

カンボジア住民における HBV genotype C1 の
高肝発がんリスクについての遺伝子的検討
—GenBank HBV C1 340 株 full genome との比較—

松尾 順子、高橋 和明、Chuon Channarena、片山 恵子、田中 純子
広島大学 大学院医系科学研究科 疫学・疾病制御学

研究概要

東南アジアではまだ HBV キャリア率が高く、HBV 感染が肝がんの大きな原因となっている。

我々は 2010-2014 年の期間にカンボジア王国における一般住民の肝炎調査を行い、HBsAg 陽性率が 5.6%と高く、主な genotype は Cであることを示した。genotype C は genotype B に比べ肝がんのリスクが高く、genome 側として HBV 遺伝子変異、とくに core promoter 変異が肝がん関連リスクと報告されており、またカンボジアでは genotype C が優位であることが報告されている。

カンボジアでの HBV に関する詳細な遺伝子解析を行った報告はまだ少なく、カンボジアの genotype C は肝がん関連リスクとされる core promoter 変異などがあるのか、またその遺伝子的特徴を明らかにすることを目的として、GenBank から得られた full genome と比較検討した。

HBsAg 陽性 と判明した 35 人から、full genome sequence が行えた 26 株について遺伝子解析を行った。系統樹解析により genotype C1 が 24/26 株 (92.3%) と優位であったので GenBank に登録済みの genotype C1 340 株と再度系統樹解析を行った。これら genotype C1 株は全体で大きく 4 つのクラスターにわかれ、カンボジア住民株の多くとラオス、マレーシア、タイ由来株とで 1 つのクラスターを形成していた。カンボジア住民の genotype C1 株では core promoter の A1762T と G1764A の変異をもつ double mutation を 75.0%、それに加えて C1653T か T1753V の変異を持つ combo mutation を 58.3%と高率に変異を認めた。GenBank から得た genotype C1 340 株中 double mutation を 47.2%、combo mutation を 33.2% に認めた。背景病態から ASC, AH, LC/HCC に分類しこれら core promoter の変異を比較したところ double mutation は ASC の 20.0% (15/75 例)、CH の 49.0%(73/149 例)、LC/HCC の 100%(21/21 例)に、combo mutation は ASC の 6.7% (5/75 例)、CH の 34.2%(51/149 例)、LC/HCC の 92.3%(20/21 例)に認められ、genotype C1 でも 病態が重いほどこれら変異を持つ割合が高いことが有意に認められた。カンボジア住民の genotype C1 は高率に core promoter 変異を有しており、その率は GenBank の ASC 群や CH 群よりも高く、肝発がんに対する対応が早急に必要ことが示唆された。

A. 研究目的

東南アジアではまだ HBV キャリア率が高く、HBV 感染が肝がんの大きな原因となっている。HBV genotype C は genotype B に比べ肝がんのリスクが高く、genome 側として PreS deletion や core promoter 変異などの HBV 遺伝子変異が肝がん関連リスク因子と報告されている。

我々は 2010-2014 年の期間にカンボジア王国にお

ける一般住民を対象に肝炎調査を行い、HBsAg 陽性率が高く、主な genotype は Cであることを示した¹⁾。

近年、中国を中心に genotype C2 の core promoter 変異、特に A1762T と G1764A が同時に変異している double mutation、さらにその上流 C1653T か T1753V (いずれも X 領域) の変異を伴う combo mutation を持つと予後が悪いことが多数報告され、変異の認められる場合には核酸アナログ製剤など抗

ウイルス療法を早急に始めるよう強く勧められている。

カンボジア王国においてはこのような遺伝子的特徴の仔細な報告はない。本研究ではカンボジア王国の住民における HBV genotype C は肝がん関連リスク因子とされる core promoter 変異などがあるのか、またその特徴を明らかにすることを目的として、その遺伝子配列を GenBank から得られた genotype C1 340 株の full genome と比較検討した。

B. 研究方法

1. 前回調査：2010 年から 2014 年にかけてカンボジア王国シェリムアップ州において子供を含む住民 626 人を対象に肝炎調査を行った。
(男性 254 人、女性 372 人、7-90 歳
2014 年での平均年齢 38.3±16.3 歳
HBsAg 陽性率 5.6% (35 人)、HBsAb 陽性率 28.0%、HBcAb 35.3%)
2. 今回の調査：上記調査で HBsAg 陽性と判明した一般住民 35 人から、HBV full genome sequence が行えた 26 株について遺伝子解析を行った。広島大学疫学研究倫理審査委員会とカンボジア保健省倫理委員会の承認を得ている
3. 解析方法
 - ① 26 株の full genome sequence：PCR 増幅後の direct sequence を行った。
 - ② genotyping：MEGA 7 で UPGMA 法により系統樹解析を行った。
 - ③ geographic distribution の検討：住民株は genotype C1 が dominant であったので GenBank に登録済の genotype C1 340 株と genotype C1 住民株 24 株について NJ(Neighbor-Joining)法により再度系統樹解析を行った。

- ④ 肝がん関連遺伝子変異：住民株 26 株の core promoter 変異を解析した。
GenBank genotype C1 340 株の背景病態と変異：GenBank の登録 profile や paper からその株の背景病態を ASC, CH, LC/HCC に分類し、core promoter mutation の頻度を 3 群間の χ^2 乗検定と posthoc pairwise χ^2 検定を行った。

C. 研究結果

1. 得られたカンボジア住民株は genotype C1 が 24 株、genotype B1 は 1 株、genotype B2 は 1 株であった (図 1)。

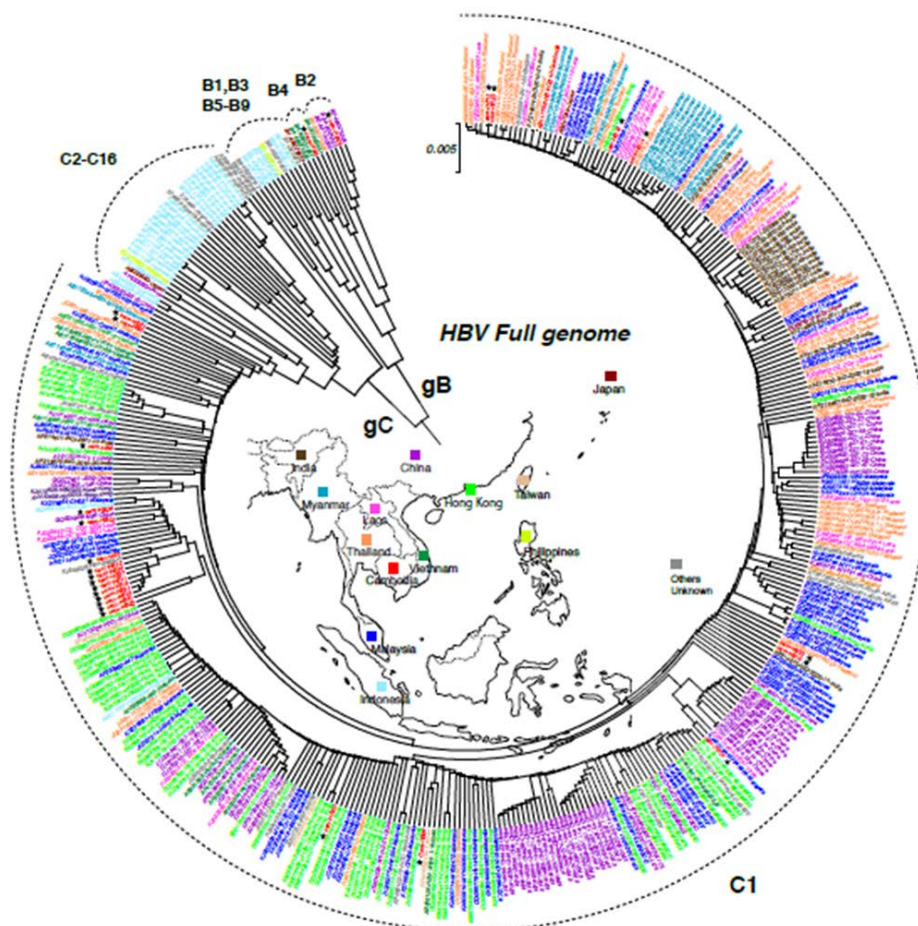


図 1. HBsAg 陽性であったカンボジア住民株のうち、full genome sequence を行えた 26 株の系統樹。

地図上の色で株由来国を示し、カンボジア住民株は赤色。

2. カンボジア住民の genotype C1 (24 株) と GenBank に登録済みの genotype C1 (340 株) について NJ 法で系統樹解析を行うと世界中の genotype C1 株は大きく 4 つのクラスターに分かれていることがわかった。

カンボジア住民株が一番多く含まれた (16 株) クラスターは、地理的分布として狭いエリアのカンボジア近隣諸国のみの株で構成されていた。(図 2)。

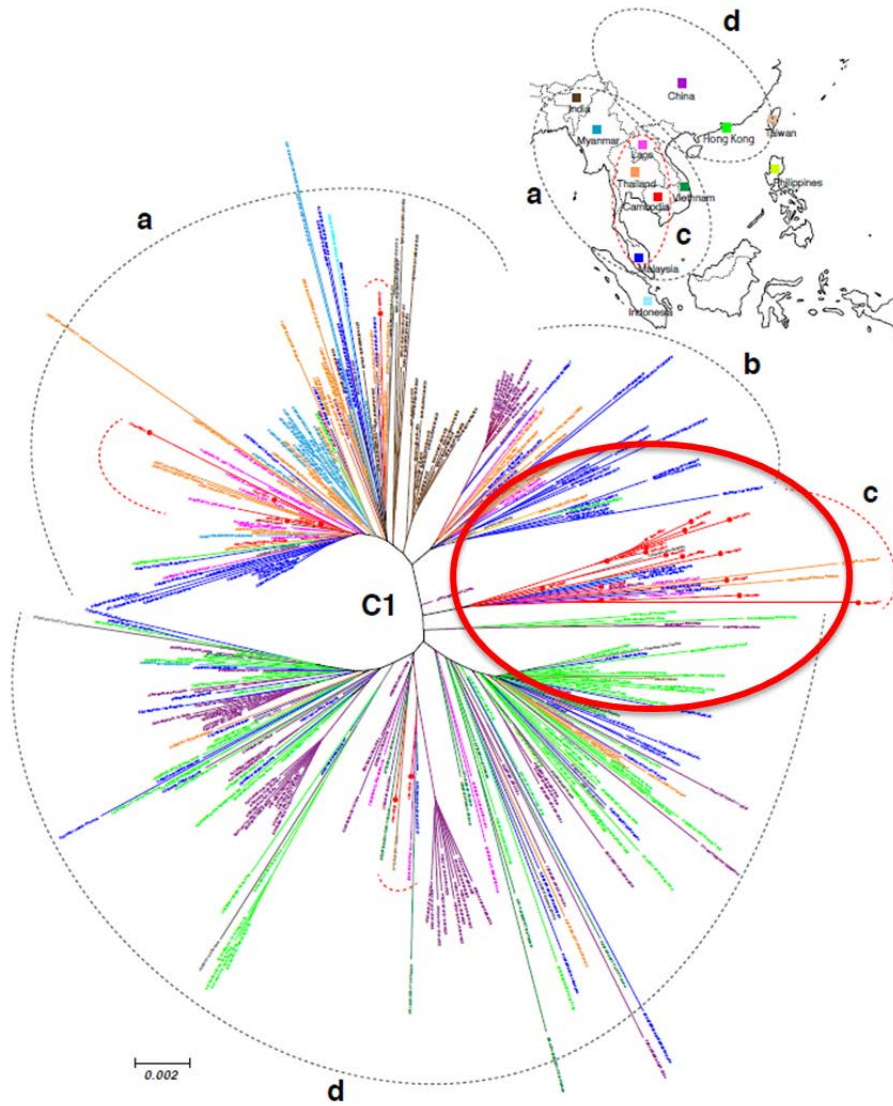


図 2. GenBank genotype C1 340 株とカンボジア住民 genotype C1 24 株の NJ 法による系統樹。地図上の色で株由来国を示し、カンボジア住民株は赤色で示した。

3. カンボジア住民株を full genome で仔細に見ると core promoter 変異だけでなく、preS 欠失や、core 領域 P130 の変異も多く認められた。住民の genotype C1 24 株中 double mutation は 18/24 75.0%、combo mutation は 14/24 58.3%に認められ変異は高い保有率を示した (図 3)。一方、GenBank にある既知の full genome の genotype

C1 340 株を詳細に見るとカンボジア住民株と同様に preS 欠失や、core 領域 P130 の変異も認められた。340 株中 double mutation は 160/340 47.1%、combo mutation は 113/340 33.2%に認められその保有率はカンボジア住民株より少ないことが明らかとなった。

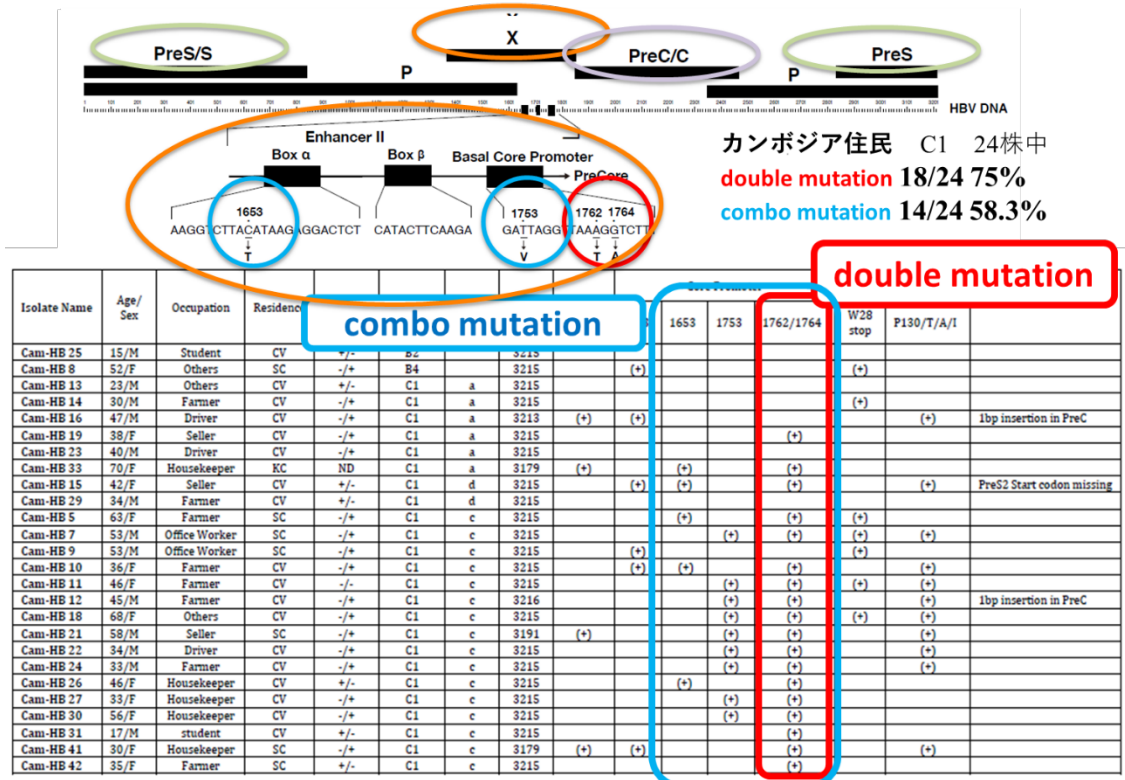
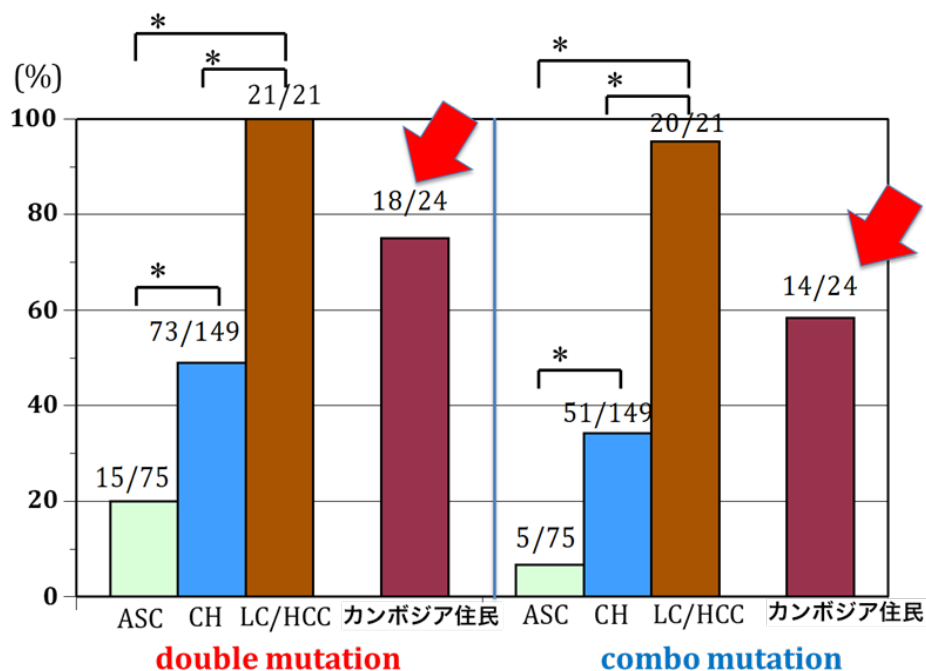


図 3. カンボジア住民株 26 株の遺伝子プロファイル。

double mutation は 75.0%に combo mutation は 58.3%に認められた。

GenBank 登録株について登録されている背景や論文よりその株の由来の病態を分類すると ASC 75 例、CH 149 例、LC/HCC 21 例であった（他判定困難 95 株）。病態毎での core promoter 変異の double mutation 保有率は、各々 ASC 15/75 20.0%、CH 73/149 49.0%、LC/HCC 21/21 100%、

20/21 95.2%、combo mutation ASC 5/75 6.7%、CH 51/149 34.2%、LC/HCC 20/21 95.2%であった（図 4）。この 3 群で core promoter 変異の頻度の比較をすると double mutation、combo mutation とともに病態が重いと変異を保有している頻度が高いことがわかった（ $p < 0.05$ ）。



* $p < 0.05$: 3群間での χ^2 乗検定とposthoc pairwise χ^2 検定

図 4. Genbank genotype C1 340 株からの背景病態による core promoter 変異の保有率の比較。右にカンボジア住民株の変異保有率を示した。

D. 考察

1. カンボジアではユニバーサルワクチンの普及により 新規感染の対策は軌道に乗り、今後 HBV キャリア率は低下していくと期待されている²⁾。
2. しかしすでに感染を起こしている HBV キャリアがまだ広く存在しており、今回の住民株の調査では 肝発がん関連リスクと考えられている core promoter 変異を多く保有していることがわかった。double mutation は 75.0% に combo mutation は 58.3% に認められた。
3. これら住民は肝発がんの高リスク保持者と考えられ、今後カンボジアでも肝発がんに対する対策が必要と考えられた。

E. 結論

- 1) カンボジアのシェムリアップ州における肝炎ウイルス調査で見いだされた HBV 持続感染(35/626: 5.6%)のうち、full genome 解析を行った 26 株の HBV genotype は、C1 24 株(95.2%)、B2 と B4 は各 1 株であり、HBV genotype C1 が優位であった。
- 2) GenBank に full genome として登録されていた 340 例の HBV genotype C1 株について、肝発がんと関連のある core promoter 部分の変異をみると、340 株中 double mutation を 160 株(47.1%)、combo mutation を 113 例(33.2%)に認めた。
病態別にみると、CH の 34.2%(51/149 例)、LC/HCC の 92.3%(20/21 例)に combo mutation が認められ、genotype C1 でも 病態進行で変異の割合は有意に高くなることが示された。
- 3) カンボジア住民の HBV genotype C1 の 24 名の full genome 解析で、24 株中 18 株(75.0%)に double mutation を、14 株(58.3%)に combo mutation を認め、肝発がんリスクが高い遺伝子変異を高頻度

で持っていることがわかった。発がんに対する対応が早急に必要ことが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Channarena Chuon, Chikako Yamamoto, Shintaro Nagashima, Somana Svay, Sirany Hok, Hiroko Fujii, Mayumi Fujimoto, Shiho Saito, Keiko Katayama, Kazuaki Takahashi, Junko Tanaka, Prevalence of HCV and HBV, and characteristics of HCV genomes among general population in Cambodia, APASL 2016 Tokyo
- 2) Channarena Chuon, KO KO, 永島慎太郎、山本周子、山下真未、秋田智之、杉山文、大久真幸、片山恵子、Ork Vichit, Md Shafiqul Hossain, 田中純子, カンボジアにおける HB ユニバーサルワクチン導入後に出生した児における HBV 感染状況把握のための血清疫学研究：層化無作為抽出法による全国調査、第 54 回 日本肝臓学会総会、2018 大阪

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表なし
2. 学会発表なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

該当なし

