

B형 간염 바이러스의 PreS, Basal
Core Promoter 유전자 변이에
따른 간암의 임상 양상 및 예후

연세대학교 대학원
의 학 과
류 한 작

B형 간염 바이러스의 PreS, Basal
Core Promoter 유전자 변이에
따른 간암의 임상 양상 및 예후

지도교수 안 상 훈

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2010년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

류 한 작

류한작의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2010년 6월

감사의 글

먼저 본 논문이 완성되기까지 깊은 애정과 따뜻한 지도로 이끌어 주신 안상훈 교수님께 진심으로 고개 숙여 감사 드리며, 연구를 위하여 각별한 조언을 아끼지 않으신 이재면, 김도영, 김자경 교수님께 깊이 감사 드립니다. 함께 옆에서 격려해준 이종민, 김승엽, 이명하 선생님께도 감사 드리며, 연구실의 장혜영 선생님께도 감사의 말씀을 전합니다. 통계 자문과 분석을 도와준 竹馬故友 문성진에게 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 지금까지 사랑과 격려를 아끼지 않으신 부모님과 동생에게도 감사 드립니다. 끝으로, 넓고 깊고 아름다운 간학문의 세계로 이끌어 주신 한광협 과장님과 평생 학자로서 자손들에게 등불이 되어 주셨던 조부님께 감사드리며, 이 모든 분께 논문을 바칩니다.

저자 씀

차례

국문요약	-----1
I. 서론	-----3
II. 대상 및 방법	-----6
1. 대상	-----6
2. 정의	-----6
3. 방법	-----7
가. HBV 변이 실험 방법	-----7
나. HBV 변이와 간암의 임상적 의의에 대한 분석	---9
3. 통계 분석	-----9
III. 결과	-----10
1. 대상 환자의 특성	-----10
2. 변이 유무에 따른 간암의 특성	-----12
3. 변이 유무에 따른 간암의 생존율	-----18
IV. 고찰	-----22
V. 결론	-----27
참고 문헌	-----28
Abstract	-----33

그림 차례

Figure 1. 실험에 사용되는 specific primer의 위치

-----8

Figure 2. Survival of Patients divided According to

PreS mutation -----19

Figure 3. Survival of Patients divided According to

BCP mutation -----20

표 차례

Table 1. Baseline Characteristics of All Patients	
-----	11
Table 2. Baseline and Tumor Characteristics	
According to PreS Mutation -----	14
Table 3. Treatment Modality Between Non-preS	
and PreS Mutant Tumor -----	15
Table 4. Baseline and Tumor Characteristics	
According to BCP Mutation -----	16
Table 5. Treatment Modality Between Non-BCP	
and BCP Mutant Tumor -----	17
Table 6. Cox Regression Analysis for Survival ---	
-----	21

국문 요약

B형 간염 바이러스의 PreS, Basal Core Promoter 유전자 변이에 따른 간암의 임상 양상 및 예후

B형 간염 바이러스(HBV)의 preS, basal core promoter (BCP) 유전자 변이는 간세포암(간암) 발생의 위험 인자로 알려져 있다. 그러나, 현재까지 HBV의 변이와 간암의 임상 양상과의 연관성에 관한 연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구자는 HBV의 특이 preS, BCP 유전자 변이에 따른 간암의 임상 양상과 예후에 대해 알아보하고자 하였다.

1994년 5월부터 2008년 4월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에서 간암으로 진단된 126명의 환자를 대상으로 하여 각각 preS 변이에 따라 비변이군 103명 변이군 23명, BCP 변이에 따라 비변이군 44명 변이군 82명으로 나누어 분석하였다. HBV DNA를 혈청에서 추출하여 특이 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)로 preS, BCP 변이를 증폭한 뒤 직접 염기서열 측정법(direct sequencing assay)을 이용하였다. 각군의 간암의 병기, 크기, 수, 형태, 혈관 침범, 문맥 혈전, 간외 전이를 포함한 진단 당시 간암의 임상 양상과 예후를 조사하였다.

대상 환자의 중간 연령은 비preS군 44세, preS군 47세이었고, 남자

비율은 82.5%, 87.0%, e 항원 양성 비율은 32.0%, 17.4%, 간경변증 비율은 82.2%, 78.9%, 알파태아단백(alpha-fetoprotein, AFP)의 중앙값은 401.8 IU/mL, 147.7 IU/mL, alanine aminotransferase(ALT)의 중앙값은 각각 47 IU/L, 50 IU/L로 양군간의 기본 특징은 의미 있는 차이가 없었다. 또한, 간암의 개수, 주종양의 크기, 형태, 혈관 침범, 문맥혈전, 림프절 전이, 간외 전이, tumor, node, and metastasis (TNM) 병기 등 종양의 특성 및 수술, 간동맥화학색전술, 방사선, 항암화학요법, 고주파 등 초치료 방법에 있어서 양군의 의미 있는 차이는 없었다. 반면, Kaplan-Meier 분석을 통한 누적 생존율은 preS변이군이 비변이군에 비해 의미 있게 낮았다(P=0.024). BCP 변이를 기준으로 두군을 나누었을 때도 양군간의 기본 및 종양 특성은 의미 있는 차이가 없었고, preS 변이와 달리 누적 생존율도 BCP 변이 유무에 따라 차이가 없었다. Cox 회귀분석에 따르면 preS 변이와 Child 분류, TNM 병기가 생존에 독립적인 위험 인자이었다.

이상의 결과로, HBV의 preS와 BCP 변이 유무는 진단 당시 간암의 특성에 영향을 주지 않았으나 preS 변이는 간암의 생존에 영향을 미치는 독립적인 위험 인자임을 알 수 있었다.

핵심 되는 말: 간세포암, preS, basal core promoter, 변이, 예후

B형 간염 바이러스의 PreS, Basal Core Promoter 유전자 변이에 따른 간염의 임상 양상 및 예후

<지도교수 안 상 훈>

연세대학교 대학원 의학과

류 한 작

I. 서 론

간세포암(간암)은 전세계적으로 다섯번째로 흔한 암으로 암사망률의 세번째를 차지하고 있다. 지역적으로 동아시아 및 사하라 남부 아프리카에서 호발하며 여성보다 남성에게서 2-3배 많이 발생한다¹. 간암 발생의 위험 주된 위험 인자로 B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV), C형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV), 간경변증, 아플로톡신 B1에의 노출, 음주, 당뇨 등이 있다. 전세계적으로 간암 발생의 80% 정도가 HBV와 연관 있는 것으로 알려져 있다².

하지만, 간암의 중요한 유발인자인 HBV의 정확한 발암기전이 아직 밝혀지지 않고 있다. 이를 위해 지금까지 국외 및 국내에서 여러 연구가 진행되었으며, 특히 바이러스 측면에서 HBV의 변이

를 찾아보고, HBV의 변이가 간암의 발생에 미치는 영향을 알아보
고자 하는 많은 노력이 있었다³⁻⁵. HBV 게놈은 DNA 중합효소를
만드는 P, 각각 core protein과 surface protein을 만드는 C와 S,
숙주 세포내에서 transcription, transformation 하는 X 단백질을
만드는 X의 4개의 open reading frame으로 구성되어 있다. 이 중
S 유전자 영역은 preS1, preS2, S 영역으로 구성되어 있고 여기서
세 종류의 표면 단백질이 만들어 지는데 세 영역 모두를 포함하는
단백질을 large HB surface protein, preS2와 S 영역만 포함하는
단백질은 middle HB surface protein, S 영역만 포함하는 경우를
small HB surface protein라 한다⁶. 표면 항체들은 바이러스가 간
세포 내로 들어갈 때와 완전한 바이러스 형성에 중요한 역할을 하
고 숙주 면역세포의 중요한 표적이 되는 것으로 알려져 있으며⁷,
core promoter(nucleotide 1742-1849)영역은 HBeAg 전구체와
pregenomic mRNA의 전사를 조절하는 기능이 알려져 있다⁸.

최근 이러한 영역 중에서 preS 변이가 간세포내 산화적 스트레
스를 유발하여 DNA 손상을 준다는 연구⁹⁻¹⁰ 및 basal core
promoter(BCP)의 1762,1764 변이가 p53 종양 억제 유전자에 영
향을 주어 간암을 유발한다는 연구가 있었다¹¹. 실제로 여러 연구
를 통해 preS deletion 변이, BCP 변이가 간암 발생의 독립적이
위험 인자로 알려져 있고¹²⁻¹³, 최근 한국인을 대상으로 한 연구에

서도 precore 변이는 간암 발생과 연관이 없었으나, BCP 변이가 간암 발생의 위험 인자임을 알 수 있었다¹⁴.

하지만, 대부분의 연구가 HBV의 변이를 종합적으로 분석한 측면에서는 미비하였고, 임상과의 연관성에서도 변이의 유무와 간암의 발생 여부에만 초점이 맞추어져 있어서 HBV 변이와 관련한 간암의 상세한 임상 양상의 차이를 알아 보는데는 한계가 있다.

이에 본 연구자는 HBV로 인한 간암 환자를 대상으로 preS, BCP 변이를 조사하여 진단 당시 전체 및 변이 비발생 군과 발생 군의 임상 양상과 예후를 비교하여 이 변이들이 임상에 미치는 영향을 확인하고 나아가 간암 환자에서 이런 변이들의 존재 여부를 확인할 필요가 있는지 알아보려고 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

1994년 5월부터 2008년 4월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에서 간암으로 진단된 6개월 이상 HBsAg 양성으로 다른 HBV 유전자형의 영향을 배제하기 위하여, 오직 유전자형이 HBV/C2인 135명의 환자 중에서, 만 16세 이하의 소아와 HCV나 인체면역결핍바이러스(HIV) 감염이 같이 있는 경우, HBV 변이 혈청 검체 채혈 전에 항바이러스제를 투여한 9명을 제외하여 126명의 환자를 대상으로 하였다. preS 변이에 따라 비변이군 103명 변이군 23명, BCP 변이에 따라 비변이군 44명 변이군 82명으로 나누어 분석하였다. 간암의 진단은 생검을 통해 확진을 하거나 유럽 간학회의 가이드라인에 따라 alpha-feto protein (AFP)와 혈관조영술, 컴퓨터전산화단층촬영 또는 자기공명영상의 결과로 진단하였다¹⁵. 간암의 치료는 2004년 대한간암연구회에서 제정한 “간세포암종 진료 가이드라인”에 준해서 치료하였다¹⁶.

2. 정의

간경변증은 조직학적으로 진단하거나, 저혈소판혈증 ($<100,000/\text{mm}^2$)과 비장종대가 있으면서 영상학적으로 간 경계 부위가 무디고 결절성인 경우로 정의하였다¹⁷.

PreS 변이는 preS1 또는, preS2 deletion이 있는 경우로 하였고, BCP 변이는 1762번째의 염기인 adenine이 thymine으로 치환되고 1764번째의 guanine이 adenine으로 치환된 A1762T/G1764 변이가 있는 경우로 정의하였다.

3. 방법

가. HBV 변이 실험 방법

(1) Serological Assays for HBV and Genotyping

HBeAg과 anti-HBe 항체는 chemiluminescent enzyme immunoassay를 이용하여 측정하였다. HBV 유전자형은 surface gene 분석을 통해 polymerase chain reaction(PCR)-restriction fragment length polymorphism genotyping을 이용하여 DNA에서 측정하였다.

(2) PCR Amplification and Direct Sequencing of PreS and BCP

HBV DNA는 혈청 200ul 에서 QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN Inc, Chatworth, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법대로 분리하였다. HBV DNA는 PicoMaxx Fidelity PCR system (Stratagene, La Jolla, CA)으로 증폭 primer와 thermocycling condition을 이용하여 PCR로 증폭하였다.

PreS/S region 의 증폭은 HBSS nucleotide(nt) 2740-2764

5'-GGCATTATTTACATACTCTGTGGAA-3'와 HBSAS nt 894-914 5'-TGTGGTAAAGTACCCCAGCTT-3'의 primer을 이용하여 PCR 하며, BCP 부분의 증폭은 HB7F 5'-GAGACCACCGTGAA CGCCCA-3'와 HB7R 5'-CCTGAGTGCTGTATGGTGAGG-3'을 이용하여 PCR을 시행하였다(Figure 1).

PCR 산물은 ethidium bromide을 포함하고 1% agarose gel에서 전기 영동을 통하여 확인 후 QIAXII gel extraction kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA를 ABI 3730 XL(Applied Biosystems, Foster City, CA)장비를 이용한 sequencing analysis를 시행하였다.

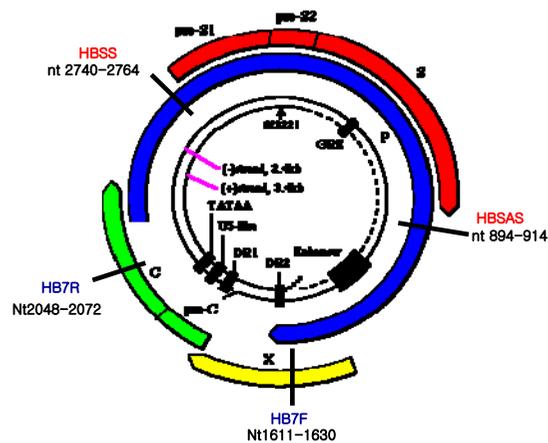


Figure 1. 실험에 사용되는 specific primer의 위치

나. HBV 변이와 간암의 임상적 의의에 대한 분석

HBV 변이는 preS, BCP 에 따라 그룹을 지어서 간암과의 관련성을 분석하였다. 간암의 변수는 진단 당시의 종양의 개수, 주종양의 크기, 결절형 혹은 미만형 여부, 혈관 침범, 문맥혈전, 림프절전이, 간외 전이, Tumor, node and metastasis(TNM) 병기를 포함하여 HBV 변이와의 관련성을 분석하였다.

간암의 진행 경과 및 예후는 생존율, 시간별 진행을 포함시켜 HBV 변이와의 관련성을 분석하였다.

4. 통계 분석

모든 자료의 통계 처리는 개인용 컴퓨터 프로그램 SPSS for window version 15.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였으며, 기술적 자료는 중앙값(범위) 및 백분율로 표시하였다. 비연속 변수의 비교에는 Chi-Square test 또는 Fisher's Exact test를 이용하였으며, 연속 변수의 비교는 Student t-test 또는 Mann-Whitney U test를 사용하여 분석하였다. 간암의 독립 위험인자를 파악하기 위해서는 로지스틱 회귀를 이용한 다변량 분석 방법 및 생존율은 Kaplan-Meier 생존 분석을 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 대상 환자의 특성

대상 환자는 총 126명으로 연령 중앙값은 45세(범위, 18-63)였고 남자 105명, 여자 21명이었다. 대상환자 중 간경변증은 104예(82.5%)였고, HBeAg 양성은 37예(29.4%)였다. AFP 중앙값은 405.4 IU/mL(범위, 3.3-83000)였고, ALT 중앙값은 45 IU/L(범위, 13-457)였다. 대상 환자 중 preS 변이가 있는 환자는 23예(18.3%)이었고, BCP 변이가 있는 환자는 82예(65.1%)이었다. 환자의 TNM 병기는 I,II,III,IV-A,IV-B가 각각 11(8.7%), 39(31.0%), 38(30.2%), 27(21.4%), 11(8.7%)이었다(Table 1).

Table 1. Baseline Characteristics of All Patients

Variables	N (%)
Subject	126
Age, yr*	45 (18-63)
Sex, male (%)	105 (83.3)
HBeAg, positive (%)	37 (29.4)
Cirrhosis (%)	98 (77.8)
AFP, IU/mL*	405.4 (3.3-83000)
ALT, IU/L*	45 (13-457)
Presence of Mutation (%)	
PreS	23 (18.3)
BCP	82 (65.1)
TNM stage (%)	
I	11 (8.7)
II	39 (31.0)
III	38 (30.2)
IV-A	27 (21.4)
IV-B	11 (8.7)

AFP, alpha-feto protein; ALT, alanine aminotransferase; BCP, basal core promoter; TNM, tumor, node and metastasis.

*This value was median.

2. 변이 유무에 따른 간암의 특성

PreS 변이 유무에 따른 양군간의 간암의 연령, 성별, HBeAg 양성, 간경변증, AFP, ALT의 의미 있는 차이는 없었다. 또한, preS 변이가 없는 간암과 preS 변이가 있는 간암의 종양 특성은 각각 종양 개수의 중앙값은 2(범위, 1-10), 2(범위, 1-7)였고, 주요종양의 크기는 5cm(1-15), 4cm(1.7-8.0), 결절형/미만형 형태는 73/30(70.9%/29.1%), 17/6(73.9%/26.1%), 혈관 침범은 29(28.2%), 7(30.4%), 문맥 혈전은 29(28.2%), 7(30.4%), 임파선 전이는 15(14.6%), 1(4.3%), 간외 전이는 11(10.7%), 0(0%), TNM 병기 I/II/III/IV-A/IV-B는 10/28/32/25/8(9.7%/27.2%/31.1%/24.3%/7.8%), 0/11/5/7/0(0%/47.8%/21.7%/30.4%/0%)로 양군간의 의미 있는 차이는 없었다(Table 2).

생존율에 영향을 미칠 수 있는 간암의 치료 방법에 있어서도 양군간의 수술 비율은 25(24.3%), 7(30.4%)이었고, 초치료로 수술/간동맥화학색전술/방사선향암치료/항암치료/고주파치료를 시행한 비율은 12/50/15/16/9(11.7%/48.5%/14.6%/15.5%/8.7%), 5/10/4/1/3(21.7%/43.5%/17.4%/4.3%/9.5%)로 각각 양군간의 의미 있는 차이는 보이지 않았다(Table 3).

BCP 변이 유무에 따라서도 양군간의 간암의 연령, 성별, HBeAg 양성, 간경변증, AFP, ALT의 의미 있는 차이는 없었다. 또한, BCP

변이가 없는 간암과 BCP 변이가 있는 간암의 종양 특성에서도 각각 종양 개수의 중앙값은 2(범위, 1-8), 2(범위, 1-20)였고, 주요종양의 크기는 5cm(1.0-11), 4cm(1.0-15), 결절형/미만형 형태는 29/15(65.9%/34.1%), 61/21(74.4%/25.6%), 혈관 침범은 15(34.1%), 21(25.6%), 문맥 혈전은 17(38.6%), 19(23.2%), 임파선 전이는 9(20.5%), 7(8.5%), 간외 전이는 4(9.1%), 7(8.5%), TNM 병기 I/II/III/IV-A/IV-B는 6/12/8/14/4(13.6%/27.3%/18.2%/31.8%/9.1%), 4/27/29/18/4(4.9%/32.9%/35.4%/22.0%/4.9%)로 역시 양군간의 의미 있는 차이는 없었다(Table 4).

생존율에 영향을 미칠 수 있는 간암의 치료 방법에 있어서도 양군간의 수술 비율은 8(18.2%), 24(29.3%)이었고, 초치료로 수술/간동맥화학색전술/방사선항암치료/항암치료/고주파치료를 시행한 비율은 4/19/7/9/5(9.1%/43.2%/15.9%/20.5%/11.4%), 13/41/12/9/7(15.9%/50.0%/14.6%/11.30%/8.5%)로 각각 양군간의 의미 있는 차이는 보이지 않았다(Table 5).

Table 2. Baseline and Tumor Characteristics According to PreS Mutation

HCC	HCC without preS mutation (n=103)	HCC with preS mutation (n=23)	<i>p</i> - value
Baseline parameters			
Age, yr*	44 (29-63)	47 (18-55)	0.519
Sex, male (%)	85 (82.5)	20 (87.0)	0.763
HBeAg, positive (%)	33 (32.0)	4 (17.4)	0.210
Cirrhosis (%)	83 (82.2)	15 (78.9)	0.750
AFP, IU/mL*	401.8 (1.5-83000)	147.7 (3.0-53343)	0.131
ALT, IU/L*	47 (13-457)	50 (15-155)	0.924
Tumor factors			
Number*	2 (1-10)	2 (1-7)	0.579
Main tumor size, cm*	5 (1-15)	4 (1.7-8.0)	0.404
Type-nodular/diffuse (%)	73/30 (70.9/29.1)	17/6 (73.9/26.1)	0.807
Vascular invasion (%)	29 (28.2)	7 (30.4)	0.827
PVT ^a (%)	29 (28.2)	7 (30.4)	0.827
Lymph node metastasis (%)	15 (14.6)	1 (4.3)	0.301
Distant metastasis (%)	11 (10.7)	0 (0)	0.213
TNM stage	10/28/32/25/8	0/11/6/5/1	0.141
I/II/III/IV-A/IV-B (%)	(9.7/27.2/31.1/24.3/7.8)	(0/47.8/21.7/30.4/0)	

*This value was median. ^aPVT: portal vein thrombosis.

Table 3. Treatment Modality Between Non-preS and PreS mutant Tumor

HCC Treatment	HCC without preS mutation (n=103)	HCC with preS mutation (n=23)	<i>p</i>-value
Operation (%)	25 (24.3)	7 (30.4)	0.598
Initial treatment (%)			0.508
Operation	12 (11.7)	5 (21.7)	
TACE^a	50 (48.5)	10 (43.5)	
CCRTx^b	15 (14.6)	4 (17.4)	
Chemotherapy alone	16 (15.5)	1 (4.3)	
RFA^c	9 (8.7)	3 (9.5)	

^aTACE: transcatheter arterial chemoembolization, ^bCCRTx: concurrent chemoradiation therapy, ^cRFA: radiofrequency ablation.

Table 4. Baseline and Tumor Characteristics According to BCP Mutation

HCC	HCC without BCP mutation (n=44)	HCC with BCP mutation (n=82)	<i>p</i> - value
Baseline parameters			
Age, yr*	44 (31-55)	46 (18-63)	0.054
Sex, male (%)	38 (86.4)	67 (81.7)	0.620
HBeAg, positive (%)	16 (36.4)	21 (25.6)	0.224
Cirrhosis (%)	35 (79.5)	69 (84.1)	0.623
AFP, IU/mL*	556.2 (1.5-83000)	222.9 (2.3-83000)	0.139
ALT, IU/L*	44 (15-342)	50 (13-457)	0.453
Tumor factors			
Number*	2 (1-8)	2 (1-20)	0.946
Main tumor size, cm*	5 (1.0-11)	4 (1.0-15)	0.966
Type-nodular/diffuse (%)	29/15 (65.9/34.1)	61/21 (74.4/25.6)	0.408
Vascular invasion (%)	15 (34.1)	21 (25.6)	0.408
PVT (%)	17 (38.6)	19 (23.2)	0.097
Lymph node metastasis (%)	9 (20.5)	7 (8.5)	0.089
Distant metastasis (%)	4 (9.1)	7 (8.5)	1.000
TNM stage I/II/III/IV-A/IV-B (%)	6/12/8/14/4 (13.6/27.3/18.2/31.8/9.1)	4/27/29/18/4 (4.9/32.9/35.4/22.0/4.9)	0.090

*This value was median. ^aPVT: portal vein thrombosis.

Table 5. Treatment Modality Between Non-BCP and BCP mutant Tumor

HCC Treatment	Non BCP mutant HCC (n=44)	BCP mutant HCC (n=82)	<i>p</i>-value
Operation (%)	8 (18.2)	24 (29.3)	0.202
Initial treatment (%)			0.488
Operation	4 (9.1)	13 (15.9)	
TACE^a	19 (43.2)	41 (50.0)	
CCRTx^b	7 (15.9)	12 (14.6)	
Chemotherapy alone	9 (20.5)	9 (11.0)	
RFA^c	5 (11.4)	7 (8.5)	

^aTACE: transcatheter arterial chemoembolization, ^bCCRTx: concurrent chemoradiation therapy, ^cRFA: radiofrequency ablation.

3. 변이 유무에 따른 간암의 생존율

Kaplan-Meier 생존 분석을 통하여 preS 변이 유무에 따른 양군간의 생존율을 비교하였을 때 preS 비변이군과 변이군의 1년, 3년, 5년 생존율은 각각 73.9%, 60.8%, 22.7% 와 70.8%, 56.3%, 0% 였고 preS 변이군이 비변이군에 비해 통계적으로 유의하게 생존율이 낮았다(Figure 2. log rank $P=0.024$).

반면, BCP 유무에 따른 양군간의 1년, 3년, 5년 생존율은 BCP 비변이군과 변이군이 각각 66.6%, 37.2%, 22.5% 및 73.3%, 38.6%, 22.7% 였고, Kaplan-Meier 생존 분석을 하였을 때 양군간의 생존율에는 차이가 없었다(Figure 3. log rank $P=0.418$).

Cox regression을 통해 생존에 영향을 미치는 다변량 분석을 하였을 때, preS 변이(odds ratio=1.789, 95% confidence interval=1.039-3.080, $P=0.036$)와 Child class, TNM 병기가 생존율에 영향을 미치는 독립적인 위험 인자였다(Table 6).

Figure 2. Survival of Patients divided According to PreS mutation

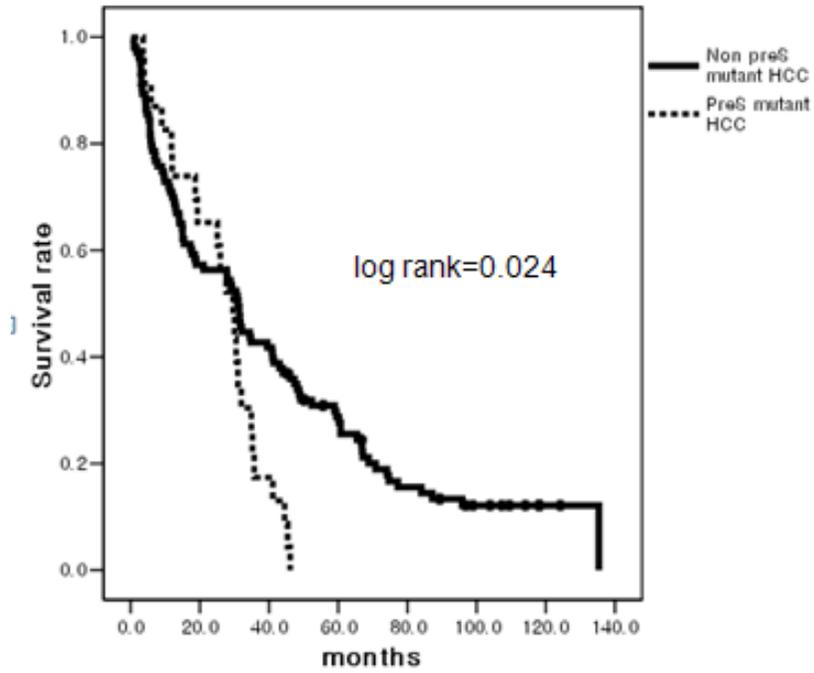


Figure 3. Survival of Patients divided According to BCP mutation

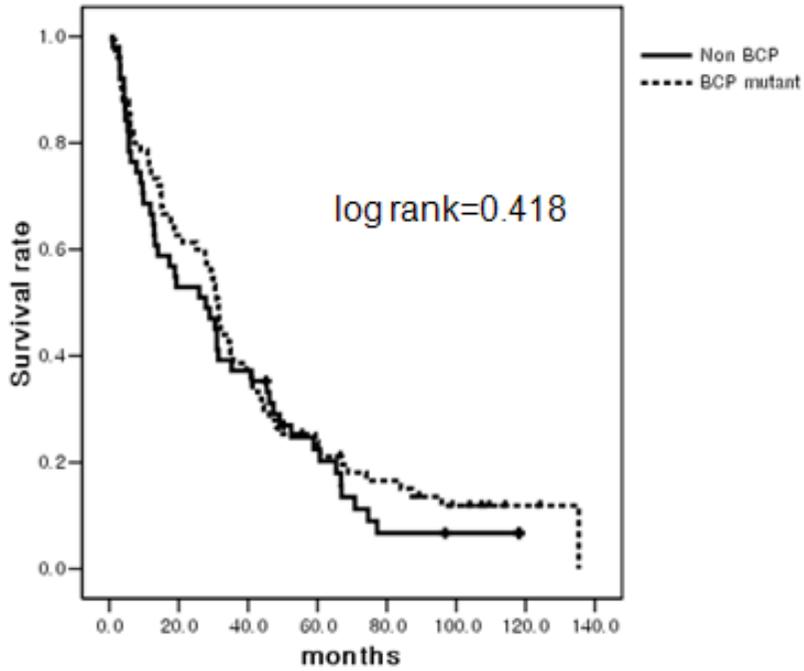


Table 6. Cox Regression Analysis for Survival

Valuables	Odds ratio (95% CI*)	p-value
AFP	1.186 (0.668-2.107)	0.561
PreS (vs. negative)	1.789 (1.039-3.080)	0.036
Child-Pugh class (A/B)	1.483 (1.039-3.080)	0.027
TNM stage (vs. I)		
II	2.023 (0.760-5.390)	0.159
III	4.316 (1.541-12.088)	0.005
IV-A	6.149 (2.174-17.392)	0.001
IV-B	47.890 (13.148-174.431)	<0.001

*CI: confidence interval.

IV. 고찰

본 연구는 한국인 간암 환자를 대상으로 간암 발현에 영향을 주는 HBV 유전자 내의 변이종들과 임상 양상의 연관성을 분석함으로써 HBV 유전자 변이가 간암의 임상 경과 및 예후에 미치는 영향을 연구한 첫 연구이다. PreS 및 BCP 변이 유무에 따라서 두군으로 나누어 비교하였으며, 진단 당시의 종양의 개수, 주종양의 크기, 결절형 혹은 미만형 여부, 혈관 침범, 문맥혈전, 림프절 전이, 간외 전이, TNM 병기를 포함하여 HBV 변이와의 관련성을 비교해 보았다. 간암 진단 당시 변이 여부와 종양의 임상 양상과는 차이가 없었고, BCP 변이 여부와는 달리 preS 변이가 있는 간암에서 누적 생존율이 낮았고, preS 변이는 다변량 분석에서 생존에 영향을 미치는 독립적인 위험 인자이었다.

HBV는 3.2 kb 크기의 작은 유전자를 가졌음에도 20,000-25,000개의 인간 유전자에서 만들어지는 갖가지 숙주 방어 단백질과 면역체계에 대항하여 기생하여 생존한다는 점에서 인간을 숙주로 하는 병원균 중 가장 성공적으로 감염하는 바이러스의 하나일 것이다¹⁸. 이 이중나선 게놈은 4개의 겹쳐진 해독틀(open reading frame)을 가지는데 각각 표면단백(S), 중심단백, 중합효소, X 라 불리는 다기능적 비구조 단백을 부호화(encode)한다.

HBV에 의한 간 손상은 바이러스 자체보다는 세포 독성 T세포

가 감염된 간세포에 영향을 주기 때문에 간질환의 정도는 숙주의 면역상태와 관계된다고 알려져 왔으나¹⁹ 최근 숙주 요인의 바이러스 자체에 의한 간세포 손상 기전에 제기되어 precore, core promoter, preS 변이종 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이 중 precore 부위의 A1896(guanine->adenine) 변이가 주로 활동성 감염과 전격성 감염 환자들에게 관찰되어 이 변이가 심각한 간질환을 일으키는 것으로 알려졌으나²⁰, 이 변이가 HBeAg 음성이고 anti-HBe 양성인 무증상 환자들에게 흔히 발견되는 보고도 있어²¹ 간질환의 발생과 병태생리적으로 직접적인 관련은 없다는 연구도 있었다. 최근 한국인을 대상으로 한 연구에서 만성 B형 감염 환자와 간암환자를 case-control match 하였을 때, precore 변이가 의미 있는 차이를 보이지 않아¹⁴ 본 연구에서도 precore를 제외하고 BCP 및 preS 변이 유무에 따른 간암의 임상 양상을 조사하였다.

HBV 유전자 중 X 유전자는 BCP와 중첩되어 있고, 숙주세포에 내에서 HBV의 유전자 복제와 전사를 촉진시키고(transcription), 숙주세포를 transformation시키며, core promoter를 transactivation하는 X 단백질을 만들어 바이러스의 증식과 숙주의 면역반응에 밀접한 관계가 있다고 한다²². 이 HBV의 X mutation이 cell apoptosis 와 survival 에 관여하는 transcription factor NF-

κB 를 억제하고²³, p21 expression에 관여하면서 tumor inhibitor gene인 p53 기능을 약화하여¹¹, 간세포의 과증식을 유발하여 hepatocarcinogenesis에 관여하는 것으로 보고하였다. BCP 영역 (nucleotides 1742-1849)은 HBeAg 전구체와 pregenomic mRNA의 전사를 조절하는 기능이 있어 이 영역의 변이는 HBeAg과 HBcAg의 발현에 전사 수준에서 변화시켜 간질환 활성도에 변화를 가져올 수 있다고 하였고²⁴⁻²⁵, 이중 가장 흔한 1762번째의 염기인 adenine이 thymidine으로 치환되고 1764번째의 guanine이 adenine으로 치환되는 TA 변이는 HBeAg 생성을 억제하여 HBeAg에 의한 면역 관용효과가 사라지게 하여 심한 간경변을 일으킨다는 보고 및²⁶ HBV의 증식 과 HBcAg의 표현을 증가시킨다는 연구들이 있었다²⁷⁻²⁸. 이러한 HBV의 증식과 HBcAg의 표현 증가는 심한 간손상을 일으킬 가능성이 있다. 실제로 최근 많은 연구에서 BCP의 TA변이(A1762T/G1764A)가 간암 발생의 독립적인 위험 인자로 보고되었다^{13-14,29-30}. 그러나, 본 연구에서는 일단 간암이 발생하였을 때는 BCP변이 여부와 진단 당시의 종양의 개수, 주종양의 크기, 결절형 혹은 미만형 여부, 혈관 침범, 문맥혈전, 림프절 전이, 간외 전이, TNM 병기 등 간암의 임상 양상과는 관계가 없었고, 간암의 생존율에도 BCP 변이 여부가 영향을 주지 못하였다. 이는 BCP 변이에 영향은 미미하고 종양의 병기 등 다른 인자

들이 더 큰 영향을 끼치기 때문으로 보인다.

PreS1과 preS2로 이루어진 preS 영역(nucleotides 2854-155)은 중합효소 영역과 중첩되며, 어떤 연구에서는 preS와 BCP 영역에서의 HBV 돌연변이와 간암과의 연관성을 보여주었다^{5,29}. PreS1과 preS2는 T 또는 B 세포의 epitope을 가지므로 면역반응에 필수적인 역할을 한다. PreS 돌연변이는 인터페론 치료중에 종종 나타나는데 바이러스에 의해 숙주의 면역반응을 피하기 위함으로 보인다³¹, 무증상 HBV 보유자보다 진행성 간질환에서 preS의 결손 빈도가 높다는 보고가 있었다⁴. PreS 변이의 간암 발생에 관한 연구로는 preS1의 변이로 표면 항체가 filament 형태를 취하고 이는 endoplasmic reticulum(ER)에서 세포 밖으로 배출이 되지 않게 되어 간세포들이 불투명 유리상(ground glass)세포질 변화를 나타내고³², γ interferon에 대한 과민 반응으로 세포 손상을 받게되어³³ 이 filament형의 표면 항체가 ER에 과축적이 되면 그 기능을 상실하게 되어 간세포가 비가역적인 손상을 받아 간세포 증식 속도가 증가하여³⁴ reactive oxygen 생성 및 DNA 손상을 초래하여 간암까지 일으킬 수 있는 것으로 보고하였다^{9,35}. 그리고 S유전자영역의 변이로 생긴 불완전한 preS2/S(truncated preS2/S) 단백질은 다른 유전자를 transactivation시켜 종양을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다³⁶⁻³⁷. 본 연구에서는 preS 변이 유무에 따른 간암의 임상

양상에는 차이가 없었으나, BCP 변이 여부와는 달리 preS 변이가 있는 간암에서 생존율이 낮게 나오고, preS 변이 유무가 생존에 독립적인 위험 인자였는데, 이것은 HBV에서 표면항원(HBsAg)이 숙주세포의 인식과 감염과 막구조의 안정화하는 구조 단백질의 기능, 숙주세포 인식 리간드로서의 기능, 운반체 단백질로서의 기능, 전사 활성 인자(transactivational activator)로서의 기능, 항염증작용의 기능, 면역항원으로서의 기능⁶ 등 많은 다양하고 중요한 역할을 한다는 점에서 표면 항원의 변이가 다른 변이 보다는 임상적으로 중요하고 그것이 결국에는 생존을 악화에도 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

요약하면, 본연구를 통해 간암 발생의 위험 인자로 알려진 HBV의 preS 및 BCP 유전자 변이는 진단 당시 간암의 특성에는 영향을 주지 않았으나, BCP 변이와 달리 preS 변이는 간암의 생존율에 영향을 미치는 독립적인 위험인자임을 알 수 있었고, 간암 발생의 위험 요인과 예후를 예측함에 있어 preS 변이 측정이 유효할 수 있을 것으로 판단된다. 앞으로, preS 변이가 간암의 예후에 미치는 원인 및 임상 경과에 대한 추가 연구가 필요하겠다.

V. 결 론

HBV로 인한 간암 환자를 대상으로 preS, BCP 변이를 조사하여 진단 당시 변이 비발생 군과 발생 군의 임상 양상과 예후를 비교하여 이 변이들이 임상에 미치는 영향을 확인하고 나아가 간암 환자에서 이런 변이들의 존재 여부를 확인할 필요가 있는지 알아보기 위하여 1994년 5월부터 2008년 4월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에서 간암으로 진단된 126명의 환자를 대상으로 하여, preS 변이에 따라 비변이군 103명 변이군 23명, BCP 변이에 따라 비변이군 44명 변이군 82명으로 나누어 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 진단 당시 preS, BCP 변이 유무에 따른 간암의 임상 양상에는 차이가 없었다.
2. BCP 변이는 간암의 생존율에 영향을 주지 않았다.
3. PreS 변이는 간암의 생존율에 영향을 미치는 독립적인 위험인자였다.

이상의 결과로, 간암 발생의 위험 요인과 예후를 예측함에 있어 preS 변이 측정이 유효할 수 있을 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. Yu MC, Yuan JM, Govindarajan S, Ross RK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *The Canadian journal of gastroenterology* 2000;14:703-9.
2. Kim SR, Kudo M, Hino O, Han KH, Chung YH, Lee HS. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan and Korea. A review. *Oncology* 2008;75 Suppl 1:13-6.
3. Tanaka Y, Mukaide M, Orito E, Yuen M, Ito K, Kurbanov F, et al. Specific mutations in enhancer II/core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2006;45:646-53.
4. Chen C, Hung C, Lee C, Hu T, Wang J, Lu S, et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133:1466-74.
5. Lin CL, Liu CH, Chen W, Huang WL, Chen PJ, Lai MY, et al. Association of pre-S deletion mutant of hepatitis B virus with risk of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1098-103.
6. Park JH. [Hepatitis B virus surface antigen: a multifaceted protein]. *Korean Journal of Hepatology* 2004;10:248-59.
7. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
8. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-51.

9. Hsieh Y, Su I, Wang H, Chang W, Lei H, Lai M, et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* 2004;25:2023-32.
10. Su I, Wang H, Wu H, Huang W. Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2008;23:1169-74.
11. Park US, Park SK, Lee YI, Park JG. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1→S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-94.
12. Chen C, Changchien C, Lee C, Hung C, Hu T, Wang J, et al. Combined mutations in pre-s/surface and core promoter/precore regions of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study. *The journal of infectious diseases* 2008;198:1634-42.
13. Liu S, Zhang H, Gu C, Yin J, He Y, Xie J, et al. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101:1066-82.
14. Kim JK, Chang HY, Lee JM, Baatarkhuu O, Yoon YJ, Park JY, et al. Specific mutations in the enhancer II/core promoter/precore regions of hepatitis B virus subgenotype C2 in Korean patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of medical virology* 2009;81:1002-8.
15. Holomn J, Glasa J. EASL clinical practice guidelines. *Journal of Hepatology* 2009;51:821-2.
16. Park JW. [Practice guideline for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma]. *Korean Journal of Hepatology*

- 2004;10:88-98.
17. Kim SU, Han K, Nam CM, Park JY, Kim DY, Chon CY, et al. Natural history of hepatitis B virus-related cirrhotic patients hospitalized to control ascites. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2008;23:1722-7.
 18. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *New England Journal of Medicine*, The 1997;337:1733-45.
 19. Ferrari C, Penna A, DegliAntoni A, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus antigens. An overview. *Journal of Hepatology* 1988;7:21-33.
 20. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *New England Journal of Medicine*, The 1991;324:1699-704.
 21. Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology* 1999;29:976-84.
 22. Wang Y, Chen P, Wu X, Sun AL, Wang H, Zhu YA, et al. A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus. *Journal of virology* 1990;64:3977-81.
 23. Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brchot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999;18:4848-59.
 24. Laskus T, Rakela J, Tong MJ, Nowicki MJ, Mosley JW, Persing DH. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *Journal of Hepatology* 1994;20:837-41.

25. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *Journal of virology* 1996;70:5845-51.
26. Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, et al. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Annals of Internal Medicine* 1995;122:241-8.
27. Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997;233:374-81.
28. Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98:2268-76.
29. Kao J, Chen P, Lai M, Chen D. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-34.
30. Yuan J, Zhou B, Tanaka Y, Kurbanov F, Orito E, Gong Z, et al. Hepatitis B virus (HBV) genotypes/subgenotypes in China: mutations in core promoter and precore/core and their clinical implications. *Journal of clinical virology* 2007;39:87-93.
31. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus research* 2007;127:164-76.
32. Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America 1987;84:6909-13.
33. Gilles PN, Guerrette DL, Ulevitch RJ, Schreiber RD, Chisari FV. HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma. *Hepatology* 1992;16:655-63.
 34. Huang SN, Chisari FV. Strong, sustained hepatocellular proliferation precedes hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic mice. *Hepatology* 1995;21:620-6.
 35. Hagen TM, Huang S, Curnutte J, Fowler P, Martinez V, Wehr CM, et al. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:12808-12.
 36. Meyer M, Caselmann WH, Schlter V, Schreck R, Hofschneider PH, Baeuerle PA. Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO Journal* 1992;11:2991-3001.
 37. Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekul AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *Journal of virology* 1992;66:5284-9.

ABSTRACT

Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with respect to specific preS, basal core promoter mutations of hepatitis B virus

Han Jak Ryu

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed By Associate Professor Sang Hoon Ahn)

Hepatitis B virus (HBV) mutations in preS and basal core promoter (BCP) region are known risk factors for the development of hepatocellular carcinoma through the different mechanisms. To date, however, there has been no report on the clinical characteristics of HCC with regard to these mutations. This study aimed to examine the clinical features and prognosis of HCC with respect to specific preS and BCP mutations of HBV.

Patients with HBV-related HCC were targeted for this study; 126 participants were enrolled and examined between May 1994 and April 2008. The patients were divided according to preS and BCP mutations (23 with

preS mutation, 103 without preS mutation; 82 with BCP mutation, 44 without BCP mutation). After extraction of HBV DNA from serum, amplification and direct sequencing of the preS, BCP region was performed by nested PCR using specific primers. Tumor, node, and metastasis (TNM) staging between the groups was done; the prognosis and characteristics of the tumor were evaluated, including size, number, type, vessel invasion, portal vein thrombosis (PVT), and metastasis.

There was no statistical difference in the baseline characteristics of the HCC group with the preS mutation, compared with the HCC group lacking the preS mutation; median age, proportion of male sex, hepatitis B e antigen (HBeAg) positivity, cirrhosis, median alpha-fetoprotein (AFP) level, and median alanine aminotransferase (ALT) level were 47 vs. 44, 87.0 vs. 82.5%, 17.4 vs. 32.0%, 78.9 vs. 82.2%, 147.7 vs. 401.8 ($P = 0.131$), and 50 vs. 47 ($P = 0.924$), respectively. There were also no differences in the tumor characteristics (i.e., number of tumors, main tumor size, nodular/diffuse tumor type, vessel invasion, PVT, lymph node metastasis, distant metastasis, and TNM stage) and the initial treatment modalities [i.e., an operation, the transcatheter arterial chemoembolization (TACE) procedure, radiation therapy, chemotherapy, and radiofrequency ablation (RFA)] of the groups. On the other hand, the survival rate was less in those with the preS mutation

than in those without it ($P = 0.024$). In the BCP and non-BCP mutation groups, no differences in baseline and tumor characteristics were found. Unlike the preS mutation groups, there was no difference in the survival rate of the BCP and non-BCP groups. PreS positivity, Child class and TNM stage were independent risk factors for survival based on Cox regression analysis (OR = 1.789, 95% CI = 1.039 ~ 3.080, $P = 0.036$).

The preS and BCP mutations of HBV did not affect initial tumor features. However, preS mutation was an independent risk factor affecting HCC survival.

Key words: hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, preS, basal core promoter, mutation, prognosis.