

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591149

研究課題名(和文)呼吸器悪性腫瘍における新規癌ウイルス感染実態の網羅的解析

研究課題名(英文)Detection of a novel oncogenic virus in tumors of the respiratory tract

研究代表者

上岡 樹生(Kamioka, Mikio)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：00274374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙は肺癌の最大の原因ではあるが、近年わが国では非喫煙者の非小細胞肺癌が増加の傾向にある。従来、肺癌の原因として喫煙以外に、環境因子、遺伝的素因、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においても、喫煙以外の因子の関わりを強く示している。本研究において、一部の非小細胞肺癌で新規腫瘍ウイルスであるメルケル細胞ポリオマウイルス(MCPyV)のゲノムが見出されることを見出した。しかも、その感染形態は野生株とは異なり、MCPyV large T遺伝子のC末端領域に欠損が生じ、腫瘍細胞の染色体に組み込まれるなど、腫瘍特異的と考えられる感染形式であった。

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 cancers occurring in never smokers has increased in recent times. Factors other than smoking such as oncogenic virus may be associated with the development of lung cancer.

In this study, we tested non-small cell lung cancer (NSCLC) for the presence of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) and detected the viral genome in some patients with NSCLC. We showed the presence of integrated MCPyV genome into host cells and a truncated large T gene with a preserved retinoblastoma tumor-suppressor protein-binding domain. Although the viral detection rate was low, the molecular signatures of MCPyV infection support the possibility that during the multistep carcinogenesis process MCPyV may partly participate in the pathogenesis of NSCLC in a subset of patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器腫瘍 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌関連の死因としては世界でも上位を占め続けている。喫煙は肺癌発症におけるリスクファクターの主因であることはよく知られているが、近年非喫煙者の間でも相当数の肺癌の発症が見られる事は多くの報告が示している。また、非喫煙者の中でも肺癌の発症地域に偏りが見られる事がアジア地域などで報告されている。これらの事実は喫煙以外にも肺癌の発症に関与する因子が存在することを示唆する。

このことについて、感染性微生物が肺癌の発症に関与していることを示す報告がある。そのひとつとしてヒトパピローマウイルスが挙げられるが、その結果は研究グループによってまちまちであった。2008年に皮膚の神経内分泌系悪性腫瘍であるメルケル細胞癌(MCC)よりメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)が発見された。MCPyVの感染経路については確立されてはいなかったものの、そのDNA断片は下気道分泌物からも検出されていたため肺の悪性腫瘍発症の原因となり得ることは疑われており、これを検証するための研究が期待されていた。

非小細胞肺癌(NSCLC)におけるMCPyVの関与の可能性に関しては、最近になり南北アメリカでNSCLCでのMCPyV DNAの陽性率がそれぞれ17%、5%と報告された(Joh et al, 2010; Gheit et al, 2012)。しかしこれらの検討は欧米で行われており、地域による偏りの見られる非喫煙者の肺癌発症の原因としてのMCPyV関与を検証するためにはアジア地域でも検討を進めていくことが急務であった。

2. 研究の目的

本研究ではNSCLC発症におけるMCPyVの関与を検証するため、日本人NSCLC患者でのウイルスゲノムの証明だけでなく、ウイルス産生RNAやウイルス特異的蛋白の存在を検討する。さらにMCPyV陽性のNSCLCの中からウイルスDNAの宿主DNAへの組み込み例や、突然変異を起こしたウイルスの存在する症例を探し出す。NSCLCにおいてMCPyV関連蛋白の発現とウイルスゲノムの組み込みや遺伝子変異を示した報告はなく、その発癌性に影響する因子についての検討をする。

3. 研究の方法

対象は日本人のNSCLC症例で、扁平上皮癌(SCC) 32名、腺癌(AC) 45名、大細胞癌(LCC) 32名、多形癌(PL) 3名の合計112名である。112症例のうち85人が喫煙者であり、非喫煙者は27人であった。調べた限りでは全例、発癌性を示す化学薬品への暴露やアスベストやラドンの吸入歴などはなかった。さらに8例の悪性中皮腫と5例の胸腺腫も本研究の対象にした。

検体からのDNA採取はDNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) を用い、200 ngのDNAをAmpliQ Gold 360 Master Mix (Life Techno-

logies) によるPCR反応に使った。MCPyVのLarge T antigen (LT) のLT1, LT3, viral protein 1 (VP1) の合計3か所に用いたプライマーは既存の報告による配列を用い、DNAの抽出を証明するためのコントロールとしてグロビン(HBB)を用いた。PCRは40サイクルとし、2.0%アガロースゲルに泳動しバンドを確認した。またPCR産物をHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics) で精製し、model 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) を使ったシーケンス反応に供した。結果はBioEdit software (Ibis Biosciences) により確認した。

通常のPCRでバンドが確認された症例についてリアルタイムPCRにより定量化した。反応はTaqMan gene expression master mix (Life Technologies) を用いたStepOnePlus thermocycler (Life Technologies) により行った。定量化の基準としては通常のPCRで得られた精製産物をpMD20-Tベクターに挿入しクローニングしたものを使用した。

Reverse transcription (RT)-PCRは検体よりHigh Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics) を用いて総RNAを抽出し、1 µgのRNAをSuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) による逆転写反応に用いた。反応液のうち1 µlのcDNAを半定量的なPCRに使用した。PCR反応にはLT1, VP1の2種類のプライマーを用い、HBBにより標準化し定量とした。

MCPyV蛋白を検出するために、免疫組織学的検査を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋した標本を調整し、MCPyV LT エクソン2抗原に対するモノクローナル抗体CM2B4を用いた。

MCPyVの組み込み部位を同定するためにdetection of integrated papilloma sequences (DIPS)-PCR法を用いた。DNAをTaq Iで消化後、切断部位特異的なアダプター構造に結合させ、ウイルス配列とアダプター特異的なプライマーでPCR増幅、その後直接シーケンス反応で確認する方法であり、ウイルスと宿主細胞DNAの結合部位を確認することが可能である。MCPyV LT遺伝子のシーケンス反応についてはGenBankに保存されているMCPyV MCC350株(EU375803) のデータを使用し、そのヌクレオチド151-3102の情報と比較検討した。

4. 研究成果

MCPyVの確認は通常のPCR法で行い、さらにリアルタイムPCR法でウイルス量を定量化した。MCPyV確認のための通常のPCRはLT1, LT3, VP1の3か所のプライマーを設定し、NSCLC症例サンプルに対して行った。その結果、32症例のSCCのうちMCPyV DNAは、LT1プライマーにより3例、LT3プライマーにより7例、VP1プライマーにより4例が検出された。また45症例のACではLT1プライマーにより7例、LT3プライマーにより8例、VP1プライマーにより5例が検出された。32症例のLCCでは1例でLT3プライマー

によりMCPyVが検出された。3例中1例のPLではLT3とVP1の両方のプライマーでMCPyV DNAが確認できた。これらの通常PCRで得られたPCR産物は精製され、シーケンス反応によりMCPyVに特異的な配列を有することが確認できた。またPCRのコントロールとしてはHBBを用い、全例ともDNAの採取を確認できている。この結果、112名のNSCLC患者のうち20名(18%)がMCPyV DNAを有していることが判明した。組織型ごとの内訳としてはSCC 28%、AC 20%、LCC 3%、PL 33%であった。LT1, LT3, VP1の3種類のプライマーすべてで陽性が確認できたのは6症例のみであった。

同様のPCRを悪性中皮腫、胸腺腫に対して行ったが、全く反応は得られなかった。

NSCLC症例 3例において癌部と非癌部での検討が可能であったが、それぞれHBBをコントロールとしMCPyVの定量的な比較を行ったところ、3例とも癌部でMCPyVのPCRバンドは強く増幅されたが、非癌部では1例でLT1による増幅みられたものの、ほとんど非癌部でのMCPyVはみられないという結果が得られた。

病理組織型とMCPyVの陽性の間には統計学的に有意な差は認められなかった。また、非喫煙者の中にもMCPyVが陽性で検出されたが、これも統計学的に有意な差は認められていない。

次にMCPyV LT領域の発現に関する検討をRT-PCRにより行った。20例のMCPyV陽性検体のうち、RNA抽出が十分量できたのは10例のみであった。MCPyV RNA発現に関しては、LT領域エクソン2 (910-1152)、VP1 (3786-4137)の2区間を検討に用いた。4例でLT遺伝子の増幅が認められたがVP1はどのサンプルでも増幅されていなかった。

続いてMCPyV LT蛋白の発現を免疫組織学的に検討した。腫瘍細胞の核に一致してMCPyV LT蛋白が染色されるのが確認され、腫瘍細胞によりLT蛋白が産生されていることが示唆された。またいくつかの症例においては非腫瘍部にも部分的な弱いLT蛋白の発現がみられた。

次にMCPyVの宿主細胞内での存在様式について検討した。11症例についてDIPS-PCRを行い、2例にMCPyVは宿主細胞のDNAが組み込まれていることが判明した。MCPyV LT遺伝子はそれぞれ染色体5q23.1と染色体11q25に組み込まれていた。

さらにMCPyV LT遺伝子のシーケンスをヌクレオチド151-3102の範囲について4症例で検討した。GeneBankによると腫瘍由来でない野生型MCPyV株 Appendix206 (JN038578)では、LT遺伝子のエクソン2の206番目のアミノ酸配列であるリシンを含む部位に癌抑制蛋白retinoblastoma tumor-suppressor protein (Rb)結合モチーフ (LFCDK) を有しているが、MCC由来のMCC350株 (EU375803)ではこれがグルタミンに置き換わっている。MCC350で見られたようなLxCxEのパターンは我々の症例でも4例に認められた。このモチーフはRb活性との関連が示唆されている。

3例でLT遺伝子全長のシーケンスが得られたが、それぞれ異なったアミノ酸置換がLT遺伝子のC末端側に認められ、うち2例においてはストップコドンへの置換は見られていなかった。一方、1例ではLT遺伝子はフレームシフト変異が起こっており1611-1656が欠落していた。この変化はRb結合領域の下流に起こっており、その結果ヘリカーゼをコードするエクソン2は短くなっている状態であった。

本研究はアジア地域におけるNSCLCに関するMCPyVの関与について検討した最初の報告である。今回我々の使ったMCPyVに対するプライマーセットはLT1, LT3, VP1であるが、これらはMCPyV検出に用いられる基本的な組み合わせである。結果として、MCPyV陽性率は18%であった。最近の研究によると北アメリカのNSCLCでは17%にMCPyV陽性が認められているが、その際LT3のプライマーセットが使われている(Joh et al, 2010)。これは我々の結果ともほぼ一致する値とみることが出来る。チリの報告によるとNSCLCの5%でMCPyVが陽性であったが(Gheit et al, 2012)、地理的な偏りのみられることに起因する結果であったのか、使用したプライマーや実験的な条件の差による検出率の相違などの原因が考えられる。

さらに、我々の結果では中皮腫や胸腺腫ではMCPyVは認められなかったが、この結果はこれまでの報告と一致している(Bhatia et al, 2010)。

喫煙は肺癌の主要なリスクファクターである。我々の症例でも76%が喫煙者ではあった。本研究においても男性の6%、女性の69%が非喫煙者からのNSCLC発症であった。したがって喫煙のみではNSCLC発症は十分な説明が出来ないと考えることができる。MCPyVが肺癌発症の原因であることを証明するためには、MCPyV DNAの陽性のみでは条件としては不十分である。なぜなら健常人であっても下気道を高感度PCRでスクリーニングしてみるとMCPyV陽性となる例があるからである(Babakir-Mina et al, 2010)。一方いくつかの研究によりMCPyVがMCCを発症させる際、その発癌性を発揮するためにはMCPyV LT蛋白の発現が必要であるという報告がなされている。この点に着目して、我々もLT遺伝子発現をRNAと蛋白の両方で検討した。その結果10例のMCPyV DNA陽性の症例において4例でLT遺伝子のRNAが検出されたが、VP1遺伝子に関しては発現が認められなかった。MCPyVなどポリオマウイルスは一般にウイルス複製に際しLT遺伝子は最初に発現がみられ、VP遺伝子は後期に発現が認められる。しかし、ウイルス発癌による腫瘍ではウイルスの複製はされなくなっているという傾向があり、MCPyVが最もよくみられるMCCにおいてもウイルス複製は抑制されており、LT遺伝子は強く発現されVP遺伝子の発現は見られないという報告がある。この知見から考えると、我々の症例でも同様にLT遺伝子は発現し、VP1遺伝子は発現せずウイルス複製は止まっているという結果が予想された。

MCPyVの発癌性を示す性質のうち、LT遺伝子におけるLxCxE motifを介したRbへの結合能に関する報告がある。このLxCxEモチーフは我々の症例でも認められたが、MCC由来のMCC 350で検出されたものと同じ変化であった。ウイルスがLT遺伝子にRb結合領域を保持しているということは宿主細胞に対して何らかの腫瘍化に関する役割を果たしているものと推察できる。

またMCPyVが宿主細胞DNAへ組み込まれている点についても腫瘍化には重要な役割を果たしていることが予想できる。組み込みを証明するため我々はDIPS-PCR法を使った。MCPyVは2つの症例で組み込みが認められており、それぞれ染色体5番と11番に挿入されていた。染色体5番への挿入はMCCの症例でも報告が見られているが、注目すべきなのは我々の症例での組み込み部位はLT遺伝子のエクソン2にあり、これはRb結合部位の下流である点である。もう1例についてはウイルス-宿主細胞遺伝子結合部位はLT遺伝子のヌクレオチド2738に位置しておりLT遺伝子は短くなっている。しかしながらこの症例でシークエンスを調べてみるとLT遺伝子の全長が存在するという結果が得られた。この結果は短くなり宿主DNAに挿入されたMCPyVと、全長を持つウイルスの共存状態が存在することが考えられ、同様の結果は以前にも報告がみられているものである(Laude et al, 2010; Martel-Jantin et al, 2012)。

本研究はNSCLC症例において、MCPyV DNAの存在だけでなくLT RNA発現とLT蛋白発現を示した最初の報告である。さらに、MCC以外でもMCPyVの組み込みや遺伝子変異が存在することを示すことができた。MCCにおいてはウイルスの組み込みや遺伝子変異はその腫瘍原性に大きな働きをしていると考えられている。MCCと比較すると、NSCLCにおけるMCPyVは低率ではあるが、我々の提示したいくつかの症例はMCCと酷似した変化を呈していることがわかった。下気道におけるMCPyVの持続的な暴露は、ウイルスが宿主細胞DNAへの組み込みを稀ながら起こすことになり、その結果MCPyVによる発癌が起こるといふ仮説が考えられる。またMCPyV感染は細胞の癌化の初期段階に必要であり、癌化の進展にはLT発現はあまり必要でないとの報告もある。

我々はNCLCSにおいてMCPyVの癌関連蛋白の発現を示すことができ、フレームシフト変異により短くなったLT領域ではRb結合領域を保持しているのを発見した。しかしながら、このようなウイルスの形態は多くなく、MCPyVにおけるNCLCSの発症には部分的な関与をいくつかの症例で示唆する結果が得られたと言える。

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)

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 and Infection*. 査読有. 2014 (掲載決定). doi: 10.1016/j.micinf.2014.04.004.

Hashida Y, Imajoh M, Kamioka M, Taniguchi A, Kuroda N, Hayashi K, Nakajima H, Sano S, Daibata M. 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, 2014, 135-141. doi: 10.1099/vir.0.058149-0.

Hashida Y, Imajoh M, Nemoto Y, Kamioka M, Taniguchi A, Taguchi T, Kume M, Orihashi K, Daibata M. Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumour-specific signature in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. 査読有. 108, 2013, 629-637. doi: 10.1038/bjc.2012.567.

Hashida Y, Imajoh M, Taniguchi A, Kamioka M, Daibata M. Absence of Merkel cell polyomavirus in monocytic leukemias. *Acta Haematologica*. 査読有. 130, 2013, 135-137. doi: 10.1159/000347174.

Imajoh M, Hashida Y, Taniguchi A, Kamioka M, Daibata M. Novel human polyomaviruses, Merkel cell polyomavirus and human polyomavirus 9, in Japanese chronic lymphocytic leukemia cases. *Journal of Hematology & Oncology*. 査読有. 5, 2012, 25. doi: 10.1186/1756-8722-5-25.

Takeuchi H, Zhang YN, Israel DA, Peck RM Jr, Kamioka M, Yanai H, Morimoto N, Sugiura T. Effect of Helicobacter pylori cdrA on interleukin-8 secretions and nuclear factor kappa B activation. *World Journal of Gastroenterology*. 査読有. 18, 2012, 425-434. doi: 10.3748/wjg.v18.i5.425.

[学会発表](計3件)

橋田 裕美子, 上岡 樹生, 他. 非小細胞肺癌におけるメルケル細胞ポリマウイルスの検出. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10日, 神戸国際会議場(神戸市)

橋田 裕美子, 上岡 樹生, 他. 慢性リンパ性白血病における新規ポリオマウイルスの検出. 第60回日本ウイル

ス学会学術集会. 2012年11月13日~2012年11月15日, 大阪国際会議場(大阪市)

村上 雅尚, 上岡 樹生, 他. 慢性活動性EBV感染症のT/B細胞活性についてのPCR array 解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13日~2012年11月15日, 大阪国際会議場(大阪市)

〔その他〕

ホームページ等

高知大学医学部

<http://www.kochi-ms.ac.jp/>

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・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・教授

研究者番号: 50263976

(3) 連携研究者

村上 雅尚 (MURAKAMI MASANAO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 80571017