

200400603A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

SARSの感染・発症・重症化の分子機構

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17（2005）年3月

主任研究者

笹月 健彦

目次

I. 総括研究報告書

- SARS の感染・発症・重症化の分子機構 1
笹月 健彦

II. 分担研究報告書

1. アンギオテンシン変換酵素 1 (ACE1) の遺伝的多型と
重症急性呼吸器症候群 (SARS) の重症化の関連 7
糸山 智 他
2. アンギオテンシン変換酵素 2 (angiotensin-converting enzyme 2: ACE2)
遺伝子の多型と重症急性呼吸器症候群 (SARS) との関連解析—新たに同定したエクソンと
一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs) を踏まえて 15
糸山 智 他
3. 活性化マクロファージにおける
Toll like receptor を介した NKG2D リガンドの発現誘導 23
小笠原 康悦
4. 重症急性呼吸器症候群における抗ウイルス蛋白遺伝子多型と疾患感受性研究 29
濱野 栄美 他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

I. 総括研究報告書

SARSの感染・発症・重症化の分子機構

主任研究者

笹月健彦 国立国際医療センター

研究要旨

2003年のSARSアウトブレイクの際に、WHOによるグローバルアラートの最初のきっかけとなった、ベトナム国立バクマイ病院、フレンチ病院、ベトナム国立衛生疫学研究所との共同研究体制を確立し、3度のベトナム訪問を通じて、第一次調査を実施し、合計150人近い患者・接触者の参加協力を得、疫学情報、血液試料を得ることができた。この試料を用いて、SARSの感染・発症・重症化に関連する分子を同定するための、分子遺伝学的研究を実施した。さらにNK細胞の抗ウイルス作用に関する基礎的検討を行った。その結果、SARSの重症化に関連する候補遺伝子として、血管内皮傷害に関連の深いACE遺伝子、インターフェロンにより誘導されて抗ウイルス作用を有することが知られるMxA、さらにSARSウイルス感染と関連する遺伝子として、MxAと同様な宿主側抗ウイルス分子であるOAS1の遺伝子変異がそれぞれSARSとの関連を示した。一方、SARSの宿主側レセプターであるACE2を詳細に検討したが、SARS感染と有意な関連を示すような遺伝子変異は見いだされなかった。ACE, MxA, およびOAS1は、HLA以外の遺伝子で、SARSの発症との関連を示した初めての研究成果となり、SARSに関わる宿主側の抗ウイルス応答が、今後の機能解析により明らかになることが期待される。

A. 研究目的

SARSはわが国では全く未体験な疾患であり、アジア諸国との国際共同研究によってのみ、その真実を解明できるものと思われる。研究面でわが国が主導的役割を果たすことにより、その病態を十分に理解して、近い将来、同様な新興感染症がわが国に侵入する事態に備える必要がある。SARSは高齢者では、致死率が50%を超えており、小児が軽症であるという特徴を有し、この機序は全く解明されていない。これについては、肺の上皮の再生機構の老化に関係しているのではないかという仮説を検証する必要がある。また台湾から報告されたHLAのタイプによって重症化しやすいという仮説、またSARSレセプターとして同定されたACE2の遺伝子変異によって、ウイルスの感染を受けにくい場合が存在するのかどうかといった点は、これらの候補遺伝子の変異検索と、症例対照関連解析によって明らかになるものと予想される。さらに抗体の産生、免疫応答は、かえって生体の過剰反応を引き起こし、重症化を引き起こす

可能性も指摘されており、これらは丹念な疫学調査と血液試料の解析により明らかになるものと予想される。

また、SARSの感染、発症の阻止には免疫系の果たす役割が大きいと考えられる。一般的にウイルス感染の防御には、初期感染時、自然免疫系が効率よく働くことが必須である。現時点では、SARS感染のマウスモデルが確立されていないため、ウイルス感染類似のモデルとしてpoly I:Cを用いて実験系を構築した。

B. 研究方法

2003年のSARSの世界的流行時に、ベトナムにおいてWHOによる当時の認定基準によってSARSと診断された症例は62例であり、そのうち死亡した5例とベトナム人ではない3例を除いた54例のうち、書面による同意を得られた44例が本研究に参加した。SARS患者との接触があったと考えられるがSARSを発症しなかった病院スタッフ103例を接触非発症者と

して登録した。さらに、SARS 患者との接触が全くなかったと考えられる 50 例も対象とした。全ての対象者から EDTA 加末梢血を採取し、凍結、輸送し、血球からゲノム DNA を抽出した。

また、NKG2D リガンドの発現を検討するために、NKG2D-Fc-fusion-protein を作成し、マウスマクロファージを単離、活性化し、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現解析をおこない、定量的 PCR 法による mRNA の発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析に関しては、いずれも三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1) ACE1 の D アリルと SARS 重症度との関連
SARS 群 (SARS cases) 44 症例を低酸素血症の有無で分類した場合、D アリルの頻度が低酸素血症群で有意に高かった。また、ロジスティック解析により、ACE1 の D アリルは年齢、性別、接触の程度とは独立した、SARS による低酸素血症のリスクファクターであることが示された。

2) ACE2 の全長 cDNA クローニング

5' -RACE では肺と気管支で、従来のエクソン 1 より 5' 側に新エクソンを確認した。隼丸では従来のエクソン 1 が 5' 側で 65 bp 長い、新たなエクソン 1 の伸長部分が見いだされた。

3) ACE2 遺伝子の多型スクリーニング

検出された 19 の SNPs のうち 13 の SNPs は今回新規に同定されたものである。そのうちの 1 つは非同義置換であったが、いずれの比較においても遺伝子型頻度とアリル頻度で統計的に有意差を認めなかった。

4) OAS1 遺伝子と SARS 感染との関連

OAS1 遺伝子 exon3 の A/G SNP では G アリル頻度が SARS 患者に有意に高く認められた。ま

た OAS1 遺伝子 exon6 の A/G SNP においても G アリル頻度が高い傾向にあった。

また、血清中の抗 SARS 抗体陽性者を SARS-CoV 感染者として、抗体陰性の接触非感染者と比較しても、OAS1 遺伝子 exon3 および exon6 で G アリル頻度が有意に高かった。この 2 箇所の SNP の間には強い連鎖不平衡が認められた。

5) MxA 遺伝子と SARS 重症度との関連

SARS 患者での解析において経過中に酸素療法を必要とした重症者では、MxA 遺伝子プロモーター領域の -88G/T SNP で、酸素療法が行われた SARS 患者に G アリルが有意に多く認められた。

6) 活性化マクロファージにおける NKG2D リガンドの発現

LPS, Poly I:C 刺激で NKG2D リガンドの一種 RAE-1 の mRNA、表面発現が選択的に誘導された。IFN-gamma 刺激では RAE-1 が発現誘導されず、Poly I:C や LPS は、直接 Toll like Receptor を介して、RAE-1 の発現誘導に関与していることが示唆された。MyD88 欠損マクロファージにおいては、Poly I:C 刺激によっても RAE-1 がほとんど誘導されないことから、Poly I:C 刺激による RAE-1 の発現誘導は、MyD88 を介したシグナルによっておこっていることを証明した。

D. 考案

ベトナムにおける SARS の拡大は、香港からベトナムを訪れた 1 人の旅行者が発症し入院したことから始まっており、入院先の病院で院内感染という形で感染は拡大していった。当初は適切な感染対策が採られていなかったことから、病院スタッフや入院患者は SARS-CoV に対して等しく無防備であったと考えられる。ベトナムの全 SARS 症例のうち、87%は医療スタッフまたは入院患者かその病院を訪れたケースであった。ベトナムの症例は同一ウイルス株に感染したと考えられ、またウイルスの曝露状況も似ており、発症や重症化に与える病原体側

の要素はかなり均一であると思われる。さらに本研究では比較的、集団として均一であるベトナム人のみを対象としており、発症や重症化に関わる宿主側の遺伝的要因の検討には、交絡要因の少ない対象集団であると考えられる。

本研究では重症度を酸素投与の有無によって分類した。SARS 症例に対する酸素投与はベトナムの公式基準に従って行われており、またレントゲン写真における肺炎の広がりによく相関していたことから、酸素投与の有無で重症度を分類したことには妥当性があると考えられる。

SARS 群をこのような基準に基づく重症度で分類し比較したところ、D アリルの頻度は、低酸素血症群において有意に高く、またロジスティック解析によっても独立したリスクファクターであったため、この多型は重症化に関わるものと推測された。

致死的な SARS 症例の肺病理所見は diffuse alveolar damage (DAD) と呼ばれ、その本体は、肺血管内皮と肺胞上皮の傷害と考えられている。ACE の遺伝子型 DD の個体ではその II の個体と比較して、血清 ACE レベルが約 2 倍であり、ACE1 によって変換産生されるアンギオテンシン II は血管収縮作用のほか、血管内皮の傷害、アポトーシスを誘導することが報告されており、ACE1 がこのようなメカニズムで肺の毛細血管傷害、重症化に関与している可能性が考えられる。

HIV-1 感染症における CCR5-Δ32 の例のように、SARS-CoV のレセプターである ACE2 の遺伝的変異が SARS-CoV の感染と発症に影響を与えている可能性を考え、肺から ACE2 の全長 cDNA をクローニングし、変異解析を行った。

初めに、従来報告されてるエクソン 1 より 5' 側に、新たなエクソンと既知のエクソン 1 の伸長部分を確認した。これらのスプライシングパターンには臓器特異性が示唆された。次に、ACE2 の全エクソンのスクリーニングで同定された未登録の SNPs を含めて、症例対照で SNPs の観察頻度に有意差を認めなかった。我々の結

果と香港からの報告とを総合すると、ACE2 遺伝子の多型が SARS の病態に著しい影響を与えている可能性は少ないと思われるが、今回同定した新しいエクソンや新たな遺伝的多型は、今後 ACE2 の発現調節の研究に重要な情報を提供するものと考えられる。

本研究において、IFN 誘導性 OAS1 遺伝子の多型が SARS-CoV に対する感受性あるいは感染後の SARS 発症に関与している可能性が示された。OAS-1 は二本鎖 RNA 存在下で活性化され、アデノシン三リン酸からオリゴアデニル酸を産生する。このオリゴアデニル酸がエンドヌクレアーゼである RNase L を活性化し、RNA を分解することで抗ウイルス活性が示される。OAS-1 遺伝子は 6 つのエクソンからなるが、その mRNA は大きさの異なる 3 つの転写産物 E16・E18・9-2 が知られており、スプライシングが違いにより区別される。E16 は exon5 までを含む転写産物で p40 タンパクに翻訳され、E18 は exon6 を含み p46 タンパクに翻訳される。9-2 は exon6 のスプライスアクセプター部位が E18 と異なっており、フレームが E18 と異なりストップコドンがより下流にあるため、より大きいタンパクをコードする。この 9-2 から翻訳されるタンパクのみが、C 末端側に Bcl-2 homology domain 3 (BH3) を持ち、Bcl-2 ファミリーの抗アポトーシスタンパクと結合することによって、これらの活性を抑制し、間接的にアポトーシスを誘導することが知られている。9-2 蛋白は RNase L 活性化と細胞のアポトーシス誘導との 2 つの機序で抗ウイルス作用を示すと考えられる。

本研究では SARS 患者および SARS-CoV 感染者において OAS1 遺伝子 exon6 A/G SNP に G アリルを持つものが多く認められた。C 型肝炎での研究でもこの SNP で GG genotype を持つものは慢性化率が高いことが報告されており、G アリルが複数のウイルス感染症に対し感受性であると考えられた。この SNP は E18 では 3' 側の非翻訳部位に位置するが、一方 9-2 では 397 位のアルギニンからグリシンへのアミノ

酸置換を伴う変異である。この非同義変異は BH3 ドメインの近傍に位置していることから、9-2 の機能に影響を与える可能性も考えられる。Exon 6 の SNP と連鎖不平衡を示す exon3 の SNP についても、同様の有意差を得た。この SNP は二本鎖 RNA 結合ドメインの近傍に位置しており、162 位のセリンがグリシンに置換される。したがって、少なくとも OAS1 の遺伝子多型が SARS 感染において疾患感受性に影響を与えると考えられた。

MxA 遺伝子プロモーター領域の-88 G/T SNP の解析では、SARS 患者で経過中に酸素療法を必要とした重症者に GG genotype、G アリルを持つものが多く認められた。GG genotype は C 型肝炎に対する IFN 治療の無効患者に多く認められたと報告されており、さらに G アリルでは IFN によって誘導されるプロモーター活性や mRNA 発現量が T アリルより低いことが示されており、SARS の臨床経過に悪影響を及ぼす可能性がある。さらに、これらの変異は、SARS 治療薬の候補として有望視される IFN による治療反応性にも影響を与える可能性がある。

SARS 等の RNA ウイルス感染モデルである poly I:C 刺激によって、活性化マクロファージが、NKG2D リガンドの一つ RAE-1 を発現することが明らかとなった。NKG2D は、NK 細胞の主要な活性化レセプターであり、その欠損により、ウイルス感染が増悪することは、以前から知られている。ウイルス感染において、活性化マクロファージ上に NKG2D リガンドが発現することは、以下の 3 つの可能性を示唆し、興味深い。1. NK 細胞上の NKG2D を介して、NKG2D リガンド発現細胞を直接破壊することで、ウイルス感染細胞の排除に関与している。2. NK 細胞や活性化 T 細胞と NKG2D リガンド発現細胞との相互作用で NKG2D を介して免疫応答の増強に関与している。3. NK 細胞上の NKG2D は NKG2D リガンドとの結合により、二次的に NKG2D の機能不全を誘導して、NK 細胞からの攻撃を逃れる。

E. 結論

3 度のベトナム訪問を通じて、第一次調査を実施し、合計 150 人近い患者・接触者の参加協力を得、疫学情報、血液試料を得ることができた。この試料を用いて、SARS の感染・発症・重症化に関連する分子を同定するための、分子遺伝学的研究を実施した。またウイルス感染に関連した NKG2D リガンドの発現に関する基礎的検討を行った。その結果、SARS の重症化に関連する候補遺伝子として、血管内皮傷害に関連の深い ACE 遺伝子、インターフェロンにより誘導され、抗ウイルス作用を有することが知られる MxA、さらに感染と関連する遺伝子として、MxA と同様な抗ウイルス分子である OAS1 遺伝子多型が SARS との関連を示した。一方、SARS の宿主側レセプターである ACE2 を詳細に検討したが、SARS 感染と有意な関連を示すような遺伝子変異は見いだされなかった。ACE, MxA, および OAS1 は、HLA 以外の遺伝子で、SARS の発症との関連を示した初めての研究成果となった。今後、細胞レベルでの機能解析により、これらの抗ウイルス作用関連分子が、宿主側の自然免疫系、獲得免疫系の抗ウイルス応答にどのような役割を果たすか、検討する予定である。

G. 論文発表 (SARS 研究に直接関わるもののみを記載)

1. Hamano E, Hijikata M, Itoyama S, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T, Keicho N. Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. *Biochem Biophys Res Commun* 329 (4):1234-9, 2005.

2. Itoyama S, Keicho N, Minako Hijikata, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T. Identification of an Alternative 5'-untranslated Exon and new Polymorphisms of Angiotensin-converting Enzyme 2 Gene: Lack of Association With

SARS in the Vietnamese Population. Am J Med Genet, in press.

3. Itoyama S, Keicho N, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Ohashi J, Hijikata M, Matsushita I, Kawana A, Yanai H, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T. ACE1 Polymorphism and Progression of SARS. Biochem Biophys Res Commun 323 (3):1124-1129, 2004.

4. Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phi NC, Ban VV, Ha LD, Long HT, Yanai H, Keicho N, Kirikae T, Sasazuki T, Anderson R. Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam. Am J Trop Med Hyg, in press.

5. Shichijo S, Keicho N, Long HT, Quy T, Phi NC, Ha LD, Ban VV, Itoyama S, Hu C-J, Komatsu N, Kirikae T, Kirikae F, Shirasawa S, Kaji M, Fukuda T, Sata M, Kuratsuji T, Itoh K, Sasazuki T. Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. Tissue Antigens 64 (5):600-607, 2004.

Ⅱ. 分担研究報告書

アンギオテンシン変換酵素1（ACE1）の遺伝的多型と重症急性呼吸器症候群（SARS）の重症化の関連

| | | |
|-------|-----------------|--|
| | 糸山智 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| 分担研究者 | 慶長直人 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | Tran Quy | Bach Mai Hospital |
| | Nguyen Chi Phi | Bach Mai Hospital |
| | Hoang Thuy Long | National Institute of Hygiene and Epidemiology |
| | Le Dang Ha | Institute for Clinical Research in Tropical Medicine |
| | Vo Van Ban | Hanoi-French Hospital |
| | 土方美奈子 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 櫻田紳策 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 松下育美 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 大橋順 | 東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学教室 |
| | 川名明彦 | 国立国際医療センター呼吸器科 |
| | 野内英樹 | 結核予防会結核研究所 |
| | 切替照雄 | 国立国際医療センター研究所感染症制御研究部 |
| | 倉辻忠俊 | 国立国際医療センター研究所 |
| 主任研究者 | 笹月健彦 | 国立国際医療センター |

研究要旨

SARSの発症者のうち一部の患者は予後不良の急性呼吸促迫症候群（ARDS）に発展するが、軽症のまま治癒する患者や不顕性感染者の存在も知られている。ARDSの発症と予後に関しては、ACE1遺伝子のイントロン16にある挿入欠失多型が影響を及ぼしているとの報告がある。今回我々はこのACE1の遺伝的多型とSARSの発症、重症化との関係を日本とベトナムの共同研究により検討した。SARS発症群44人、SARS患者と接触したが発症しなかった接触非発症群103人、非接触非発症群50人を対象とし、さらにSARS発症群を、酸素投与を指標に、低酸素血症群22人、非低酸素血症群22人に分けた。対象者の末梢血よりゲノムを抽出し、PCR法により挿入欠失を検出し、タイピングを行った。解析の結果、非低酸素血症群と比較して低酸素血症群において欠失アリルの頻度が有意に高かった（ $P=0.013$ ）。SARS発症、接触非発症、非接触非発症の群間ではアリルの頻度に差は見られなかった。さらに年齢、性別、SARS患者との接触の程度も、SARSの発症や重症化との関連はなかった。SARSの重症化とACE1の遺伝的多型との関連が示唆された。

We have hypothesized that genetic predisposition influences the progression of SARS. Angiotensin converting enzyme (ACE1) insertion / deletion (I/D) polymorphism was previously reported to show association with the adult respiratory distress syndrome, which is also thought to play a key role in damaging the lung tissues in SARS cases. This time, the polymorphism was genotyped in 44 Vietnamese SARS cases, with 103 healthy controls who had had a contact with the SARS patients and 50 controls without any contact history. SARS cases were divided into either non-hypoxemic or hypoxemic groups. Despite the small sample size, the frequency of the D allele was significantly higher in the hypoxemic group than in the non-hypoxemic group ($p = 0.013$), whereas there was no significant difference between the SARS cases and controls, irrespective of a contact history. ACE1 might be one of the candidate genes that influences the progression of pneumonia in SARS.

A. 研究目的

SARS は SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の感染により発症する新興感染症であり、通常、咳などの呼吸器症状や高熱で発症し、続いて肺炎を引き起こす。さらに重症例では急速に肺炎が進行し呼吸不全に陥り、致死率は約 11%である。この致死的な肺炎の病態は、臨床経過と死亡症例の病理学的所見から、急性呼吸促進症候群 (ARDS) に相当するものと考えられる。

SARS については、病原ウイルスである SARS-CoV に同じように暴露されながら発症しない例から、致死的な肺炎を引き起こす例まで、幅広く、発症や重症化に個人差が存在すると考えられる。一般に、ウイルス性疾患では、ウイルスの病原性の違い、ウイルスの暴露量、感染ルートなどが病態に影響を及ぼすと考えられるが、2002 年から 2003 年にかけての SARS の世界的流行においては、中国広東省を除くと、同一株のウイルスが世界に広がっており、病原性の違いよりも、宿主側に発症と重症化のリスクファクターが存在する可能性が考えられる。疫学的な検討から、高年齢、糖尿病、心疾患が予後不良因子として報告されているが、遺伝的要因については HLA との相関について 2 つの報告があるだけである^{1) 2)}。そこで我々は候補遺伝子として、ARDS の予後と相関があると報告されたことのある ACE1 遺伝子の多型に着目した。

ACE1 は血圧の調節機構の 1 つであるレニン-アンギオテンシン系 (RAS) の重要な構成因子であり、アンギオテンシン I を強力な血管収縮作用があるアンギオテンシン II に変換する酵素である。SARS-CoV のレセプターとして同定された ACE2 も RAS を構成する酵素で、ACE1 と相同性の高いドメインを有しているが、その働きは ACE1 とむしろ拮抗することが多い。ACE1 遺伝子はヒトでは第 17 染色体に存在し、26 のエクソンから構成されている。イントロン 16 に 287bp の Alu 配列の挿入欠失 (Insertion / Deletion : I/D) 変異があり、この多型は、血管内皮の傷害に関連した多くの疾患との関連が知られている。呼吸器疾患では、肺の血管内皮、上皮の広汎な傷害を主徴とする ARDS の予後とこの多型の欠失アリルと間に関連があることが報告されている³⁾。今回、我々はベトナムとの国際共同研究で得られた

血液サンプルと臨床情報を解析し、ACE1 の遺伝的多型と SARS 発症、または重症化との関連を検討した。

B. 方法

2003 年の SARS の世界的流行時に、ベトナムにおいて WHO による当時の認定基準によって SARS と診断された症例は 62 例であり、そのうち死亡した 5 例とベトナム人ではない 3 例を除いた 54 例のうち、書面による同意を得られた 44 例が本研究に参加した。院内感染により SARS 感染が拡大していた時期に、その病院に勤務しており、SARS 患者との接触があったと考えられるが SARS を発症しなかった病院スタッフ 103 例を接触非発症者として登録した。さらに、SARS 患者との接触が全くなかったと考えられる別の病院のスタッフである 50 例も対象とした。全ての対象者から EDTA 加末梢血を採取し、その場で遠心分離によって血球と血漿に分けた後、凍結、輸送し、血球からゲノム DNA を抽出した。

ACE1 の I/D 多型のタイピングには、ミスタイピングを防ぐため、過去に報告された、3 種類のプライマーを用いる PCR 法を用いた⁴⁾。正鎖プライマーを I/D より 5' 側に、相補鎖プライマーを 1 つは I/D より 3' 側に、もう 1 つを挿入配列中に設置し、これら 3 種の PCR プライマーを同時に反応させ、PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により型判定を行った。

性別、年齢、SARS 患者との接触の程度、発症中の酸素吸入の有無などの臨床情報をカルテと対象者本人へのインタビューから得た。また、発症中の胸部レントゲン写真の異常陰影の広がり程度を、2 人の臨床医が独立に評価した。両肺野をそれぞれ上肺野、中肺野、下肺野に 3 分割し、合計 6 肺野のうち、極期に異常陰影が存在する肺野の数をカウントした。

C. 結果

SARS 症例 44 例と接触非発症者 103 例の背景を表 1 に示す。SARS 患者との接触の程度を、直接患者に接したケースを “Direct”、患者に直接は接触していないがその病院に勤務して、間接的に接触する可能性のあったケースを “Indirect” とした。

表 1. 対象の背景

| Characteristics | SARS cases (n=44) | Contacts (n=103) |
|------------------------------|----------------------|---------------------|
| Age (yr), mean [range] | 39.3 [17-76] | 36.5 [15-68] |
| Male / Female | 13 / 31 | 46 / 57 |
| Underlying diseases | | |
| Diabetes mellitus | 0 | 0 |
| Hypertension | 2 | 1 |
| Heart disease | 0 | 0 |
| Lung disease | | |
| COPD | 3 | 2 |
| Bronchial asthma | 0 | 2 |
| Tuberculosis | 1 | 1 |
| Pulmonary embolism | 0 | 1 |
| Contact status | | |
| Direct | 37 | 63 |
| Indirect | 7 | 40 |
| Occupation | | |
| Nurse | 16 | 24 |
| Doctor | 5 | 13 |
| Co-medical staff | 8 | 22 |
| Non-medical staff | 1 | 44 |
| Visitor | 2 | - |
| Inpatient | 2 | - |
| Family or maid of patient | 5 | - |
| Others | 5 | - |

ベトナムにおける SARS 患者への酸素投与は、一律、動脈血酸素分圧 60mmHg 以上または動脈血酸素飽和度 90%以上を保つことが基準とされていたため、酸素を投与されたケースを低酸素血症群 (Hypoxemic group)、投与されなかったケースを非低酸素血症群 (non-hypoxemic group) に分類した (表 2)。低酸素血症群のうち 5 例は重症の呼吸不全のため人工呼吸器を必要とした。

レントゲン写真の異常陰影の広がりについては、2 人の臨床医の独立した評価が統計的に強く相関しており、また異常陰影を示す肺野の数と酸素吸入の有無の間には強い相関があった (表 3)。即ち、酸素吸入の有無は肺炎の程度を反映していた。

SARS 群 (SARS cases) 44 症例、接触非発症群 (Controls with contact) 103 例、非接触群 (Controls without contact) 50 例の、ACE1 I/D のタイピング結果を表 4 に示す。これらの群間では、遺伝子型 (Genotype frequency) とアリル頻度 (Allele frequency) のいずれにおいても有意差は認められなかった。しかしながら、SARS 群を低酸素血症の有無で分類した場合、D アリルの頻度が低酸素血症群で有意に高かった ($p=0.013$) (表 5)。また、ロジスティック解析により、ACE1 の D アリルは年齢、性別、接触の程度とは独立した、低酸素血症のリスクファクターであることが示された (表 6)。

D. 考察

ベトナムにおける SARS の拡大は、香港からベトナムを訪れた 1 人の旅行者が発症し入院したことから始まっており、入院先の病院で院内感染という形で感染は拡大していった。当初は適切な感染対策が採られていなかったことから、病院スタッフや入院患者は SARS-CoV に対して等しく無防備であったと考えられる。ベトナムの全 SARS 症例のうち、87%は医療スタッフまたは入院患者かその病院を訪れたケースであった。ベトナムの症例は同一ウイルス株に感染したと考えられ、またウイルスの曝露状況も似ており、発症や重症化に与える病原体側の要素はかなり均一であると思われる。さらに本研究では比較的、集団として均一であるベトナム人のみを対象としていることから、発症や重症化に関わる宿主側の遺伝的要因の検討には適していたと考えられる。

本研究では重症度を酸素投与の有無によって分類した。SARS 症例に対する酸素投与はベトナムの公式基準に従って行われており、またレントゲン写真における肺炎の広がりによく相関していたことから、

酸素投与の有無で重症度を分類したことには妥当性があると考えられる。ACE1 の I/D 多型は過去の報告を見ると人種間でアリル頻度に差があり、ベトナム人集団は、白人に比べると、日本人の頻度分布に

近かった。また、SARS 群と接触非発症群のアリル頻度の分布は、ベトナム人一般を反映していると思われる非接触群と比較して差はなかった。SARS 群と接触非発症群の間では、遺伝子型頻度もアリル頻度においても有意な差を認めなかったことから、この遺伝的多型は SARS の発症には影響を与えないものと考えられる。しかし、SARS 群を重症度で分類し比較したところ、D アリルの頻度は、低酸素血症群において有意に高く、またロジスティック解析によっても独立したリスクファクターであったため、この多型は重症化に関わるものと推測された。

致死的な SARS 症例の肺病理所見は diffuse alveolar damage (DAD) と呼ばれる状態である。肺毛細血管と肺胸腔の間にある二つの壁である血管内

皮と肺胞上皮の透過性の異常亢進が DAD の発生機序と考えられている。過去の報告では、ACE の遺伝子型 DD の個体ではその II の個体と比較して、血清 ACE レベルが約 2 倍であるとされている⁵⁾。また、ACE1 によって変換産生されるアンギオテンシン II は血管収縮作用以外に、血管内皮のアポトーシスを誘導することなどが報告されている⁶⁾。従って、ACE1 の D アリルは血管内皮の傷害と関連して、DAD、すなわち肺の重症化に関与している可能性が考えられる。

今後はこの遺伝的多型の蛋白発現に影響を与える機序や、ウイルス感染の状態や炎症の場における遺伝的多型の影響を研究することによって、SARS 重症化の機構の一部を明らかにしていきたい。

表 2. 重症度別の患者背景

| Characteristics | SARS cases (n=44) | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------|--|--|
| | Non-hypoxemic group (n=22) | Hypoxemic group | | |
| | | (n=22) | without mechanical ventilation (n=17) | with mechanical ventilation (n=5) |
| Age (yr), mean | 37.7 | 41.0 | 36.8 | 55.4 |
| Male / Female (n) | 6 / 16 | 7 / 15 | 5 / 12 | 2 / 3 |
| Direct / Indirect contact (n) | 19 / 3 | 18 / 4 | 16 / 1 | 2 / 3 |

表3. レントゲン写真の評価と低酸素血症

| number of involved zones | non-hypoxemic group | hypoxemic group |
|--------------------------|---------------------|-----------------|
| | (n=22) | (n=22) |
| One | 14 | 1 |
| Two | 6 | 6 |
| Three | 2 | 2 |
| More than three | 0 | 13 |

表4. 全対象の ACE1 I/D タイピング結果

| | SARS cases (n=44) | Controls | | References: | | | |
|--------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| | | with contact (n=103) | without contact (n=50) | Japanese (n=341) | Chinese (n=102) | Korean (n=135) | British (n=1903) |
| Genotype frequency | | | | | | | |
| DD | 6 (13.6%) | 12 (11.7%) | 3 (6.0%) | 13.1% | 16.7% | 24.4% | 26.1% |
| DI | 17 (38.6%) | 44 (42.7%) | 25 (50.0%) | 40.5% | 47.0% | 43.0% | 49.8% |
| II | 21 (47.8%) | 47 (45.6%) | 22 (44.0%) | 46.3% | 36.3% | 32.6% | 24.1% |
| Allele frequency | | | | | | | |
| D | 0.33 | 0.33 | 0.31 | 0.33 | 0.4 | 0.46 | 0.51 |
| I | 0.67 | 0.67 | 0.69 | 0.67 | 0.6 | 0.54 | 0.49 |

表5. 低酸素血症の有無による比較

| | SARS cases (n=44) | |
|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | Non-hypoxemic group (n=22) | Hypoxemic group (n=22) |
| Genotype frequency | | |
| DD | 1 (4.5%) | 5 (22.7%) |
| DI | 7 (31.8%) | 10 (45.5%) |
| II | 14 (63.6%) | 7 (31.8%) |
| Allele frequency | | |
| D | 0.2 | 0.45 |
| I | 0.8 | 0.55 |

表6. ロジスティック解析

| Variable | Univariate Analysis | |
|-----------------------|-----------------------|---------|
| | odds ratio (95% CI) | p value |
| ACE (No. of D allele) | 3.04 (1.15-8.02) | 0.025 |
| Variable | Multivariate Analysis | |
| | odds ratio (95% CI) | p value |
| ACE (No. of D allele) | 3.04 (1.12-8.25) | 0.029 |
| Age (>60 yr) | 2.12 (0.19-24.1) | 0.546 |
| Female | 1.07 (0.25-4.52) | 0.928 |
| Direct contact | 0.53 (0.09-3.12) | 0.484 |

参考文献

- 1) M.Lin, H.K.Tseng, J.A.Trejaut, H.L.Lee, J.H.Loo, C.C.Chu, P.J.Chen, Y.W.Su, K.H.Lim, Z.U.Tsai, R.Y.Lin, R.S.Lin, C.H.Huang, Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection, BMC. Med. Genet. 4(2003) 9.
- 2) M.H.Ng, K.M.Lau, L.Li, S.H.Cheng, W.Y.Chan, P.K.Hui, B.Zee, C.B.Leung, J.J.Sung, Association of Human-Leukocyte-Antigen Class I (B*0703) and Class II (DRB1*0301) Genotypes with Susceptibility and Resistance to the Development of Severe Acute Respiratory Syndrome, J. Infect. Dis. 190 (2004) 515-8.
- 3) R.P.Marshall, S.Webb, G.J.Bellingan, H.E.Montgomery, B.Chaudhari, R.J.McAnulty, S.E.Humphries, M.R.Hill, G.J.Laurent, Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome, Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 166 (2002) 646-50.
- 4) A.E.Evans, O.Poirier, F.Kee, L.Lecerf, E.McCrum, T.Falconer, J.Crane, D.F.O'Rourke, F.Cambien, Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease, Q. J. Med. 87 (1994) 211-4.
- 5) Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest. 1990 Oct;86(4):1343-6.
- 6) Xu ZH, Shimakura K, Yamamoto T, Wang LM, Mineshita S. Pulmonary edema induced by angiotensin I in rats. Jpn J Pharmacol. 1998 Jan;76(1):51-6

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告書
 アンギオテンシン変換酵素 2 (angiotensin-converting enzyme 2 : ACE2)
 遺伝子の多型と重症急性呼吸器症候群 (SARS) との関連解析
 —新たに同定したエクソンと一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNPs) を踏まえて—

| | | |
|-------|-----------------|--|
| 分担研究者 | 糸山智 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 慶長直人 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 土方美奈子 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | Tran Quy | Bach Mai Hospital |
| | Nguyen Chi Phi | Bach Mai Hospital |
| | Hoang Thuy Long | National Institute of Hygiene and Epidemiology |
| | Le Dang Ha | Institute for Clinical Research in Tropical Medicine |
| | Vo Van Ban | Hanoi-French Hospital |
| | 松下育美 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 櫻田紳策 | 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 |
| | 野内英樹 | 結核予防会結核研究所 |
| | 切替富美子 | 国立国際医療センター研究所感染症制御研究部 |
| | 切替照雄 | 国立国際医療センター研究所感染症制御研究部 |
| | 倉辻忠俊 | 国立国際医療センター研究所 |
| 主任研究者 | 笹月健彦 | 国立国際医療センター |

研究要旨

SARS コロナウイルス (SARS-CoV) のレセプターとしての働きが報告された ACE2 について、その遺伝的多型と SARS-CoV の易感染性や SARS 発症との関連を解析した。ヒトにおいて肺は SARS-CoV の重要な複製部位と考えられるため、まず肺から全長 ACE2 遺伝子をクローニングした。この過程で、データベースに未登録な新たなエクソンを同定した。このエクソンを含めた ACE2 遺伝子のすべてのエクソンとその周辺配列上の多型の有無をベトナム人のサンプルでスクリーニングし、19 の SNPs を同定した。このうちの 13 の SNPs はデータベースに登録されていない新たな SNPs であり、1 つの非同義 SNPs と 3 つの 3' -UTR の SNPs を含むものであった。これらの SNPs の頻度を、ベトナム人で SARS を発症した 44 症例、発症はしなかったが SARS 患者と接触があった人のうち SARS-CoV に対する抗体陽性であった 16 例と抗体陰性であった 87 例、そして SARS 患者との接触がなかった 50 例について、群間で比較したが有意差は見出せなかった。しかしながら、新たなエクソンと新たな SNPs の同定は、今後 ACE2 の発現調節の研究に重要な情報を与えるものと考えられる。

We analyzed genetic variations of ACE2, considering that it might influence susceptibility to SARS-CoV or development of SARS as a functional receptor. By cloning of the full-length cDNA of the ACE2 gene in the lung, where replication occurs on SARS-CoV, it was shown that there are different splicing sites. All exons including the new alternative exon, exon-intron boundaries and the corresponding 5' -flanking region of the gene were investigated and 19 SNPs were found. Out of these, 13 SNPs including one nonsynonymous substitution and three 3' -UTR polymorphisms were newly identified. A case control study involving 44 SARS cases, 16 anti-SARS-CoV antibody-positive contacts, 87 antibody-negative contacts and 50 non-contacts in Viet Nam, failed to obtain any evidence that the ACE2 gene polymorphisms are involved in the disease process in the population. Nevertheless, identification of new 5' -untranslated exon and new SNPs is considered helpful in investigating regulation of ACE2 gene expression in the future.

A. 研究目的

新興感染症である SARS は、病原体として新種のコロナウイルスである SARS-CoV が同定され、その後、宿主側の ACE2 が SARS-CoV のレセプターとして働くことが報告された¹⁾。ウイルスレセプターの多型は、ウイルス感染症の病態において重要な役割を果たしている場合がある。例えば、ケモカインレセプターの1つである CCR5 は human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) の co-receptor として働くが、CCR5- Δ 32 と呼ばれる CCR5 遺伝子の変異アリルは、白人では、8-21% に保有され、HIV-1 の感染に抵抗性を示し、感染後の AIDS 発症を遅らせることが知られている。そこで我々は、SARS-CoV のレセプターである ACE2 の遺伝的変異の同定と、SARS-CoV の感染や SARS 発症との間の関連解析を試みた。

ACE2 は ACE1 と高い相同性が認められ、ACE1 と同様に主に血圧調整に関わるレニンアンジオテンシン系を構成する酵素である。ヒトでは X 染色体に存在し、16 のエクソンから構成される全長約 40 kb の遺伝子である。ヒトについてはこれまで、リンパ腫、心臓左心室、睾丸のそれぞれの組織に由来する cDNA から全長がクローニングされているが、SARS-CoV の複製部位と考えられる肺についてはいまだ全長 cDNA がクローニングされていない。

今回我々は、ヒトの肺組織と気管支由来の total RNA サンプルから ACE2 の全長 cDNA をクローニングした。その過程でデータベースに登録されているエクソン 1 の 5' 側に今まで知られていないエクソンが存在することと、従来のエクソン 1 の 5' 端が既知のデータよりも上流にあることを見出した。そこで、これらの新しいエクソン領域を含めたすべてのエクソンとエクソンの周辺配列の遺伝的多型をスクリーニングし、そこで同定された多型と SARS の関連をベトナム人の検体でケースコントロールスタディにより検討した。

B. 方法

<cDNA クローニング>

ACE2 遺伝子の全長クローニングには、肺組織、気管支から抽出された total RNA、そしてコントロールとして睾丸由来の total RNA を使用した。クローニングは reverse transcription-polymerase chain reaction

(RT-PCR) と、5' -, 3' -rapid amplification of cDNA ends (RACE) を組み合わせて行った。まず、total RNA サンプルを oligo(dT)₁₂₋₁₈ をプライマーを用いて cDNA 合成した。次にこの cDNA から、エクソン 1 の配列上に設定したセンスプライマー RT-PCR-exon1 (5' - CAA AGG CTG ATA AGA GAG AA -3') とエクソン 18 に設定したアンチセンスプライマー RT-PCR-exon18 (5' - GAA CAG AAG TCA AAT CCA GA -3') を用いた PCR で、ACE2 遺伝子の既知の 18 のエクソンを含んだ 2721 bp を増幅した。RACE には市販のキットを使用し、5' -RACE に対する遺伝子配列特異的プライマーセットには ACE2-5' Outer1 (5' -GTG GAT ACA TTT GGG CAA GT -3') と ACE2-5' Inner1 (5' -CCT AGA CTA AAA CCT CCT CA -3') のセット、ACE2-5' Outer2 (5' -GAA GTA AGA AAG CCT CCA CA -3') と ACE2-5' Inner2 (5' -CTC CTG ATC CTC TGT AGC CA -3') のセットを用いた。3' -RACE に対する遺伝子配列特異的プライマーセットには、ACE2-3' Outer (5' -CAA TGA TGC TTT CCG TCT GA -3') と ACE2-3' Inner (5' -ACA CTT GGA CCT CCT AAC CA -3') のセットを用いた。RT-PCR と RACE のそれぞれの方法で増幅された DNA 産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

<新たなエクソン領域の発現と

スプライシングの検討>

5' -RACE により従来のエクソン 1 より 5' 側に新たに同定されたエクソン (新エクソン) と、エクソン 1 が従来の 5' 端よりも上流に伸長した新しいエクソン領域 (新伸長エクソン 1) のスプライシングパターンを検討した。クローニングに使用した市販の total RNA サンプルを、ランダムヘキサマーを用いて cDNA 合成した後、この cDNA を 3 つのセンスプライマー (New-exon (5' - TTC TTA CTT CCA CGT GAC CT-3')、Extended-exon1 (5' -GCT CAG CAG ATT GTT TAC TG-3')、Original-exon1 (5' - ACC CAA GTT CAA AGG CTG AT -3')) のうちの 1 つと、アンチセンスプライマー ACE2-5' Outer1 の組み合わせによる PCR で増幅した。この 3 つのセンスプライマーはそれぞれ、新エクソン、新伸長エクソン 1、従来のエクソン 1 の配列上に設定した (図 1)。加えて、センスプライマー New-exon と新伸長エクソン 1 の配列上に設定したアンチセンスプ

ライマー Extended-exon1-antisens を用いて PCR を行った。これらの増幅産物はアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により検出した。さらに、市販の主要臓器 cDNA パネル、市販のヒト小腸由来の total RNA と、手術検体から得られたヒト気管支上皮の培養細胞由来の total RNA についても同様の方法で検討した。

< ケースコントロールスタディの対象と

ゲノムの抽出 >

2003 年の SARS の世界的流行時に、ベトナムにおいて当時の WHO の SARS 診断基準によって診断された症例は 62 例であり、そのうち死亡した 5 例とベトナム人ではない 3 例を除いた 54 例のうち、書面による同意を得

られた 44 例が本研究にエントリーされた。

院内感染により感染が拡大していた当時、その病院に勤務しており、SARS 患者との接触があったと考えられるが SARS を発症しなかった、そのような病院スタッフ 103 例を接触非発症者としてゲノム解析の対象とした。さらに、SARS 患者との接触がなかったと考えられる別の病院のスタッフである 50 例も対象とした。全ての対象者から EDTA 加末梢血を採取し、遠心分離によって血球と血漿に分け、血球からゲノムを抽出した。

< 抗 SARS-CoV 抗体検査 >

全対象の血清を、市販の ELISA 法による抗体検出キットで検査した。

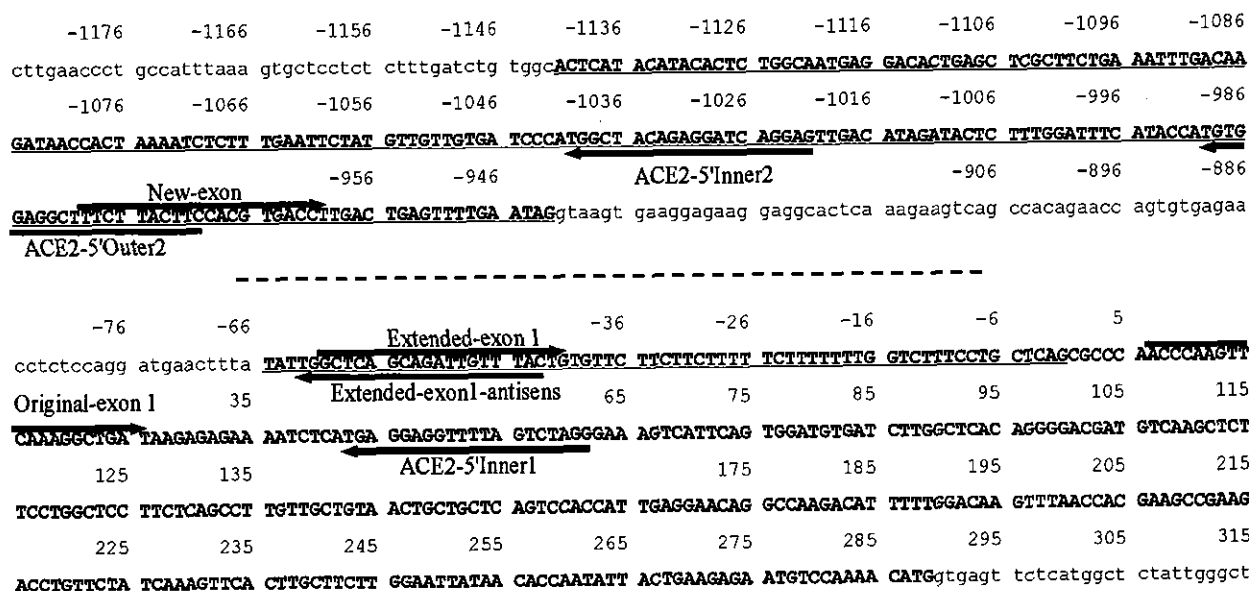


図 1. ACE2 遺伝子の新エクソンと新伸長エクソン 1

新エクソン (-1142 ~ -942) と新伸長エクソン 1 (-65 to -1) をアンダーラインで示す。従来のエクソン 1 はアンダーラインなしの大文字で示す。ACE2-5' Outer1 を除いた、5' -RACE とその後の RT-PCR 解析に使用したプライマーを矢印で示す。中段の点線はイントロンの途中の配列を省略したことを指す。

表 1. ACE2 遺伝子の多型スクリーニングに使用したプライマー

| 増幅領域 | プライマー名 | プライマー塩基配列 (5' → 3') | 増幅産物サイズ |
|--------------------|------------------|-----------------------------|---------|
| 5' flanking region | ACE2-pro-1-sense | TAA TTC AGT CAG TGC TTG C | 676 bp |
| | ACE2-pro-1-anti | AAT AGT GGA GGC ATA GAT AAA | |
| 5' flanking region | ACE2-pro-2-sense | TTT GTG AGC TGC TTT ATT TT | 618 bp |
| | ACE2-pro-2-anti | TGC CAG AGT GTA TGT ATG AG | |
| new alternate exon | ACE2-new-sense | TTA TTG CAA TGT CAC CTG A | 470 bp |
| | ACE2-new-anti | TTA TGA CTA CTC TCC ACT CCA | |

| | | | |
|--------------------|-------------------|-----------------------------|--------|
| 5' flanking region | ACE2-pro-3-sense | TTT GAA TAG GTA AGT GAA GG | 669 bp |
| | ACE2-pro-3-anti | TAG AAC TAG GGA TCA TGA AGA | |
| 5' flanking region | ACE2-pro-4-sense | TGA ATT CCA TAA AGA CAA GG | 653 bp |
| | ACE2-pro-4-anti | AAA CTT GTC CAA AAA TGT CTT | |
| exon1 | ACE2-ex1-sense | ATC TTT AAC AGC TTT CTA GGA | 644 bp |
| | ACE2-ex1-anti | AAC ATC CAA TCT CAC AAC TC | |
| exon2 | ACE2-ex2-sense | AAC TCA TCT ATG TCA CAG CAC | 636 bp |
| | ACE2-ex2-anti | AAA TTA TAT GGA CAC CTT ACC | |
| exon3 | ACE2-ex3-sense | ACT TCT TTG GGT TTT GGT AG | 627 bp |
| | ACE2-ex3-anti | ACA TCA GGT CAT AAA GTG GTT | |
| exon4 | ACE2-ex4-sense | TCA TTT CAG TGG TTT ATT TTC | 521 bp |
| | ACE2-ex4-anti | CTT TTC TTT TTC CCC AGT A | |
| exon5 | ACE2-ex5-sense | CTT GTA TGG TTC TTG TGC TT | 535 bp |
| | ACE2-ex5-anti | GGG CTG TCC TAT TAT TCT CTA | |
| exon6 | ACE2-ex6-sense | ACC TGT GTT CTC CCA AGT A | 568 bp |
| | ACE2-ex6-anti | CTT TAT CAT TTG AAT TGC AG | |
| exon7 | ACE2-ex7-sense | TCA CCA AGT TAA GTA CAC GAA | 562 bp |
| | ACE2-ex7-anti | TAC ACC TGC AAT TCA AGT TAT | |
| exon8 | ACE2-ex8-1-sense | TTG CAG TGA GAA CAT TTG AAA | 560 bp |
| | ACE2-ex8-1-anti | CCT CTG TTG TCT CCC ATT T | |
| exon8 | ACE2-ex8-2-sense | GCT GTG CAG TAG ATC TCA AA | 643 bp |
| | ACE2-ex8-2-anti | CAG ATT GTC CAC AGG TTC A | |
| exon9 | ACE2-ex9-sense | CTA TGA GCA AGA GAA CAG G | 577 bp |
| | ACE2-ex9-anti | TCA CCA GTA GTA ATT TCC AGT | |
| exon10 | ACE2-ex10-sense | AGG GAG GAA ACT GAA ACT AAT | 587 bp |
| | ACE2-ex10-anti | GGT ATC CAA ATG GAG ACT AAA | |
| exon11 | ACE2-ex11-sense | GTG CAC ACC TAT AAA CCA AG | 615 bp |
| | ACE2-ex11-anti | TGA GCA TGT TTA GGG TAG AC | |
| exon12 | ACE2-ex12-sense | GTG AAA GGG CTA TTA ATC TGT | 612 bp |
| | ACE2-ex12-anti | GAG AGG GCT GTA GTT ATG A | |
| exon13 | ACE2-ex13-sense | CAG GAA CCT AGA CCA TAC AA | 636 bp |
| | ACE2-ex13-anti | GTT GCT TTC ACT ATG TCT CA | |
| exon14 | ACE2-ex14-sense | GTA CAA ATT AGG TCA TGG C | 550 bp |
| | ACE2-ex14-anti | GAC GAG AGT CAA TTG AAA G | |
| exon15 | ACE2-ex15-sense | ATT ATT GGG TTT CAT CTC G | 637 bp |
| | ACE2-ex15-anti | TAT AGG TCA ATG AAG GCA G | |
| exon16 | ACE2-ex16-sense | CAG AAC AAA TAG TGC CAA A | 610 bp |
| | ACE2-ex16-anti | CAT AGT GGT AAC TTG CTT GAT | |
| exon17 | ACE2-ex17-sense | GCT CTG TCA CCT AGG CTA G | 633 bp |
| | ACE2-ex17-anti | CTA GGA AGA TGA ACT GCT GAT | |
| exon18 | ACE2-ex18-1-sense | TTA AGA TGA ATC CTA GCA GTG | 655 bp |
| | ACE2-ex18-1-anti | CAT TTA GAT TAT CCC TGA ACA | |
| exon18 | ACE2-ex18-2-sense | TCT GGA TTT GAC TTC TGT TC | 623 bp |
| | ACE2-ex18-2-anti | AAC ACT GTG AGC AAA TAC AAA | |
| exon18 | ACE2-ex18-3-sense | GAA CAG GTA GAG GAC ATT G | 531 bp |
| | ACE2-ex18-3-anti | GGG TAG TGA CTG TGA GAA ATA | |