

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～18年度 総合研究報告書

平成19（2007）年3月

主任研究者

笹月健彦

# 目 次

## I. 総合研究報告書

SARS の感染・発症・重症化の分子機構	1
笹月 健彦	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
--------------------	---

# I. 総合研究報告書

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。平成16年度は、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。また平成17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。平成18年度は、この間に現地で集積された臨床データを解析し、主に、SARS回復者のカルテ、アンケート用紙から集計された臨床情報に、患者構成、症状、所見、治療に関するデータを再抽出し、中高年の女性医療従事者で、上気道症状を伴わない、リンパ球数の低下の所見を確認した。また、SARSと関連するHLAアリルについては、ベトナム人一般集団のHLA-A、B、C、DRB1、DQB1遺伝子に関して詳細に検討し、SARS患者で高率に見られたDRB1\*1202が、DQB1\*0301とハプロタイプを組み、ベトナム人一般集団で高頻度であることを明らかにした。さらに疾患感受性に関連する宿主要因としては、I型インターフェロン(IFN)誘導性抗ウイルス蛋白のひとつであり、SARS重症化と関連を示した、MxA遺伝子プロモーター領域の一塩基多型(SNP) -88G/Tが、SARSウイルス複製の場であるヒト気管支上皮細胞においてそのmRNA発現量と関連することを明らかにした。マウスモデルでは、SARSウイルス由来のRNAには、TNFなど炎症性サイトカインの分泌を促進し、NKG2Dレセプターリガンドをマウス樹状細胞に誘導するGUに富む領域が見いだされた。これら3年間の研究により、SARSに限らず、新興呼吸器ウイルス感染症の宿主側抗ウイルス応答、感染、発症、重症化の分子機構を考える上で重要な知見が得られた。

## 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。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が、近年、これまでになく、新型インフルエンザを中心とした、新興呼吸器ウイルス感染症のパンデミックの恐れが強まっており、近い将来、重篤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。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いる。

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。

臨床情報については、カルテ、質問表等により、情報を得た。データ解析は、SPSS13.0 を用いて、基準統計と、分散分析、カイ二乗分析を行った。

MxA 遺伝子多型の機能解析のため、切除気管支残余部分より単離培養された気管支上皮細胞を培養に用いた。

また、NKG2D リガンドの発現を検討するために、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。SARS 全塩基配列より、GU rich の領域を選び出し、マウスの系で、TNF の産生、NKG2D リガンドの発現を定量した。

### (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) ACE/ACE2 と SARS 重症化

a) 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。

b) SARS 重症度と関連する ACE1 の D アリルの機能的意義

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。

c) 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。辜丸では従来のエクソン 1 がよりも 5' 側で 65 bp 長い、新エクソン 1 の伸長部分が見いだされた。

d) 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。

2) typeI IFN 誘導性抗ウイルスタンパクの遺伝子多型と SARS 重症化

a) 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。

b) MxA 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型と気管支上皮細胞における発現量の関連

これまでベトナム人 SARS 患者では重症者に MxA 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型 (SNP) -88G/T の GG genotype、G アリルを持つものが多く見られることを報告してきた。SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の主な複製の

場と考えられている気管支上皮細胞を用い、MxA -88G/T SNP と MxA mRNA 発現量の関係を検討した。定量的 RT/PCR 法で MxA mRNA 発現量を比較したところ、非刺激状態では MxA の相対発現比は-88GG genotype の群に比して、-88GT/TT genotype の群で有意に高かった ( $p=0.0164$ )。

3) HLA と SARS との関連

a) 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 患者群で有意に高く、DRB1\*13 の頻度が SARS 患者群で有意に低かった。

b) ベトナムにおける HLA クラス I、クラス II 遺伝子の対立遺伝子型およびハプロタイプ分布

ベトナム人集団の HLA クラス I、クラス II 遺伝子の対立遺伝子およびハプロタイプ頻度を解析した。クラス I 遺伝子により構成されるハプロタイプでは、A\*1101-B\*1502-Cw\*0801 が最も高頻度で推定され、それに続いて A\*3303-B\*5801-Cw\*0302 と A\*0207-B\*4601-Cw\*0102 が比較的高頻度で見られた。上記 3 種のハプロタイプは中国南部で高頻度に見られるものであったが、A\*2901-B\*0705-Cw\*1501 は、ベトナム人集団で特徴的であった。一方、クラス II 遺伝子により構成されるハプロタイプでは、DRB1\*1202-DQB1\*0301 が全ハプロタイプ中の 1/3 を占め、インドネシアに見られるジャワ人との近縁性が示唆された。

4) その他の遺伝子と SARS

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、SARS の第 2 レセプターとして報告されている LSIGN 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。

## 5) SARS 対象患者の臨床記述疫学研究

SARS に関わる臨床疫学研究、WHO の診断基準に基づいた 44 名の SARS 発症者の画像、呼吸機能検査を含む後遺症に関する追跡調査と、103 名の濃厚接触非発症者を含む 147 名について、現地で得られた臨床データを解析し、主に、SARS ウイルス感染者の臨床疫学情報を記述的に整理して、今後のために報告した。

## 6) SARS RNA による炎症性サイトカインおよび NKG2D リガンドの発現誘導

### a) 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。

### b) 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

SARS 全塩基配列由来の GU rich の合成 oligo RNA を刺激として、マクロファージ細胞株から TNF が産生されることを明らかにした。

### c) 抗原提示細胞における SARS RNA による炎症性サイトカインおよび NKG2D リガンドの発現誘導

細菌感染、ウイルス感染、真菌感染などにおいて、マクロファージや樹状細胞は、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。SARS ウイルスは RNA ウイルスであり、SARS RNA の刺激によって、マクロファージや樹状細胞が多量の炎症性サイトカイン TNF-alpha を発現誘導することが明らかとなった。さらに、NK 活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1 も

SARS RNA によって樹状細胞上に発現誘導された。

## 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。

これまでこのことを客観的に示す報告がなされていなかったため、本研究班の最終年度に、ベトナムの研究者と共同で、これまで集積された臨床疫学データの総括を行った。対照となった SARS44 例については、医療関係者、それも労働年齢の看護師を初めとする女性スタッフが主であり、A 病院に入院した SARS 患者より感染したものと推測された。B 病院では、一例も院内感染が生じなかった。このように一病院の院内感染という均一な環境下で、比較的そろった背景の患者集団であったことは、SARS の重症化に関するパラメータの解析に有利な点であった。重症者には、高齢者がみられたが、統計的な有意差は得られなかった。軽症者と中等症 + 重症者の間で、極期のリンパ球数、CPK、AST、ALT との間には統計的な有意差が認められ、特にリンパ球数の減少は重症例で顕著であり、重症化のよいマーカーと考えられた。CPK も重症例で軽症例の 7 倍ほど高く、マーカーと

して有用と考えられた。胸部 X 線上、初診時の肺病変の局在と重症化とは関係がなかった。

治療は一般抗生剤、抗ウイルス剤、ステロイドを中心に施行された。細菌性の二次感染の防止、抗生物質の抗炎症作用や免疫調節作用などを考えると、重症度と一部の抗生剤との間に関連が認められるかもしれないが、抗生剤の使用に係る要因は複雑であり、使用期間と複数の抗生剤の使用状況を勘案したさらに詳細な解析が必要と思われた。ステロイドは重症例に、抗ウイルス剤は、軽症例に多く使用されたが、この点についても、聞き取り調査など、さらなる検討が必要と思われた。

疾患感受性遺伝子研究では、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関連していたことから、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た。

SARS 群をこのような重症度で分類し、比較したところ、ACE 遺伝子の 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、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、ACE 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いる。実際に、D アリルがヒトで、重要な機能的な意義を有するものであるかどうかを検討したところ、D アリル由来の mRNA は I アリル由来の mRNA に比べて、有意に発現が亢進していることが示された。このアリルによる発現量のちがいは、末梢血細胞より、ヒト血管内皮や気管支上皮細胞という、組織構成細

胞で顕著にみられたことは、病態との関連をさらに示唆するものと考えられた。

また 2005 年に、久場らの ACE と ACE2 のノックアウトマウスを用いた研究により、急性肺傷害の程度は、局所における ACE と ACE2 の imbalance によって、大きな影響を受けることが、報告された。これは、マウスにおける報告であるが、我々のヒトでの報告はそれを裏付けるものとなった。

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、従来報告されているエクソン 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た。

我々はさらに SARS-CoV 感染・SARS 発症・重症化に関連する宿主要因として、ウイルス感染の初期に重要な役割を果たす自然免疫系分子に注目してきた。ウイルス感染に対し、OAS1, PKR, MxA など細胞内抗ウイルス蛋白は、I 型インターフェロン (IFN) によって感染初期から誘導される。国際共同研究によるベトナム人検体を用いた関連解析の結果、MxA 遺伝子プロモーター領域 -88G/T が SARS 重症化と関連していることを報告した。さらに、SARS ウイルス複製の場である、ヒト気道上皮細胞において、この MxA -88G/T 遺伝子多型が MxA mRNA の発現量と関連することを明らかにした。すなわち、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 の重症化に関与する可能性が推測された。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。

HLA は、未知の感染症の疾患感受性と免疫応答を考える上で、最も重要な分子の一群である。一般ベトナム人集団の HLA 遺伝子型頻度とハプロタイプを詳細に検討することにより、ベトナム人集団の HLA 遺伝子型の特徴を明らかにすることができ、新興感染症における疾患感受性遺伝子研究に有用な基礎データを得ることができた。HLA については、これまでの報告と異なる DRB1\*12 の疾患感受性、DRB1\*13 の疾患抵抗性が報告された。DRB1\*13 は、B 型肝炎ウイルスの感染に対しても抵抗性に働く可能性がいくつか報告されており、興味深い。

その他の遺伝子として、これまでに LSIGN、MBL 遺伝子の遺伝子多型と SARS の感染、発症、重症化との関連が報告されているため、我々も、これらの遺伝子多型との関連を検討した。LSIGN は、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おり、繰り返し数の個人差 (VNTR) が、ホモ接合では高次構造が安定し、ウイルスの吸着、分解に有利に働くと考えられたが、我々の検討では、有意差には至らなかった。MBL 遺伝子も非特異的なウイルスの吸着、分解に寄与すると考えられるが、我々の検討では、有意な寄与因子としては証明されなかった。

また、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。さらに poly I:C のみならず、SARS のウイルスの RNA には、炎症性サイトカインの分泌を促進するような領域があることが明らかになった。SARS RNA の刺激によって、マクロファージや樹状細胞が多量の炎症性サイトカイン TNF-alpha を発現誘導することが明らかとなった。さらに、NK 活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1 も SARS RNA によってマウス樹状細胞上に発現誘導された。このことは、SARS ウイルス感染時において、マクロファージが産生する多量の TNF-alpha が患者の炎症を増悪させている可能性が示唆された。

## 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 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。血管内皮傷害に関連の深い ACE 遺伝子、MxA の遺伝子変異はそれぞれの遺伝子の発現 mRNA レベルと相関することをヒト気管支上皮細胞の系で、実験的に明らかにすることができた。

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。総じて、これらの知見は、SARS に限らず、今後、新興呼吸器ウイルス感染症のヒト肺における抗ウイルス応答を考える上で重要なものと推測された。

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

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. 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, Hijikata M, 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
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
Sinich S, Keicho N, Long HT, N, Quy T, Phi NC, Long, Ha LD, Ban V.V, Itoyama S, Hu.C.-J, Komatsu.N, Kirikae F, Kirikae T, 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.	Brief communication		600-607	2004
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.	Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam.	Am J Trop Med Hyg	73 (1)	17-25	2005



## Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population

Emi Hamano <sup>a</sup>, Minako Hijikata <sup>a</sup>, Satoru Itoyama <sup>a</sup>, Tran Quy <sup>b</sup>, Nguyen Chi Phi <sup>b</sup>,  
Hoang Thuy Long <sup>c</sup>, Le Dang Ha <sup>d</sup>, Vo Van Ban <sup>e</sup>, Ikumi Matsushita <sup>a</sup>,  
Hideki Yanai <sup>f</sup>, Fumiko Kirikae <sup>g</sup>, Teruo Kirikae <sup>g</sup>, Tadatoshi Kuratsuji <sup>h</sup>,  
Takehiko Sasazuki <sup>i</sup>, Naoto Keicho <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Japan

<sup>b</sup> Bach Mai Hospital, Viet Nam

<sup>c</sup> National Institute of Hygiene and Epidemiology, Viet Nam

<sup>d</sup> Institute for Clinical Research in Tropical Medicine, Viet Nam

<sup>e</sup> Hanoi-French Hospital, Viet Nam

<sup>f</sup> The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Japan

<sup>g</sup> Department of Infectious Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Japan

<sup>h</sup> Research Institute, International Medical Center of Japan, Japan

<sup>i</sup> International Medical Center of Japan, Japan

Received 13 February 2005

### Abstract

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

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Severe acute respiratory syndrome; SARS associated coronavirus; Association study; Polymorphism; Oligoadenylate synthetase 1; Myxovirus resistance-A; Interferon; Vietnam

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a new infectious disease that emerged towards the end of 2002, spreading from China to countries in Asia, Europe, and North America. During the outbreak, a total of 8098 cases of SARS were diagnosed and the mortality rate was 9.6% [1]. Risk factors for exacerbation of the

clinical progress in SARS have been reported as being patients in excess of 60 years of age, or having diabetes mellitus or other comorbid medical conditions [2,3]. However, little is known about host genetic factors associated with the development or progression of SARS, excepting human leukocyte antigens [4,5] and insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme 1 gene whose association with the disease [6] our research group had identified.

\* Corresponding author. Fax: +81 3 3207 1038.

E-mail address: [nkeicho-tky@umin.ac.jp](mailto:nkeicho-tky@umin.ac.jp) (N. Keicho).

It has been shown that SARS is caused by a newly identified SARS coronavirus (SARS-CoV) [7–10]. Among innate immunity against viral infection, type I interferons (IFN- $\alpha/\beta$ ) induced by virus infection generally play an important role in the first line of defense, inducing intracellular antiviral proteins, such as 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS-1), myxovirus resistance-A (MxA), and double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) [11]. Although the induction of endogenous type I IFNs in the SARS-CoV infection in vivo has not yet been clarified, recent studies have shown that administration of exogenous type I IFNs could inhibit SARS-CoV replication both in vivo [12] and in vitro [13–19]. Investigations into the role of the IFN system against SARS-CoV infection are important, not only to understand the mechanisms of viral pathogenesis but also to adopt effective therapeutic strategies against SARS.

Host genetic factors that influence antiviral effects of IFNs have been well studied in the field of viral hepatitis. Type I IFNs have been widely used as antiviral agents, mainly to treat hepatitis C virus (HCV) infection. Host genetic factors that affect the outcome of IFN treatment in chronic hepatitis C have been investigated, and a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of IFN-inducible *MxA* gene was associated with the response to IFN treatment in the Japanese [20,21] and Caucasian populations [22]. The SNP in *MxA* gene and SNPs in *OAS-1* gene and in *PKR* gene were also shown to be associated with self-limiting infection of HCV by Knapp et al. [22]. Their report indicated that the SNPs in IFN-inducible genes were not only associated with the result of IFN treatment but also with the natural course of HCV infection.

It has been highly suspected that host genetic factors affect the course of various viral infections, including cases of SARS-CoV infection. In the present study, we have tried to determine whether the polymorphisms in IFN-inducible genes are associated with SARS-CoV infection, development, and progression of SARS. This was carried out by investigating 44 Vietnamese SARS cases, with 103 controls of individuals with a history of contact with SARS patients and 50 controls of individuals with no such contact history.

## Materials and methods

**Subjects.** This study was reviewed and approved by ethics committees in the Ministry of Health in Vietnam as well as the International Medical Center in Japan. Written informed consent had been obtained from all subjects and detailed characteristics of the subjects had been described beforehand [6]. In short, the study population comprised 44 SARS patients in Vietnam, 103 staff members of the same hospital as control subjects, who had come into contact with SARS patients but had not developed SARS, and 50 individuals reflecting the general Vietnamese population, having had no contact

history with SARS patients. Out of 44 SARS patients, 22 required oxygen therapy because of hypoxemia, with the other 22 cases, not being hypoxemic, not receiving any such oxygen therapy. There was a significant correlation between the degree of lung involvement in chest radiographs and the requirement of supplementary oxygen. Because of this finding, the progression of SARS in the lung could be reasonably determined from the status of supplementary oxygen ascertained in our previous study [6]. Peripheral blood samples were obtained in all subjects and the genomic DNAs were subsequently extracted [6]. Anti-SARS-CoV antibodies in the blood samples were tested by SARS ELISA (Genelabs Diagnostics, Singapore).

**Genotyping of allelic variants of the *OAS-1*, *MxA*, and *PKR* genes.** The SNPs analyzed in this study were all genotyped utilizing PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods.

It was once held that *OAS-1* gene consisted of 8 exons [23]. However, according to the current database of RefSeq gene NM\_016816, it comprises six exons. As a result, the A/G SNP (rs#2660) in exon 8 of *OAS-1* gene associated with outcome of HCV infection in the previous report by Knapp et al. [22] should have been located in exon 6, which falls on the 3'-untranslated region of long transcript E18 (NM\_016816). To detect the SNP, genomic DNA was amplified by AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) with primers 25AS-e6F (5'-GAG GAC TGG ACC TGC ACC ATC CTC-3') and 25AS-e6R (5'-AGA AAG TCA AGG CTG GAA TTT CAT-3'), and the PCR products of 309 bp were digested with *Mbo*II (New England Biolabs) at 37 °C for 1 h. The 309 bp product was not cut in the presence of G-allele, but was cut into fragments in the presence of A-allele. Subsequently, the fragment was separated into 188 and 121 bp units on 2% agarose gels with ethidium bromide.

We found a non-synonymous SNP in exon 3 of the *OAS-1* gene registered in the JSNP database (No. IMS-JST093062, i.e., rs#3741981). The A/G SNP in exon 3 was genotyped by PCR with primers 25AS-e3F (5'-ATC AGG AAT GGA CCT CAA GAC TTC-3') and 25AS-e3R (5'-CGG ATG AGG CTC TTG AGC TTG GT-3'), and RFLP with *Acc*I (New England Biolabs). The PCR products of 306 bp were digested with *Acc*I and electrophoresed on 3% agarose gels to analyze undigested 306 bp band and digested parts of 159 and 147 bp bands.

The G/T SNP at position -88 in the promoter region of *MxA* gene was analyzed by PCR-RFLP methods as described previously [20]. The G/T SNP at position -88 was associated with the result of IFN treatment in chronic hepatitis C [20–22] and with the result of HCV infection [22].

The T/C SNP at position -168 in the promoter region of *PKR* gene, associated with result of HCV infection [22], was genotyped as follows. PCR was carried out with primers PKR-pF (5'-GTG GAA CCC TTG ATT CGA GAA CCT AGT-3') and PKR-pR (5'-GCG GCT TCG GGA GAG CTG GTT CTC AGT-3') using TaKaRa Ex Taq with GC buffer I (TaKaRa). The cycling condition is 45 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C for 1 min. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and digested with *Sgr*AI (New England Biolabs). Digested DNA was electrophoresed on a 5% agarose gel. The presence of T-allele was demonstrated by 169 and 155 bp fragments, and the presence of C-allele was indicated by 169, 136, and 19 bp fragments.

**Statistical analysis.** Possible differences deriving from the distribution of age and gender between two groups were evaluated with the unpaired *t* test and  $\chi^2$  test, respectively. Disease associations were assessed by the  $\chi^2$  test. *p* values less than 0.05 were considered significant in all the tests, and data analysis was carried out using JMP version 5 (SAS Institute). Genotype distribution of tested polymorphisms in the control population was in Hardy-Weinberg equilibrium. We calculated Lewontin's  $|D'|$  and  $r^2$  to assess the extent of pairwise linkage disequilibrium between polymorphisms [24]. These indices were calculated with the use of haplotype frequencies estimated by the PHASE algorithm (PHASE, version 2.1.1) based on Bayesian methods.

## Results

Demographic information is shown in Table 1. The mean age was not different between SARS cases and contacts ( $p = 0.1781$ ). Although females appeared more frequently in SARS cases than contacts, the male/female ratio was not statistically different between the two groups ( $p = 0.0869$ ). Sixteen individuals out of 103 contacts were revealed to have anti-SARS-CoV antibodies. When we classified these individuals into an infected group together with SARS patients, age and gender showed no significant difference between the infected and non-infected groups ( $p = 0.2139$ ;  $0.2065$ ). SARS cases were classified by the requirement for oxygen therapy. Age and gender did not differ between these subgroups either ( $p = 0.4198$ ;  $0.7411$ ).

We analyzed SNPs of IFN-inducible genes showing association with HCV infection as described above [20–22], and compared their genotypes and allele frequencies between 44 SARS cases and 103 controls with contact history to SARS patients (Table 2).

We observed a higher frequency of the G-allele positive genotypes (GA and GG) of non-synonymous SNP in exon 3 of *OAS-1* gene in SARS patients (odds ratio 2.68; 95% CI; 1.17–6.15;  $p = 0.0178$ ). Allele frequency of the G-allele in exon 3 was significantly higher in SARS patients ( $p = 0.0090$ ). Allele frequency of the G-allele in exon 6 of *OAS-1* was also found more frequently in SARS patients than in the controls that showed marginal significance ( $p = 0.0542$ ).

The genotype and allele frequencies of *OAS-1* polymorphisms were compared among 60 SARS-CoV infected individuals and 87 uninfected individuals (Table 3). It was shown that frequencies of the G-alleles in exon 3 and exon 6 were significantly higher in infected individuals than in uninfected ( $p = 0.0156$  and  $p = 0.0176$ , respectively). These two polymorphisms in the *OAS-1* gene were in strong linkage disequilibrium ( $|D'| = 0.931$ ,  $r^2 = 0.530$ ). Genotype and allele frequencies in 50 controls with no contact history with SARS patients are also shown in Table 3. In controls of subjects having no contact history, allele frequencies of G-allele in exons 3 and 6 were lower than those of the infected group, but higher than those of the uninfected group.

The SNPs in *MxA* gene and *PKR* gene were not associated with the development of SARS (Table 2). However, on comparison of the *MxA* genotype between hypoxemic SARS patients requiring oxygen therapy

Table 2

Genotype and allele frequencies in SARS cases and controls with contact history

	SARS cases (n = 44)	Controls (n = 103)	p value
<i>OAS-1</i> exon 6			
Genotype			
AA	18 (40.9%)	60 (58.3%)	0.0537
AG	21 (47.7%)	36 (35.0%)	
GG	5 (11.4%)	7 (6.7%)	
Allele			
A	0.65	0.76	0.0542
G	0.35	0.24	
<i>OAS-1</i> exon 3			
Genotype			
AA	9 (20.5%)	42 (40.8%)	0.0178
AG	24 (54.5%)	48 (46.6%)	
GG	11 (25.0%)	13 (12.6%)	
Allele			
A	0.48	0.64	0.0090
G	0.52	0.36	
<i>MxA</i> -88			
Genotype			
GG	23 (52.3%)	43 (41.7%)	0.2400
GT	16 (36.4%)	52 (50.5%)	
TT	5 (11.3%)	8 (7.8%)	
Allele			
G	0.70	0.67	0.5597
T	0.30	0.33	
<i>PKR</i> -168			
Genotype			
CC	18 (41.9%)	49 (47.6%)	0.5278
CT	22 (51.2%)	46 (44.7%)	
TT	3 (7.0%)	8 (7.8%)	
Allele			
C	0.67	0.70	0.6780
T	0.33	0.30	

and non-hypoxemic SARS patients who did not, GG genotype was found more frequently in patients of the former category (odds ratio 3.75; 95% CI 1.08–10.7;  $p = 0.0346$ ). It was also shown that the G-allele was more frequent in the former group ( $p = 0.0195$ ) (Table 4). The other SNPs did not show any significant  $p$  values between these two groups (data not shown).

## Discussion

Our study showed that the polymorphisms in the IFN-inducible *OAS-1* gene might affect susceptibility to SARS-CoV infection or the development of SARS.

Table 1  
Characteristics of SARS cases and healthy contacts

Characteristics	Contacts			SARS cases		
	(n = 103)	Anti-SARS-CoV Ab (-) (n = 87)	Anti-SARS-CoV Ab (+) (n = 16)	(n = 44)	Non-hypoxemic group (n = 22)	Hypoxemic group (n = 22)
Age (year), mean [range]	36.5 [15–69]	36.6 [15–69]	36.6 [25–50]	39.3 [17–76]	37.7 [17–61]	41.0 [23–76]
Male/female (n)	46/57	39/48	7/9	13/31	6/16	7/15

Table 3  
Genotype and allele frequencies of *OAS-1* polymorphisms in SARS infected, uninfected, and controls without contact history

<i>OAS-1</i>	SARS infected (n = 60)	Uninfected (n = 87)	p value	Controls without contact (n = 50)
<b>Exon 6</b>				
Genotype				
AA	25 (41.7%)	53 (60.9%)	0.0215	27 (54.0%)
AG	28 (46.7%)	29 (33.3%)		17 (34.0%)
GG	7 (11.7%)	5 (5.7%)		6 (12.0%)
Allele				
A	0.65	0.76	0.0176	0.71
G	0.35	0.24		0.29
<b>Exon 3</b>				
Genotype				
AA	14 (23.3%)	37 (42.5%)	0.0163	17 (34.0%)
AG	33 (55.0%)	39 (44.8%)		26 (52.0%)
GG	13 (21.7%)	11 (12.6%)		7 (14%)
Allele				
A	0.51	0.65	0.0156	0.60
G	0.49	0.35		0.40

Table 4  
Genotype and allele frequencies of *MxA* –88 G/T polymorphism in the subgroups of SARS cases

	SARS cases (n = 44)		p value
	Non-hypoxemic group (n = 22)	Hypoxemic group (n = 22)	
Genotype			
GG	8 (36.4%)	15 (68.2%)	0.0346
GT	10 (45.4%)	6 (27.3%)	
TT	4 (18.2%)	1 (4.5%)	
Allele			
G	0.59	0.82	0.0195
T	0.41	0.18	

In the presence of double-stranded RNA (dsRNA), *OAS-1* catalyzes the 2',5'-oligomers of adenosine in order to permit the binding and activation of a latent ribonuclease, RNase L, which cleaves cellular and viral RNAs [11,25]. *OAS-1* gene has two major transcripts that are generated by alternative splicing at the last two exons [23]. E16 (NM\_002534) is a short transcript with 5 exons and is translated to p40 isoform. E18 (NM\_016816) is a long transcript with 6 exons and is translated to p46 isoform. Another transcript 9-2 is generated using a different splice acceptor site that comes from E18 at exon 6 and is translated to 9-2 protein [26]. The 9-2 protein has a unique property due to the Bcl-2 homology domain 3 present in its unique carboxyl-terminal region. This is also distinctive in causing cellular apoptosis by binding to the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family [26]. Therefore, *OAS-1* has dual functions representing the synthesis of 2',5'-oligomers of adenosine and the promotion of cellular apoptosis.

Knapp et al. [22] described how the GG genotype in exon 6 of *OAS-1* gene was more frequent in persistent

HCV infection than in self-limiting infection. In our study, the G-allele was more frequently observed in SARS-CoV infected individuals than in the uninfected group. In both these studies, the G-allele was susceptible to virus infection. The A/G polymorphism in exon 6 is located downstream of the stop codon for E18 transcript meaning therefore that it is included in the 3'-untranslated region. However, it is located upstream of the stop codon for 9-2, and the A/G SNP results in amino acid substitution Arg397Gly of 9-2 protein, which is located near the Bcl-2 homology domain (amino acid positions 372–393). It will be an interesting aspect if this phenomenon occurs with any functional importance. We also analyzed the A/G polymorphism in exon 3 of *OAS-1* gene and found that there was strong linkage disequilibrium between the two SNPs. The A/G polymorphism in exon 3 causes amino acid substitution Ser162Gly in three isoforms, which is located near the dsRNA binding domain (amino acid positions 104–158) of *OAS-1* [27]. We are unable at this point to determine which SNP is directly related to susceptibility to SARS or SARS-CoV infection. One can also consider that the other unidentified polymorphism of strong linkage disequilibrium with these SNPs may serve as the basis for any functional difference. Judging from the results obtained in this study, polymorphisms in *OAS-1* gene are likely to be involved in SARS-CoV infection or the development of SARS, at least in part, bearing in mind the fact that *OAS-1* might have antiviral potential against SARS-CoV.

SARS-CoV is usually cultured in Vero E6 cell line [13–17,19], which cannot produce IFNs because it lacks *IFN* genes [28,29]. Recently, Cinatl et al. [30] infected permissive Caco-2 cells with SARS-CoV and analyzed the effects of SARS-CoV on cellular gene expression by high-density oligonucleotide arrays. They found that SARS-CoV infection of Caco-2 cells up-regulated IFN-inducible *OAS-2*, *OASL*, and *MxA* but not *PKR* genes. *OAS-2* and *OASL* are members of the human *OAS* gene family [25]. The role of *OAS-1* as an inhibitor of SARS-CoV replication should be clarified to examine the hypothesis that Caco-2 cells permitted considerable infection with SARS-CoV because they did not induce *OAS-1*.

As regards the G/T polymorphism at position –88 in promoter region of *MxA* gene, GG genotype and G-allele were found to be more frequent in patients with an enhanced clinical progression, requiring oxygen therapy, although the number of cases was rather small. GG genotype was found more frequently in non-responders of IFN treatment in hepatitis C, and a luciferase reporter assay revealed that the *MxA* promoter sequence of G haplotype had lower promoter activity than that of T haplotype [31]. Recently, Arcas et al. [32] reported that GG genotype expressed lower amount of *MxA* mRNA than GT or TT genotype in IFN-treated peripheral



blood mononuclear cells in vitro. Spiegel et al. [15] reported that SARS-CoV replication was not affected in Vero E6 cells that were stably expressing MxA. They concluded that antiviral effect of IFN against SARS-CoV was not mediated by MxA. In our study, –88 SNP in *MxA* promoter was not related to disease susceptibility. Taking these observations together, MxA may not have a strong inhibitory effect on replication of SARS-CoV, but lower MxA expression may play a role in the worsening of SARS clinical progression.

If SARS re-emerges, IFN could be a promising candidate to treat SARS patients [12–19]. In the present study, the SNPs in *OAS-1* were associated with SARS-CoV infection or development of SARS, and the SNP in *MxA* was associated with the progression of SARS. It could be interesting to consider that they may also be related to the response of SARS patients to IFNs, and that SARS patients with AA genotype of the A/G SNP in exon 3 of *OAS-1* may respond to IFN treatment more effectively than those with AG or GG genotypes. During the course of our study, age was not a risk factor contributing to any worsening of SARS, probably because the majority of the patients consisted of relatively young medical staff members [6].

In conclusion, we showed that the polymorphisms in *OAS-1* gene were associated with SARS-CoV infection or development of SARS and that the polymorphism in *MxA* gene was also associated with hypoxemic status in SARS cases in Vietnam. These findings may lead to an understanding of IFN-induced antiviral response to SARS infection.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Nguyen Le Hang, Ms. Pham Thi Phuong Thuy, and Ms. Nguyen Thi Thu Ha for their help in the management and coordination of this study in Vietnam. The authors also thank Kazuko Tanabe D.V.M. and Mr. John Crosskey for their critical reading of the manuscript and Dr. Goh Tanaka for his help in statistical analysis. This work was supported by a grant for International Health Cooperation Research (14C-9) and for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare in 2004.

#### References

- [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] J.S. Peiris, S.T. Lai, L.L. Poon, Y. Guan, L.Y. Yam, W. Lim, J. Nicholls, W.K. Yee, W.W. Yan, M.T. Cheung, V.C. Cheng, K.H. Chan, D.N. Tsang, R.W. Yung, T.K. Ng, K.Y. Yuen, Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome, *Lancet* 361 (2003) 1319–1325.
- [8] T.G. Ksiazek, D. Erdman, C.S. Goldsmith, S.R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J.A. Comer, W. Lim, P.E. Rollin, S.F. Dowell, A.E. Ling, C.D. Humphrey, W.J. Shieh, J. Guarnier, C.D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J.Y. Yang, N. Cox, J.M. Hughes, J.W. LeDuc, W.J. Bellini, L.J. Anderson, A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1953–1966.
- [9] C. Drosten, S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H.R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R.A. Fouchier, A. Berger, A.M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J.C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H.D. Klenk, A.D. Osterhaus, H. Schmitz, H.W. Doerr, Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1967–1976.
- [10] T. Kuiken, R.A. Fouchier, M. Schutten, G.F. Rimmelzwaan, G. van Amerongen, D. van Riel, J.D. Laman, T. de Jong, G. van Doornum, W. Lim, A.E. Ling, P.K. Chan, J.S. Tam, M.C. Zambon, R. Gopal, C. Drosten, S. van der Werf, N. Escriou, J.C. Manuguerra, K. Stohr, J.S. Peiris, A.D. Osterhaus, Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome, *Lancet* 362 (2003) 263–270.
- [11] C.E. Samuel, Antiviral actions of interferons, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 778–809.
- [12] 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) 290–293.
- [13] J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, H.W. Doerr, Treatment of SARS with human interferons, *Lancet* 362 (2003) 293–294.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] S. Knapp, L.J. Yee, A.J. Frodsham, B.J. Hennig, S. Hellier, L. Zhang, M. Wright, M. Chiaramonte, 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.
- [23] 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.
- [24] R.C. Lewontin, On measures of gametic disequilibrium, *Genetics* 120 (1988) 849–852.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] J.D. Mosca, P.M. Pitha, Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 2279–2283.
- [29] M.O. Diaz, S. Ziemien, M.M. Le Beau, P. Pitha, S.D. Smith, R.R. Chilcote, J.D. Rowley, Homozygous deletion of the alpha and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5259–5263.
- [30] J. Cinatl Jr., G. Hoever, B. Morgenstern, W. Preiser, J.U. Vogel, W.K. Hofmann, G. Bauer, M. Michaelis, H.F. Rabenau, H.W. Doerr, Infection of cultured intestinal epithelial cells with severe acute respiratory syndrome coronavirus, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 2100–2112.
- [31] 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.
- [32] 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.

## 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

Satoru Itoyama,<sup>1</sup> Naoto Keicho,<sup>1\*</sup> Minako Hijikata,<sup>1</sup> Tran Quy,<sup>2</sup> Nguyen Chi Phi,<sup>2</sup> Hoang Thuy Long,<sup>3</sup> Le Dang Ha,<sup>4</sup> Vo Van Ban,<sup>5</sup> Ikumi Matsushita,<sup>1</sup> Hideki Yanai,<sup>6</sup> Fumiko Kirikae,<sup>7</sup> Teruo Kirikae,<sup>7</sup> Tadatoshi Kuratsuji,<sup>8</sup> and Takehiko Sasazuki<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Bach Mai Hospital, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup>Institute for Clinical Research in Tropical Medicine, Vietnam

<sup>5</sup>Hanoi-French Hospital, Vietnam

<sup>6</sup>The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Japan

<sup>7</sup>Department of Infectious Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Japan

<sup>8</sup>Research Institute, International Medical Center of Japan, Japan

<sup>9</sup>International Medical Center of Japan, Japan

We analyzed genetic variations of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), considering that it might influence patients' susceptibility to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (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 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found. Out of these, 13 SNPs including one non-synonymous 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 Vietnam, 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. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2); severe acute respiratory syndrome (SARS); SARS associated coronavirus (SARS Co-V); virus receptor; polymorphism; association study

Grant sponsor: Ministry of Health, Labour, and Welfare (in 2004).

\*Correspondence to: Dr. Naoto Keicho, Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan. E-mail: nkeicho-tky@umin.ac.jp

Received 27 December 2004; Accepted 1 April 2005

DOI 10.1002/ajmg.a.30779

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

### INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is an emerging infectious disease characterized by systemic inflammation followed by atypical pneumonia [Peiris et al., 2003b]. Shortly after the initial worldwide outbreak in 2003, SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) was discovered as an etiological agent of SARS [Drosten et al., 2003; Ksiazek et al., 2003; Kuiken et al., 2003; Peiris et al., 2003a], and then angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) was identified as a functional receptor of this newly arrived virus [Li et al., 2003]. More recently, CD209L was reported as being another alternative receptor for the virus, but it appears to be a less efficient entry site than ACE2 [Jeffers et al., 2004].

Virus receptors generally play a key role in the entry of the pathogen into the host cells and may influence development or progression of viral diseases. For example, it is well known that genetic polymorphism of chemokine receptor 5 (CCR5), a co-receptor for human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), influences the natural history of HIV-1 infection. The mutant allele CCR5-Δ32 does not produce a functional protein and has been shown to protect host cells against HIV-1 infection, and progression into acquired immunodeficiency syndrome is delayed after seroconversion takes place [Dean et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996]. By analogy with the above, we considered that genetic polymorphisms of ACE2 could influence SARS-CoV infection or clinical manifestations of SARS.

ACE2 is a homologue of ACE1 and exhibits 40% identity of amino acid sequence to its N- and C-terminal domains [Tipnis et al., 2000]. Similar to ACE1, ACE2 is a metalloprotease that constitutes a renin-angiotensin system. Human full-length ACE2 cDNAs have been cloned already from lymphoma (GenBank accession No. AF241254) [Tipnis et al., 2000], cardiac left ventricle (AF291820) [Donoghue et al., 2000] and testis (AY623811) [Douglas et al., 2004]. Based on published data, it has been said that the ACE2 gene (ACE2) contains 18 exons, and spans approximately 40 kb of genomic DNA on the human X-chromosome. Although ACE2 mRNA expressions were demonstrated in the lung by the method of quantitative reverse transcription-PCR (RT/PCR) [Harmer et al., 2002] and its protein expression was obviously shown by immunohistochemistry [Hamming et al., 2004], full-length ACE2 cDNA has not been cloned from the lung so far. This is considered to be

very likely as being an important replication site of SARS-CoV [Haagmans et al., 2004].

In the present study, we attempted a full-length cloning of *ACE2* cDNA from the human lung and found a new alternative, the 5'-untranslated exon. During this process, an extended region of the original exon 1 was identified in the testis' RNAs. Then, we explored genetic polymorphisms within 19 exons including new regions and the 5'-flanking region of *ACE2* and tried to determine whether the polymorphisms of *ACE2* are associated with SARS in Vietnamese.

## MATERIALS AND METHODS

### Cloning of ACE2 cDNA From the Lung

Cloning was performed by combination of RT/PCR and 5'- and 3'- rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedures, using human lung total RNA (Stratagene, La Jolla, CA) and human testis total RNA (Stratagene) as a control. The total RNAs were reverse-transcribed using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) with oligo(dT)<sub>12-18</sub>, and then cDNA was amplified using Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) with primers ACE2-exon 1s (5'-CAA AGG CTG ATA AGA GAG AA-3') and ACE2-exon 18 as (5'-GAA CAG AAG TCA AAT CCA GA-3') to amplify the transcript of 2721 bp encompassing the original 18 exons of *ACE2* gene on database.

The First Choice RLM-RACE Kit (Ambion, Austin, TX) was used for 5'- and 3'-RACE procedures following the manufacturer's recommendation. Gene-specific primer sets for 5'-RACE were ACE2-5'Outer1 and ACE2-5'Inner1 (5'-GTG GAT ACA TTT GGG CAA GT-3' and 5'-CCT AGA CTA AAA CCT CCT CA-3'), and ACE2-5'Outer2 and ACE2-5'Inner2 (5'-GAA GTA AGA AAG CCT CCA CA-3' and 5'-CTC CTG ATC CTC TGT AGC CA-3'). Gene specific primer set for 3'-RACE was ACE2-3'Outer and ACE2-3'Inner (5'-CAA TGA TGC TTT CCG TCT GA-3' and 5'-ACA CTT GGA CCT CCT AAC CA-3'). Nucleotide sequences of PCR products were directly determined by the automated DNA sequencer (PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA).

To investigate expression of the exons on the 5' side, RT/PCR procedures were performed on the total RNAs of human lung, testis, trachea (Stratagene), primary-cultured bronchial epithelial cells [Lechner and LaVeck, 1985], small intestine (Ambion), and on the human major organ cDNAs (Bio Chain Institute) with the sense primer New-exon (5'-TTC TTA CTT CCA CGT GAC CT-3') or Extended-exon 1 (5'-GCT CAG CAG ATT GTT TAC TG-3') and the antisense primer ACE2-5'Outer1.

### Genomic DNA Samples for the Association Study

An association study between SARS patients and controls was reviewed and approved by local ethics committees. Of 62 cases fulfilling the World Health Organization case definition of probable SARS in Vietnam [WHO, 2003], 5 fatal cases and 3 non-Vietnamese cases were excluded from this study. In the remaining 54 cases, 44 individuals agreed to participate in this study as cases. One hundred and three Vietnamese staff members, who did not develop SARS but may have come in contact with SARS patients in the hospital where nosocomial infection of SARS had arisen, were enrolled as contacts. Furthermore, 50 medical staff members who had been working in a separate building and those considered having no history of contact with SARS patients joined in this study as non-contacts, according to information obtained by questionnaire. Peripheral blood samples of all the subjects were collected and genomic DNA was extracted from the blood cells by a method described elsewhere [Wang et al., 1994].

### Testing for Antibody Response to the SARS-CoV

To detect the antibody to the SARS-CoV in serum, all the blood samples were tested with SARS ELISA (Genelabs Diagnostics Pte. Ltd., Singapore Science Park, Singapore) in accordance with the manufacturer's recommendation [Guan et al., 2004].

### Identification of Polymorphisms Within ACE2 Gene

Of the 44 SARS cases and 103 contacts recruited, a half of the samples were randomly selected for searching polymorphisms within the *ACE2* gene. PCR primers were designed to amplify 19 exons including the new alternative exon, exon-intron boundaries and approximately 1,000 bp of the 5'-flanking region of the new exon, reaching 2,000 bp upstream of the 5'-end of the original exon 1 (Table I). Genomic DNA of each sample was subjected to PCR amplification followed by direct sequencing.

### Genotyping of Identified Polymorphisms

Non-synonymous nucleotide substitutions and other variations with a minor allele frequency higher than 0.05 were subjected to genotyping in all SARS cases, contacts and non-contacts. Consequently, one novel non-synonymous substitution, two possible non-synonymous polymorphisms in the database (dbSNP identification nos. rs4646116 and rs11798104), and variations of 3'-UTR in exon 18 (position 39844) and of intron 3 (rs2285666, position 8789) were genotyped by the combination of direct sequencing method and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis or PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

### Statistical Analysis

Disease associations were assessed by the chi-square test. The *P* values less than 0.05 were considered significant in all the tests and data analysis was carried out using JMP version 5 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## RESULTS

### Full-Length ACE2 cDNAs From the Lung and Expression of the Transcripts

By the use of the RT/PCR encompassing all known exons of *ACE2* and 3'-RACE method, we could amplify *ACE2* cDNA as PCR fragments completely corresponding to the published sequence of *ACE2* cDNA (AF241254). The 5'-RACE procedure on the total RNA of the lung demonstrated the presence of a new alternative exon (registered as AB193259), which consisted of a segment between position -1141 and -942 and was connected to the 5'-end of the original exon 1. The 5'-end of transcripts was extended to position -1141 repeatedly by both sets of gene-specific primers. In addition, novel 65 nucleotides on the 5'-side (registered as AB193260), extending the 5'-end of the original exon 1 upstream, were amplified from the total RNA of testis. A schematic diagram of the exon-intron structure is shown in Figure 1.

RT-PCR revealed that the expression of the new alternative exon could be seen not only in the lung but also in the testis, trachea, bronchial epithelial cells, small intestine, and various major organs (data not shown). The new extended region was expressed not only in the testis but also in other organs including bronchial epithelial cells and the small intestine (data not shown).