

新型コロナウイルス感染症の重症化予測に 関するバイオマーカーの開発と応用

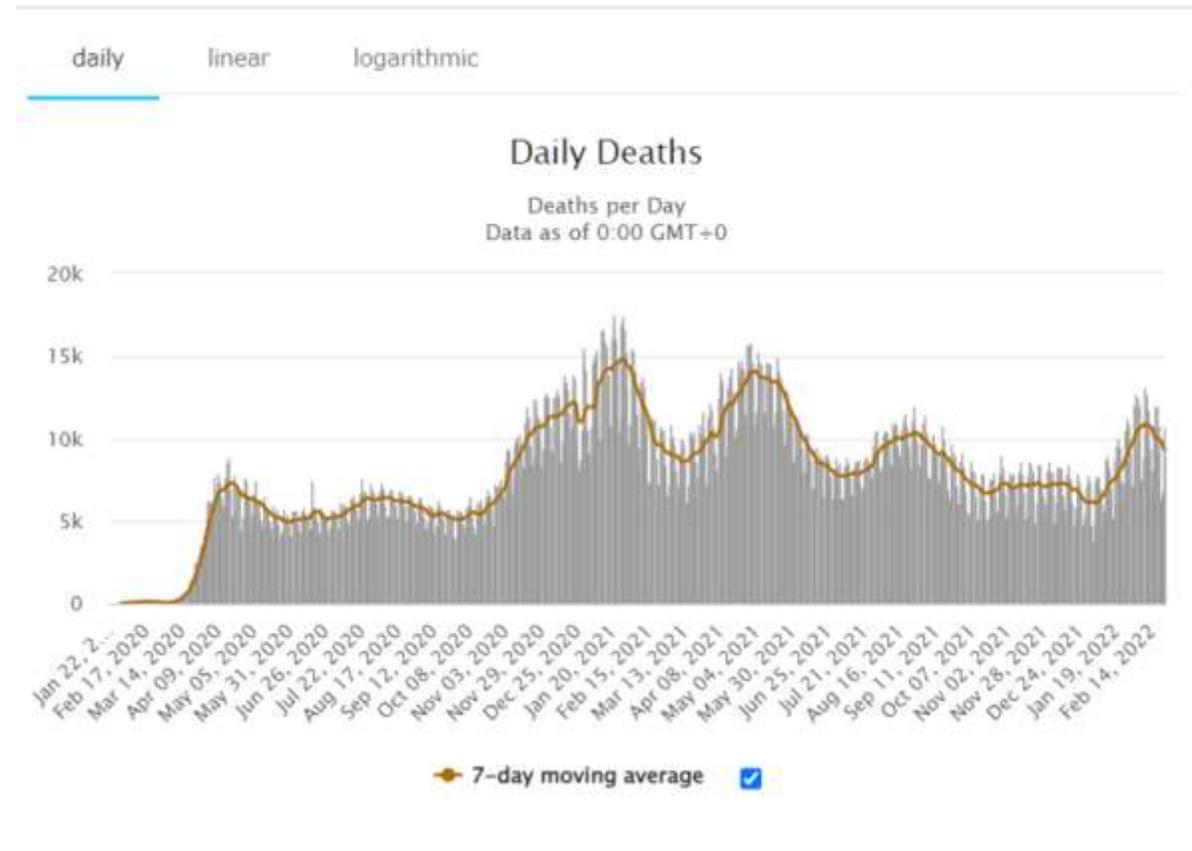
杉山真也

国立国際医療研究センター
研究所ゲノム医科学プロジェクト

COVID-19 海外動向

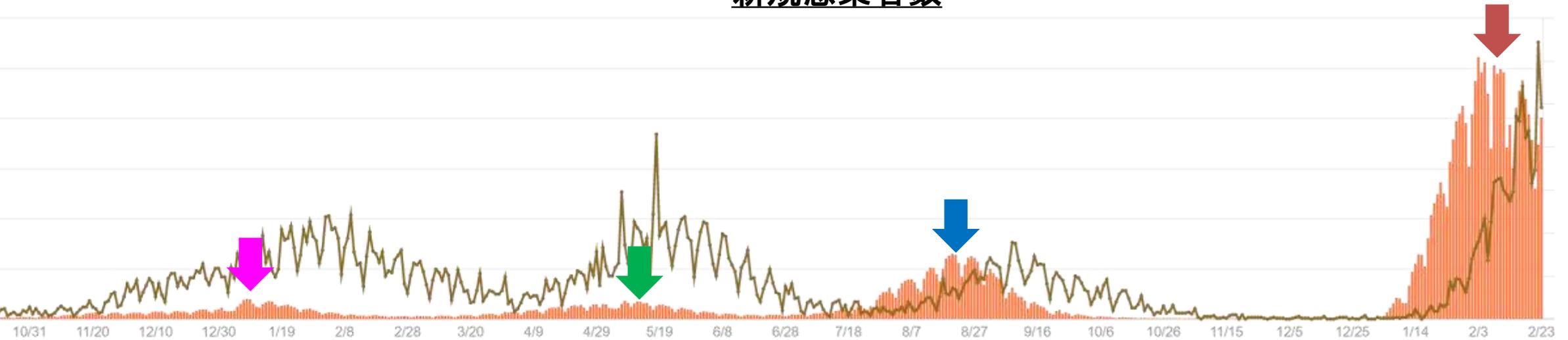
COVID-19 CORONAVIRUS PANDEMIC

Last updated: February 23, 2022

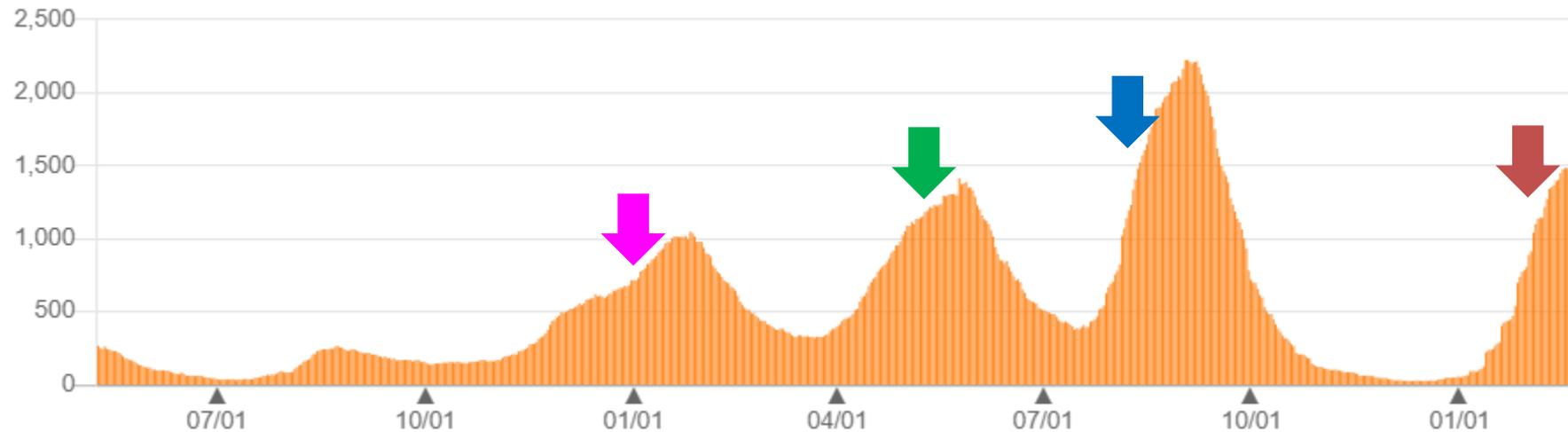


COVID-19国内動向

新規感染者数



人工呼吸器、ECMO利用患者数

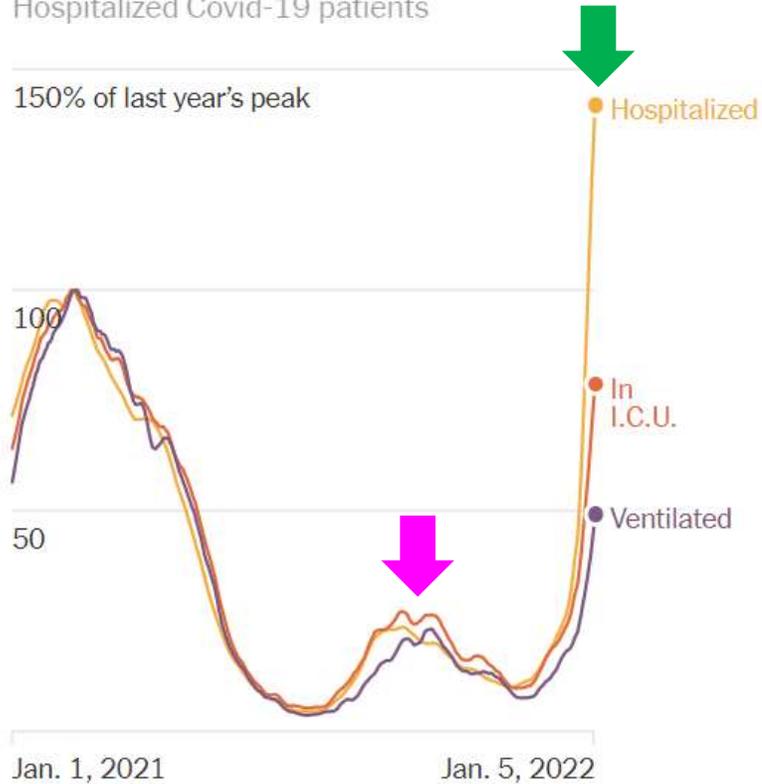


オミクロンの感染状況(米国)

New York City

Hospitalized Covid-19 patients

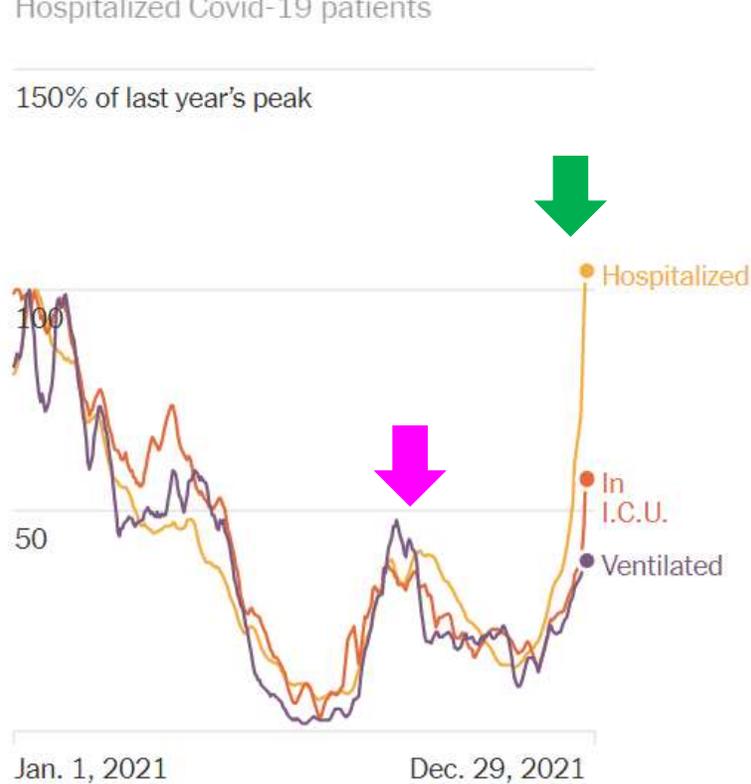
150% of last year's peak



Washington, D.C.

Hospitalized Covid-19 patients

150% of last year's peak



Chicago

Hospitalized Covid-19 patients

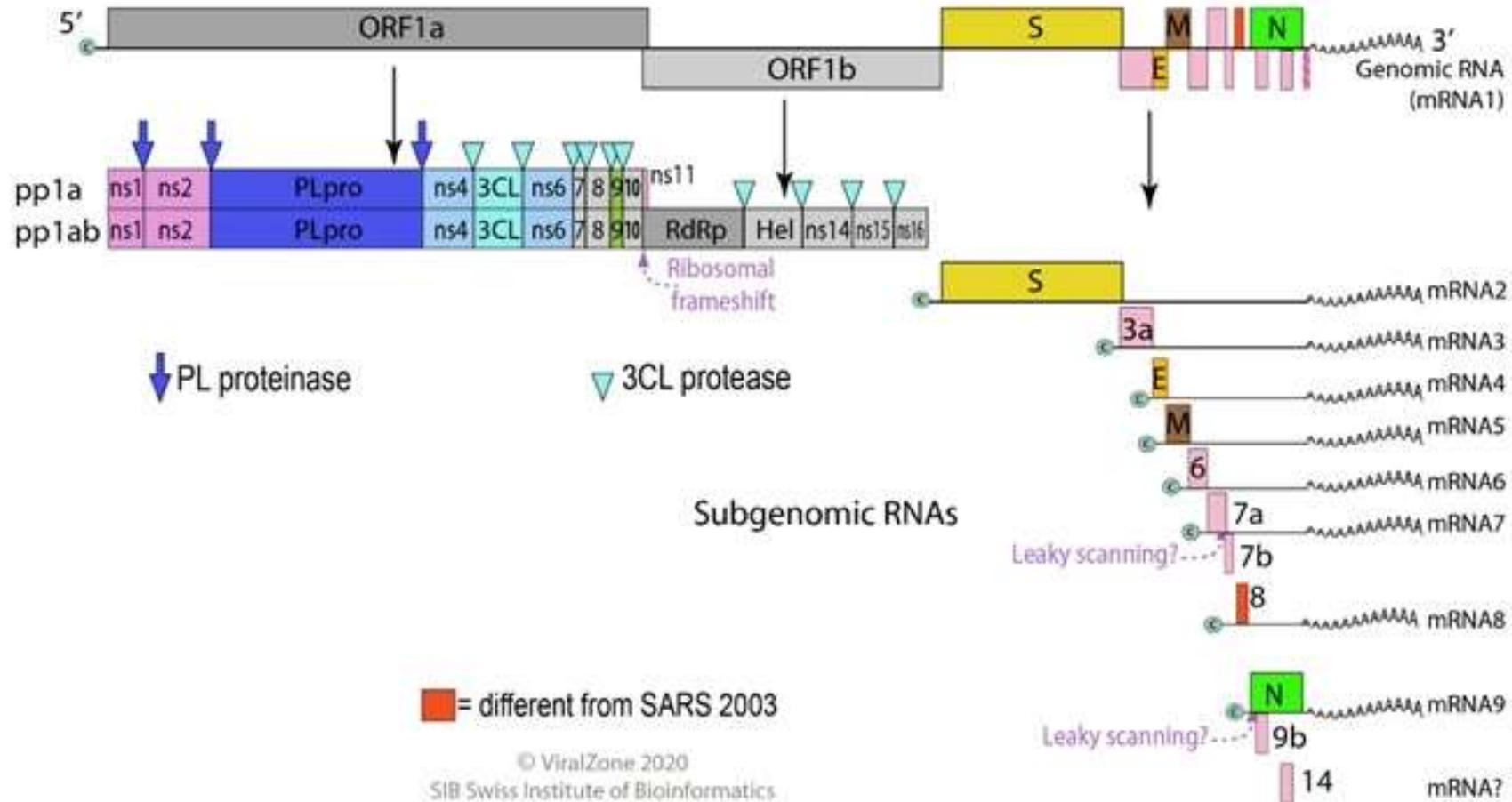
150% of last year's peak



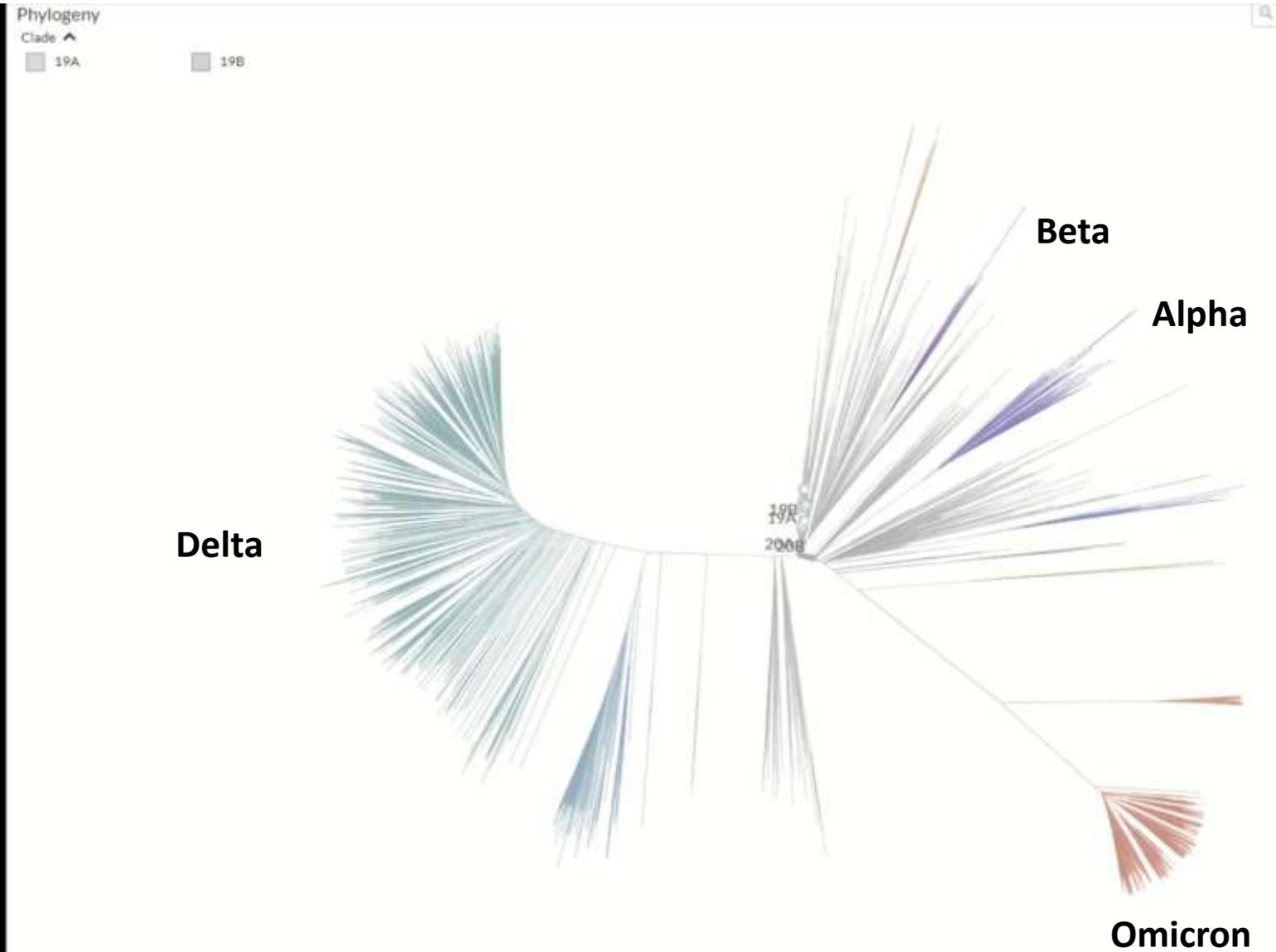
2022.01.05

<https://www.nytimes.com/>

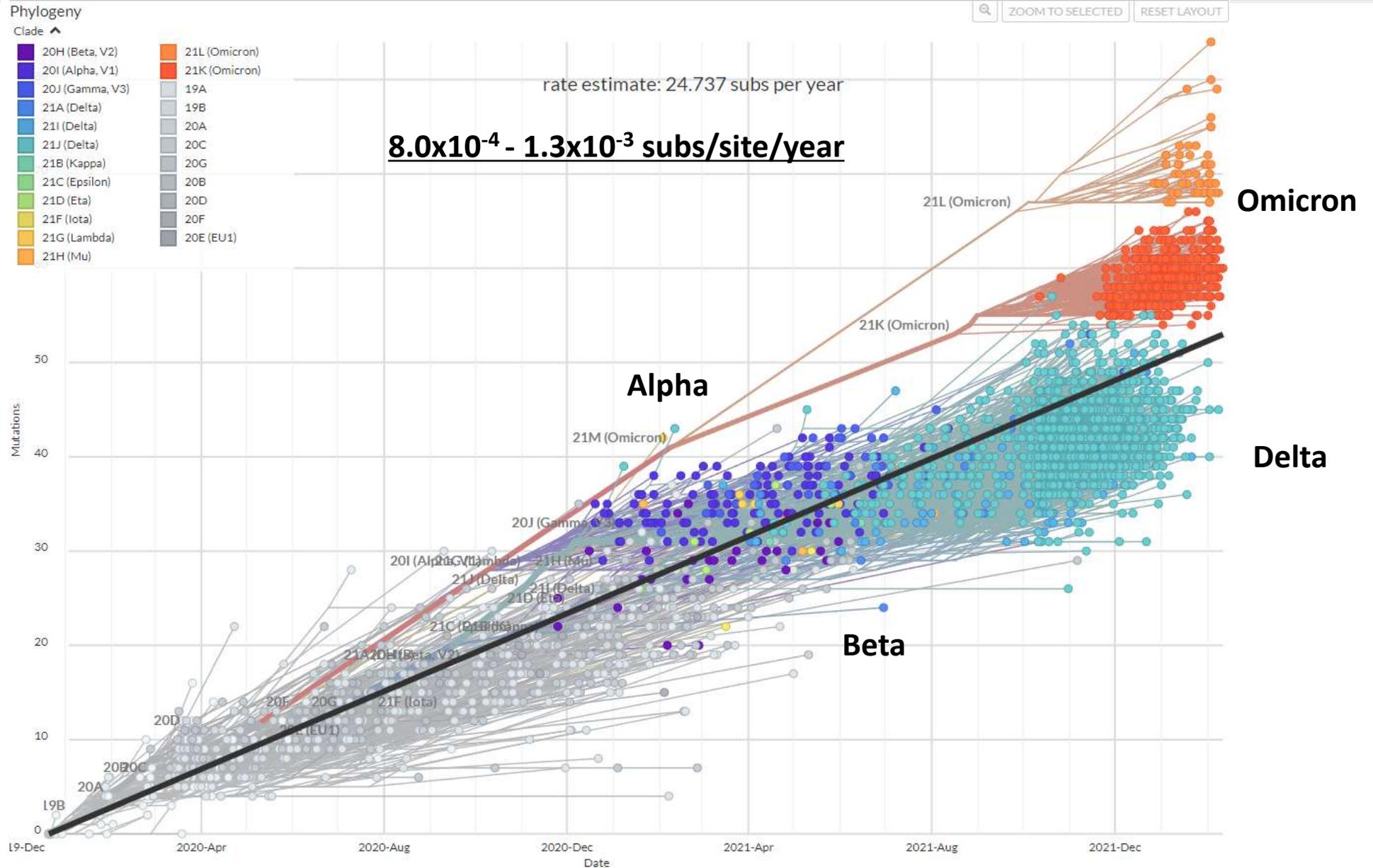
SARS-CoV-2



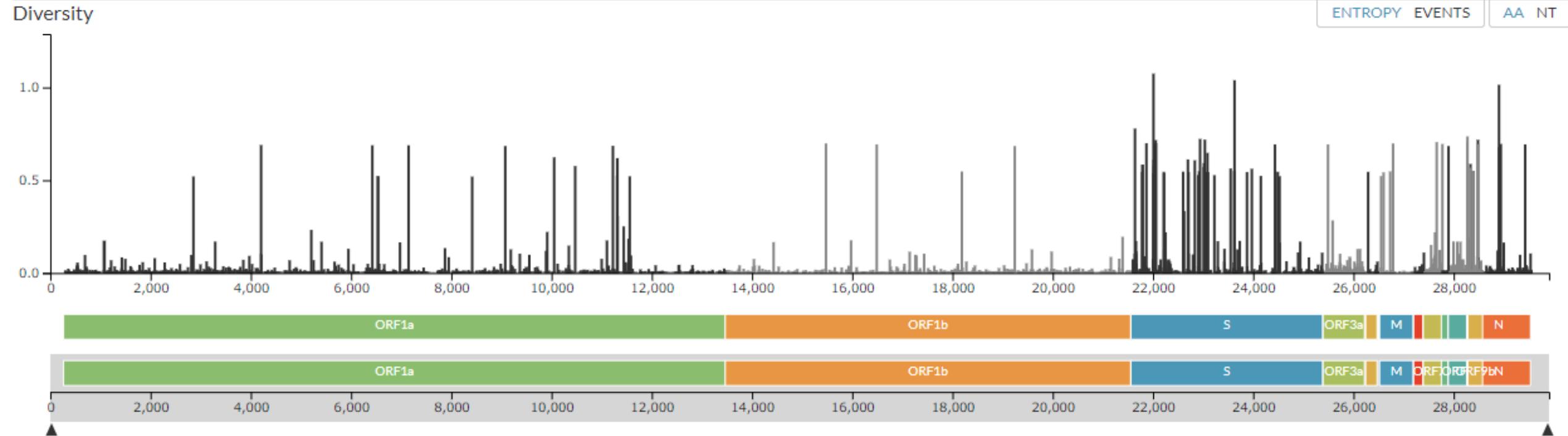
CoV2 ゲノムと採取日に基づいた系統樹



CoV2の変異速度

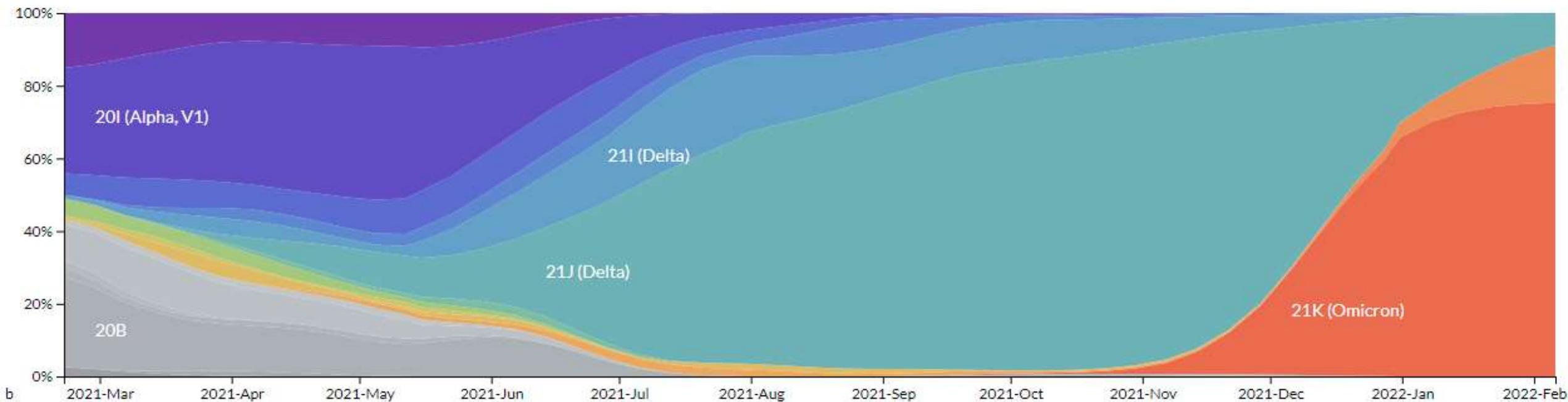


CoV2 ゲノム全体での変異導入部位



CoV2の各系統が感染全体に占める割合

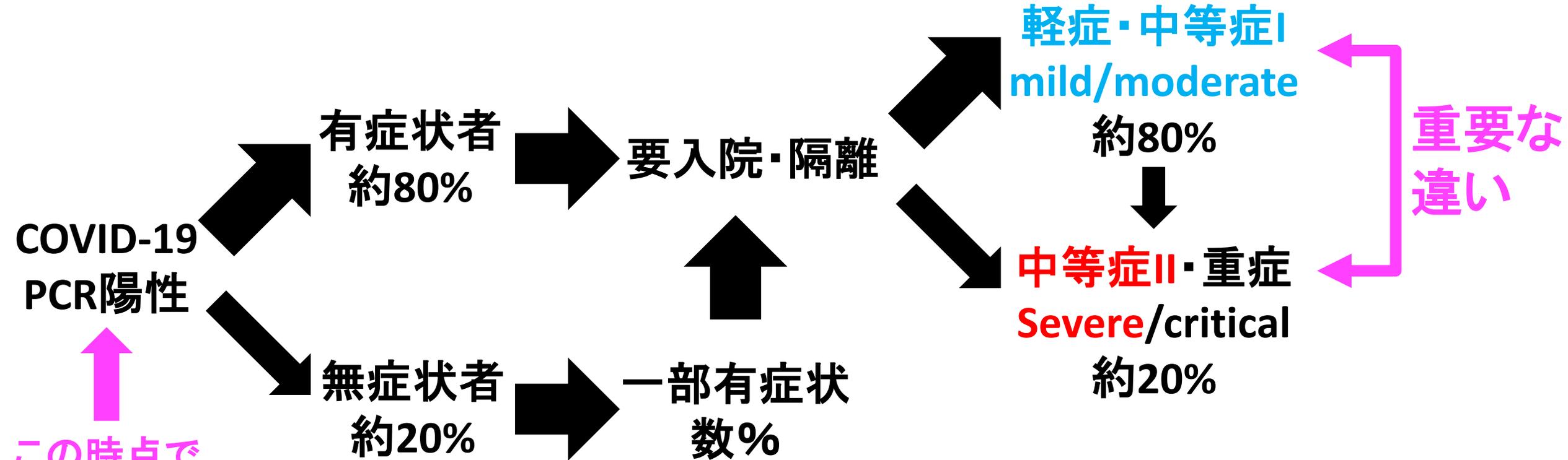
Frequencies (colored by Clade)



NIHガイドライン(米国)

分類	Stage	Characteristics
無症候	Asymptomatic or presymptomatic infection	<ul style="list-style-type: none">Positive test for SARS-CoV-2 but no symptoms
軽症	Mild illness	<ul style="list-style-type: none">Varied symptoms (eg, fever, cough, sore throat, malaise, headache, muscle pain) but no shortness of breath, dyspnea, abnormal imaging
中等症I	Moderate illness	<ul style="list-style-type: none">SpO₂ ≥ 94% and lower respiratory disease evidenced by clinical assessment or imaging
中等症II	Severe illness	<ul style="list-style-type: none">SpO₂ < 94%, PaO₂/FiO₂ < 300, respiratory rate > 30 breaths/min, or lung infiltrates > 50%
重症	Critical illness	<ul style="list-style-type: none">Respiratory failure, septic shock, and/or multiorgan dysfunction

背景



重要な
違い

「問題点」

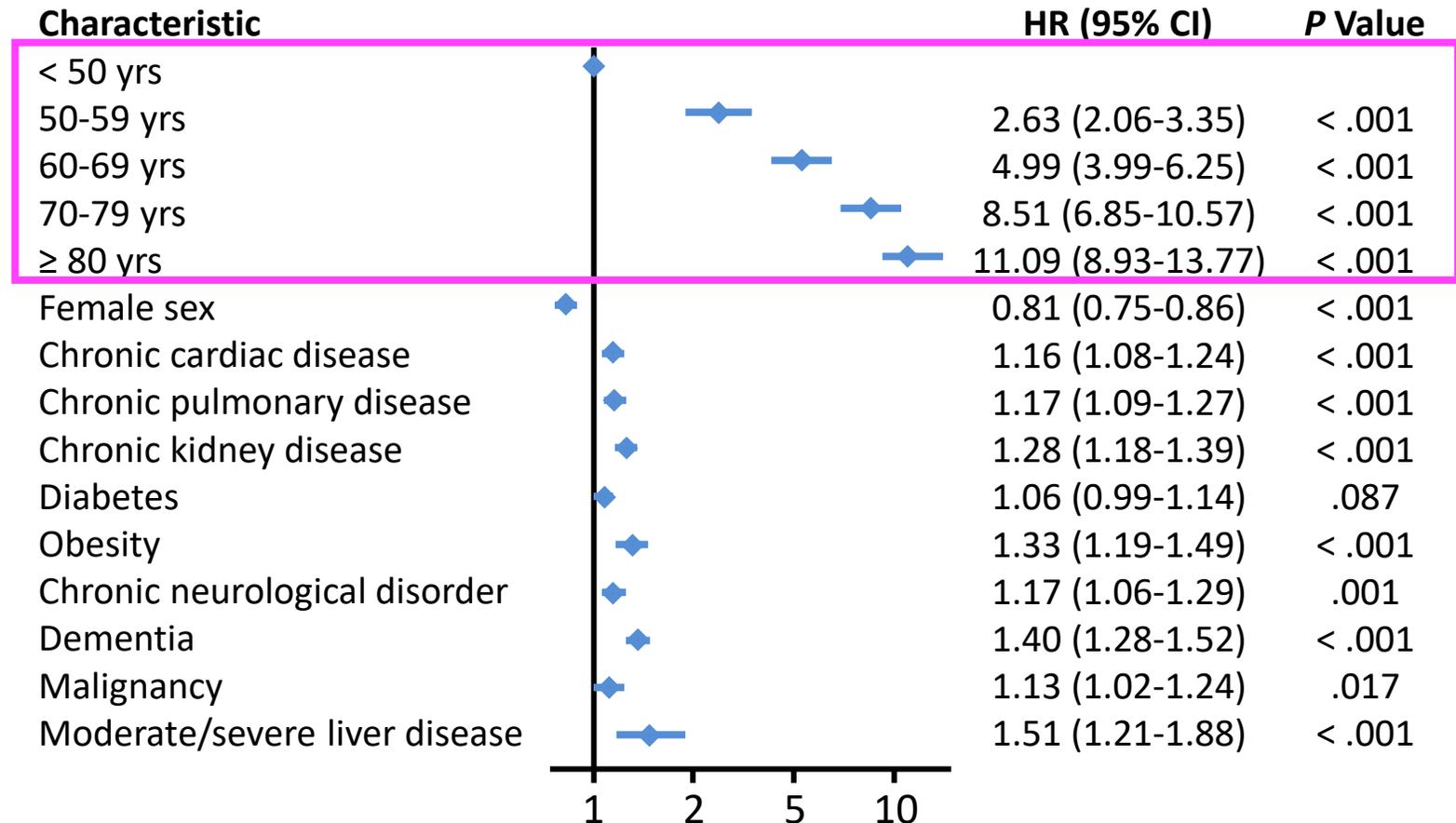
- 入院患者の増加と医療崩壊のリスク
- 軽症から急激に重症化
- 突然死の発生

- 医療資源の有効活用
- 重症患者の囲い込み

COVID-19重症化に関わる因子(英国)

- Prospective observational cohort study of hospital admissions in England, Wales, and Scotland during February 6 - April 19, 2020 (N = 20,133)
 - Significantly increased risk of mortality among **older patients, men, and those with chronic comorbidities**

Multivariate Survival Analysis



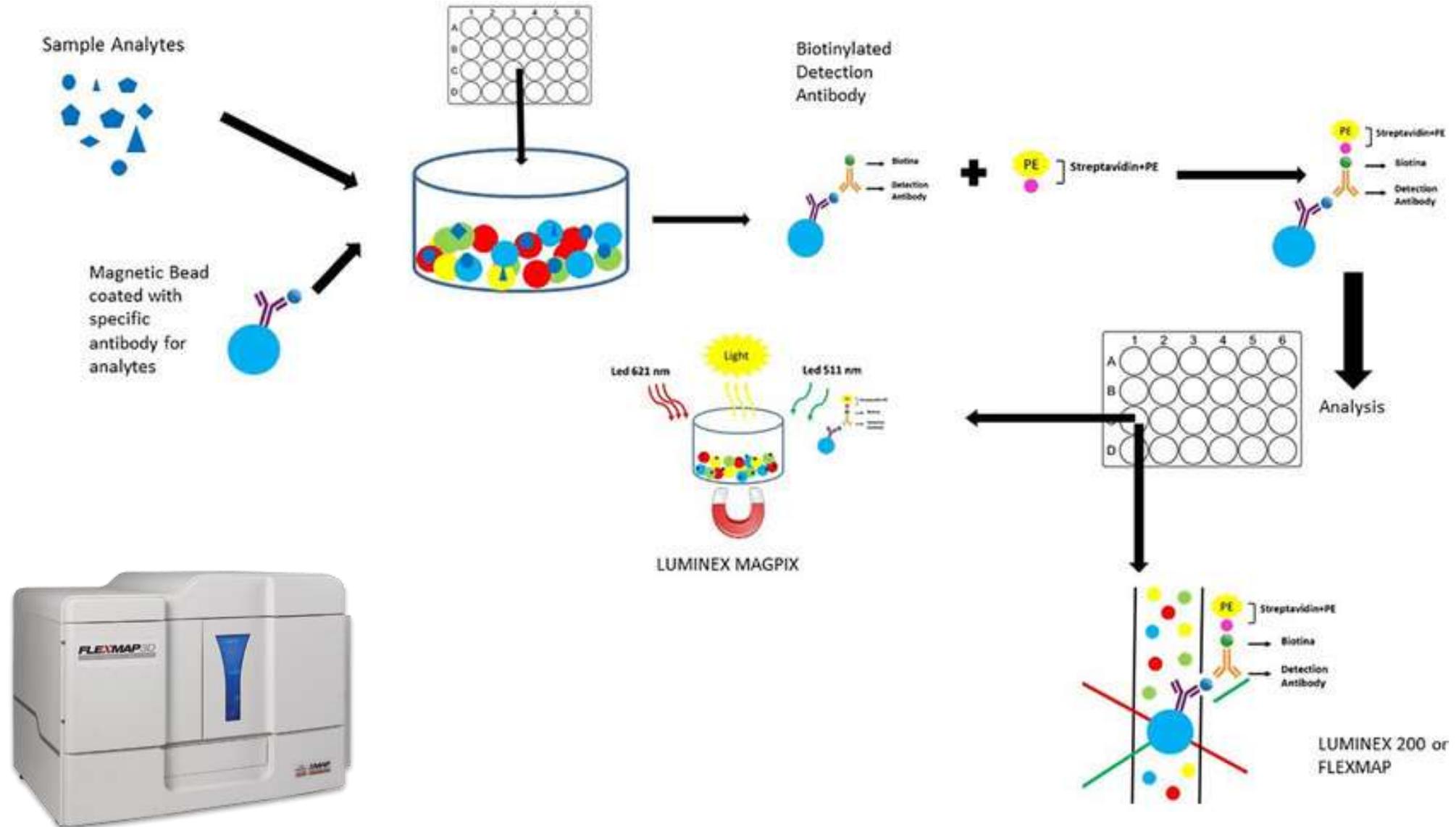
目的

- **血液検査で迅速、簡便な診断**
- **液性因子の網羅的な解析**
- **重症化の経時的な変化を捉える**

檢討項目一覽

• CCL1	• CX3CL1	• IFN- α 2	• IL-1 α	• FGF2
• CCL2	• CXCL1	• IFN- γ	• IL-1 β	• G-CSF
• CCL3	• CXCL2	• IFN- λ 1	• IL-2	• GM-CSF
• CCL4	• CXCL5	• IFN- λ 2	• IL-3	• HGF
• CCL5	• CXCL6	• IFN- λ 3	• IL-4	• LIF
• CCL7	• CXCL9		• IL-5	• M-CSF
• CCL8	• CXCL10		• IL-6	• MIF
• CCL11	• CXCL11		• IL-7	• PDGF-BB
• CCL13	• CXCL12		• IL-8	• SCF
• CCL15	• CXCL13		• IL-9	• SCGF- β
• CCL17	• CXCL16		• IL-10	• TNF- α
• CCL19			• IL-12 (p40)	• TNF- β
• CCL20			• IL-12 (p70)	• TRAIL/ TNFSF10
• CCL21			• IL-13	• VEGF
• CCL22			• IL-15	• β -NGF
• CCL23			• IL-16	
• CCL24			• IL-17	
• CCL25			• IL-18	
• CCL26			• IL-1Ra	
• CCL27			• IL-2R α	

Luminex法によるマルチプレックスアッセイ



スクリーニング群 (NCGM:2020年1月~3月)

患者背景 (入院直後の検査値)

Variable	Mild/Moderate n=16	Severe/Critical n=12	p value
Age (y) (IQR)	46.5 (41.0, 55.8)	59.5 (48.0, 72.3)	0.15
Sex M/F (n)	12/4	9/3	1.0
Temperature (°C)	37.6±1.0	37.9±0.8	0.33
Pulse (bpm)	82.2±16.6	83.8±9.2	0.76
Respiratory rate (breaths/min)	17.8±2.1	20.3±5.6	0.11
SpO ₂ (%)	96.0±2.1	95.4±1.6	0.42
ALB (g/dL)	4.2±0.3	3.2±0.6	<0.001
AST (U/L)	29.4±16.5	45.8±28.2	0.09
ALT (U/L)	32.8±29.3	48.2±44.5	0.28
LDH (U/L)	194.7±97.2	352.8±185.6	0.01
CRE (mg/dL)	0.9±0.2	1.2±1.4	0.45
CRP (mg/dL)	1.6±2.9	9.1±4.3	<0.001
WBC (10 ³ /μL)	5.1±1.9	6.0±2.6	0.37
Neu (%)	64.3±15.0	79.4±8.8	0.016
Lym (%)	26.0±12.4	24.0±21.3	0.77
PLT (10 ⁴ /μL)	20.1±4.7	16.8±8.9	0.21
HIV + (%)	12.5	0	1.0
HBV + (%)	6.3	8.3	1.0
CKD (%)	0	16.7	0.48
HT (%)	18.8	58.3	0.03
T2DM (%)	12.5	25.0	0.39
DL (%)	25.0	25.0	1.0
Smoker (%)	25.0	25.0	1.0
COPD (%)	0	16.7	0.48
CABG (%)	0	8.3	0.24
HA (%)	12.5	8.3	0.72
ACEi/ARB (%)	18.8	8.3	0.44
βB (%)	0	8.3	0.24

軽症	Mild: 肺炎なし(軽症)
	Moderate: 酸素需要なし、肺炎あり(中等症I)
重症	Severe: 酸素需要のある肺炎(中等症II)
	Critical: 人工呼吸、集中治療管理(重症)

ALB:アルブミン

AST:肝機能マーカー

ALT:肝機能マーカー

LDH:炎症マーカー

CRE:腎機能マーカー

CRP:炎症マーカー

WBC:白血球数

Neu:好中球

Lym:リンパ球数

PLT:血小板

CKD:慢性腎不全

HT:高血圧

T2DM:2型糖尿病

DL:脂質異常症

COPD:慢性閉塞性肺疾患

CABG:冠動脈バイパス

HA:不整脈

ACEi/ARB:ACE阻害薬等

βB:ベータ阻害薬

結果

COVID-19病態との関連因子

Category A	Category B
CCL17	IFN-λ3
	IP-10
	CXCL9
	IL-6

Category A: 早期に **severe** 化を予測する因子
Category B: **severe** 化の兆候を捉える因子

Mild: 肺炎なし(軽症)

Moderate: 酸素需要なし、肺炎あり(中等症I)

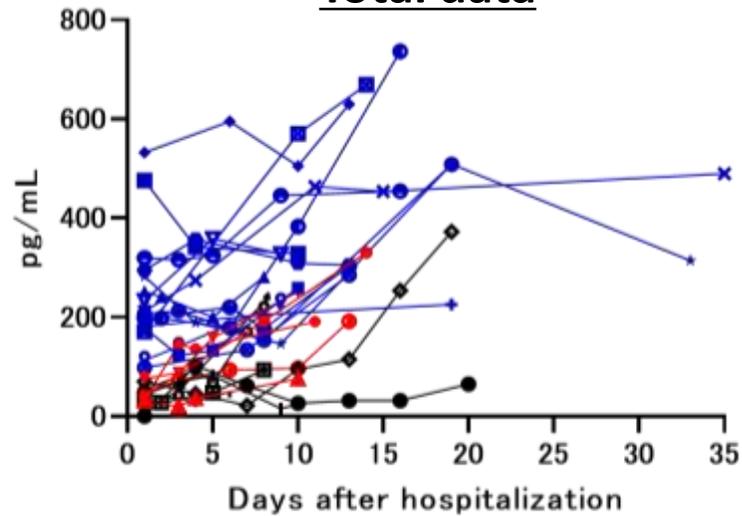
Severe: 酸素需要のある肺炎(中等症II)

Critical: 人工呼吸、集中治療管理(重症)

重症化の予測因子として、
CCL17とIFN-λ3を同定したことは世界初

CCL17 (Cat-A)

Total data



Mild: 肺炎なし(軽症)

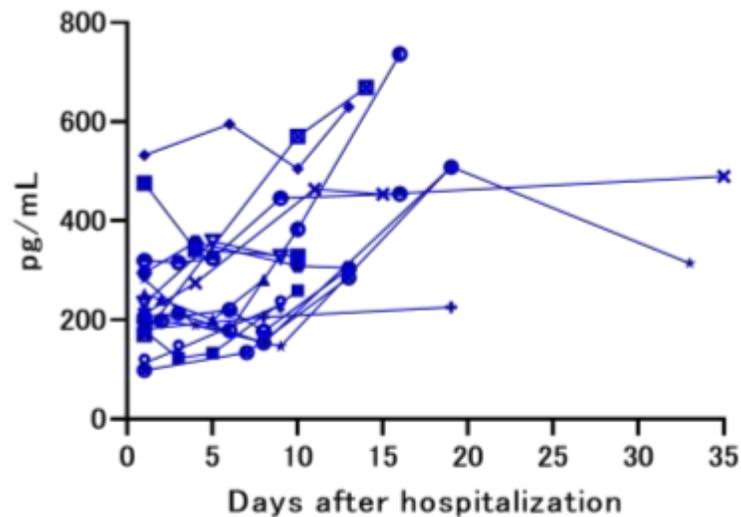
Moderate: 酸素需要なし、肺炎あり(中等症I)

Severe: 酸素需要のある肺炎(中等症II)

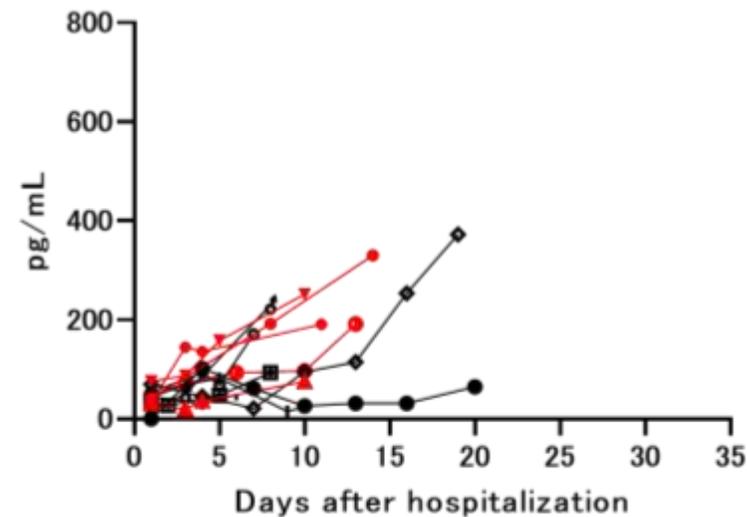
Critical: 人工呼吸、集中治療管理(重症)

Mild/moderate: 一定の値よりも高い
Severe/critical: 一定の値よりも低い

Mild/moderate

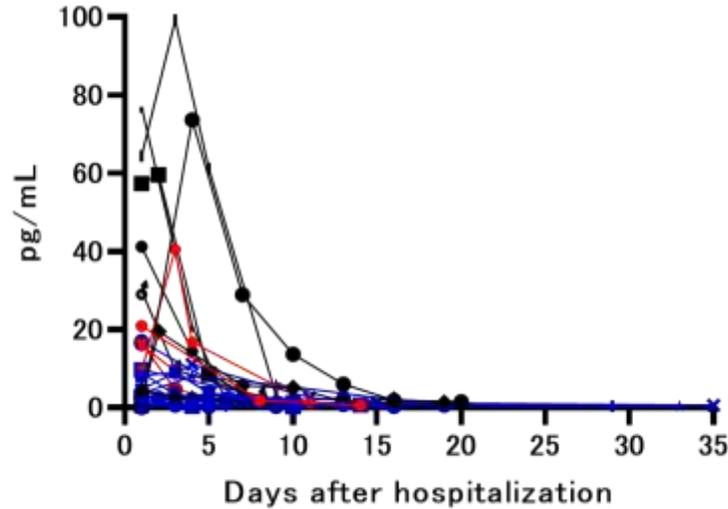


Severe/critical



IFN- λ 3 (Cat-B)

Total data



Mild: 肺炎なし(軽症)

Moderate: 酸素需要なし、肺炎あり(中等症I)

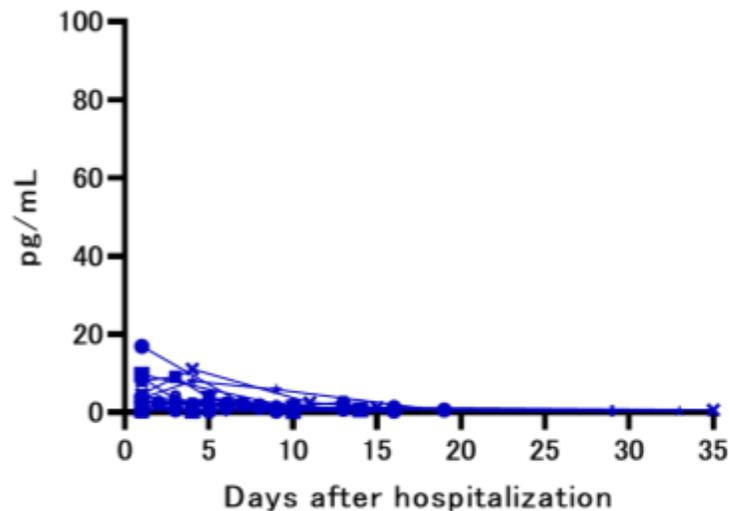
Severe: 酸素需要のある肺炎(中等症II)

Critical: 人工呼吸、集中治療管理(重症)

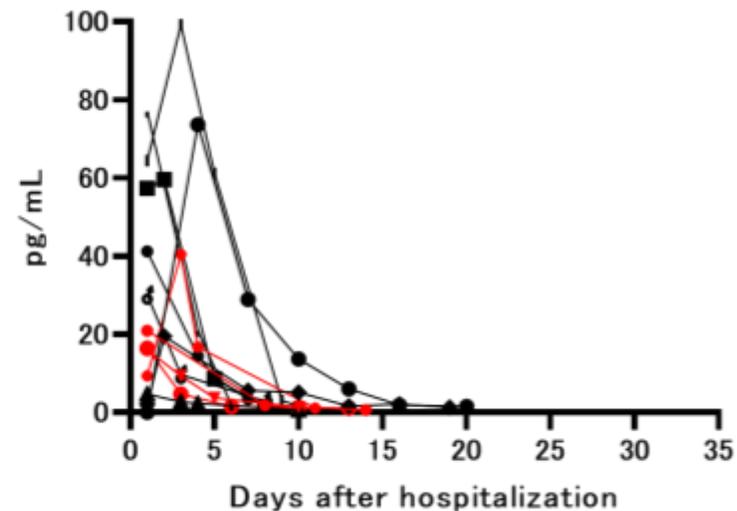
Mild/moderate: 低い値を維持

Severe/critical: 一過性の上昇がある

Mild/moderate



Severe/critical



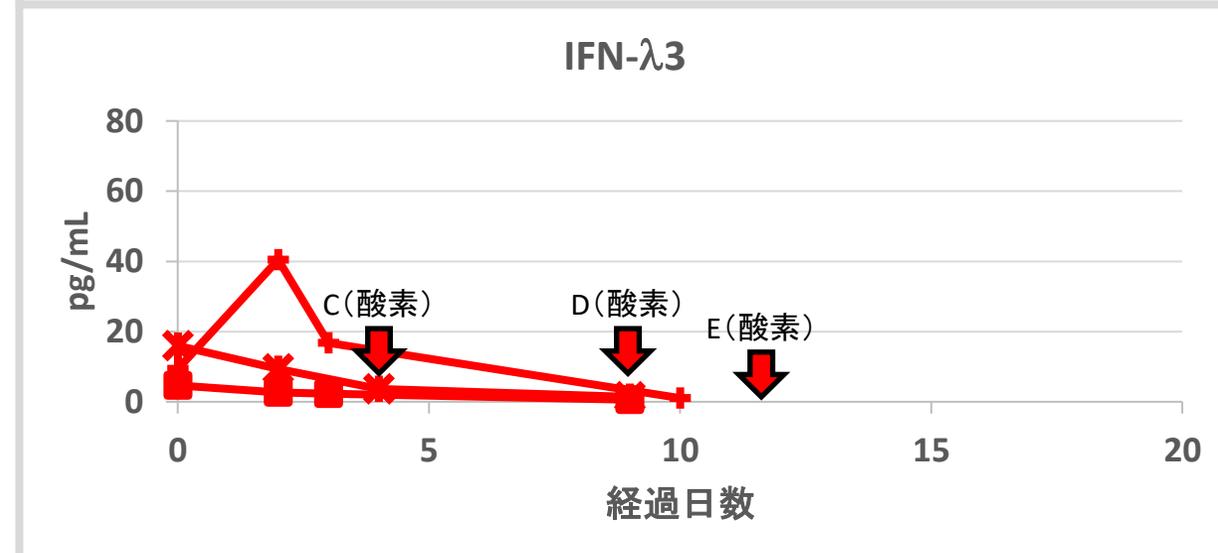
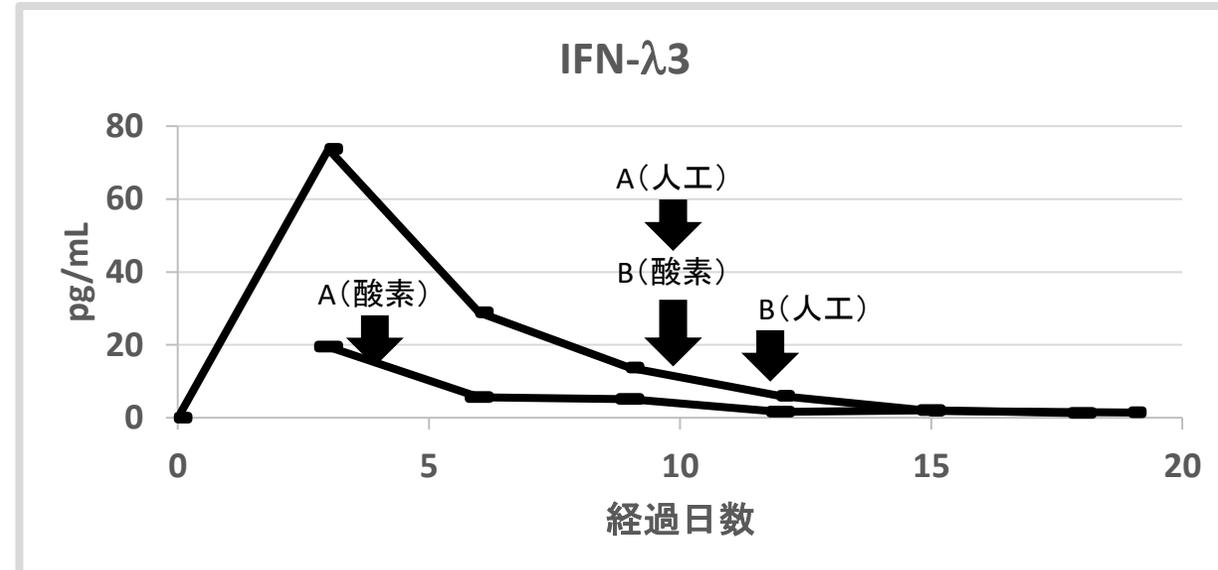
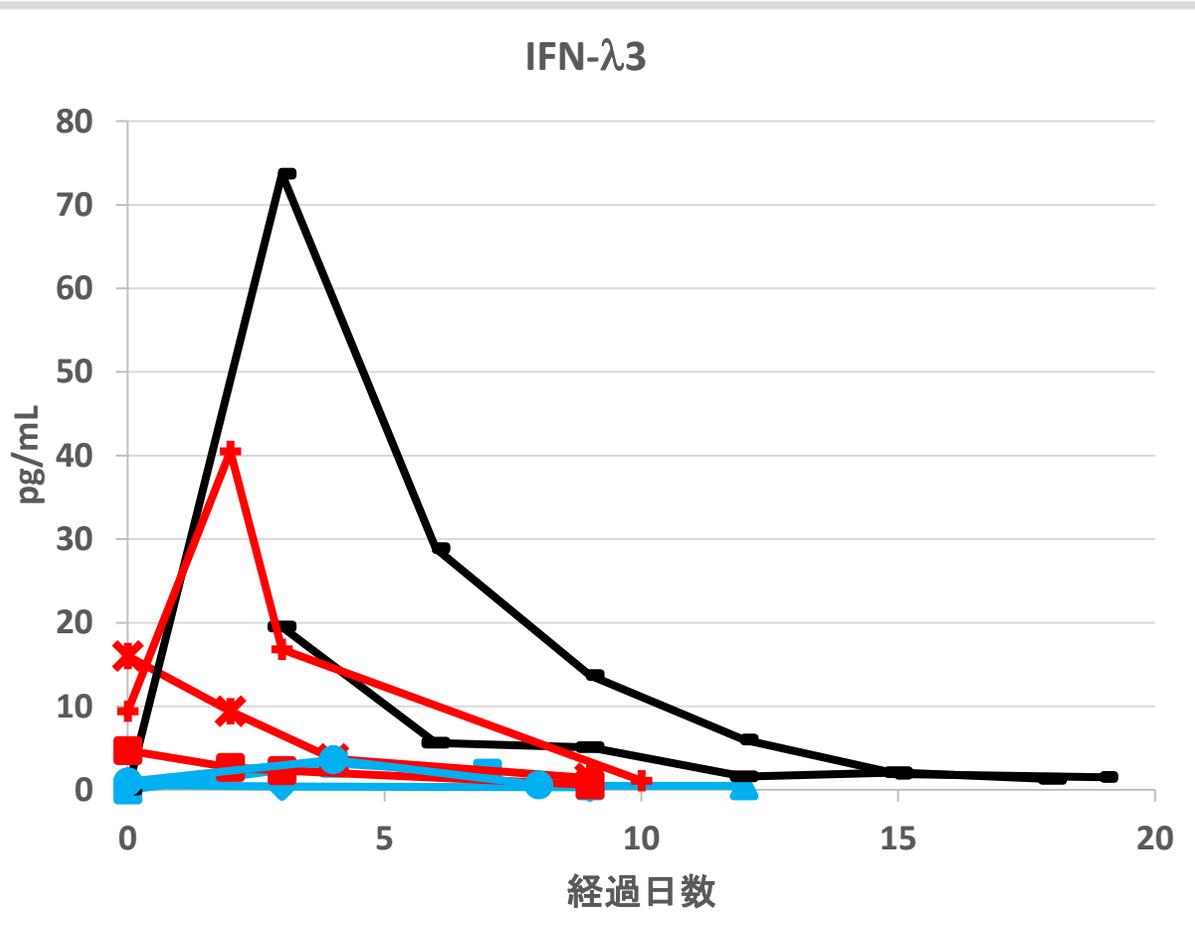
IFN-λ3と重症化の経過

Mild: 肺炎なし(軽症)

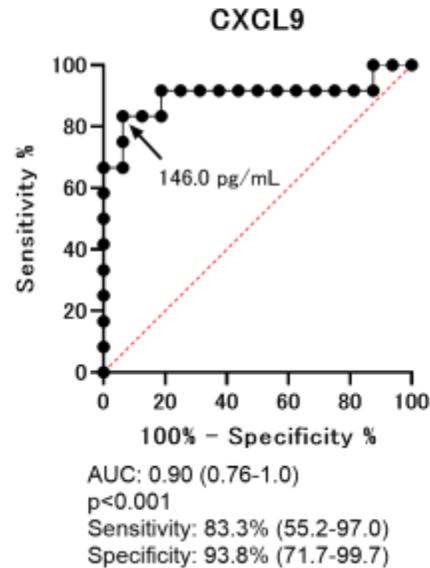
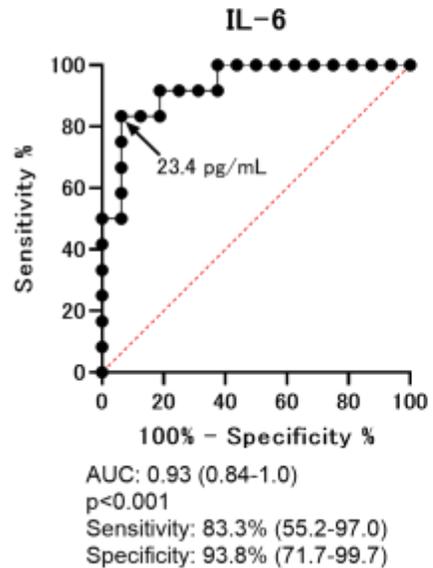
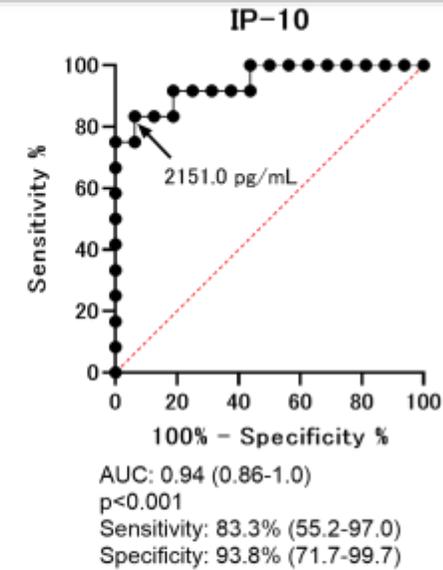
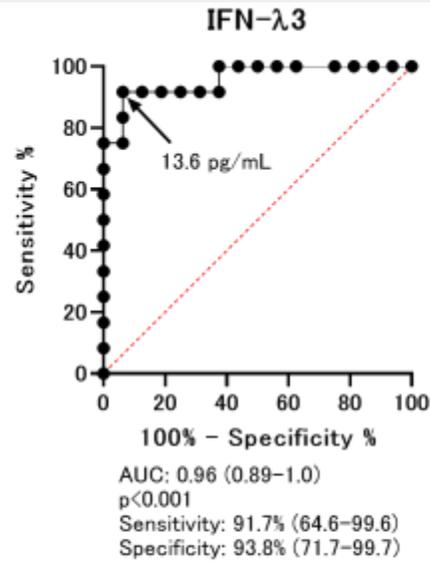
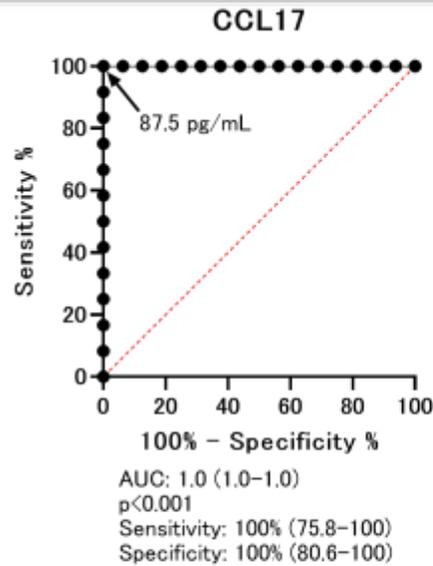
Moderate: 酸素需要なし、肺炎あり(中等症I)

Severe: 酸素需要のある肺炎(中等症II)

Critical: 人工呼吸、集中治療管理(重症)



ROC解析(カットオフ値)



Mild/moderateとSevere/criticalを
分ける最適な血中濃度を算出

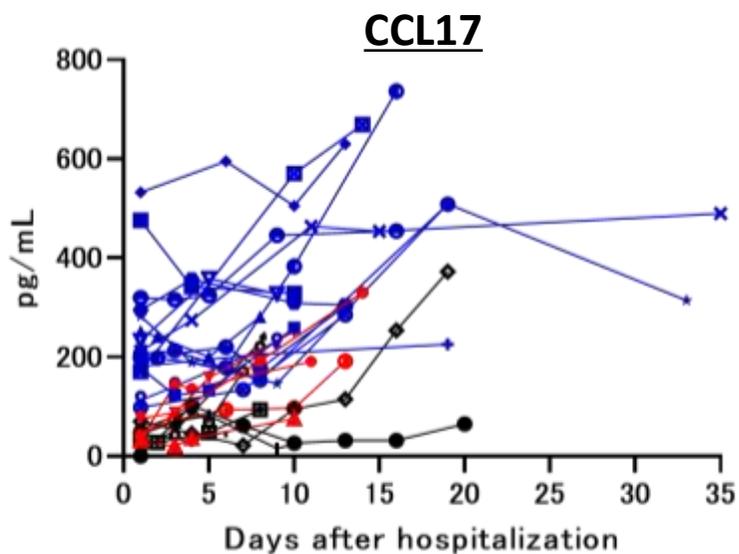
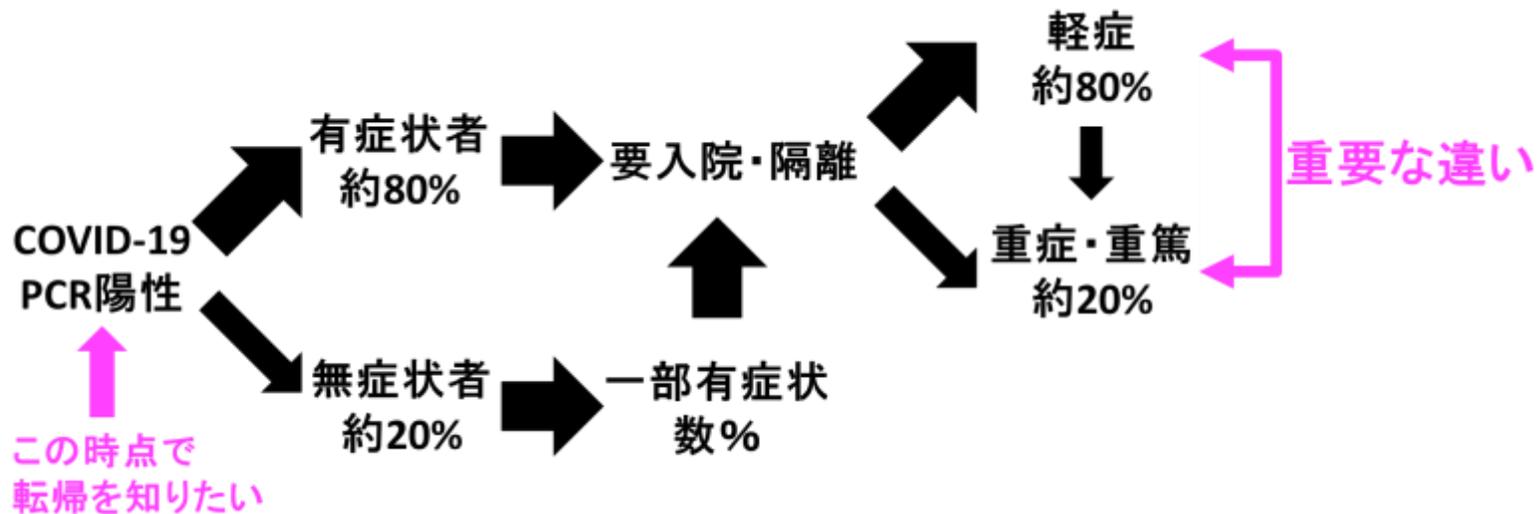
バリデーション(NCGM:2020年3月~7月)

患者背景(入院直後の検査値)

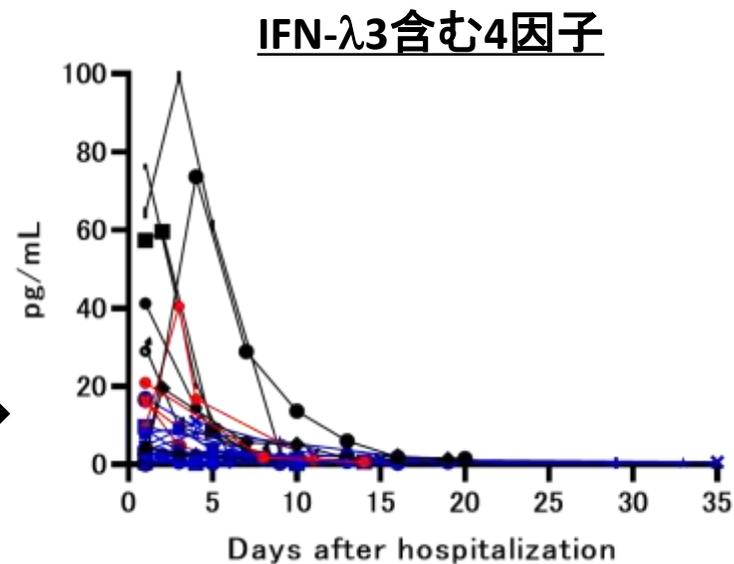
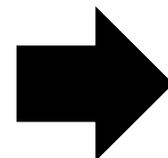
	Mild/Moderate	Severe/Critical	Univariate	Multivariate
Variable	n=46	n=12	p value	p value
Age (y) (IQR)	43.5 (29.3, 59.3)	67.5 (50.3, 73.3)	0.003	
Sex M/F (n)	30/16	10/2	0.23	
Temperature (°C)	37.4±0.9	38.3±1.0	0.005	
Pulse (bpm)	83.1±13.8	79.4±18.6	0.44	
Respiratory rate (breaths/min)	17.7±2.3	20.0±3.9	0.02	
SpO ₂ (%)	97.1±1.2	96.6±1.1	0.22	
ALB (g/dL)	3.9±0.6	3.4±0.4	0.004	
AST (U/L)	35.4±21.6	66.8±38.1	<0.001	
ALT (U/L)	39.2±30.9	51.1±39.6	0.27	
LDH (U/L)	241.5±79.6	403.2±111.0	<0.001	
Creatinine (mg/dL)	0.9±1.2	0.9±0.2	0.95	
CRP (mg/dL)	3.6±4.4	10.0±3.9	<0.001	
WBC (10 ³ /μL)	6.0±3.7	5.5±2.3	0.69	
Neutrophils (%)	69.6±11.1	79.6±7.9	0.005	
Lymphocytes (%)	22.0±9.1	14.3±5.4	0.006	
PLT (10 ⁴ /μL)	23.3±9.5	18.8±5.7	0.12	
CCL17 (pg/mL)	185.7±84.3	64.2±26.3	<0.001	0.009

サマリ

Category A	Category B
CCL17	IFN-λ3
	IP-10
	CXCL9
	IL-6



ホテル等
要観察・入院



CCL17 (TARC)の保険収載

保険適応内容	詳細
保険適用日	2021年6月11日
保険適用区分	E2（既存項目・変更あり）
測定項目	D015 血漿蛋白免疫学的検査 18 TARC
基準値	95.0 pg/mL以下
保険点数	184点
留意事項	<p>ア アトピー性皮膚炎の重症度評価の補助を目的として、血清中のTARC量を測定する場合は、月1回を限度として算定できる</p> <p>イ COVID-19と診断された患者（呼吸不全管理を要する中等症以上の患者を除く）の重症化リスクの判定補助を目的として、血清中のTARC量を測定する場合は、一連の治療につき1回を限度として算定できる</p>

TARC大手検査会社の対応

- BML: 受託開始済み
- ファルコ社: 6月28日受託開始
- LSI: 7月12日予定
- SRL: 7月中旬以降

IFN-λ3の保険収載

COVID-19関連で保険収載されている重症化関連の検査の比較

	IFN-λ3(21年2月3日収載)	IL-6(21年1月1日収載)
使用目的	血清中のインターフェロン-λ3の測定(SARS-CoV-2陽性患者の重症化リスクの判定補助)	血清又は血漿中のIL-6の測定(救急搬送、集中治療を要する患者又は集中治療管理下の患者における重症度判定の補助)
臨床評価成績の対象	SARS-CoV-2 陽性の入院患者(経過観察)	救急搬送またはICU 入室となった全身性炎症反応症候群(SIRS)患者
重症度の判定	SpO2 ≤ 93%、又は人工心肺又はECMOの装着(呼吸器障害)	SOFA スコアで2点以上(多臓器障害)
基準値	13.6 pg/mL未満	7.0 pg/mL以下
保険点数	340点	170点
備考	<ul style="list-style-type: none">本検査を2回以上算定する場合は、前回の検査結果が基準値未満であること。	<ul style="list-style-type: none">全身性炎症反応症候群又は疑いで、2回に限り算定可。3回以上算定する場合は、詳細な理由を摘要欄に記載すること。

IFN-λ3検査の臨床性能試験

感度:88.9%
特異度:84.6%

IFN-λ3大手検査会社の対応

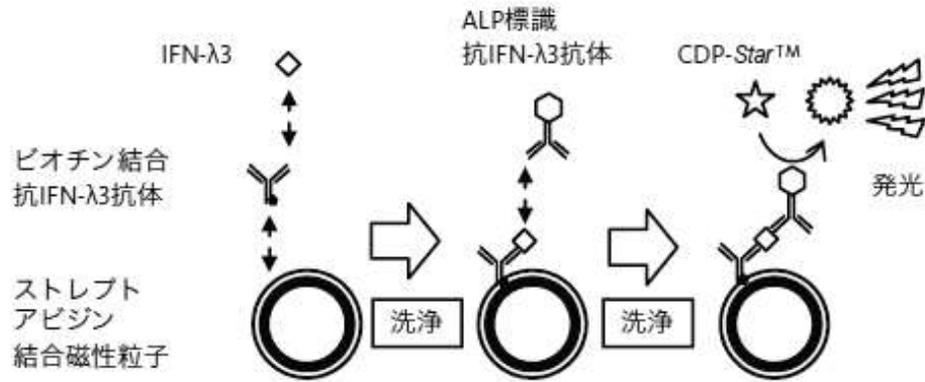
LSI社:3月1日受託開始
ファルコ社:3月1日受託開始
SRL社:3月3日受託開始
BML社:導入準備中

IFN-λ3検査の保険の自己負担部分

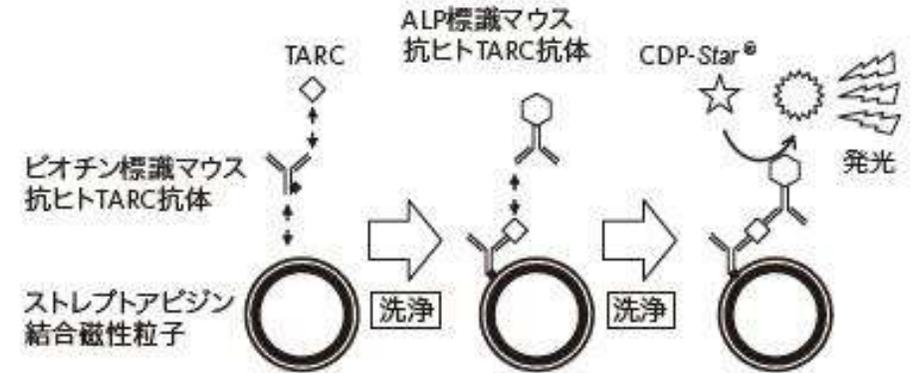
- 入院中であれば公費負担(自治体と国の折半)
- 宿泊療養または自宅療養中であれば国庫負担(交付金の対象)

検査項目の自動測定化

Chemiluminescent Enzyme Immunoassay (CLEIA)



IFN-λ3検査



TARC (CCL17) 検査



HISCL (シスメックス社)

多施設共同前向き試験

COVID-19の予後予測因子の同定と臨床応用に関する研究

Prospective study to **R**eveal **E**arly **D**iagnostic-markers at an **I**nitial-stage of **C**COVID-19 onset
(**P**REDICT study)

実施機関名： 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター

研究責任者： 研究所ゲノム医科学プロジェクト 杉山真也

- 全国20施設で実施中
- 1000症例の経時的な採血と観察
- CCL17、IFN-λ3、IL-6、CXCL9、IP-10の実臨床での診断有効性の確認
- 診断基準、アルゴリズムの検討

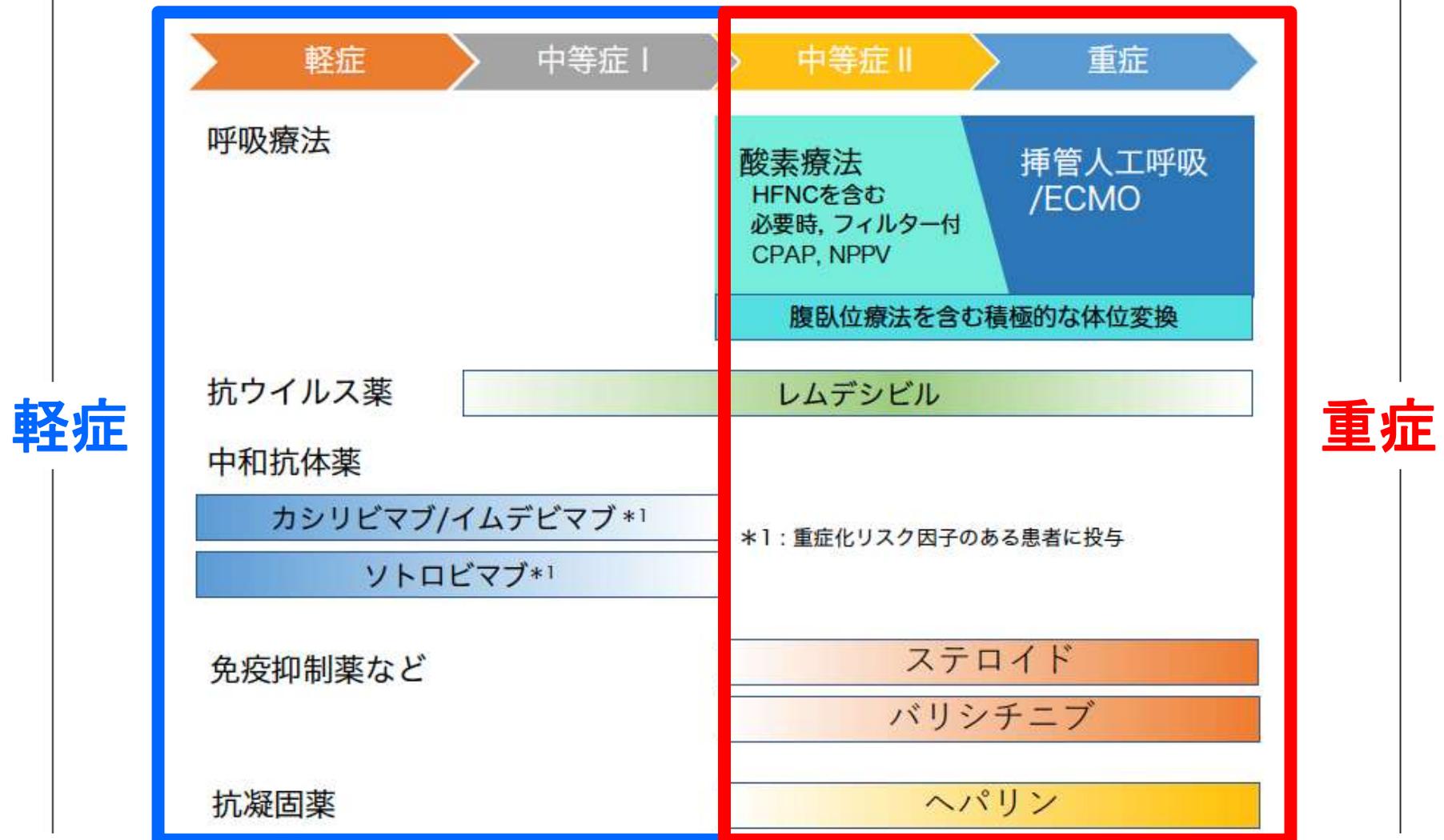
連絡先：PREDICT study事務局 <predict-office@hosp.ncgm.go.jp>

多施設共同前向き試験

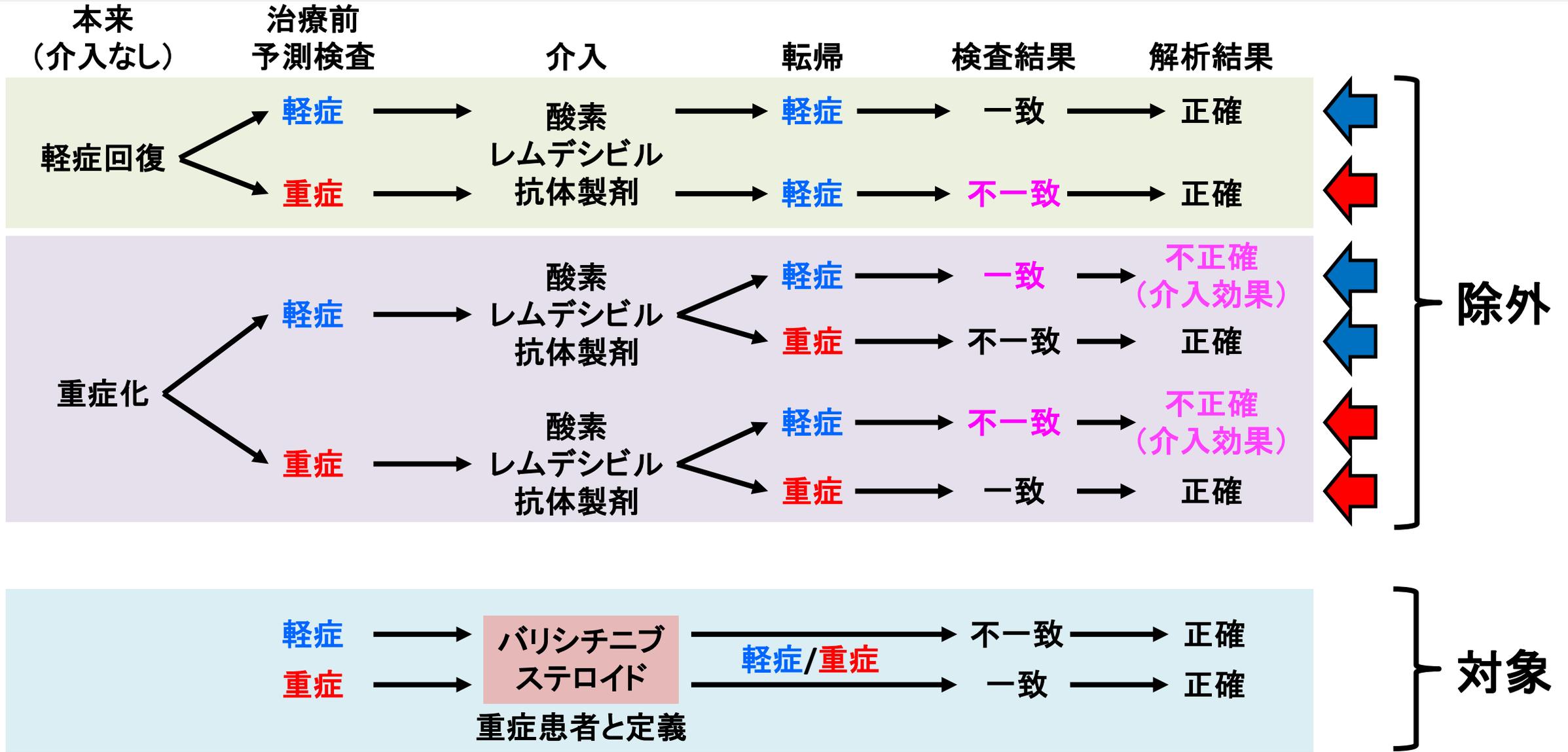
機関名	所属	職名	研究責任者氏名
KKR札幌医療センター	呼吸器センター	センター長	福家 聡
東京大学	医科学研究所先端医療研究センター感染症分野	教授	四柳 宏
東京大学	大学院理学系研究科ヒトゲノム多様性研究室	准教授	大橋 順
東京医科歯科大学	呼吸器内科	教授	宮崎 泰成
国立国際医療研究センター	国際感染症科	センター長	大曲 貴夫
東京都立駒込病院	感染症科	部長	今村 顕史
東邦大学	医学部微生物・感染症学講座	教授	館田 一博
東京医科大学	呼吸器内科	教授	阿部 信二
帝京大学医学部内科学講座	呼吸器・アレルギー学	教授	長瀬 洋之
国立病院機構災害医療センター	呼吸器内科	部長	上村 光弘
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院	呼吸器内科	部長	駒瀬 裕子
名古屋市立東部医療センター	呼吸器内科	部長	前田 浩義
春日井市民病院	呼吸器内科	部長	岩田 晋
公立陶生病院		副院長	近藤 康博
神戸市立医療センター中央市民病院		副院長	富井 啓介
愛媛県立中央病院	呼吸器内科	医長	本間 義人
九州医療センター	呼吸器センター	科長	岡元 昌樹
長崎みなとメディカルセンター	呼吸器内科	部長	澤井 豊光
長崎大学	呼吸器内科	教授	迎 寛
佐世保市総合医療センター	呼吸器内科	部長	福田 雄一

COVID-19への治療介入

図 4-1 重症度別マネジメントのまとめ



解析対象と除外集団



中間解析 (n=83 経時採血:2~10回)

IFN-λ3検査

診断	検査陽性	検査陰性
重症化	19	4
軽症回復	7	54

		95% UI
オッズ比	36.6	9.9-134.3
感度	73.1%	59.6-81.4
特異度	93.1%	87.1-96.8
PPV	82.6%	67.4-92.0
NPV	88.5%	82.8-92.1

CCL17検査

診断	検査陽性	検査陰性
重症化	6	18
軽症回復	4	55

		95% UI
オッズ比	4.6	1.2-16.9
感度	60.0%	32.8-82.4
特異度	75.3%	71.6-78.4
PPV	25.0%	13.7-34.3
NPV	93.2%	88.6-97.0

両検査を組み合わせた場合の正診率
96.4% (92.5-100)

CCL17

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 1996 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 271, No. 35, Issue of August 30, pp. 21514-21521, 1996
Printed in U.S.A.

Molecular Cloning of a Novel T Cell-directed CC Chemokine Expressed in Thymus by Signal Sequence Trap Using Epstein-Barr Virus Vector*

(Received for publication, April 30, 1996, and in revised form, June 12, 1996)

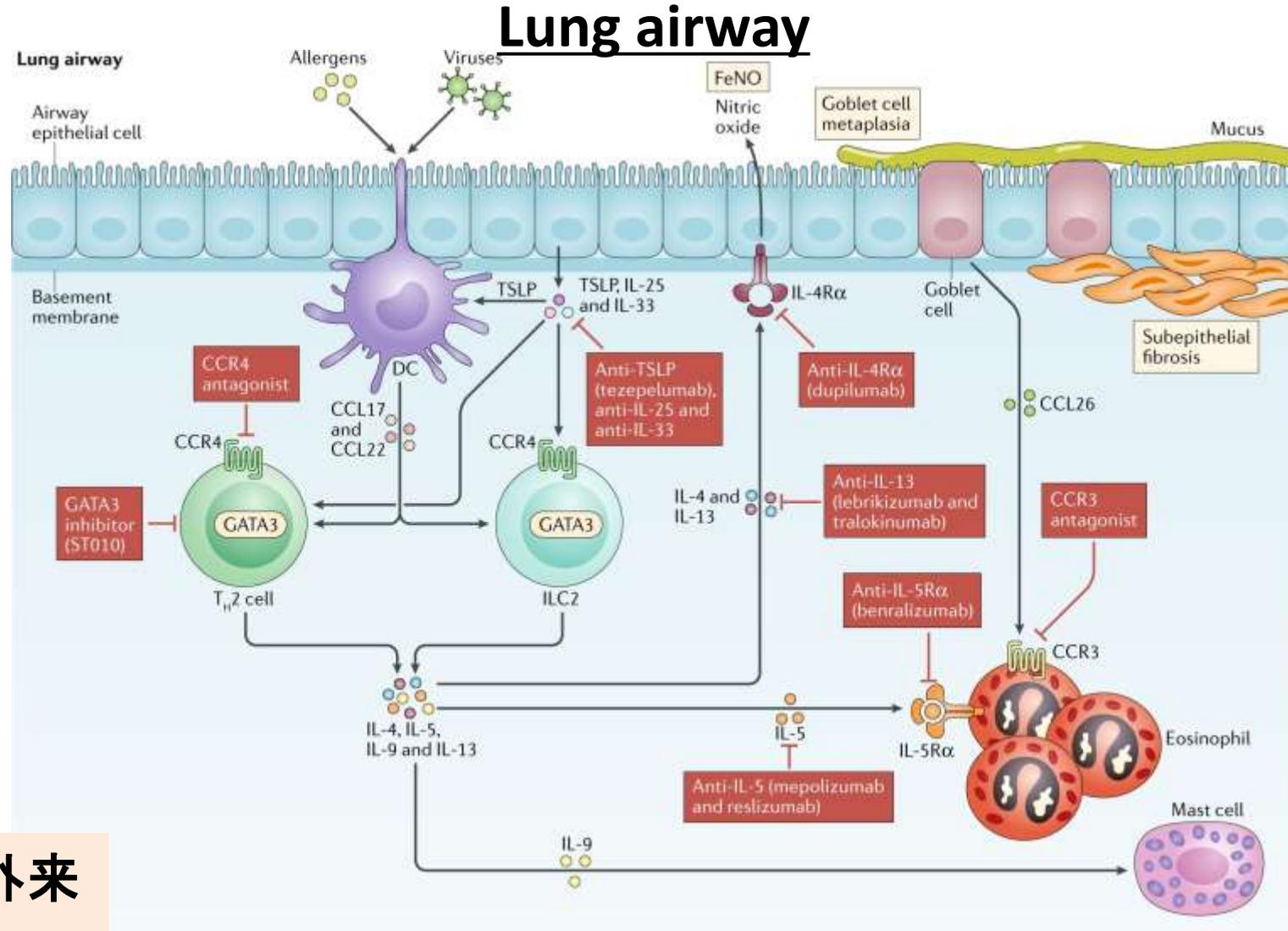
Toshio Imai†, Tetsuya Yoshida, Masataka Baba, Miyuki Nishimura, Mayumi Kakizaki, and Osamu Yoshie

From the Shionogi Institute for Medical Science, 2-5-1 Mishima, Settsu-shi, Osaka 566, Japan

Imai T et al. J Biol Chem 1996

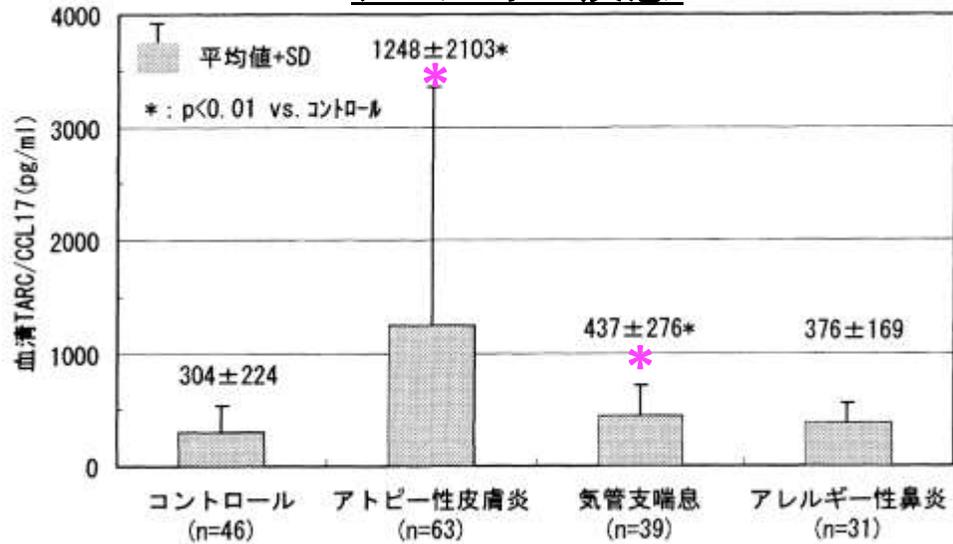
CCL17を合成する主な細胞種 樹状細胞 線維芽細胞

肺ではアレルギー、ウイルス等の外来物に対して免疫応答する

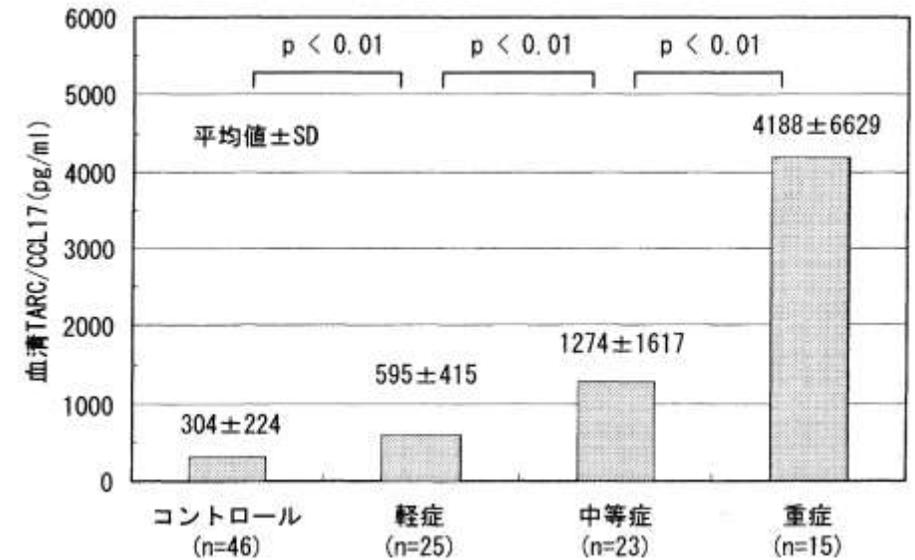


CCL17の関連する疾患

アレルギー疾患



アトピー性皮膚炎

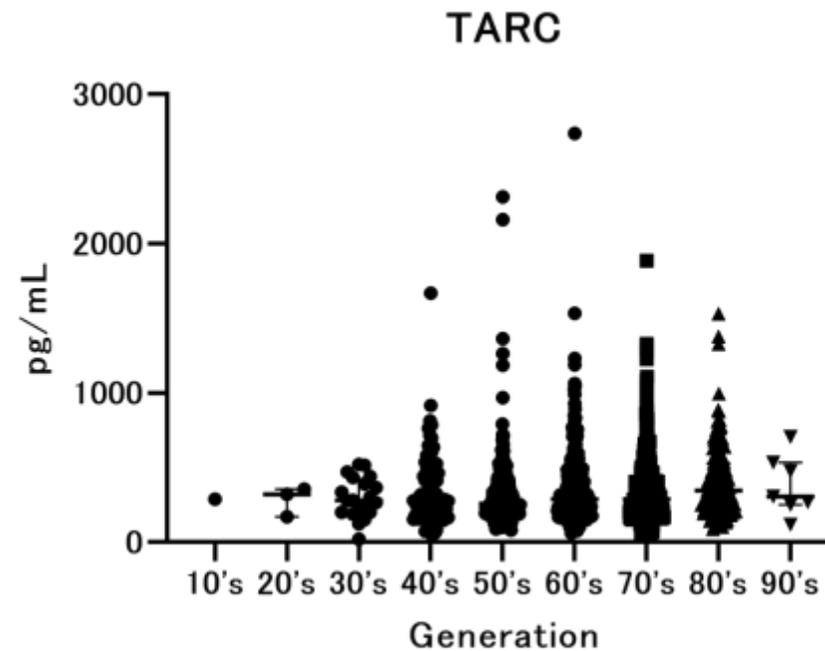
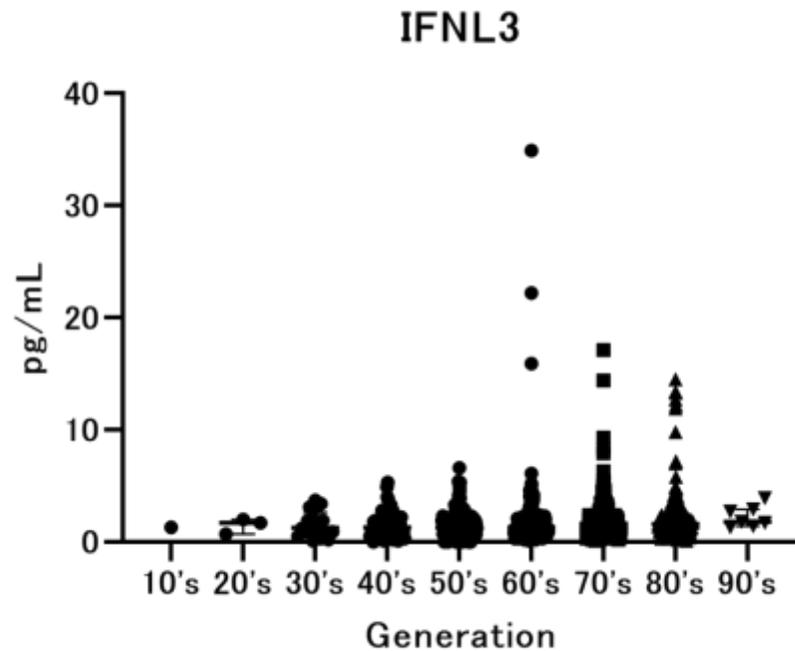


- CCL17の増加はアレルギー疾患を増悪化
- COVID-19ではCCL17の低下で重症化
- COVID-19とCCL17の関係は、今回初報告
- CCL17が低下する疾患はこれまでに報告がない

各検査値で成人に差はなし

健常者での測定

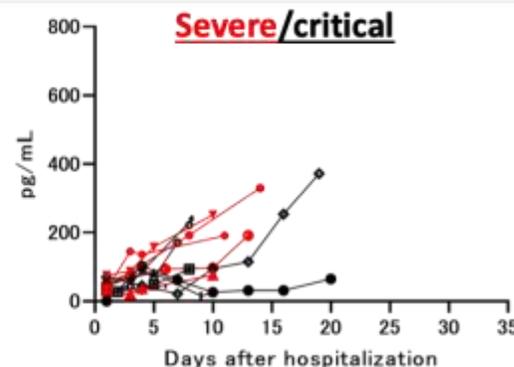
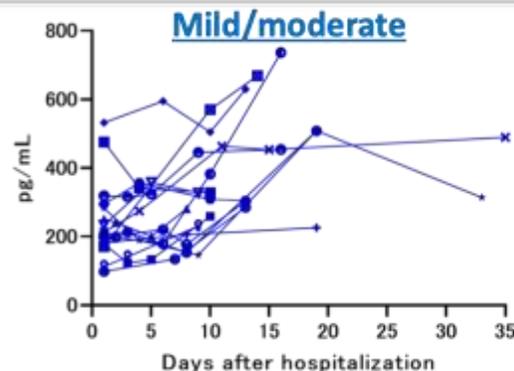
N=1372



群間の多重検定を実施

「COVID-19なし」で重症化基準に入ったヒトの割合

COVID-19: CCL17



59歳以下

60歳以上

健常者

n=372	重症化基準	COVID-19なしで 基準超えたヒト (n)	%	n=1000	重症化基準	COVID-19なしで 基準超えたヒト (n)	%
IFN-λ3(pg/mL)	>13.6	0	0	IFN-λ3(pg/mL)	>13.6	6	0.6
CCL17 (pg/mL)	<100	8	2.2	CCL17 (pg/mL)	<100	18	1.8

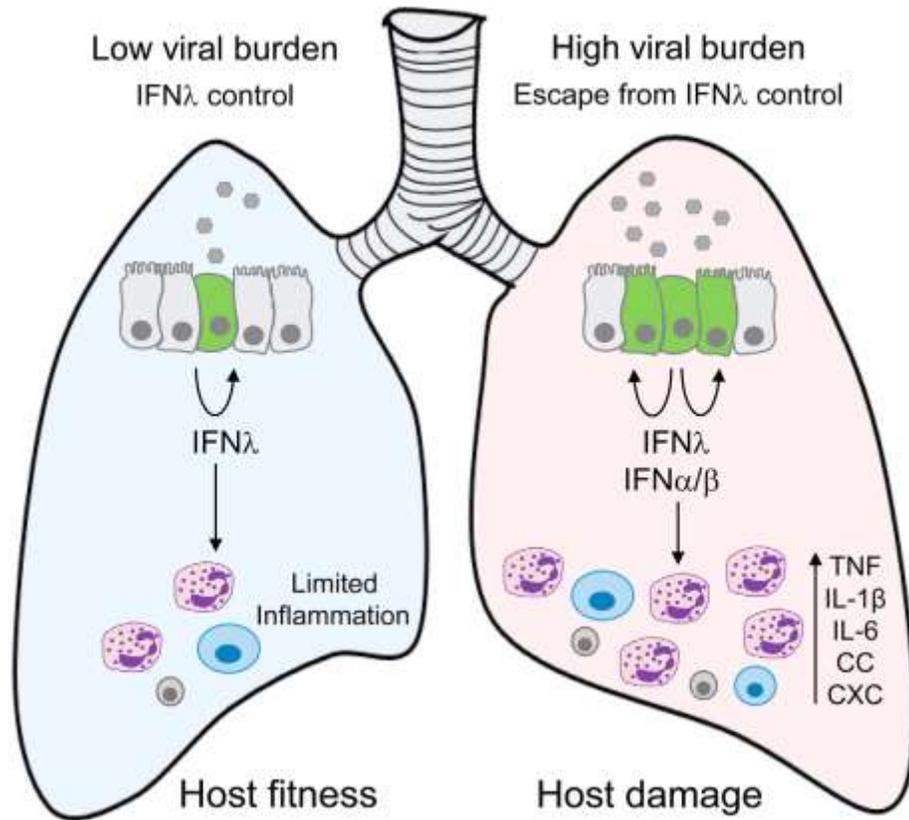
診断された人のうち、重症化する割合 (%)

年代 (歳) 診断月	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90-	計
	-9	-19	-29	-39	-49	-59	-69	-79	-89	90-	
2020年 6-8月	0.09	0.00	0.03	0.09	0.54	1.47	3.85	8.40	14.50	16.64	1.62
2020年 1-4月	0.69	0.90	0.80	1.52	3.43	6.40	15.25	26.20	34.72	36.24	9.80

出典：2020年10月22日第11回アドバイザーボード資料（京都大学西浦教授提出資料）より作成

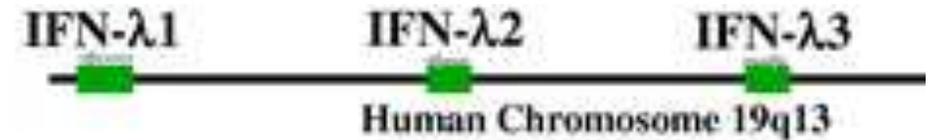
- 60歳以上は感染をトリガーにCCL17が低下する集団がメイン
- エピジェネティックな影響を肺組織で検討中

IFN-λsと呼吸器疾患の関連



Reprinted from Immunity, Volume 46, Issue 5, Ioanna E. Galani et al. Interferon-λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness, Pages 875-890, Copyright (2017), with permission from Elsevier.

IFN lambda family

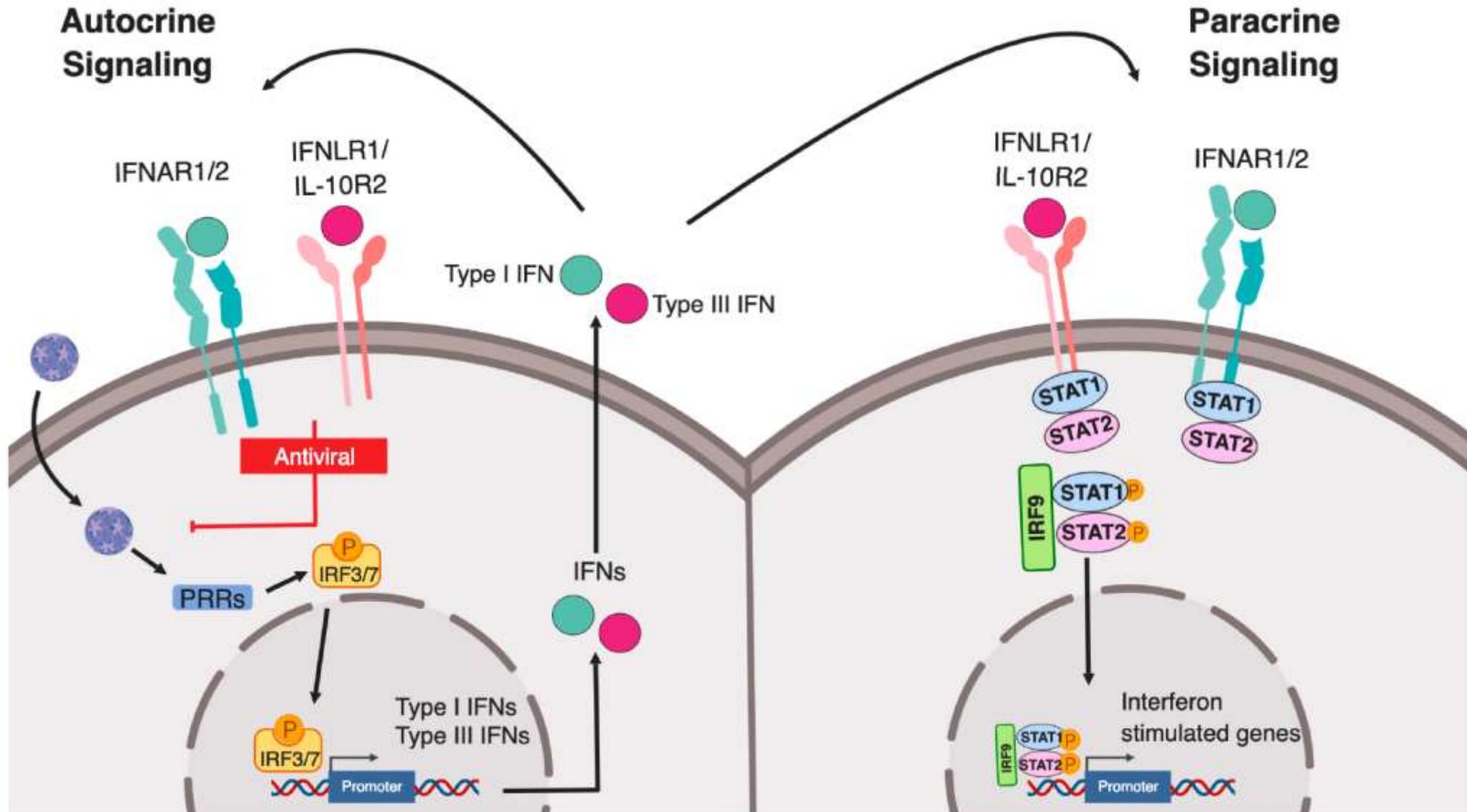


JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH, Volume 30, Number 8, 2010, Raymond P. Donnelly et al. Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family The publisher for this copyrighted material is Mary Ann Liebert, Inc. publishers.

- 遺伝子配列が最大で96%以上同じ
- 個々の分離測定が困難

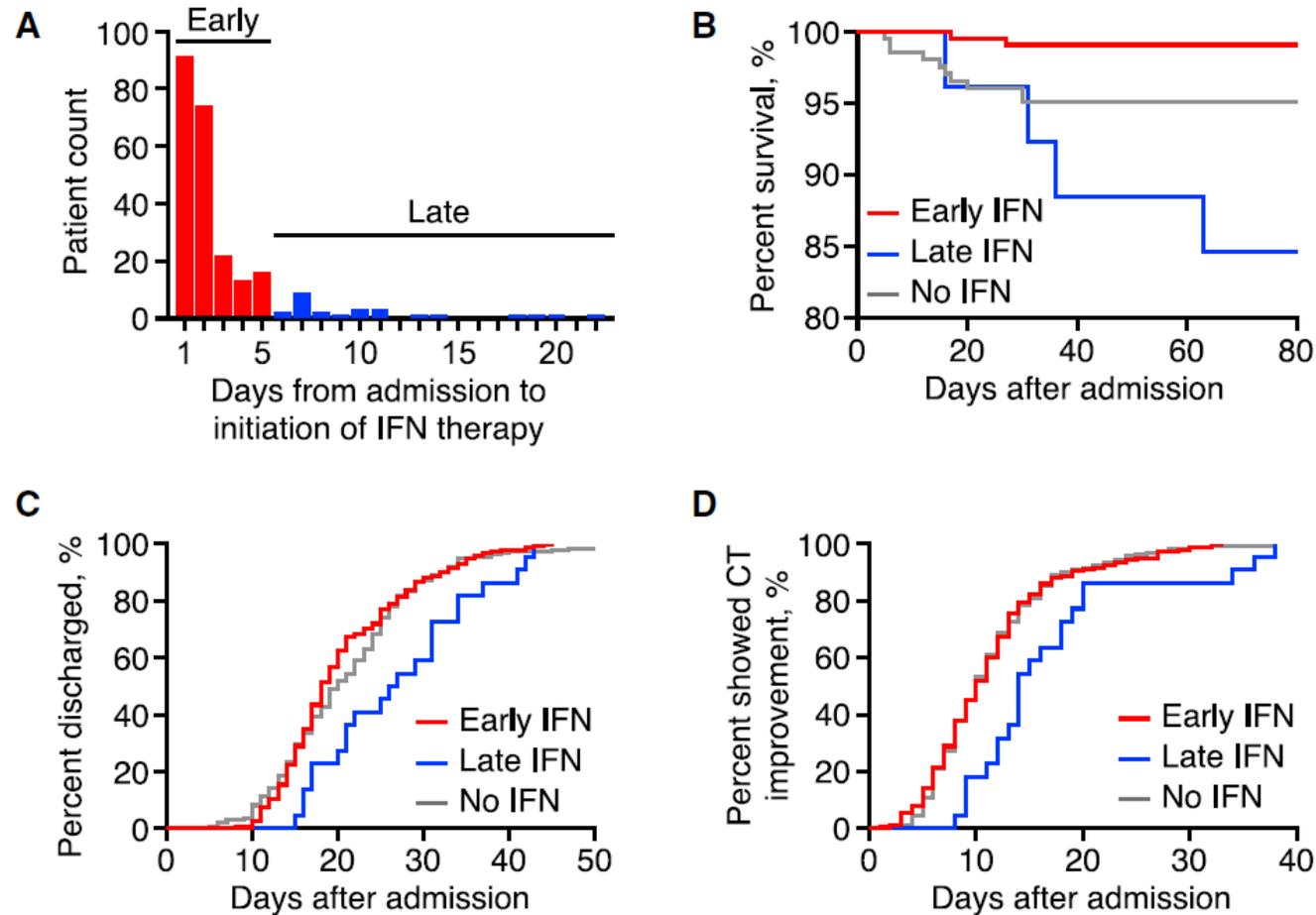
- ARDS、COVID-19等の重症肺疾患でIFN-λsが関係することは既知(マウス)
- 我々の解析技術は、IFN-λsを分けて測定(ヒト)

IFN-alpha induces IFN-alpha and lambda

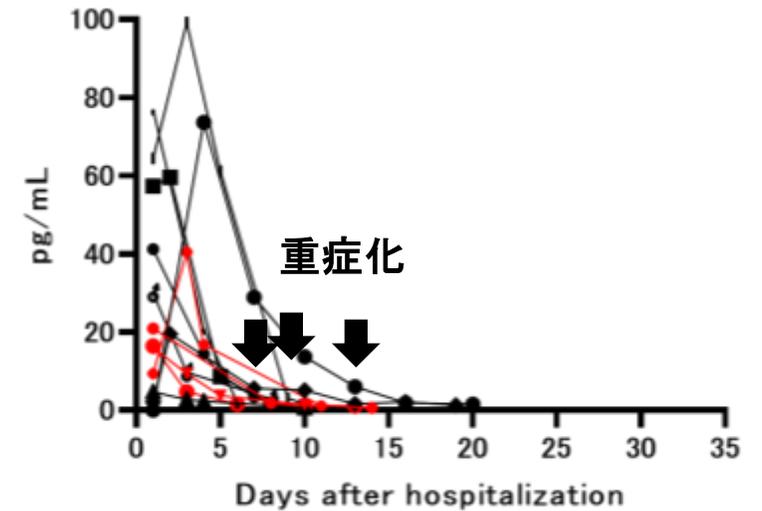


IFN- α 製剤の投与時期と重症化リスク

COVID-19患者へのIFN- α 製剤投与と効果



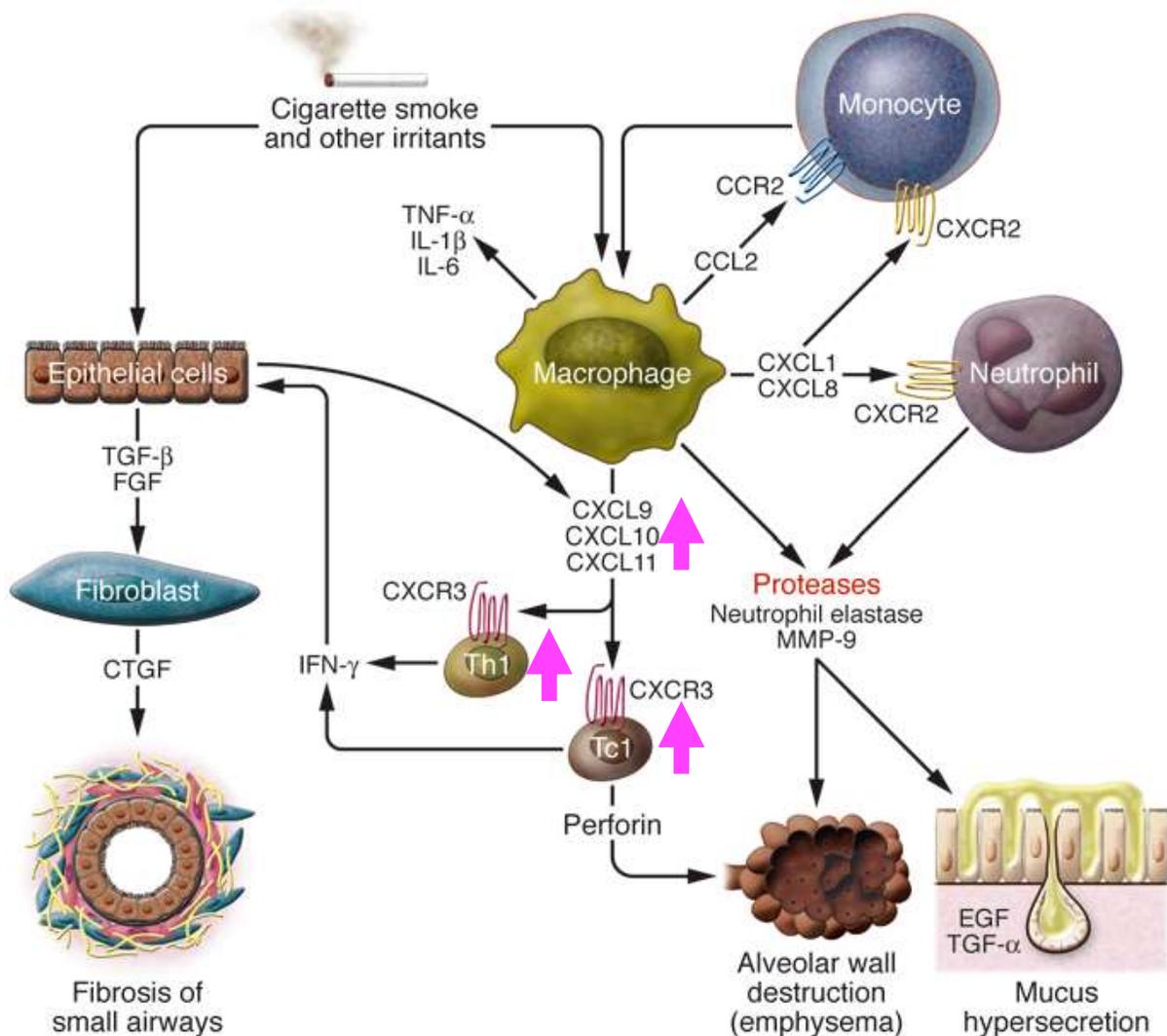
COVID-19におけるIFN- λ 3の動態 中等症II/重症



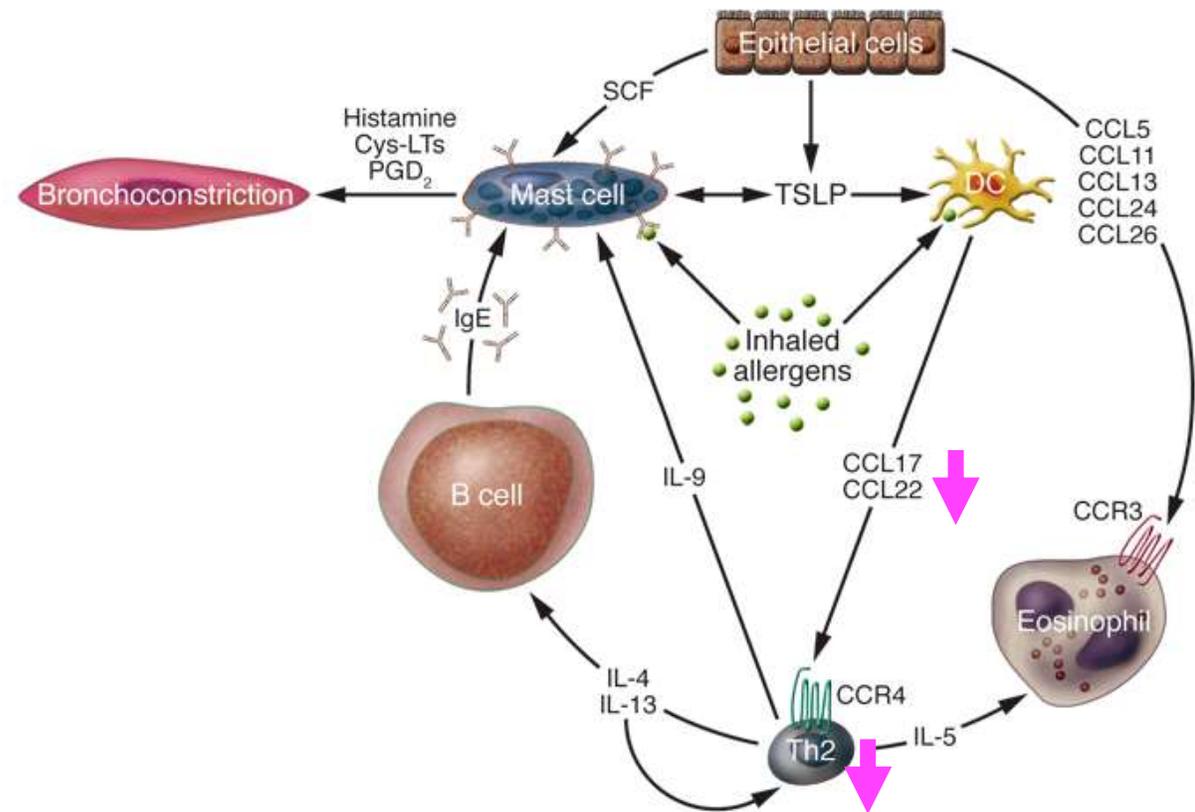
自施設データ

Relationship among CXCL9, CXCL10 (IP-10), CCL17

Cytokines involved in COPD



Cytokines involved in asthma



**Th1/Tc1 >> Th2
重症化の要因か**

Type 1 helper T cell (Th1)
Type 2 helper T cell (Th2)
Type 1 cytotoxic T cell (Tc1)

今後の予定

今後の課題

- ワクチン後の検討中
- 多施設試験の全体解析
- 人種による違いの確認、海外展開

治療薬の開発

- CCL17の減少の仕組みを解析→重症化阻止へ
- IFN- λ 3、CXCL9、IP-10、IL-6の中和、阻害→重症化阻止へ

謝辞

国立国際医療研究センター

センター病院呼吸器内科

杉山温人
放生雅章
泉信有
高橋仁
鈴木学
橋本理生

国際感染症センター

木下典子
早川佳代子
忽那賢志^{*}
石金正裕
斎藤翔
井手聡
中本貴人
野本英俊
大曲貴夫

国府台病院

柳井秀勝
狩野俊和
宇佐美政秀

研究所

考藤達哉
西田奈央
溝上雅史

エイズ治療センター

瀧永博之
土屋亮人