

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17年度 総括・分担研究報告書

平成18（2006）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

1. ベトナムにおける Mannose-Binding Lectin の遺伝的多型と SARS coronavirus 感染の関連	5
土方 美奈子 他	
2. アンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme : ACE) の遺伝的多型が ACE の発現量に与える影響と、重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome :SARS) との関連	9
糸山 智 他	
3. ベトナムにおける L-SIGN の遺伝的多型と SARS 重症化の関連	13
糸山 智 他	
4. ベトナムにおける HLA と SARS の関連	17
糸山 智 他	
5. 活性化マクロファージにおける SARS RNA による炎症性サイトカインの発現誘導	21
小笠原 康悦	
6. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) と SP-B 遺伝子多型の関連性について	25
大河内 雅子 他	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------	----

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により、合計197人の患者・接触者の参加協力を得、疫学情報、血液試料を得たが、平成16年度より、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てきた。また本年度は、さらに、SARS RNAによる炎症性サイトカインの発現誘導についても検討した。これまでの分子遺伝学的検討により、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発揮するMxA、OAS1の遺伝子変異がSARSとの関連を示し、それらの遺伝子変異は機能的意義を有することを実験的に明らかにすることができた。HLAについては、ベトナム人集団では、これまで報告されていない、アリルとの関連が認められた。一方、SARSの宿主側レセプターとして報告されたACE2とLSIGN、病原体の免疫系細胞への接着の際に重要な分子として知られるMBL、肺の界面活性物質で、急性肺傷害との関連が指摘されているSP-Bについては、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。SARSの病態に関わる分子が次第に明らかになってきた。宿主側の抗ウイルス応答の特異性が、さらに今後の解析により明らかになるものと期待される。

A. 研究目的

2003年以降、SARSは、実験室レベルの過誤を除き、自然発生していないため、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。また、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、肺の上皮細胞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。

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。

これらの点を踏まえて、分子遺伝学的、免疫学的な検討を行い、SARSの感染・発症・重症化の分子機構を明らかにすることを目的に検討を行った。

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、SARS全塩基配列より、GU richの領域を選び出し、マクロファージ細胞株に導入し、TNFの産生を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト検体を用いた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) SARS重症度と関連するACE1のDアリルの機能的意義

昨年までの報告により、SARS群では、低酸素血症群（中等度から重症群）でDアリルの保有頻度が有意に高く、ロジスティック解析によっても、ACE1のDアリルは年齢、性別、接触の程度とは独立した、リスクファクターであることが示されたが、本年度、このDアリルの機能的意味を、ヒト気管支上皮細胞、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、ヒト白血球において、RT-PCR-RFLP法を用いて検討したところ、ACE遺伝子多型のD/Iヘテロの個体由来のmRNAの発現量全体に対するDアリル由来mRNAの発現量D/(D+I)は、いずれも0.5以上であり、Iアリル由来mRNAの発現量より、有意に高く、また、白血球の0.61に対して、気管支上皮細胞は0.77、血管内皮細胞は0.79とさらに高かった。

2) HLA遺伝子とSARS感染との関連

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1遺伝子型を遺伝子タイピングして、SARS患者群と接触非発症者群、非接触対照群とをそれぞれ比較したところ、いずれの比較においても、DRB1*12のアリル頻度がSARS患者群で有

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 A*, 136 (1): 52-7, 2005.

3. 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*, 73 (1): 17-25, 2005.

II. 分担研究報告書

ベトナムにおける Mannose-Binding Lectin の遺伝的多型と SARS coronavirus 感染の関連

分担研究者	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
	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
	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
	糸山 智	国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部
	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
	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
	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 (現所属 国立成育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

重症急性呼吸器症候群(severe acute respiratory syndrome: SARS)は SARS coronavirus (SARS-CoV)の感染により発症する。SARS-CoV 感染に関連する宿主側因子の研究がいくつかある中で、自然免疫で重要な役割を担う mannose-binding lectin (MBL)の遺伝的多型との関連が香港と北京から報告されている。今回、我々はこの MBL の遺伝的多型と SARS-CoV 感染の関連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、さらに接触非発症群を血漿中の抗 SARS-CoV 抗体の有無により、感染非発症者 16 人と非感染者 87 人に分けた。対象者の末梢血よりゲノムを抽出し、PCR-RFLP 法によりタイピングを行った。解析の結果、ベトナムでは SARS-CoV 感染者の数が限られているためか有意差は得られなかったものの、血清中の MBL 濃度が低くなる事が知られている遺伝子型を有するものが SARS-CoV 感染者群では非感染者群より多い傾向が見られた。今後、MBL の血中濃度の測定が必要と思われた。

Mannose-binding lectin (MBL) is one of the key molecules in innate immunity and MBL gene polymorphisms have been associated with increased susceptibility to some pathogens including SARS-CoV. We assessed whether MBL gene polymorphisms were associated with SARS-CoV infection in Vietnamese population. The polymorphisms were 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. Controls with contact history were divided into anti-SARS CoV-antibody-positive and -negative groups. Presumably due to the small sample size, the frequency of the genotypes associated with low serum levels of MBL was not significantly higher in the SARS-CoV infected group than in the non-infected group. However, determination of serum MBL concentration deserves further investigation.

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群(severe acute respiratory syndrome: SARS) は SARS coronavirus (SARS-CoV)の感染により発症する新興感染症である。SARS-CoV 感染に関連する宿主因子の研究が各国で行われているが、その中で最近 mannose-binding lectin (MBL)遺伝子(*mbl2*)の多型との関連が香港のグループ 1)、北京のグループ 2)から相次いで報告された。また、その後の香港の別のグループからの報告では 3)、症例数がやや少ないためか関連はなかったとされた。

MBLはコレクチン(collectin)のひとつであり、肝臓で合成され、血中に分泌される。MBLはCa⁺⁺要求性の糖認識領域(carbohydrate recognition domains: CRDs)を介して病原体表面の糖鎖に結合した後に、(1)直接的に病原体の感染を阻止、(2)MBP-associated serine protease (MASP)-1,-2の活性化を通して補体系の活性化(レクチン経路)を引き起こし、病原体を溶解させる、あるいは、(3)オプソニンとして働くことにより貪食細胞への取り込みを増強、という3つの方法で病原体の感染抑制に働き、自然免疫を担う重要な分子である。ヒトの血中 MBLは、3分子がN端側のシステインでS-S結合でつながった上に、コラーゲン様領域(グリシンが3つ目ごとに繰り返されるトリプレット配列)で3重ヘリックス構造をつくり、さらにネック領域で束ねられてできる構造基本単位が、さらにN端側で束ねられて多様なホモポリマーを形成し、C端側のCRDsが花のようにクラスターを形成した所謂「花束型」と呼ばれる構造となる。

MBLの一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)とMBLの血中濃度 4)、および様々な感染症との関連は良く研究されており、アジアではコドン 54のアミノ酸がグリシンからアスパラギン酸に変異するために正常なコラーゲン様構造がとれずオリゴマーを形成できない B variant、プロモーターの-221がGからCに変異して発現量が低下する X variant の二つが主に血中の MBL濃度低下の原因であり、各種感染症と関連するとされている。香港からの報告 1)では、コドン 54の変異である B のキャリアが SARS と関連しており、北京からの報告 2)でも同様の結果が得られている。

今回、我々はベトナムとの国際共同研究で得られた血液検体と臨床情報を解析し、MBLの遺伝的多型と SARS-CoV 感染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。

全対象の血漿を、市販のELISA法で抗SARS-CoV抗体の測定を行ったところ、103例の接触非発症者は、16例の抗体陽性者と87例の抗体陰性者に分かれたため、抗体陽性者はSAR-CoVに感染したが発症しなかったと判断し、SARS患者44例と併せてSAR-CoV感染者群(60例)、抗体陰性者は接触があったがSARS-CoVに感染しなかったSAR-CoV非感染者群(87例)として扱った。

アジア人においては、MBLのプロモーター領域の-550G/C, -221T/C +4C/T (それぞれH/L, Y/X, P/Q variants と呼ばれる)、エクソン1の230G/A (A/B, codon54)が主要なSNPsであり、ハプロタイプはHYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYPBの5種類に限定されて例外は非常に稀であることが既に知られている。LYPBを有する場合は正常なオリゴマーを形成できないために血中MBL濃度は著しく低くなり、また、LXPAは正常な分子構造のMBLを形成するものの、血中MBL濃度はHYPA, LYPA, LYQAと比較して低いことが知られている。よって、今回のベトナム人を対象とする検討では、Y/XとA/Bの2カ所のSNPsの遺伝子型をPCR-RFLP(polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism)法で決定することとした。

PCR プライマーとして MBLs (5'- ACC TGG GTT TCC ACT CAT TCT CAT -3') と MBLas (5'- CCC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG -3')を用いて Y/X と A/B の 2カ所の SNPs 位置を含む 623bp をゲノムから増幅し、増幅産物を制限酵素 *BtgI* で消化した後にアガロースゲル電気泳動を行うと Y は 540bp と 83bp に切断されるのに対し X は切断されずに 623bp のままであることを利用して、Y/X の遺伝子型判定を行った。また同様に、PCR 増幅産物を制限酵素 *Ban I* で消化すると、A は切断されずに 623bp のままであるのに対し B は 536bp と 87bp に切断されることを利用して、アガロースゲル電気泳動で A/B の遺伝子型判定を行った。

C. 結果

SARS 症例 44 例、接触非発症者 103 例、非接触者 50 例で得られた結果を表 1 に示す。また SARS-CoV 感染者 60 例と非感染者 87 例で得られた結果を表 2 に示す。いずれも、有意差はなかった。

表 1 SARS 症例・接触非発症コントロール・非接触コントロール群における MBL の遺伝子型とアリル頻度

	SARS cases (n=44)	Controls	
		with contact (n=103)	without contact (n=50)
<i>MBL genotype</i>			
<i>YA/YA</i>	19 (43.2%)	31 (30.1%)	19 (38.0%)
<i>YA/XA</i>	12 (27.3%)	39 (37.9%)	11 (22.0%)
<i>YA/YB</i>	6 (13.6%)	23 (22.3%)	11 (22.0%)
<i>XA/XA</i>	3 (6.8%)	4 (3.9%)	4 (8.0%)
<i>XA/YB</i>	3 (6.8%)	5 (4.9%)	5 (10.0%)
<i>YB/YB</i>	1 (2.3%)	1 (1.0%)	0 (0%)
<i>MBL haplotype</i>			
<i>YA</i>	0.64	0.60	0.60
<i>XA</i>	0.24	0.25	0.24
<i>YB</i>	0.13	0.15	0.16

表 2 SARS-CoV 感染者と非感染者における MBL の遺伝子型とアリル頻度

	SARS-CoV	
	Infected (n=60)	Uninfected (n=87)
<i>MBL genotype</i>		
<i>YA/YA</i>	23 (38.3%)	27 (31.0%)
<i>YA/XA</i>	19 (31.6%)	32 (36.8%)
<i>YA/YB</i>	9 (15.0%)	20 (23.0%)
<i>XA/XA</i>	4 (6.7%)	3 (3.4%)
<i>XA/YB</i>	4 (6.7%)	4 (4.6%)
<i>YB/YB</i>	1 (1.7%)	1 (1.1%)
<i>MBL haplotype</i>		
<i>YA</i>	0.62	0.61
<i>XA</i>	0.26	0.24
<i>YB</i>	0.13	0.15

D. 考察

ベトナム人において *MBL* の B アリルの頻度は、0.12 という報告 5) と 0.125 という報告 6) があり、今回の我々の検討の結果とほぼ同じであり、また香港 1) の 0.13、北京 2) の 0.135 という結果とも同等である。一方、ベトナム人での X アリルの頻度は報告がなく、我々の検討が初めてであるが、約 0.25 という結果は、香港 1) の 0.2、北京 2) の 0.14 という結果と比較してやや頻度が高いと思われる。

我々の検討では、B アリル、X アリルともに SARS 発症、SARS 感染との関連は認められなかった。しかし、香港の報告 1) の SARS 症例 569 例、コントロール 1188 例、北京の報告 2) の SARS 症例 352 例、コントロール 392 例、香港の報告 3) の SARS 症例 179 例、コントロール 200 例 (いずれもコントロールは一般集団) と比較して、今回我々が対象としたベトナム人 SARS 患者・感染者は数が非常に少ないことから、*MBL* の遺伝的多型と SARS の関連を否定するものでもない。

しかし、血中 *MBL* の濃度が極端に低いことが予想される *YB/YB*、*XA/XA*、*XA/YB* という遺伝子型を有するものをまとめると、SARS 症例で 7 例 (15.9%) に対し接触非発症コントロールで 10 例 (9.7%)、SARS-CoV 感染者で 9 例 (15.0%) 対し非感染者で 8 例 (9.2%) と、SARS 症例でも SARS-CoV

感染者でもその割合が高い傾向がみられる。ベトナム人では他のアジア人と比較してプロモーター変異である X アリルの頻度が高く、ベトナム人集団で *MBL* の遺伝子型と *MBL* の血中濃度の関連を調べた報告はまだない。よって、今後、今回対象とした症例の血漿中の *MBL* 濃度を実際に測定して、*MBL* 遺伝子型との関連を調べるとともに、SARS 発症や SARS-CoV 感染と *MBL* 濃度との関連を検討する必要があると思われた。

hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102-6.

参考文献

- 1) Ip WK, Chan KH, Law HK, Tso GH, Kong EK, Wong WH, To YF, Yung RW, Chow EY, Au KL, Chan EY, Lim W, Jensenius JC, Turner MW, Peiris JS, Lau YL. Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect Dis.* 2005 May 15;191(10):1697-704.
- 2) Zhang H, Zhou G, Zhi L, Yang H, Zhai Y, Dong X, Zhang X, Gao X, Zhu Y, He F. Association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect Dis.* 2005 Oct 15;192(8):1355-61.
- 3) Yuan FF, Tanner J, Chan PK, Biffin S, Dyer WB, Geczy AF, Tang JW, Hui DS, Sung JJ, Sullivan JS. Influence of FcγRIIA and MBL polymorphisms on severe acute respiratory syndrome. *Tissue Antigens.* 2005 Oct;66(4):291-6.
- 4) Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* 1995 Sep 15;155(6):3013-20.
- 5) Song le H, Binh VQ, Duy DN, Juliger S, Bock TC, Luty AJ, Kremsner PG, Kun JF. Mannose-binding lectin gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. *Mutat Res.* 2003 Jan 28;522(1-2):119-25.
- 6) Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A. Susceptibility to dengue

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（Angiotensin Converting Enzyme : ACE）の遺伝的多型が ACE の発現量に与える影響と、重症急性呼吸器症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome : SARS）との関連

分担研究者	糸山智 慶長直人 土方美奈子 櫻田紳策 松下育美 大橋順	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 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
主任研究者	笹月健彦	国立国際医療センター

研究要旨

前年度に、ベトナムの SARS 患者集団において非低酸素血症群と比較して低酸素血症群では、ACE 遺伝子の Deletion / Insertion (D/I) 多型の D アリルの頻度が有意に高いことを報告した。D アリルが ACE の高発現型であり、それに続くアンギオテンシン II の作用の増強を介して、SARS 重症化に影響を与えるという仮説を支持するものであった。今年度は、この仮説の一部を検証する目的に、D/I 多型がヘテロ接合体である、培養ヒト気管支上皮細胞 (HBEC) 45 サンプル、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 6 サンプル、ヒト白血球 (WBC) 3 サンプルを使用して、サンプルから抽出した total RNA の中に含まれる、ACE の mRNA の発現量全体に対する、D/I 多型についての D アリル由来 mRNA の発現量比 D/(D+I) を、RT-PCR-RFLP 法により測定した。D アリルの発現量比の平均は、WBC の 0.61 に対して、HBEC は 0.77、HUVEC は 0.79 と明らかに高かった。気管支上皮や血管内皮といった局所においても、D アリルが ACE の高発現型であり、D/I 多型の ACE 発現に与える影響が、構成的に内皮、上皮といった炎症の場において大きいことが示唆された。

英文抄録

Last year, we reported that the D allele of the deletion / insertion (D/I) polymorphism on the ACE gene was associated with the severity of SARS. Our hypothesis is that the D allele causes higher expression of ACE and then higher amount of angiotensin-II (AT-II) formed by the ACE D allele leads to severe inflammation of the lung in SARS. This year, using RT-PCR-RFLP method, we compared the ACE mRNA expression from the D allele with that from I allele in human bronchial epithelial cells (HBEC), in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and in human white blood cells (WBC) from DI heterozygotes. On average, the proportion of D-derived mRNA expression were 0.77 in HBEC and 0.79 in HUVEC, which were higher than 0.61 in WBC. These data suggest that the D allele leads to higher expression of the ACE especially in epithelium and endothelium, the sites of inflammation caused by SARS.

A. 研究目的

前年度に我々は、SARS の重症化に ACE の遺伝的多型が影響を与えている可能性を報告した。ACE 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 (Renin-Angiotensin System : RAS) の構成因子であり、アンギオテンシン I をアンギオテンシン II (Angiotensin-II : AT-II) に変換する酵素である。この AT-II には血圧調節機構の一員としての血管収縮作用以外に、血管透過性や炎症細胞の浸潤を亢進するサイトカイン用の作用があることが、近年明らかにされつつある。血管透過性の亢進や炎症細胞の浸潤という現象は、重症化した SARS 患者の肺の

病態である急性呼吸促迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome : ARDS) の発症機序の一部でもある。また、ACE 遺伝子にはイントロン 16 に 287bp の欠失挿入 (Deletion / Insertion : D/I) 多型があり、この多型の遺伝子型 DD の個体群は II の個体群と比較して、末梢血液中の ACE の濃度が有意に高いことから、D アリルは ACE の高発現型と考えられる。以上のことから、我々は ACE 遺伝子の D/I 多型の D アリルは、ACE の高発現とそれに続く AT-II のサイトカイン用作用の増強を介して、SARS 重症化の危険因子となるという仮説を立て、ベトナム人のサンプルを用いて検討したところ、SARS 非低酸素血症群

と比較して低酸素血症群において、この多型の D アリルの頻度が有意に高いことが示された¹⁾。このことは RAS が SARS の重症化に関与する可能性と、RAS の個体差が SARS の重症度に影響を与える可能性を示唆し、その機序として上記の仮説を支持するものであった。

今年度はこの結果を受けて、RAS の個体差が重症度に影響を与える機序の一部を明らかにするために、D/I 多型が細胞レベルの ACE の発現に与える影響を検討した。

ACE には、somatic ACE と germinal ACE の 2 つの isoform がある。前者は主に肺や腎臓の血管内皮細胞に細胞膜結合型蛋白として発現し、血圧や腎機能の調節に関与している。後者は睾丸に発現し、生殖機能に関与していると考えられている。また、血液にも膜結合型 ACE が細胞膜から遊離した分泌型 ACE が存在するが、血液中の ACE 濃度はサルコイドーシスなどの一部の肺疾患の病勢を反映するものの、血圧や血液中の AT-II 濃度との相関はなく、生理的な意義は明らかではない。

近年、全身を循環する RAS とは独立した組織レベルの RAS の存在と生理的意義、そして疾患への関与が研究されている。ACE が血管内皮細胞に高発現している肺においても、ARDS を含めた疾患における組織レベルの RAS の関与が検討されている。また、ACE 遺伝子の D/I 多型と末梢血液中の ACE 濃度との相関はよく知られているものの、組織レベルの ACE の発現量との関連は明らかにされていない。SARS 重症化の病態にとっては、肺の炎症の場である血管内皮や気道上皮に存在している ACE や AT-II がむしろ重要であると考えられる。そこで今回は、D/I 多型が細胞レベルの ACE の発現に与える影響を検討した。

B. 方法

ACE 遺伝子 D/I 多型ヘテロ接合体の細胞において、ACE の mRNA の発現量全体に対する、D/I 多型の D アリル由来 mRNA の発現量比を測定した。この検討には、培養ヒト気管支上皮細胞 (human bronchial epithelial cells : HBEC)、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC)、ヒト白血球 (human white blood cells : WBC) より抽出した total RNA を使用した。

HBEC は、国立国際医療センターの倫理委員会で承認された研究計画に従い、同センター呼吸器外科の協力と患者の同意の下で、手術により切除された肺から採取し培養し、DNA は passage 1 細胞から抽出し、total RNA は passage 1 と 2 の細胞から抽出した。HUVEC は独立した個体から得られた市販の 12 サンプルを培養した。DNA と total RNA の抽出は、HBEC と同じ条件と方法で行った。WBC については、健康人ボランティア 10 名から末梢血を採取し、total RNA と DNA を抽出した。全てのサンプルについて抽出した DNA を用いて、前年度の報告と同じ方法により ACE

遺伝子の D/I 多型のタイピングを行い、遺伝子型が DI ヘテロ接合体と判定されたサンプルについて、以下の測定を行った。

この測定は過去の報告²⁾の実験系を一部改変した reverse transcription (RT)- polymerase chain reaction (PCR)- restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法で行った。イントロン 16 に存在する D/I 多型の各々のアリル由来の mRNA の識別に、D/I 多型とほぼ完全な連鎖不平衡の関係にあるエクソン 15 に存在する A/G の single-nucleotide polymorphism (SNP) (rs4331) を指標とした。D アリルは SNP の A、I アリルは SNP の G と連鎖不平衡である。プライマーに random hexamer を使った RT により、total RNA から cDNA を合成した。続く PCR には、エクソン 15 の塩基配列上で A/G SNP よりも 5' 側に設計された正鎖プライマーと、エクソン 17 上に設計した、HEX 蛍光色素で標識した相補鎖プライマーを使用した。PCR 産物の RFLP には、A/G SNP において G を含む配列を消化し、A を含む配列は消化しない制限酵素 *Hae* II を使用した。A を含む配列の PCR 増幅産物は 242 bp、G を含む配列の PCR 増幅産物は制限酵素消化により、蛍光色素標識プライマー側の 133 bp と、蛍光標識のない 5' 側の 109 bp となる。RFLP 後の PCR 増幅産物は polyacrylamide gel electrophoresis により展開し、イメージアナライザーを用いてバンドを検出して、各アリル由来の PCR 増幅産物の蛍光度を測定した。

C. 結果

抽出した DNA の ACE 遺伝子 D/I 多型のタイピングの結果、遺伝子型が DI ヘテロ接合体は、HBEC 100 サンプルのうち 49 サンプル、HUVEC 12 サンプルのうち 6 サンプル、WBC 10 サンプルのうち 3 サンプルであった。

RT-PCR-RFLP-PAGE の結果において、242 bp のバンドの蛍光量は DNA の D アリル由来の mRNA の発現量に対応するので「D」として、133 bp のバンドの蛍光量は I アリル由来に対応するので「I」として、ACE の mRNA の発現量全体に対する D アリル由来 mRNA の発現量比を D/(D+I) として算出した。その結果、HBEC の 9 サンプルと HUVEC の 1 サンプルで発現量比が突出して高かった。原因として RFLP の消化不足の可能性が考えられた。これらのサンプルについては *Hae* II とは逆に、SNP (rs4331) の A を含む配列の PCR 産物を消化して、G を含む配列の PCR 産物は消化しない制限酵素 *Bst*AP1 を用いて同様の RFLP-PAGE を行った。HBEC の 5 サンプルと HUVEC の 1 サンプルでは発現量比 D/(D+I) が突出して高くなる傾向が再現されたが、それ以外の HBEC の 4 サンプルについては傾向が再現できなかったため、この 4 サンプルは集計から除外した。

D アリル由来の mRNA の発現量比が突出して高いことが確認できた HBEC の 5 サンプルと HUVEC の 1 サンプル

プルを含めた結果では、サンプル群の発現量比の平均が HBEC は 0.77、HUVEC は 0.79、WBC は 0.61 であった (図 1)。WBC の結果は過去の報告²⁾ に近似するものであり、それに対して HBEC や HUVEC の結果は明らかに発現量比が高かった。発現量比が突出して高いサンプルは、D/I 多型以外の影響がある可能性があるため、これらを除外して集計したが、この場合もそれぞれの平均は HBEC が 0.75、HUVEC が 0.76、WBC が 0.61 であり、WBC と比較して HBEC と HUVEC では発現量比が高くなった。

D. 考察

ACE 遺伝子 D/I 多型ヘテロ接合体細胞のアリル特異的 mRNA 発現量比の検討に用いたこの実験系は、同一条件の細胞集団の mRNA の発現量比を測定するので、mRNA の転写に与える影響として、アリルの違い以外の細胞の要素や培養条件が一定である。すなわち、ACE 遺伝子アリル特異的 mRNA 発現量の違いは、D/I 多型を含めたアリル自体の機能の違いをきわめて正確に反映すると考えられる。

今回の WBC における D アリル特異的 mRNA の発現量比は、過去の報告²⁾ に近似し、それに対して、HBEC と HUVEC の発現量比は明らかに高かった。ACE 遺伝子 D/I 多型の ACE 発現に与える影響が、気管支上皮や血管内皮といった局所において、これまで以上に考えられていた以上に大きい可能性が示された。すなわち、ACE 活性の個体差は、構成的に内皮、上皮といった炎症の場においてより大きく、D アリルを有する場合は ACE のより高い発現を介して ARDS に関与し

ていることが示唆される。

2004 年の我々の報告¹⁾ の後、ACE 遺伝子 D/I 多型と SARS の重症度の関連について、香港の患者と対象集団で検討されたが、この報告では関連は否定的であった³⁾。しかし別の報告によると、マウスの急性肺傷害モデルで、ACE 遺伝子がノックアウトされたマウスでは肺炎の程度が軽減し、ACE2 遺伝子がノックアウトされたマウスでは重症化し、さらにこの重症化は AT-II のレセプターの阻害薬により抑制された⁴⁾。また、SARS の病原体である SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の spike 蛋白による刺激は、ウイルスレセプターである ACE2 の発現量を低下させ、肺炎が重症化した。そして、この重症化も AT-II レセプターの阻害薬により抑制された⁵⁾。即ちマウスでは、RAS において ACE と ACE2 のアンバランスが生じた場合に、それらによって量の調節がされている AT-II が、そのレセプターを介して、肺炎の重症化に影響を与えることが示された。また、ウイルスレセプターとしての ACE2 は SARS-CoV と結合した時、RAS の一員として AT-II の量に影響を与えることにより SARS の急性肺傷害の重症化に関わることが示唆された。

これらの報告は、RAS が SARS の重症化に関与する可能性を強く支持するものであり、一連の我々の研究結果は、RAS の個体差が SARS の重症度に影響を与える可能性を支持している。今後も SARS 重症化に関わる RAS の役割を明らかにしていきたい。

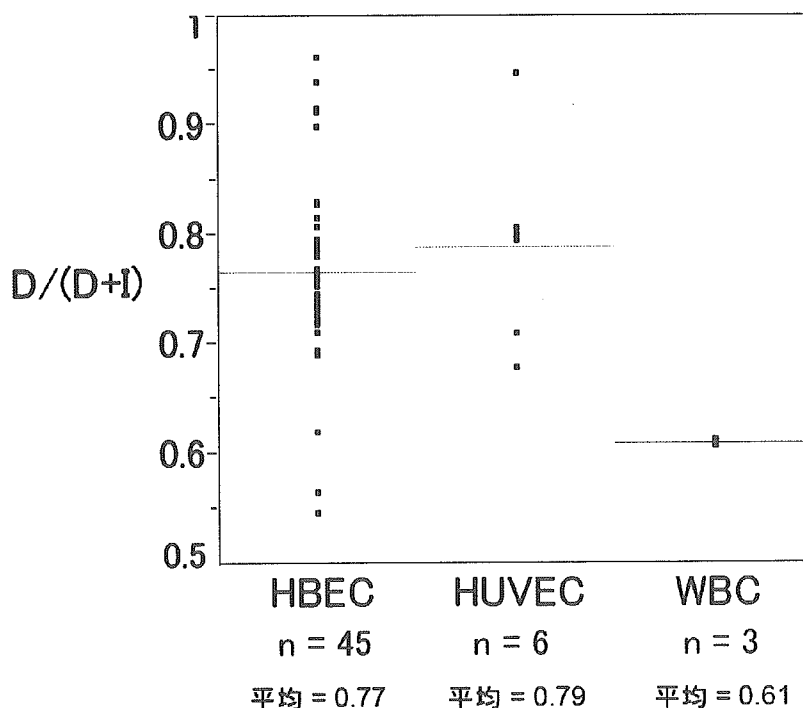


図1. 各サンプルの発現比の分布と、サンプル群の平均を示す。

参考文献

- 1) Itoyama S, Keicho N, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha le D, 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.* 2004 Oct 22;323:1124-9.
- 2) Suehiro T, Morita T, Inoue M, Kumon Y, Ikeda Y, Hashimoto K. Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Hum Genet* 2004;115:91-6.
- 3) Chan KC, Tang NL, Hui DS, Chung GT, Wu AK, Chim SS, Chiu RW, Lee N, Choi KW, Sung YM, Chan PK, Tong YK, Lai ST, Yu WC, Tsang O, Lo YM. Absence of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and development of adult respiratory distress syndrome in patients with severe acute respiratory syndrome: a case control study. *BMC Infect Dis.* 2005 Apr 9;5:26.
- 4) Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 2005 Jul 7;436:112-6.
- 5) Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* 2005 Aug;11:875-9.

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

ベトナムにおける L-SIGN の遺伝的多型と SARS 重症化の関連

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
	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
主任研究者	笹月健彦	国立国際医療センター

研究要旨

SARS は SARS-CoV の感染により発症する感染症であり、ACE2 がウイルスレセプターであるが、L-SIGN もウイルスレセプターとして働く可能性が報告された。また、L-SIGN 遺伝子にはエクソン 4 に VNTR があることが知られており、この多型のホモ接合体が SARS-CoV の感染に対して抵抗性であることが報告された。今回我々は、この遺伝的多型と SARS-CoV 感染の関連を、ベトナム人の検体を用いて検討した。SARS 患者群 44 例、SARS 患者と接触したが発症しなかった接触非発症者群 103 例を対象とした。接触非発症者群は抗 SARS-CoV 抗体の有無により、感染非発症者群 16 例と非感染者群 87 例に分かれ、SARS 患者群と感染非発症者群を合わせて感染者群として、非感染者群と比較した。対象者の末梢血よりゲノムを抽出し、PCR 法によりこの遺伝的多型の型判定を行った。その結果、ベトナム人の検体では、ホモ接合体が SARS-CoV 感染に対して抵抗性である傾向は認められなかった。

英文抄録

The SARS is an emerging pneumonia due to infection of the SARS-CoV. The L-SIGN, a novel C-type lectin, is possibly one of the virus receptors of SARS-CoV and recently it was reported that the homozygosity of VNTR on L-SIGN gene exon4 plays a protective role during SARS-CoV infection. Here, we assessed its effect in Vietnamese SARS cases and controls. The polymorphism was genotyped in 44 SARS cases and in 103 healthy controls who had not developed SARS but had a contact with the SARS patients. The controls were separated into two groups that were anti-SARS-CoV antibody-positive group and -negative group. The antibody-negative group was considered the non-infected group and compared with the infected group including SARS cases and antibody-positive controls. The frequency of the homozygotes of the VNTR in the non-infected group was not significantly higher than that in the infected group.

A. 研究目的

2003 年に世界的に流行した重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome : SARS) は、SARS coronavirus (SARS-CoV) がその原因病原体として同定され、その後すみやかに、angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) が SARS-CoV のウイルスレセプターのひとつであることが報告された。さらに 2004 年には、liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (L-SIGN) も SARS-CoV のウイルスレセプターとして働く可能性が報告された(1)。多くのウイルス感染症では、ウイルスレセプターはその病態において重要

な役割を果たす。SARS についても、ACE2 や L-SIGN が重要な研究対象となっている。

L-SIGN 遺伝子は dendritic cell-specific SIGN (DC-SIGN) と類似する遺伝子としてクローニングされ、お互いに塩基配列で 73%、翻訳されたアミノ酸配列では 77%の相同性がある(2)。L-SIGN も DC-SIGN と同様に、C 型レクチンに分類される。DC-SIGN は樹状細胞に発現しており、異物や病原体の認識と補足、樹状細胞の遊走や接着、樹状細胞と T リンパ球の相互作用に関わることが知られている。一方で L-SIGN は、肝臓の類洞内皮細胞、リンパ節、2 型肺胞上皮細胞と肺胞の血管内皮細胞において発現しているこ

とが確認され (1, 3)、肝臓の類洞ではリンパ球の遊走に關与する可能性が報告されている。また、L-SIGN は Ebola virus や Sindbis virus のウイルスレセプターである可能性や、Human immunodeficiency virus-1 や hepatitis C virus との結合能があることが報告されている。しかし、ウイルスレセプターとして、あるいは自然免疫としての役割も含めた、L-SIGN の機能は十分には解明されていない。

L-SIGN 遺伝子は染色体上では 19p13.3 に位置し、8 つのエクソンが存在するが、転写される mRNA のうち主要なものはエクソン 1 ~ 7 の 7 つのエクソンに由来する (2, 3)。翻訳されたタンパクは、II 型の膜貫通型タンパクである。N 末端側親水部分を細胞質側に突き出し、膜貫通領域を経て細胞外には、neck 領域と carbohydrate recognition domain (CRDs) が続いている。また、neck 領域をコードしている遺伝子のエクソン 4 には 69 塩基対のリピートがあり、タンパクでは 23 アミノ酸の繰り返し配列となる。L-SIGN は細胞膜上で 4 量体を形成していると考えられ (4)、アミノ酸の繰り返し配列による高次構造が 4 量体の形成に貢献していると考えられている。さらに、エクソン 4 のリピートは variable number of tandem repeat (VNTR) であることが報告されており、リピート回数や対立遺伝子間のリピートの回数の違いが、4 量体形成の効率や機能に影響を与えている可能性が考えられている (4)。

最近、L-SIGN 遺伝子エクソン 4 の VNTR と SARS-CoV 感染との関係が報告された (5)。この報告によると、VNTR と疾患の関連解析において、SARS-CoV 感染者群と比較してコントロール群では、VNTR のホモ接合体の頻度が高かった。さらに、培養細胞を用いた SARS-CoV 感染実験では、VNTR がホモ接合体の細胞はヘテロ接合体の細胞よりも SARS-CoV との結合能が高かった。そして、ホモ接合体の細胞は、ウイルスと結合した後のタンパク分解酵素によるウイルスの処理においても優れており、細胞間 trans 感染は少なかった。即ち、この VNTR のホモ接合体は SARS-CoV 感染に抵抗性であることが示された。

今回、我々はベトナムとの国際共同研究で得られた血液検体と臨床情報を解析し、L-SIGN 遺伝子エクソン 4 の VNTR と SARS-CoV 感染や SARS 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 例を接触非発症者群として登録した。全ての対

象者から末梢血を採取し、遠心分離によって血球と血漿に分けた後、血球からゲノム DNA を抽出した。

全対象の血漿を、市販の ELISA 法で抗 SARS-CoV 抗体の測定を行ったところ、103 例の接触非発症者群は、16 例の抗体陽性者群と 87 例の抗体陰性者群に分かれた。16 例の抗体陽性者群は SARS-CoV に感染したが発症しなかったと判断し、SARS 患者群 44 例と併せて SARS-CoV 感染者群 (60 例)、87 例の抗体陰性者群は接触があったが SARS-CoV に感染しなかった SARS-CoV 非感染者群 (87 例) として再分類した。

また、SARS 患者群 44 例を重症度で分類した場合も比較検討した。昨年度の報告と同様の方法で低酸素血症の有無を指標にして、中重症群と軽症群に分類した。それぞれ 22 例ずつであった。

L-SIGN 遺伝子エクソン 4 の VNTR の型判定は、過去に報告された方法に従った (3)。各サンプルから抽出されたゲノム DNA から VNTR 領域を PCR で増幅した。DNA の VNTR 領域をはさむように設計されたプライマーセット (5' -TGTCGAAGTCCCCAGCTCCC-3'、5' -GAACTCACCAATGCAGTCTCAAATC-3') と TaKaRa LA Tag を使い、温度条件は 94°C 5 秒間と 68°C 1 分間を 40 サイクルとした。PCR 増幅産物のサイズはリピート回数のちがいより異なり、リピート回数別のアレル由来の PCR 増幅産物は、5 回リピートは 440bp、6 回リピートは 509bp、7 回リピートは 578bp、8 回リピートは 647bp、9 回リピートは 716bp となる。2% アガロースゲルを用いた電気泳動により展開し、ethidium bromide によりバンドを検出して、リピート回数を判定した。

C. 結果

SARS 患者群と接触非発症者群、さらに SARS 患者群は重症度により、接触非発症者群は抗体の有無により分けた場合の、リピート回数別のアレル数と頻度、そしてホモ接合体の人数と頻度を表 1 に示す。

全対象を再分類により、SARS-CoV の感染者群と非感染者群に分けた場合の結果を表 2 に示す。どの 2 群間の比較でも、有意差は得られなかった。

D. 考察

今回の実験から得られた、ベトナム人の L-SIGN 遺伝子エクソン 4 の VNTR のリピート回数の分布は、5 回から 9 回リピートの範囲内となり、7 回リピートが最も頻度が高く、8 回リピートはまったく観察されなかった。この結果は先に報告された中国人の一般コントロール集団の結果 (5) と近似し、別の報告の Caucasian の一般コントロール集団の結果 (3) と比較しても傾向が一致した (表 1)。

Chan らの報告では、SARS-CoV 感染者群と比較してコントロール群では、VNTR のホモ接合体の頻度が高かったが、今回のベトナム人のサンプルを用いた検

討では、そのような傾向は観察されなかった。

一方で、SARS 患者群において中重症群と軽症群を比較した場合は、有意差はないものの、軽症群の方がホモ接合体の頻度が高い傾向が認められた。ホモ接合体の L-SIGN はヘテロ接合体と比較して、SARS-CoV との結合能と分解能が高いことから、SARS 発症後のウイルス複製に対して、ホモ接合体の L-SIGN が抵抗性に働いていて、重症化を阻止している可能性が考えられる。

今回の我々の検討では、L-SIGN 遺伝子エクソン 4 の VNTR のホモ接合体が、SARS-CoV 非感染者群で多いという結果は得られなかったが、これはベトナム人のサンプル数が限られていることが一因と考えられる。しかしながら、この遺伝子多型のホモ接合体が SARS の重症化に対して抵抗性であるという報告はこれまでになく、興味深い結果であると考えられる。

表 1. SARS 患者群と接触非発症者群のリポート回数別のアレル頻度と、ホモ接合体の頻度

リポート回数	SARS患者群			接触非発症者群			合計 n=147	参考文献より	
	中重症 n=22	軽症 n=22	合計 n=44	抗体 (+) n=16	抗体 (-) n=87	合計 n=103		中国人 (5) n=380	Caucasian (3) n=350
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.3)
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25 (3.6)
5	4 (9.1)	6 (13.6)	10 (11.3)	8 (25.0)	22 (12.6)	30 (14.6)	40 (13.6)	102 (13.4)	202 (28.9)
6	5 (11.4)	1 (2.3)	6 (6.8)	2 (6.3)	10 (5.7)	12 (5.8)	18 (6.1)	37 (4.9)	86 (12.2)
7	28 (63.6)	30 (68.2)	58 (65.9)	20 (62.5)	113 (64.9)	133 (64.6)	191 (65.0)	530 (69.7)	377 (53.9)
8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.3)
9	7 (15.9)	7 (15.9)	14 (15.9)	2 (6.3)	29 (16.7)	31 (15.0)	45 (15.3)	91 (12.0)	7 (1.0)
ホモ接合体	9 (40.9)	14 (63.6)	23 (52.3)	7 (43.8)	39 (44.8)	46 (44.7)	69 (46.9)	209 (55.0)	-
									アレル数 (%) 人数 (%)

表 2. SARS-CoV の感染者群と非感染者群の、リポート回数別のアレル頻度と、ホモ接合体の頻度

リポート回数	感染者群 n=60	非感染者群 n=87
5	18 (15.0)	22 (12.6)
6	8 (6.7)	10 (5.7)
7	78 (65.0)	113 (64.9)
8	0 (0)	0 (0)
9	16 (13.3)	29 (16.7)
ホモ接合体	30 (50.0)	39 (44.8)
		アレル数 (%) 人数 (%)

参考文献

1) Jeffers SA, Tusell SM, Gillim-Ross L, Hemmila EM, Achenbach JE, Babcock GJ, Thomas WD Jr, Thackray LB, Young MD, Mason RJ, Ambrosino DM, Wentworth DE, Demartini JC, Holmes KV. CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:15748-53.
2) Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. J Immunol.

2000;165:2937-42.
3) Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y, Carrington M. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. J Exp Med. 2001;193:671-8.
4) Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. J Biol Chem. 2001 Aug 3;276(31):28939-45.
5) Chan VS, Chan KY, Chen Y, Poon LL, Cheung AN, Zheng B, Chan KH, Mak W, Ngan HY, Xu X, Screaton G, Tam PK, Austyn JM, Chan LC, Yip SP, Peiris M, Khoo US, Lin CL. Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. Nat Genet. 2006 Jan;38(1):38-46.

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

ベトナムにおける HLA と SARS の関連

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
	徳永勝士	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
	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
	柏瀬貢一	東京都赤十字血液センター検査部
主任研究者	笹月健彦	国立国際医療センター

研究要旨

SARS-CoV の曝露者のうちで、SARS を発症しない例、発症しても軽症に終わる例、そして重症化する例が存在し、宿主側に SARS のリスクファクターが存在する可能性が考えられている。今回、我々は HLA と SARS 発症、重症化の関連をベトナム人のサンプルを用いて検討した。SARS 患者群 44 例、SARS 患者と接触したが発症しなかった接触非発症者群 103 例、SARS 患者との接触歴がない非接触コントロール群 50 例を対象とした。全対象者から採取した末梢血からゲノム DNA を抽出し、HLA-A、B、Cw、DRB1、DQB1 について遺伝子型判定を行った。SARS 患者群と接触非発症者群との間と、SARS 患者群と非接触コントロール群との間で比較したところ、いずれの比較においても、DRB1*12 のアレル頻度が SARS 患者群で有意に高く、DRB1*13 の頻度が SARS 患者群で有意に低かった。DRB1*13 は他のいくつかの感染症においても抵抗性と関連することが報告されており、SARS についても DRB1*13 は、宿主側の遺伝的な抵抗性因子である可能性が示された。

We have hypothesized that genetic predisposition influences the progression of SARS. This time, the HLA-A, B, Cw, DRB1 and DQB1 loci were genotyped in 44 Vietnamese "SARS cases", in 103 healthy "controls with contact" who had had a contact with the SARS patients and in 50 "controls without contact". The frequency of the DRB1*12 was significantly higher and the frequency of the DRB1*13 was significantly lower in the SARS cases than in controls with contact and than in controls without contact. Particularly, it was reported that the DRB1*13 was associated with protection against the HBV infection and the malaria. Our study suggested that the DRB1*13 was one of the protective genetic factors even against SARS.

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome : SARS) は SARS coronavirus (SARS-CoV) の感染により発症する新興感染症である。一般に、ウイルス性疾患では、ウイルスの毒性 (virulence) の違い、ウイルスの暴露量、感染ルートなどが病態や重症度に影響を及ぼすと考えられる。しかし、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、同一株から由来したSARS-CoVが世界に広がったと考えられ、さらに暴露の状況が似ていると思われる集団の中でも、発症しない例から、発症しても軽症のまま自然軽快する例、そして病状が急速に進行し致死的な状態に陥る例まで幅広く存在した。すなわち、SARSの発症や重症化に個人差があり、SARS-CoVの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。

世界的流行時の疫学的な検討から、高年齢、糖尿病、心疾患が、宿主側の予後不良のリスクファクターとして報告された。その後、遺伝的なリスクファクターについても検討されており、Human leukocyte antigen (HLA)、Angiotensin converting enzyme、2', 5'-oligoadenylate synthetase、mannose-binding lectin、liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin、Fcγ-receptor II Aの遺伝的多型がSARSの感染、発症、重症化に影響を与える可能性が報告されている。

HLAはその名が示す通りに白血球表面抗原として発見されたが、T細胞への抗原提示という免疫応答時に非常に重要な役割を担うと同時に、ヒトの主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex ; MHC) であり、自他認識のマーカー分子として機能している。HLAはクラスIとクラスIIの2種類に分けられ、クラスI分子にはA, B, C (古典的クラスI)、クラスII分子にはDR, DQ, DPがあり、クラスI分子の発現はほとんどの体細胞表面に認められるが、クラスII分子の発現は免疫担当細胞、特にB細胞・樹状細胞・マクロファージ上に認められる。ヒトでは第6染色体短腕21.3の約4,000kbに存在するMHC領域に遺伝子群がある。HLAは遺伝的多型性が大きく多様性に富んでおり、人種による特徴もあり、また免疫応答に密接な関係があるため、古くから感染症、腫瘍、自己免疫疾患などの分野で、HLA遺伝子の多型性と疾患の関係が研究されてきた。SARSとの関連についても、感染に対する感受性や抵抗性を示すHLAアレルの存在が報告されている(1-3)。

今回、我々はベトナムとの国際共同研究で得られた血液検体と臨床情報を解析し、HLAの遺伝的多型とSARS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。SARS患者群44例はさらに、昨年度の報告と同様の方法で低酸素血症の有無を指標にして、中～重症患者群と軽症患者群に分類した。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例を接触非発症者群として登録した。SARS患者との接触歴がない別の病院スタッフ50例を非接触コントロール群として登録した。全ての対象者から末梢血を採取し、遠心分離によって血球と血漿に分けた後、血球からゲノムDNAを抽出した。

HLA locusのうち、古典的クラスIに分類されるHLA-A、HLA-B、HLA-Cwと、古典的クラスIIに分類されるHLA-DRB1、HLA-DQB1について遺伝子型判定を行った。Polymerase Chain Reaction (PCR)-based Microtiter Plate Hybridization法 (湧永製薬株式会社) を用い、この方法でHLAの型が確定出来ない検体について、PCR-based sequence-specific oligonucleotide probing法 (ONE LAMBDA, INC) 又はSequencing-based typingにより型判定を行った。

C. 結果

SARS群44例、非接触コントロール群50例は全例において、判定対象であるHLA locusの型を確定した。接触コントロール群103例中3例で一部の型判定が確定できなかったため、本研究の解析から除外した。

古典的クラスIのHLA-A、HLA-B、HLA-Cwの型別のアレル数と頻度を表1に、古典的クラスIIのHLA-DRB1、HLA-DQB1の型別のアレル数と頻度を表2に示す。アレル頻度の有意差検定は、SARS患者群と接触非発症者群との間と、SARS患者群と非接触コントロール群との間で行った。

2通りの群間の比較のいずれにおいても、DRB1*12のアレル頻度はSARS患者群で有意に高く、DRB1*13のアレル頻度はSARS患者群で有意に低かった。B*48のアレル頻度は、SARS患者群と非接触コントロール群との間で比較した場合のSARS患者群で有意に高く、DRB1*14のアレル頻度は、SARS患者群と接触非発症者群との間で比較した場合のSARS患者群で有意に高かった。B*51、DRB1*04、DRB1*08、DQB1*06のアレル頻度は、SARS患者群と非接触コントロール群との間で比較した場合の非接触コントロール群で有意に高かった。HLA-A、HLA-Cwについては、型別のアレル頻度の有意差はなかった。