

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

「次世代シーケンサを用いた断裂時の遺伝子発現変動の網羅的解析に関する研究」

研究分担者： 白井 学

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・室長

研究要旨

「乳児特発性僧帽弁腱索断裂」の病因解明を行うために、原因として予想される細菌、あるいはウイルス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、次世代シーケンサを用いた網羅的解析により明らかにする。

A. 研究目的：

数日の感冒様症状に引き続き突然生じる、乳児の僧帽弁腱索断裂の病因として、細菌やウイルス感染の可能性が考えられている。病理解析のためにホルマリン固定後パラフィン包埋された断裂僧帽弁腱索からトータル RNA を抽出し、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。

B. 研究方法：

手術による弁置換が必要で僧帽弁及び腱索組織が摂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。

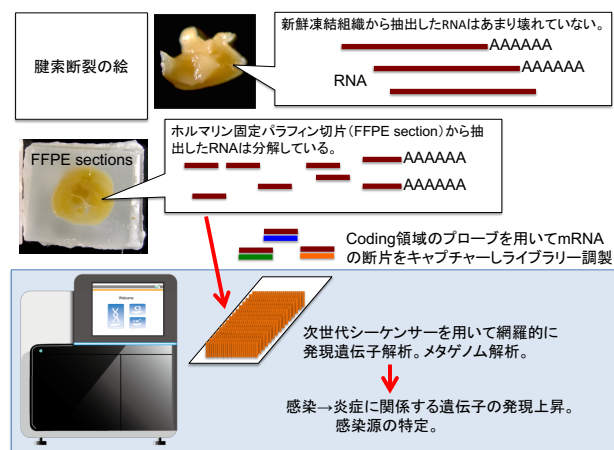
倫理面での配慮

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絶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：

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

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：

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。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：

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病院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

なし

2. 学会発表

なし

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