

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08720

研究課題名(和文) MCPyV感染実験系樹立とMCPyV陽性メルケル細胞癌の発癌機序に基づく治療

研究課題名(英文) Establishment of MCPyV-infection experimental system and the therapy base on the carcinogenesis of MCPyV-positive Merkel cell carcinoma

研究代表者

林 一彦 (HAYASHI, Kazuhiko)

鳥取大学・医学部・特任教員

研究者番号：30180962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高悪性度の皮膚メルケル細胞癌(MCC)の約80%がウイルス(MCPyV)関連神経内分泌癌であるが、予後不良に関与する分子生物学的異常(Notchシグナル、ヒストン、代謝系、ミスマッチ修復等)について、MCPyV(+)MCCの発癌機序をMCPyV(-)MCCと比較して治療法開発の基盤となる情報を解明した。MCPyVの研究基盤となる実験系確立のためにウイルス産生系細胞株樹立を試みたが成功しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メルケル細胞癌(MCC)は高悪性度の皮膚神経内分泌癌であり、その約80%がウイルス(MCPyV)に感染している。予後不良に関与する発癌機序もMCPyV(+)MCCとMCPyV(-)MCCで異なるため、これらの分子生物学的異常(Notchシグナル、ヒストン、トリプトファン代謝系、ミスマッチ修復等)の違いを明らかにしたことは、MCPyV(+)MCCとMCPyV(-)MCCとで別々に有効な治療法開発のために有用な情報基盤となる。

MCPyVの生物学的特性を明らかにする基礎的研究基盤となるウイルス産生系培養細胞株樹立による実験系確立を試みたが不成功だった。

研究成果の概要(英文)：Approximately 80% of Merkel cell carcinoma(MCC), an aggressive skin neuroendocrine carcinoma, are infected with polyomavirus (MCPyV). We reported several significant findings on Notch signaling, epigenetics, Try metabolism and DNA mismatch repair etc. in the different carcinogenesis between MCPyV(+)MCC and MCPyV(-)MCC, which are useful for development of new therapy.

We have failed to establish the in vitro culture system of MCPyV-producing cell, which is a basic method to study the biology of MCPyV.

研究分野：病理学

キーワード：メルケル細胞癌 メルケル細胞ポリオーマウイルス シグナル伝達系 腫瘍微小環境 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

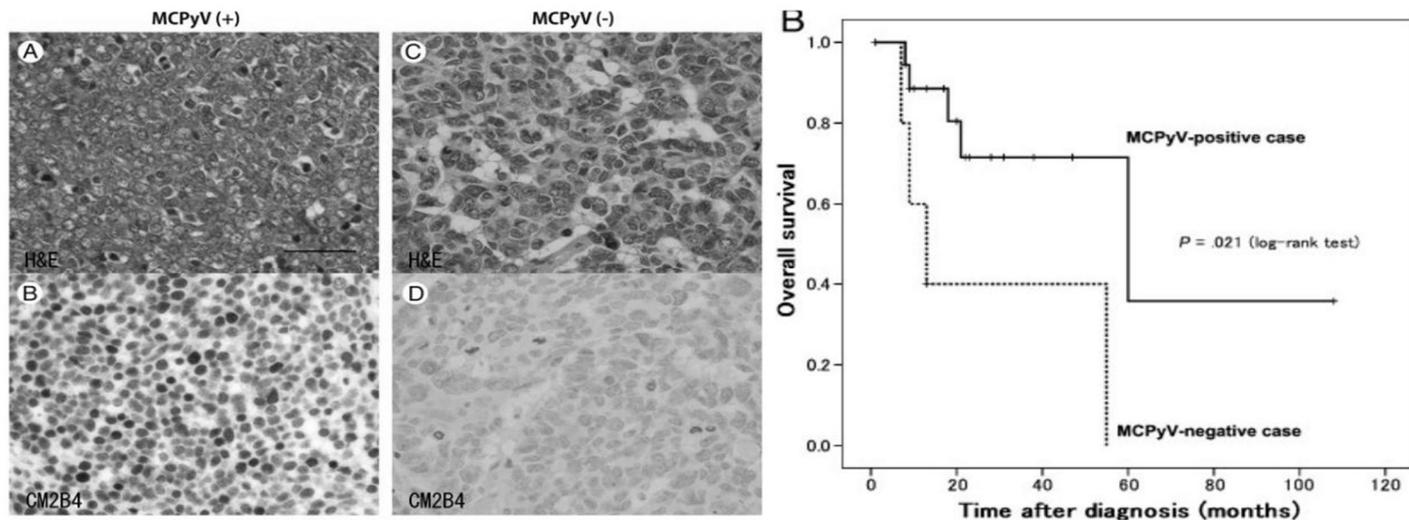


図 1 :MCPyV 陽性症例群と陰性群は形態が異なる 図 2 :MCPyV 陰性症例群は陽性群より予後が悪い

2008 年に Feng らによりメルケル細胞癌に新種のポリオーマウイルス(MCPyV)が感染して腫瘍細胞のゲノムにクローナルに組み込まれ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ている。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、日本と英国のメルケル細胞癌を収集して以下の報告をしてきた。即ち MCPyV 陽性症例群と MCPyV 陰性症例群が形態学的に異なり(図 1)、H.E.染色標本の観察により高い精度で鑑別できること、さらに、MCPyV 陽性群より MCPyV 陰性群の方が予後不良であり(図 2)、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こと、さら Akt/mTOR/4E-BP1 Pathway Signal 発現すること、接着因子 CADM1 の発現が予後と相関すること、免疫グロブリンが MCPyV 陽性群のみに発現すること等、両者の発癌機構に相違があること、剖検材料で全身の臓器からも MCPyV-DNA が検出されることや、日本人の MCPyV 株の遺伝子配列が欧米人の株と異なること、Langerhans cell histiocytosis 症例で高率に MCPyV が検出できること、新規の抗体や ISH 法の開発等を報告してきた。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

本研究の目的は、(1) MCPyV 陽性症例群と MCPyV 陰性症例群の病態や発癌機構の相違をさらに詳細に解明して、それぞれに有効な標的に基づくメルケル細胞癌の治療法開発や MCPyV 陽性メルケル細胞癌の予防・治療法確立をめざすことである。(2) MCPyV を産生する培養細胞株を樹立して、MCPyV の基礎的な生態や性状を明らかにするための研究方法に役立てることである。

3. 研究の方法

材料として収集したメルケル細胞癌(日本:120例、英国:60例)のパラフィン包埋材料や MCPyV 陽性と陰性のメルケル細胞癌細胞株を用いる。方法としてはメルケル細胞癌症例を抗 MCPyV-LT 抗体(CM2B4)による免疫染色と定量 PCR 法による MCPyV 感染の判定結果により陽性群と陰性群に分類する。MCPyV 陽性と陰性メルケル細胞癌両群における病態・発癌機構の相違を臨床情報、病理組織、組織培養、免疫染色、ISH、PCR、定量 PCR、次世代シーケンサーを用いた mRNA 発現や遺伝子変異解析等を駆使して解明する。また、ハイリスク・ハイリターン課題として MCPyV 産生性メルケル細胞癌株の樹立とこのウイルスを用いた MCPyV 感染機構やワクチン開発を行う。確実に成果が保証される課題として、MCPyV 感染の新しい検出法開発やメルケル細胞癌以外の疾患・腫瘍における MCPyV 罹患状況の検討や免疫不全患者材料での MCPyV 感染調査を計画している。

4. 研究成果

皮膚のメルケル細胞癌(MCC)の多くがポリオーマウイルス(MCPyV)関連神経内分泌癌であると近年判明している。MCC の予後不良に関与する分子生物学的異常については十分解明されていない。SWI/SNF 複合体はクロマチン構造の改変に関わる蛋白群で、癌抑制因子としての機能を持ち、その異常が多くの腫瘍の発生や進展に関与することが知られている。我々は MCC における SWI/SNF 複合体構成蛋白の発現異常と、それらが予後を含めた臨床病理学的因子に及ぼす影響を検討し

た。MCC の 50 例(MCPyV 陽性 30 例,陰性 20 例)に対し BRG1, BRM, INI1, ARID1A の免疫染色を施行し、発現の消失・減弱と臨床病理学的因子との比較を行った。BRG1, BRM, INI1, ARID1A の消失・減弱はそれぞれ 5 例(10%), 2 例(4%), 0 例, 0 例で見られた。BRG1 の消失・減弱例とそれ以外との間で年齢、性別、病期、MCPyV の有無、予後を比較したが有意な差は認めなかった。MCC における SWI/SNF 発現異常の寄与は少ないと考えられる。Long non-coding RNA の NEAT1(Nuclear Enriched Abundant Transcript-1)は paraspeckle 形成に必須の因子で、ウイルス感染時に発現されて種々の cytokine を誘導することが知られている。MCC27 例の解析でも、MCPyV 陽性 MCC は MCPyV 陰性 MCC より有意に NEAT1 発現が高く、paraspeckle(SFPQ)も約 2 倍になっていた。MCPyV 陽性 MCC と SFPQ-ChIP seq data で 1.5 倍以上増加した遺伝子から 15 種類の NEAT1 関連遺伝子を同定した。その中の一つの接着因子関連遺伝子 GNB1L2 の蛋白発現が MCPyV 陽性 MCC で有意に高いことを示した。

メルケル細胞癌(MCC)とその腫瘍微小環境(TME)における Try 代謝の律速酵素である IDO1 と TD02 及び Try 代謝産物 kynurenine のレセプターである AhR の発現と Merkel cell polyomavirus(MCPyV)感染や予後との相関を検討した結果、(1) MCPyV(-)MCC の腫瘍における IDO1 と TME における TD02 の発現が有意に高く、(2)腫瘍での IDO1 低発現と TME での TD02 と AhR の低発現の MCC 群が有意に予後良好であった。MCC における腫瘍免疫低下を誘導する Try 代謝経路の発現評価は、この経路を標的とする免疫療法が有効な患者を選択するのに重要である(Hum Pathol. 2019;84:52-61)。組織の発生や恒常性維持に重要な Notch signaling 系の NOTCH1/NOTCH2/NOTCH3/jagged 1 (JAG1) の MCC での発現と MCPyV 感染や予後との相関を検討した結果、(1) MCPyV(-)MCC 群は JAG1 発現が有意に高く、NOTCH3 も低発現傾向を示し、(2)NOTCH3 高発現 MCC 群は、有意に予後(OS と DSS)が良好であった。癌抑制遺伝子である NOTCH3 発現は、MCC の独立した予後因子である(Anticancer Res. 2019;39(1):319-329)。Langerhans 組織球症や Langerhans 細胞肉腫について、MCPyV 感染が interleukin-1 activation loop model のトリガーとなり、遺伝子異常の背景を持つランゲルハンス細胞から発生する仮説を提唱した(Cell Commun Signal. 2018,22;16:49)。感染性腫瘍疾患の一つの病理として「Merkel 細胞癌と Merkel 細胞ポリオーマウイルス」に関する総説を著した(病理と臨床 2018.36:179-184)。

「メルケル細胞ポリオーマウイルス陰性のメルケル細胞癌(MCPyV(-)MCC)群では、ヒストン H3K27me3 修飾が低下する；特に皮膚の扁平上皮癌を合併するメルケル細胞ポリオーマウイルス陰性のメルケル細胞癌で H3K27me3 修飾発現が著明に低下する」ことを論文に掲載された(Anticancer Res.2019 39:5573-5579)。DNA 修復異常は癌遺伝子やがん抑制遺伝子の変異を誘導して種々の発癌の原因となるが、メルケル細胞癌におけるウイルス陽性群と陰性群における Mismatch Repair(MMR)タンパク質である MLH1, MSH2, MSH6 と PMS2 の発現と臨床病理学的因子を比較検討した。その結果、MSH2, MSH6 と PMS2 の発現が、MCPyV(+)MCC 群に有意に高く、MLH1 発現では有意差がなかった。さらに、生存率の解析では、MSH6 の高発現群が OS, DSS とともに有意に予後良好であった。MSH2, MSH6 と PMS2 の発現が、MCPyV(-)MCC 群に有意に低い結果から、これらの MMR 蛋白発現の障害が、MCPyV(-)MCC 群の発癌機序に重要な役割を果たし、生物学的に MSH6 発現低下は予後不良と相関することを、第 31 回欧州病理学会(2019, Nice)で発表した。Notch signal の MCC での発現と MCPyV 感染や予後との相関を検討し、MCPyV(-)MCC 群は JAG1 発現が有意に高く、癌抑制遺伝子の NOTCH3 発現は、MCC の独立した予後因子であることを論文掲載した(Anticancer Res. 2019;39:319-329)。さらに NOTCH シグナルの標的因子(Cyclin D3, HES1 と cMYC)の発現が MCPyV(-)MCC 群で有意に高いことを第 31 回欧州病理学会で報告した(2019, Nice)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lusi Oka Wardhani, Michiko Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Daisuke Nonaka, , Keiko Nagata, Masako Kato, Yukisato Kitamura, Kazuhiko Hayashi	4. 巻 84
2. 論文標題 Expression of the ID01/TD02-AhR pathway in tumor cells or the tumor microenvironment is associated with MCPyV status and prognosis in Merkel cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Pathol	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humpath.2018.09.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wardhani LO, Matsushita M, Kuwamoto S, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Expression of Notch 3 and Jagged 1 Is Associated With Merkel Cell Polyomavirus Status and Prognosis in Merkel Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 319-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13114.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ichiro Murakami, J. Nakashima, M. Iguchi, Makoto Toi, Y. Hashida, T. Higuchi, M. Daibata, M. Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Yasushi Horie, Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi, Takashi Oka, Tadashi Yoshino, Toshihiko Imamura, Akira Morimoto, Shinsaku Imashuku, Jean Gogusev, Francis Jaubert	4. 巻 16
2. 論文標題 Merkel cell polyomavirus and Langerhans cell neoplasm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Commun Signal.	6. 最初と最後の頁 49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-018-0261-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 桑本 聡史、松下倫子、林 一彦	4. 巻 36
2. 論文標題 感染性疾患の病理、Merkel細胞癌とMerkel細胞ポリオマウイルス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroki T, Matsushita M, Iwasaki T, Nonaka D, Kuwamoto S, Nagata K, Kato M, Akizuki G, Kitamura Y, Hayashi K	4. 巻 69:8-14
2. 論文標題 Association of expression of the hedgehog signal with Merkel cell polyomavirus infection and prognosis of Merkel cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Pathol	6. 最初と最後の頁 8-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humphath.2017.05.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsushita M, Iwasaki T, Nonaka D, Kuwamoto S, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K	4. 巻 60(3):
2. 論文標題 Higher Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase Is Significantly Associated with Merkel Cell Polyomavirus-negative Merkel Cell Carcinomas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Yonago Acta Med	6. 最初と最後の頁 145-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagata K, Kumata K, Nakayama Y, Satoh Y, Sugihara H, Hara S, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Hayashi K	4. 巻 30(3):
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation Activates B Cells Polyclonally and Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression: A Mechanism Underlying Autoimmunity and Its Contribution to Graves' Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Viral Immunology	6. 最初と最後の頁 240-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/vim.2016.0179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mohri T, Nagata K, Kuwamoto S, Matsushita M, Sugihara H, Kato M, Horie Y, Murakami I, Hayashi K	4. 巻 13(6):
2. 論文標題 Aberrant expression of AID and AID activators of NF- B and PAX5 is irrelevant to EBV-associated gastric cancers, but is associated with carcinogenesis in certain EBV-non-associated gastric cancers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4133-4140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.5978.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Lusi Oka Wardhani, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K.
2. 発表標題 The histone modification H3K27me3 is reduced in MCPyV-negative Merkel cell carcinomas.
3. 学会等名 30th European Congress of Pathology, Bilbao, Spain, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lusi Oka Wardhani, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K.
2. 発表標題 The expressions of IDO1 and TDO2 in tumor cells and their tumor microenvironment are associated with MCPyV status and prognosis in Merkel Cell Carcinomas
3. 学会等名 30th European Congress of Pathology, Bilbao, Spain, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下倫子、岩崎健、桑本聡史、野中大輔、長田佳子、加藤雅子、北村幸郷、林一彦
2. 発表標題 メルケル細胞ポリオーマウイルス陰性のメルケル細胞癌では、ヒストンH3K27me3修飾が低下する
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会、札幌、2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsushita M, Kuromi T, Iwasaki T, Kuwamoto S, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K
2. 発表標題 Association of Hedgehog signal expression with MCPyV infection and outcome in Merkel cell carcinoma.
3. 学会等名 29th European Congress of Pathology, Amsterdam, Netherlands, 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsushita M, Kuwamoto S, Iwasaki T, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kitamura Y, Hayashi K
2. 発表標題 Altered expression of SWI/SNF complex and its significance in Merkel cell carcinoma.
3. 学会等名 29th European Congress of Pathology, Amsterdam, Netherlands, 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋月源、今村亮俊、山田俊理、水谷玲菜、松下倫子、長田佳子、桑本聡史、加藤雅子、秋光信佳、林一彦
2. 発表標題 Expression of NEAT1 is significantly higher in MCPyV-positive MCC than MCPyV-negative one.
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会、東京、2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松下倫子、桑本聡史、岩崎健、野中大輔、長田佳子、加藤雅子、村上一郎、北村幸郷、林一彦
2. 発表標題 メルケル細胞癌におけるSWI/SNF複合体の発現異常とその意義に関する検討
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会、東京、2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Michiko Matsushita, Lusi Oka Wardhani, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Daisuke Nonaka, Keiko Nagata, Masako Kato, Yukisato Kitamura, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 The expression of Notch signaling pathway in Merkel cell carcinoma
3. 学会等名 31st European Congress of Pathology, Nice, France (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lusi Oka Wardhani, Michiko Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Daisuke Nonaka, Keiko Nagata, Masako Kato, Yukisato Kitamura, Kazuhiko Hayashi
2. 発表標題 Association of mismatch repair proteins with Merkel cell polyomavirus status and prognosis in Merkel cell carci
3. 学会等名 31st European Congress of Pathology, Nice, France (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下倫子、ルシ オカ ワードダーニ、岩崎健、桑本聡史、野中大輔、長田佳子、加藤雅子、北村幸郷、林一彦
2. 発表標題 メルケル細胞癌の腫瘍細胞と腫瘍微小環境におけるID01/TD02-AhR経路の発現 は予後と相関する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会、東京
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----