

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591610

研究課題名(和文)皮膚腫瘍におけるメルケル細胞ポリオマーウイルスの病原性の証明

研究課題名(英文)Verification of pathogenecity of Merkel cell polyoma virus in skin neoplasms

研究代表者

金子 高英 (Kaneko, Takahide)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20333718

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)：本期間中に10例のメルケル細胞癌の新規症例を蓄積した。症例の内訳は男性6例、女性4例。平均年齢は75歳、部位は顔面発生が8例、上肢1例、下肢1例。発生母地として前駆病変を伴った症例は皆無であった。初回治療時にリンパ節転移、遠隔転移を認めた症例はなかった。生検による自然消褪傾向を示した症例はなかった。治療は8例手術療法を施行し、2例に放射線治療を施行。今回の腫瘍サンプルからポリオマーウイルスの検出を試みたがいずれも検出されなかった。より感度の高い方法の開発が必要である。In situ immune PCRについては条件を変えていったが、陽性所見は得られず、さらに最適条件の探索が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：We have experienced ten cases of Merkel cell carcinoma in this period. There were six males and four females, ranging in age 65 to 80 years (mean and median 75 years). 8 of the cases presented on the face, each of two cases, upper extremity and lower extremity. Precursor lesions were not found. On initial treatment, Resection were performed in 8 cases, on the other hand, radiation therapy were performed in two cases. Unfortunately, in all samples of this series, Polyoma virus were undetectable. Also, in situ immune PCR, positive findings could be obtained regardless of many changes of PCR conditions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メルケル細胞癌 ポリオ-マ-ウイルス immuno PCR

1. 研究開始当初の背景

2008年、皮膚科領域の癌であるメルケル細胞癌(図1)から今までに報告されていなかった新しいポリオーマウイルスが発見されメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)を名付けられた(Science, 2008)。それ以後、有棘細胞癌や基底細胞癌などの悪性腫瘍に限らず、疣贅やその他の良性の腫瘍にも組織からのPCRにてMCVの塩基配列が見つかり始め、



図1 メルケル細胞癌

特に免疫不全状態の患者に見られる皮膚腫瘍にMCVが強く関連することが報告されてきた。しかしながら一方、抗体などでMCVの発現する蛋白を調べると、メルケル細胞癌では検出されるがその他の腫瘍では検出されないという報告も多く、MCVの蛋白を検出する感度が低いのか?あるいは、本当にメルケル細胞癌以外の腫瘍でMCVは病因となっているのか?など、大きな議論を呼んでいる。一般に、ポリオーマウイルスは細胞の増殖に関連するウイルスで、細胞に感染するとMCVの遺伝子からLarge T抗原が翻訳される。癌抑制遺伝子産物であるp53とRB蛋白は細胞のサイクルを調節しているが、Large T抗原は二つの蛋白に結合してその機能を抑制することにより、細胞の分裂サイクルが止まらなくなり、細胞が不死化し増殖し続けるようになる。現在までにMCVのLarge T抗原の表皮細胞などでの役割を詳細に検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究目的は、MCVがメルケル細胞癌以外の皮膚悪性腫瘍、その他の良性腫瘍や疣贅など

の原因となっていることを証明することにある。そのためにMCVの存在と病変誘導活性の2点を明らかにする。

1) MCVの存在: 蛋白質の検出感度の高い新しい技術であるイムノPCRを用いてMCVの発現蛋白を検出する。さらに組織レベルでin situ イムノPCRを実現し、上記の腫瘍組織レベルでのMCV蛋白の存在を証明する。

2) 病変誘導活性: MCVのLarge T抗原の発現ベクターを構築し、それを人の表皮細胞や線維芽細胞に導入し細胞が不死化できるのか、さらに現在培養ができなくその起源が不明確な基底細胞癌、脂漏性角化症、汗孔腫などの腫瘍細胞にベクターを導入して、培養細胞の株化確立を目指す。

3)メルケル細胞癌症例の解析、蓄積も行う。

3. 研究の方法

1) 実験への検体の作成

a) 弘前大学皮膚科教室で新たに切除された皮膚の悪性腫瘍と良性腫瘍組織、凍結サンプル、固定組織などを用意する。

b) 新たにとられた組織は、そのまま分子生物学的、生化学的、組織学的な実験などすべての実験に用いる。

c) 凍結していたサンプルについては、イムノPCRとin-situ イムノPCRに用いる。d) 固定されていた標本については、主に組織学的な検査を行う。

2) MCVのゲノムの証明と変異の同定

a) 生の標本と凍結標本についてはそのままフェノール法にてDNAを採取する。

b) 固定されていた標本は、DNAアイソレータ-PS-ラピッド試液を用いて抽出する。

c) パラフィン切片からはTaKaRa DEXPATを用いてDNAを抽出する。

d) すべてのDNAについてMCVのLarge T抗原遺伝子をPCRで増幅し、有無を調べる。

e) また、メルケル細胞癌ではその部の変異もあるので、すべてのサンプルについてその変

異もチェックする。

3) MCV の large T 抗原の発現ベクターの構築

- a)我々はTet-onプロモーターを有するベクターを有しているため、PCRで増幅したMCVの large T抗原を組みこむ。
- b)培養表皮細胞と線維芽細胞に実際にそのベクターを導入し、stableな細胞株の薬剤選択を行う。さらに、rtetRのベクターを導入する。
- c)ドキシサイクリンを添加して、遺伝子、蛋白レベルでLarge T抗原の発現を確認する。

4) イムノPCR の条件設定

- a)まずプレートにMCV に対するモノクローナル抗体を固相化する。
- b)その後、標準抗原と反応後、ビオチン化した2 次抗体を反応。
- c)あるいは、2 次抗体を加えた後、ビオチン化した3 次抗体を反応。
- d)次にストレプトアビジンを介してビオチン化したDNA(ブルースクリプト)と反応
- e) molecular beacon とともにreal-time PCR にてDNA を増幅し定量化する。
- f)同様に通常のELISA の条件でも同様の実験を行う。
- g)最適の抗体、DNA の濃度を決定する。

5) In-situ イムノPCR の条件設定

- a)組織切片を用意し、1 次抗体を加え、さらにビオチン化した2 次抗体を加える。
- b)次にストレプトアビジンを介してビオチン化したDNA(ブルースクリプト)と反応
- c)今回は通常のPCR を行い、DNA を増幅。PCR は4 つの抗体を使用するRAMP 法で反応条件を60 度と一定で、通常のPCR とは異なり、90-60-72 度のサイクルは必要ない。
- d) digoxigenin-labelled DNA probe にて検出を行う。
- e)抗体の濃度、hybridization の条件など最

適なものを決める。

6) イムノPCR の施行

- a)細胞抽出液でおこなうイムノPCR の最適条件をすでに決定しているため、それに従い実験を行う。
- b)腫瘍組織をホモジナイズし、遠心の上層を取り、抗体をコートしてあるプレートに加える。
- c)ストレプトアビジンとビオチン化した抗体、あるいは2 , 3 次抗体を加える。
- d)real time PCR にてDNA を増幅し、MCV の蛋白の有無を定量する。

4. 研究成果

本期間中に 10 例のメルケル細胞癌の新規症例を蓄積することができた。症例の内訳は男性 6 例、女性 4 例。平均年齢は 75 歳、部位は顔面発生が 8 例、上肢 1 例、下肢 1 例。発生源地として前駆病変を伴った症例は皆無であった。初回治療時にリンパ節転移、遠隔転移を認めた症例はなかった。生検による自然消褪傾向を示した症例はなかった。治療は 8 例、手術療法を施行し、2 例に放射線治療を施行した。今回のサンプルとなった腫瘍からポリオーマウイルスの検出を試みたがいずれも検出されなかった。もっと、感度のよい方法の開発が必要である。また In situ immune PCR については条件を変えていったが、陽性所見は得られず、さらに最適条件の探索が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Nakajima K, Kaneko T, Aizu T, Nakano H, Matsuzaki Y, Sawamura D: Signet-ring cutaneous squamous cell carcinoma arising on the back of the finger. 査読有 ,Case Rep Dermatol, 10:(5):215-218, 2013. doi: 10.1159/000354536.
2. Korekawa A, Kaneko T, Hagiwara C, Nakajima K, Takayuki A, Nakano H,

Sawamura D: Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia in infancy. 査読有, J Dermatol. 2012; 39:1052-1054. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01578.x

3. Rokunohe D, Takeda H, Kaneko T, Aizu T, Akasaka A, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D: Spindle cell hemangioma and decorin expressio. 査読有, Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 2012;2:8-10. doi:10.4236/jcdsa.2012.21002
4. Takeda H, Nakajima K, Kaneko T, Harada K, Matsuzaki Y, Sawamura D: Follicular mucinosis associated with radiation therapy. 査読有, J Dermatol. 2011;38(11):1116-1118. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2010.01187.x.

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 金子高英、中野 創、澤村大輔：四肢に多発した線状cutaneous neuromaの1例。第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2013.9.21-22.大宮ソニックシティ
2. 中島康爾、金子高英、福井智久、六戸亜希子、六戸大樹、会津隆幸、松崎康司、中野 創、澤村大輔、澤村大輔：治療経過中に癌性髄膜炎症を発症したメルケル細胞癌。第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2013.8.9-10。甲府富士屋ホテル
3. 金子高英、萩原千尋、是川あゆ美、六戸亜希子、六戸大樹、神 可代、中島康爾、会津隆幸、中野 創、澤村大輔：脳転移が判明してから約5年生存した進行期結膜黒色腫の治療経験。第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2013.8.9-10。甲府富士屋ホテル
4. 金子高英、六戸亜希子、六戸大樹、中野 創、澤村大輔：Mohs' pasteで局所制御した手術不能高齢患者に生じた皮膚悪性腫瘍の2例。日本皮膚科学会青森地方会第362回例会、2013.5.26.ホテルニューキャッスル(弘前市)
5. Kaneko T, Korekawa A, Akasaka E, Nakano H, Sawamura D: Amelanotic malignant melanoma with rhabdoid features, a rare variant of malignant Melanoma. 2nd Eastern Asia Dermatology Congress, 2012.6.13-15.Beijing(China)
6. 金子高英、福井智久、六戸亜希子、是川あゆ美、六戸大樹、中島康爾、会津隆幸、中野 創、澤村大輔、原田 研：原発不明悪性黒色の4例。第76回日本皮膚科学

会東部支部学術大会、2012.9.29-30.ロイトン札幌

7. 金子高英、是川あゆ美、赤坂英二郎、会津隆幸、中野 創、澤村大輔：Cystic hygromaの1例。第27回日本皮膚外科学会総会・学術集会、2012.9.1-2。岩手県民会館
8. 金子高英、神 可代、中野 創、澤村大輔：Milia en plaqueの2例。第63回日本皮膚科学会西武支部学術大会、2011.10.8-9。沖縄

〔図書〕(計 1 件)

1. 金子高英：皮膚科のがん。最新!がん治療, 朝日新聞出版, 2011,207-211

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 高英(KANEKO, Takahide)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20333718

(2)研究分担者

中野 創(NAKANO, Hajime)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90281922