

論文の内容の要旨

論文題目 重症急性呼吸器症候群と抗ウイルス蛋白オリゴアデニル酸合成酵素 1 遺伝子多型の関連解析及び気道上皮細胞における発現様式の研究

指導教員 長瀬 隆英 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

濱野 栄美

肺の自然免疫は、呼吸によって気道に吸着する病原体に対する第一線の生体防御機構として重要な役割を担っている。呼吸器感染症は、このような病原体と宿主の相互作用で生じ、ウイルスや細菌などの病原体は宿主内で増殖しようとし、宿主はそれを様々な生体防御機構で排除しようとする。ある病原体に曝露された時、感染の成立や発症、重症化の有無などの感染症の辿る道筋の違いには、病原体側の要因と宿主側の要因が複雑に関係している。

重症急性呼吸器症候群(SARS)は 2002 年秋から 2003 年春にかけてアジアを中心に世界的に流行が認められた新興感染症で、病原体として SARS コロナウイルス(SARS-CoV)感染が新規に同定され、約 10%の高い致死率を示した。我々は、SARS-CoV に対する感受性に関連する宿主の遺伝的要因として、自然免疫系の

一部を担う I 型インターフェロン(IFN)により誘導される抗ウイルス蛋白の遺伝的多型に注目した。I 型 IFN はウイルス感染が起きた細胞から産生され、ウイルス感染に対する宿主の初期防衛反応において重要な役割を果たす。I 型 IFN に誘導される抗ウイルス蛋白として、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素(*OAS*)、二本鎖 RNA 依存性蛋白リン酸化酵素(*PKR*)、Myxovirus resistance-A(*MxA*)蛋白がよく知られている。SARS-CoV は RNA ウイルスであり、複製中間体として二本鎖 RNA を生じるため、SARS-CoV 感染は I 型 IFN の産生を誘導すると考えられる。本研究では、SARS-CoV 感染症においても I 型 IFN で誘導される細胞内抗ウイルス蛋白が宿主の自然免疫として感染防御に働くという仮説を立てた。他のウイルス感染症との関連が既に報告されている遺伝的多型を有する遺伝子を候補遺伝子として、抗ウイルス蛋白遺伝子の SNP が SARS-CoV 感染において疾患感受性に寄与するという作業仮説を立て、症例-対照関連解析により SARS-CoV 感染との関連を検討した。

本研究はベトナムとの国際共同研究として行われた。ベトナム人 SARS 患者 44 例、患者収容病院の職員で SARS 患者との接触歴があるが SARS を発症しなかった接触対照者 103 例を対象に抗ウイルス蛋白遺伝子の一塩基多型(SNP)解析を行った。解析した SNP は *OAS1* exon3 A/G (rs3741981), intron5 A/G (rs10774671), exon6 A/G (rs2660), *MxA* promoter -88 G/T (rs2071430), *PKR* promoter -168 C/T (rs12992188)であった。接触対照者 103 例のうち血漿中抗 SARS-CoV 抗体価陽性を示した 16 例を SARS-CoV 不顕性感染者とみなし、SARS 患者 44 例と併せた 60 例を SARS-CoV 感染者と考え、残りの抗 SARS-CoV 抗体価陰性 87 例を接触非感染者とした。SARS-CoV 感染者群と非感染者群の比較では、*OAS1* exon3 A/G, intron5 A/G, exon6 A/G とともに SARS-CoV 感染者群で AA genotype が少なく ($p=0.0163$, $p=0.0215$, $p=0.0215$)、A アリルの頻度が有意に低かった ($p=0.0156$, $p=0.0176$, $p=0.0176$)。 *OAS1* exon3 A/G-intron5 A/G-exon6 A/G の 3 つの SNPs は強い連鎖不平衡にあり、intron5 A/G と exon6 A/G は完全に一致 (連鎖不平衡係数

$|D'|=1$, $r^2=1$)、exon3 A/G と intron5 A/G, exon6 A/G の連鎖不平衡係数 $|D'|=0.931$, $r^2=0.530$ であった。*OAS1* exon3-intron5-exon6 のハプロタイプとして、A-A-A, G-A-A, G-G-G の3つが推定された。SARS-CoV 感染者群と非感染者群でのハプロタイプ頻度から A-A-A が感染抵抗性、G-G-G が疾患感受性と考えられた。

OAS はウイルス複製により生じる二本鎖 RNA (dsRNA) の存在により活性化され、アデノシン三リン酸から 2'-5' 結合オリゴアデニル酸(オリゴ A) を合成する。このオリゴ A が非活性型 RNase L に結合し、これを活性化させ、ウイルスおよび局所の RNA を分解することで、抗ウイルス作用を発揮する。OAS には OAS1, OAS2, OAS3 の3つのアイソザイムがあるがいずれもオリゴ A 合成活性を有し、ゲノム上にクラスターを形成している。関連解析で検討した *OAS1* の3つの SNP が近傍の *OAS* 遺伝子の発現にも影響を与えている可能性を検討するため、tagged-SNP を用いてベトナム人集団での *OAS1* 遺伝子周囲の連鎖不平衡の解析を行った。*OAS1* の3つの SNPs は強い連鎖不平衡にあるが、前方は *RPH3A* との間、後方は *OAS3* exon6 以降で連鎖不平衡のとぎれが認められた。続いてこの3つの SNP 以外に疾患感受性に関連する SNP が *OAS1* 遺伝子上にあるかを検討した。プロモーター領域を含む *OAS1* 遺伝子領域の多型スクリーニングにより見出された2箇所 SNPs (intron1 A/C と intron3 A/G) についてに対し疾患関連解析を行ったが、SARS 発症・SARS-CoV 感染ともに有意差は認められなかった。これらの結果から、*OAS1* exon3・intron5・exon6 の SNPs が SARS-CoV 感染に関連する遺伝子多型であり、他に存在する機能的に重要な遺伝子多型との連鎖不平衡による二次的な結果では無いと考えられた。

OAS1 遺伝子は6つの exon からなるが、その mRNA には大きさの異なる3つの転写産物 E16・E18・9-2 が報告されており、それぞれ後方2つの exon での alternative splicing により区別される。E16 は exon5 までを含む転写産物で p40 蛋白に翻訳され、E18 は exon6 を含み p46 蛋白に翻訳される。9-2 は exon6 の splice-acceptor site が E18 と異なっており、exon6 の塩基配列の読み枠が E18 と異

なるより大きい p48 蛋白をコードする。これら 3 種の OAS1 蛋白はいずれもオリゴアデニル酸合成酵素活性を有しているが、p48 蛋白だけはその C 末端側に Bcl-2 homology domain 3 (BH3)を有し、Bcl-2 ファミリーの抗アポトーシス蛋白と結合することによって、細胞をアポトーシスに誘導すると報告された。最近、OAS1 遺伝子 intron5/exon6 の splice-acceptor site に A/G SNP が存在し、この SNP によって alternative splicing が制御されることが報告された。この A/G SNP が A allele であるとき本来 splice-acceptor として最適な AG 配列が AA に置き換わるため exon6 の splice-acceptor site が後方へ移動し、9-2 transcript が産生されることが示された。

そこで SARS-CoV の複製の場のひとつである気管支上皮細胞の培養刺激実験を行い、OAS1 ハプロタイプによる OAS1 transcript の種類と量の違い、さらにアポトーシス誘導能の違いの有無を検討した。まずヒト気管支上皮細胞でも intron5 A アリルの時すなわち exon3-intron5-exon6 が A-A-A または G-A-A ときのみ 9-2 transcript が産生されることを RT/PCR で確認した。更に各 transcript に特異的なプライマーを設計し、気道上皮細胞に対し IFN 刺激を与え、各 transcript の発現を個別に検出したところ、G-G-G の細胞では E18 だけが強く認められ、それとは逆に A-A-A, G-A-A の細胞では E18 以外の transcripts の発現が確認された。OAS1 mRNA の定量的評価の目的で real-time PCR を行ったところ、I 型 IFN により誘導される OAS1 全体量、OAS2、OAS3 はハプロタイプ間で差は認められなかった。9-2 transcript 量は G-G-G では非常に低値であり、一方 A-A-A, G-A-A では著明に誘導された。気道上皮細胞に対する I 型 IFN 刺激および NE 刺激アポトーシス誘導実験では、ハプロタイプ A-A-A で最も強くアポトーシスが誘導され、G-G-G で最も弱かった。関連解析の結果、A-A-A が感染抵抗性、G-G-G が感染感受性、G-A-A が中間的であったことと、それぞれのハプロタイプを有する細胞の 9-2 産生量・アポトーシス誘導能とは非常によく一致していた。9-2 transcript からは、アポトーシス誘導能をもつ p48 蛋白が翻訳されるため、アポ

トーンシス誘導能も splice-acceptor site の SNP により制御を受けるのではないかと推測された。オリゴアデニル酸合成酵素活性はこの SNP が G アリルの方が高く、A アリルの方が低いと報告されているが、関連解析結果で A アリルの方が感染抵抗性であることを説明するには、A アリルのみが有する 9-2 transcript の産生を介したアポトーシス誘導能がウイルス感染抵抗性に寄与するのではないかと考えられた。ハプロタイプ A-A-A と G-A-A が、splice-acceptor site の SNP が共に A であるのに 9-2 transcript の発現量とアポトーシス誘導能に違いがあるように見える原因に関しては例数を増やし、今後の検討が必要であると考えた。

本研究の遺伝子解析と発現解析の結果より、ヒト気管支上皮細胞での I 型 IFN による *OAS1* 9-2transcript、p48 の発現を介したアポトーシスの誘導が、曝露直後の SARS-CoV 感染細胞を破壊し、ウイルス感染が全身的に広がることを阻止して SARS-CoV 感染・SARS 発症に影響を与える可能性が考えられた。外因性 IFN は SARS-CoV の増殖を抑えることが細胞株および実験動物での感染実験で報告されており、I 型 IFN は SARS に対する有望な治療薬と考えられている。*OAS1* 遺伝子多型は、IFN 治療効果やウイルス曝露後の発症予防に対し指標になりうると考えられた。また OAS はウイルス感染に対し広く誘導されるため、*OAS1* 遺伝子多型の研究は他のウイルス感染症の予後や重症化機構の解明にも発展させることが出来ると考えられた。