

平成27年1月

松下倫子 学位論文審査要旨

主査 梅北善久

副主査 鱒岡直人

同 北村幸郷

主論文

A new in situ hybridization and immunohistochemistry with a novel antibody to detect *small T-antigen* expressions of Merkel cell polyomavirus (MCPyV)

(メルケル細胞ポリオーマウイルスのsmall T抗原を検出する新規in situ ハイブリダイゼーション法及び新しい抗体による免疫染色法)

(著者：松下倫子、野中大輔、岩崎健、桑本聡史、村上一郎、加藤雅子、長田佳子、北村幸郷、林一彦)

平成26年 DIAGNOSTIC PATHOLOGY DOI:10.1186/1746-1596-9-65 8 pages

参考論文

1. Detection of Merkel cell polyomavirus in the human tissues from 41 Japanese autopsy cases using polymerase chain reaction

(日本人剖検41症例を用いたPCRによるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)

(著者：松下倫子、桑本聡史、岩崎健、森（檜垣）裕美、八島正司、加藤雅子、村上一郎、堀江靖、北村幸郷、林一彦)

平成25年 Intervirology 56巻 1頁～5頁

2. Merkel cell polyomavirus (MCPyV) strains in Japanese merkel cell carcinomas (MCC) are distinct from Caucasian type MCPyVs: genetic variability and phylogeny of MCPyV genomes obtained from Japanese MCPyV-infected MCCs

(日本人のメルケル細胞癌由来のメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)株は白色人種のMCPyV株とは異なる：日本人メルケル細胞癌から検出されるMCPyV遺伝子の多様性と系統樹)

(著者：松下倫子、岩崎健、桑本聡史、加藤雅子、長田佳子、村上一郎、北村幸郷、林一彦)

平成26年 Virus Genes 48巻 233頁～242頁

学 位 論 文 要 旨

A new in situ hybridization and immunohistochemistry with a novel antibody to detect *small T-antigen* expressions of Merkel cell polyomavirus (MCPyV)

(メルケル細胞ポリオーマウイルスのsmall T抗原を検出する新規in situ ハイブリダイゼーション法及び新しい抗体による免疫染色法)

メルケル細胞癌 (MCC) の約80%にメルケル細胞ポリオーマウイルス (MCPyV) が検出され、MCPyV感染MCC群は非感染MCC群より予後良好であることが知られている。MCCにおけるMCPyV感染の正確な判定は臨床的に重要であるが、現在、MCPyV検出に通常使用される免疫染色 (IHC) 用の抗MCPyV large T-antigen (LT) 抗体 (CM2B4) では、稀に偽陽性と偽陰性判定が生ずる。本研究ではMCPyV検出の精度向上を目的に、*small T-antigen* (ST) mRNAを検出する新規in situハイブリダイゼーション (ISH) と新しい抗ST抗体によるIHCを施行して、これらの感度と特異度を従来のIHCと比較検討した。

方 法

日本と英国のMCCホルマリン固定32症例を用いた。MCPyV-LT遺伝子の検出はreal-time PCRを用い、LT抗原の検出はIHC (使用抗体: CM2B4) にて行った。ST遺伝子検出にPCRを用い、ST mRNAの定量にreal-time PCRを、ST mRNA検出にはMCPyV-ST (nt 196-756) に対するDIG標識RNAプローブを用いてISHを施行した。ST発現の検出には抗ST (aa: 164-177) ウサギポリクローナル抗体 (抗体名: ST-1) を作成しIHCを行った。本研究により作成された、ST mRNA-ISH及びST-1抗体を用いたIHCによる感度と特異度を、CM2B4抗体を使用したIHCと比較評価した。

結 果

MCPyVのLT遺伝子のreal-time PCRの検出結果に基づき、MCPyV陽性MCC群16例、MCPyV陰性MCC群16例に分けて、従来のCM2B4-IHCによる偽陽性症例1例、偽陰性症例1例を認めた。新しいMCPyV検出方法のそれぞれの感度、特異度は、ST DNA: PCR (0.94、1.0)、ST-1-IHC {核における染色 (0.69、1.0)、細胞質における染色 (0.88、0)}、ST mRNA定量 (1.0、-)、ST mRNA-ISH (0.94、1.0)。LT DNA定量: (1.0、1.0)、CM2B4-IHC (0.94、0.94) となった。ST-1-IHCはMCPyVのDNAが陽性であった2症例 (核のみ陽性) 以外の症例で細胞質陽性であった。したがって、核での判定が有意であった。ST-1-IHCの感

度 (0.69) はCM2B4-IHCの感度 (0.94) より劣るが、*ST* mRNA-ISHは同等 (0.94) であった。一方、特異度は、CM2B4-IHCが0.94に対して、*ST* mRNA-ISHとST-1-IHCが共に1.0と優れていた。今回、CM2B4-IHCによる偽陽性例と偽陰性例は、*ST* mRNA-ISH及び、ST-1-IHCを追加して補正する事で、PCRの結果と一致した。

考 察

MCCでは*LT*遺伝子に変異を持ったMCPyVが宿主ゲノムに組み込まれ、産生されるLT蛋白がRBに結合することによって細胞周期制御を阻害し、腫瘍の増殖に重要な役割を果たしているとされている。また、*ST*もがん遺伝子と考えられている。MCCからのMCPyVのLT抗原の検出には、通常CM2B4抗体を用いたIHCが行われている (Wielandら、J Am Acad Dermatol、2012)。しかし、Kuwamotoら (Hum Pathol、2011) は、CM2B4によるIHCは感度、特異度が不十分であると報告している。また、MCPyVの検出にあたり、PCR及びreal-time PCRとCM2B4によるIHCとの結果の異なる偽陽性、偽陰性症例があるとの報告がある (Shudaら、Int J Cancer、2009)。

本研究にて作成したST-1抗体によるIHC及び*ST* mRNA-ISHはCM2B4-IHCより特異度が優れており、感度に関しては*ST* mRNA-ISHはCM2B4-IHCと同等であった。ST-1-IHCでは核及び細胞質への染色が見られたものの、核判定が有用であり、*ST* mRNA-ISHはMCPyV陽性症例においては1症例を除き核陽性であった。CM2B4-IHCにおける偽陽性、偽陰性症例においては本研究にて作成されたST-1抗体及び*ST* mRNA-ISHを使用することでPCRとの結果が一致した。最近の研究で、Shudaら (J Clin Invest、2011) は、*ST*遺伝子はMCCが腫瘍増殖する際に必要であると報告している。MCPyVの*ST*領域の機能は未解明なことが多く、*ST* mRNA-ISH及び、ST-1-IHCは今後、*ST*領域の研究を行う際に有効な方法となることが期待される。

結 論

CM2B4抗体のみのIHCではなく、*ST* mRNA-ISH及びST-1-IHCを併用することにより、予後の良いMCPyV陽性MCCをより正確に同定できることが示唆された。