

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16128

研究課題名（和文）COVID-19における新規重症化/予後予測マーカーの同定

研究課題名（英文）Identification of novel severity/prognostic markers in COVID-19

研究代表者

高野 智弘（Takano, Tomohiro）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・研究員

研究者番号：10885669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）における重症化や予後を予測できる因子を同定することを目的とした。COVID-19重症生存例において、免疫抑制作用を有するPolymorphonuclear MDSC（PMN-MDSC）の頻度が感染初期（発症後0-21日）に一過的に増加する一方で、重症死亡例においてはその増加が観察されなかった。また重症生存例と死亡例の末梢血単核細胞（PBMC）のsingle cell RNA sequence解析により、PBMC中の多くのクラスターにおいて死亡例ではII型インターフェロン応答が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、MDSCがCOVID-19重症化や予後に関連することを国内で初めて示すことができた。本研究の成果がCOVID-19の治療法や重点的な治療を要する患者をスクリーニングする技術の開発基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to identify factors that can predict the severity and prognosis of novel coronavirus infection (COVID-19). In survivors of severe COVID-19, the frequency of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs), a subset of MDSCs with immunosuppressive functions, transiently increases in the early stages of infection (0-21 days after symptom onset), while no increase was observed in non-survivors of severe COVID-19. In addition, single cell RNA sequence analysis revealed that type II interferon responses were significantly enhanced in the most of clusters in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from the deceased patients compared with the survived subjects.

研究分野：感染症免疫学

キーワード：COVID-19 MDSC PMN-MDSC scRNA-seq Type II interferon

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2019年12月に中国・武漢において重篤な呼吸器関連疾患を伴う新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の発生が報告され、それ以後世界中で爆発的に感染が拡大し、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) として広く認知されている。COVID-19 における重症化や予後を予測できる因子を同定することができれば、医療リソースの節約および効率的な運用につながり、経済的損失を最小限に抑えられる。COVID-19 が重症化する仕組み、原因についてはいまだ完全には明らかとなっていないが、重症化しやすい素因として癌や肥満、加齢、2型糖尿病などの基礎疾患が報告されている。これらは共通して免疫反応の低下と関連があることから、申請者は COVID-19 が重症化する素因の一つとして、適切な免疫反応を抑制する因子が関係していると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、COVID-19 患者から末梢血を経時的に採取し、免疫細胞や可溶性因子の増減をモニタリングすることにより重症化や症状の回復と関連する因子を探索、同定することである。また COVID-19 重症例検体を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行うことにより、細胞表面分子等の解析のみでは得られない機能に関する情報を取得し、重症化に関わるメカニズムを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) COVID-19 患者における末梢血中の免疫細胞/可溶性因子の動態解析

連携病院に入院した計 40 名 (軽症 12 例、中等症 I 7 例、中等症 II 8 例、重症 13 例) の COVID-19 患者から経時的に採血を実施し、バキュティナ CPT 単核球分離用採血管を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) および血漿を分離した。分離した PBMC 中における Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) の頻度をフローサイトメトリーにより経時的に解析した。また血漿中における各種サイトカインおよびケモカイン (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17F, G-CSF, GM-CSF, IP-10, IFN- α , IFN- γ , MCP-1, MIP-1, MIG, TNF- α) の濃度を Cytometric Bead Array (CBA) を用いてフローサイトメトリーにより解析した。

(2) COVID-19 重症患者における末梢血単核細胞の single cell RNA sequence による網羅的遺伝子解析

COVID-19 重症生存例 3 例および重症死亡例 3 例について発症後 9-21 日目の PBMC を用いて 10x Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 を使用し single cell RNA-seq を行った。得られたシーケンスデータを R パッケージ Seurat (<https://satijalab.org/seurat/>) および enrichR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) COVID-19 患者における末梢血中の免疫細胞/可溶性因子の動態解析

免疫抑制能を有する MDSC に着目して解析を行った。COVID-19 重症生存例において、MDSC サブセットの一つである Polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC) の頻度が感染初期 (発症後 0-21 日) に一過的に増加することが明らかとなった。一方で重症死亡例においては PMN-MDSC の頻度に顕著な増加は観察されなかった (図 1)。また PMN-MDSC の増加と関連する可溶性因子について血漿中 IL-8 濃度が感染初期の重症生存例において有意に高く、また血中 PMN-MDSC の頻度と相関関係にあることが明らかとなった (図 2)。

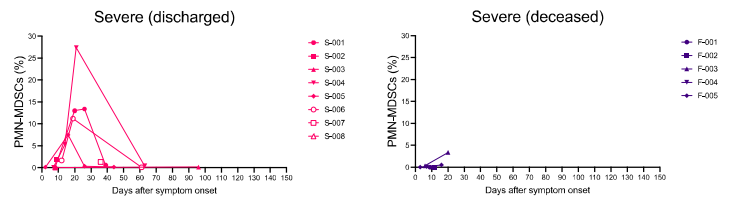


図1

(2) COVID-19 重症患者における末梢血感覚細胞の single cell RNA sequence による網羅的遺伝子発現解析
 遺伝子発現プロファイルから PBMC は 16 のクラスターに分けられた (図 3)。各クラスターにおいて、生存例と比較して死亡例で有意に発現が変動する遺伝子群 (DEG) を抽出した。各クラスターにおける DEG から、各クラスターの死亡例に特徴的な生物学的パスウェイ解析を行った。その結果、重症死亡例では 16 クラスター中 14 クラスターにおいて II 型インターフェロンシグナリングパスウェイが有意に亢進していることが明らかとなった。

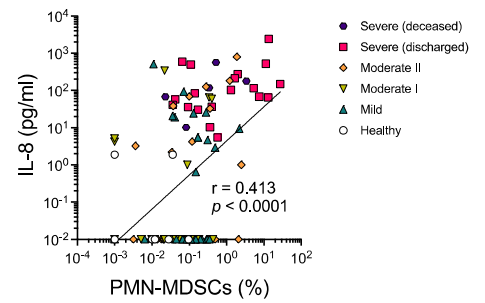


図2

(3) 総括

本研究から、COVID-19 重症化に伴い血中 IL-8 の上昇により PMN-MDSC が一過的に増加することで免疫抑制能が増強され、過剰な II 型インターフェロン応答を抑制することにより回復に寄与する可能性が示唆され (図 4)、PMN-MDSC が COVID-19 の重症化/予後予測マーカーとして利用できることが示唆された。本研究の成果が COVID-19 重症化の予防や治療のための基盤となることが期待される。

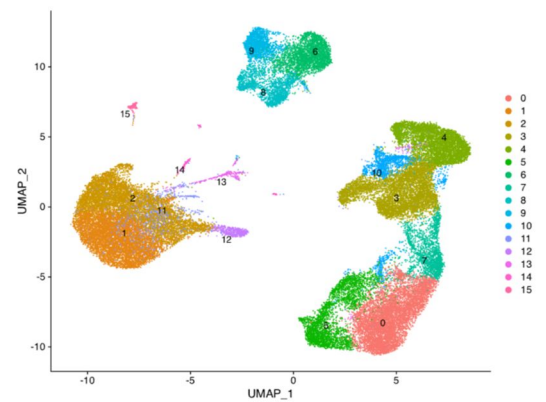


図3

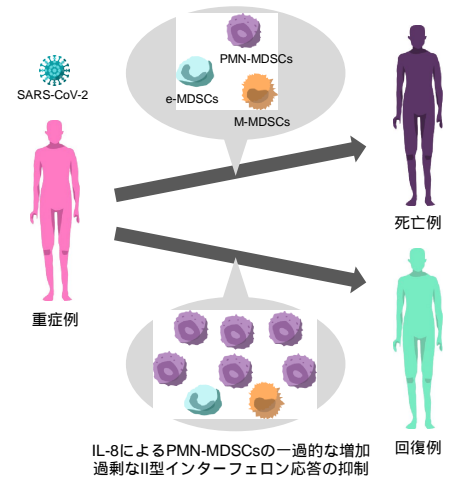


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takayuki Matsumura, Tomohiro Takano, Yu Adachi, Kazutaka Terahara, Saya Moriyama, Taishi Onodera, Ayae Nishiyama, Yoshimasa Takahashi
2. 発表標題 Myeloid cell dynamics predict clinical outcome of severe COVID-19
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------