

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

平成29年度 研究報告書

「乳児特発性僧帽弁腱索断裂の多彩な病因に基づいた治療法の確立に向けた研究」

（H28-難治等（難）-一般-009）

研究代表者 白石 公

国立循環器病研究センター 小児循環器部

研究要旨：

[背景] 生来健康である乳児に、数日の感冒様症状に引き続き突然に僧帽弁の腱索が断裂し、急速に呼吸循環不全に陥る疾患が存在する。本疾患は原因が不明で、過去の報告例のほとんどが日本人であるという特徴をもつ。発症早期に的確に診断され、専門施設で適切な外科治療がなされないと、急性左心不全により短期間に死に至る。また外科手術により救命し得た場合も人工弁置換術を余儀なくされるもしくは神経学的後遺症を残すなど、子どもたちの生涯にわたる重篤な続発症をきたす。これまでの我々の調査 (*Shiraishi et al., Circulation. 2014;130:1053-61*) の結果、僧帽弁腱索が断裂する原因として、ウイルス感染（心内膜心筋炎）、母体から移行した血中自己抗体（抗SSA抗体）、川崎病（回復期以降）などが明らかになっており、これら何らかの感染症や免疫学的異常が僧帽弁腱索断裂の引き金になると考えられているが、各々の病態の詳細は不明である。

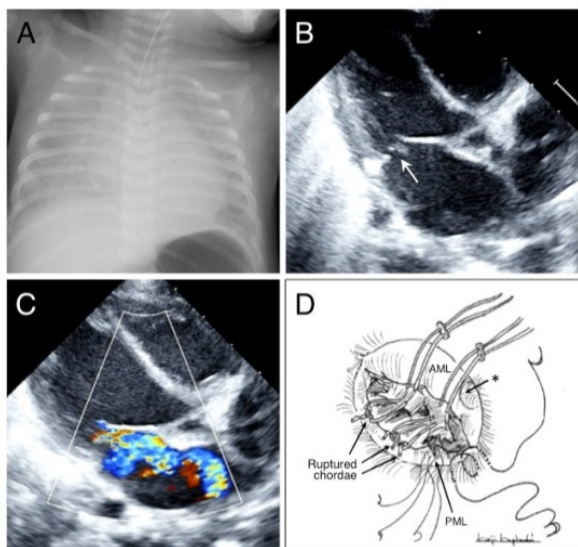
[方法] 本研究では、国立循環器病研究センター創薬オミックス解析センターにおいて、過去のホルマリン固定パラフィン包埋切片（FFPE）を用いてRNAトランスクリプトーム解析を行った。次世代シーケンサを用いた網羅的トランスクリプトーム解析により、感染による炎症反応性の遺伝子発現変化、断裂時の遺伝子発現変動を詳細に解析することにより、感染の可能性、断裂を引き起こした原因を明らかにする試みを行った。

[結果] 過去の僧帽弁組織6症例のサンプルを用いて、NextSeq500を用いて詳細なRNA-seq解析を行った。本研究により、FFPE組織から抽出した微量で低品質なtotal RNAでもRNA-seq解析が可能であることが示された。シーケンスリード数を大幅に増やすことにより、網羅的な遺伝子発現解析ができるだけでなく、ヒトゲノムにマッピングされなかったRNA配列をもとに、感染源の探索も可能と考えられる。

[結論] 過去の僧帽弁組織からのRNAトランスクリプトーム解析による病態解明が可能であることが判明した。今後は、新鮮組織からの網羅的RNA-seq解析も行い、その結果との整合性も確認する予定である。

A. 研究目的

生来健康である乳児に、数日の感冒様症状に引き続き突然に僧帽弁の腱索が断裂し、急速に呼吸循環不全に陥る疾患が存在する。本疾患は原因が不明で、過去の報告例のほとんどが日本人であるという特徴をもつ。発症早期に的確に診断され、専門施設で適切な外科治療がなされないと、急性左心不全により短期間に死に至る。また外科手術により救命し得た場合も人工弁置換術を余儀なくされるもしくは神経学的後遺症を残すなど、子どもたちの生涯にわたる重篤な続発症をきたす。しかしながら本疾患は国内外の小児科の教科書に独立した疾患として記載されておらず、多くの小児科医は本疾患の存在を認識していない。またその急激な臨床経過の特徴から、過去の死亡例は「乳児突然死症候群」と統計処理された可能性があり、実際の発症はさらに多いと考えられる。これまでの我々の調査の結果 (*Shiraishi et al., Circulation. 2014;130:1053-61*)、僧帽弁腱索が断裂する原因として、ウイルス感染 (心内膜心筋炎)、母体から移行した血中自己抗体 (抗 SSA 抗体)、川崎病 (回復期以降)、などが明らかになっており、これら何らかの感染症や免疫学的異常が僧帽弁腱索断裂の引き金になると考えられているが、各々の病態の詳細は不明である。また最近数年間、国内での症例報告が増加しており、早期の実態調査、早期発見の啓蒙、診断治療方針の確立が急務である。



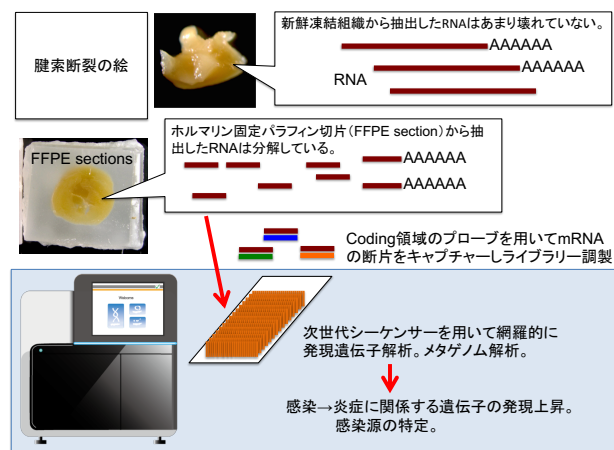
生後4ヶ月の乳児に発症した僧帽弁腱索断裂 (A:胸部 Xp 所見、B:断層心エコー所見、C:ドプラー断層所見、D:手術所見)

B. 研究方法

本研究では、大阪大学微生物病研究所生命情報科学において、僧帽弁組織や咽頭ぬぐい液、血液からメ

タゲノム解析により原因と考える微生物の検索を行うとともに、国立循環器病研究センター創薬オミックス解析センターにおいて、過去のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) を用いてRNAトランスクリプトーム解析を行った。次世代シーケンサを用いた網羅的トランスクリプトーム解析により、感染による炎症反応性の遺伝子発現変化、断裂時の遺伝子発現変動を詳細に解析することにより、感染の可能性、断裂を引き起こした原因を明らかにする試みを行った。

手術による弁置換が必要で僧帽弁及び腱索組織が採取できた症例において、病理解析のためにホルマリン固定しパラフィン包埋された (Formalin Fixed Paraffin Embedding, FFPE)、僧帽弁、腱索から total RNA の抽出を行った。FFPE 組織から得られる RNA は微量で低品質なため、タカラ社の SMARTer 技術を用いて cDNA ライブラリーを作成し、国立循環器病研究所創薬オミックス解析センター設置の NextSeq500 を用いて詳細な RNA-seq 解析を行った。



倫理面での配慮

本研究における患者情報や血液および組織の収集に関しては、各医療機関の倫理委員会の承認を得ることを原則とする。病名や病歴情報の収集は、対象患者もしくは代諾者の承諾が得られた場合のみ行うこととする。国立循環器病研究センター倫理委員会の研究承認は既に得られている。

研究では患者の人権に十分に配慮し、病歴、検査所見などの臨床データ、血液や摘出組織などのサンプルは、検査実施者には匿名化番号で通知し、提供者のいかなる個人情報も漏出しないように細心の注意を払う。またこれらの病歴やサンプルは、国立循環器病研究センターにおいて施錠した状態で厳重に管理する。

研究結果や成果を学会発表する際には、個人が特定できない配慮を (連結可能匿名化) 行い、提供者

のプライバシーを守る。また共同研究機関に遺伝子解析を依頼する場合は、すべて匿名化されたサンプル番号のみを用いて情報の提供を行う。情報をパソコンで管理する際には、ネットワークから隔離された状態で管理する。連結表は国立循環器病研究センター・教育推進部部長室において、責任者白石公のもとで、施錠された状態で保管する。

C. 研究結果

1)最近5年間の発症症例の推移

2012年（平成24年）に行った全国調査以降の発症症例数を明らかにする目的で、日本小児循環器学会の希少疾患疫学調査のデータを元に、最近の発症症例を再調査した。平成24年以降27年末までに33症例の発症が記述されていた。下の図に示すように、各年によるばらつきが非常に大きく、地域による集積性も見られないことが明らかになった。

乳児僧帽弁狭窄症(H23～27)

H23	H24	H25	H26	H27
1 手稲深仁会病院	1 群馬県立小児医療センター	1 九州大学病院	1 東北医薬学医科大学付属病院	1 福島県立医科大学付属病院
1 北海道大学病院	1 都立小児総合医療センター		1 日本医科大学付属病院	1 千葉県立こども病院
1 北海道立小児総合医療・療育センター	1 東京女子医科大学病院		1 国立成育医療センター病院	1 東京都立墨堤病院
2 自治医科大学附属・とちぎ子ども医療センター	1 国立成育医療センター病院	2	1 社会保険中央病院	1 東京大学医学部附属病院
1 埼玉県立小児医療センター	1 聖マリアンナ医科大学病院		1 大阪医科大学付属病院	1 昭和大学医学部附属病院
1 福井愛育病院	1 新潟大学医学部総合病院	1	1 国立循環器病研究センター	1 埼玉医科大学医学部附属病院
1 和歌山県立医科大学	1 福井県立総合医療センター	1	1 大分県立中央病院	1 名古屋第二東洋病院
1 愛媛県立中央病院	1 静岡県立こども病院	1	1 広島市民病院	1 岡山中央病院
	1 聖隷湘南病院	1		1 福井県立福井病院
	1 岐阜県総合医療センター	1		1 関西医科大学附属秋方病院
	1 岡山小児医療センター	1		1 茨城県立総合医療センター
	1 国立循環器病研究センター	2		1 兵庫県立尼崎総合医療センター
	1 徳島大学医学部・歯学部附属病院	1		1 広島市民病院循環器小児科
	1 九州大学病院	1		1 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
	1 熊本赤十字病院	1		
	1 熊本市民病院	1		
計 9	計 18	計 1	計 8	計 14

2) メタゲノム、RNA トランスクリプトーム解析 :

a.新たに発症した1乳児症例において、僧帽弁組織および血液のメタゲノム解析およびウイルスゲノムの検索を行なった。原因と考えられる明らかなウイルスは検出されなかった。

Type	#reads	Human	Bacteria	Viruses	Fungi	Protozoan Parasites	Archaea	Other	Nohit
negative control	4,889,549	4,834,386	388	127	333	429	0	36,187	17,699
僧帽弁	4,782,392	4,719,591	647	141	341	689	1	40,394	20,588
Throat swab	5,432,816	5,239,724	40,570	129	438	599	6	57,665	93,685
urine	6,909,679	6,782,589	1,340	194	523	776	2	94,512	29,743
stool	4,232,813	4,150,268	2,861	109	345	425	0	60,832	17,973

	バクテリア(リード数)					真菌類: バクテリアリード数/全リード = 0.01% (~500 reads/カウントアップ)				
	Top1	Top2	Top3	Top4	Top5	Top1	Top2	Top3	Top4	Top5
対照										
僧帽弁										
咽喉	<i>Bothia mucilaginosus</i>	16,228	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	3,933	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3,154	<i>Veillonella parvula</i>	2,984	<i>Streptococcus</i> , Other	87
尿										
便	<i>Eggerthella lenta</i>	595								

b.過去の僧帽弁組織6症例のサンプルを用いて、NextSeq500を用いて詳細なRNA-seq解析を行った。FFPE組織から得られるRNAは微量で低品質

なため、RNA-seq解析は、6,000万クラスター/検体を目標に行った。今回用いた6検体中、2検体のコントロール、2検体の患者において詳細に解析を行った結果、コントロール、患者検体間で遺伝子発現が大きく変化していた。また、当初予想された、炎症反応性の遺伝子発現変化も確認された。

D. 考察

近年、DNA, RNAを劣化させない固定液PaxGeneが発売され、様々な保存組織から損傷の少ない良質なDNA, RNAが抽出できるようになり、このような保存組織から次世代シーケンサーを用いたDNA, RNAの網羅的解析を行うことが可能となった。本疾患の病因を明らかにするためには、臨床経過や臨床検査所見から、既知の原因の中から考えられる病因を特定してゆくアプローチのみならず、遺伝子や転写産物の網羅的解析のデータから、これまで知られていなかった未知の病因に迫るアプローチも不可欠である。

そこで、本疾患の直接的な病因研究に取り組むことを目的として、DNA, RNAの網羅的解析を含む新たな研究計画を国立循環器病研究センター倫理委員会に提出し、承諾された(M25-097-2)。本疾患で僧帽弁置換術を余儀なくされた症例において、患者代諾者から同意書を得た上で、得られた組織をPaxGeneで固定し、そこからDNA, RNAを回収して、大阪大学附属微生物病研究所において、ウイルスゲノムの検索およびRNAトランスクリプトーム解析を行った。明らかな病原体は検出されなかったが、今後さらに症例を重ねて、研究を継続する予定である。

また同様に過去に僧帽弁置換術を行った4例においても両親から同意書による承諾を得て、ホルマリン固定パラフィン切片 (FFPE) からRNA, DNAを回収して、ウイルスゲノムの検索およびRNAトランスクリプトーム解析を行った。本疾患にウイルス感染が関与しているのか、病理組織学的には多くの症例で軽度のリンパ球浸潤を主体とする非特異的炎症所見が見られるが、まずウイルスDNA, RNA解析により、本疾患のような弁や腱索を主体とする心内膜炎を引き起こすことがこれまで考えてこられなかったウイルスが、新たに見つかる可能性がある。そうすれば、本疾患予防のための抗体やワクチンの作成にもつながる。また、RNAトランスクリプトーム解析を用いてどのような炎症シグナルカスケードが亢進しているかを明らかにできれば、本疾患における腱索断裂にいたる分子細胞生物学的なメカニズムを明らかにすることができ、本疾患の治療薬の開発につながる可能性が出てくる。

実際に今回行った研究により、FFPE組織から抽出した乳児の僧帽弁という、細胞数が少ない微量

で低品質なtotal RNAでもRNA-seq解析が可能であることが示された。シーケンスリード数を大幅に増やすことにより、網羅的な遺伝子発現解析ができるだけでなく、ヒトゲノムにマッピングされなかったRNA配列をもとに、感染源の探索も可能と考えられる。今後、他のFFPE組織を用いてRNA-seq解析を行うことでデータを蓄積するとともに、新鮮組織からの網羅的RNA-seq解析も行い、その結果との整合性も確認する必要がある。

E. 結論

一方、今回行ったRNAトランスクリプトーム解析において、FFPE組織から抽出されたRNAでも網羅的なRNA-seq解析が可能となり、年に数例程度しか得られない症例だけではなく、過去に保存された検体を用いることで原因の解明を行える可能性が示された。今後、より多くの症例を積み重ねることにより、原因の究明が進むと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 白石 公. 僧帽弁閉鎖不全. 小児科診療「小児の治療指針」2017;81:355-356.

2. 学会発表

- 1) 白石 公. 「乳児特発性僧帽弁腱索断裂の臨床的特徴」第24回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会、特別講演. 2018. 2. 24. 京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし