した RNA を SOLiD™ Total RNA-Seq Kit (Life technologies 社) によってライブラリを作製し、SOLiD 5500 を用い RNA-seq を行う。
- (5) 方法：メルケル細胞癌の FFPE 材料よりマイクロダイセクションで得た DNA サンプルを TargetSeq™ Exome Enrichment キット (Life technologies) を用いエクソン領域をハイブリッドキャプチャーし、SOLiD5500 (Life technologies) で解析を行う。
- (6) 方法：メルケル細胞癌の MCPyV 陽性群 (20 例) と MCPyV 陰性群 (20 例) を用いて MCPyV-ST の合成ペプチドに対する抗体と MCPyV-ST mRNA に対する Probe: ST 全長 (nt 196-756) を作成してそれらの感度と特異度を既存の抗体 (CM2B4) と比較検討する。
- (7) 方法：新鮮なメルケル細胞癌から SCID マウスの移植系や培養株を樹立してウイルスを増殖させて分離する培養系を確立し、得られたウイルスを用いて in vitro で感受性のある細胞を同定する。
- (8) 方法：メルケル細胞癌以外の疾患・腫瘍における MCPyV 感染の有無を免疫染色と定量 PCR 法でスクリーニングして MCPyV 関与の有無を明確にする。
- (9) 方法：扁平上皮癌とメルケル細胞癌の X 染色体上にあるアンドロレセプター (AR) 遺伝子の不活化パターンを調べる

「HUMARA 法」で解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) MCPyV 陽性症例群の腫瘍細胞が MCPyV 陰性症例群に比べて N/C 比の高い円形の均一な形態を示す分子機構の解明は試みたがはっきりした機序は不明であり、今後とも研究が必要である。
- (2) MCPyV 陽性症例群のメルケル細胞癌腫瘍細胞にのみ免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM) が発現し、MCPyV 陰性群では免疫グロブリンが発現しなし。さらに、特に軽鎖は Ig 鎖のみが発現して Ig 鎖が発現しないことを確認して、学会発表して論文に掲載した (Am J Surg Pathol. 160;2014;38:1627-35)。この現象は、メルケル細胞癌がリンパ球に由来するとの報告を否定し、MCPyV に感染したメルケル細胞癌により免疫グロブリンが異所性に発現すると考察した。しかし、その現象の出現機序は未解明である。
- (3) メルケル細胞癌の MCPyV 陽性群 (30 例) と MCPyV 陰性群 (30 例) より RNA を抽出して PI3K - Akt 系の *mTOR*, *Akt*, *TSC1*, *TSC2*, *4E-BP1* 等遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR でていりょうして比較検討し、それぞれのシグナル遺伝子の蛋白やそのリン酸化して活性化した産物に対する抗体のうちで FFPE 標本での免疫染色が可能なもの (例えば、Akt (pana) Rabbit mAb と Phospho-Akt (Ser473) Rabbit mAb) を Cell Signaling 社から購入して免疫染色により両群でのシグナル活性化を H-score で定量比較した。その結果、ほとんどの Akt/mTOR/4E-BP1 pathway signal は、MCPyV 陽性症例群と陰性群で亢進して有意差を認めなかったが、p - Akt (T308) が陰性群で有意に活性化が亢進していた。これらの成果は分子標的治療に有用な情報であることを報告した (Hum Pathol. 2015;46:210-6)。
- (4) 両群の mRNA 発現プロファイリングに

基づく発癌機序の違いの解明と治療標的の選択のため、MCPyV 陽性と陰性のメルケル細胞株から total RNA を抽出し、HiSeq を用いた次世代シーケンサーによる両群の Whole Transcriptome 比較解析は、まだ、試行中で十分な結果が得られていない。

(5) 次世代シーケンサーによる両群遺伝子変異の違いの解明のため、重要な約 100 種類のがん関連遺伝子を網羅的に次世代シーケンサーでの塩基配列の変異解析により、MCPyV 陽性群より MCPyV 陰性群の方が遺伝子変異が多いことや両群とも紫外線に起因すると思われる C>T 変異が多いことが明らかになった。しかし、データ解析に慣れないためまた mRNA 発現に顕著な差がある遺伝子の変異を明らかにするに至っていない。

(6) メルケル細胞癌における MCPyV 感染の新しい検出法開発に成功した。

現在、MCPyV 感染の判定に標準使用される抗体(CM2B4)には擬陽性、偽陰性が起る。これを補正できる MCPyV-small T 抗原に対する特異度と感度の高い新たな抗体作製や ISH 法の開発を行った。MCPyV-small T の合成ペプチドを複数合成して特異度の高い抗体を選別して MCPyV 陽性群と陰性群各 20 例を用いて免疫染色で比較検討して優れていることを確認した。また、MCPyV-ST mRNA 全長に対するプローブを作成して、ISH 法によりウイルスの mRNA 発現を検出できることも確認して感度と特異度に問題がない新しい検出法であることを報告した (Diag Pathol. 2014 Mar. 20;9:65)。

(7) MCPyV の感染機序の解明と有効なワクチン開発：

ウイルス感染機序の解明にはウイルスを増殖させて分離する培養系を確立することに成功していない。したがって感染機序に基づくワクチン開発もできていない。こ

れらはかなりむづかしい課題だが、今後とも追及する意義がある。

(8) 新しい MCPyV 関連疾患・腫瘍の同定、免疫不全疾患との相関については、口腔外科領域の腫瘍や疾患を網羅的に収集して、これらにおける MCPyV-DNA を RT-PCR により定量検索した結果、いずれもバックグラウンドの値と有意差がなく、口腔外科領域には MCPyV 関連腫瘍が存在しないことを明らかにした。免疫抑制状態の患者の病変には MCPyV-DNA が増加していた。これらを報告した (Molecular and clinical oncology DOI:10.3892/mco.2015.629)。Langerhans cell histiocytosis と Langerhans cell sarcoma に高率に MCPyV-DNA が検出されることを論文に掲載した。

(9) 扁平上皮癌等を合併するメルケル細胞癌症例で、両腫瘍の起源(clonality)の解明は、扁平上皮癌を合併するメルケル細胞癌症例の両腫瘍の起源(clonality)を、X 染色体上にあるアンドロレセプター (AR) 遺伝子の不活化パターンを調べる「HUMARA 法」で解析するが、小数例での解析しかできておらず報告するに至っていない。

## 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 11 件)

Comment on 'Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus' T Iwasaki, M Matsushita, D Nonaka, I Murakami, K. Hayashi, Mod Pathol. 2016 Jan;29(1):89-90. doi:

10.1038/modpathol.2015.69. 査読有

Lower expression of CADM1 and higher expression of MAL in Merkel cell carcinomas are associated with Merkel cell polyomavirus infection and better prognosis. Takeshi Iwasaki, Michiko Matsushita, Daisuke Nonaka, Keiko Nagata,

Masako Kato, Satoshi Kuwamoto, Ichiro Murakami, Kazuhiko Hayashi Hum Pathol 2016 48, 1-8 査読有

T Iwasaki; M. Matsushita, D. Nonaka, S. Kuwamoto, M. Kato, I. Murakami, K. Nagata, H. Nakajima, S. Sano, K. Hayashi, Comparison of Akt/mTOR/4E-BP1 Pathway Signal Activations and Mutations of the PIK3CA Gene between MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel Cell Carcinomas Hum Pathol 2015 46(2):210-6. doi: 10.1016/j.humpath.2014.07.025. 査読有

T. Iwasaki, M. Matsushita, D. Nonaka, M. Kato, K. Nagata, I. Murakami, K. Hayashi Phosphohistone-H3 (PHH3) is prognostic relevant in Merkel cell carcinomas but Merkel cell polyomavirus is a more powerful prognostic factor than AJCC clinical stage, PHH3, Ki-67 or mitotic indices Pathol Int 2015; 65: 404-409 doi:10.1111/pin.12305 査読有

S Tanioa, M Matsushita, S Kuwamoto, I Kodani, I Murakami, Y Horie, K Ryoike, K Hayashi Low prevalence and low viral loads of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in the oral and maxillofacial tumors or tumor-like lesions from immunocompetent patients; absence of MCPyV-associated neoplasm Molecular and clin oncol DOI:10.3892/mco.2015.629 査読有

I Murakami, K Takata, M Matsushita, D Nonaka, T Iwasaki, S Kuwamoto, M Kato, T Mohri, K Nagata, T Yoshino, K Hayashi Immunoglobulin expressions are only associated with MCPyV-positive Merkel cell carcinomas but not with MCPyV-negative ones: comparison of prognosis. Am J Surg Pathol 2014 38(12):1627-35. doi: 10.1097/PAS.0000000000000279. 査読有

M matsushita, D Nonaka, T Iwasaki, S

Kuwamoto, I Murakami, M Kato, K Nagata, Y Kitamura, K Hayashi A new in situ hybridization and immunohistochemistry with a novel antibody to detect small T-antigen expressions of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) Diagn Pathol. 2014 Mar 20;9(1):65. [Epub ahead of print] 査読有

I Murakami, M Matsushita, T Iwasaki, S Kuwamoto, M Kato, Y Horie, K Hayashi, J Gogusev, F Jaubert, S Nakamoto, M Yamakawa, H Nakamine, K Takata, T Oka, Tadashi Yoshino High viral load of Merkel cell polyomavirus DNA sequences in Langerhans cell sarcoma tissues Infectious Agents and Cancer 2014, 9:15 <http://www.infectagentscancer.com/content/9/1/15> 査読有

I Murakami, M Matsushita, T Iwasaki, S Kuwamoto, M Kato, Y Horie, K Hayashi, T Imamura, A Morimoto, S Imashuku, J Gogusev, F Jaubert, K Takata, T Oka, T Yoshino. Detection of Merkel cell polyomavirus DNA sequences in peripheral blood and tissues from patients with Langerhans cell histiocytosis. Hum Pathol 2014 45:119-26. doi:10.1016/j.humpath.2013.05.028. 査読有

M Matsushita, T Iwasaki, S Kuwamoto, M Kato, K Nagata, I Murakami, Y Kitamura, K Hayashi Merkel cell polyomavirus (MCPyV) strains in Japanese Merkel Cell Carcinomas (MCC) are distinct from Caucasian type MCPyVs: Genetic variability and phylogeny of MCPyV genomes obtained from Japanese MCPyV-infected MCCs Virus Genes 2014 48:233-42. doi:10.1007/s11262-013-1023-y. 査読有

Y Hashida, M Imajoh, M Kamioka, A

Taniguchi, N Kuroda, K Hayashi, H Nakajima, S Sano, M Daibata. Phylogenetic analysis of Merkel cell polyomavirus based on full-length LT and VP1 gene sequences derived from neoplastic tumors in Japanese patients.

J General Virol 2014 95(Pt 1):135-41. doi: 10.1099/vir.0.058149-0. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

Akizuki G, Imamura K, Yamada T, Mizutani R, Matsushita M, Iwasaki T, Nonaka D, Kuwamoto S, Nagata K, Hayashi K, Akimitsu N

Expression of a long non-coding RNA NEAT1 is significantly higher in MCPyV-positive Merkel cell carcinomas than MCPyV-negative ones

31st IAP・28th Congress of the European Society of Pathology, 9月25日-29日, ケルン/ドイツ, 2016

松下倫子, 岩崎健、野中大輔、桑本聡史、長田佳子、加藤雅子、北村幸郷、林一彦 メルケル細胞癌におけるJAK-STAT経路活性化とMCPyVおよび予後との関係

第105回病理学会総会, 5月12日-14日, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2016

Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Nonaka D, Nagata K, Murakami I, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K. Activation-Induced Deaminase (AID) gene expressions in Merkel cell carcinomas by immunohistochemical and molecular analysis 27<sup>th</sup> European Congress of Pathology, 9月5日-9日, ベオグラード/セルビア 2015

桑本聡史、松下倫子、野中大輔、岩崎健、村上一郎、加藤雅子、林一彦 多変量解析によるメルケル細胞癌の予後予測因子の検討 第104回日本病理学会総会, 4月30日-5月2日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2015

Hayashi K, Nonaka D, Matsushita M,

Takata K, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Nagata K, Kitamura Y, Yoshino T, Murakami I. Comparative analysis of B cell-related marker and immunoglobulin expressions between MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas. 26<sup>th</sup> European Congress of Pathology, 8月30日-9月3日, 英国/ロンドン, 2014

岩崎健 松下倫子, 村上一郎, 桑本聡史, 野中大輔, 加藤雅子, 林一彦 メルケル細胞癌におけるメルケル細胞ポリオーマウイルス感染による細胞形態変化を規定する因子の検討 第103回日本病理学会総会, 4月24日-26日, 広島国際会議場(広島県広島市), 2014

〔図書〕(計 0件)

〔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〕

ホームページ等なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林一彦(HAYASHI Kazuhiko)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 30180962

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: