

## 5. メルケル細胞ポリオーマウイルスとメルケル細胞癌

中村 智之, 片野 晴隆

国立感染症研究所感染病理部

メルケル細胞癌から新たなポリオーマウイルスであるメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)が発見された。メルケル細胞癌は皮膚の神経内分泌系の細胞であるメルケル細胞を由来とするまれな皮膚癌で、白人の顔面、頭部などに発症する。全長5.4kbpのウイルスDNAゲノムには他のポリオーマウイルスと同様にVP1, VP2, VP3, およびsmall T, large T (LT)抗原がコードされている。メルケル細胞癌ではMCVは高頻度に検出されているが、陽性率には地域差がある。他の疾患からはほとんど検出されていない。メルケル細胞癌ではMCV遺伝子が宿主細胞のゲノムにインテグレーションしていることが確認されている。LTは環状のMCVの複製に重要であるが、メルケル細胞癌ではLTの中間部分に休止コドンを伴う変異があり、C末端のヘリケースドメインが機能せず、Rb結合ドメインなどの働きにより発癌が促進される。ヒトポリオーマウイルスとしては初めての癌ウイルスに分類すべきものであり、今後、感染様式や発癌メカニズムの解明が期待される。

### はじめに

ポリオーマウイルス Polyomavirus は、複数の (poly-) 腫瘍 (-oma=tumor) という語源が示すように、宿主にしばしば癌を引き起こす腫瘍原性を特徴とする。最初に発見されたヒトポリオーマウイルスはBK virus とJC virus であり、JC virus は進行性多巣性白質脳症の患者の脳から、BK virus は腎臓移植をした患者の尿から、ともに1971年に発見された<sup>11, 18)</sup>。成人の70-80%が両方のウイルスに対する抗体を持っており、これらのウイルスは新生仔ハムスターに腫瘍を誘発するが、ヒトの腫瘍の原因となっている事実は知られていない。近年、ヒトに感染するポリオーマウイルスに新たに3つのウイルスが追加された。2007年にKI virus, WU virus が気道感染症患者から発見されたが<sup>2, 13)</sup>、関連する疾患は今のところまだ見つかっていない。そして、2008年にはメルケル細胞癌から、メルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus; MCV) が発見された<sup>8)</sup>。

本稿では、一番最近発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルスとメルケル細胞癌について概説する。

### メルケル細胞癌からの MCV の発見

メルケル細胞癌は顔面などに発症するまれな皮膚癌であり、皮膚の神経内分泌系細胞であるメルケル細胞が由来である<sup>19)</sup>。ほとんどは65歳以上の高齢者の顔面、頭部などの日光露出部位に発症する。進行が早く、所属リンパ節転移や再発は30%まで見られ、予後も悪い<sup>1)</sup>。日本には正確な疾患統計はないが、米国においては年間1,200例ほどの新規患者が報告されている<sup>16)</sup>。発症には人種差があり、白人に多く、黒人に少ない。高齢者に加え、臓器移植患者やエイズ患者などの免疫低下者によくみられることから、感染性病因が示唆されていた。組織学的に、精細なクロマチンを伴う、明るく円形の核が特徴の癌細胞が索状またはびまん性に増殖する像を採る (図1)。一見、肺の小細胞癌と近似しているが、免疫組織化学でサイトケラチン20が陽性である点が鑑別になる。そのほか、免疫組織化学ではchromogranin A や neuron-specific enolase (NSE) が陽性であり、メルケル細胞癌の由来が神経内分泌系であることが示唆される。

2008年2月、ピッツバーグ大学のYuan Chang と Patrick Moore のグループは、今まで知られていないポリオーマウイルスが、メルケル細胞癌のゲノム上に組み込まれている (インテグレーション) と Science 誌上に発表し

### 連絡先

〒162-8460 新宿区戸山1-23-1  
国立感染症研究所感染病理部  
TEL: 03-5285-1111 内線 2627  
FAX: 03-5285-1189  
E-mail: katano@nih.go.jp

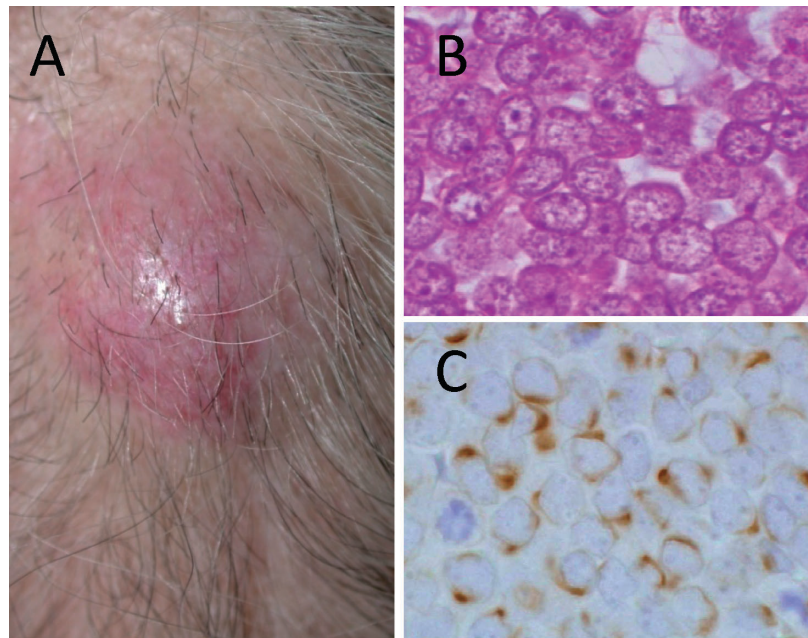


図1 メルケル細胞癌

- (A) 頭部に発症したメルケル細胞癌。(東京慈恵会医科大学皮膚科伊東秀記先生原図)  
 (B) HE染色。明るく円形の核を持ち精細なクロマチンと小さな核小体が特徴的である。  
 (C) サイトケラチン20の免疫染色。細胞質内に偏在する染色像が見られる。

た<sup>8)</sup>。このグループは1994年にカポジ肉腫の組織からヒトヘルペスウイルス8 (human herpesvirus 8, HHV-8, KSHV) を発見しており<sup>6)</sup>、彼らにとって2つめのヒト癌ウイルスの発見である。彼らはまず、メルケル細胞癌の検体のmRNAからcDNAライブラリーを作成し、ハイスループットのシーケンサーを用いて約40万本のcDNA配列(150bpから200bp長)を決定した。これらのcDNA配列データから、データベース上に登録されているヒト由来の既知配列を引き算することにより、約3,000本まで絞り込んだ上で、そのうちの1本がアフリカミドリザルのポリオーマウイルスと相同性のあることを見出した。この配列から、もとのcDNAライブラリーに戻り、3'-RACEを行ったところ、ウイルスT抗原様の配列とヒトゲノム染色体上の遺伝子(3p14.2, ヒト受容体型チロシン脱リン酸化酵素, PTPRG, human receptor tyrosine phosphatase type G gene)との融合転写物が同定された。これはすなわち、ウイルス遺伝子がヒトのゲノムに組み込まれていることを示すものであった。最終的にはウイルスのゲノムウオーキングにより、全長5,387塩基対のゲノムからなる新規ポリオーマウイルスが同定された。メルケル細胞癌から検出されたウイルスであることから、メルケル細胞ポリオーマウイルス(Merkel cell polyomavirus, MCVまたはMCPyV)と命名された。ハイスループットのシーケンサーで得られたcDNAの配列からヒトの配列を除き、ウイルスなどの外来

性配列を同定する方法(digital transcriptome subtraction; DTS)は2007年にこのグループが詳細に条件検討しており<sup>9)</sup>、近年のシーケンシング技術の飛躍的な進歩とヒトゲノムデータベースの充実がこの発見の背景にある。

#### MCVのゲノム構造

MCVのゲノム構造は他のポリオーマウイルスのそれに類似する。MCVは約5.4kbpの2本鎖DNAを持ち、ウイルス粒子の構造タンパクであるVP1, VP2, VP3と早期腫瘍タンパクであるsmall T antigenおよびlarge T (LT) antigenの少なくとも5つのウイルス遺伝子をコードしている(図2)。これらの遺伝子配列を他の既知のポリオーマウイルスと比較するとMCVはマウスポリオーマウイルスのサブグループに属し、アフリカミドリザルのリンパ球性ポリオーマウイルスに最も近似する配列を持つ<sup>8)</sup>。これまで発見されているJCV, BKVなどのヒトポリオーマウイルスのサブグループとは遠縁である。LTは腫瘍原性に重要なタンパクであり、この遺伝子構造については後述する。LTの1,201-1,245bpにはmiRNAがコードされており、LTの遺伝子発現を抑制する働きがあることが示されている<sup>22)</sup>。またこれまで、VP1領域に90bpほどの欠失が報告されているほか<sup>17)</sup>、後述するようにLTを中心に変異が報告されている。

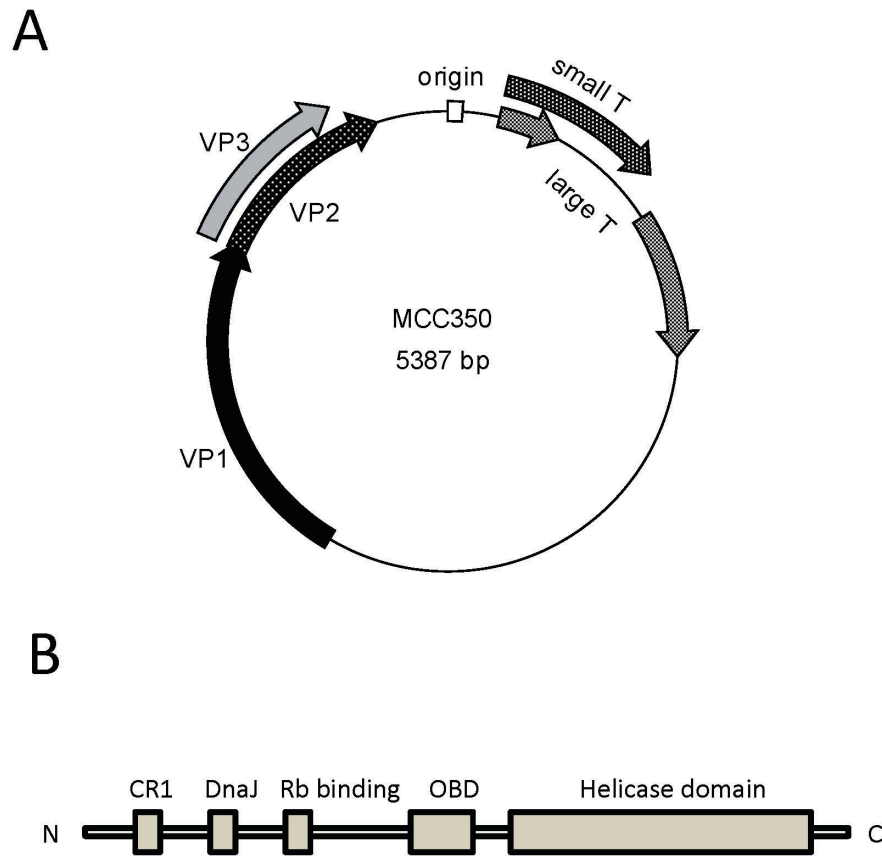


図2 メルケル細胞ポリオーマウイルスのゲノム構造

- (A) MCV ゲノムは、約 5.4kbp の 2 本鎖環状構造をとる。初期遺伝子領域には、ウイルスの複製に関与する small T antigen, LT を持ち、後期遺伝子領域には、ウイルスクアプシドタンパク(VP1, VP2, VP3)がコードされている。図は MCV の標準株 MCC350 (GenBank EU375803)を示す。
- (B) LT の遺伝子構造。N 末端から順に CR1, DnaJ, Rb binding site, origin binding domain (OBD), helicase domain をコードする (文献 24 を改変)。メルケル細胞癌由来の MCV では LT の Rb binding domain から helicase domain の間に休止コドンに伴う変異が見られる。

### MCV の検出と疫学

MCV の最初の報告以降、世界各国で続々と MCV を検出した報告が続いており、MCV は世界に広く蔓延しているウイルスであることが考えられる<sup>3-5, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 20, 21, 23</sup>。MCV を検出する方法は、これまでのところ PCR または定量的 PCR を用いた核酸検出であり、血清疫学のデータはまだない。これまでの報告では、米、仏、独などの欧米のメルケル細胞癌における MCV の陽性率は 69-100% であるのに対し、豪では 24% と低い (表 1)。また、皮膚のコントロール標本や鼻咽頭、気管吸引物からも頻度は低いが陽性例が報告されている。これらの PCR の結果は標的遺伝子や反応条件が一定しておらず、検出系の感度に差があることや、標的遺伝子に変異がある可能性もあることを考慮する必要がある。しかし、これらの PCR 結果と、メルケル細胞癌は欧米の白人に多く、その他の地域では一般的に頻

度が低いことを考えると、健常者における MCV 感染率に地域差があることが想像される。メルケル細胞癌以外の疾患との関連については明らかでない。カポジ肉腫や悪性黒色腫、組織学的に近似する肺小細胞癌などが検索されているが、MCV の陽性率は皮膚のコントロールサンプルと似たような値であり、これら疾患との関連は薄いと考えられる。

### メルケル細胞癌における MCV 発癌

一般にポリオーマウイルスはその自然宿主では腫瘍原性を示さず、ウイルスゲノムの複製とウイルス粒子の産生により宿主細胞は細胞融解に陥る。しかし、自然宿主以外の細胞では腫瘍原性を示し、ウイルスの複製は行われぬ。その場合にウイルスゲノムは宿主細胞のゲノムにインテグレーションし、small T と LT を構造的に発現する。MCV による発癌はこの LT 遺伝子が鍵となることが示されつつ

表 1

| 文献 | 地域      | 方法         | 標的遺伝子   | サンプル       | 検体数  | 陽性数 | 陽性率  |
|----|---------|------------|---------|------------|------|-----|------|
| 8  | 米国      | PCR        | LT, VP1 | メルケル細胞癌    | 10   | 8   | 80%  |
|    |         |            |         | 各臓器        | 59   | 5   | 8%   |
|    |         |            |         | 皮膚コントロール   | 25   | 4   | 16%  |
| 17 | ドイツ     | PCR        | VP1     | メルケル細胞癌    | 39   | 30  | 70%  |
| 3  | ドイツ     | Q-PCR      | LT      | メルケル細胞癌    | 53   | 45  | 85%  |
| 12 | 米国      | Q-PCR      | ST, LT  | メルケル細胞癌    | 16   | 11  | 69%  |
|    | オーストラリア |            |         | メルケル細胞癌    | 21   | 5   | 24%  |
|    | 米国      |            |         | 扁平上皮癌      | 15   | 2   | 13%  |
| 20 | 米国      | PCR        | LT, VP1 | 非悪性黒色腫皮膚腫瘍 | 156  | 1   | 0.6% |
| 10 | フランス    | PCR        | LT, VP1 | メルケル細胞癌    | 9    | 8   | 89%  |
|    |         |            |         | コントロール     | 15   | 0   | 0%   |
| 14 | スウェーデン  | PCR        | LT      | 悪性黒色腫      | 38   | 0   | 0%   |
| 23 | イギリス    | Nested PCR | ST      | エイズ剖検リンパ節  | 42   | 0   | 0%   |
|    |         |            |         | コントロール     | 55   | 1   | 0.8% |
| 5  | 米国      | Q-RT-PCR   | LT      | 前立腺癌       | 28   | 0   | 0%   |
| 15 | スウェーデン  | Q-PCR      | LT, VP1 | 鼻咽頭吸引物     | 635  | 27  | 4.3% |
| 4  | オーストラリア | Q-PCR      | VP2/3   | 気管吸引物      | 526  | 7   | 1.3% |
| 7  | 米国      | PCR        | LT      | メルケル細胞癌    | 29   | 22  | 76%  |
| 21 | フランス    | RT-PCR     | LT      | メルケル細胞癌    | 10   | 10  | 100% |
|    |         |            |         | その他の腫瘍     | 1241 | 0   | 0%   |

ある。

### (1) LT の変異と MCV による腫瘍化

MCV の LT 遺伝子は、全長およそ 3kbp であり、他のポリオーマウイルスの LT と同様に細胞増殖に必要な CR1, DnaJ, Rb binding site に加え、ウイルスの複製のために必要な origin binding domain や helicase domain がコードされている (図 2)。LT はウイルスの複製には重要な役割を果たす。LT が発現すると LT 中の origin binding domain を介して LT はウイルスの origin に結合する。そこから LT の C 末にあるヘリケースドメインの作用により、2 本鎖 DNA がほどかれることでウイルスの複製が始まる。ところが、こうした LT によるウイルス複製はメルケル細胞癌では行われていないようである。Shuda らは、メルケル細胞癌および非腫瘍サンプルから抽出された DNA における LT の塩基配列を調べたところ、メルケル細胞癌由来の MCV の LT では、その中間部分で休止コドンを伴う変異が検出される場合が多く、一方で非腫瘍部位由来の MCV の LT に

は休止コドンを伴う変異がないことを見出した<sup>24)</sup>。メルケル細胞癌由来の MCV における休止コドンの位置は、LT の Rb binding domain と helicase domain の間に集中していた。従って、これら腫瘍部由来ウイルスの LT はヘリケース活性を持たず、ウイルス複製は行われない。LT の Rb binding 領域は Rb と結合することが示されており、メルケル細胞癌では LT は Rb の働きを抑制し、発癌を促進する働きが主で、ウイルスの複製を行わない。

### (2) ゲノムインテグレーションと LT

MCV がクローニングされた際に、MCV の LT 遺伝子がヒトゲノム染色体 3p14.2 の上の PTPRG と融合した形でクローニングされた<sup>8)</sup>。これは MCV が宿主ゲノムにインテグレーションしていることを示すものである。さらに、MCV 遺伝子をプローブにメルケル細胞癌から抽出された DNA をサザンブロット法で検索したところ、検索した 8 例のうち、6 例に MCV の全長 5.4kbp 以外のバンドが存在し、しかも、症例により、バンドの高さは異なっていた<sup>8)</sup>。こ

れは少なくともこの6例ではMCV遺伝子が宿主ゲノムにインテグレーションし、かつ、インテグレーション部位は症例ごとに異なることを示唆する。なお、この6例の中には再発例もあり、原発例との比較を行ったところ、再発例にも原発例と同様のバンドが見られ、クローナルな腫瘍であることが証明された。2009年に入り、Sastre-Garauらは、解析したメルケル細胞癌10例のほぼ全例でMCVがゲノムにインテグレーションしていることを detection of integrated papilloma sequences (DIPS) -PCR法を用いて明らかにした<sup>21)</sup>。インテグレーション部位は染色体2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 20, Yと多岐にわたっており、症例ごとに異なっていた。さらに彼らは fluorescent in situ hybridization (FISH法)を用いてMCVゲノムが宿主ゲノム中に検出されることを示している。原発例と再発例ではインテグレーション部位が同じことから、腫瘍細胞の増殖の前に、MCVがゲノムにクローナル・インテグレーションした、としている。また、インテグレーションが起こる際のウイルス側の切断部位についても検討が行われ、LTのC末部分に集中していることが示されている<sup>21)</sup>。これは上述のLTの変異部位との関連もあり、興味深い。さらにSastre-Garauらは Array CGH (comparative genomic hybridization)を用い、MCV陽性のメルケル細胞癌で、1q, 6pおよび11番染色体の増幅、さらに17pに欠失がみられたことを明らかにしたが、これらの遺伝子再構成とMCVのインテグレーション部位との相関は見られなかった<sup>21)</sup>。

### おわりに

MCVは、ごく最近発見されたウイルスであり、ウイルス学的知見、病因的意義、疫学研究などウイルスの性状を知るための情報がほとんど得られていない。しかし、メルケル細胞癌から高頻度で検出されること、一部の癌細胞でMCVがゲノムにインテグレーションしていることが示されたことから、癌ウイルスである可能性が高い。LT単独でtransformation活性を持っている可能性も高く、MCVはヒトポリオマウイルスとしては初めての癌ウイルスであろう。MCVが健常者でどの程度蔓延しているか、メルケル細胞への感染機構や癌化の分子機構などが今後の研究課題であろう。

### 引用文献

- 1) Agelli M, Clegg LX. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 49:832-841, 2003.
- 2) Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81:4130-4136, 2007.
- 3) Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. MC Polyomavirus Is Frequently Present in Merkel Cell Carcinoma of European Patients. *J Invest Dermatol*, 2008.
- 4) Bialasiewicz S, Lambert SB, Whiley DM, Nissen MD, Sloots TP. Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults. *Emerg Infect Dis* 15:492-494, 2009.
- 5) Bluemn EG, Paulson KG, Higgins EE, Sun Y, Nghiem P, Nelson PS. Merkel cell polyomavirus is not detected in prostate cancers, surrounding stroma, or benign prostate controls. *J Clin Virol* 44:164-166, 2009.
- 6) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-1869, 1994.
- 7) Duncavage EJ, Zehnbauser BA, Pfeifer JD. Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 22:516-521, 2009.
- 8) Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319:1096-1100, 2008.
- 9) Feng H, Taylor JL, Benos PV, Newton R, Waddell K, Lucas SB, Chang Y, Moore PS. Human transcriptome subtraction by using short sequence tags to search for tumor viruses in conjunctival carcinoma. *J Virol* 81:11332-11340, 2007.
- 10) Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Brieu N, Guillot B, Segondy M. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerg Infect Dis* 14:1491-1493, 2008.
- 11) Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1:1253-1257, 1971.
- 12) Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 129:246-248, 2009.
- 13) Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3:e64, 2007.
- 14) Giraud G, Ramqvist T, Ragnarsson-Olding B, Dalianis T. DNA from BK virus and JC virus and from KI, WU, and MC polyomaviruses as well as from simian virus 40 is not detected in non-UV-light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes. *J Clin Microbiol* 46:3595-3598, 2008.
- 15) Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Allander T. Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerg Infect Dis* 15:489-491, 2009.
- 16) Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* 89:1-4, 2005.
- 17) Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, Zur Hausen A. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* 68:5009-5013, 2008.
- 18) Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from

- human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1:1257-1260, 1971.
- 19) Pectasides D, Pectasides M, Economopoulos T. Merkel cell cancer of the skin. *Ann Oncol* 17:1489-1495, 2006.
  - 20) Ridd K, Yu S, Bastian BC. The presence of polyomavirus in non-melanoma skin cancer in organ transplant recipients is rare. *J Invest Dermatol* 129:250-252, 2009.
  - 21) Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, Rozenberg F, Almeida A, Boitier F, Carlotti A, Couturaud B, Dupin N. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 218:48-56, 2009.
  - 22) Seo GJ, Chen CJ, Sullivan CS. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology* 383:183-187, 2009.
  - 23) Sharp CP, Norja P, Anthony I, Bell JE, Simmonds P. Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals. *J Infect Dis* 199:398-404, 2009.
  - 24) Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16272-16277, 2008.

## Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma

**Tomoyuki NAKAMURA, Harutaka KATANO**

Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases

A new polyomavirus, Merkel cell polyomavirus, was identified from Merkel cell carcinoma, a rare skin cancer. Origin of Merkel cell carcinoma is Merkel cell, a neuroendocrine cell in the skin. Merkel cell carcinoma occurs in the skin of head and face of white elders. Like other polyomaviruses, a 5.4 kbp-virus genome encodes VP1, VP2, VP3, small T antigen, and large T (LT) antigen. MCV has been frequently detected in Merkel cell carcinoma in the world by PCR. It was demonstrated that MCV genome integrated into the host genome of Merkel cell carcinoma. LT plays an important role in replication of a circular MCV. However, mutations with stop codons were identified in the LT genes derived from Merkel cell carcinoma cases. Such mutations cause a truncation of the LT gene, resulting in defect of LT's helicase activity and in induction of Rb binding function in the LT. MCV is a new member of human oncovirus belonging to the human polyomavirus.