

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐治 龍
横浜市立大学大学院医学研究科 救急医学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学 主任教授 中島 秀明

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 組織学 主任教授 大保 和之

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 実験動物医学 准教授 中澤 正年

博士の学位論文審査結果の要旨

Combining IL-6 and SARS-CoV-2 RNAemia-based risk stratification
for fatal outcomes of COVID-19

(血中 SARS-CoV2 RNA 量および IL-6 の組み合わせによる
COVID-19 の致死的前後のリスク層別化)

.....本文.....

学位論文の審査の冒頭において、申請者より上記表題について要旨の発表を行った。内容は以下のとおりである。

1. 序論

COVID-19 のパンデミックにより、人工呼吸器 (MV) や体外式膜型人工肺 (ECMO) の需要が逼迫している。医療資源を効率的に運用し死亡率を改善するために、患者の重症度を適切に層別化することを目指した。

COVID-19 患者の末梢血中インターロイキン (IL) -6 の上昇が人工呼吸器の必要性や高い死亡率に強く関連することが報告されてきた(Herold et al., 2020)。

そして IL-6 は単球・マクロファージ・樹状細胞などの免疫細胞にベータコロナウイルスが感染した際に放出されることが分かっており (Moore et al. 2020), 実際に重症 COVID-19 患者では末梢血中でも SARS-CoV-2 RNA が検出され、かつ IL-6 も高度上昇に上昇していると報告がなされていた(Chen et al., 2020)。そして COVID-19 におけるインターフェロン (IFN) - γ による T 細胞免疫反応と IL-6 によるマクロファージ活性化の相乗的效果によって急性呼吸促進症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) が発症するのではないかと推測されている(Zhou et al., 2020)。

これらのことから COVID-19 患者におけるウイルス RNA 血症と IL-6 の上昇は、ウイルス過負荷とそれによって引き起こされた過剰炎症を反映していると考えられ、両者が COVID-19 の重症化病態を直接表しているバイオマーカーであると仮説を立て、特に着目した。そこで血中 IL-6 濃度と SARS-CoV-2 RNA 量や、すでに重症化に関わると言われている検査所見 (リンパ球数・CRP・D-dimer・AST・LDH・GFR・SpO₂/FiO₂) や患者背景 (糖尿病・COPD・高血圧・心疾患・慢性腎臓病) と、重症度層別化能力を比較した。またこれらの中で有力なものを組み合わせることで、COVID-19 患者における ECMO 使用や死亡に至る致死的患者を前もって高精度に予測・層別化することを目的とした。

2. 実験材料と方法

この研究は横浜市立大学医学部附属病院倫理委員会の倫理許可 (No.B200200048) を得て実施された。横浜市立大学附属病院・横浜市立大学市民総合医療センター・国立病院機構横浜医療センターの3つの病院を対象として、2020年2月から2021年7月までに入院した患者のうち、臨

床情報が完全には取得できなかった5人と、誤嚥性肺炎または感染性動脈瘤という明確に異なる原因で死亡した2例を除く102人がこの本研究に登録された。それぞれ臨床所見・検査所見・転帰のデータを収集し、血中IL-6およびSARS-CoV-2RNAコピー数をELISAキットおよび定量PCRで評価した。

また臨床検査で気管支肺胞洗浄をうけた11人の患者については、気管支肺胞洗浄液中のIL-6濃度もELISAキットを用いて測定した。

3. 結果

30人の患者は入院後 0.73 ± 0.38 日でMVが必要となったが、残りの72人は観察中に必要ではなかった。その後MVを装着したうちの5人が入院後 4.8 ± 1.1 日(3日から9日の範囲)でARDSをきたしECMO導入となった。さらにそのうちの1人はARDSにより死亡したが、残りの4人は回復して退院した。また人工呼吸器を装着したうちの別の7人は、入院後 13.6 ± 1.6 日(7日から21日の範囲)でARDSにより死亡した。合計して12人の患者がECMOないし院内死亡をきたす致死群と判断された。それ以外の患者を非致死群と定義した。

様々な変数のうち、酸素飽和度と吸入酸素量の比(SpO_2/FiO_2)、IL-6、および挿管前の入院時のSARS-CoV-2 RNAは、致死群をよく予測することができた。さらにこれらの変数のうちを組み合わせることでさらに高精度に予後を予測することができた(曲線下面積:0.934)。また SpO_2/FiO_2 が低い(261未満)MV装着患者においては、30日後に致命的予後を辿る確率は、IL-6高値(49 pg/mL以上)かつSARS-CoV-2 RNAemia(1.5コピー/ μ L以上)の患者群で最も高く(88%)、IL-6高値またはRNAemiaの患者群が続き(22%)、IL-6低値かつRNAemiaでない患者群で最も低かった(8%)。

さらに11人の患者で気管支肺胞洗浄液中のIL-6と、同時に採取した血液中のIL-6の濃度を測定すると強い正の相関がみられた($r=0.93$, $p=0.001$)

4. 考察

CRP・LDH・リンパ球数といったすでに重症度に関わるとされている検査項目よりも、血中SARS-CoV-2 RNAやIL-6は致死群を精度よく予測することができた。したがってこれらはウイルス過負荷や過剰炎症といった肺の状態を直接的に反映しているバイオマーカーだと思われる。実際IL-6濃度は血中と気管支肺胞洗浄液で強く相関していた。病態機序に深く関わるこれらのバイオマーカーを組み合わせることで、MVが導入される前の時点で致死群を高精度で予測することができた。将来的には、これらのバイオマーカーがCOVID-19に対する免疫抑制療法などの治療ガイドとして使用できることも期待できる。

上記を申請者は論文発表した。また申請者は昨今の成果としてCOVID-19患者血漿のプロテオーム解析により致死群を予測するバイオマーカーとしてCHI3L1・IGFALSを見出したことを

述べた。さらに検体数を増やして LASSO 推定法を用いた予後予測式の作成も提示した。

審査にあたり、以上の論文の要旨の後に、以下の質疑応答を行った。審査員の質問内容を太字で示し、申請者の回答を続いて示す。

中澤正年：COVID-19 重症化では様々なサイトカインが関わりと考えられるが、その中でなぜ IL-6 に着目したのか述べよ。

申請者は IL-6 の他に IL-10・IL-17・IFN- α ・IFN- β ・IFN- γ ・TNF- α など様々なサイトカインを様々な患者の様々なタイムポイントで実際に測定した。結果として IL-6 が予後と最も関連することが分かった。またさまざまなサイトカインの中で IL-6 だけが血中濃度と気管支肺胞洗浄液中濃度との強い相関がみられた。

中澤正年：結果として IL-6 が最も予後を反映するサイトカインとなったのは何故なのか、申請者の考える分子学的な意義を述べよ。

例えば IL-10 は重症患者で高い傾向、IFN- α ・IFN- β は軽症患者で高い傾向にあったが、半数の検体では測定感度以下となり統計学的な差は見出すことができなかった。COVID-19 は様々な炎症経路を持つため、細胞種に特異的なサイトカインでは COVID-19 患者全体の重症度を反映できないのではないかと考える。転じて IL-6 は様々な細胞種によって産生されるため、多様な重症化機序を表現できたのではないかと考える。

中島秀明：COVID-19 において IL-6 を産生する細胞種は何だと考えるか。

フローサイトメーターを用いた研究にも取り組んできたが、サイトカインの染色まではしていなかった。文献的には肺胞マクロファージが主に産生していると推察される。

大保和之：COVID-19 において IL-6 そのものが重症化の原因となっているのか、あるいは炎症が起こっていることを示している結果に過ぎないのかどちらだと考えるか。

臨床研究でヒト化抗ヒト IL-6 受容体モノクローナル抗体であるトシリズマブが COVID-19 の重症化を防いだという報告がある。したがって結果というよりは IL-6 そのものが重症化の原因になっていると思われる。ただしトシリズマブ使用後に細菌による二次感染により重症化した症例も複数経験しており、またそのような報告もなされている。そのため IL-6 が最適な治療ターゲットとは言い難いと感じている。

中島秀明：COVID-19 において IL-6 の下流にある経路がよりよい治療ターゲットになり得るのではないかと。申請者自身の研究や、他の報告で何か述べられるものがあれば提示せよ。

申請者は IL-6 の下流の経路を調べる研究は行っていない。実際に IL-6 の下流の経路を調べる

には遺伝子欠損マウスを用いるのが適切と思われるが、SARS-CoV2 はそのままではマウスに対して病原性は持ち合わせず、数世代マウスの中でウイルスを継代させる必要がある。そのように変異したウイルスがヒトの COVID-19 のモデルとして適切かは不明確である。

中澤正年：COVID-19 において TNF- α は重症化に関連しなかったのか。

予備検討で測定を行ったが、市販の好感度 ELISA でも検出することができなかった。サイトカイン染色にフローサイトメーターを用いて特定の細胞種に着目すれば検出できるかもしれないが、バイオマーカーという点では実際的でないかもしれない。

大保和之：参考論文における COVID-19 予後層別化のバイオマーカー探索の研究において見出された CHI3L1 や IGFALS の、COVID-19 重症化における分子病理学的な意味は何か。

CHI3L1 は特発性肺線維症患者では血清 CHI3L1 の上昇が見られることが報告されている。免疫組織化学では、特発性肺線維症患者の線維化病変に隣接する細気管支上皮細胞および肺胞マクロファージで CHI3L1 の発現レベルが亢進していることも示されており、特発性肺線維症の線維化過程に CHI3L1 が関与している可能性が示唆されている。したがって CHI3L1 の上昇は、特に肺組織の損傷と修復の観点から、COVID-19 の重症化に関連している可能性がある。

一方で IGFALS は、健常なヒトにおいて IGFBP3 およびインスリン様成長因子 1(IGF-1) と三元複合体を形成する。IGFALS/IGFBP3 の IGF-1 への結合は、IGF-1 とその受容体 IGF-1R との相互作用を妨げ、IGF-1 の安定性を低下させ、それによってその生物学的機能を抑制することが示されている。IGF-1 濃度は線維増殖ステージで徐々に減少し ARDS 患者の死亡率と負の相関を示すことが分かっている。したがってさらに、IGFALS の低下は IGF-1 を介して間接的に COVID-19 における呼吸機能障害に関与していることが示唆される。

上記の質疑を踏まえて、審査員より以下の指摘を行った。

申請者は、臨床的な視点から研究立案を行い、研究を通じてまさに社会的課題の解決を図った点で非常に評価できる。一方で着目した IL-6 に対する分子病理学的評価・解析はあまりなされておらず、これらを今後加えることで COVID-19 に対する深い病態理解が進むと考えられる。

発表内容、質疑応答を踏まえ審査員による協議の結果、本研究は博士(医学)の学位授与に値すると考えられた。