

論文の内容の要旨

論文題目 アンギオテンシン変換酵素（ACE）と ACE2 の遺伝的多型と
重症急性呼吸器症候群（SARS）重症化機構の探究

指導教員 小池和彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

糸山 智

重症急性呼吸器症候群（SARS）は 2003 年に世界的に流行した新興感染症である。SARS は発症した場合に死亡率が約 10%に達するため、重症化機構を含めた病態の解明が急務である。感染症の重症化の要因を考える場合、大きくウイルス側の要因と宿主側の要因に分けられる。原因病原体である SARS-CoV に同じように曝露されながら、発症者の 70~80%は自然軽快する一方で、致死的な肺炎に発展する症例もあり、SARS 重症化には宿主側の要因とその個体差の関与が予想された。

重症化した SARS の肺病変は、ARDS の状態である。急性期の ARDS は、血管内皮細胞と気道上皮細胞の傷害が重要な要素と理解されており、細胞のアポトーシスや炎症細胞の浸潤が関与すると考えられている。

レニンアンジオテンシン系(RAS)は、人体における主な血圧の調節機構であり、主に肺の血管内皮から分泌される ACE により、AT-II が産生される。AT-II は強い血管収縮作用を示すが、一方で AT-II が肺局所において、血管透過性の亢進、肺胞上皮細胞のアポトーシスや炎症細胞の浸潤を促進するなど、RAS の構成要素である AT-II は、ARDS の炎症病態にも重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。

また、RAS の新たな構成要素である ACE2 が、SARS-CoV のウイルスレセプターの 1 つであることが報告された。ACE2 もウイルスレセプターとしての働きを介して、SARS の病態に影響を与える可能性が考えられる。さらに ACE2 は RAS において、AT-II を減少させる。ACE は AT-II を増加させ、両者は AT-II 量の調節に関して、拮抗的に働く。このことから、ウイルスレセプターとしての働きと AT-II の量を負の方向に調節する働きをもつ ACE2 が、正の方向へ調整する ACE と拮抗しながら、SARS の病態と重症化に関与している可能性が推測される。

個体差という視点からも、ACE 遺伝子のイントロン 16 に存在する deletion(D)/insertion(I)の遺伝的多型の D アリルが、ARDS の発症と予後に関連することが報告されている。さらに、この多型の D アリルと末梢血液中の ACE 活性との関係も知られており、D 型が機能的に ACE の高発現型であり、ARDS の病態増悪に関与している可能性が推測される。

以上より、拮抗する ACE と ACE2 の活性のバランスに基いて、RAS は AT-II などを通じて SARS の重症化機構に関与する可能性があり、遺伝的多型にもとづく RAS の個体差が SARS の発症と重症度に関与するのではないかと考え、以下の 2 つの作業仮説を立てた。

1. ACE 遺伝子の D/I 多型は機能的に意味があり、SARS の重症化 (ARDS) に関与している
2. ACE2 の遺伝的多型が、SARS-CoV のレセプターとして、あるいは RAS 系の構成要素として、SARS の病態に影響を与える

この2つの仮説の検証を、SARSの流行が認められた国の1つである、ベトナムとの共同研究により行った。ベトナム国内の流行は、発端となった1症例から、主に病院内感染により、短期間に感染が拡大した。ウイルスへの曝露の状況が比較的均一で、しかも患者のほとんどがベトナム人であったことから、ベトナムの患者集団と同一病院の接触非発症コントロール集団はSARSと遺伝的多型の関係の検証に適した集団であった。

SARS発症群44人、SARS患者と接触したが発症しなかった接触コントロール群103人、非接触コントロール群50人を対象とし、さらにSARS発症群を、酸素投与を指標に、低酸素血症群22人、非低酸素血症群22人に分けた。対象者の末梢血よりゲノムを抽出し、遺伝的多型の解析に用いた。また血漿中の抗SARS-CoV抗体を測定した。この重症度分類の方法は、胸部レントゲン写真における肺病変の広がりとの相関を確認することによって、妥当性があると判断した。

ACE遺伝子のD/I多型はPCR法でタイピングを行った。解析の結果、非低酸素血症群と比較して低酸素血症群においてDアリの頻度が有意に高かった($p=0.013$)。SARS発症、接触非発症、非接触非発症の群間ではこの差はなかった。さらに年齢、性別、SARS患者との接触の程度も、SARSの発症や重症化との関連はなく、Dアリの独立したSARS重症化の危険因子であることが示された。

仮説2の検証について、ヒトの肺組織からのACE2全長cDNAクローニングにより、気道における発現エクソンを確認したうえで、全ての発現エクソンに存在する遺伝的多型をスクリーニングし、SARSとの関連解析を行った。スクリーニングによって13ヶ所の新しいSNPsを含め、19ヶ所のSNPsを同定したが、いずれのSNPsも、SARSの感染や発症との関係を見出せなかった。

しかし、ACE2遺伝子cDNAクローニングの過程で、5'-RACEによりエクソン1よりも5'側上流に新しいエクソンを発見し、ACE2遺伝子には2つの転写開始点を示された。また、RT-PCRにより、SARS-CoVの複製の場と考えられている

肺や小腸において、その発現が確認された。この新エクソンは非翻訳領域であり、ACE 蛋白の構造に直接影響を与えないが、mRNA の安定性やプロモーター活性の違いなどを介して、ACE2 蛋白の発現量に影響を与えるかもしれない。

さらに、ACE 遺伝子 D/I 多型の D アリルと SARS の重症化が関連する結果を受けて、この多型の機能的意義の検討を試みた。全身を循環する RAS とは独立して、臓器局所の RAS の存在が知られ、RAS の鍵となる酵素である ACE は主に肺の血管内皮で発現することからも、ARDS が起こる肺局所における D/I 多型の ACE 発現に与える影響の検討が必要と考えた。

本研究では、ACE 遺伝子 D/I 多型ヘテロの細胞において、D/I 多型の各アリル由来の mRNA の発現比を測定した。この検討には、ヒト末梢血液白血球、培養 HUVEC、培養気管支上皮細胞より抽出した total RNA を使用した。まず、D/I 多型の各アリル由来の mRNA を RT-PCR により DNA として増幅した。そして、イントロンの多型である D/I 多型とほぼ 100%連鎖不平衡であるエクソン上の A/G の SNP において、D/I 多型の I と連鎖不平衡の SNP の G のみが切断される酵素を用いて RFLP を行った。PCR の相補鎖プライマーを蛍光色素で標識しておき、PAGE で分離した各アリル由来の PCR-RFLP 産物の量を蛍光度で測定し、D/I 比を算出した。

この実験系は同一条件の細胞集団の mRNA の発現比を測定するので、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によると考えられる。さらに、RT に使用する total RNA、PCR のサイクル数、PCR の DNA polymerase、そして RFLP の酵素を変えて比較検討することによって、この実験系を用いてサンプル間で D/I 比を比較することができることを確認した。

ヒト末梢血白血球は 10 サンプル中 3 サンプルで ACE 遺伝子 D/I 多型がヘテロであった。HUVEC は 12 サンプル中 6 サンプル、気管支上皮細胞は 50 サンプル中 26 サンプルで D/I ヘテロであった。それぞれのサンプルで実験を行ったところ、

末梢血白血球における ACE 遺伝子アリル特異的 mRNA の D/I 比は 1.63 であり、過去の報告の D/I=1.79 に近似した。それに対して、培養 HUVEC と培養気管支上皮細胞においては、その発現比がそれぞれ 3.57、3.02 と明らかに高かった。D アリルの ACE 発現に与える影響が、気管支上皮や血管内皮といった肺局所において、これまでに理解されていた以上に大きい可能性が示唆された。さらに、HUVEC の 6 サンプル中の 2 サンプルと、気管支上皮細胞の 26 サンプル中の 5 サンプルにおいて、他のサンプルと比較して mRNA の D/I 比が突出して高かった。今回発見したこのような現象は、これまでには報告がない。長年の研究にも関わらず、イントロンに存在するこの D/I 多型が ACE の発現に影響を与える機序は解明されていない。今回観察された現象からも、ACE の発現に個体差を与える因子として、D/I 多型以外の因子の存在を想定し探索する必要がある。

本研究の遺伝的多型と SARS の関連解析から、ACE 遺伝子 D/I 多型の SARS 重症化への関与が支持された。さらにこの D/I 多型は ACE 発現に、肺局所においてより大きい影響を与える可能性が示された。ACE 活性の個体差が病変局所の AT-II の産生量の個体差を生み、サイトカイン様の働きを示す AT-II が血管透過性の亢進や炎症細胞の浸潤、細胞のアポトーシス促進を介して ARDS を発症する傾向を強めるかもしれない。最近の報告では、SARS-CoV の spike 蛋白の刺激により、レセプターである ACE2 の発現が抑制されることと、ACE と ACE2 のアンバランスが AT-II の量の変化を生み、肺障害の程度に影響を与えることが示されており、これらのことを踏まえると、SARS-CoV の感染により ACE2 の発現が抑制されると、ACE を高発現する D アリルを持つ個体では、よりバランスが ACE 側に傾き、ARDS を発症する傾向が強くなる可能性も推測される。

このような研究から、RAS が ARDS 発症機序に関与することが、今後、より一層明確になれば、治療にも新たな道が開かれるのではないかと期待される。