

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年4月7日(07.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/071601 A1

(51) 国際特許分類:  
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/569 (2006.01)  
G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/036525

(22) 国際出願日: 2021年10月1日(01.10.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2020-168107 2020年10月2日(02.10.2020) JP

(71) 出願人: 国際スペースメディカル株式会社 (INTERNATIONAL SPACE MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1020082 東京都千代田区一番町6番地 相模屋本社ビル7階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(71) 出願人: 宮戸 みつる (MIYATO, Mitsuru) [JP/JP]; 〒2510052 神奈川県藤沢市藤沢 1 0 4 3 - 5 - 5 0 3 Kanagawa (JP). 落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro) [JP/JP]; 〒1040053 東京都中央区晴海 3 - 1 3 - 1 - 3 1 6 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 藤田 雄 (FUJITA, Yu); 〒2660031 千葉県千葉市緑区おゆみ野 3 - 1 9 - 4 - 1 3 0 6 Chiba (JP). 松崎 潤太郎 (MATSUZAKI, Juntaro); 〒1600018 東京都新宿区須賀町 1 0 - 8 - 1 0 8 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6 - 1 0 - 1 六本木ヒルズ森タワー 2 3 階 T M I 総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD OF PREDICTING PROGRESSIVE COVID-19 SEVERITY BY USING PROTEIN MARKERS IN BLOOD EXOSOMES

(54) 発明の名称: 血中エクソソームのタンパク質マーカーを利用したCOVID-19重症化予測方法

(57) Abstract: The present invention provides a method of predicting progressive severity in a COVID-19 patient by using RNA levels of COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, and the like in the patient's blood.

(57) 要約: 本発明は、患者の血液に含まれるCOPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7等のRNAのレベルを利用した、COVID-19患者の重症化予測方法を提供するものである。



WO 2022/071601 A1

## 明 細 書

発明の名称：

血中エクソソームのタンパク質マーカ―を利用したCOVID-19重症化予測方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、血液中のエクソソームが有するタンパク質を検出して、SARS-CoV-2感染症の重症化リスクを予測する方法等に関する。

### 背景技術

[0002] severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19) が全世界に蔓延しパンデミックとなっている。SARS-CoV-2は、コロナウイルス属のウイルスであり、遺伝情報として機能する核酸 (RNA)、それを取り囲む蛋白質の殻 (capsid)、及び、スパイクを有する脂質二重膜の殻 (envelope) からなる極めて小さい粒子 (直径0.1nm) である。このウイルスは、感染者の咳・くしゃみ・鼻水等の飛沫から放出されたウイルスが口や目から侵入する飛沫感染や、感染者の飛沫のウイルスを触った手で口や鼻に触れる接触感染により、ヒトからヒトへと感染が拡大している。

[0003] この感染症は、1～14日間の長い潜伏期間を経て、風邪等に似た発熱・咳等の初期症状となる。感染者の大半は軽症や無症状の不顕性である。COVID-19において問題とされているのは、残りの一部患者が、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) のような重度の呼吸障害を起こし、更には心筋炎や血管炎、脳髄膜炎等を併発して生命の危機に陥ることである。

[0004] 現在、各国においてSARS-CoV-2感染の有無の検査が積極的に実施されており、PCR検査に加えて、抗原検査、及び抗体検査が行われている。しかし、これらの検査方法は、ウイルスの存在そのもの又は過去にウイルス感染したことを判定するものであり、ウイルス感染した患者の重症化ま

では予測できないという問題があった。一部の基礎疾患、例えば、循環器疾患・呼吸器疾患・糖尿病等の基礎疾患の持病を持つ患者、及び、妊婦や高齢者等においては重症化しやすい傾向がみられるものの、健康な若年者における重症化例も見られ、より正確な重症化予測方法が求められている。

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] よって、本発明は、SARS-CoV-2感染患者における重症化予測方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、PCR検査によりSARS-CoV-2陽性と判定され、中程度の症状を呈する患者から血液サンプルを採取し、その後の病態の進行度を観察した。その後、患者の病態の進行度と血液サンプル中のエクソソームに含まれるタンパク質との関係をレトロスペクティブに解析した結果、患者血液由来のエクソソームが有するCOPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGP1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, C

CT2, THBD, ISG15, 及びZYXのレベルがCOVID-19患者が重症化すること、又は重症化しないことを示唆するマーカーとなることを見出した。よって、本発明は、血中エクソソームに含まれる上記タンパク質を利用した、COVID-19患者の重症化予測方法を提供するものである。

[0007] 本明細書において「COVID-19患者」は、その症状の有無にかかわらずSARS-CoV-2への感染が判明している対象又はSARS-CoV-2への感染が疑われる対象を意味する。例えば、COVID-19患者はPCR検査においてSARS-CoV-2が陽性と判定された患者であってもよい。SARS-CoV-2は、severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, 又は2019 novel coronavirus (2019-nCoV) と呼ばれるコロナウイルスであり、全長29.9kbの一本鎖プラス鎖RNAウイルスである。最初に発生した武漢株 (Wuhan-Hu-1) の遺伝子配列がGenBank\_ID MN908947に公開されているが、Nextstrainの報告によれば、25.9塩基変異/ゲノム/年の変異速度であることが報告されており、少なくとも9塩基の変異がランダムに発生していると考えられている。よって、本明細書において「SARS-CoV-2」とは、SARS-CoV-2の武漢株及びそこから変異により生じた派生株をすべて含む。

[0008] 本明細書における、マーカータンパク質は、COPB2 (COPI Coat Complex Subunit Beta 2) (例えば、配列番号11), KRAS (KRAS proto-oncogene) (例えば、配列番号12), PRKCB (Protein kinase C beta type) (例えば、配列番号13), RHOC (Ras homolog family member C) (例えば、配列番号14), CD147 (Basigin, extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN))

) (例えば, 配列番号15), CAPN2 (Calpain-2) (例えば, 配列番号16), ECM1 (Extracellular matrix protein 1) (例えば, 配列番号17), FGG (Fibrinogen gamma chain) (例えば, 配列番号18), MFAP4 (microfibril-associated protein 4) (例えば, 配列番号19), AD11 (1, 2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase, APL1, ARD, Fe-ARD, HMFT1638, MTCBP1, Ni-ARD, SIPL, mtnd), AK1 (Adenylate kinase isoenzyme 1), MGAT1 (Alpha-1, 3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase), CLDN3 (Claudin 3), CRP (C-reactive protein), UQCRC2 (Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial), FGA (Fibrinogen alpha chain), FGB (Fibrinogen beta chain), FGL1 (Fibrinogen-like protein 1), GPX1 (Glutathione peroxidase 1), GSK3B (Glycogen synthase kinase 3 beta), LBP (Lipopolysaccharide binding protein), PDGFC (Platelet Derived Growth Factor C), RAB13 (Ras-related protein Rab-13), RAP1B (Ras-related protein Rap-1b), SLC6A4 (Sodium-dependent serotonin transporter), UBA7 (Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 7), ORM1 (Orosomucoid 1, Alpha-1-acid glycoprotein 1),

RNPEP (Aminopeptidase B), ANGPT1 (Angiopoietin 1), APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される。好ましくは、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, 及びUBA7から選択され、より好ましくは、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, 及びMFAP4から選択される。

[0009] 本明細書におけるマーカータンパク質は、上述のマーカータンパク質のアイソフォーム、プレカーサータンパク質、成熟タンパク質、又はトランケットフォームであってもよく、更にそれらの一部のアミノ酸、例えば、1~50個、1~30個、1~20個、1~10個、1~8個、1~5個、1~3個、1~2個、又は1個のアミノ酸が置換され又は欠失していてもよく、又はそれらのタンパク質に含まれないアミノ酸（例えば、1~50個、1~30個、1~20個、1~10個、1~8個、1~5個、1~3個、1~2個、又は1個のアミノ酸）が付加され又は挿入されていてもよい。上述のマーカータンパク質と90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94

%以上, 95%以上, 96%以上, 97%以上, 98%以上又は約99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質もマーカータンパク質に含まれる。同一性は、例えば、BLAST等により判定することができる。特にそのように解することが不整合である場合を除き、本明細書に記載のマーカータンパク質はこれらの変異体やバリエーションを含む。

[0010] 本明細書において、「血液サンプル」とは、全血、血漿、血清、全血又は血球の溶血液などの血液の分画物若しくは処理物、並びにこれらの希釈液や濃縮液を含み、好ましくは血清又はその希釈液である。

[0011] 本明細書において、「重症化」とは、以下のWHO 2020 scoring for COVID-19 casesにおいて、Score 5以上 (Hospitalized-severe disease) を意味する。

[0012] [表1]

Patient	Descriptor	Score
Uninfected	No clinical or virological evidence of infection	0
Ambulatory	No limitation of activities	1
	Limitation of activities	2
Hospitalized-mild disease	No oxygen therapy	3
	Oxygen by nasal prongs or mask	4
Hospitalized-severe disease	Non-invasive ventilation of high-flow oxygen	5
	Intubation and mechanical ventilation	6
	Ventilation + additional organ support (pressors, RRT, ECMO)	7

RRT: renal replacement therapy, ECMO: extracorporeal membrane oxygenation.

[0013] 本明細書において、「エクソソーム」とは、様々な細胞から放出される直径約20~200nm又は50~150nmの細胞外小胞を指しEVとも表記される。エクソソームは、細胞間通信、抗原提示、タンパク質並びにmRNA及びmiRNA等の核酸の輸送をはじめとする様々な機能を有し得ることが知られている。好ましくは、本明細書におけるエクソソームは、CD9及びCD63を表面に有する。

[0014] 本明細書において、マーカーRNAとは、miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, RNU2-29P, CDKN2B-AS1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, let-7c-5p, m

i R-21-5 p, mi R-140-3 p, 及び C5orf66-AS2 から選択され、これらは例えば、順に、配列番号1~10に記載される核酸配列を有していてもよいがこれに限定されるものではない。

[0015] マーカーRNAにアイソフォーム又はバリエーションが存在する場合には、当該アイソフォームやバリエーションも本明細書におけるマーカーRNAに含まれる。例えば、本明細書におけるマーカーRNAは、上述のマーカーRNAとして知られる配列における一部の塩基、例えば、1~5個、1~3個、1~2個、又は1個の塩基が置換され又は欠失していてもよく、又は上述のマーカーRNAに含まれない塩基（例えば、1~5個、1~3個、1~2個、又は1個の塩基）が付加され又は挿入されていてもよい。また、上述のマーカーRNAと90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上又は約99%以上の同一性を有する塩基配列を有するRNAも本明細書におけるマーカーRNAに含まれる。同一性は、例えば、BLAST等により判定することができる。特にそのように解することが不整合である場合を除き、本明細書に記載のマーカーRNAはこれらの変異体やバリエーションを含む。

### 発明の効果

[0016] 本発明の方法等により、COVID-19患者の予後を予測することができることから、入院の可否の判断やモニタリング体制の必要性の判断に利用することができる。特に、重症化が予測される患者については、より頻繁な症状の確認を行うことにより、適切な治療や処置を行うことを可能とする。

### 図面の簡単な説明

[0017] [図1]実施例におけるコホートの患者募集フローチャートを示す。

[図2]31人の軽度のCOVID-19患者及び10人の感染していない健康な対照の血清サンプルからのCD9+/CD63+EVからのプロテオームのLC-MS同定のワークフローを示す。31人の軽度のCOVID-19患者は、サンプル採取後の経過から、グループ1（軽症；n=22）とグループ2（重症；n=9）に分けられた。

[図3] 3つの被検対象群からの723種類のタンパク質のPCAマップである。

[図4] 3つのサブジェクトグループ間のCOPB2、KRAS、PRKCM、RHOC、CD147、CAPN2、ECM1、FGG、及びMFAP4の相関関係を示すグラフである。P値は、ピアソンの相関分析による傾向に対する。エラーバーは平均±SEMを表す。縦軸はタンパク質量、横軸は患者群（非感染、グループ1（軽症）、グループ2（重症））を表す。

[図5] 9つのEVタンパク質についてROC解析を行ったグラフである。数値は評価されたAUC値（95%CI）を表す。

[図6] ログランク検定による9つのEVタンパク質のカプランマイヤー曲線を示す。縦軸は病状が進行しない患者の割合を示し、横軸の時間（日）は、登録日からの経過日数を表す。最適なカットオフ値を使用して、高グループと低グループを定義した。

[図7] 31人の軽度のCOVID-19患者及び10人の感染していない健康な対照の血清サンプルからのexRNAプロファイルをNGSで決定するワークフローを示す。31人の軽度のCOVID-19患者は、サンプル採取後の経過から、グループ1（軽症；n=22）とグループ2（重症；n=9）に分けられた。

[図8] 3つの被検対象群の43種類のトランスクリプトについてのPCAマップである。

[図9] 色はピアソンの相関係数を示す。上の三角形部分において、正の相関は紫色で表し、負の相関は茶色で表す。円の色濃さと楕円化は、相関係数に比例する。下三角に実際の相関値を表示し、ピンク色のハイライトは $P < 0.05$ を表す。クラスター1（PRKCB、RHOC、COPB2、及びKRAS）には、抗ウイルス応答に関連するEVタンパク質のグループが含まれていた。クラスター2（喫煙、年齢、及びMFPA4）及びクラスター3（CM1、CDKN2B、AS1、AL365184.1、CAPN2、CRP、FGG、及びCD147）には、凝固関連マーカーのグループが含ま

れていた。クラスター4 (ALT, RNU2-29P, SNORD33, miR-122-5p, 及びAL732437.2) には、肝障害に関連するexRNAのグループが含まれていた。

[図10]COVID-19の重症化予測の流れを示すフローチャートである。

[図11]COVID-19在宅診療法の図である。

## 発明を実施するための形態

### [0018] 1. 重症化可能性の判定方法

一態様において、本発明は、COVID-19患者の重症化する可能性を判定する方法であって、該患者由来の血液中のエクソソームに存在する1種類以上のマーカータンパク質のレベルを測定すること、及び測定されたマーカータンパク質のレベルを、コントロールRNAレベルと比較することにより、前記患者が重症化する可能性が判定されることを含んでなる。前記マーカータンパク質は以下のタンパク質からなる群から選択される：COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYX。

[0019] よって、本発明の重症化可能性の判定は、COVID-19患者である被験者の血液由来のエクソソーム中のマーカータンパク質レベルとコントロールのマーカータンパク質レベルとを比較することを含んでいてもよい。例えば、測定されるタンパク質がCOPB2又はKRASである場合、当該タンパク質のレベルが、健常人のタンパク質レベルと比較して高いときに、前記患者が重症化する可能性が低い又は軽症状態を維持すると判定され、あるいは、健常人のタンパク質レベルと比較して高くない（低いか又は同等である）ときに重症化する可能性が高いと判定することができる。また、測定されるタンパク質が、PRKCB又はRHOCである場合、当該タンパク質のレベルが、健常人又は軽症状態を維持した患者の感染判明時のタンパク質レベルと比較して低いときに、前記患者が重症化する可能性が高いと判定され、あるいは、健常人又は軽症状態を維持した患者の感染判明時のタンパク質レベルと比較して低くない（高いか又は同等である）ときに、前記患者が重症化する可能性が低いと判定される。測定されるタンパク質がCD147、CAPN2、ECM1、及びFGGのいずれかである場合、当該タンパク質のレベルが、健常人又は軽症状態を維持した患者の感染判明時のタンパク質レベルと比較して高いときに前記患者が重症化する可能性が高いと判定され、あるいは、当該タンパク質のレベルが、健常人又は軽症状態を維持した患者の感染判明時のタンパク質レベルと比較して高くない（低いか又は同等である）ときに前記患者が重症化する可能性が低いと判定される。また、測定されるタンパク質がMFAP4である場合、当該タンパク質のレベルが、健常人のタンパク質レベルと比較して低いときに前記患者が重症化する可能性が低いと判定され、あるいは、健常人のタンパク質レベルと比較して低くない（高いか又は同等である）ときに前記患者が重症化する可能性が高いと判定される。

[0020] 重症化する可能性を判定するために測定されるマーカータンパク質は、COPB2、KRAS、PRKCB、RHOC、CD147、CAPN2、ECM1、FGG、MFAP4、ADI1、AK1、MGAT1、CLDN3

, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される1種類又はそれ以上とすることができ、好ましくは、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, 及びMFAP4から選択される1種類又はそれ以上とすることができる。例えば、測定されるRNAは、2種類又はそれ以上、3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上、あるいは、5種類又はそれ以上とすることができる。

[0021] 2種類以上を組み合わせて利用する場合、好ましくは、以下の(a)又は(b)の組み合わせを利用することができる：

(a) PRKCB、RHOC、COPB2、及びKRASから選択される2種類以上の組み合わせ

(b) ECM1、CAPN2、FGG、及びCD147から選択される2種類以上の組み合わせ。

[0022] 本明細書において「コントロールタンパク質レベル」とは、比較対象におけるマーカータンパク質レベルを意味する。ここで「比較対象」とは、健常人又は重症化しなかった（軽症又は無症状を維持した）COVID-19患

者の感染判明時（感染初期）や入院時の血中エクソソームのマーカータンパク質レベルを意味する。「コントロールタンパク質レベル」は、被検患者の血液由来のエクソソーム中のマーカータンパク質レベルを測定する際に、健康人の血液由来のエクソソームサンプル又は重症化しなかった（軽症又は無症状を維持した）COVID-19患者の感染判明当初や入院時の血液由来のエクソソームサンプルを同時に測定することにより得ることができる。あるいは、既にこのような陰性比較対象について測定したマーカータンパク質レベルに関する情報を予め取得しておき、当該レベル又は当該レベルを考慮して設定された値をコントロールタンパク質レベルとして利用することもできる。このような値は、既に実施された試験の結果からROC解析を行い設定されたCut off値であってもよい。あるいは、このように事前に設定されたレベルのマーカータンパク質を含有するサンプルをコントロールサンプルとして予め調整しておき、被検患者の血液由来のエクソソーム中のマーカータンパク質レベルを測定する際に、同時に測定することでコントロールタンパク質レベルを得てもよい。

[0023] 本発明の方法がマーカータンパク質を測定する方法を含む場合、本発明の方法は、必要に応じて、被験患者由来の血液サンプルからエクソソームの調製ステップを含んでいてもよい。エクソソームの調製は、被験者から採取した血液を用いて任意の公知の方法を使用して行うことができる。例えば、血清などのサンプルからのエクソソームの回収は、超遠心分離法（例えば、Thery C., Curr. Protoc. Cell Biol. (2006) Chapter 3: Unit 3.22.）、ポリマー沈殿法、免疫沈降法、FACS法、限外濾過法、ゲル濾過法、HPLC法、及び抗体やレクチンを利用してビーズ等の担体に吸着させる方法が挙げられる。また、市販のエクソソーム単離用キットを用いて、エクソソームを回収してもよい。

[0024] 抗体を用いる方法を採用する場合、エクソソーム表面のCD9とCD63を利用して、抗CD9抗体及び抗CD63抗体が結合した担体を用いて単離することができる。エクソソームの調製ステップは、例えば、被検患者由来

の血液サンプルと抗CD9抗体及び抗CD63抗体が結合した担体とを混合すること、エクソソームが結合した担体を回収することを含んでいてもよい。また、このステップにおいて、エクソソームが結合した担体を洗浄する工程や担体からエクソソームを解離させる工程等を含んでいてもよい。

[0025] 上記回収方法のうち、超遠心分離法は、エクソソームの単離に最も一般的に利用されている標準的な方法である。超遠心分離法における遠心力は、例えば50,000×g以上、100,000×g以上、又は150,000×g以上であってよく、また300,000×g以下、250,000×g以下、又は200,000×g以下であってよい。遠心時間は、限定しないが、例えば、30分～120分、60分～90分、又は70分～80分間とすることができる。また、遠心分離前に、必要に応じて、フィルター濾過及び／又はより低い遠心力での遠心分離を行うことにより、夾雑物を除去又は低減してもよい。

[0026] エクソソームが回収されたこと、又はエクソソームの物性の確認は、公知の方法に従って行うことができ、例えば電子顕微鏡により視覚的に確認してもよく、又はNTA (Nano Tracking Analysis) 技術を用いてエクソソームの粒子径及び粒子数を計測してもよい。あるいは、エクソソームのマーカーとなり得るタンパク質及び／又は遺伝子の発現を確認することにより、エクソソームの存在を確認することもできる。

[0027] タンパク質レベルの測定は、調製されたエクソソームをそのまま用いるか、又はSDSやRIPA Buffer/RIPA Lysis Bufferなどの界面活性剤で膜を破壊してから行ってもよい。SDSを用いた場合には、タンパク質は変性するが、RIPA Buffer/RIPA Lysis Bufferを用いた場合には、未変性のタンパク質サンプルとして調製することができる。あるいは、調製されたエクソソームから更にタンパク質を抽出して測定してもよい。よって、本発明の方法は、任意で、調製したエクソソームからタンパク質を抽出精製することを含んでいてもよい。タンパク質を抽出する場合は、市販のエクソソームタンパク質抽出キット

(コスモ・バイオ株式会社), ExoMS Surface Protein Capture Kit (System Biosciences) などを用いて行うことができる。

[0028] タンパク質レベルの測定は、タンパク質量を測定可能な方法であれば特に制限されるものではないが、一般的にはマーカータンパク質と特異的に結合する物質を利用する方法である。「マーカータンパク質と特異的に結合する物質」としては、抗体又はその抗原結合性断片、アプタマー、リガンド/受容体又はその結合性断片、あるいはそれらと別の物質との融合物を挙げるることができる。「抗原結合性断片」とは、抗体の一部(部分断片)を含むタンパク質又はペプチドであって、抗体の抗原への作用(免疫反応性・結合性)を保持するタンパク質又はペプチドを意味する。このような免疫反応性断片としては、例えば、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fab3$ 、一本鎖 $Fv$ (以下、「 $scFv$ 」という)、(タンデム)バイスペシフィック一本鎖 $Fv$ ( $sc(Fv)_2$ )、一本鎖トリプルボディ、ナノボディ、ダイバレントVHH、ペンタバレントVHH、ミニボディ、(二本鎖)ダイアボディ、タンデムダイアボディ、バイスペシフィックトリボディ、バイスペシフィックバイボディ、デュアルアフィニティリターゲティング分子(DART)、トリアボディ(又はトリボディ)、テトラボディ(又は $[sc(Fv)_2]_2$ )、若しくは $(scFv-SA)_4$ ジスルフィド結合 $Fv$ (以下、「 $dsFv$ 」という)、コンパクトIgG、重鎖抗体、又はそれらの重合体を挙げることができる(Nature Biotechnology, 29(1):5-6(2011); Maneesh Jain et al., TRENDS in Biotechnology, 25(7)(2007):307-316; 及び、Christoph steinら, Antibodies(1):88-123(2012)参照)。本明細書において、抗体及び免疫反応性断片は、モノスペシフィック、バイスペシフィック(二重特異性)、トリスペシフィック(三重特異性)、及びマルチスペシフィック(多重特異性)のいずれであってもよい。

[0029] 典型的にはタンパク質レベルの測定は、マーカートンパク質と特異的に結合する物質に結合したマーカートンパク質の結合レベルを決定することにより行われる。測定される「結合レベル」とは、これらの物質の結合量、結合数、又は結合割合、あるいはそれらを表す数値（例えば、測定された蛍光強度などの測定値そのもの）とすることができる。この場合、マーカートンパク質と特異的に結合する物質として標識化された物質を用いるか、あるいは、マーカートンパク質を標識化して用いてもよい。また、一般的には標準サンプルを同時に測定し、当該標準サンプルを基に標準曲線若しくは検量線を作成して算出した値、又は標準サンプルレベルを指標に標準化した数値を結合レベルとして決定する。

[0030] よって例えば、本発明の方法は、以下を備えていてもよい：

(a) 少なくとも1つのマーカートンパク質と結合する物質と、患者の血液由来のエクソソーム中のタンパク質とを接触させること；

(b) 前記マーカートンパク質と結合する物質に結合した前記エクソソーム中のマーカートンパク質の結合レベルを決定すること；及び、

(c) 測定された結合レベルから当該エクソソーム中のマーカートンパク質レベルを決定すること。

[0031] マーカートンパク質と結合する物質として抗体又はその抗原結合性断片を用いる場合、結合の測定は公知の検出及び／又は測定方法に基づくことができる。例えば、酵素免疫測定法（E I A法）、簡易E I A法、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（E L I S A法）、ラジオイムノアッセイ法（R I A法用）、蛍光免疫測定法（F I A法）等の標識化免疫測定法；ウェスタンブロットティング法等のイムノブロットティング法；金コロイド凝集法等のイムノクロマト法；イオン交換クロマトグラフィ法、アフィニティークロマトグラフィ法等のクロマトグラフィ法；比濁法（T I A法）；比ろう法（N I A法）；比色法；ラテックス凝集法（L I A法）；粒子計数法（C I A法）；化学発光測定法（C L I A法、C L E I A法）；沈降反応法；表面プラズモン共鳴法（S P R法）；レゾナントミラーディテクター法（R M D法）；比

較干渉法等により結合を測定することができる。

[0032] 具体的には、固相に固定化された本発明の抗体又はその抗原結合性断片に被験試料（サンプル）を接触させ、洗浄後、マーカートンパク質と結合可能な標識化抗体を添加した後、非結合抗体を洗浄により除去し、当該抗体の標識を検出又は標識量（例えば、標識の強度）を測定することによりマーカートンパク質のレベルを決定することができる。また、イムノクロマトにより行う場合には、固定化されていない第一のマーカートンパク質と結合可能な標識化抗体にサンプルを接触させた後、当該混合物を第二のマーカートンパク質と結合可能な抗体又はその抗原結合性断片が特定部位に固定化された担体と接触させ、当該部位における前記標識化抗体を検出又は標識量（例えば、標識の強度）を測定することによりマーカートンパク質のレベルを決定することができる。

[0033] 標識化の方法としては、例えば、放射性同位体（R I）標識、蛍光標識、及び酵素標識を挙げることができる。R I標識する場合の放射性同位体としては、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{45}\text{Ca}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ を挙げることができる。また、蛍光標識する場合の蛍光色素としては、DAPI、SYTO X（登録商標）Green、SYTO（登録商標）9、TO-PRO（登録商標）-3、Propidium Iodide、Alexa Fluor（登録商標）350、Alexa Fluor（登録商標）647、Oregon Green（登録商標）、Alexa Fluor（登録商標）405、Alexa Fluor（登録商標）680、Fluorescein（FITC）、Alexa Fluor（登録商標）488、Alexa Fluor（登録商標）750、Cy（登録商標）3、Alexa Fluor（登録商標）532、Pacific Blue（商標）、Pacific Orange（商標）、Alexa Fluor（登録商標）546、Coumarin、Tetramethylrhodamine（TRITC）、Alexa Fluor（登録商標）555、BODIPY（登録商標）FL、Texas Red（登録商標）、Alexa Fluor

(登録商標) 568, Pacific Green (商標), Cy (登録商標) 5, 及び, Alexa Fluor (登録商標) 594 を挙げることができる。酵素標識としては、ビオチン (ビオチン-16-dUTP, ビオチン-11-dUTP など), ジゴキシゲニン (DIG:ステロイド系天然物) (デオキシウリジン5'-三リン酸), アルカリホスファターゼなどが利用可能である。

[0034] また、本発明のマーカートンパク質レベルを決定するステップは、以下に記載するマーカートンパク質と結合する物質を有する組成物やデバイスを利用してよい。

[0035] 本明細書において、タンパク質が「特異的に結合する」とは、当該物質が他のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する親和性よりも、マーカートンパク質配列を有する核酸に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、マーカートンパク質を他のアミノ酸配列を有するタンパク質から区別して検出することが可能な程度の親和性を意味する。他のアミノ酸配列は、マーカートンパク質配列と区別できる程度に異なっていることが好ましく、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。例えば、実質的に高い親和性は、マーカートンパク質との結合量が、他のアミノ酸配列との結合量の3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上であってもよい。

[0036] 本発明の重症化可能性は、上述のマーカートンパク質に加えて、該患者由来の血液中のマーカートンRNAのレベルを利用して判定されてもよい。よって、上記方法は、更に、該患者由来の血液サンプル中の1種類以上のマーカートンRNAのレベルを測定することを含み、前記マーカートンパク質レベルと当該マーカートンRNAレベルとを組み合わせる可能性が判定されてもよい。具体的には、測定されたマーカートンRNAのレベルが、コントロールの該マーカートンRNAレベルと比較して高いときに前記患者が重症化する可能性

が高いと判定されることを含んでなる。前記マーカーRNAは以下のRNAからなる群から選択される：miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, RNU2-29P, CDKN2B-AS1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, let-7c-5p, miR-21-5p, miR-140-3p, 及びC5orf66-AS2。

[0037] 本発明の方法は、任意でCOVID-19患者の血液からRNAを抽出することを含んでいてもよい。RNAは、市販のRNA抽出キット（例えば、miRNeasyMini Kit, 又は、QIAzol及びmiRNeasy Mini Kit, (いずれもQiagen, Hilden, ドイツ)）を用いて、製造者のプロトコルに従い抽出することができる。

[0038] 重症化する可能性を判定するために測定されるマーカーRNAは、miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, RNU2-29P, CDKN2B-AS1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, let-7c-5p, miR-21-5p, miR-140-3p, 及びC5orf66-AS2から選択される1種類又はそれ以上とすることができる。好ましくは、miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, RNU2-29P, CDKN2B-AS1, 及びAL365184.1から選択される1種類又はそれ以上とすることができる。例えば、測定されるRNAは、2種類又はそれ以上、3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上、あるいは、5種類又はそれ以上とすることができる。

[0039] 2種類以上を組み合わせて利用する場合、好ましくは、以下の(a)又は(b)の組み合わせを利用することができる：

- (a) CDKN2B-AS1とAL365184.1との組み合わせ
- (b) miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, 及びRNU2-29Pから選択される2種類以上の組み合わせ。

[0040] 本発明者らの見出したところによれば、COVID-19患者の血中にお

けるこれらのRNAレベルが、非感染の健常人又は感染判明後の経過において軽症の状態を維持したCOVID-19患者の感染判明時と比較して高い場合、重症化しやすい。よって、本発明の重症化可能性の判定は、COVID-19患者である被験者の血液サンプル中のマーカーRNAレベルとコントロールのRNAレベルとを比較することにより行うことができる。被験者由来の血液サンプル中のマーカーRNAレベルが、コントロールのマーカーRNAレベルよりも高い場合には、重症化する可能性が高いと判定される。また、被験者由来のサンプルにおけるマーカーRNAレベルが、コントロールのマーカーRNAレベルと比較して高くない（即ち、同等か低い）場合には、重症化する可能性が低い又は軽症の状態を維持する可能性が高いと判定することができる。

[0041] 本明細書において「コントロールのマーカーRNAレベル」とは、陰性比較対象におけるマーカーRNAレベルを意味する。ここで「陰性比較対象」とは、健常人又は重症化しなかった（軽症又は無症状を維持した）COVID-19患者の感染判明時（感染初期）や入院時の血液サンプル中のマーカーRNAレベルを意味する。「コントロールのマーカーRNAレベル」は、被検患者の血液サンプル中のマーカーRNAレベルを測定する際に、健常人の血液サンプル又は重症化しなかった（軽症又は無症状を維持した）COVID-19患者の感染判明当初や入院時の血液サンプルをコントロールとして同時に測定することにより得ることができる。あるいは、既にこのような陰性比較対象について測定されたマーカーRNAレベルに関する情報を予め取得しておき、当該レベル又は当該レベルを考慮して設定された値をコントロールのマーカーRNAレベルとして利用することもできる。例えば、このような値は、既に実施された試験の結果からROC解析を行い設定されたCut off値であってもよい。あるいは、このように事前に設定されたレベルのマーカーRNAを含有するサンプルをコントロールサンプルとして予め調整しておき、被検患者の血液サンプル中のマーカーRNAレベルを測定する際に、同時に測定することでコントロールのマーカーRNAレベルを得て

もよい。

[0042] RNAレベルの測定は、RNA量を測定可能な方法であれば特に制限されるものではないが、一般的にはマーカーRNAと特異的に結合する物質を利用する方法で行われる。一例において「マーカーRNAと特異的に結合する物質」は、核酸分子であり得、好ましくはマーカーRNAと相補的な配列を有する核酸分子である。マーカーRNAと相補的な配列を有する核酸分子は、マーカーRNAとハイブリダイゼーションにより特異的に結合することができる。本明細書における「核酸」はDNA、RNA、又は人工的に創製した核酸（PNAやLocked Nucleic Acid（2'，4' - BNA）などの架橋型核酸を含む）、あるいはそれらの組み合わせを含む。マーカーRNAと特異的に結合する核酸分子は、少なくとも一部に人工的に設計された配列（例えば、標識化やタグ化の為の配列など）を含んでいてもよい。

[0043] 「プローブ」は、典型的には、マーカーRNA配列と相補的な配列を有し、マーカーRNA配列との結合を測定するために用いられる核酸分子である。プローブは通常、マーカーRNAと特異的に結合可能な10～30mer、10～20merなどの核酸分子である。マーカーRNAとプローブとの結合レベルを測定する方法としては、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）、マイクロアレイ、ASO法などを挙げることができ、具体的には、GeneChip™ miRNA Array Strip（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）やAgilent miRNAマイクロアレイ（Agilent Technologies社）を用いる方法を用いることができる。

[0044] RNAレベルの測定は、マーカーRNAに結合したマーカーRNAと特異的に結合する物質の結合レベルを測定することにより行うことができる。「結合レベル」は、結合量、結合数、又は結合割合、あるいはそれらを表す数値（例えば、測定された蛍光強度などの測定値そのもの）とすることができる。

る。この場合、マーカーRNAと特異的に結合する物質として標識化された物質を用いるか、あるいは、マーカーRNAを標識化して用いてもよい。また、一般的には標準サンプルを同時に測定し、当該標準サンプルを基に標準曲線若しくは検量線を作成して測定サンプルの測定値から算出された値、又は標準サンプルレベルを指標に標準化された数値を結合レベルとして決定する。

[0045] 標識化の方法としては、例えば、放射性同位体（R I）標識、蛍光標識、及び酵素標識を挙げることができる。R I標識する場合の放射性同位体としては、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{45}\text{Ca}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ を挙げることができる。また、蛍光標識する場合の蛍光色素としては、DAPI、SYTO X（登録商標）Green、SYTO（登録商標）9、TO-PRO（登録商標）-3、Propidium Iodide、Alexa Fluor（登録商標）350、Alexa Fluor（登録商標）647、Oregon Green（登録商標）、Alexa Fluor（登録商標）405、Alexa Fluor（登録商標）680、Fluorescein（FITC）、Alexa Fluor（登録商標）488、Alexa Fluor（登録商標）750、Cy（登録商標）3、Alexa Fluor（登録商標）532、Pacific Blue（商標）、Pacific Orange（商標）、Alexa Fluor（登録商標）546、Coumarin、Tetramethylrhodamine（TRITC）、Alexa Fluor（登録商標）555、BODIPY（登録商標）FL、Texas Red（登録商標）、Alexa Fluor（登録商標）568、Pacific Green（商標）、Cy（登録商標）5、及び、Alexa Fluor（登録商標）594を挙げることができる。酵素標識としては、ビオチン（ビオチン-16-dUTP、ビオチン-11-dUTPなど）、ジゴキシゲニン（DIG：ステロイド系天然物）（デオキシウリジン5'-三リン酸）、アルカリホスファターゼなどが利用可能である。

- [0046] 例えば、本発明の方法は、以下の（a）～（c）を備えていてもよい：
- （a）少なくとも1つのマーカーRNAの塩基配列若しくはその一部と結合する核酸分子（プローブ）と、患者の血液サンプルとを接触させること；
  - （b）前記プローブに結合した前記血液サンプル中のマーカーRNAの結合レベルを測定すること；及び、
  - （c）測定された結合レベルから当該血液サンプル中のマーカーRNAレベルを決定すること。
- [0047] 前記方法において、少なくとも1つのマーカーRNAの塩基配列若しくはその一部と結合する核酸分子（プローブ）の代わりに、本明細書に記載された当該核酸分子を含む組成物、キット、又はデバイスを利用してもよい。
- [0048] あるいは、RNAレベルは、PCRを利用した方法を用いて測定することができ、例えば、マーカーRNAと特異的に結合する核酸（プライマー）を用いてqPCR、ARMS（Amplification Refractory Mutation System）、RT-PCR（Reverse transcriptase-PCR）、又はNested PCRを行うことにより測定してもよい。あるいは、インベーター（登録商標）法を利用してもよい。例えば、適切なプライマーと共にGenoExplorer™ miRNA qRT-PCR Kit（GenoSensor Corporation）を使用する方法を利用することができる。「プライマー」は通常、核酸増幅のために用いられる10～30mer（好ましくは、17～25mer、15～20merなど）の核酸分子であり、少なくともその一部に（好ましくは、7mer以上、8mer以上、9mer以上、10mer以上の）マーカーRNAの末端配列と相補的な配列を有する。
- [0049] よって、RNAレベルは、以下のステップにより測定されてもよい：
- （a）患者の血液サンプルを鋳型として、マーカーRNAと特異的に結合可能な核酸分子（プライマー）を用いて、該患者の血液サンプル中のマーカーRNAの全部又は一部を増幅させること；
  - （b）増幅された核酸分子のレベルを測定すること；及び、

(c) 増幅された核酸分子のレベルから当該血液サンプル中のマーカーRNAレベルを決定すること。

[0050] 患者の血液サンプル中のマーカーRNAの全部又は一部の増幅は、当該血液サンプルを鋳型としてPCR反応等を行うことにより実施することができる。増幅された核酸のレベルは、ドット・プロット・ハイブリダイゼーション法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、PCR-RFLP法、In situ RT-PCR法、PCR-SSO (sequence specific Oligonucleotide) 法、PCR-SSP法、AMPFLP (Amplifiable fragment length polymorphism) 法、MVR-PCR法、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法により測定することができる。

[0051] 本明細書において、RNAと「特異的に結合する」とは、当該物質が他の塩基配列を有する核酸に対する親和性よりも、マーカーRNA配列を有する核酸に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、マーカーRNA配列を有する核酸を他の塩基配列を有する核酸から区別して検出することが可能な程度の親和性を意味する。他の塩基配列は、マーカーRNA配列と区別できる程度に異なっていることが好ましく、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下の同一性を有する塩基配列であってもよい。例えば、実質的に高い親和性は、マーカーRNAとの結合量が、他の塩基配列との結合量の3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上であってもよい。

[0052] 本発明の方法は、更に、上述のマーカータンパク質、マーカーRNAに加えて、年齢、喫煙インデックス、血中CRP値、及び血中ALT値を利用して行われてもよい。すなわち、年齢、喫煙インデックス、血中CRP値、及び／又は血中ALT値と、前記マーカータンパク質レベルとを組み合わせることで重症化の可能性を判定してもよいし、あるいは、年齢、喫煙インデックス、

血中CRP値、及び血中ALT値と、前記マーカータンパク質レベルと、前記マーカーRNAレベルとを組み合わせることで重症化の可能性を判定してもよい。ここで、年齢、喫煙インデックス、CRP、及びALTは全て健常人又は軽症を維持したコントロールと比較して数値が高い場合に重症化可能性が高いと判定され、あるいは、健常人又は軽症者であるコントロールと比較して数値が高くない（低いか又は同等である）場合に重症化可能性が低いと判定される。喫煙インデックス、CRP、及びALTは、常法により判定又は測定することができる。

[0053] よって、本発明の重症化予測は、以下の(a)～(d)から選択される組み合わせにより重症化を判定することを含んでもよい：

(a) PRKCB, RHOC, COPB2, 及びKRASからなる群から選択される2以上の因子

(b) 喫煙インデックス、年齢、及びMFAP4からなる群から選択される2以上の因子

(c) CDKN2B-AS1, AL365184.1, ECM1, CAPN2, CRP, FGG, 及びCD147からなる群から選択される2以上の因子

(d) ALT, RNU2-29P, SNORD33, miR-122-5p, 及びAL732437.2からなる群から選択される2種類以上の因子。

[0054] 被験者由来のサンプルにおけるマーカーレベルが、比較対象となるコントロールレベルより高い又は低いかな否かは、統計的分析により決定することができる。統計学的有意性は、T-test (T検定), F検定, カイ二乗検定等の統計学的手法により判断でき、例えば、2以上のサンプルを比較し、信頼区間及び/又はp値を決定することにより決定することができる (Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983)。本発明の信頼区間は、例えば、90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%又は99.99%であってもよい。p値は、例えば、0

. 1, 0. 05, 0. 025, 0. 02, 0. 01, 0. 005, 0. 001, 0. 0005, 0. 0002又は0. 0001であってもよい。

[0055] 本明細書全体において、「レベル」とは、数値化された存在量に関する指標を意味し、例えば、濃度、量あるいはその代わりとして用いることができる指標（好ましくは、数値指標）を含む。よって、レベルは蛍光強度等の測定値そのものであってもよいし、濃度に換算された値であってもよい。また、レベルは、絶対的な数値（存在量、単位面積当たりの存在量など）であっても良いし、又は必要に応じて設定された比較対照と比較した相対的な数値であってもよい。

[0056] 本明細書において、重症化する可能性を判定する方法は、重症化する可能性を決定、又は評価する方法、重症化すること又は重症化しないことを予測する方法、重症化しない可能性を決定、判定、又は評価する方法、あるいは、これらを行うための情報を提供する方法として使用してもよい。

[0057] 本明細書の「可能性判定方法」は、そのように解することが不整合である場合を除き、重症化可能性の変化をモニターする方法を含む。よって、本明細書において、「可能性を判定する」の語は、特にそのように解することが不整合である場合を除き、重症化可能性の変化をモニターすると解釈しても良い。また、モニターする方法における可能性判定は、連続的又は断続的に行われても良い。

[0058] また、本発明の可能性判定方法は、*in vivo*, *ex vivo*, 又は *in vitro* のいずれで行われるものであってもよいが、好ましくは、*ex vivo*, 又は *in vitro* で行われる。

[0059] 可能性判定は、それにより患者の状態の経過又は転帰を予測することを意味し、状態の経過又は転帰を100%の正確さで判断可能であることを意味するものではない。重症化可能性が高いとは、重症化が起こる可能性が増大していることを意味するものであり、重症化が起こらない場合を基準として起こりやすいことを意味するものではない。即ち、可能性の判定結果は、マーカーRNAが上昇している患者において、そのような特徴を示さない患者

に比較して、重症化がより生じやすいということの意味する。

[0060] 本発明の重症化可能性判定方法は、更に重症化する可能性が高いと判定されたCOVID-19患者に対して、重症化予防処置を施すことを含んでもよい。このような、重症化予防処置としては、ワクチン、治療薬、若しくは予防薬の投与、人工呼吸器、ECMO、若しくはIMPELLA等による治療又は処置、及び、患者の症状モニタリングの頻度を高める（例えば、1日1回又はそれ以上、1日2回又はそれ以上、1日3回又はそれ以上など）ことなどを挙げるができる。

[0061] 2. COVID-19重症化マーカー

別の態様において、本発明は、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNM1, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択されるから選択される少なくとも1種類のタンパク質である、COVID-19重症化マーカーに関する。これらのうち、好ましくは、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1

, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, 及びUBA7から選択される少なくとも1種類のタンパク質であり、より好ましくは、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, 及びMFAP4から選択される少なくとも1種類のタンパク質である。

[0062] 本明細書において「マーカー」とは、被験者におけるその発現又は存在レベルが、既に発生している特定の疾患、状態又は症状を示唆しているか、又は将来において特定の疾患、状態又は症状をもたらすリスクを示唆する生体内分子を意味する。別の言い方をすれば、マーカーは、現在又は将来の特定の疾患、状態又は症状を判断又は予測するための指標、又は指標として測定される分子である。具体的に、本発明におけるマーカーが、COPB2、KRAS、PRKCB、RHOC、及びMFAP4のいずれかである場合、存在レベルが低いことによりCOVID-19が重症化するリスクが高いことを示す分子であり、本発明におけるマーカーが、CD147、CAPN2、ECM1、及びFGGのいずれかである場合、存在レベルが高いことによりCOVID-19が重症化するリスクが高いことを示す分子である。

[0063] 3. COVID-19重症化予測用組成物又はキット

別の態様において、本発明は、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB

, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される少なくとも1種類のタンパク質と結合可能な物質を含むCOVID-19重症化予測用組成物に関する。あるいは、本発明は、COPB2, KRAS, PRKCB, RHOA, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される少なくとも1種類のタンパク質と結合可能な物質を含むCOVID-19重症化予測用キットであってもよい。

[0064] マーカータンパク質と結合可能な物質は、上述の「1. 重症化可能性の判定方法」において「マーカータンパク質と結合可能な物質」として記載された物質を使用することができる。例えば、キットは、マーカータンパク質と

結合可能な抗体又はその結合性断片が固定化した固相又はハプテン、及び標識化されたマーカートンパク質と結合可能な抗体又はその結合性断片を含む免疫化学測定キットとすることができる。または、本発明のキットは、マーカートンパク質と結合可能な抗体又はその結合性断片、及び、抗体又はその結合性断片と結合可能な物質（例えば、抗体又はその結合性断片）を含む免疫化学測定キットとすることができる。

[0065] COVID-19重症化予測用組成物又はキットは、必要に応じてマーカートンパク質と結合可能な物質を安定的に保存するための緩衝液等を含んでもよい。また、本発明の重症化予測用組成物又はキットは、上述の公知の検出及び／又は測定方法に基づくことができる。

[0066] COVID-19重症化予測用組成物又はキットは、マーカートンパク質と特異的に結合する物質へのマーカートンパク質の結合レベルを決定するためのものであってもよい。この場合、当該組成物又はキットは、蛍光などによりマーカートンパク質との結合を検出するためのシステムと共に使用されるものであって良い。

[0067] 上記組成物又はキットは、更に、1種類又はそれ以上、2種類又はそれ以上、3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上、5種類又はそれ以上の前記マーカRNAとを測定可能な物質を含んでもよい。

[0068] 例えば、前記組成物又はキットは、以下の組み合わせを含んでもよい：

(a) PRKCBを測定可能な物質、RHOCを測定可能な物質、COPB2を測定可能な物質、及びKRASを測定可能な物質から選択される2種類以上の組み合わせ

(b) ECM1を測定可能な物質、CAPN2を測定可能な物質、FGGを測定可能な物質、及びCD147を測定可能な物質から選択される2種類以上の組み合わせ。

[0069] 本発明のキットは、必要に応じて、発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、検体前処理用試薬、ブロッキング試薬等を含んでもよい。また、

本発明のキットが標識化された物質を含む場合、更に該標識と反応する基質を含んでいてもよい。更に、本発明のキットは、紙箱又はプラスチックケース等のキットの構成物を格納するパッケージ、及び取扱い説明書等を含んでいてもよい。キットは、含まれる異なる構成成分が別々の容器中に包装され、一つのキットに含まれていてもよいし、あるいは、マーカートンパク質と結合可能な物質のみがキットに含まれ、別の構成成分がキットとは別に提供されていてもよい。

[0070] 4. COVID-19重症化予測用デバイス

本明細書におけるデバイスは、1種類又はそれ以上、2種類又はそれ以上、3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上、又は5種類のマーカートンパク質と結合可能な物質が結合した、アレイ、ビーズ、チップ、免疫クロマトプレート又はカラムなどを含んでいてもよい。当該デバイスは、上述のマーカートンパク質と、マーカートンパク質と特異的に結合する物質との結合レベルを測定することにより行うための物であってもよい。

[0071] 本明細書におけるデバイスは、更に、1種類又はそれ以上、2種類又はそれ以上、3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上、又は5種類のマーカRNAと結合可能な物質（プローブ）が結合した、マイクロアレイ、ビーズ、又はカラムなどであってもよい。当該デバイスは、上述のマーカRNAと、マーカRNAと特異的に結合する物質（プローブ）との結合レベルを測定することにより行うための物であってもよい。

[0072] 「マイクロアレイ」は、1つ以上のマーカを一度に定量する方法において用いられるデバイスを指す。マイクロアレイには、単一のマーカに結合する複数種類のプローブ又は抗体やその抗原結合性断片が結合していてもよい。DNAマイクロアレイは、例えば、マーカRNAに相補的な完全長cDNA又はマーカRNAの一部にハイブリダイズするcDNA断片がプローブとして結合していてもよい。

[0073] 5. マーカートンパク質の測定方法

別の態様において、本発明は、患者由来の血液由来のエクソソームに含ま

れるCOPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される少なくとも1種類のタンパク質のレベルを決定する方法であって,

該患者由来の血液由来のエクソソームに含まれるタンパク質と、前記組成物又は前記デバイスとを接触させることを含んでなる方法に関する。

[0074] より具体的には、本発明は、患者由来の血液由来のエクソソームに含まれる1種類以上のマーカータンパク質のレベルを測定する方法であって、

該患者由来の血液由来のエクソソームに含まれるタンパク質と、前記組成物又は前記デバイスとを接触させること、

前記組成物又は前記デバイス中の前記マーカータンパク質と結合可能な物質に結合した前記エクソソーム中のマーカータンパク質の結合レベルを測定すること；及び、

測定された結合レベルから当該エクソソーム中のマーカータンパク質レベルを決定することを含んでなる方法であってもよい。

[0075] 別の態様において、本発明は、患者由来の血液由来のエクソソームに含まれる1種類以上のマーカータンパク質のレベル、並びに、患者由来の血液に含まれる1種類以上のマーカーRNAのレベルを測定する方法であって、

該患者由来の血液由来のエクソソームに含まれるタンパク質と、前記組成物又は前記デバイスとを接触させること、並びに

該患者由来の血液中のRNAと、前記組成物又は前記デバイスとを接触させることを含んでなる方法に関する。

[0076] より具体的には、本発明は、患者由来の血液由来のエクソソームに含まれる1種類以上のマーカータンパク質のレベル、並びに、患者由来の血液に含まれる1種類以上のマーカーRNAのレベルを測定する方法であって、

該患者由来の血液由来のエクソソームに含まれるタンパク質と、マーカータンパク質と結合可能な物質を有する前記組成物又は前記デバイスとを接触させること、

前記組成物又は前記デバイス中の前記マーカータンパク質と結合可能な物質に結合した、前記エクソソーム中のマーカータンパク質の結合レベルを測定すること；及び、

測定された結合レベルから当該エクソソーム中のマーカータンパク質レベルを決定すること、並びに、

該患者由来の血液サンプルに含まれるRNAと、マーカーRNAと結合可能なプローブを有する前記組成物又は前記デバイスとを接触させること、

前記組成物又は前記デバイス中の前記プローブに結合した血液中のマーカーRNAの結合レベルを測定すること；及び、

測定された結合レベルから当該血液中のマーカーRNAレベルを決定することを含んでなる方法であってもよい。

[0077] 本明細書全体にわたって、測定されるマーカーRNA若しくはマーカータンパク質、又は組成物やデバイスに含まれるマーカーRNA若しくはマーカータンパク質は、1種類又はそれ以上、2種類又はそれ以上、3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上、あるいは5種類又はそれ以上であってもよい。

。2種類以上を測定する場合には、重症化可能性は、測定された全ての結果を総合して考慮することにより判定してもよい。例えば、測定した全てのマーカーが重症化可能性が高いとの判定結果を示す場合は、測定した一部のマーカーが重症化可能性が高いとの判定結果を示す場合よりも、重症化可能性が高いと判定してもよい。あるいは、各マーカーについて重みづけを行い、より、重要度が高いマーカーRNAの結果を重視して重症化可能性を判定してもよい。例えば、本願実施例の結果において、感度及び特異度の高いタンパク質（例えば、COPB2、KRAS、PRKCB、RHOC、CD147）、P値の低いタンパク質（RHOC、ECM1、FGG、MFAP4）など、重症化した患者を判別（discrimination）する上でより有益であったことが示されたタンパク質の重要度を高いとすることができる。

[0078] 本明細書全体にわたって、本発明の方法に使用される又は本発明の組成物、キット及びデバイスに含まれるマーカーRNAと結合可能な物質又はマーカータンパク質と結合可能な物質は、1種類のマーカーRNA又は1種類のマーカータンパク質に対して2種類以上であってもよい。よって、例えば、本発明の方法において、同一のマーカーRNAに結合可能な異なる2種類又はそれ以上（3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上など）のプローブや、同一のマーカーRNAに結合可能な2種類又はそれ以上（3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上など）のプライマーを用いてもよい。また、本発明の方法において、同一のマーカータンパク質に結合可能な異なる2種類又はそれ以上（3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上など）の抗体又はその抗原結合性断片を用いてもよい。また、本発明の組成物、キット及びデバイスは、同一のマーカーRNAに結合可能な異なる2種類又はそれ以上（3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上など）のプローブや、同一のマーカーRNAに結合可能な2種類又はそれ以上（3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上など）のプライマーを含んでもよい。更に、本発明の組成物、キット及びデバイスは、同一のマーカータンパク質に結合可能な異なる2

種類又はそれ以上（3種類又はそれ以上、4種類又はそれ以上など）の抗体又はその抗原結合性断片を含んでいてもよい。

[0079] なお、本願発明は、以下の発明であってもよい。

（1）コロナウイルス感染症（COVID-19）の症状が重症化する可能性があるか否かの予測に用いる検査方法であって、

被検者から、血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取するステップと

、

採取した体液からエクソソームを回収するステップと、

回収したエクソソームからタンパク質を抽出するステップと、

エクソソームから抽出したタンパク質を解析してそのタンパク質情報（タンパク質の種類と発現量に関する情報）を取得するステップと、

取得した前記タンパク質情報（タンパク質の種類と発現量に関する情報）に基づいて、前記被検者が重症化する可能性があるか否かを予測するステップと、

を含むことを特徴とするコロナウイルス検査方法。

[0080] （2）前記エクソソームに由来するタンパク質のうち、予め定めた特定の種類のタンパク質のいずれか1種または2種以上の組合せを、前記被検者が重症化する可能性があるか否かを予測するための重症化予測マーカー（バイオマーカー）として用いる、ことを特徴とする（1）に記載のコロナウイルス検査方法。

[0081] （3）重症化可能性を予測するステップにおいて、

予め定めた特定の種類のタンパク質の発現量が、予め定めた基準値を超えている場合に、前記被検者が重症化する可能性があるとして予測する、

ことを特徴とする（1）に記載のコロナウイルス検査方法。

[0082] （4）前記タンパク質には、

エクソソームの膜上タンパク質、

エクソソームが内包するタンパク質

の一方または両方が含まれる、ことを特徴とする（1）に記載のコロナウ

イルス検査方法。

[0083] (5) 前記被検者は、

コロナウイルス (SARS-CoV-2) に感染している者、

コロナウイルス (SARS-CoV-2) に感染した疑いがある者、または

コロナウイルス (SARS-CoV-2) に感染しているか否か分からない者

であることを特徴とする (1) に記載のコロナウイルス検査方法。

[0084] (6) (1) 乃至 (5) の何れかに記載のコロナウイルス検査方法の実施に用いるシステムであって、

被検者から、血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取するための採液手段と、

検体として採取された血液、鼻汁、唾液等の体液を保存するための保存手段と、

採取され保存された体液からエクソソームを回収するためのエクソソーム回収手段と、

回収したエクソソームからタンパク質を抽出するためのタンパク質抽出手段と、

前記エクソソームに由来するタンパク質から得られたタンパク質を解析してそのタンパク質情報 (タンパク質の種類と発現量に関する情報) を取得するためのタンパク質解析手段と、

取得した前記タンパク質情報 (タンパク質の種類と発現量に関する情報) に基づいて、前記被検者が重症化する可能性があるか否かを予測するための重症化予測手段と、

を有することを特徴とするコロナウイルス検査システム。

[0085] (7) ウイルス検査対象者・ウイルス感染者・患者・病院・行政等の利用者が使う、通信機能を備えた利用者システムと、

ウイルス検査を担う検査センターが使う、通信機能を備えた解析判定シス

テムと、

を利用したウイルス検査方法であって、

利用者システムは、

被検者から、血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取するための採液手段と、

検体として採取された血液、鼻汁、唾液等の体液を保存するための保存手段と、

採取され保存された体液からエクソソームを回収するための回収手段と、

回収したエクソソームからタンパク質を抽出するステップと、

回収したエクソソームに含まれるタンパク質を解析してそのタンパク質情報（タンパク質の種類と発現量に関する情報）を得るためのタンパク質解析手段と、

解析判定システムとインターネットを介して通信するための通信手段と、

を有しており、

解析判定システムは、

利用者システムから送信されたタンパク質情報に基づいて、前記被検者が重症化する可能性があるか否かを予測するための重症化予測手段と、

利用者システムとインターネットを介して通信するための通信手段と、

を有しており、

(a) 利用者システムが、前記被検者から採取された体液からエクソソームを回収するステップと、

(b) 利用者システムが、回収したエクソソームからタンパク質を抽出するステップと、

(d) 利用者システムが、エクソソームから抽出したタンパク質を解析してそのタンパク質情報（タンパク質の種類と発現量に関する情報）を取得するステップと、

(f) 利用者システムが解析判定システムに対し、インターネットを介して、取得した前記タンパク質情報を送信するステップと、

(g) 解析判定システムが、利用者システムから受信したタンパク質情報（タンパク質の種類と発現量に関する情報）に基づいて、前記被検者が重症化する可能性があるか否かを予測するステップと、

(k) 解析判定システムが、利用者システムに対し、インターネットを介して、前記ステップ (g) の予測結果に関する情報を送信するステップと、  
を含むことを特徴とするコロナウイルス検査方法。

- [0086] (8) 血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取するステップと、  
採取した体液からエクソソームを回収するステップと、  
回収したエクソソームからタンパク質を抽出するステップと、  
エクソソームから抽出したタンパク質を解析してタンパク質情報を得るステップと、  
エクソソームから得られたタンパク質情報に基づいて、コロナウイルス (SARS-CoV-2) の型式を解析するステップと、  
解析したコロナウイルスの型式に基づいて、コロナウイルスの感染の有無を判定するステップと、  
コロナウイルスに感染していると判定した場合に、コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症度を複数段階で判定するステップと、  
を含むことを特徴とするウイルス検査方法。

- [0087] (9) (8) に記載のウイルス検査方法の実施に用いるシステムであって、  
血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取するための採液手段と、  
検体として採取された血液、鼻汁、唾液等の体液を保存するための保存手段と、  
採取され保存された体液からエクソソームを回収するためのエクソソーム回収手段と、  
回収したエクソソームからタンパク質を抽出するためのタンパク質抽出手段と、  
回収したエクソソームに含まれるタンパク質を解析してタンパク質情報を得るためのタンパク質解析手段と、

エクソソームから得られたタンパク質情報に基づいて、コロナウイルス（SARS-CoV-2）の型式を解析するためのウイルス解析手段と、

解析したコロナウイルスの型式に基づいて、コロナウイルスの感染の有無を判定するための第1の判定手段と、

コロナウイルスに感染していると判定された場合に、コロナウイルス感染症（COVID-19）の重症度を複数段階で判定するための第2の判定手段と、

を有することを特徴とするウイルス検査システム。

[0088] (10) ウイルス検査対象者・ウイルス感染者・患者・病院・行政等の利用者が使う、通信機能を備えた利用者システムと、

ウイルス検査を担う検査センターが使う、通信機能を備えた解析判定システムと、

を利用したウイルス検査方法であって、

利用者システムは、

血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取するための採液手段と、

検体として採取された血液、鼻汁、唾液等の体液を保存するための保存手段と、

採取され保存された体液からエクソソームを回収するための回収手段と、

回収したエクソソームからタンパク質を抽出するステップと、

回収したエクソソームに含まれるタンパク質を解析してタンパク質情報を得るためのタンパク質解析手段と、

解析判定システムとインターネットを介して通信するための通信手段と、

を有しており、

解析判定システムは、

利用者システムから送信されたタンパク質情報に基づいて、コロナウイルス（SARS-CoV-2）の型式を解析するためのウイルス解析手段と、

解析したコロナウイルスの型式に基づいて、コロナウイルスの感染の有無を判定するための第1の判定手段と、

コロナウイルスに感染していると判定される場合に、コロナウイルス感染症（COVID-19）の重症度を複数段階で判定するための第2の判定手段と、

利用者システムとインターネットを介して通信するための通信手段と、  
を有しており、

(a) 利用者システムが、ウイルス検査対象者・ウイルス感染者・患者から採取された体液からエクソソームを回収するステップと、

(b) 利用者システムが、回収したエクソソームからタンパク質を抽出するステップと、

(d) 利用者システムが、エクソソームから抽出したタンパク質を解析してタンパク質情報を得るステップと、

(f) 利用者システムが解析判定システムに対し、インターネットを介して、エクソソームから得られたタンパク質情報を送信するステップと、

(g) 解析判定システムが、利用者システムから受信したタンパク質情報に基づいて、コロナウイルス（SARS-CoV-2）の型式を解析するステップと、

(h) 解析判定システムが、解析したコロナウイルスの型式に基づいて、コロナウイルスの感染の有無を判定するステップと、

(i) コロナウイルスに感染していると判定された場合に、コロナウイルス感染症（COVID-19）の重症度を複数段階で判定するステップと、

(j) 解析判定システムが、利用者システムに対し、インターネットを介して、前記ステップ（h）の判定結果に関する情報を送信するステップと、

(k) 解析判定システムが、利用者システムに対し、インターネットを介して、前記ステップ（i）の判定結果に関する情報を送信するステップと、  
を含むことを特徴とするウイルス検査方法。

[0089] (11) 血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取しかつ保存し、この体液からエクソソームが有するタンパク質を抽出し、また、このタンパク質情報に基づいて、コロナウイルス（SARS-CoV-2）の型式を瞬時に解

析して、コロナウイルスの感染の有無に限らず、感染したとしても軽症に終わるか或は重症化するかという判定をする、コロナウイルスの検査法。

[0090] (12) コロナウイルスの感染の有無に限らず、感染したとしても軽症であるかあるいは重症化するかという判定をするために、血液、鼻汁、唾液等の体液を検体として採取しかつ保存する採液器と、この体液からエクソソームが有するタンパク質を抽出する測定器からなる検査装置、また、このタンパク質情報に基づいて、コロナウイルスの型式を瞬時に判別する解析器の解析装置からなる、(11)に記載のコロナウイルス検査法を実施するための装置。

[0091] (13) コロナウイルス感染の有無に限らず、感染したとしても軽症であるかあるいは重症化するかという判定をするために、患者・病院・行政等の利用者と、検査センター等の検査所との合意によって設定したパソコン等の通信手段に基づいて、利用者から検査所に対して検体情報を電子化して送信し、また、検査所から利用者に対して検体情報から瞬時に解析した結果情報を電子化して報告するというコロナウイルスの在宅検査法を特徴とする、(10)に記載のコロナウイルス検査法。

[0092] 第一に、新型コロナウイルス検査及び解析に関する装置は、検査器具と解析器具からなる。

検査器具は、採液器と測定器をいう。

前者の採液器は、検体として血液等の体液を採取しかつ保存するものである。これは、検体の種類に応じて異なる。いずれの容器や試薬も市販のものでよい。

後者の測定器は、検体として採取した体液からエクソソームが有するタンパク質を抽出するものである。

解析装置は、検査の結果情報に基づいて、深層学習 (deep learning) に従って、新型コロナウイルスの型式を瞬時に判別するシステムを用いるものである。

[0093] 第二に、新型コロナウイルスの検査法は、検体としての体液を採液器で採

取し、かつ、体液を保存する。この体液から、測定器をもって、エクソソームが有するタンパク質を抽出する。また、検査の結果情報に基づいて、解析器をもって、深層学習に従って、新型コロナウイルスの型式を瞬時に判別する。

[0094] 第三に、新型コロナウイルスの在宅検査法（19）は、図2の記載の通りである。利用者（14）と検査所（13）は、利用者（14）が新型コロナウイルスの検査依頼をして代金を支払うのに対し、検査所（14）がこの検査の引受を承諾して検査装置（8）を送付する合意をする。この合意は、パソコンを始め、スマートホン・テレビジョン等の通信手段（15）（16）をもって、両者間でやり取りをする。

利用者（14）は、動画による取扱説明に基づいて、検体の体液を採取し（4）、また、この体液から、検査装置（7）をもってタンパク質を抽出し（5）、更に、電子化（デジタル化）して、検査情報を送信する（17）。これに対し、検査所（13）は、解析装置（9）をもって、検査情報を解析し、この結果情報を電子化して利用者に報告する（18）。

[0095] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。なお、本願明細書全体を通じて引用する文献は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

[0096] （実施例1）患者群及び重症化に影響する臨床パラメーター

2020年3月から5月までの慈恵会医科大学病院を受診したSARS-CoV-2陽性の42人の患者を登録した（東京慈恵会医科大学審査委員会承認（番号：32-055（10130）））。鼻咽頭スワブのPCR検査でSARS-CoV-2 RNA陽性と判定された患者をCOVID-19（SARS-CoV-2感染）患者とした。患者の重症度は、表2に示すWHO 2020 Scoringに基づき決定した。登録時点でmild status（WHOスコア=3）であるCOVID-19患者31名を登録し、重症患者11人は除外した。COVID-19患者の全員がWHOのCOVID-19臨床マネジメント暫定ガイダンスに基づく標準治療（ステ

ロイドを含まない)を受けた。健常人として、2019年3月から4月までの定期健康診断のため、さいたま市大宮シティクリニックに訪れた健常ドナーのうち、COVID-19と年齢の合う10名(東京大学医科学研究所機関審査委員会承認(番号:28-19-0907))を対象とした。

[0097] 登録の時点で被験者から得た血液を4℃、3000rpmで10分間遠心分離した上清として血清サンプルを採取し、-80℃で保存した。得られた血清サンプル中の各マーカーと登録後の臨床経過との相関をレトロスペクティブに検討した。登録後の経過から疾患の進行度合いに応じて31人のCOVID-19患者を以下の2群に分けた(図1)ところ、グループ1(軽症者)は22名、グループ2(重症者)は9名であった。

グループ1(軽症者): mild status (WHOスコア $\leq$ 4)を維持した患者

グループ2(重症者): severe status (WHOスコア $\geq$ 5)に進行した患者

[0098] グループ2の患者のうち、2名はCOVID-19合併症により死亡した。個別の患者の背景及びサンプル採取後の症状の進行を表3に示す。また、臨床パラメーターの統計値を表4に示した。健常人とCOVID-19患者との間で、年齢、性別、BMI、喫煙インデックス、血清尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、高血圧歴、糖尿病、脂質異常症、及び冠状動脈性心臓病において相違は見られなかった( $P>0.05$ )。一方で、白血球細胞(WBC)数、C-reactive protein(CRP)値には有意な違いが確認された( $P<0.05$ )。また、グループ1とグループ2のCOVID-19患者の間では、性別、BMI、WBC数、BUN、Cr、クレアチニンキナーゼ(CK)、D-ダイマー、フィブリノーゲン、高血圧歴、糖尿病、脂質異常症、及び冠状動脈性心臓病において相違は見られなかった( $P>0.05$ )。一方で、年齢、喫煙インデックス、CRP値、及びALT値には有意な違いが確認された( $P<0.05$ )。よって、年齢、喫煙インデックス、CRP

値、及びALT値の4つパラメーターが重症化に関連することが示された。

[0099] [表2]

Patient	Descriptor	Score
Uninfected	No clinical or virological evidence of infection	0
Ambulatory	No limitation of activities	1
	Limitation of activities	2
Hospitalized-mild disease	No oxygen therapy	3
	Oxygen by nasal prongs or mask	4
Hospitalized-severe disease	Non-invasive ventilation of high-flow oxygen	5
	Intubation and mechanical ventilation	6
	Ventilation + additional organ support (pressors, RRT, ECMO)	7

RRT: renal replacement therapy, ECMO: extracorporeal membrane oxygenation.

[0100] [表3]

	Patients	WHO score	WHO category	Clinical assessment	Age	Sex	Onset of severe events (day)*	The period of hospital stay	Outcome
Healthy donor	HD-1	0	uninfected	healthy	38	M	-	-	-
	HD-2	0	uninfected	healthy	34	M	-	-	-
	HD-3	0	uninfected	healthy	25	F	-	-	-
	HD-4	0	uninfected	healthy	40	M	-	-	-
	HD-5	0	uninfected	healthy	71	M	-	-	-
	HD-6	0	uninfected	healthy	55	M	-	-	-
	HD-7	0	uninfected	healthy	62	M	-	-	-
	HD-8	0	uninfected	healthy	47	M	-	-	-
	HD-9	0	uninfected	healthy	59	M	-	-	-
	HD-10	0	uninfected	healthy	34	F	-	-	-
Group 1 COVID-19	1	3→3	mild→mild	mild→mild	34	M	-	15	discharged
	2	3→3	mild→mild	mild→mild	31	M	-	14	discharged
	3	3→3	mild→mild	mild→mild	48	M	-	10	discharged
	4	3→3	mild→mild	mild→mild	43	M	-	13	discharged
	5	3→3	mild→mild	mild→mild	52	M	-	21	discharged
	6	3→3	mild→mild	mild→mild	54	M	-	26	discharged
	7	3→3	mild→mild	mild→mild	87	M	-	28	discharged
	8	3→3	mild→mild	mild→mild	55	F	-	25	discharged
	9	3→3	mild→mild	mild→mild	25	F	-	11	discharged
	10	3→3	mild→mild	mild→mild	27	F	-	23	discharged
	11	3→3	mild→mild	mild→mild	42	F	-	15	discharged
	12	3→3	mild→mild	mild→mild	45	M	-	12	discharged
	13	3→3	mild→mild	mild→mild	70	M	-	47	discharged
	14	3→3	mild→mild	mild→mild	44	M	-	54	discharged
	15	3→3	mild→mild	mild→mild	44	M	-	9	discharged
	16	3→3	mild→mild	mild→mild	56	M	-	15	discharged
	17	3→3	mild→mild	mild→mild	31	F	-	12	discharged
	18	3→3	mild→mild	mild→mild	54	M	-	18	discharged
	19	3→3	mild→mild	mild→mild	41	F	-	21	discharged
	20	3→3	mild→mild	mild→mild	35	M	-	0	discharged
	21	3→3	mild→mild	mild→mild	36	F	-	0	discharged
	22	3→3	mild→mild	mild→mild	42	M	-	7	discharged
Group 2 COVID-19	23	3→7	mild→severe	mild→critical	61	M	5	93	discharged
	24	3→7	mild→severe	mild→critical	80	M	4	23	death
	25	3→7	mild→severe	mild→critical	64	M	3	138	still hospitalized
	26	3→7	mild→severe	mild→critical	72	M	9	44	discharged
	27	3→7	mild→severe	mild→critical	73	M	7	29	discharged
	28	3→7	mild→severe	mild→critical	73	M	7	125	still hospitalized
	29	3→7	mild→severe	mild→critical	51	M	10	43	death
	30	3→6	mild→severe	mild→severe	58	M	5	31	discharged
	31	3→5	mild→severe	mild→severe	57	M	7	16	discharged

(表中、Sex欄のMは男性、Fは女性を示す) ; \* 「Onset of

「severe events (day)」は、許可を受けてサンプリングした日からの日数を示す。

## [0101] [表4]

	uninfected	COVID-19		P value		
		Group 1	Group 2	(uninfected vs. infected)	(Group 1 vs. Group 2)	
	(n=10)	(n=22)	(n=9)			
Age (year)	46.5 ± 14.8	45.3 ± 14.3	65.4 ± 9.5	0.42	0.001	
Sex	Men	8 (80%)	15 (68.2%)	9 (100%)	1.00	0.08
	Women	2 (20%)	7 (31.8%)	0 (0%)		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 ± 4.4	23.0 ± 3.0 (n=20)	22.4 ± 3.2	0.95	0.63	
Smoking index	176 ± 237	60 ± 140	427 ± 670	0.94	0.02	
WBC count (10 <sup>3</sup> /μL)	6.7 ± 2.9	4.6 ± 1.5	5.2 ± 3.2	0.03	0.46	
CRP (mg/dL)	0.12 ± 0.12	2.50 ± 2.41	6.07 ± 5.11	0.01	0.01	
BUN (mg/dL)	13.7 ± 4.5	17.0 ± 16.6	22.6 ± 14.6	0.35	0.39	
Cr (mg/dL)	0.84 ± 0.13	1.72 ± 3.22	1.88 ± 2.4	0.33	0.90	
ALT (IU/L)	22.5 ± 8.5	21.4 ± 15.2	42.6 ± 33.2	0.51	0.02	
CK (IU/L)	NA	69.5 ± 44.1	71.8 ± 50.8	NA	0.90	
D-Dimer (μg/mL)	NA	1.8 ± 2.0 (n=12)	1.1 ± 0.4	NA	0.28	
Fbg (mg/dL)	NA	389.0 ± 84.2 (n=7)	480.4 ± 172.2	NA	0.22	
Hypertension	2 (20.0%)	6 (27.3%)	3 (33.3%)	0.70	1.00	
Diabetes mellitus	0 (0%)	5 (22.7%)	3 (33.3%)	0.17	0.66	
Dyslipidemia	0 (0%)	4 (18.2%)	3 (33.3%)	0.16	0.38	
Coronary heart disease	0 (0%)	2 (9.1%)	0 (0%)	1.00	1.00	

Continuous variables were expressed as mean ± SD and tested by Student's *t*-test.  
Categorical variables were expressed as n (%) and tested by Fisher's exact test.

## [0102] (実施例2) エクソソーム (EV) 中のタンパク質測定

## (1) エクソソーム (EV) の単離

Dynabeads M-280 Tosylactivate (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) に結合した抗CD9抗体及び抗CD63抗体 (HU Group Research Institute, Tokyo) を、キレートベースのPEVIA (登録商標) 試薬 (HU Group Research Institute) で処理した後、ローテーター上で4℃で18時間インキュベートした。ビーズをPBSで3回洗浄し、さらに分析するまで4℃で保存した。

## [0103] (2) ペプチドの調製

得られたエクソソーム (EV) は、S-Trapマイクロスピナラム (AMR Inc, 東京, 日本) を使用して、製造元の指示にわずかな変更を加えて処理した。具体的には、エクソソームを、50 μLの5% SDS (F

UJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 大阪, 日本) を含む50mM TEABバッファー (Honeywell Inc, シャーロット, ノースカロライナ, 米国), pH7.5に懸濁した。ビーズを除去した後, EVからのタンパク質の量をMicro BCA™タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific Inc) で測定した。質量分析用の13.8ng Pierce™消化インジケーター (Thermo Fisher Scientific Inc) を, 消化効率の品質管理のために溶解サンプルに追加した。

[0104] (3) LC-MSによるプロテオミク分析

EVタンパク質から得られたペプチドは, 0.1%ギ酸 (FA) (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific Inc) を含む10 $\mu$ lの水で再構成された。ペプチドの定量化は, Pierce™Quantitative Fluorometric Peptide Assay (Thermo Fisher Scientific Inc) を使用して行った。ペプチドのプロテオミクス分析は, Ultimate 3000 Nano LC Systems (Thermo Fisher Scientific Inc.) を搭載したQ Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用して実行した。nano Zero&Captive Spray Insert (75 $\mu$ m $\times$ 25cm, Ion Opticks Pty Ltd) を備えたC18逆相AuroraUHPLCエミッターカラムに接続されたチャンバー内で40 $^{\circ}$ Cに加熱されたAcclaim PepMap 1000トラップカラム (75 $\mu$ m $\times$ 2cm, nanoViper C183 $\mu$ m, 100 $\text{\AA}$ , Thermo Fisher Scientific Inc) に, ペプチドサンプル (1 $\mu$ g) をDreamsprayインターフェイス (AMR Inc) を使用して注入した。ナノポンプの流量は, 302分のグラジエントで250nL/minに設定され, 移動相はA

(水中0.1%FA, Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific Inc.) 及びB (アセトニトリル中0.1%FA, フィッシャーケミカル, サーモフィッシャーサイエンティフィック) とした。クロマトグラフィーグラジエントは, 0~8分の2%Bから直線的に増加するように設計され, 8~272分は2%Bから35%Bまで, 272~282分は35%Bから70%Bまで, 282~283分は70%Bから95%Bまでとし, 洗浄8分及び平衡化10分とした。データ依存性の取得は, 陽イオンモードで実行した。質量分析パラメーター及びProteome Discoverer 2.2.0.388ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific Inc) のパラメーターは, 以前のレポート (Ayako Kurimoto ら, Enhanced recovery of CD9-positive extracellular vesicles from human specimens by chelating reagent, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.17.155861>) に記載の方法に準じて行った。

[0105] (実施例3) 血清miRNA測定

実施例1で採取した血清サンプルのaliquots (200 $\mu$ L) からQIAzol及びmiRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, ドイツ) を用いて, 製造者のプロトコルに従いtotal RNAを抽出した。QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) を用いてライブラリーを調製した。調整されたライブラリーは, Bioanalyzer 2100又はTapeStation 4200システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 米国) を用いて品質管理した。ライブラリープールをLibrary Quantification Kit (Takara, 滋賀, 日本) を用いて定量し, NovaSeq6000 sequencing platform (Illumina Inc, San Diego,

CA, 米国)で配列決定した。決定された配列をCLC Genomics Workbench v20.0.1を用いて、前処理し、かつ、miRBase v22.1及びEnsembl non-coding DNA database release100に対してアノテーションした。

[0106] (実施例4) 統計学的処理

カテゴリ変数のフィッシャーの直接確率検定と連続変数の対応のない学生t検定を使用して、2つのグループ間の臨床データを比較した。EVタンパク質とexRNAの中からバイオマーカー候補を特定するために、最初に一元配置分散分析(ANOVA)を使用して、3つの被験者グループ(非感染、COVID-19グループ1、及びグループ2)間で $P < 0.05$ の異なるレベルで存在する候補を選択した。主成分分析(PCA)は、Partek Genomics Suite 7.0 (Partek, セントルイス, ミズーリ州, 米国)を使用して、選択した候補について実行した。次いで、グループ1とグループ2との識別力が優れている候補を、リーワンアウトクロス検証を使用した線形判別分析に基づいて選択し、その後Rバージョン3.6.3 (R Foundation for Statistics Computing, <http://www.R-project.org>), compute.esパッケージバージョン0.2-2, ハッシュパッケージバージョン2.2.6.1, MASSパッケージバージョン7.3-51.5, mutossパッケージバージョン0.1-12, 及びpROCパッケージバージョン1.16.2を用いてのROC分析を行った。各候補の最適なカットオフ値は、感度と特異度の合計の最大点(Youdenインデックス)に基づいて設定した。予測感度, 特異度, 及び精度は、各候補に対応するカットオフ値を使用して計算した。ログランク検定を使用した Kaplan-Meier 分析と Cox 回帰分析は、IBM SPSS Statistics 25 (IBM Japan, 東京, 日本)を使用して実行した。相関プロットは、Rバージョン3.6.3及びcorrplotパッケージバージョン0.84を使用して生成され、教師なし階層的クラ

スタリング分析は、Partek Genomics Suite 7.0を使用して実行した。すべての分析の統計的有意性の限界は、0.05の両側P値として定義した。

[0107] (結果)

[0108] (1) COVID-19患者及び非感染対照の血清サンプル中のEVからのプロテオームプロファイルのLC-MS分析

臨床現場では、リキッドバイオプシーからのEVの分析が、様々な疾患の診断及び予後のバイオマーカーを与える潜在的な手段として注目されている。ただし、EVを患者から分離するための標準化された方法がないため、この戦略はまだ広く使用されていない。最適なEVの調製法について種々検討したところ、EVの表面マーカートンパク質を標的とする免疫沈降(IP)ベースの方法により迅速かつ特異的な分離が可能であった。具体的には、キレート試薬の存在下で、血清サンプルからのCD9+又はCD63+陽性EVをIPを使用して回収することにより収量と純度が向上すると共に、LC-MSによるその後のEVプロテオーム分析に適していた(図2)。

[0109] 41種類の血清サンプルから、LC-MS分析を行い、すべてのサンプルにおいて存在しなかったタンパク質を除外した結果、1676種類のタンパク質が特定された。これらの1676種類のタンパク質のうち、723種類のタンパク質が3つのグループ間で異なるレベルで存在していた( $P < 0.05$ ; 一元配置分散分析)。3つの患者コホート間でこれらの723種類のEV由来タンパク質の発現パターンを比較するために、主成分分析(PCA)マッピングに基づく教師なし多変量統計を使用した。PCAは、LC-MSデータのすべての項目出現頻度(term frequency)を使用して第1主成分(PC1)と第2主成分(PC2)をプロットし、3つのグループ間の分離傾向を示す(図3)。最初のPC1が分散の28.1%を占め、2番目のPC2が分散の14.5%を占めることから、二つの主成分により54.5%の寄与率で3つのグループ間を分離できる傾向が示された。

[0110] この観察結果は、COVID-19患者の血清のEVプロテオームプロフ

ファイルが非感染被検者（健常人）からかなり逸脱していることを示した。わずかな重複又は分散があるものの、PCAスコアプロットにより、グループ1とグループ2の間に明らかなEVプロテオミクスの違いがあることが見出された。グループ1とグループ2の患者からのEV由来タンパク質の違いをさらに特定するために、選択した各タンパク質のフィッシャー線形判別分析に基づいて、それら間の識別パフォーマンスの堅牢性（robustness）を示す交差検定スコア（Urabe Fら, Clin Cancer Res. 2019; 25(10): 3016-25.）を計算した。候補タンパク質から、交差検定スコアが0.75を超える91種類のタンパク質をリスト化した（表5～表7）。

[0111]

[表5]

EV proteins for discrimination between mild and severe COVID-19 patients.

GeneName	Cross-validation score	Sensitivity	Specificity	Accuracy	AUC
COPB2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
KRAS	0.90	1.00	0.82	0.87	0.93
PRKCB	0.90	0.89	0.95	0.94	0.93
RHOC	0.90	0.78	1.00	0.94	0.96
CD147	0.87	0.67	0.91	0.84	0.73
CAPN2	0.87	0.89	0.77	0.81	0.84
ECM1	0.87	0.67	0.95	0.87	0.82
FGG	0.87	0.67	1.00	0.90	0.87
MFAP4	0.87	0.56	1.00	0.87	0.75
ADI1	0.84	0.67	0.95	0.87	0.88
AK1	0.84	0.89	0.91	0.90	0.95
MGAT1	0.84	1.00	0.77	0.84	0.91
CLDN3	0.84	0.89	0.82	0.84	0.86
CRP	0.84	0.78	0.77	0.77	0.82
UQCRC2	0.84	0.78	0.82	0.81	0.77
FGA	0.84	0.67	0.95	0.87	0.88
FGB	0.84	0.67	1.00	0.90	0.84
FGL1	0.84	0.78	0.82	0.81	0.85
GPX1	0.84	0.67	0.91	0.84	0.81
GSK3B	0.84	0.44	1.00	0.84	0.73
LBP	0.84	0.78	0.86	0.84	0.82
PDGFC	0.84	0.89	0.77	0.81	0.86
RAB13	0.84	0.78	0.86	0.84	0.85
RAP1B	0.84	0.67	1.00	0.90	0.91
SLC6A4	0.84	0.89	0.82	0.84	0.90
UBA7	0.84	0.78	0.86	0.84	0.83
ORM1	0.81	0.89	0.59	0.68	0.80
RNPEP	0.81	0.56	0.95	0.84	0.68
ANGPT1	0.81	0.78	0.86	0.84	0.88
APOB	0.81	0.78	0.86	0.84	0.79

[0112]

[表6]

GeneName	Cross-validation score	Sensitivity	Specificity	Accuracy	AUC
BHMT	0.81	0.44	1.00	0.84	0.74
CPN1	0.81	0.89	0.68	0.74	0.84
GNAZ	0.81	1.00	0.95	0.97	0.99
ICAM2	0.81	1.00	0.59	0.71	0.83
SELL	0.81	0.67	0.91	0.84	0.74
MAN1A1	0.81	0.78	0.82	0.81	0.85
SERPINA5	0.81	0.89	0.82	0.84	0.81
PACSIN2	0.81	0.89	0.86	0.87	0.90
NCF1B	0.81	0.89	0.55	0.65	0.73
TMEM59	0.81	0.44	0.95	0.81	0.59
YWHAB	0.77	0.67	0.95	0.87	0.85
ABAT	0.77	0.33	1.00	0.81	0.52
ADH1B	0.77	0.67	0.95	0.87	0.79
ASL	0.77	0.67	0.91	0.84	0.80
ASS1	0.77	0.78	0.86	0.84	0.79
CDH2	0.77	0.56	0.95	0.84	0.69
CAB39	0.77	0.89	0.91	0.90	0.94
CPS1	0.77	0.67	0.82	0.77	0.74
CD226	0.77	0.67	1.00	0.90	0.87
COL6A3	0.77	0.67	0.86	0.81	0.82
CUL4A	0.77	0.78	0.64	0.68	0.75
DSC1	0.77	0.44	0.95	0.81	0.58
ENTPD5	0.77	1.00	0.64	0.74	0.86
EIF4A1	0.77	0.67	0.86	0.81	0.80
FN1	0.77	0.89	0.68	0.74	0.81
PGC	0.77	0.89	0.68	0.74	0.78
RHEB	0.77	1.00	0.59	0.71	0.84
GNAI2	0.77	0.89	0.59	0.68	0.79
GNB1	0.77	0.78	0.77	0.77	0.83
GNA13	0.77	0.67	0.95	0.87	0.86
ITGA2B	0.77	0.67	0.91	0.84	0.86
ITGB1	0.77	1.00	0.59	0.71	0.84

[0113]

[表7]

GeneName	Cross-validation score	Sensitivity	Specificity	Accuracy	AUC
ITGB1	0.77	1.00	0.59	0.71	0.84
ILK	0.77	0.89	0.77	0.81	0.84
F11R	0.77	1.00	0.50	0.65	0.82
LTA4H	0.77	0.56	0.91	0.81	0.67
LIMS1	0.77	0.89	0.77	0.81	0.83
NAV2	0.77	0.56	0.86	0.77	0.73
FAM129B	0.77	0.78	0.86	0.84	0.84
NNMT	0.77	0.67	0.91	0.84	0.69
NID1	0.77	0.89	0.55	0.65	0.76
PPIA	0.77	0.78	0.77	0.77	0.86
PLA1A	0.77	0.67	0.91	0.84	0.80
PPBP	0.77	0.67	0.77	0.74	0.69
PECAM1	0.77	1.00	0.55	0.68	0.82
GP1BB	0.77	0.67	0.86	0.81	0.81
PCSK9	0.77	1.00	0.82	0.87	0.91
MENT	0.77	0.44	0.95	0.81	0.71
SERPINA10	0.77	0.67	0.82	0.77	0.74
F2RL3	0.77	0.89	0.86	0.87	0.91
LOX	0.77	0.67	0.91	0.84	0.81
SFTPB	0.77	0.67	0.77	0.74	0.78
RAB5B	0.77	0.78	0.86	0.84	0.84
RALB	0.77	0.89	0.68	0.74	0.82
REEP6	0.77	0.78	0.68	0.71	0.71
RETN	0.77	0.67	0.73	0.71	0.69
AGXT	0.77	0.22	1.00	0.77	0.48
CCT2	0.77	0.89	0.64	0.71	0.81
THBD	0.77	0.56	0.91	0.81	0.74
ISG15	0.77	0.33	1.00	0.81	0.67
ZYX	0.77	1.00	0.55	0.68	0.82

[0114] さらに、3つの患者グループ間で交差検定スコアが0.85を超える上位9つのタンパク質の各グループの存在量を図4に示した。これらのタンパク質の中で、4つのタンパク質、COP Iコート複合体サブユニットベータ2

(COPB2)、KRASプロトオンコジーン(KRAS)、プロテインキナーゼCベータ(PRKCB)、およびrasホモログファミリーメンバーC(RHOC)はグループ1において、グループ2または非感染対照よりも多かった(P傾向>0.05)。さらに、CD147、カルpain2(CAPN2)、細胞外マトリックスタンパク質1(ECM1)、フィブリノーゲンガンマ鎖(FGG)は、非感染コントロールまたはグループ1よりもグループ2で有意に量が多かった(P傾向<0.05)。ミクロフィブリル関連タンパク質4(MFAP4)のみが、非感染コントロールまたはグループ2よりもグループ1において量が少なかった(P傾向>0.05)。

[0115] (2) COVID-19重症度に対する9つのEVタンパク質の予測値

グループ1とグループ2を組み合わせるROC分析を実行し、9つの予測マーカーのセットに対して感度、特異性、およびAUCのロバストテストを行った(図5)。グループ1において存在量が亢進していた、COPB2、KRAS、PRKCM、およびRHOCの4つのマーカーのAUC値は、それぞれ、1.00(95%CI:1.00-1.00)、0.93(95%CI:0.85-1.00)、0.93(95%CI:0.83-1.00)、および0.96(95%CI:0.89-1.00)であった。CD147、CAPN2、ECM1、FGG、およびMFAP4の他の5つのマーカーのAUC値は、それぞれ、0.73(95%CI:0.48-0.98)、0.84(95%CI:0.67-1.00)、0.82(95%CI:0.60-1.00)、0.87(95%CI:0.73-1.00)、および0.75(95%CI:0.52-0.97)であった。

[0116] この結果から、患者の入院時に検査されたこの一連のマーカーが、軽度と重度のCOVID-19を発症する患者間を有意な程度に分離可能であることが示唆された。Youdenインデックスに従って9つのマーカータンパク質の最適なカットオフ値を特定するため、追加のROC曲線を生成した。

[0117] さらに分析するために、カットオフ値を使用してCOVID-19患者を低グループと高グループに分け、重度のCOVID-19関連イベントの発

症を比較した。重度のイベントの開始までの時間を示す Kaplan-Meier 曲線を、9つのタンパク質のそれぞれについて作成した（図6）。グループ1で存在量の増加がみられたタンパク質である、COPB2、KRAS、PRKCM、およびRHOCの量が少ないグループの非重症化期間（無進行期間）は、同タンパク質の量が多いグループよりも有意に短かった（それぞれ、 $P=9.8 \times 10^{-10}$ ； $P=1.0 \times 10^{-5}$ ； $P=5.1 \times 10^{-7}$ ； $P=4.2 \times 10^{-8}$ ）。逆に、グループ2で存在量が増加したタンパク質である、CD147、CAPN2、ECM1、FGG、およびMFAP4の量が多いグループの非重症化期間（無進行期間）は、同タンパク質の量が少ないグループよりも有意に短かった（ $P=7.0 \times 10^{-5}$ ； $P=0.00060$ ； $P=2.2 \times 10^{-5}$ ； $P=1.9 \times 10^{-7}$ ； $P=2.0 \times 10^{-6}$ ）。これらの結果は、患者が重度のCOVID-19関連イベントを経験する可能性を予測するのにこの一連のマーカーが役立つことを示している。

[0118] (3) COVID-19患者及び非感染対照からの血清サンプル中のExRNAプロファイルのNGS測定

循環するexRNAは、幅広い疾患のバイオマーカーとして機能する可能性がある。ExRNAは、EVへの取り込みや、脂質やタンパク質との結合によって分解から保護される多様なRNA亜集団で構成されている。血液サンプル中のExRNAプロファイルは動的であり、mRNA、miRNA、piRNA、及びlncRNAが含まれる（Muriillo ODら、Cell. (2019) 177 (2) : 463-77 e15.）。本実施例においては、次世代シーケンシング（NGS）を使用して、患者の血清サンプルに存在するexRNAを分析した（図7）。

[0119] 41種類の血清サンプルから、NGS分析により408の転写産物が同定された。ただし、すべてのサンプルで読み取りが50未満の転写産物は除外した。これらのexRNAのうち、43の転写産物が3つのグループ間で差別的に発現していた（ $P < 0.05$ ；一元配置分散分析）。3つのグループ間におけるこれらの43の転写産物の発現パターンを特定するために、PC

Aマッピングに基づいて教師なし多変量統計を実行した。NGSデータからのPCAプロットから、3つのグループ間を分離する傾向が明らかとなった(図8)。この分離は、分散の28.1%を占めるfirst principal components (PS1)によって説明できた。second principal components (PS2)は分散の14.5%を占めた。これらの観察結果は、COVID-19患者の血清e x RNAプロファイルが非感染ドナーの血清e x RNAプロファイルからかなり逸脱していることを示していた。さらに、いくらかの重複又は分散性にもかかわらず、PCAプロットにより、グループ1とグループ2の間のe x RNAプロファイルの明らかな違いを検出できた。

[0120] グループ1とグループ2を区別するために、選択した各転写産物の相互検証スコアをフィッシャー線形判別分析に基づき計算した。候補転写産物から、交差検定スコアが0.75を超える14の転写産物を選択した(表8)。

[0121] [表8]

Transcript	Cross-validation score	Sensitivity	Specificity	Accuracy	AUC
miR-122-5p	0.84	0.56	1.00	0.87	0.81
SNORD33	0.84	1.00	0.73	0.81	0.89
AL732437.2	0.84	0.89	0.68	0.74	0.80
RNU2-29P	0.81	0.44	1.00	0.84	0.70
CDKN2B-AS1	0.81	0.67	0.95	0.87	0.86
AL365184.1	0.81	0.78	0.86	0.84	0.87
AL365184.1	0.81	0.78	0.91	0.87	0.90
AL365184.1	0.81	0.67	0.91	0.84	0.87
AL365184.1	0.81	0.78	0.91	0.87	0.90
AL365184.1	0.81	1.00	0.73	0.81	0.92
let-7c-5p	0.77	0.44	0.95	0.81	0.75
miR-21-5p	0.77	0.56	0.91	0.81	0.71
miR-140-3p	0.77	0.89	0.77	0.81	0.89
C5orf66-AS2	0.77	0.78	0.91	0.87	0.89

[0122] (4) 疾患の重症度値を予測するために選択されたマーカー間の相関

次に、単変量Cox回帰分析を使用して、e x RNAマーカーとEVタンパク質マーカーのハザード比(HR)を計算した。特に、低COBP2のHRは、最適なカットオフ値を使用した統計的計算ができず、EVCOPB2

が2セットのマーカーの中で最高の予測値を持っていることを示唆した。高年齢 (HR 28.1 ; 95%CI 3.4-231.9 ; P=0.0019) , 高CRP (HR 8.4 ; 95%CI 1-67.5 ; P=0.045) , 低PRKCB (HR 32.1 ; 95%CI 3.9-261.9 ; P=0.0012) , 低RHOC (HR 23.6 ; 95%CI 4.7-118 ; P=0.00012) , 高CD147 (HR 10.7 ; 95%CI 2.5-45.1 ; P=0.0013) , 高CAPN2 (HR 15.5 ; 95%CI 1.9-125.9 ; P=0.010) , 高ECM1 (HR 11.6 ; 95%CI 2.8-48.4 ; P=0.00079) , 高FGG (HR 21.4 ; 95%CI 4.2-110.4 ; P=0.00025) , 高MFAP4 (HR 12.7 ; 95%CI 3.3-48.6 ; P=0.00022) , 高miR-122-5p (HR 10.5 ; 95%CI 2.7-40.4 ; P=0.00063) , 高AL732437.2 (HR 9.9 ; 95%CI 1.2-79.9 ; P=0.031) , 高RNU2-29P (HR 10.4 ; 95%CI 2.6-40.8 ; P=0.00081) , 高CDKN2B-AS1 (HR 14.4 ; 95%CI 3.4-61.3 ; P=0.00031) , 及び高AL365184.1 (HR 14.2 ; 95%CI 1.8-114.4 ; P=0.013) は統計的に有意だった (表9)。

[0123]

[表9]

	Cut-off	HR	(95% CI)	P value
Age high	56.5	28.1	(3.4 - 231.9)	0.0019
Smoking index high	87.5	3.1	(0.8 - 11.6)	0.092
CRP high	2.3	8.4	(1 - 67.5)	0.045
ALT high	21.5	3.8	(0.8 - 18.5)	0.095
COPB2 low	1.6 x10 <sup>8</sup>	NA	-	-
KRAS low	4.8 x10 <sup>7</sup>	189.8	(0.4 - 9.0 x10 <sup>4</sup> )	0.095
PRKCB low	6.3 x10 <sup>7</sup>	32.1	(3.9 - 261.9)	0.0012
RHOC low	1.4 x10 <sup>7</sup>	23.6	(4.7 - 118)	0.00012
CD147 high	6.1 x10 <sup>8</sup>	10.7	(2.5 - 45.1)	0.0013
CAPN2 high	7.2 x10 <sup>5</sup>	15.5	(1.9 - 125.9)	0.010
ECM1 high	2.3 x10 <sup>8</sup>	11.6	(2.8 - 48.4)	0.00079
FGG high	1.4 x10 <sup>10</sup>	21.4	(4.2 - 110.4)	0.00025
MFAP4 high	4.6 x10 <sup>8</sup>	12.7	(3.3 - 48.6)	0.00022
miR-122-5p high	1.0 x10 <sup>5</sup>	10.5	(2.7 - 40.4)	0.00063
SNORD33 high	406.6	104.1	(0.4 - 2.7 x10 <sup>4</sup> )	0.10
AL732437.2 high	8.8	9.9	(1.2 - 79.9)	0.031
RNU2-29P high	124.1	10.4	(2.6 - 40.8)	0.00081
CDKN2B-AS1 high	6.2	14.4	(3.4 - 61.3)	0.00031
AL365184.1 high	2.9	14.2	(1.8 - 114.4)	0.013

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; NA, not applicable

[0124] 選択したマーカー間の潜在的な関係を調査するために、スピアマンの相関係数をマーカーレベルに基づいて計算した。19個のマーカーの相関係数を視覚化するために相関プロットを作成した（図9）。これにより、それらが属するグループ内で強い正の相関を共有するマーカーの4つの階層的クラスターが見出された。各マーカーは、明確に定義された4つのクラスター（つまり、クラスター1、2、3、及び4）のいずれかに当てはまるようだった。特に、クラスター1（PRKCB、RHOC、COPB2、及びKRAS）は他のクラスターと負の相関関係にあり、クラスター2、3、及び4は、互いに実質的に強い正の相関関係があった。

[0125] クラスター1の4つのEVタンパク質はすべて、グループ2のCOVID-19患者よりもグループ1の方が有意に高い存在量を示した。MFAP4のレベルは、喫煙又は年齢と有意な相関関係はなかった。一方、クラスター

3には、ECM1, CDKN2B, AS1, AL365184.1, CAPN2, CRP, FGG, 及びCD147が含まれていた。1つのexRNA (クラスター3のCDKN2B, AS1) と細胞外マトリックス形成に関連する4つのタンパク質 (クラスター2のMFPA4とクラスター3のECM1, CAPN2, CD147) のレベルは、凝固において重要な機能を果たすFGGのレベルと相関していた ( $P < 0.05$ ) (図4)。クラスター3のマーカーのレベルは、血管内皮機能障害と凝固に関連している年齢 (Donato AJら, Circ Res. 2018; 123(7): 825-48.) と相関していた。データの大部分は、クラスター2及び3が凝固関連マーカーのグループを表していることを示唆していた。クラスター4のコンポーネントALT, RNU2-29P, SNORD33, miR-122-5p, 及びAL732437.2は、少なくとも部分的に肝障害に関連する現象を反映している可能性がある。主に肝機能障害に関連する代表的なトランスアミナーゼであるALTのレベルは、これらの3つのexRNA種のレベルと相関していた ( $P < 0.05$ )。

[0126] 上記結果から、患者の血清中のEVタンパク質とexRNAのプロファイルが、SARS-CoV-2感染と疾患の進行に対する特定の宿主反応を明確に反映していることが示された。

### 符号の説明

- [0127] 13. 検査所  
14. 利用者  
15. 中央電算機  
16. 個別電算機  
17. 情報の送信  
18. 情報の報告  
19. 新型コロナウイルスの在宅検査法

## 請求の範囲

[請求項1] COVID-19患者の重症化する可能性を判定する方法であって

,

該患者由来の血液中のエクソソームに存在する1種類以上のマーカータンパク質のレベルを測定すること、及び

測定されたマーカータンパク質のレベルを、コントロールRNAレベルと比較することにより、前記患者が重症化する可能性が判定され

,

ここで、前記マーカータンパク質が、以下の群から選択される1種類以上のタンパク質である方法：COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYX。

[請求項2] 前記マーカータンパク質が、以下の群から選択される1種類以上の

タンパク質である請求項1に記載の方法：COPB2，KRAS，PRKCB，RHOC，CD147，CAPN2，ECM1，FGG，及びMFAP4，

ここで，測定されたタンパク質がCOPB2又はKRASである場合，当該タンパク質のレベルが，健常人のタンパク質レベルと比較して高いときに前記患者が重症化しない可能性が高いと判定され，

測定されたタンパク質が，PRKCB又はRHOCである場合，当該タンパク質のレベルが，健常人又は軽症化した患者のタンパク質レベルと比較して低いときに前記患者が重症化する可能性が高いと判定され，

測定されたタンパク質がCD147，CAPN2，ECM1，及びFGGのいずれかである場合，当該タンパク質のレベルが，健常人又は軽症化した患者のタンパク質レベルと比較して高いときに前記患者が重症化する可能性が高いと判定され，かつ，

測定されたタンパク質がMFAP4である場合，当該タンパク質のレベルが，健常人のタンパク質レベルと比較して低いときに前記患者が重症化する可能性が低いと判定される。

[請求項3]       コントロールタンパク質レベルが健常人又は重症化しなかったCOVID-19患者から感染初期に得られた血液サンプル中の該マーカーRNAのレベルである，請求項1又は請求項2に記載の方法。

[請求項4]       2種類以上を組み合わせて使用することを特徴とする，請求項1～請求項3のいずれか1項記載の方法。

[請求項5]       前記2種類以上の組み合わせが，以下の(a)又は(b)の組み合わせである，請求項4に記載の方法

(a) PRKCB、RHOC、COPB2、及びKRASから選択される2種類以上の組み合わせ

(b) ECM1，CAPN2，FGG，及びCD147から選択される2種類以上の組み合わせ。

[請求項6] 更に、該患者由来の血液中の1種類以上のマーカーRNAレベルを測定することを含み、

前記マーカータンパク質レベルと当該マーカーRNAレベルとを組み合わせる可能性が判定され、

ここで、前記マーカーRNAが、以下の群から選択される1種類以上のRNAであり、: miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, RNU2-29P, CDKN2B-AS1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, AL365184.1, let-7c-5p, miR-21-5p, miR-140-3p, 及びC5orf66-AS2、かつ、

ここで、測定されたRNAのレベルが、コントロールRNAレベルと比較して高いときに前記患者が重症化する可能性が高いことを示す、

請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の方法。

[請求項7] 前記マーカーRNAが以下のRNAからなる群から選択される、請求項6に記載の方法: miR-122-5p, SNORD33, AL732437.2, RNU2-29P, CDKN2B-AS1, 及びAL365184.1。

[請求項8] 更に、該患者の年齢、喫煙インデックス、血中CRP値、及び血中ALT値から選択される1種類以上を決定又は測定することを含み、年齢、喫煙インデックス、血中CRP値、及び/又は血中ALT値が、前記マーカータンパク質レベルと組み合わせられて、又は、前記マーカータンパク質レベルと前記マーカーRNAレベルと組み合わせられて重症化する可能性が判定されることを特徴とする、請求項1～請求項7のいずれか1項に記載の方法、

ここで、年齢、喫煙インデックスCRP、及びALTは全て健常人又は軽症者であるコントロールと比較して数値が高い場合に重症化可

能性が高いと判定される。

[請求項9] 以下の (a) ~ (d) から選択される組み合わせにより重症化を判定することを含む、請求項8に記載の方法。

(a) PRKCB, RHOC, COPB2, 及びKRASからなる群から選択される2以上の因子

(b) 喫煙インデックス, 年齢, 及びMFAP4からなる群から選択される2以上の因子

(c) CDKN2B-AS1, AL365184.1, ECM1, CAPN2, CRP, FGG, 及びCD147からなる群から選択される2以上の因子

(d) ALT, RNU2-29P, SNORD33, miR-122-5p, 及びAL732437.2からなる群から選択される2種類以上の因子。

[請求項10] 更に、重症化可能性が高いと判定された患者に対して、更に重症化に対する管理又は治療を行うことを含む、請求項1~請求項9のいずれか1項に記載の方法。

[請求項11] COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGA T1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGP T1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACS IN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H,

LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される少なくとも1種類のタンパク質である、COVID-19重症化マーカー。

[請求項12]

COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, 及びMFAP4から選択される少なくとも1種類のタンパク質である、請求項11に記載のマーカー。

[請求項13]

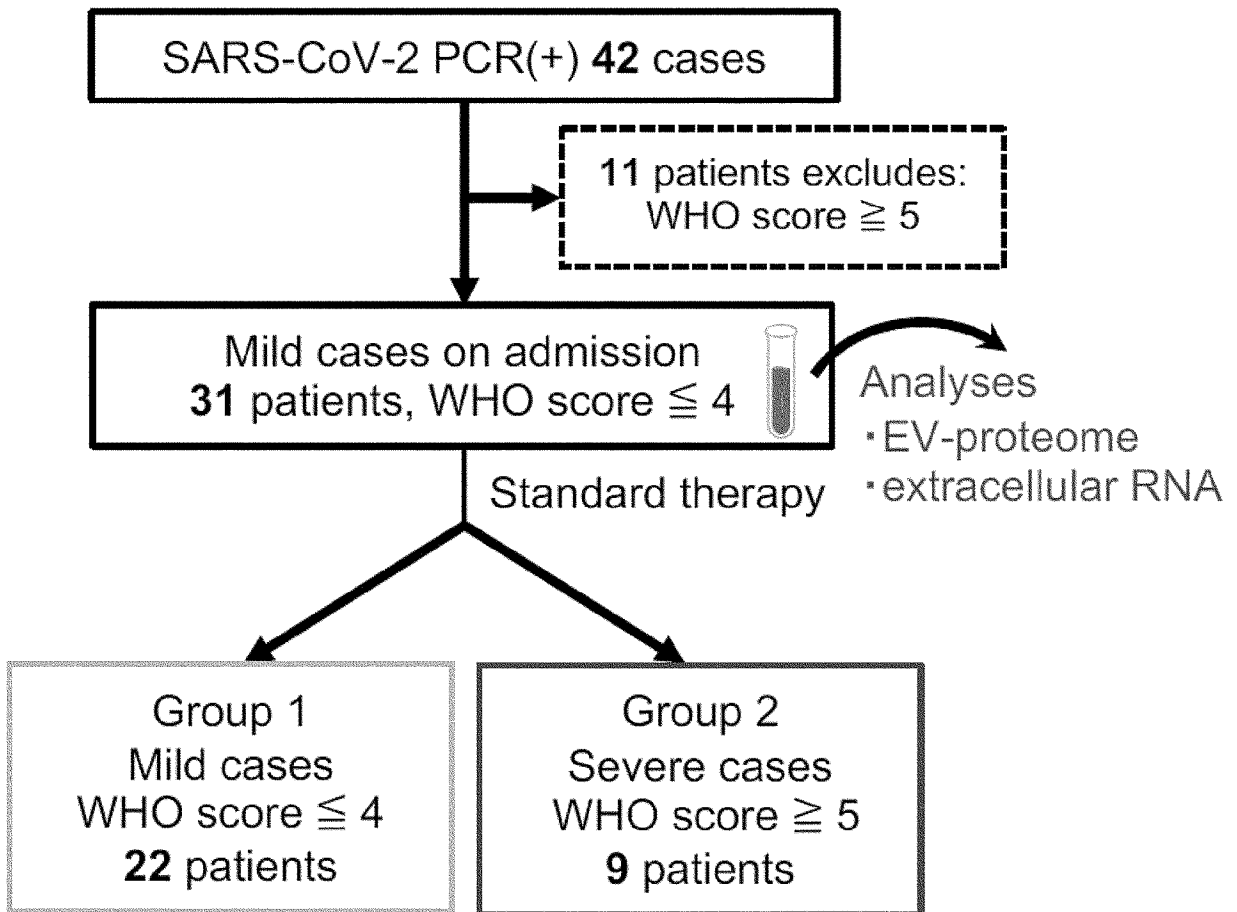
COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGA1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGP1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CDH2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される少なくとも1種類のタンパク質と結合可能な物質結合可能な物質を1種類以上含むCOVID-19重症化予測用組成物。

- [請求項14] COPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, 及びMFAP4から選択される少なくとも1種類のタンパク質と結合可能な物質を1種類以上含む、請求項13に記載の組成物。
- [請求項15] 前記タンパク質と結合可能な物質を2種類以上含む、請求項14に記載の組成物。
- [請求項16] 以下の(a)又は(b)の組み合わせを含む、請求項15に記載の組成物：
- (a) PRKCBと結合可能な物質、RHOCと結合可能な物質、COPB2と結合可能な物質、及びKRASと結合可能な物質から選択される2種類以上の組み合わせ
  - (b) ECM1と結合可能な物質、CAPN2と結合可能な物質、FGGと結合可能な物質、及びCD147と結合可能な物質から選択される2種類以上の組み合わせ。
- [請求項17] 前記物質が抗体又はその抗原結合性断片である、請求項13～請求項16のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項18] 請求項13～請求項17のいずれか1項に記載の組成物を含むCOVID-19重症化予測用キット又はCOVID-19重症化予測用デバイス。
- [請求項19] 患者由来の血液由来エクソソーム中のCOPB2, KRAS, PRKCB, RHOC, CD147, CAPN2, ECM1, FGG, MFAP4, ADI1, AK1, MGAT1, CLDN3, CRP, UQCRC2, FGA, FGB, FGL1, GPX1, GSK3B, LBP, PDGFC, RAB13, RAP1B, SLC6A4, UBA7, ORM1, RNPEP, ANGPT1, APOB, B4GALT1, BHMT, CPN1, GNAZ, ICAM2, SELL, MAN1A1, SERPINA5, PACSIN2, NCF1B, TMEM59, YWHAB, ABAT, ADH1B, ASL, ASS1, CD

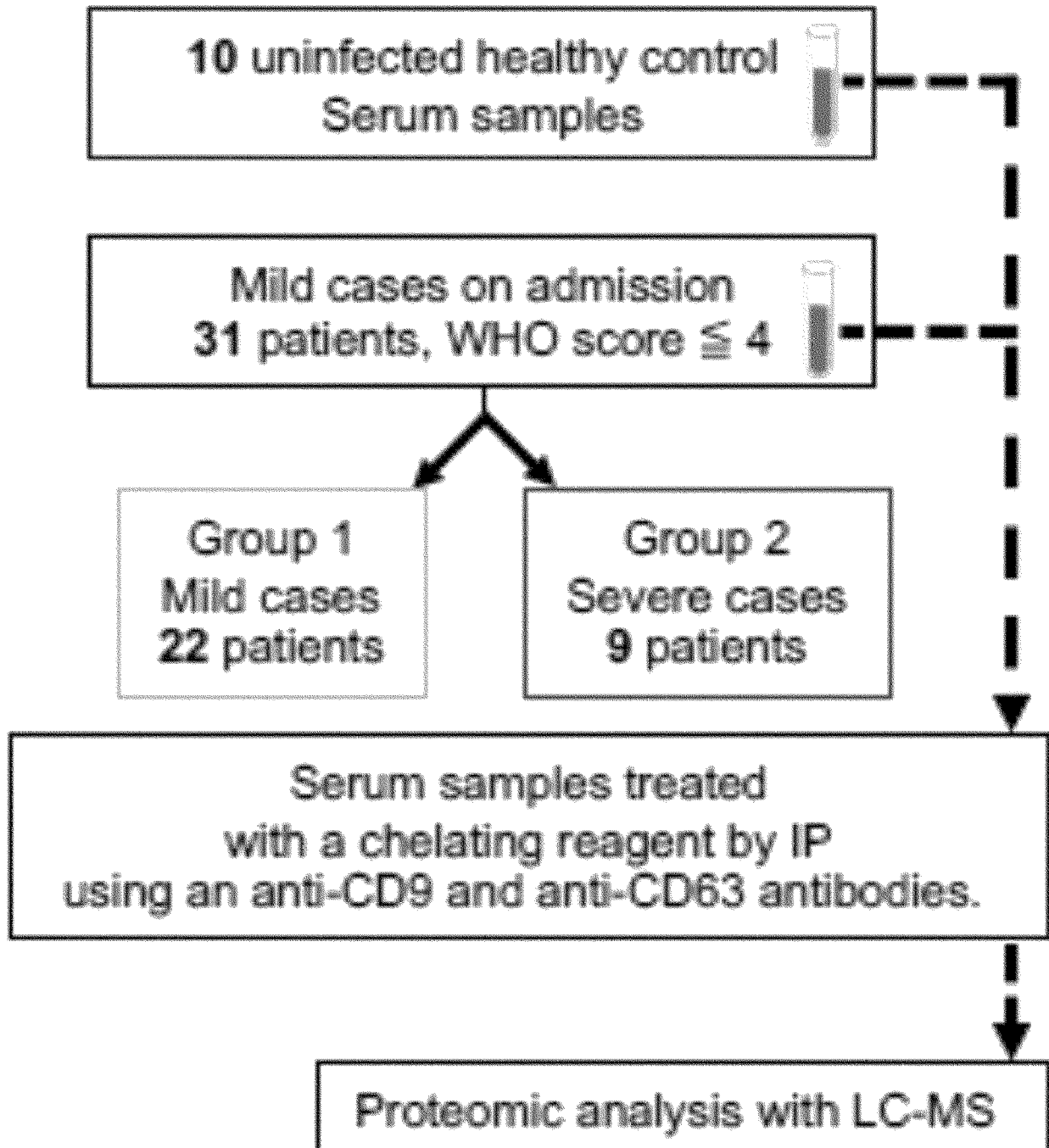
H2, CAB39, CPS1, CD226, COL6A3, CUL4A, DSC1, ENTPD5, EIF4A1, FN1, PGC, RHEB, GNAI2, GNB1, GNA13, ITGA2B, ITGB1, ILK, F11R, LTA4H, LIMS1, NAV2, FAM129B, NNMT, NID1, PPIA, PLA1A, PPBP, PECAM1, GP1BB, PCSK9, MENT, SERPINA10, F2RL3, LOX, SFTPB, RAB5B, RALB, REEP6, RETN, AGXT, CCT2, THBD, ISG15, 及びZYXから選択される少なくとも1種類のタンパク質のレベルを測定する方法であって,

該患者由来の血液サンプルと、請求項13～請求項18のいずれか1項に記載の組成物とを接触させることを含んでなる、方法。

[図1]

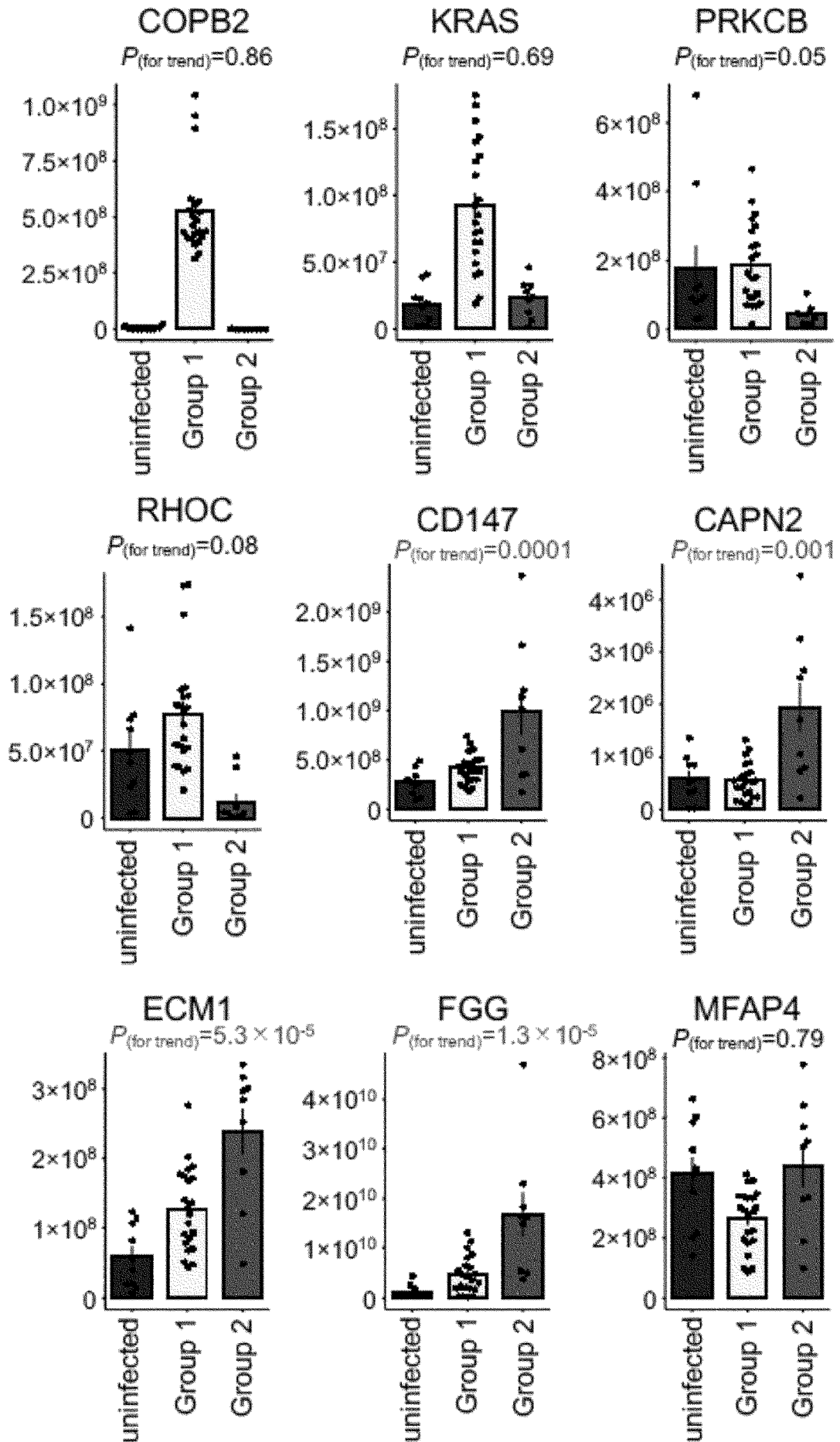


[図2]

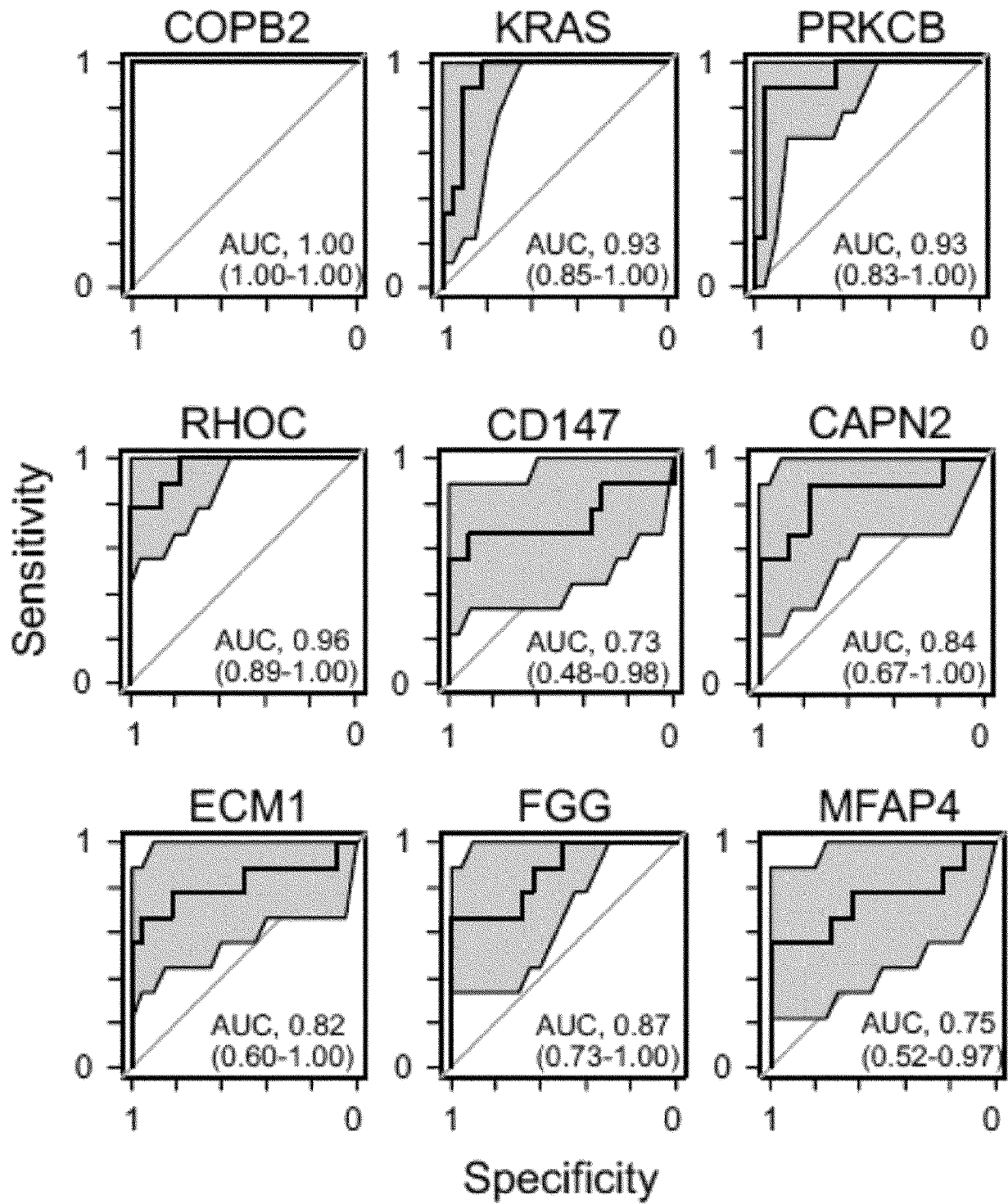




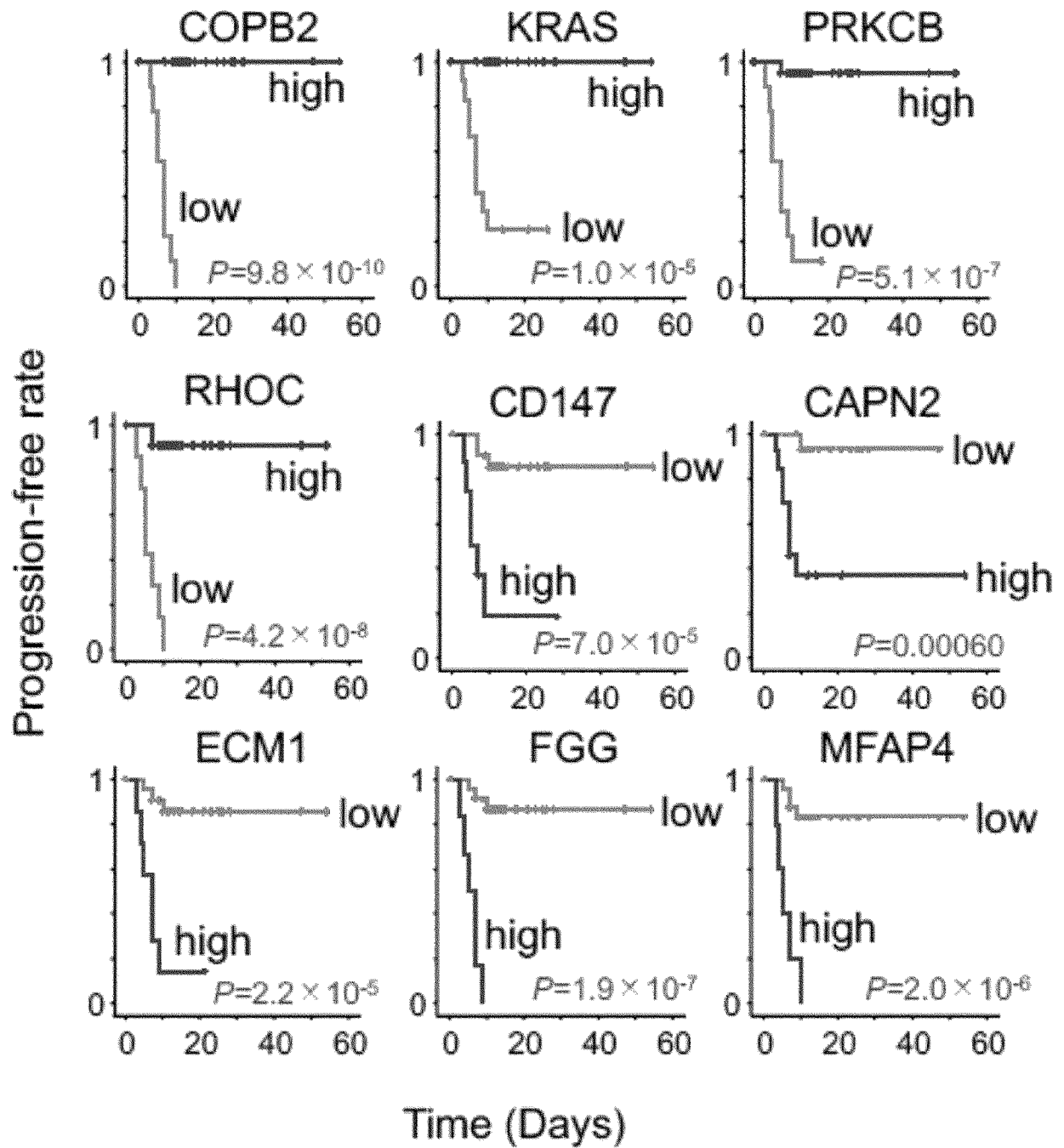
[圖4]



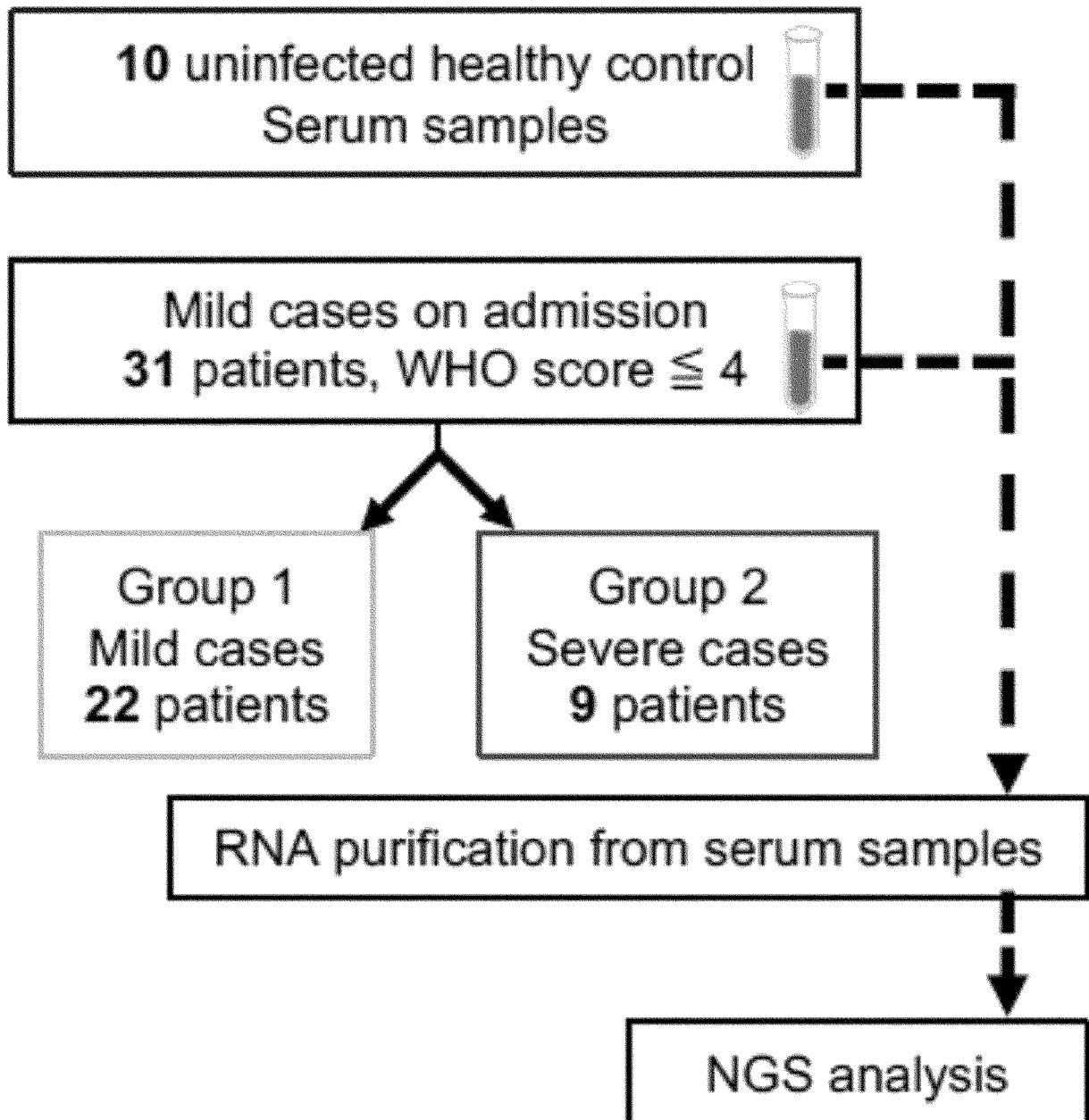
[図5]



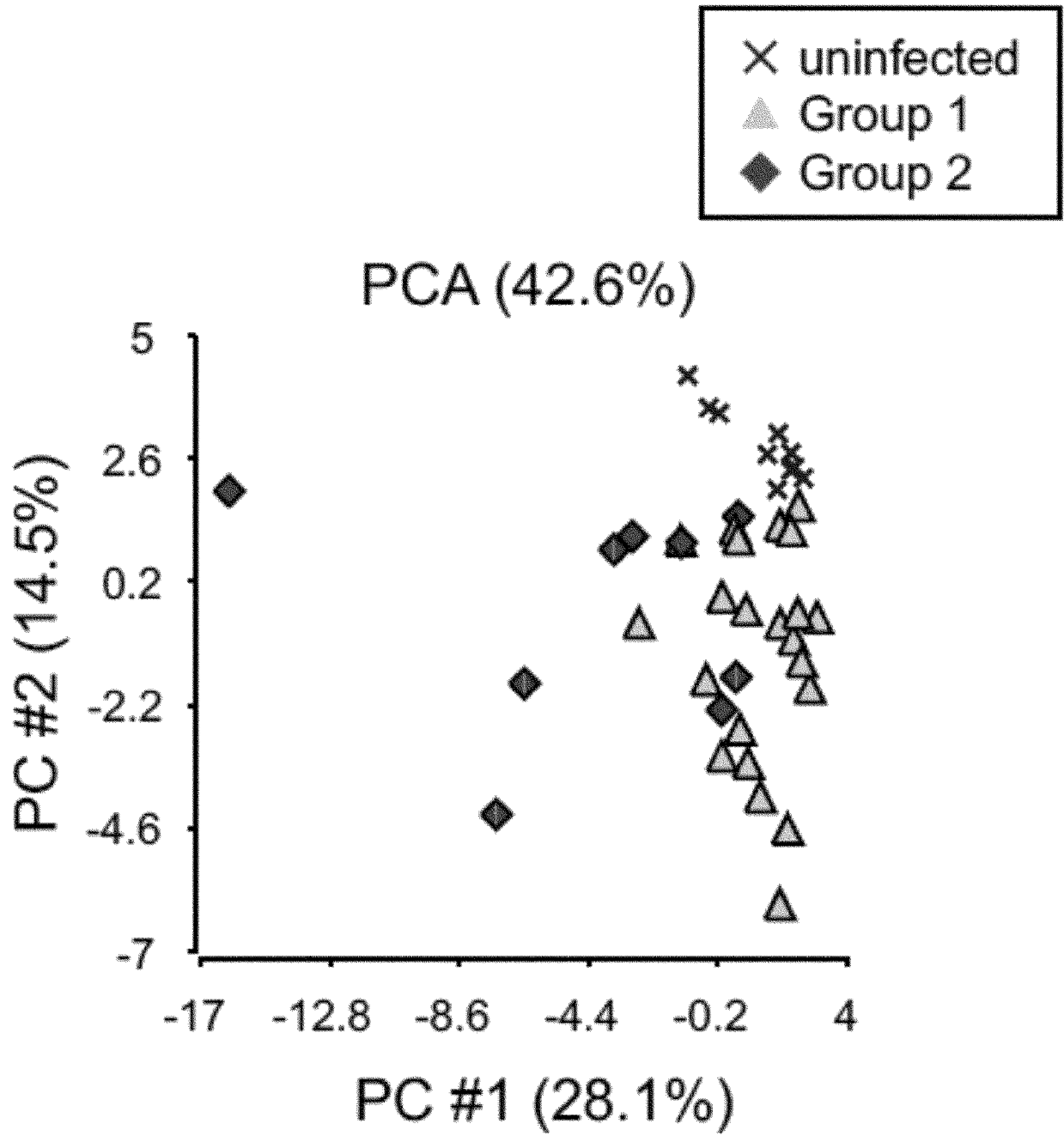
[図6]



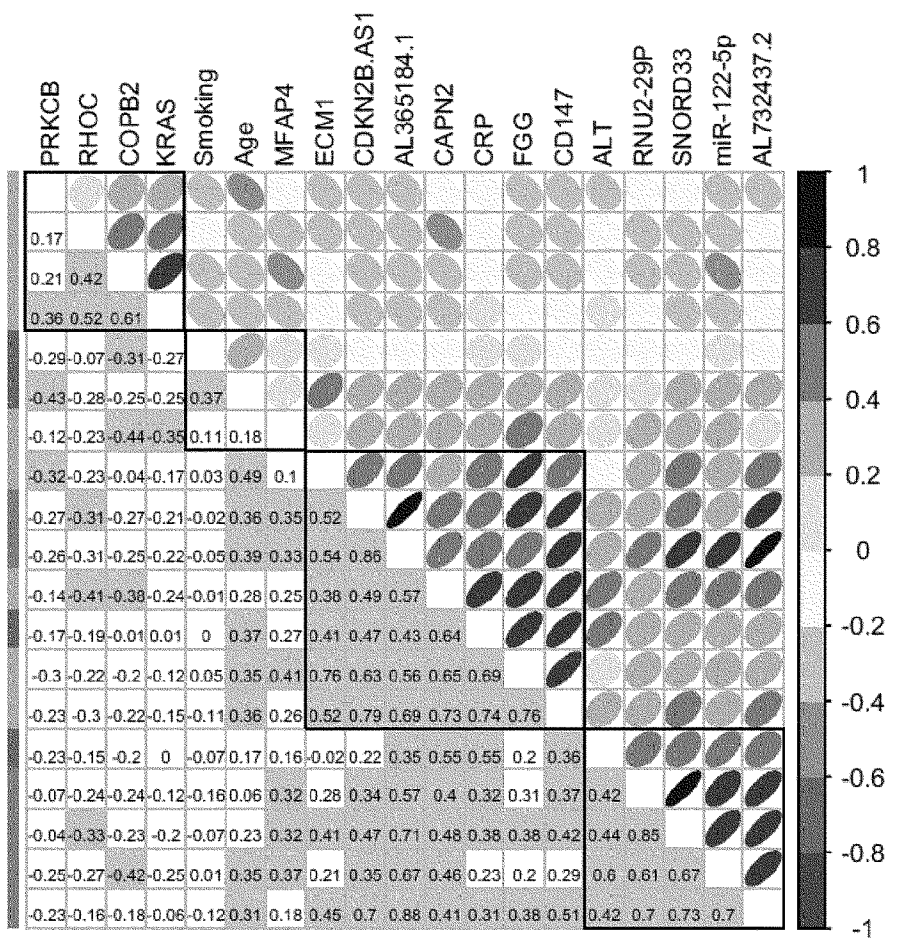
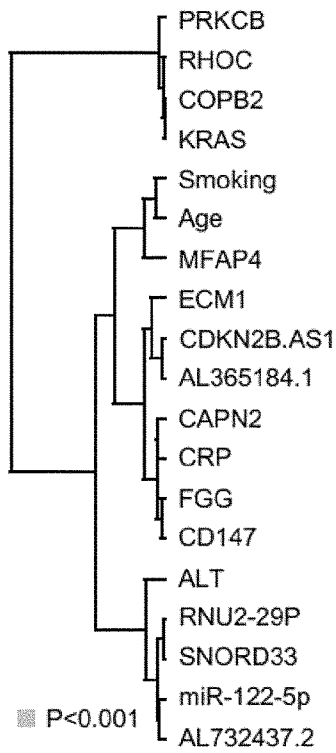
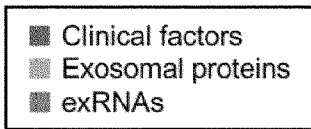
[図7]



[図8]

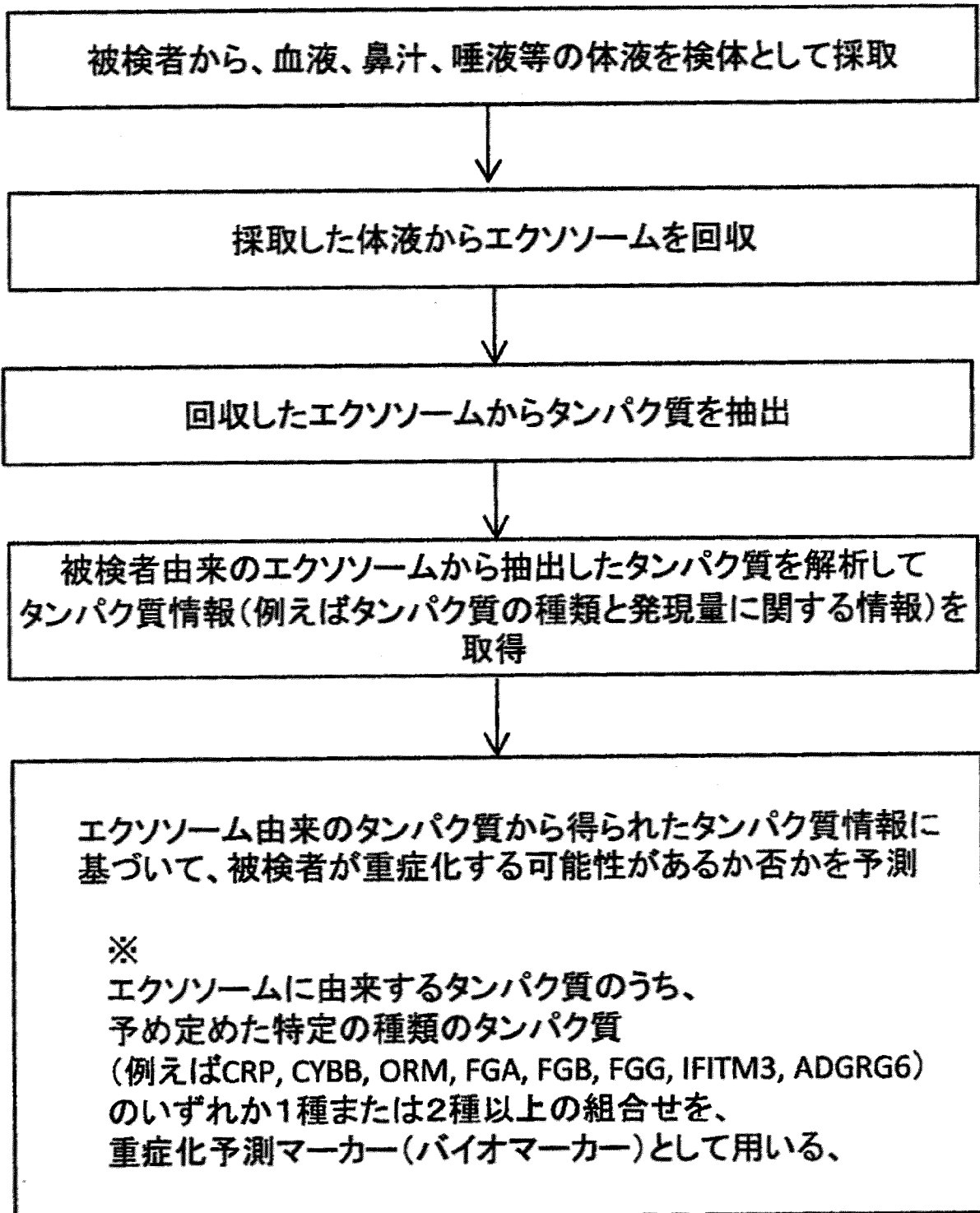


[9]



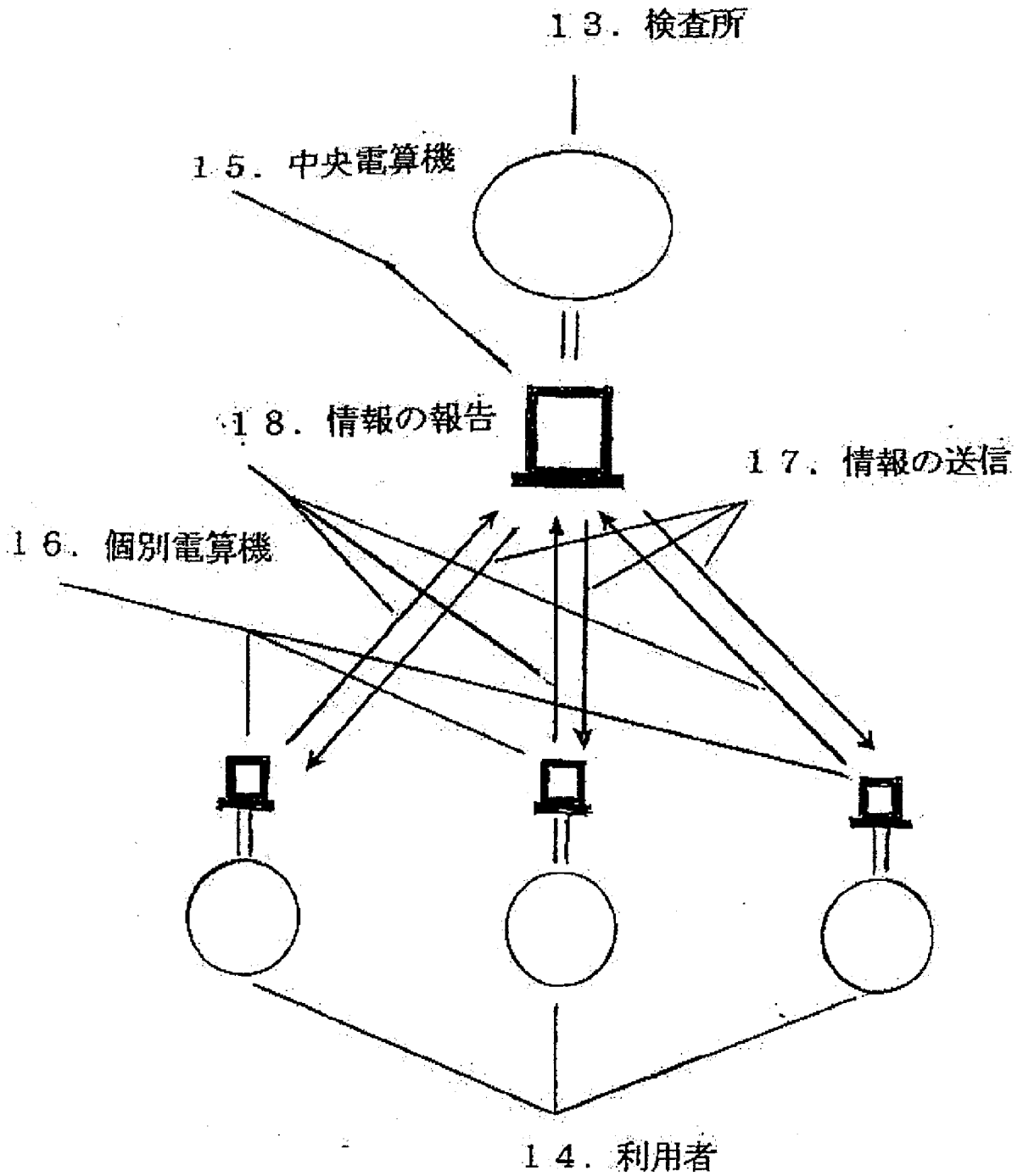
[図10]

## 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症化予測の流れ



[図11]

## 19. 新型コロナウイルスの在宅検査法



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/036525

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12Q 1/6883</i> (2018.01)i; <i>G01N 33/50</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/569</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/68</i> (2006.01)i FI: G01N33/68 ZNA; C12Q1/6883 Z; G01N33/569 L; G01N33/50 P		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/6883; G01N33/50; G01N33/569; G01N33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SKEVAKI, C. et al. Laboratory characteristics of patients infected with the novel SARS-CoV-2 virus. Journal of Infection. 21 June 2020 table 1	11, 13, 17-18
A	table 1	1-10, 12, 14-16, 19
X	WANG, C-Z. et al. Early risk factors of the exacerbation of coronavirus disease 2019 pneumonia. Journal of Medical Virology. 29 May 2020 table 3	11, 13, 17-18
A	table 3	1-10, 12, 14-16, 19
A	AN, P. et al. Biochemical indicators of coronavirus disease 2019 exacerbation and the clinical implications. Pharmacological Research. 23 May 2020 table 1	1-19
A	LI, Huan et al. Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis. Journal of Infection. June 2020, vol. 80, pp. 646-655 Summary	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>07 December 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>21 December 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	植田幸嗣ほか, エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー開発, 医学のあゆみ, vol. 251, no. 10, 06 December 2014, pp. 975-979, (UEDA Koji et al. Proteomic approaches for exosomal biomarker development. Journal of Clinical and Experimental Medicine.) entire text, all drawings	1-19
P, X	FUJITA, Yu et al. Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2. Journal of Extracellular Vesicles. 02 June 2021, vol. 10, e12092 Abstract	1-19

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: G01N33/68 ZNA; C12Q1/6883 Z; G01N33/569 L; G01N33/50 P		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/6883; G01N33/50; G01N33/569; G01N33/68 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	SKEVAKI, C., et al, Laboratory characteristics of patients infected with the novel SARS-CoV-2 virus, JOURNAL OF INFECTION, 2020.06.21 Table1 Table 1	11,13,17-18 1-10,12,14-16,19
X A	WANG, C-Z. et al., Early risk factors of the exacerbation of coronavirus disease 2019 pneumonia, Journal of medical virology, 2020.05.29 TABLE 3 TABLE 3	11,13,17-18 1-10,12,14-16,19
A	AN, P. et al., Biochemical indicators of coronavirus disease 2019 exacerbation and the clinical implications, Pharmacological research, 2020.05.23 Table 1	1-19
A	LI, Huan et al., Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis, Journal of Infection, 2020.06, Vol.80, PP.646-655 SUMMARY	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07.12.2021	国際調査報告の発送日 21.12.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  海野 佳子 2J 3906  電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	植田幸嗣ほか, エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー開発, 医学のあゆみ, Vol. 251, No. 10, 2014.12.06, PP.975-979 全文全図	1-19
P, X	FUJITA, Yu et al., Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COP2, Journal of Extracellular Vesicles, 2021.06.02, Vol.10, e12092 abstract	1-19

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見: