

<ACE2 遺伝子の多系スクリーニング>

SARS の 44 症例と接触非発症の 103 例からランダムに選んだ約半数のゲノムサンプルを用いて、ACE2 遺伝子の多型スクリーニングを行った。新エクソンと新伸長エクソン 1 を含めたすべてのエクソンとその周辺配列、そして従来のエクソン 1 の 5' 端から上流 2,000 bp を含むように新エクソンの 5' 端から上流 1,000 bp の配列を、PCR 法とダイレクトシーケンス法を用いて検討した。このスクリーニングに使用した PCR プライマーは表 1 に示した。

<ケースコントロールスタディのための全検体のタイピング>

非同義 SNPs と、スクリーニングでマイナーアリの頻度が 0.05 を超えた SNPs について、すべてのサンプルでタイピングを行った。スクリーニングで新たに確認された 1 つの非同義 SNP、データベースに登録されている 2 つの非同義 SNPs (rs4646116、rs11798104)、エクソン 18 の 3' -UTR 領域の 1 つの SNP、イントロン 3 の 1 つの SNP が候補となった。タイピングはダイレクトシーケンス法と、single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法または PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法のいずれかと組み合わせて行った。

<統計解析>

χ^2 乗検定もしくは Fisher's exact test を用いて、p 値 0.05 以下を有意とした。

C. 結果

<ACE2 の全長 cDNA クローニング>

RT-PCR による増幅産物の塩基配列は、エクソン 1 からエクソン 18 までのすべてのエクソンにおいて、報告されている ACE2 の cDNA 配列 (AF241254) と 99%以上一致した。3' -RACE で増幅された塩基配列は、報告されている cDNA 配列と 3' 端まで一致した。5' -RACE では肺と気管支のサンプルで、従来のエクソン 1 より 5' 側に新エクソン (新規登録番号 AB193259)

を確認した。辜丸のサンプルではこの新エクソンは確認されなかったが、従来のエクソン 1 が登録されている塩基配列よりも 5' 側で 65 bp 長かった (新伸長エクソン 1 : 新規登録番号 AB193260)。これらの観察された新エクソンと新伸長エクソン 1、そしてこの観察に使用した遺伝子配列特異的プライマーを図 1 に示す (プライマー ACE2-5' outer1 は除く)。プライマー ACE2-5' Outer1 と ACE2-5' Inner1 による 5' -RACE で、ゲノム配列の従来のエクソン 1 の 5' 端より上流 -1142 から -942 の間の配列が新エクソンとして検出された。新エクソン上に設計したプライマー ACE2-5' Outer2 と ACE2-5' Inner2 を用いた 5' -RACE でも、-1142 よりも上流に伸長することはなかった。

<新しいエクソン領域の臓器別発現傾向>

RT-PCR において、PCR センスプライマー Original-exon1 と PCR アンチセンスプライマー ACE2-5' Outer1 を使用した時、すべての RNA サンプルで増幅産物を認めた。センスプライマーを New-exon に代えた場合も同様にすべてのサンプルで増幅産物を認めた。センスプライマーを Extended-exon1 に代えた場合は、肺と辜丸においてのみ増幅産物を認めた。センスプライマー New-exon とアンチセンスプライマー Extended-exon1-antisens の組み合わせでは、いずれのサンプルでも増幅されなかった。これらの結果は、主要臓器 cDNA パネル、ヒト小腸由来とヒト気管支上皮の培養細胞由来の total RNA についての実験結果と合わせて図 2 に示す。新エクソンは肺や気管支上皮だけでなく、小腸を含めたいくつかのヒトの主要臓器にも発現が確認された。

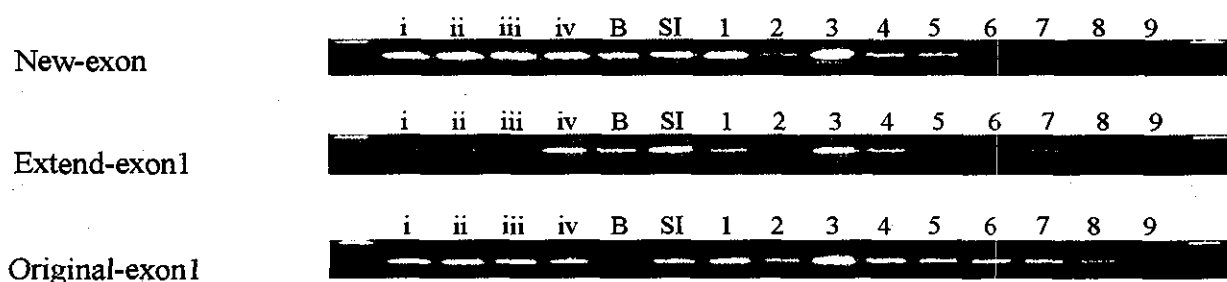


図2. ACE2遺伝子の臓器毎の発現傾向

4%アガロースゲル電気泳動の写真を示す。上段、中段、下段は、RT-PCRのPCRセンスプライマーをNew-exon、Extend-exon1、Original-exon1を使用した結果を示す。各レーンは、i：肺（男性）、ii：肺（女性）、iii：気管支、iv：辜丸、B：気管支上皮培養細胞、SI：小腸、レーン1-9：主要臓器パネルcDNAs；1：placenta, 2：lung, 3：kidney, 4：liver, 5：pancreas, 6：heart, 7：brain, 8：spleen, and 9：skeletal muscle。

<ケースコントロールスタディの対象と抗体検査結果に基づく分類>

サンプルを得られた SARS 44 症例を SARS 群、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 103 例を接触コントロール群、SARS 患者との

接触がなかったと考えられる 50 例を非接触コントロール群とした。接触コントロール群は、抗体検査が陽性であった 16 例を抗体陽性群、陰性であった 87 例を陰性群とした。それぞれの群の年齢と性別を表 2 に示す。

表2. 対象の分類と背景

	SARS 群 (n=44)	接触 コントロール群 (n=103)	抗 SARS-CoV 抗体		非接触 コントロール (n=50)
			陽性 (n=16)	陰性 (n=87)	
			平均年齢 (歳) [範囲]	39.3 [17-76]	
男性 / 女性	13 / 31	46 / 57	7 / 9	39 / 48	17 / 33

^a data not available

<ACE2 遺伝子の多系スクリーニング結果>

スクリーニングによって検出された 19 の SNPs を表 3 に示す。このうち 6 つはデータベースに登録されており、13 の SNPs を今回新たに同定した。さらにそのうちの 1

つは非同義置換であり 638 番目のアスパラギンをセリンに変えるものであった。19 の SNPs のうち、イントロン 3 の SNP とエクソン 18 の 1 つの SNP がマイナーアリの頻度が 0.05 以上であり、他の SNPs は稀な変異であった。

<ケースコントロールスタディのための全検体のタイピング結果>

マイナーアレル頻度が 0.05 以上であったイントロン 3 とエクソン 18 の 2 つの SNPs と、今回新たに同定された非同義 SNP、dbSNP データベースに登録されている 2 つの非同義 SNPs (rs4646116、rs11798104) について、全サンプルでタイピングを行った。データベースに登録されている 2 つの非同義 SNPs は、全検体のタイピングにおいても検出されなかった。他の 3 つの

SNPs の結果を表 4 に示す。ACE2 遺伝子は X 染色体上に存在するため、遺伝子型は性別に解析した。SARS 群と抗体陽性接触コントロールを合わせて SARS-CoV 感染群として抗体陰性接触コントロール群と比較した場合、SARS 群と抗体陽性コントロール群を比較した場合、接触コントロール群と非接触コントロール群を比較した場合、いずれの比較においても遺伝子型頻度とアレル頻度の両方で統計的に有意差を認めなかった。

表 4. ケースコントロールスタディの結果

				接触コントロール群		非接触コントロール
		SARS 群		抗体陽性群	抗体陰性群	
Intron 3 (rs2285666)						
Male	Genotype/allele ^a	A	5 (0.38)	4 (0.57)	21 (0.54)	5 (0.31)
	no. (freq.)	G	8 (0.62)	3 (0.43)	18 (0.46)	11 (0.69)
		total no.	13	7	39	16
Female	Genotype	A/A	12 (0.39)	4 (0.44)	15 (0.31)	11 (0.33)
	no. (freq.)	A/G	16 (0.51)	3 (0.33)	24 (0.50)	17 (0.52)
		G/G	3 (0.10)	2 (0.22)	9 (0.19)	5 (0.15)
		total no.	31	9	48	33
	Allele	A	40 (0.65)	11 (0.61)	54 (0.56)	39 (0.59)
	no. (freq.)	G	22 (0.35)	7 (0.39)	42 (0.44)	27 (0.41)
Exon 15 (N638S)						
Male	Genotype/allele	A	13 (1.00)	7 (1.00)	39 (1.00)	17 (1.00)
	no. (freq.)	G	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
		total no.	13	7	39	17
Female	Genotype	A/A	31 (1.00)	8 (0.89)	47 (0.98)	33 (1.00)
	no. (freq.)	A/G	0 (0.00)	1 (0.11)	1 (0.02)	0 (0.00)
		G/G	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
		total no.	31	9	48	33
	Allele	A	62 (1.00)	17 (0.94)	95 (0.99)	66 (1.00)
	no. (freq.)	G	0 (0.00)	1 (0.06)	1 (0.01)	0 (0.00)
Exon 18 (3'-UTR)						
Male	Genotype/allele	G	12 (0.92)	7 (1.00)	37 (0.95)	17 (1.00)
	no. (freq.)	A	1 (0.08)	0 (0.00)	2 (0.05)	0 (0.00)

		total no.	13	7	39	17
Female	Genotype	G/G	27 (0.87)	8 (0.89)	46 (0.96)	29 (0.88)
	no. (freq.)	A/G	4 (0.13)	1 (0.11)	2 (0.04)	4 (0.12)
		A/A	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
		total no.	31	9	48	33
Allele		G	58 (0.94)	17 (0.94)	94 (0.98)	62 (0.94)
	no. (freq.)	A	4 (0.06)	1 (0.06)	2 (0.02)	4 (0.06)

^a 男性においては、遺伝子型頻度とアリル頻度は同じである。

D. 考察

2003年のSARSの世界的流行時には、約3分の1の症例は軽症であったが、一方では約20%から30%の症例で人工呼吸器を必要とするぐらいに肺炎が重症化し、死亡率は約11%であった。また、非発症者の中に抗SARS-CoV抗体陽性者がいることが報告されており、不顕性感染の存在が予想される。そこで我々は、HIV-1感染症におけるCCR5- Δ 32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た。

ヒトについては肺がSARS-CoVの複製部位の1つと考えられており、我々はまず、肺からACE2の全長cDNAをクローニングした。この過程で、従来のエクソン1より5'側に新たなエクソンを確認し、従来のエクソン1との間のイントロンは、BreathnechとChambonのGT/AGの法則に則っていた。また同時に、エクソン1の5'端が登録されていたデータよりも65bp上流までであることが判明した。今回の検討ではスプライシングの違いによる発現量の比較は行っていないが、得られた結果からはこれらの新しいエクソン領域は臓器によりスプライシングパターンに違いがある可能性が示された。

2004年に香港のグループがACE2遺伝子の多型はSARS感受性に影響を与えないと報告した。しかしながらこの報告では、dbSNPデータベースに登録されているイントロンの多型について検討しているにすぎない。それに対して我々は、クローニングにより肺に発現している新たなエクソンを確認し、この領域を含めた全エクソンのスクリーニングで同定された、未登録のSNPsを含めたすべてのSNPsについて、網羅的に検討を試みた。非翻訳配列のSNPsについては比較的観察頻

度が高いSNPsを選択し、また観察頻度が低くても非同義SNPsはすべてケースコントロールスタディの対象とした。今回の検討では、抗SARS-CoV抗体陽性群と接触非発症抗体陰性群、即ち、ウイルスに曝露した時に感染した群としなかった群の間における比較では、SNPsの観察頻度に有意差を認めなかった。SARS群と接触非発症抗体陽性群、即ち、感染した時の発症した群と非発症群の比較においても同様であった。これらの群は、一般集団と考えられる非接触群との比較においても差は認めなかったことから、遺伝的に偏った集団ではないと考えられる。しかし、今回の検討ではサンプル数が少ないことにより、弱い影響を与える遺伝子変異を検出できていない可能性は否定できない。

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。一方、我々が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。

参考文献

- 1) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450-4.

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

小笠原康悦 国立国際医療センター研究所、難治性疾患研究部、臨床免疫研究室

研究要旨

身体全体に存在しているマクロファージは、感染における自然免疫系に重要な役割を担っており、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染などにおいて、Toll-like receptor (TLR) family を用いて、それら病原体を認識していることが知られている。我々は、病原体モデルの刺激によって、活性化マクロファージが TLR を介して NKG2D リガンドを発現誘導することを明らかにした。活性化マクロファージにおいては、Poly I:C あるいは LPS 刺激によって、NKG2D リガンドの中でも retinoic acid early inducible-1 (RAE-1) が特異的に発現誘導された。さらに、この発現誘導には、TLR シグナルに重要なアダプター分子、MyD88 が関与していることも明らかになった。RAE-1 は、通常のマクロファージでは発現がみられないが、Poly I:C あるいは LPS 刺激によって活性化したマクロファージにおいて細胞表面上に発現されることが判明した。このことは、病原体感染時において、NKG2D を発現している NK 細胞や T 細胞が、RAE-1 を発現している活性化マクロファージと直接相互作用して種々の機能を担っている可能性がある。

Macrophages are distributed throughout the body where they are poised to alert the innate immune systems to infection. Macrophages recognize the presence of infection using the Toll-like receptor (TLR) family of proteins that detect a variety of ligands on bacterial, viral and fungal pathogens. We show that macrophages activated with pathogen products known to signal through TLRs express ligands for the NKG2D receptor. Poly I:C or LPS stimulation up-regulates the mRNA for the retinoic acid early inducible-1 (RAE-1) family of NKG2D ligands, but not for the other known NKG2D ligands in activated macrophages, through the TLR adaptor MyD88. RAE-1 protein is found on the surface of activated, but not resting macrophages. RAE-1-NKG2D interactions may delineate mechanisms by which NK cells and T cells interact with infected macrophages directly during infection.

A. 研究目的

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。自然免疫系で重要な役割を果たすマクロファージや NK 細胞は、ウイルス感染細胞の除去、獲得免疫系の活性化に重要であることが知られているが、その分子機構はよくわかっていない。我々は、SARS 感染において、マクロファージや NK 細胞の果たす役

割を解明することを目的とし、研究を行ってきた。マクロファージは、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染などにおいて、Toll-like receptor (TLR) family を用いて、それら病原体を認識していることが知られている(1)。また、NK 細胞において、主要な活性化レセプターである NKG2D は、サイトメガロウイルス感染において重要な役割を担っていることが報告されている(2)。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、直接的に SARS

ウイルス感染時における NKG2D の役割を解析することは困難である。本年度は、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、マクロファージにおける NKG2D リガンドの発現を検討した。

B. 方法

1) マウスマクロファージの単離と活性化

MyD88 遺伝子欠損マウスは、Dr. A. DeFranco より供与を受けた。C57BL/6 および BALB/c マウスの腹腔内を PBS で洗浄しマクロファージを回収した。回収した腹腔内マクロファージを *in vitro* で 24 時間培養後、浮遊細胞を除去して、接着している細胞のみを残し、これをマクロファージとして実験に供した。これら細胞を RNA ウイルス感染モデルとして広く使われている合成核酸 poly I:C (100 · g/ml)、細菌感染モデルとして LPS (100 ng/ml) および IFN- γ (10 U/ml) で刺激した。刺激 24 時間後、培養細胞を回収し、mRNA の発現と細胞上での NKG2D リガンド (RAE-1 α , β , γ , δ , ϵ H60, MULT1) の発現を検討した。

2) フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現解析

マクロファージ上の Fc レセプターによる標識抗体の非特異的結合を排除するため、Fc レセプターを抗 Fc レセプター抗体 (クローン 2.4G2) で前処理してから、各種標識抗体および Fc-fusion-protein で染色した。NKG2D リガンドの発現を検討するために、NKG2D-Fc-fusion-protein を作成し、実験に供した。NKG2D-Fc-fusion-protein は、マウス NKG2D の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 部分とのキメラタンパク質である。NKG2D-Fc-fusion-protein の結合を検出するために、二次抗体として、PE 標識 goat anti-human Fc 抗体を用いた。さらに、NKG2D リガンドの一つである Retinoic Acid Early inducible-1 (RAE-1) の発現を検出するため、抗 RAE-1 抗体を Dr. J. P. Houchins (R&D systems) より供与いただいた。

3) 定量的 PCR 法による mRNA の発現解析

定量的 PCR 法は、ABI 7700 (Applied Biosystems) を用いて行った。プローブは、fluorochromes (FAM) 或いは、VIC[™] を 5' 末端に標識し、クエンチャーとして TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine)

または minor groove binder (MGB) を 3' 末端に結合させた。プローブの DNA 配列は以下の通りである。VIC-CTT GCC ATT TTC AAA GAG ACG TTT CAG CC-TAMRA (NKG2D), FAM-CCG TGT GGG CGC ATA CAT ACA AAC A-TAMRA (DAP10), FAM-TGC AGA CAG GAA GTT -MGB (RAE-1 α), FAM-ACT GAA GTG AAG AAA T-MGB (RAE-1 β), FAM-CAA CCT GTG AAC GAT-MGB (RAE-1 γ), FAM-CCA GCA GAT GAA G-MGB (RAE-1 δ), VIC-GCC ACT GGC AAA T-MGB (RAE-1 ϵ), VIC-TTG CCT GAT TCT GAG CCT TTT CAT TCT GCT-TAMRA (H60) and FAM-CAA ACT TTG CTT TCC CTG GTT AAG CAG TAC AGC-TAMRA (HPRT). PCR プライマーの DNA 配列は以下の通りである。RAE-1 α ; sense GTGAAACGATTGAAATCTTGATACC, antisense GCTTTTCCTTGGGCTGCTTT, RAE-1 β ; sense AAGTAACAT AAACAAGACCATGACTTCAG, antisense TCCTCAACTTCTGGC ACAATTT, RAE-1 γ ; sense GACGGCAAATGCCACTGAA, antisense CCACTTTGGTGTAGACACCTTGTC, pan-RAE-1; sense CAACTTGACCATCAAGGCTCCTA, antisense GATAAGTATTT CACCCACGAAGCA, HPRT; sense TGG AAA GAA TGT CTT GAT TGT TGA A, antisense AGC TTG CAA CCT TAA CCA TTT TG, H60; sense GAG CCA CCA GCA AGA GCA A, antisense CCA GTA TGG TCC CCA GAT AGC T. Total RNA は DNase I で処理後、first-strand cDNA を random hexamer primer を用いて合成した。Data は Sequence Detector v1.7 Analysis Software を用いて解析した。

C. 結果

1) 活性化マクロファージにおける NKG2D リガンド mRNA の発現

我々はまずはじめに定量的 PCR 法を用いて活性化マクロファージにおける各種 NKG2D リガンドの mRNA の発現を検討した。図 1 で示すように、LPS, Poly I:C 刺激で NKG2D リガンドの一種 RAE-1 が発現誘導されることが明らかとなった。面白いことに、これらの刺激で RAE-1 の発現誘導は認められるものの、H60 や MULT1 といった他の NKG2D リガンドの発現誘導は認められず、LPS あるいは poly I:C の刺激では、RAE-1 が選択的に発現誘導されることが判明した。また、Poly I:C 刺激では、特に RAE-1 α の発現が顕著であった。加えて、IFN- γ 刺激では RAE-1 が発現誘導されないことから、IFN- γ を介した RAE-1 の発現誘導では無く、Poly I:C や LPS が直接 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。

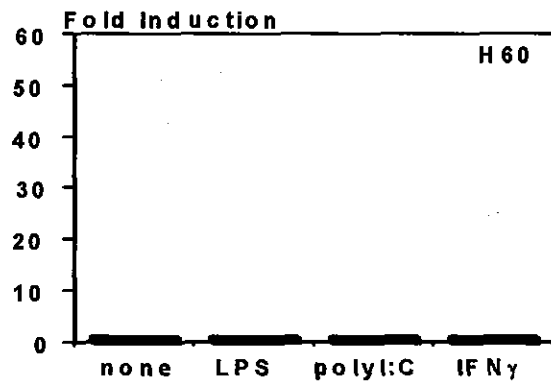
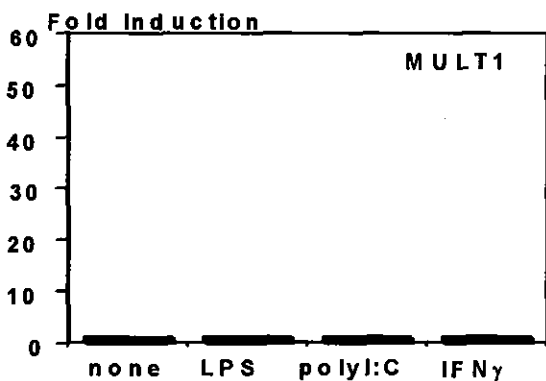
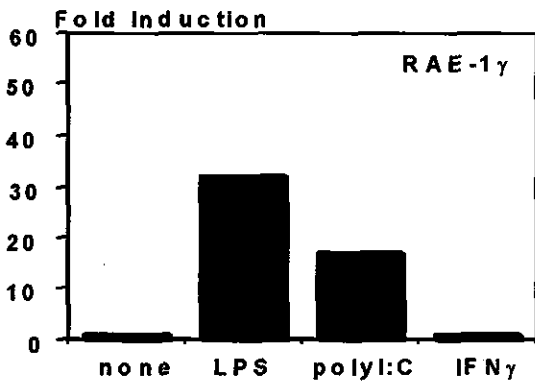
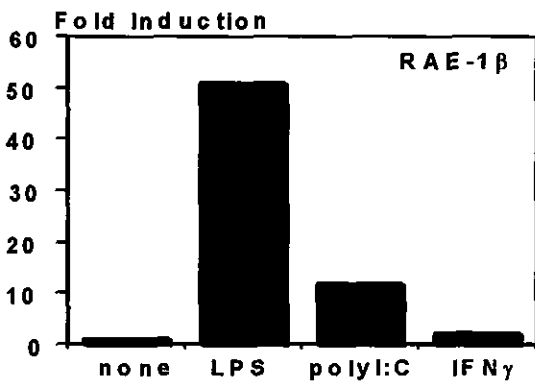
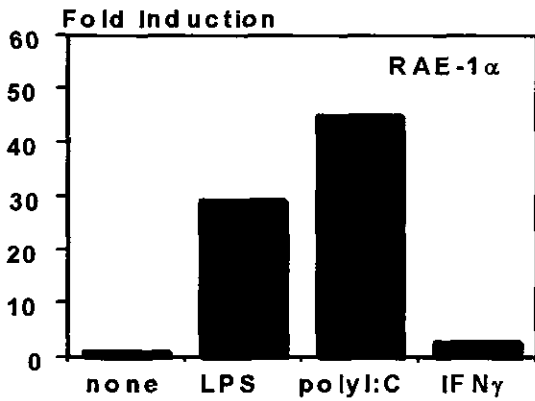
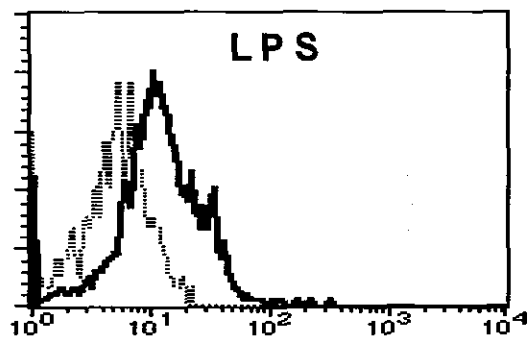
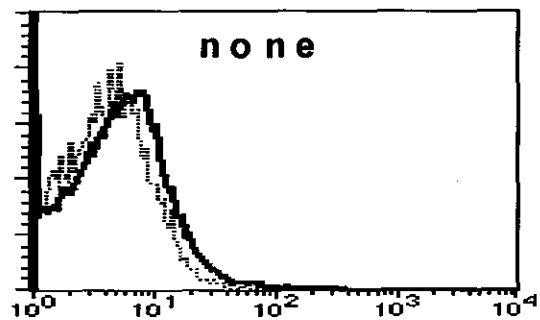


図1 活性化マクロファージにおける NKG2D リガンドの mRNA 発現

2) 活性化マクロファージにおける細胞表面上の RAE-1 の発現

前述の結果より、poly I:C および LPS 刺激で RAE-1 の mRNA の発現が増強することから、活性化マクロファージの細胞表面上にも RAE-1 が発現誘導されることは充分考えられる。そこで、我々は、poly I:C および LPS で刺激した活性化マクロファージの RAE-1 の発現を検討した。



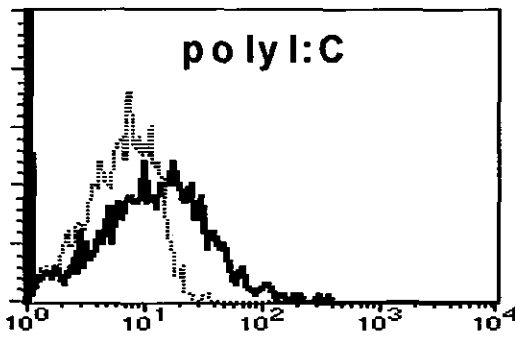


図2 活性化マクロファージにおける細胞表面上のRAE-1の発現

LPSおよびPoly I:C刺激でRAE-1が細胞表面上に発現誘導されることが明らかとなった。

3) MyD88依存性のRAE-1の発現誘導。

前述の結果より、Poly I:CおよびLPSによるNKG2Dリガンドの発現誘導はIFN- γ を介さず、TLRからのシグナルを介して行われていることが示唆された。これまで、poly I:CはTLR3をLPSはTLR4を介してシグナルが伝達されることが報告されている。さらにシグナル分子としてMyD88が重要な役割を担っていることが知られている。そこで、我々は、MyD88を介してNKG2Dリガンドの発現が誘導されているかを検討した。WTにおいては、図1の結果同様、Poly I:CによってRAE-1が発現誘導されるのに対し、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が明らかとなった。従って、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が判明した。

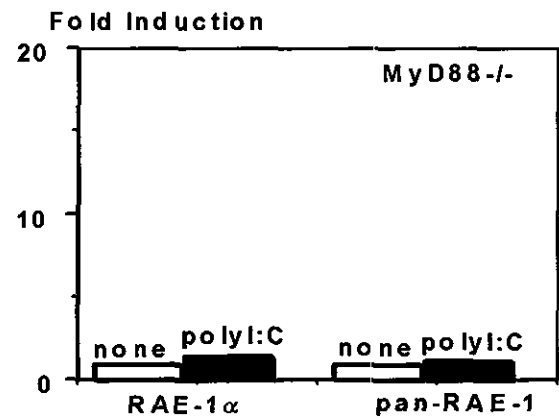
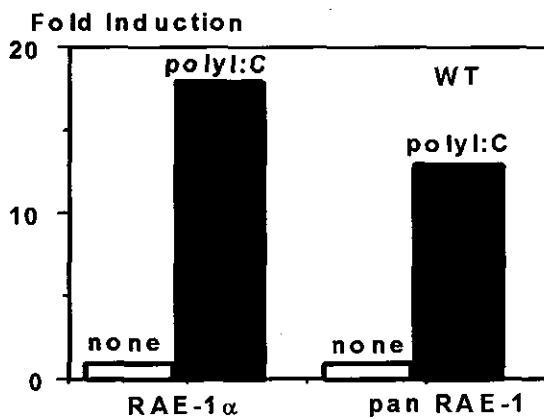


図3 MyD88依存性のRAE-1の発現誘導

加えて、RAE-1の発現誘導は、TNF- α やIFN- α/β の刺激によってもおこらないことも明らかになり(3)、Poly I:C刺激によるRAE-1の発現誘導は、TLR-MyD88を介したものである可能性が高い。

D. 考察

本研究において、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リガンドは通常ではsilentであり、発現がほとんど認められないが、本研究によって、SARS等のRNAウイルス感染時にも発現誘導されることが強く示唆される。NKG2Dは、NK細胞の主要な活性化レセプターであり、NK細胞の欠損で、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つの可能性を示唆する。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、NKG2Dは、co-stimulatory分子として機能していることが知られていることから、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の発現がダウンモジュレーションされ、機能不全を誘導することが知られている(4)。すなわち、ウイルス感染におけるNKG2Dリガンドの発現は、NKG2Dの機能不全を誘導して、NK細胞からの攻撃を逃れるため、ウイルスにとって有用な事象で

ある可能性もある。今後、なぜウイルス感染において、NKG2D リガンドが発現誘導されるのかについて追究していきたいと考えている。

E. 結論

本研究において、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 リガンドは通常では silent であり、発現がほとんど認められないが、本研究によって、SARS 等の RNA ウイルス感染時にも発現誘導されることが強く示唆される。

参考文献

1. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
2. Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA, Arase H, Houchins JP, Mocarski ES, et al. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 2003;197(10):1245-53.
3. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 2004;172(4):2001-5
4. Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, et al. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 2003;18(1):41-51.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Shiratori I, Ogasawara K, Saito T, Lanier LL, Arase H. Activation of innate immunity upon recognition of a novel CD99-like ligand by PILR. *J. Exp. Med.* (2004) 199: (4) 525-533
- 2). Hamerman J.A., Ogasawara K., Lanier L.L. Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. (2004) *J Immunol* 172 (4) : 2001-2005

3). Ogasawara K, Hamerman J. A., Ehrlich L.R., Jordan H., Bluestone J. A., Lanier L.L. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. (2004) *Immunity* 20: 757-767.

2. 学会発表

NK 活性化レセプター NKG2D とそのリガンドの機能と役割
小笠原康悦, Jeffrey A. Bluestone, Lewis L. Lanier
第 3 4 回日本免疫学会総会、学術集会記録、332 項、
2004 年 12 月

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

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

濱野栄美	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
糸山智	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, Viet Nam
Nguyen Chi Phi	Bach Mai Hospital, Viet Nam
Hoang Thuy Long	National Institute of Hygiene and Epidemiology, Viet Nam
Le Dang Ha	Institute for Clinical Research in Tropical Medicine, Viet Nam
Vo Van Ban	Hanoi-French Hospital, Viet Nam
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
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
主任研究者 笹月健彦	国立国際医療センター

研究要旨

I型インターフェロン(IFN)誘導性抗ウイルス遺伝子が重症急性呼吸器症候群(SARS)感染症の自然経過に影響している可能性を想定し、遺伝子多型と感染・発症・重症化の関連解析を行った。44名のベトナム人SARS患者と接触対照者103人を対象に抗ウイルス蛋白遺伝子オリゴアデニル酸合成酵素(*OAS1*)-1、*MxA*、二本鎖RNA依存性蛋白リン酸化酵素(*PKR*)の一塩基多型(SNP)を解析した。*OAS1*遺伝子 exon3 の非同義A/G SNPにおいてGアリルとSARS発症に関連が認められた($p=0.0090$)。*OAS1*遺伝子 exon6 のA/G SNPはこの exon3 の SNP と強い連鎖不平衡にあり、ともにSARSコロナウイルス(SARS-CoV)感染との相関が認められた。SARS患者内の解析において *MxA* 遺伝子プロモーター領域 -88 G/T SNP のGアリルは患者の低酸素状態に対する酸素投与と相関していた($p=0.0195$)。これらの結果からIFN誘導性抗ウイルス蛋白遺伝子 *OAS1* と *MxA* はSARSにおける疾患感受性と重症化に影響を与えている可能性が示唆された。

We hypothesized that host antiviral genes induced by type I interferons (IFNs) might affect the natural course of severe acute respiratory syndrome (SARS). We analyzed single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (*OAS1*), myxovirus resistance-A (*MxA*) and double-stranded RNA-dependent protein kinase (*PKR*) in 44 Vietnamese SARS patients and 103 controls. The G-allele of nonsynonymous A/G SNP in exon 3 of *OAS1* gene showed association with SARS ($p=0.0090$). The G-allele in exon 3 of *OAS1* and the one in exon 6 were in strong linkage disequilibrium and it was found that both of them were associated with SARS coronavirus (SARS-CoV) infection. The G-allele of G/T SNP at position -88 in the *MxA* gene promoter showed a relationship with SARS that was accompanied by hypoxemia ($p=0.0195$). Our findings suggest that polymorphisms of two IFN-inducible genes *OAS1* and *MxA* might affect susceptibility to the disease and progression of SARS at each level.

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群(SARS)は2002年秋ころから2003年春にかけて、アジアを中心に北米・ヨーロッパでの流行が認められた新興感染症である。原因は新型ウイルスであるSARSコロナウイルス(SARS-CoV)であることが判明した。現在再流行を認めてはいないが、流行時には呼吸器症状をはじめとする重篤な症状を引き起こしており、死亡率9.4%という統計がWHOより示された(1)。SARSにおける重症化の宿主側危険因子として、高齢・糖尿病をはじめとする合併症の存在が報告されているが(2,3)、宿主側の遺伝素因に関してはHLA多型(4,5)とアンジオテンシン転換酵素1遺伝子のI/D多型(6)以外にSARS発症や進展に相関を示すものは、現時点では報告されていない。

一般的に、ウイルス感染に対する自然免疫としてI型IFNが感染初期から誘導され、OAS1, MxA, PKRなどを含む様々な細胞内抗ウイルス蛋白の産生を誘導する(7)。SARS感染時の*in vivo*での内因性I型IFNの産生に関して詳細な報告はないが、I型IFNの投与によりSARS-CoVの複製が抑制されることが培養細胞実験及び動物実験の結果、最近報告されている(8-14)。SARS-CoV感染におけるI型IFNの役割を解明することにより、SARS発症の機序を理解し治療に対する新たな知見を得ることができると思われる。従来、ウイルス感染に対するI型IFNの働きについては特にC型ウイルス性肝炎の分野で多数報告されている。MxA遺伝子プロモーター領域のSNPがC型肝炎患者に対するIFN治療の予後と関連しているとの報告があり、またMxA, OAS, PKR遺伝子のSNPがC型肝炎の慢性化と関連があるとの報告もある(15-17)。これらはI型IFN誘導性抗ウイルス蛋白遺伝子がIFN治療のみならず、C型肝炎の自然経過にも関連していることを示している。

本研究ではSARS感染・発症・重症化に関与する宿主側の遺伝要因として、IFN誘導性抗ウイルス蛋白遺伝子について、それらのSNP頻度の偏りをベトナム人SARS患者を対象に解析した。

B. 方法

ベトナム人SARS患者44例、接触対照者として患

者収容病院職員の非発症者103例、およびベトナム人非接触対照者50例を対象として解析を行った。SARSの診断は全例がWHOの臨床診断基準を満たしていた。

血清中の抗SARSコロナウイルス(SARS-CoV)抗体値は、接触対照者103例中16例が陽性であった。SARS患者において低酸素血症に対する酸素治療の有無は胸部単純写真所見上の肺病変の広がりとは相関があり重症度の指標と考えられることが当施設の研究で示されたが(6)、今回の解析ではSARS群44例中22例で酸素療法が行われていた。

IFN誘導性遺伝子では、MxA遺伝子のプロモーター領域-88 G/T SNP、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素(OAS)-1遺伝子 exon6 のA/G SNP、二本鎖RNA依存性性蛋白リン酸化酵素(PKR)プロモーター領域-168 A/C SNPにおいてウイルス感染症の予後とSNPの関連が報告されており、これらについてPCR-RFLP法を用いてgenotypeを決定した。また、OAS遺伝子については、J-SNPデータベースに登録されている exon3 の非同義A/G SNPについても同様に解析を行った。各genotypeとSARSの発症・重症化との関連について、 χ^2 乗検定を行い解析した。

本研究は、ベトナム保健省および当センターの倫理委員会の承認を受けて行われ、対象者に対しては書面による説明と同意の取得が行われた。

C. 結果

OAS1遺伝子 exon3 のA/G SNPではGG genotypeまたはAG genotypeがSARS患者に多く認められた($p=0.0178$)、Gアレル頻度が有意に高く認められた($p=0.0090$)。OAS1遺伝子 exon6 のA/G SNPにおいてもGアレル頻度が高い傾向にあった($p=0.0542$) (表1)。

血清中の抗SARS抗体陽性者をSARS-CoV感染者と考え、接触対照者中の抗体陽性者16名とSARS発症者44名をあわせてSARS-CoV感染者として、抗体陰性の接触非感染者87名と比較したところ、OAS1遺伝子 exon3 および exon6 でGアレル頻度が有意に高かった($p=0.0156$, $p=0.0176$) (表2)。この2箇所のSNPは強い連鎖不平衡が認められた($D'=0.931$, $r^2=0.530$)。

MxA 遺伝子と *PKR* 遺伝子の SNP は SARS 発症に相関は認められなかった (表 1)。しかし、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 GG genotype を持つものの割合が多く認められた ($p=0.0346$) (表 3)。*MxA* 遺伝子のこの SNP において、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 ($p=0.0195$)。

表 1 : SARS 患者群と接触対照群の比較

		SARS 患者群 (n=44)		対照群 (n=103)		p value
<i>OAS1</i> exon 6	AA	18 (40.9%)	60 (58.3%)			
	AG	21 (47.7%)	36 (35.0%)			
	GG	5 (11.4%)	7 (6.7%)			
	A allele	0.65	0.76			
	G allele	0.35	0.24			
<i>OAS1</i> exon 3	AA	9 (20.5%)	42 (40.8%)			0.0178
	AG	24 (54.5%)	48 (46.6%)			
	GG	11 (25.0%)	13 (12.6%)			
	A allele	0.48	0.64			
	G allele	0.52	0.36			
<i>MxA</i> -88	GG	23 (52.3%)	43 (41.7%)			0.2400
	GT	16 (36.4%)	52 (50.5%)			
	TT	5 (11.3%)	8 (7.8%)			
	G allele	0.70	0.67			
	T allele	0.30	0.33			
<i>PKR</i>	CC	18 (41.9%)	49 (47.6%)			0.5278
	CT	22 (51.2%)	46 (44.9%)			
	TT	3 (7.0%)	8 (7.8%)			
	C allele	0.67	0.70			
	T allele	0.33	0.30			

表 2 : SARS 感染者群と非感染者群の比較

		感染者群 (n=60)		非感染者群 (n=87)		p value
<i>OAS1</i> exon 6	AA	25 (41.7%)	53 (60.9%)			
	AG	28 (46.7%)	29 (33.3%)			
	GG	7 (11.7%)	5 (5.7%)			
	A allele	0.65	0.76			
	G allele	0.35	0.24			
<i>OAS1</i> exon 3	AA	14 (23.3%)	37 (42.5%)			0.0183
	AG	33 (55.0%)	39 (44.8%)			
	GG	13 (21.7%)	11 (12.6%)			
	A allele	0.51	0.65			
	G allele	0.49	0.35			

表 3 : SARS 感染者群における重症度別比較

		低酸素血症あり (n=22)		低酸素血症なし (n=22)		p value
<i>MxA</i> -88	GG	8 (36.4%)	15 (68.2%)			
	GT	10 (45.4%)	6 (27.3%)			
	TT	4 (18.2%)	1 (4.5%)			
	G allele	0.59	0.82			
	T allele	0.41	0.18			

D. 考案

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。*OAS1* 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。*OAS1* 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、それぞれ後方 2 つのエクソンでの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 を含む p46 タンパクに翻訳される (19-21)。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 (20) (図 1)。

OAS1 の構造

- *OAS1* 遺伝子から splicing の異なる 3 種の mRNA が転写されることが知られており、全て 2'-5' OAS 酵素活性がある。
- 9-2 transcript から翻訳される p48 蛋白のみ BH3 が存在し、apoptosis を誘導する機能がある。

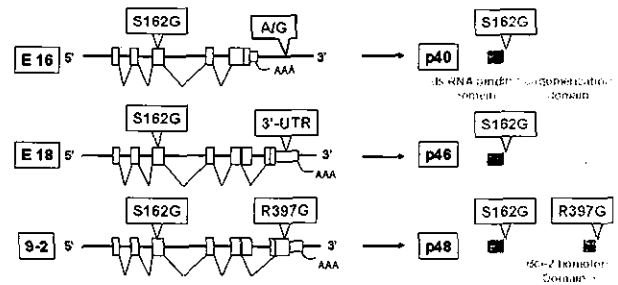


図 1 : *OAS1* から転写される 3 つの転写産物

この 9-2 から翻訳されるタンパクは 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アポトーシスを誘導する (20)。すなわち、9-2 のように BH3 ドメインのみを有する単 BH3 タンパクのサブグループは、抗アポトーシスタンパク Bcl-2 や BclxL と結合してその抗アポトーシス作用を阻害することで、結果としてアポトーシスを促進することが示されている (22)。このことから 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活性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(17)、G アリルがウイルス感染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。本研究では *OAS1* 遺伝子 exon3 の A/G SNP についても解析を行った。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。この SNP でも SARS 患者および感染者に G アリルが多く認められた。この exon3 と exon6 の SNP は強い連鎖不平衡が認められていることから、どちらの変異が疾患感受性に寄与しているかは今回の研究では特定できず、OAS の量や機能に変化をもたらすような未知の変異が連鎖して存在する可能性も否定できないが、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、プロモーター活性は T アリルに比較して G アリルでは低い事が示されている (23)。また、末梢血単核球に IFN を投与した実験で GG genotype は GT genotype や TT genotype と比較して *MxA* mRNA の発現が低いことも示された (24)。一方、Vero 細胞に *MxA* を強制発現させ SARS-CoV を感染させた実験では、SARS-CoV の増殖が抑制されないことが報告され、報告者は SARS-CoV に対する IFN の効果は *MxA* を介したものではないと結論した (25)。本研究で-88G/T の多型は SARS に対する疾患感受性に関連は認められなかった。これらの知見から、*MxA* は SARS-CoV に対して強いウイルス抑制効果はないが、*MxA* の発現低下は SARS の臨床経過に悪影響を及ぼす可能性があると考えられた。SARS の再興が認められた場合、IFN 治療が有望と考えられている。

E. 結論

今回の結果から、最も IFN 治療に反応が期待できるのは *OAS1* 遺伝子 exon3 の A/G SNP に AA genotype

を持つものであると推測された。

本研究において、IFN 誘導性 *OAS1* 遺伝子多型が SARS-CoV 感染と SARS 発症に、また *MxA* 遺伝子多型が疾患の重症化に相関していることが示された。

参考文献

- [1] World Health Organization (2003), Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS), WHO/ CDS/ CSR/ GAR/ 2003.11, Geneva.
- [2] C. M. Booth, L. M. Matukas, G. A. Tomlinson, A. R. Rachlis, D. B. Rose, H. A. Dwosh, S. L. Walmsley, T. Mazzulli, M. Avendano, P. Derkach, I. E. Ephtimios, I. Kitai, B. D. Mederski, S. B. Shadowitz, W. L. Gold, L. A. Hawryluck, E. Rea, J. S. Chenkin, D. W. Cescon, S. M. Poutanen, A. S. Detsky, Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area, *Jama*.289 (2003) 2801-2809.
- [3] J. W. Chan, C. K. Ng, Y. H. Chan, T. Y. Mok, S. Lee, S. Y. Chu, W. L. Law, M. P. Lee, P. C. Li, Short term outcome and risk factors for adverse clinical outcomes in adults with severe acute respiratory syndrome (SARS), *Thorax*.58 (2003) 686-689.
- [4] 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.
- [5] 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) 515-518.
- [6] S. Itoyama, N. Keicho, T. Quy, N. C. Phi, H. T. Long, D. Ha le, V. V. Ban, J. Ohashi, M. Hijikata, I. Matsushita, A. Kawana, H. Yanai, T.

- Kirikae, T. Kuratsuji, T. Sasazuki, ACE1 polymorphism and progression of SARS, *Biochem Biophys Res Commun.* 323 (2004) 1124-1129.
- [7] C. E. Samuel, Antiviral actions of interferons, *Clin Microbiol Rev.* 14 (2001) 778-809.
- [8] B. L. Haagmans, T. Kuiken, B. E. Martina, R. A. Fouchier, G. F. Rimmelzwaan, G. van Amerongen, D. van Riel, T. de Jong, S. Itamura, K. H. Chan, M. Tashiro, A. D. Osterhaus, Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques, *Nat Med.* 10 (2004) 290-29.
- [9] J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, H. W. Doerr, Treatment of SARS with human interferons, *Lancet.* 362 (2003) 293-294.
- [10] L. E. Hensley, L. E. Fritz, P. B. Jahrling, C. L. Karp, J. W. Huggins, T. W. Geisbert, Interferon-beta 1a and SARS coronavirus replication, *Emerg Infect Dis.* 10 (2004) 317-319.
- [11] U. Stroher, A. DiCaro, Y. Li, J. E. Strong, F. Aoki, F. Plummer, S. M. Jones, H. Feldmann, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus is inhibited by interferon- alpha, *J Infect Dis.* 189 (2004) 1164-1167.
- [12] E. L. Tan, E. E. Ooi, C. Y. Lin, H. C. Tan, A. E. Ling, B. Lim, L. W. Stanton, Inhibition of SARS coronavirus infection in vitro with clinically approved antiviral drugs, *Emerg Infect Dis.* 10 (2004) 581-586.
- [13] B. Zheng, M. L. He, K. L. Wong, C. T. Lum, L. L. Poon, Y. Peng, Y. Guan, M. C. Lin, H. F. Kung, Potent inhibition of SARS-associated coronavirus (SCOV) infection and replication by type I interferons (IFN-alpha/beta) but not by type II interferon (IFN-gamma), *J Interferon Cytokine Res.* 24 (2004) 388-390.
- [14] B. Sainz, Jr., E. C. Mossel, C. J. Peters, R. F. Garry, Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV), *Virology.* 329 (2004) 11-17.
- [15] M. Hijikata, Y. Ohta, S. Mishiro, Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon, *Intervirology.* 43 (2000) 124-127.
- [16] F. Suzuki, Y. Arase, Y. Suzuki, A. Tsubota, N. Akuta, T. Hosaka, T. Someya, M. Kobayashi, S. Saitoh, K. Ikeda, M. Matsuda, K. Takagi, J. Satoh, H. Kumada, Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection, *J Viral Hepat.* 11 (2004) 271-276.
- [17] S. Knapp, L. J. Yee, A. J. Frodsham, B. J. Hennig, S. Hellier, L. Zhang, M. Wright, M. Chiramonte, M. Graves, H. C. Thomas, A. V. Hill, M. R. Thursz, Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR, *Genes Immun.* 4 (2003) 411-419.
- [18] P. Benech, Y. Mory, M. Revel, J. Chebath, Structure of two forms of the interferon-induced (2'-5') oligo A synthetase of human cells based on cDNAs and gene sequences, *Embo J.* 4 (1985) 2249-2256.
- [19] D. Rebouillat, A. G. Hovanessian, The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties, *J Interferon Cytokine Res.* 19 (1999) 295-308.
- [20] A. Ghosh, S. N. Sarkar, T. M. Rowe, G. C. Sen, A specific isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase is a dual function proapoptotic protein of the Bcl-2 family, *J Biol Chem.* 276 (2001) 25447-25455.
- [21] S. K. Ghosh, J. Kusari, S. K. Bandyopadhyay, H. Samanta, R. Kumar, G. C. Sen, Cloning, sequencing, and expression of two murine 2'-5'-oligoadenylate synthetases.

Structure-function relationships, *J Biol Chem.* 266 (1991) 15293-15299.

[22] JT Opferman, SJ Korsmeyer. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immun.* 4 (2003) 410-415.

[23] M. Hijikata, S. Mishiro, C. Miyamoto, Y. Furuichi, M. Hashimoto, Y. Ohta, Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro, *Intervirology.* 44 (2001) 379-382.

[24] N. Fernandez-Arcas, A. Blanco, M. J. Gaitan, M. Nyqvist, A. Alonso, A. Reyes-Engel, Differential transcriptional expression of the polymorphic myxovirus resistance protein A in response to interferon-alpha treatment, *Pharmacogenetics.* 14 (2004) 189-193.

[25] M. Spiegel, A. Pichlmair, E. Muhlberger, O. Haller, F. Weber, The antiviral effect of interferon-beta against SARS-coronavirus is not mediated by MxA protein, *J Clin Virol.* 30 (2004) 211-213.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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
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
Shiratori I, Ogasawara K, Saito T, Lanier LL, Arase H.	Activation of innate immunity upon recognition of a novel CD99-like ligand by PILR.	J. Exp. Med.	199	525-532	2004
Hamerman J.A., Ogasawara K., Lanier L.L	Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor.	J Immunol	172	2001-2005	2004
Ogasawara K., Hamerman J. A., Ehrlich L.R., Jordan H., Bluestone J. A., Lanier L. L	NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice.	Immunity	20	757-767	2004

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
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
Miyashita R, Tsuchiya N, Hiikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Biji M, Kallenberg C, Hashimoto H, Yabe T, and Tokunaga K	Molecular genetic analyses on human NKG2C (KLRC2) gene deletion.	Int. Immunol.	16(1)	163-168	2004
Bannai M, Higuchi K, Akesaka T, Furukawa M, Yamaoka M, Sato K, and Tokunaga K	Single-nucleotide- polymorphism genotyping for whole- genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy.	Analy. Biochem.	327(2)	215-221	2004
Doi K, Doi H, Noiri E, Nakao A, Fujita T, and Tokunaga K	High-throughput single nucleotide polymorphism typing by fluorescent single- strand conformation polymorphism analysis with capillary electrophoresis.	Electrophor esis.	25(6)	833-838	2004

Nakajima T, Wooding S, Sakagami T, Emi M, Tokunaga K, Tamiya G, Ishigami T, Umemura S, Munkhbat B, Jin F, Guan-jun J, Hayasaka I, Ishida T, Saito N, Pavelka K, Lalouel JM, Jorde L, and Inoue I	Natural selection and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 complete AGT sequences in worldwide chromosomes.	Am. J. Hum. Genet.	74(5)	898-916	2004
Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looaresseuwan S, Clark AG, and Tokunaga K	Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection.	Am. J. Hum. Genet.	74(6)	1198-1208	2004
Sato-Takeda M, Ihn H, Ohashi J, Tsuchiya N, Ishikawa Y, Satake M, Arita H, Tamaki K, Hanaoka K, Tokunaga K, and Yabe T	The human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) haplotype is associated with the onset of postherpetic neuralgia after herpes zoster.	Pain	110	329-336	2004
Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno N.T, Kobata T, Takahashi K, and Tokunaga K	Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiatio n in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells.	J. Immunol.	173(9)	5801-5809	2004
Hananantachai H, Patarapotikul J, Ohashi J, Naka I, Looareesuwan S, and Tokunaga K	Polymorphisms of HLA-B and HLA-DRB1 genes in Thai malaria patients.	Jpn. J. Infect. Dis.	58(1)	25-28	2005

Satoh M, Takamiya Y, Oka S, Tokunaga K, and Takiguchi M	Identification and characterization of HIV-1-specific CD8+ T cell epitopes presented by HLA-A*2601.	Vaccine				in press
大木秀一、徳永勝士	ゲノム情報の活用-ヒトゲノム疫学の視点から.	現代医療	36(5)	99-103		2004
徳永勝士	ヒトゲノム研究で変わる医療	母子保健情報	第49号	113-116		2004
土井研人、徳永勝士	ポストシーケンス時代に医療はどう変わるか？ -オーダーメイド医療の実現-	遺伝9月号	58(5)	85-88		2004
徳永勝士	DNA多型とヒトゲノム多様性.	DNA多型	vol. 12	1-6		2004