

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 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：23591391

研究課題名(和文) ウイルスを起因とする造血器腫瘍の病態および腫瘍化機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of hematological malignancies caused by viral infection

研究代表者

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

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)：2008年にヒトポリオーマウイルスとしては初の腫瘍ウイルスであるメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)が報告された。欧米ではMCPyVと慢性リンパ性白血病(CLL)との病因的関与について報告がなされているが、我が国でのMCPyVとCLLの関係については明らかにされていなかった。本研究において一部の本邦発症CLLでMCPyVが検出されたが、CLL発症に直接的な役割を果たしているかは不明である。MCPyVは単球にも持続感染することが報告されている。この持続感染が細胞の腫瘍化へと発展させるのかどうかは不明であった。そこで、単球性白血病におけるMCPyVの感染有無について解析した。

研究成果の概要(英文)：Some virus infections are closely associated with oncogenesis. In 2008, Merkel cell polyomavirus (MCPyV) was reported as the first tumor polyomavirus. The association of MCPyV with chronic lymphocytic leukemia (CLL) has been discussed in the Western world, whereas the prevalence of the virus in CLL cases in Eastern countries has not been investigated. In this study, we determined the prevalence and DNA loads of MCPyV in Japanese CLL cases. We found that MCPyV is present in a subset of Japanese CLL cases, but it is unclear that MCPyV have a direct causal role in Japanese CLL. Since MCPyV can also infect monocytic cells, we investigated the prevalence of MCPyV in disorders of monocytic lineage. MCPyV DNA was not detected in any of our leukemia samples with the monocytic lineage, suggesting that MCPyV is unlikely to have played a pathogenetic role in the monocytic leukemias of these patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血器腫瘍 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

世界中において、ウイルス感染が起因となる悪性腫瘍は、全悪性腫瘍の約 15%を占める。造血器腫瘍は、Epstein-Barr ウイルス(EBV)、ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T-cell leukemia virus 1: HTLV-1)、ヒトヘルペスウイルス 8 型 (Human herpesvirus 8: (HHV-8)、ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus : HIV) などが密接に関与し、悪性腫瘍の中でも、とりわけウイルスとの関連性が高い腫瘍カテゴリーである。2008 年にヒトポリオマウイルスとしては初の腫瘍ウイルスであるメルケル細胞ポリオマウイルス(Merkel cell polyomavirus: MCPyV)が報告された。しかし、この新規腫瘍ウイルスが造血器腫瘍の発症・病態形成に関与するかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 2010 年にドイツのグループは慢性リンパ性白血病(Chronic lymphocytic leukemia: CLL)の発症に MCPyV の関与を示唆した。CLL は欧米では好発する白血病であるが、本邦では非常に稀である。そこで本研究では本邦における CLL の MCPyV の蔓延性を調べ、検出されたウイルスの遺伝子解析を行った。

また MCPyV と同じポリオマウイルスに属し、最近報告されたヒトポリオマウイルス 9 型 (HPyV9) が CLL に関係するのかを明らかにすることも本研究の目的とした。

(2) MCPyV は単球にも感染することが報告されている。したがって、この腫瘍ウイルスの持続感染が細胞の腫瘍化へと導く可能性を調べるために、単球由来白血病における MCPyV の関与について調べた。

3. 研究の方法

(1) 本研究では日本人発症 CLL 27 症例を調べた。その内訳は B 細胞性 CLL 25 例、T 細胞性 CLL 2 例であった。男性 18 例、女性 9 例で、年齢は 49 歳から 93 歳で中央値は 63 歳であった。対照として、18 人の健常人末梢血 (27 歳から 55 歳、中央値 48 歳)を用いた。フィコールコンレイを用いて末梢血から白血病細胞を豊富に含む単核球を分画し、 -80°C で保存した。DNA 抽出はフェノール/クロロホルムを用いた標準的方法で行った。

MCPyV の検出は、定量的リアルタイム PCR 法で行った。ウイルスの small T (ST) 遺伝子領域にプライマーを設定し、鋳型 DNA 量を 500 ng とした。ゲノムコピー数は MCPyV ST 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(copies/cell)。リアルタイム PCR 法で陽性のサンプルについては、large T (LT) 遺伝子領域(ヌクレオチド番号 1867-2221)にプライマーを設定し、通常の PCR 法を行い、その PCR 産物の長さにより、LT 遺伝子に欠損がないかを調べた。

さらに、別のプライマーを用いて、MCPyV

LT 遺伝子(ヌクレオチド番号 183-1157)を通常の PCR 法で増幅した。その PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンス解析に供した。これにより LT 遺伝子に腫瘍特異的の変異がみられるかを調べた。

MCPyV の検出は、viral protein 1 (VP1) 遺伝子領域にプライマーを設定し、500 ng の DNA を鋳型にして定量的リアルタイム PCR 法で行った。

(2) 単球性白血病 21 例の MCPyV 感染有無について調べた。その内訳は、急性骨髄単球性白血病 5 例(45 歳から 92 歳、中央値 60 歳)、急性単球性白血病 10 例(16 歳から 83 歳、中央値 66 歳)、慢性骨髄単球性白血病 6 例(64 歳から 84 歳、中央値 78 歳)であった。フィコールコンレイを用いて末梢血あるいは骨髄から白血病細胞を分離し、DNA をフェノール/クロロホルムを使い抽出した。

単球由来白血病における MCPyV の検出は、ST 遺伝子領域にプライマーを設定し、100 ng の DNA を鋳型にして定量的リアルタイム PCR 法で行った。

4. 研究成果

【結果と考察】

(1) CLL 27 症例中 9 例 (33.3%)で MCPyV ゲノムが検出された。これまでのカナダ、ドイツ、アメリカ合衆国からの報告では、それぞれ 21%、27%、33% (Toracchio S, et al. Emerg Infect Dis. 16:1702-1709, 2010; Pantulu ND, et al. Blood. 116:5280-5284, 2010; Teman CJ, et al. Leuk Res. 35:689-692, 2011) の陽性率であり、今回の研究結果は欧米での陽性率と類似していることが明らかとなった。

陽性サンプルの MCPyV DNA コピー数は、 $7 \times 10^{-5} \sim 1.2 \times 10^{-3}$ copies/cell であり、北米からの報告とほぼ一致していた (Teman CJ, et al. Leuk Res. 35:689-692, 2011)。これら CLL から検出される MCPyV DNA コピー数は日本人のメルケル細胞癌から検出されるコピー数よりも少なかった。調べた健常人末梢血 18 人のうち 1 人のみが、MCPyV DNA 陽性であり、そのコピー数は 1.5×10^{-4} copies/cell であった。CLL 症例の MCPyV 検出率は、健常人に比べて統計学的に優位差を持って高率であった ($P = 0.034$)。このように、一部の CLL 症例で MCPyV が検出されるものの、そのゲノム量は少なく、ほとんどの日本人 CLL の発症に MCPyV の関与は少ないと考えられた。しかしながら、今回の我々の研究結果により、CLL と MCPyV の関係については、他のアジア地域を含めた全世界的サーベイの必要性があることを提示することができた。

リアルタイム PCR 法で陽性となった 9 症例について、LT 遺伝子(ヌクレオチド番号 1867-2221)の変異解析のために、通常の PCR 法で増幅を試みた。1 症例のみ 355 bp の PCR 産物が得られ、欧州で報告されたような LT 遺伝

子の欠損はみられず、野生型であることが判明した。

さらに、MCPyV LT 遺伝子(ヌクレオチド番号 183-1157)を PCR 法で増幅し、5 症例で PCR 産物が得られた。シークエンス解析の結果、全ての症例で同じウイルス遺伝子配列を有していた。ただし、欧米で分離される MCPyV 株と比べるとヌクレオチド番号 774 部位と 775 部位の二箇所塩基欠損が認められた。したがって、これら塩基欠損は日本人(アジア人)特有の変異である可能性が示唆された。

高感度リアルタイムPCR法でMPyV9ゲノムの検出を試みたが、1例も検出されなかった。また健常人末梢血での本ウイルスは検出されなかった。これらの結果により、CLLにおけるMPyV9の関与はないことが示唆された。

(2) 本研究で調べた全ての単球由来白血病において、MCPyV DNA は検出されなかった。陽性コントロールとして用いた MCPyV 陽性メルケル細胞癌サンプルではウイルスゲノムは検出可能であったことより、偽陰性の可能性は低く、MCPyV は単球性白血病の発生には関与していないという結果を得た。

しかしながら、個体が免疫不全状態下におかれ、単球での MCPyV 持続感染が成立した時に、MCPyV が細胞を腫瘍化させる可能性は残されたままであり、世界的な疫学調査が必要であると考えられた。

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 16 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, Daibata M. Considerations on the link between Merkel cell polyomavirus and lung cancer. *Lung Cancer Management*. 査読有. 2014 (掲載決定)

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.

Taniguchi A, Hashida Y, Nemoto Y, Taguchi T, Iwahara Y, Daibata M. Pyo-

thorax-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, 2013, 1545-1550. doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.033.

Hashida Y, Imajoh M, Daibata M. Gene expression analysis in Merkel cell polyomavirus-positive non-small cell lung cancer from Japanese patients. *International Journal of Cancer*. 査読有. 133, 2013, 3014-3015. doi: 10.1002/ijc.28305.

Hashida Y, Imajoh M, Daibata M. Integrated and mutated forms of Merkel cell polyomavirus in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. 査読有. 108, 2013, 2624. doi: 10.1038/bjc.2013.196.

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, Nakajima H, Sano S, Daibata M. Prevalence and viral DNA loads of three novel human polyomaviruses in skin cancers from Japanese patients. *Journal of Dermatology*. 査読有. 40, 2013, 657-660. doi: 10.1111/1346-8138.12180.

Imajoh M, Hashida Y, Nemoto Y, Oguri H, Maeda N, Furihata M, Fukaya T, Daibata M. Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients. *Virology Journal*. 査読有. 9, 2012, 154. doi: 10.1186/1743-422X-9-154.

Fresquet V, Robles EF, Parker A, Martinez-Useros J, Mena M, Malumbres R, Agirre X, Catarino S, Arteta D, Osaba L, Mollejo M, Hernandez-Rivas JM, Calasanz MJ, Daibata M, Dyer MJ, Prosper F, Vizcarra E, Piris MA, Oscier D, Martinez-Climent JA. High-throughput sequencing analysis of the chromosome 7q32 deletion reveals IRF5 as a potential tumour suppressor in splenic marginal-zone lymphoma.

homa. *British Journal of Haematology*. 査読有. 158, 2012, 712-726. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09226.x.

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.

Imajoh M, Hashida Y, Murakami M, Maeda A, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H, Daibata M. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 gene promoter variants and comparison of cellular gene expression profiles in Japanese patients with infectious mononucleosis, chronic active EBV infection, and EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of Medical Virology*. 査読有. 84, 2012, 940-946. doi: 10.1002/jmv.23299.

Mizutani N, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Nishida Y, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Osawa Y, Ohishi K, Daibata M, Murate T. Involvement of KRAS G12A mutation in the IL-2-independent growth of a human T-LGL leukemia cell line, PLT-2. *Nagoya Journal of Medical Science*. 査読有. 74, 2012, 261-271. PMID: 23092099.

Hashida Y, Nemoto Y, Imajoh M, Murakami M, Taniguchi A, Komatsu N, Yokoyama A, Daibata M. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein 6 gene in multiple myeloma. *Oncology Reports*. 査読有. 27, 2012, 825-830. doi: 10.3892/or.2011.1548.

Takaoka E, Sonobe H, Akimaru K, Sakamoto S, Shuin T, Daibata M, Taguchi T, Tominaga A. Multiple sites of highly amplified DNA sequences detected by molecular cytogenetic analysis in HS-RMS-2, a new pleomorphic rhabdomyosarcoma cell line. *American Journal of Cancer Research*. 査読有. 2, 2011, 141-152. <http://www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0000107>

[学会発表](計 13 件)

橋田裕美子, 大畑雅典, 他. 非小細胞肺癌におけるメルケル細胞ポリオマウイロスの検出. 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)

Noel K, Daibata M, 他. Development of the BET bromodomain inhibitor OT

X015. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2013 年 10 月 19 日 ~ 2013 年 10 月 23 日, Hynes Convention Center, Boston, USA.

Murakami M, Daibata M, 他. PCR array analysis in Japanese chronic active EBV patients. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases, 2012 年 8 月 1 日 ~ 2012 年 8 月 4 日, Sheraton Philadelphia Downtown Hotel, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Murakami M, Daibata M. Identification of new target for Nm23-H1 which is an adenomatous polyposis coli-stimulated guanine nucleotide exchange factor 2. International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases, 2012 年 8 月 1 日 ~ 2012 年 8 月 4 日, Sheraton Philadelphia Downtown Hotel, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

谷口亜裕子, 大畑雅典, 他. 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 30 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(仙台市)

今城雅之, 大畑雅典, 他. 本邦におけるメルケル細胞ポリオマウイロスの分子系統解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 15 日, 大阪国際会議場(大阪市)

橋田裕美子, 大畑雅典, 他. 慢性リンパ性白血病における新規ポリオマウイロスの検出. 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, 大畑雅典, 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)

谷口亜裕子, 大畑雅典, 他. A case of primary neurolymphomatosis of the lumbar cord nerve root. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19 日 ~ 2012 年 10 月 21 日, 国立京都国際会館(京都市)

谷口亜裕子, 大畑雅典, 他. 多発性骨髄腫における BMP-6 遺伝子メチル化の検討(Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in multiple myeloma) 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011 年 10 月 14 日, 名古屋国際会議場(名古屋市)

Mizutani N, Daibata M, 他. KrasG12A mutation is responsible for the cyt

okine independent growth of a human LGL leukemia cell line, PLT2. 第73回日本血液学会学術集会, 2011年10月14日, 名古屋国際会議場(名古屋市) 村上雅尚, 大畑雅典, 他. 皮膚扁平上皮細胞癌における新規腫瘍ウイルスメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出. 第26回中国四国ウイルス研究会, 2011年6月19日, 徳島大学 青藍会館(徳島市) Taguchi T, Daibata M, 他. Various sites of highly amplified DNA sequences in a pleomorphic type of a new rhabdomyosarcoma cell line, HS-RMS-2, detected by comparative genomic hybridization, chromosome microdissection and PCR analysis. The 102nd American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2011年4月2日, Orange County Convention Center, Orland, Florida, USA.

〔図書〕(計2件)

村上雅尚, 大畑雅典. 医学書院, 感染症と発癌: リンパ腫関連ウイルスとリンパ腫, 臨床検査, 2013年, 776-782.

大畑雅典. 医学書院, 悪性リンパ腫(膿胸関連リンパ腫 pyothorax-associated lymphoma: PAL), 2013年, 343-344.

〔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

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