166　皮膚ポリオーマウイルスの病原性解明とゲノム多型解析

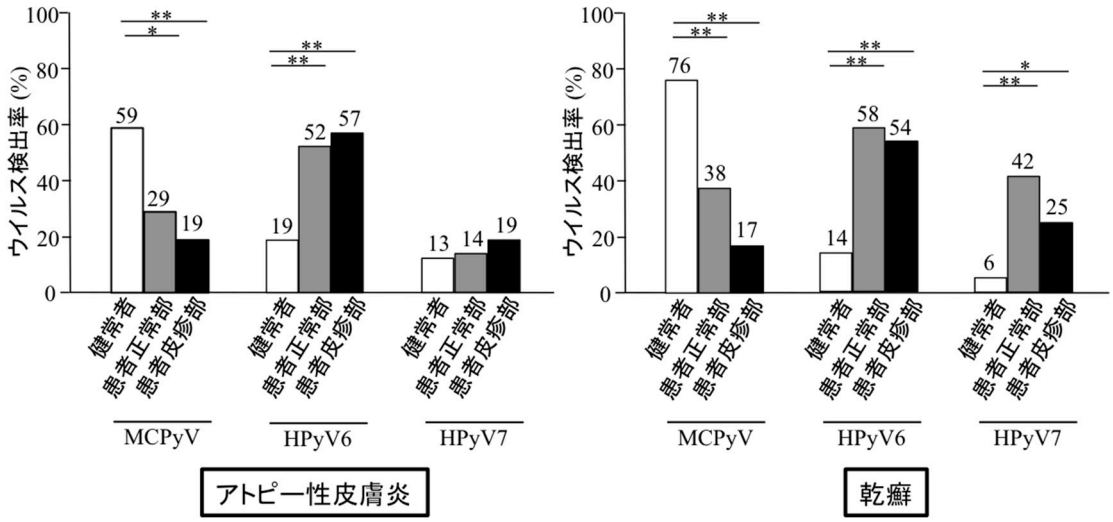
橋田　裕美子

【目的】人体の外部環境に接するあらゆる部位には様々な微生物が生息している。この微生物叢の変動が健康や疾患に深く関与していることが示唆され、注目を集めている。しかし、これまでの微生物叢の研究は細菌叢に主眼が置かれ、微生物叢を構成するウイルス種と疾患との関連性については明らかにされていない。本研究では、皮膚に生息する主なウイルスであるポリオーマウイルスに焦点をあて、炎症性皮膚疾患との関連性を明らかにすることを目的とし、感染実態の調査を行った。

【方法】炎症性皮膚疾患患者の病変部（皮疹部）と非病変部（正常部）の皮膚を清潔綿棒で擦過し、皮膚スワブを採取した。DNA を抽出し、定量リアルタイム PCR 法により皮膚指向性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（MCPyV）・ヒトポリオーマウイルス 6（HPyV6）、ヒトポリオーマウイルス 7（HPyV7）のウイルスゲノムの検出および定量を行うことで皮膚上での感染状況を調べた。ウイルスが検出された例では、ウイルスゲノム配列を同定し、変異解析および系統解析を行った。さらに、同例において皮膚常在細菌である黄色ブドウ球菌の存在量を定量リアルタイム PCR 法によって検出した。これら皮膚疾患症例での感染実態と健常者の健常皮膚での感染状況を比較した。

【結果】本研究の結果、乾癬患者では HPyV6、HPyV7 の検出率およびウイルス量が健常者の健常皮膚に比べて有意に高く、一方で MCPyV の検出率とウイルス量は共に低いことが示された。また、アトピー性皮膚炎患者でも MCPyV と HPyV6 において同様の変動が有意に認められた。これらのウイルスの変動は病変部位だけではなく、ほとんどの患者の非病変部位でも観察され、患者全身でのウイルス感染状況の変動が示唆された。また、得られたウイルスゲノム配列を調べたところ、ウイルス株は全てアジア／日本の遺伝子型であった。本研究から、疾患により皮膚常在ウイルス量の変動に差があることが明らかとなり、その変化とウイルス遺伝子型により皮膚疾患の発症や病態変化を推定できる可能性が示唆された。

炎症性皮膚疾患患者と健常者における皮膚スワブからのウイルス検出率



166. 皮膚ポリオーマウイルスの病原性解明とゲノム多型解析

橋田　裕美子

高知大学 医療学系 基礎医学部門 微生物学講座

Key words：皮膚ウイルス叢，炎症性皮膚疾患，ポリオーマウイルス，定量

緒　言

人の体の様々な部位にはマイクロバイオーム（微生物叢）が存在し、人の健康と密接な関係を持ちながら共生している。近年では腸内細菌叢と糖尿病などの生活習慣病、アレルギー疾患、癌との関連性が大きな話題となり広く知られることとなった。これまでのマイクロバイオーム研究は、主に細菌叢に主眼が置かれ、微生物叢を構成するウイローム（ウイルス叢）と疾患との関連性については十分に明らかにされていない。外界と常に接する皮膚にも微生物叢が存在し、皮膚ウイルス叢は相対的存在量が腸内よりも多いことが報告されていることから［1］、人の皮膚におけるウイルス叢は多様な役割を担っていることが予想される。

メルケル細胞ポリオーマウイルス（MCPyV）、ヒトポリオーマウイルス 6（HPyV6）、ヒトポリオーマウイルス 7（HPyV7）などのヒトポリオーマウイルス（HPyV）は、幼少期に感染し、低ウイルス量で皮膚に不顕性感染することで皮膚微生物叢の一部を構成している。MCPyV は皮膚がんの一種であるメルケル細胞がんを惹起する腫瘍ウイルスとして発見されたが［2］、「野生型」は健常者の健常皮膚にも常在し、ウイルス叢を構成している［3］。また、メルケル細胞癌患者では皮膚における MCPyV 感染量が多く、高ウイルス量の保持は皮膚癌発生のリスクファクターとなることが明らかとなっている［4］。HPyV6 と HPyV7 は 2010 年に健常者の皮膚スワブから発見され、皮膚に常在することが報告されている［5，6］。皮膚掻痒性角化異常症との関連が示唆されているが［7］、健常者と皮膚疾患患者での感染状況の差など十分に明らかにされていない。そこで本研究では、皮膚ウイローム を構成するこれらウイルスと炎症性皮膚疾患との関連性について明らかにするため、患者皮膚と健常者での感染実態の調査を行った。

方　法

1.　皮膚スワブの収集および DNA の抽出

PBS で浸した清潔綿棒で対象部位を擦過し、皮膚スワブを採取した。対象とする疾患は代表的な皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎、乾癬および掌蹠膿疱症とした。採取部位は皮膚疾患患者では病変部（皮疹部）と非病変部（正常部）とし、対照として年齢を合致させた健常者から健常皮膚スワブを採取した。皮膚疾患症例 1 例あたり、健常者 3 例を対照として解析を行った。全例において、書面にて同意が得られた者から採取した。採取した皮膚スワブからフェノール・クロロホルム法により DNA を抽出し、皮膚スワブ DNA として解析に用いた。

2. ウイルス検出率およびウイルス量の測定

検出するウイルスは、メルケル細胞ポリオーマウイルス（MCPyV）、ヒトポリオーマウイルス 6（HPyV6）、ヒトポリオーマウイルス 7（HPyV7）とし、それぞれの特異的遺伝子領域にプライマーを設定した。皮膚スワブ DNA を用いて定量リアルタイム PCR 法によりウイルスゲノムの検出を行い、検出率および DNA あたりのウイルスゲノム量を算出した。定量限界である Ct 値（Threshold Cycle）が 40 を超えない量を陽性として検出率を算定した。

3. ウイルス DNA 配列の決定および系統解析

ウイルスゲノムが検出された症例では、PCR ダイレクトシークエンス法によりウイルスゲノム配列の同定を行った。GenBank に登録されている世界各地で同定された MCPyV 株、HPyV6 株、HPyV7 の配列を用いて、MEGA 5.2 ソフトウェアを使用することで系統解析を行った。

4. 黄色ブドウ球菌の感染状態の検討

皮膚スワブ DNA に含まれる黄色ブドウ球菌ゲノムを検出した。黄色ブドウ球菌の特異的遺伝子である *nuc* 遺伝子にプライマーを設定し、上記と同様に定量リアルタイム PCR 法により測定を行った。

結果および考察

1. 皮膚疾患患者におけるヒトポリオーマウイルスの検出率

皮膚疾患患者の病変部（皮疹部）・非病変部（正常部）と健常者の皮膚スワブ DNA におけるウイルス検出率をグラフ化し、図 1 に示した。アトピー性皮膚炎と乾癬における HPyV6 検出率は、健常者の対照群と比べ、病変部と非病変部の両方で有意に高いことが示された。一方で、MCPyV の検出率はアトピー性皮膚炎・乾癬・掌蹠膿疱症で健常者に比べ有意に低い結果となった。HPyV7 の検出率も健常者群と比較して乾癬患者では病変部・非病変部ともに有意に高い結果が得られた。しかしアトピー性皮膚炎では有意差は認められず、掌蹠膿疱症では非病変部と健常者との間でのみ有意差が得られた。

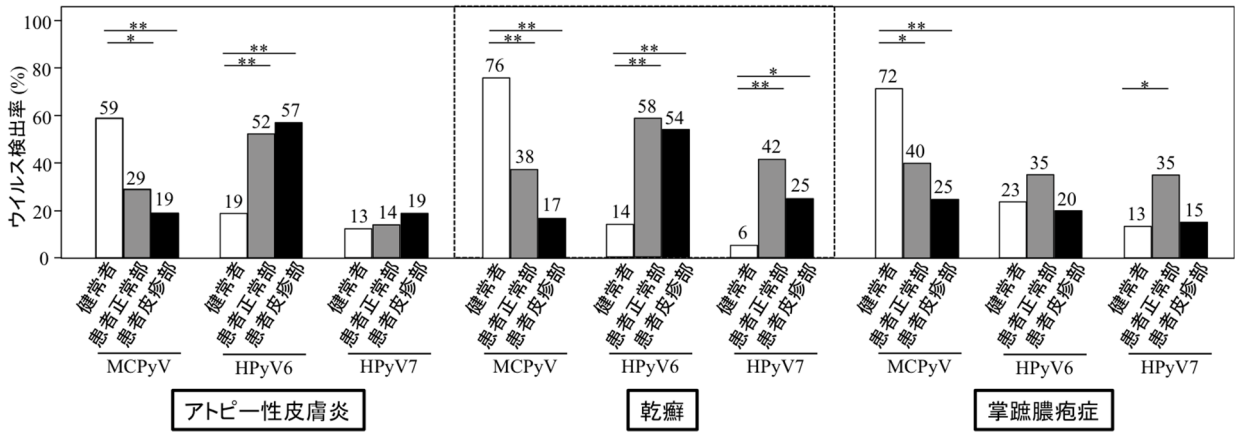


図 1. 健常者と皮膚疾患患者の皮膚スワブにおけるウイルス検出率
各部位から得られた皮膚スワブ DNA に含まれる MCPyV・HPyV6・HPyV7 のゲノム検出率をグラフで示した。統計処理は Fisher exact test を用いて行い、有意差は * $P < 0.05$、** $P < 0.01$ とした。

2. 皮膚疾患患者におけるヒトポリオーマウイルス量の変動

各症例から得られたウイルス量の比較結果を箱ひげ図を用いて図 2 に示した。乾癬患者では、健常者群と比較して、病変部と非病変部の両方で HPyV6 量と HPyV7 量が有意に高く、MCPyV 量が低い結果が得られた。同様の傾向が掌蹠膿疱症でも認められたが、HPyV6 量と HPyV7 量の有意差は、患者非病変部と健常者との間でのみ認められるものであり、患者病変部と比較した場合に有意差は得られなかった。アトピー性皮膚炎では、HPyV7 量についてはいずれの場合も差は認められなかったものの、HPyV6 量は健常者と比べ患者では病変部・非病変部でともに有意に高いことが示され、MCPyV 量は健常者と比べ患者病変部で有意に低いことが明らかとなった。

全体的に、検出率と同様にウイルス量においても、皮膚疾患症例の病変部・非病変皮膚の両方で HPyV6 と HPyV7 の量が高い傾向が認められ、一方で MCPyV 量は皮膚疾患症例の同部位において低い傾向が示された。ウイルス量の変動は、特に HPyV6 ではアトピー性皮膚炎、MCPyV、HPyV6、HPyV7 では乾癬、MCPyV では掌蹠膿疱症の患者において、病変部位だけでなく病変の認められない正常な皮膚部位でも観察された。これらの所見は、皮膚疾患症例では全身レベルで HPyV 感染状況に影響しており、病変部位に限定されないことが示唆された。実際に、検出率とウイルス量において、同じ患者の病変部と非病変部との間で統計的な差は認められなかった。

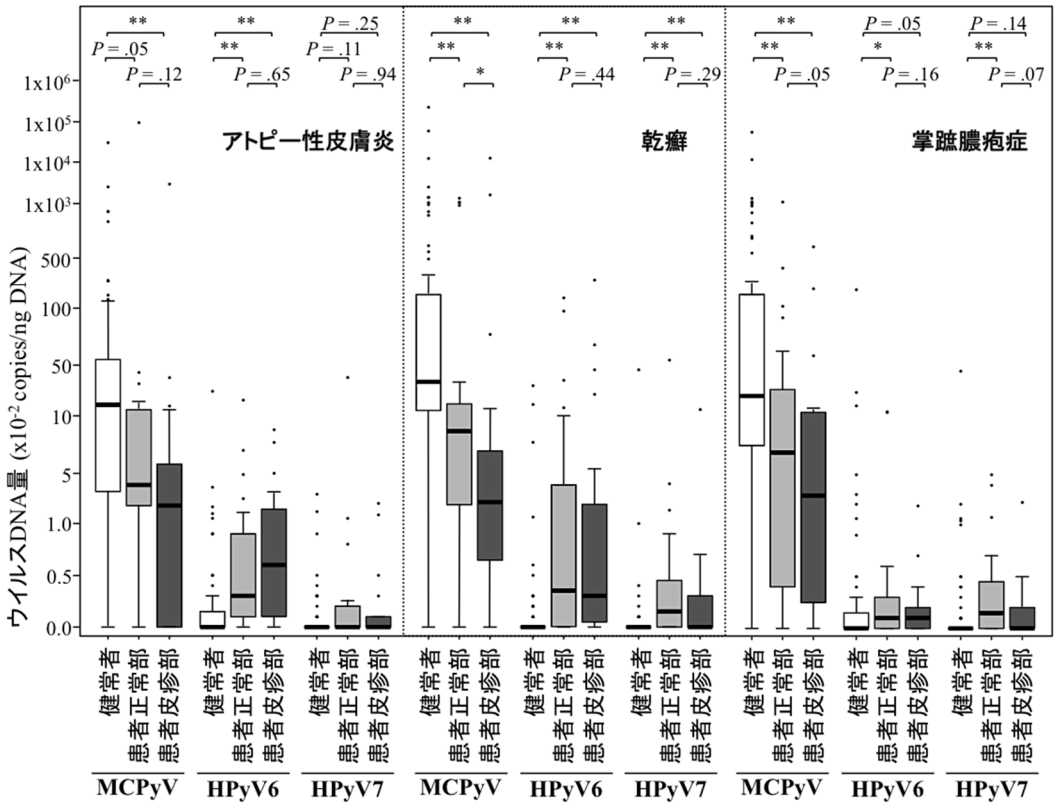


図 2. 健常者と患者の各部位における MCPyV・HPyV6・HPyV7 の量的比較
各部位におけるそれぞれのウイルス量を箱ひげ図で示した。統計処理は、患者の正常部と皮疹部の群間はWilcoxon signed-rank test を用い、健常者と患者における群間ではMann–Whitney nonparametric U testを用いて行った。有意差は $*P<0.05$、$**P<0.01$とした。

3. ウイルス DNA 配列の決定および系統解析

アトピー性皮膚炎 1 例、乾癬 3 例、掌蹠膿疱症 6 例の皮膚スラブ DNA から MCPyV の遺伝子領域 400 bp の配列を決定することができた。得られた配列をアライメントし、系統樹を作成した（図 3）。系統解析の結果、2 つの主要クレードが形成され、本研究で得られた株は全てアジア／日本のクレードに属していた。また、HPyV6 遺伝子領域 983 bp と HPyV7 遺伝子領域 544 bp について配列を決定し、系統樹を作成したところ、同様に 2 つの主要クレードが形成された。本研究で得られた株は全てアジア／日本のクレードに属しており、皮膚疾患における HPyV 株の遺伝的地域差が認められた。アトピー性皮膚炎は罹患率や病態に地域差があることが報告されており［8］、また MCPyV が惹起するメルケル細胞癌も白人系に多く、HPyV6 との関連性が示唆されている慢性炎症性疾患である木村病は東アジアに多い疾患である［9］。これらのことから HPyV 関連疾患には発症率や病態に地域差があることが示唆されていたが、本研究での系統解析結果はこれを強く裏付けるものであった。

4. 皮膚疾患患者における黄色ブドウ球菌の感染量

各種皮膚疾患患者の病変部（皮疹部）・非病変部（正常部）と健常者の皮膚スワブ DNA における黄色ブドウ球菌の感染量を、黄色ブドウ球菌特異的遺伝子である *nuc* 遺伝子のコピー数を用いて概算した（図 4）。黄色ブドウ球菌の感染量はアトピー性皮膚炎患者の病変部では健常者と比べて有意に高いことが示された。本結果はアトピー性皮膚炎においては病変部で黄色ブドウ球菌が増加することは既に報告されており［10］、本結果はそれと合致するものであった。その一方で、乾癬患者では病変部および非病変部で共に健常者と比べて感染量が有意に低い結果となった。掌蹠膿疱症では健常者と患者病変部の間で有意差は認められなかったが、健常者と患者非病変部、患者非病変部と病変部との間では各々有意な差が認められ、健常者に比べ患者皮膚では黄色ブドウ球菌量が低い傾向が明らかとなった。疾患・病態によって異なる黄色ブドウ球菌感染状況が示された。

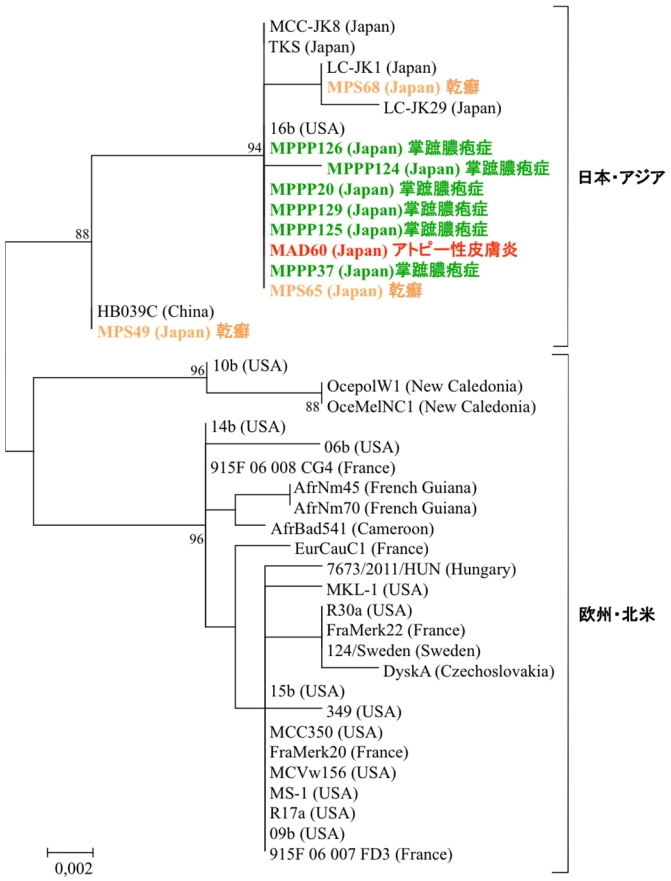


図 3. MCPyV の系統樹

MCPyVゲノムの部分領域400 bpについて最尤法を用いて系統解析を行った。本研究で同定した株は、赤色：アトピー性皮膚炎由来株、黄色：乾癬由来株、緑色：掌蹠膿疱症由来株として示した。

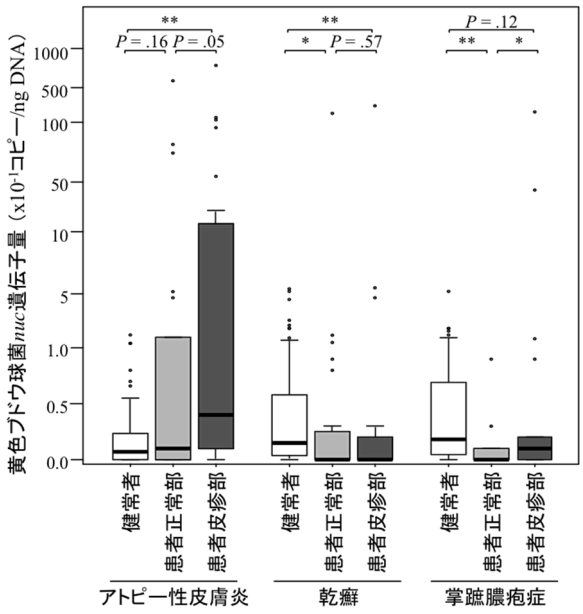


図 4. 健常者と患者における黄色ブドウ球菌 *nuc* 遺伝子領域量の比較

黄色ブドウ球菌のゲノム量（*nuc*遺伝子領域）を箱ひげ図で示した。統計処理は、患者の正常部と皮疹部の間はWilcoxon signed-rank testを用い、健常者と患者の間ではMann–Whitney nonparametric U testを用いて行った。有意差は * $P < 0.05$、** $P < 0.01$とした。

本研究で、一般的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎、乾癬、掌蹠膿疱症において患者の病変部と非病変部での 3 つの HPyV の量的変動を解析し、健常者での結果と比較することでウイルスの共変動を明らかにすることができた。さらに同時に、皮膚疾患症例における HPyV 株の系統的地域差の存在と黄色ブドウ球菌の感染量の変動に関する情報を得ることができた。皮膚疾患の病因・病態に関わるウイルス叢の潜在的役割を示唆する成果が得られたことから、今後その変動が皮膚疾患の病因であるのか結果であるのかを明らかにする必要がある。本研究成果は、皮膚疾患を引き起こす傾向のある遺伝子型やウイルス叢の状況を判別するマーカーへの発展や治療方針決定への貢献が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究は高知大学医学部微生物学講座 大畑雅典教授のご指導のもと、樋口智紀助教、高知大学医学部皮膚科学講座 佐野栄紀教授にご協力いただきました。本研究の遂行にご支援・ご協力をいただいた皆様に心より御礼申し上げます。

文　献

1) Schloss PD. Microbiology: An integrated view of the skin microbiome. Nature. 2014 Oct 2;514(7520):44-5. doi: 10.1038/514044a.
2) Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science. 2008 Feb 22;319(5866):1096-100. doi: 10.1126/science.1152586.
3) Hashida Y, Kamioka M, Tanaka M, Hosokawa S, Murakami M, Nakajima K, Kikuchi H, Fujieda M, Sano S, Daibata M. Ecology of Merkel Cell Polyomavirus in Healthy Skin Among Individuals in an Asian Cohort. J Infect Dis. 2016 Jun 1;213(11):1708-16. doi: 10.1093/infdis/jiw040.
4) Hashida Y, Nakajima K, Nakajima H, Shiga T, Tanaka M, Murakami M, Matsuzaki S, Naganuma S, Kuroda N, Seki Y, Katano H, Sano S, Daibata M. High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. J Clin Virol. 2016 Sep; 82:101-107. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.011.
5) Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe. 2010 Jun 25;7(6):509-15. doi: 10.1016/j.chom.2010.05.006.
6) Hashida Y, Higuchi T, Matsuzaki S, Nakajima K, Sano S, Daibata M. Prevalence and Genetic Variability of Human Polyomaviruses 6 and 7 in Healthy Skin Among Asymptomatic Individuals. J Infect Dis. 2018 Jan 17;217(3):483-493. doi: 10.1093/infdis/jix516.
7) Nguyen KD, Lee EE, Yue Y, Stork J, Pock L, North JP, Vandergriff T, Cockerell C, Hosler GA, Pastrana DV, Buck CB, Wang RC. Human polyomavirus 6 and 7 are associated with pruritic and dyskeratotic dermatoses. J Am Acad Dermatol. 2017 May;76(5):932-940.e3. doi: 10.1016/j.jaad.2016.11.035.
8) Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, Margolis DJ, de Bruin-Weller M, Eckert L. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey.Allergy. 2018 Jun;73(6):1284-1293. doi: 10.1111/all.13401.
9) Rascovan N, Monteil Bouchard S, Grob JJ, Collet-Villette AM, Gaudy-Marqueste C, Penicaud M, Lepidi H, Raoult D, Desnues C. Human Polyomavirus-6 Infecting Lymph Nodes of a Patient With an Angiolymphoid Hyperplasia With Eosinophilia or Kimura Disease. Clin Infect Dis. 2016 Jun 1;62(11):1419-21. doi: 10.1093/cid/ciw135.
10) Kobayashi T, Glatz M, Horiuchi K, Kawasaki H, Akiyama H, Kaplan DH, Kong HH, Amagai M, Nagao K. Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. Immunity. 2015 Apr 21;42(4):756-66. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.014.