

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業
(難治性疾患政策研究事業)

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

平成29年度 研究報告書

研究代表者 白石 公

平成30(2018)年 5月

研究報告書目次レイアウト（参考）

目 次

I. 総括研究報告 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	-----	1
II. 分担研究報告 1. 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（白井学）	-----	5
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	7

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。

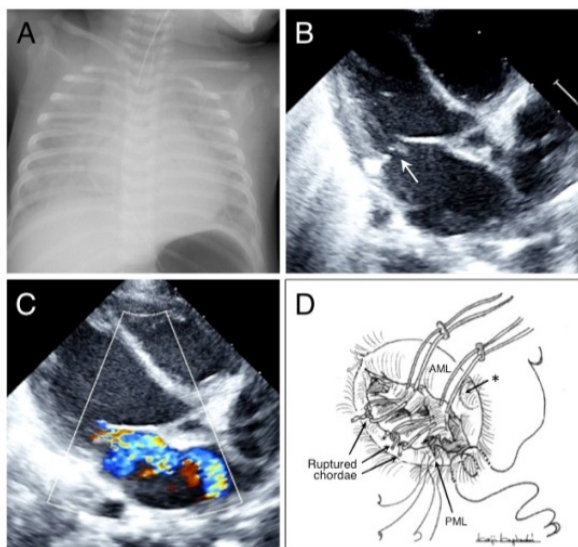
[方法] 本研究では、国立循環器病研究センター創薬オミックス解析センターにおいて、過去のホルマリン固定パラフィン包埋切片（FFPE）を用いてRNAトランスクリプトーム解析を行った。次世代シーケンサを用いた網羅的トランスクリプトーム解析により、感染による炎症反応性の遺伝子発現変化、断裂時の遺伝子発現変動を詳細に解析することにより、感染の可能性、断裂を引き起こした原因を明らかにする試みを行った。

[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。



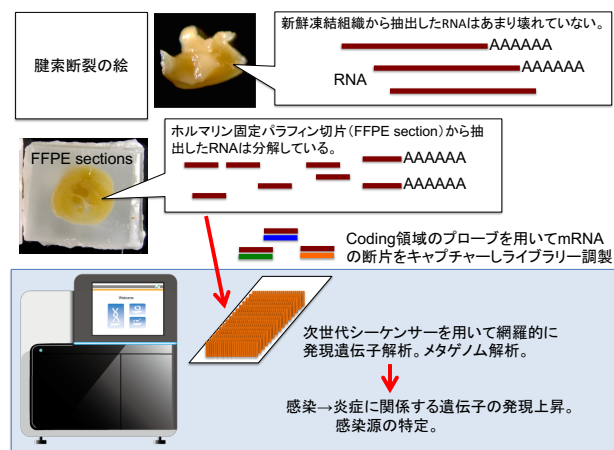
生後4ヶ月の乳児に発症した僧帽弁腱索断裂 (A:胸部 Xp 所見、B:断層心エコー所見、C:ドプラー断層所見、D:手術所見)

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

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

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。

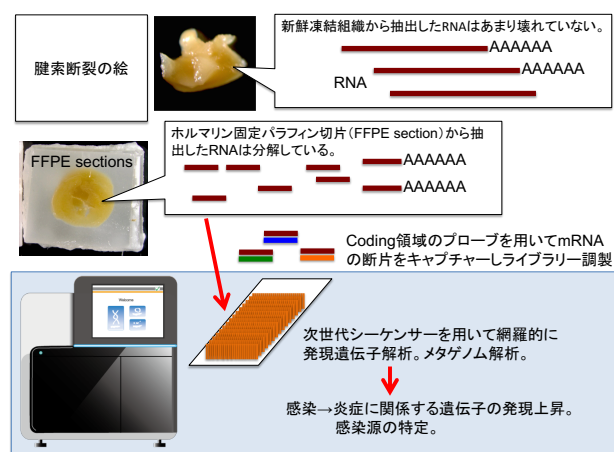
倫理面での配慮

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

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
白石 公	僧帽弁閉鎖不全	小児科診療	81	355-356.	2018