

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19733

研究課題名(和文) 宮古島でのカポジ肉腫の高発原因：変異型HHV8と島民ゲノムの感受性変異の探索

研究課題名(英文) High prevalence of Kaposi's sarcoma in Miyako Islands: The full-genome analysis of HHV8 and the exome analysis of patients originated from Miyako islands

研究代表者

眞鳥 繁隆 (Matori, Shigetaka)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80529470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：宮古島では古典型カポジ肉腫の発生が極めて多い事が知られてきた。本課題では、当地でのカポジ肉腫の高発症の原因を、HHV8ウイルスと宮古島出身患者のゲノム遺伝子の解析の両面より探索した。

沖縄本島より11倍ほど高い宮古島におけるHHV8感染率のみでは、宮古諸島出身者のカポジ肉腫の高発症を説明できず、宮古島のHHV8ゲノムの特異性、患者ゲノム変異による疾患感受性の存在が予想された。宮古諸島由来のHHV8ウイルスに共通する変異のうち、9つの遺伝子において、日本本土HHV8ではみられない宮古特有の変異があった。4人の宮古島出身カポジ肉腫患者のエクソーム解析では、共通した病的変異は発見できなかった。

研究成果の概要(英文)：Non-AIDS type Kaposi's sarcoma is extremely rare in Japan, but exclusively highly endemic in Okinawa, especially in Miyako Islands. We aimed to elucidate the exact incidence and also the cause of the high prevalence of Kaposi sarcoma in this isolated area. Non-AIDS Kaposi's sarcoma in Okinawa Prefecture were reviewed, and human herpes virus 8 seroprevalence in Miyako Islands was determined. We examined whole-genome sequences of 3 HHV8 strains and performed whole-exome sequencing of 4 male patients from Miyako Islands. The 3 HHV8 genomes isolated from Miyako islanders formed a phylogenetically branch distinct from those of previously sequenced HHV8 strains and shared specific mutations in 9 proteins. Whole-exome sequencing of the Miyako Islanders did not reveal shared pathogenic mutations. The high infectious rate of a distinct HHV8 may contribute to the high incidence of Kaposi's sarcoma in the region.

研究分野：皮膚感染症、皮膚腫瘍

キーワード：カポジ肉腫 Human herpes virus 8 宮古諸島 沖縄

1. 研究開始当初の背景

カポジ肉腫は、古典型、アフリカ型、エイズ関連型、免疫抑制型の4病型に分けられるまれな脈管系腫瘍である。近年の日本国内ではカポジ肉腫の大部分がエイズ関連型であるが、沖縄県、特に宮古島においては古典型のカポジ肉腫の発生が、他地域と比較して極めて多い。本課題に先立ち我々は、宮古島ではカポジ肉腫を生じるHHV-8ウイルスへの感染率が、沖縄本島や日本国内の10倍ほど高いことを明らかにしたが、この感染率の高さのみでは、特に高齢男性で急増することが説明できない。

1994年にカポジ肉腫からヒトヘルペスウイルス8型(human herpesvirus 8; HHV-8)が単離され、このHHV-8ウイルスの慢性持続感染がカポジ肉腫の病因であることが明らかになった。世界的には、南ヨーロッパやウガンダなど、HHV-8の抗体保有率がカポジ肉腫の発生率の高さと相関する地域と、ガーナやエジプトのように高い感染率であっても、カポジ肉腫の発症が少ない地域が報告されている。特にウイグル族、漢族など複数の民族が暮らす中国新疆区の調査では、HHV-8感染率がいずれの民族においても高いにも関わらず、古典型カポジ肉腫を発症するのはウイグル族だけであることが示されている。

本課題では、当地でのカポジ肉腫の高発症の原因を、HHV-8ウイルスの変異、宮古島の共通するゲノム変異による感受性亢進の、ウイルスとヒトの両面より探索し、HHV-8ウイルスの伝搬と発癌機序を解明することである。

2. 研究の目的

これまでの宮古島でのHHV-8感染率調査をより追求し、年齢別の感染率、IgG、IgM抗体価の推移を決定することで、宮古島におけるHHV-8ウイルスの伝搬経路や感染様式を推定する。さらに宮古島のカポジ肉腫の発症率の高さは、HHV-8ウイルスへの感染率の高さに

加え、HHV-8ウイルスゲノム自体の異型、HHV-8に対する宿主の免疫応答の違いや、HHV-8ウイルス以外の複合感染などの可能性も考え、それらを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

伝搬経路の推定：

スクリーニング手法として、ELISA抗原の選択、陽性基準の確立、再確認のためのHHV-8感染細胞を用いた蛍光抗体検出法は既に完了し、宮古島島民の血清中の抗HHV-8ウイルス膜抗原に対するIgG抗体の一次的な疫学調査は終了した。公衆衛生学的なHHV-8ウイルスの宮古島での感染・伝搬経路を探るために、年齢別の感染率、IgG抗体陽性患者の保存血清を利用してIgM抗体力価の測定を解析する。

高発症率の原因説明：

宮古島出身者に生じた数例のカポジ肉腫の腫瘍組織より、ウイルスのゲノムを含めたDNAを抽出し、患者毎のウイルスゲノムを次世代シーケンサーにより共通した変異部位を探索する。

宮古島のHHV-8ウイルスに見つかる複数箇所の変異部位の共通性や病原性を、これまでに学内で蓄積されたカポジ肉腫の病理組織検体パラフィンブロックより、短鎖DNAを増幅することで、網羅的に確認する。サイトメガロウイルス、EBウイルスなど他の発がん性ヒトヘルペスウイルスでの変異蛋白の共通性や、他の動物種に発癌性を持つ多様なヘルペスウイルスとの保存性などから、その病原性変異の可能性を探る。

4. 研究成果

1984年から2014年までの31年間に、琉球大学病院および沖縄県内の病院において、39例の古典型カポジ肉腫、22例の医原性カポジ肉腫、13例のAIDS関連カポジ肉腫の患者が

存在した。

カポジ肉腫患者数の推移は、1984-1999年までの16年間と、2000-2014年までの15年間で比較すると、古典型カポジ肉腫は8.8倍、医原性カポジ肉腫は2.7倍、エイズ型は3.3倍に増加していた。

一方、1984年から2014年までに沖縄を除く日本から報告された non-AIDS KS 症例は79例であり、男性54例、女性25例であった (Table 1)。臨床型は古典型 KS 58例(73%)、医原性 KS 21例(27%)で、平均年齢は各々68.6歳と67.6歳、男女比は古典型で2.9:1、医原性で1.1:1であった。

日本各地の non-AIDS KS 発症率

1984年から2014年までの31年間における宮古諸島、宮古諸島を除く沖縄県、沖縄県を除く日本の全年齢における non-AIDS KS 年齢調整発症率と50歳以上における粗発症率を計算した (Table 2)。全期間の全年齢における発症率は、宮古諸島で0.87 ($/10^5 \cdot \text{年}$)、男性1.9、女性0.22、宮古諸島を除く沖縄県では0.056 ($/10^5 \cdot \text{年}$)、男性0.085、女性0.031、沖縄県を除く日本での発症率は0.0015、男性0.0022、女性0.00090であった。

50歳以上における発症率は宮古諸島で4.6 ($/10^5 \cdot \text{年}$)、男性8.3、女性1.4、宮古諸島を除く沖縄県では0.27 ($/10^5 \cdot \text{年}$)、男性0.33、女性0.21、沖縄県を除く日本での発症率は0.0054、男性0.0082、女性0.0031であった。

1984-1999年、2000-2014年の二期間にわけて全年齢における発症率の推移をみると、宮古諸島では男女合わせた発症率が7倍、宮古諸島を除く沖縄県では約2倍と2000年以降の発症率が高くなる傾向が見られた。日本本土の発症率には変化がなかった。二期間での発症率の推移は50歳以上に限って算出しても、同じ傾向が得られた。

宮古島における HHV8 抗体保有率調査：

調査した1132人中、174人(15.4%)がELISAとIFAにてHHV8抗体陽性と確認された (Table 3)。HHV8抗体保有率は男性586人中97人(16.6%)、女性546人中77人(14.1%)であり、男女差はなかった ($p=0.2534$)。

抗体保有率は年齢とともに上昇する傾向があり、陽性率は50歳未満のグループでは4.2%、50~70歳未満では13.9%、70歳以上では21.6%であった。今回の調査集団には若年者が少なく10歳未満のデータがないが、調査した中で抗体陽性を確認した最小年齢は18歳であった。

HHV8 キャリアーにおける non-AIDS KS 発症率

宮古諸島、沖縄県および日本における HHV8 感染率と non-AIDS KS 患者数から、HHV8 キャリアーにおける non-AIDS KS 発症率を算出した (Table 2)。宮古諸島では毎年50歳以上の HHV8 キャリアーのうち、男性は0.045%、女性は0.0080%の健常者が non-AIDS KS を発症し、男性の方が5.6倍発症しやすい。宮古諸島を除く沖縄県では男性0.032%、女性0.0089%と計算され、男性は女性に比べ3.6倍発症しやすかった。沖縄を除く日本においては男性0.00034%、女性0.00013%であり、男性は女性に比べ2.6倍発症しやすかった。

宮古諸島、宮古諸島を除く沖縄県の人々は、沖縄県を除く日本と比べ、キャリアーからの発症率が著明に高く、男性では日本(沖縄県を除く)の男性と比べ、約100倍発症しやすく、女性においても約60倍発症しやすかった。一方、男性は宮古諸島のキャリアーの方が、宮古諸島を除く沖縄県のキャリアーより1.4倍 non-AIDS KS を発症しやすい結果であったが、女性はほぼ同じであった。

HHV8 ウイルスゲノムの解析：

今回解析した4種のHHV8ゲノム間でのゲノムの差異を比較した結果、宮古諸島由来の3つのウイルスは、相同性が非常に高かった

(99.9%)。宮古諸島由来ウイルスに共通していた変異の多くは日本本土由来ウイルスでも共通してみられたが、約5%の変異は日本本土 HHV8 ではみられない宮古特有の変異であった。今回提出した3つの宮古由来の HHV8 に共通して見られる non-synonymous 変異の中で、日本本土由来 HHV8 では見られない変異を全て拾い出したところ、9つの蛋白に集約していた。

K1 蛋白、ORF70、ORF24、ORF30、K11、ORF72、ORF73(LANA)では、今回解析した日本の4つの HHV8 と、中央の繰り返し配列中の、グルタミン rich 領域、7残基毎にロイシンを含むグルタミン酸 rich 領域に、欠失が多く存在した。

宮古島出身のカポジ肉腫患者のゲノム解析：

宮古島出身の4名のカポジ肉腫患者で whole exome sequence を施行した。

1)既知の家族性あるいは小児期発症カポジ肉腫の原因遺伝子について：

これまでに家族性カポジ肉腫あるいは小児期発症のカポジ肉腫の原因遺伝子として *TNFRSF4*, *STIM1*, *STAT4*, *IFN R1*, *CD40L*, *WAS*¹⁻⁶ が報告されている。しかしこれら6つの遺伝子には、宮古出身患者4人に共通して見られる non-synonymous 変異はなかった。

2) その他のゲノム変異：

4人の宮古出身男性患者に共通した non-synonymous 変異で、日本および世界のデータベースで頻度1%以下であるものは、X、Y染色体、常染色体ともなかった。

考察

沖縄県宮古諸島における、non-AIDS KS の高い発症率が明らかになり、それは世界的な流行地として知られる地中海諸島に匹敵する値であった。宮古諸島における HHV8 感染率は日本本土の約11倍と高かったが、沖縄県および宮古諸島における高発症率は感染

率のみでは説明できず、沖縄及び宮古諸島に分布する HHV8 ゲノムの特異性、あるいは患者ゲノム変異による疾患感受性の増加が予想された。

沖縄及び宮古諸島に由来する HHV8 は独自の変異を有しており、いずれかの変異がカポジ肉腫の高発症に関与していると考えた。

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4件)

深井恭子, 山口 さやか, 大嶺卓也, 山城充士, 眞鳥繁隆, 高橋健造. 下腿潰瘍に合併したパラベンによる接触皮膚炎の1例. 臨床皮膚科、査読有、2017年、5巻 393-396.

<http://id.ndl.go.jp/bib/000000024292>
Hayashi K, Matori S, Kariya Y, Sonosaki T, Yamaguchi S, Hagiwara K, Uezato H, Takahashi K. Dermoscopic observation of acquired digital fibrokeratoma developed on the dorsum of the fourth left toe. J Dermatol, 査読有, 2016年, 43巻 107-108.

DOI:10.1111/1346-8138.13152

苅谷嘉之, 崎枝 薫, 眞鳥繁隆, 佐久川裕行, 仲村郁心, 高橋健造, 上里 博, 宮城恒雄. 高齢者の顔面に発症した毛母腫の1例. 西日本皮膚科、査読有、2016年、79巻 246-250.

DOI:10.2336/nishinonhifu.79.246

苅谷嘉之、山城充士、山口さやか、粟澤剛、眞鳥繁隆、高橋健造、上里 博. 下顎部に生じた Nanta 骨性母斑の1例 本邦報告例の集計. 西日本皮膚科、査読有、2016年、78巻 494-499.

DOI:10.2336/nishinonhifu.

〔学会発表〕(計9件)

深井恭子、小松恒太郎、松尾雄司、林 健太郎、宮城拓也、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、山口さやか、高橋健造、照屋 操。ハンセン病の慢性潰瘍に生じた有棘細胞癌(SCC)の2例。第81回 日本皮膚科学会沖縄地方会。沖縄県南風原町 2017年10月22日。

松尾雄司、伊藤 誠、米須 栞、赤尾 圭、小松恒太郎、兼島明子、岡本有香、安村涼、苅谷嘉之、林 健太郎、眞鳥繁隆、新嘉喜 長、高橋健造。当科における洗浄液周期的自動注入機能付き陰圧創傷治療システム:VAC-Ultra®の使用経験。第81回日本皮膚科学会沖縄地方会 沖縄県南風原町 2017年10月22日。

伊藤 誠、松尾雄司、林 健太郎、眞鳥繁隆、新嘉喜 長、高橋健造。琉球大学でのメラノーマ患者のBRAF 変異と BRAF 阻害薬の使用経験。第80回 日本皮膚科学会沖縄地方会。沖縄県西原町 2017年7月20日。

宮城拓也、伊藤 誠、小松恒太郎、岩元凜々子、大嶺卓也、松尾雄司、岡本有香、大平 葵、安村 涼、林 健太郎、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、新嘉喜 長、山口さやか、山本雄一、高橋健造。琉球大学附属病院皮膚科の2016年度の紹介患者の報告第80回日本皮膚科学会沖縄地方会。沖縄県西原町 2017年7月20日。

松尾雄司、安村 涼、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、山本雄一、高橋健造。脂漏性角化症の外観を呈した悪性黒色腫の1例。第33回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会。秋田市 2017年6月30日。

平橋 文、佐久川裕行、山城充士、林健太郎、新嘉喜長、眞鳥繁隆、苅谷嘉之、山本雄一、高橋健造。単純黒子との鑑別を要した悪性黒色腫の1例。第78回日本皮膚科学会沖縄地方会 沖縄県南風原町

2016年8月28日。

佐久川裕行、新嘉喜長、山城充士、崎枝薫、苅谷嘉之、栗澤剛、眞鳥繁隆、山本雄一、高橋健造、上里博。妊婦に生じた悪性黒色腫の1例。第115回日本皮膚科学会総会。京都市 2016年6月3日-5日。山城充士、栗澤剛、眞鳥繁隆、新嘉喜長、大嶺卓也、山本雄一、高橋健造、上里博。左手背部の壊死性筋膜炎に対し腋窩ブロック下でデブリードマンを行った症例。第115回日本皮膚科学会総会 京都市 2016年6月3日-5日 栗澤剛、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、新嘉喜長、栗澤遼子、高橋健造、上里博。後頭部に生じた皮下型隆起性皮膚線維肉腫の1例。第32回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会。鹿児島市。2016年5月27日-28日。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞鳥繁隆 (MATORI, Shigetaka)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80529470

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()