

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860961

研究課題名(和文) 宮古島に多発するカポジ肉腫とHHV8潜在感染率の疫学的調査と輸血の安全性について

研究課題名(英文) Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Miyako Islands; the endemic area of Kaposi's sarcoma

研究代表者

林 健太郎 (HAYASHI, Kentaro)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50631991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題で、我々はカポジ肉腫が多発する沖縄県宮古島地方において、カポジ肉腫の病因ウイルスであるヒトヘルペスウイルス8型(HHV8)の感染率が高いことを明らかにした。宮古島におけるHHV8感染率は15.37%と、沖縄本島や日本の一般集団での感染率に比べ約11倍高かった。感染率は年齢を増すごとに高くなる傾向があり、男女差はほとんど見られなかった。一方、カポジ肉腫の発症率は、宮古島が沖縄諸島に比べ約35倍高く、宮古島におけるカポジ肉腫の好発にはHHV8の高い既感染率の他にウイルスの変異や民族学的な違いなど他の要因が関与している可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found the high seropositivity of human herpesvirus 8 (HHV8) in the population of Miyako Islands, where people have a greater chance of developing non-AIDS associated Kaposi's sarcoma. The seroprevalence of HHV8 was 15.37% in Miyako Island, that is approximately 11 times higher than those of Okinawa Islands and Japan. The prevalence rate increased with age, and there was little difference between men and women (16.55% and 14.10%). Meanwhile, estimated incidence of non-AIDS associated Kaposi's sarcoma was about 35 times higher in Miyako Islands than that in Okinawa Islands. These data support the hypothesis that the additional factors, such as the variants of HHV8 virus or the presence of host genetic factors, other than HHV8 infection rate, may be involved in Kaposi's sarcoma development.

研究分野：皮膚外科、皮膚腫瘍学、皮膚ウイルス感染症

キーワード：カポジ肉腫 HHV8 ヒトヘルペスウイルス8型 沖縄 宮古 ウイルス発癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 沖縄県におけるカポジ肉腫の現状

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病型に分けられる稀な脈管系腫瘍である。日本を含めた最近の先進国ではエイズ関連型カポジ肉腫の発症が大部分であるが、沖縄県、特に宮古島においては古典型のカポジ肉腫の発症が、他地域と比較して極めて多い。古典型カポジ肉腫は、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）の感染を伴わない比較的、生命予後は良い血管肉腫である。

興味深い点は、沖縄県内では過去31年間に57例の非AIDS関連カポジ肉腫症例を経験したが、そのうち29例（51%）が宮古島出身者であった（図1）。沖縄県の全人口が約130万人、宮古島の現在の島人口が約5.3万人であることより、その対人口比でのカポジ肉腫の発生率は沖縄県の中でも、圧倒的に宮古島出身者に多いと言える。

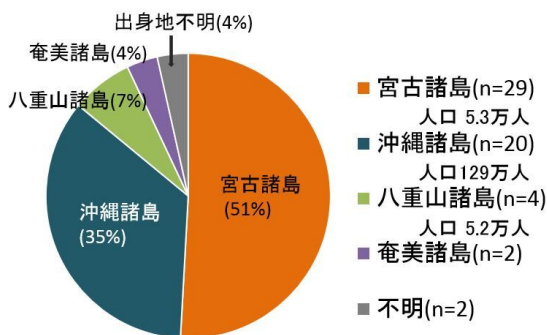


図1: 非AIDS関連カポジ肉腫患者出身地 (n=57)

一方同じ期間に琉球大学附属病院で経験したAIDS関連型カポジ肉腫は10例にすぎなかったことから、沖縄においては圧倒的に非AIDS関連カポジ肉腫が多いといえる。また、沖縄県内の非AIDS関連カポジ肉腫患者は年々増加している（図2）。

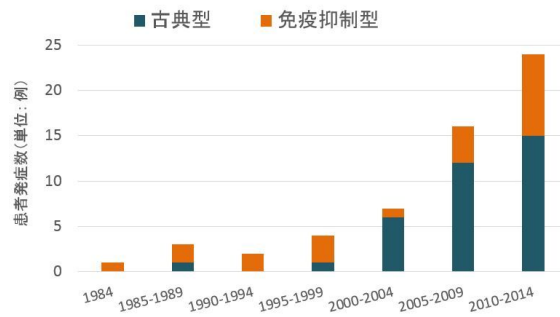


図2: 年代別非AIDS関連カポジ肉腫患者発症数

非AIDS関連カポジ肉腫は、主に下肢に自覚症状の乏しい紫斑や結節を生じ、病変は緩徐に進行し、内臓病変を伴う可能性は低いことから予後良好な疾患とされる。しかし、症例によっては、病変が多発し疼痛、浮腫により歩行が難しくなるなどQOLを著しく低下させる。このような症例には抗癌剤の全身投与が選択されることがあるが、患者は主に高齢者であり、治療を繰り返す必要がある点も問題となる。このように予後良好とされる非AIDS型カポジ肉腫も治療方針に悩む症例は多い。

(2) HHV8 について

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が直接的なカポジ肉腫の病因であると考えられるようになった。カポジ肉腫はAIDS関連型にせよ、非AIDS関連型にせよ、このヒトヘルペスウイルス8型(HHV8)の感染が関与する。

国内、および沖縄県内ではこれまでにそれぞれ3つのHHV8感染率調査結果が報告されているが、HHV8抗体の測定方法にはスタンダードな方法が確立しておらず、測定方法により感度特異度が異なるため、これらの調査で出た結果を単純に比較することはできない。2000年に行われた調査ではHHV8複合抗原を認識するELISA法を利用し、日本人の一般集団でのHHV8感染率は1.4%であった(Katano H. et al, J. Virol. 2000; 74: 3478-3485.)。同じ方法を用いて、2001年に沖縄県的那覇市内と南大東島におけるHHV8感染率調査が行われたが、その結果是那覇で1.43%、南大東島で3.22%であった(Satoh M. et al, Jpn. J. Infect. Dis. 2001; 54: 125-126.)。那覇に

においては日本の一般集団と変わらない値であり、南大東島における感染率はそれに比べるとやや高値であったが、我々の調べでは南大東島出身のカポジ肉腫患者はこれまでに経験していないことから、沖縄特に宮古島におけるカポジ肉腫の好発を説明する結果は出ていない。

2. 研究の目的

本課題では沖縄県・宮古島地方にカポジ肉腫が多発する原因を解明することを目的とする。そのため、まずは沖縄県の中でもカポジ肉腫の発症が多い、宮古島における HHV8 感染率を同定する必要がある。また沖縄本島と宮古島地方のそれぞれにおいて、島民人口とこれまでのカポジ肉腫症例数より、島ごとのカポジ肉腫発症率を算出する。得られたウイルス感染率の違いでカポジ肉腫の発症率の違いを説明できるかを検討する。

もし発症率の違いを説明できるほどのウイルス感染率の差がなければ、宮古島における高発症率には、例えば民族の違いやウイルス自体の変異など複数の発症要因の関与も考えられる。また、HHV8 ウイルス感染率が高かった場合、現在献血スクリーニングに含まれていない HHV8 が輸血によって感染する可能性があるか、公衆衛生的に非常に重要な問題になると考える。さらには現地における正確な感染経路の把握と予防対策の必要性も考慮されなければいけない。

3. 研究の方法

(1) HHV8 抗体検出方法の選択：

HHV8 ウイルスは、カポジ肉腫患者においても血中からウイルスが検出される割合は低く、ウイルス保有者のスクリーニングには HHV8 抗体を確認するのが一般的である。

しかし先述の通り、HHV8 抗体の測定方法にはスタンダードな方法が確立されておらず、各方法により感度特異度が異なるため、抗体検出方法の選択は重要である。

我々は日本人の一般集団および沖縄県那覇市内での調査に使用された国立感染症研究

所の片野晴隆博士らの開発した HHV8 mix antigen ELISA を利用することにより、国内および沖縄県本島での感染率と直接比較できると考えた。

(2) HHV8 mix antigen ELISA：

HHV8 ウイルス蛋白うち、K8.1、ORF59、ORF65、ORF73 によりコードされる蛋白がカポジ肉腫患者の血清とよく反応したことから（ウエスタンブロット法）、これらを GST 融合タンパクとして大腸菌内で発現させ、精製したものを抗原として ELISA プレートにコートしている。サンプル血清をこの ELISA プレートと反応させ、ヤギ抗ヒトイムノグロブリン（IgG、IgA、IgM、IgL 鎖）を二次抗体として使用し、化学発色で ELISA 抗原に反応する抗体を検出する。（Katano H. et al, J. Virol. 2000; 74: 3478-3485.）

この HHV8 抗体検出方法では開発時 26 例のカポジ肉腫症例のうち全例で陽性が確認されており、日本人の一般集団 1004 人中 14 人が陽性（1.4%）であったとされる。

(3) 間接蛍光抗体法：

HHV8 mix antigen ELISA で 2 回陽性と判定された検体に関しては、HHV8 感染細胞株 TY-1 細胞を用いた間接蛍光抗体法（IFA）にて確認を行い、ELISA で陽性かつ IFA にて陽性が確認された検体を HHV8 抗体陽性であると判定する。

具体的には TPA 刺激した TY-1 細胞をスライドグラスに固定し、希釈したサンプル血清と反応させ、蛍光標識したヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて、LANA 抗原を含めた核内および細胞質の発色が見られたときに陽性と判断する（Katano H. et al, J. Virol. 2000; 74: 3478-3485.）

(4) サンプル血清：

琉球大学倫理審査委員会の承認を得て、沖縄県立宮古病院における検査後の余剰血清を男性 586 人、女性 546 人の計 1132 人分採取した。

(5) HHV8 ウイルスゲノム解析

宮古島出身の非 AIDS 関連カポジ肉腫症例の皮膚病変の凍結組織より DNA を抽出する。HHV8 ウイルスゲノムの全長約 137kb をカバーするように複数にわけてプライマーを作成し、PCR でウイルスゲノムを増幅する。得られた 1.5-12kb の PCR 産物を精製した後、次世代シーケンサーを用いて HHV8 全ウイルスゲノムを解析する。これまでに報告されている HHV8 塩基配列と比較することで、宮古島のカポジ肉腫患者由来 HHV8 に特有の変異を見つける。

(6) 非 AIDS 型カポジ肉腫症例ゲノム解析

宮古島出身の非 AIDS 関連カポジ肉腫症例の皮膚病変の凍結組織よりゲノム DNA を抽出し、これまでに遺伝性カポジ肉腫の病因として報告された、免疫に関与する 4 つの遺伝子 (STIM1, OX40, IFNGR1, STAT4) 領域を PCR 増幅させる。それらの塩基配列を次世代シーケンサーを用いて同定し、宮古島出身患者に共通した、有意な変異の有無を確認する。

4 . 研究成果

(1) 宮古島における HHV8 感染率調査結果

HHV8 mix antigen ELISA および IFA 法を用いて HHV8 抗体を検出したところ、宮古島島民血清 1132 検体中 174 検体が陽性で、HHV8 感染率は 15.37%であった。

感染率には男女差はなく (男性 16.55%, 女性 14.10%)、感染率は年齢が上がるごとに高くなる傾向があった。

この結果から、宮古島における HHV8 感染率は、日本の一般集団での感染率 1.4%、沖縄本島的那覇市での感染率 1.43%に比べ、約 11 倍と非常に高いことが判明した。

(2) 感染率の違いで発症率の差を説明できるか

これまでの当科の患者統計から、宮古島における非 AIDS 関連カポジ肉腫発症率は 1.76 (/10 万人/年)、沖縄諸島においては 0.05 (/10 万人/年)と算出された。これによると宮古島においては、沖縄諸島に比べ約 35 倍発症率が高いことがわかる。

これより、HHV8 の高い既感染率以上に宮古島ではカポジ肉腫が発症しやすいことが示唆された。

(3) 今後の研究課題

ウイルス感染率以外に宮古島における非 AIDS 関連カポジ肉腫の高発症率に關与する複合要因を、ウイルス側、宿主側それぞれから考えることにした。

ウイルス側の要因

ウイルス側の原因としては、宮古島地方に蔓延している HHV8 ウイルスがカポジ肉腫を発症しやすい変異を持っている可能性を想定し、現在宮古島のカポジ肉腫患者由来の HHV8 全ウイルスゲノムの解析を進めている。

宿主側の要因

次に宿主側の要素がカポジ肉腫好発に関与するかについてであるが、世界的にも同様の考察がなされている地域がある。中国のウイグル自治区は、その地域に暮らすウイグル民族と漢民族で、ほぼ同様の HHV8 感染率であったにも関わらず、カポジ肉腫を発症するのはウイグル民族に限られる (He F. et al. J. Med. Virol. 2007; 79: 161-166)。

一方、琉球列島の遺伝的分化については、沖縄諸島と宮古島の人々は祖先を共有する近縁なグループではあるものの、より詳しくみると遺伝的分化が異なるという研究結果が昨年発表された (Sato T. et al. Mol. Bio. Evol. 2014; 31: 2014)。この研究結果は宮古島と沖縄諸島においても、民族学的な違いでカポジ肉腫の発症率が異なるのではという仮説の根拠にもなる。

そこで我々は遺伝性カポジ肉腫の原因として報告されている遺伝子のうち、STIM1、OX40、IFNGR1、STAT4 を中心に、宮古島でのカポジ肉腫患者に共通の変異がないか解析をしたいと考えている。

(4) 公衆衛生学的課題

今回の研究で、沖縄県宮古島地方において HHV8 感染率が非常に高いことが初めてわかった。日本では現在、献血の際のスクリーニング検査にも HHV8 感染の確認は含まれない。本ウイルスが輸血を介して感染する可能性

があるのかについて検討が必要だと考える。
また当地での正確な感染経路の把握が望まれ、予防対策の必要性についても検討すべき課題と考える。

<引用文献>

Katano H. et al. Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 2000; 74: 3478-3485.

Sato M. et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2001; 54: 125-126.

He F. et al. Human herpesvirus 8: Seroprevalence and correlates in tumor patients from Xinjiang, China. *J. Med. Virol.* 2007; 79: 161-166.

Sato T. et al. Genome-wide SNP analysis reveals population structure and demographic history of the Ryukyu islanders in the southern part of the Japanese archipelago. *Mol. Bio. Evol.* 2014; 31: 2929-2940.

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5件)

1. 眞鳥 繁隆, 宮城 拓也, 花城 ふく子, 園崎 哲, 林 健太郎, 栗澤 剛, 苅谷 嘉之, 高橋 健造, 上里 博: Simple Needle Manometer 法で早期診断したハブ咬症によるコンパートメント症候群の1例. *西日本皮膚科* 査読有 76巻 2014, 454-458.
<http://doi.org/10.2336/nishinohonhi.fu.76.454>

2. 大久保 優子, 内海 大介, 苅谷 嘉之, 林 健太郎, 栗澤剛, 眞鳥 繁隆, 高橋 健造, 上里 博: 筋緊張性ジストロフィーに合併し, 有棘細胞癌が疑われた毛母腫の1例. *西日本皮膚科* 査読有 76巻 2014, 353-356.
<http://doi.org/10.2336/nishinohonhi.fu.76.353>

3. 林健太郎, 仲村郁心, 眞鳥繁隆, 高橋健造, 上里 博: 隆起する皮膚疾患(臨床例)隆起性皮膚線維肉腫. *皮膚病診療* 査読有 36巻 2014, 547-550.

4. 白瀬春奈, 山口 さやか, 平良 清人, 林 健太郎, 苅谷 嘉之, 山本 雄一, 高橋 健造, 上里 博: Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm 芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍の2例. *西日本皮膚科* 査読有 76巻 2014, 577 -582.

5. 眞鳥 繁隆, 栗澤 遼子, 林 健太郎, 栗澤 剛, 平良 清人, 高橋 健造, 上里 博: 仙骨部の褥瘡, 褥瘡瘢痕に生じた有棘細胞癌の3例. *臨床皮膚科* 査読有 68巻 2014, 815-819.

[学会発表](計13件)

1. 松尾 雄司, 大嶺 卓也, 林 健太郎, 栗澤 剛, 眞鳥 繁隆, 新嘉喜 長, 高橋 健造, 上里 博: 左第4趾に生じた後天性被角線維腫の1例. *日本皮膚科学会第73回沖縄地方会* 2015年2月8日 沖縄県医師会館、(沖縄県南風原町)

2. 深井 恭子, 林 健太郎, 苅谷 嘉之, 高橋 健造, 上里 博: 糖尿病性浮腫性硬化症の1例. *日本皮膚科学会第73回沖縄地方会* 2015年2月8日 沖縄県医師会館、(沖縄県南風原町)

3. 川畑 有香, 新嘉喜 長, 林 健太郎, 安村 涼, 新垣 均, 内原 潤之介: ランダム皮膚生検にて診断した血管内大細胞型B細胞リンパ腫の1例. *日本皮膚科学会第73回沖縄地方会* 2015年2月8日 沖縄県医師会館、(沖縄県南風原町)

4. 大嶺 卓也, 佐久川 裕行, 松尾 雄司, 與那嶺 周平, 山城 充士, 大平 葵, 崎枝 薫, 園崎 哲, 苅谷 嘉之, 林 健太郎, 栗澤 剛, 眞鳥 繁隆, 高橋 健造, 上里 博: 琉球大学における2014年の手術症例. *日本皮膚科学会第73回沖縄地方会* 2015年2月8日 沖縄県医師会館、(沖縄県南風原町)

5. 佐久川 裕行, 栗澤 剛, 山城 充士, 林 健太郎, 苅谷 嘉之, 崎枝 薫, 眞鳥 繁隆, 新嘉喜 長, 高橋 健造, 上里 博: 伝達麻

醉下での Mohs 氏軟膏の使用経験 2 例. 日本皮膚科学会第 72 回沖縄地方会、2014 年 9 月 28 日、沖縄県医師会館、(沖縄県南風原町)

6. 松尾 雄司、栗澤 剛、林 健太郎、眞鳥 繁隆、新嘉喜 長、苅谷 嘉之、崎枝 薫、大平 葵、山城 充士、高橋 健造、上里 博: 当科における局所陰圧閉鎖システム: SNaP® の使用経験. 日本皮膚科学会第 72 回沖縄地方会、2014 年 9 月 28 日、沖縄県医師会館、(沖縄県南風原町)

7. 大嶺卓也、栗澤 剛、林健太郎、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、高橋健造、上里 博: 植皮術時の水圧式ナイフ(バーサジェット®)の使用経験. 日本皮膚科学会第 71 回沖縄地方会、2014 年 6 月 29 日、くまもと森都心プラザ、(熊本県熊本市)

8. 大平 葵、仲村郁心、川畑有香、玉城祐一郎、苅谷嘉之、林 健太郎、栗澤 剛、眞鳥繁隆、高橋健造、上里 博: 隆起性皮膚線維肉腫の 1 例. 日本皮膚科学会第 69 回沖縄地方会、2014 年 2 月 9 日、ANA クラウンプラザホテル沖縄ハーバービュー、(沖縄県那覇市)

9. 眞鳥繁隆、山城充士、與那嶺周平、玉城祐一郎、崎枝 薫、苅谷嘉之、大平 葵、林健太郎、栗澤 剛、高橋健造、上里 博: 琉球大学における 2013 年の手術症例. 日本皮膚科学会第 69 回沖縄地方会、2014 年 2 月 9 日、ANA クラウンプラザホテル沖縄ハーバービュー、(沖縄県那覇市)

10. 眞鳥繁隆、山城充士、川畑有香、玉城祐一郎、崎枝 薫、仲村郁心、林 健太郎、栗澤 剛、高橋健造、上里 博: 当院での悪性黒色腫のセンチネルリンパ節生検について. 日本皮膚科学会第 68 回沖縄地方会、2013 年 11 月 17 日、ホテル日航那覇グランドキャッスル(沖縄県那覇市)

11. 崎枝 薫、栗澤 剛、林 健太郎、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、川畑有香、玉城祐一郎、上里 博: 先天性異所爪の 1 例. 日本皮膚科学会第 67 回沖縄地方会、2013 年 7 月 14 日、ホテルロイヤルオリオン、(沖縄県那覇市)

12. 玉城祐一郎、宮城拓也、栗澤 剛、川畑有香、林健太郎、崎枝 薫、苅谷嘉之、高橋健造、上里 博: カルバマゼピンによる薬剤

性過敏症症候群が疑われた 1 例. 日本皮膚科学会第 66 回沖縄地方会 2013 年 5 月 30 日 琉球大学医学部臨床講義棟、(沖縄県西原町)

13. 川畑有香、栗澤 剛、眞鳥繁隆、林健太郎、苅谷嘉之、崎枝 薫、玉城祐一郎、高橋健造、上里 博: 当科における新型 V.A.C.® 治療システムの使用経験. 日本皮膚科学会第 66 回沖縄地方会 2013 年 5 月 30 日 琉球大学医学部臨床講義棟、(沖縄県西原町)

〔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:

出願年月日:

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

林 健太郎 (HAYASHI, Kentaro)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50631991

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし