

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08290

研究課題名(和文) 乳児特発性僧帽弁腱索断裂の病因解明のためのトランスクリプトーム・メタゲノム解析

研究課題名(英文) Transcriptome and Metagenome Analysis of Patients with Acute Rupture of Chordae Tendineae of the Mitral Valve in Infants

研究代表者

白石 公 (SHIRAIISHI, ISAO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員

研究者番号：80295659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳児特発性僧帽弁腱索断裂は、生来健康な生後4-6ヶ月の乳児に突然の急性心不全を引き起こす重篤な疾患で、病因と病態は未だ明らかでない。病態解析を目的に患者のパラフィン切片からDNAおよびRNAを抽出し解析した。RNAトランスクリプトーム解析では、患者群において免疫系、細胞増殖、細胞死に関連するmRNAの発現亢進が確認された。RNAメタトランスクリプトーム解析では、NIH-CQVのシーケンスが同定された。組織切片上で高感度ISHにより発現を確認したところ、2症例でparvovirus B19のmRNAが主に心内膜主体に同定された。今後は新たな症例で同ウイルスの関与の検証を重ねる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳児特発性僧帽弁腱索断裂は、年間の発症例が約20例程度の希少疾患ではあるが、生来健康な乳児が死に至る可能性(8.4%)、重篤な中枢神経系障害をきたす可能性(11%)、僧帽弁人工弁置換を余儀なくされる可能性(27%)のある、重篤な疾患である。本疾患の原因を明らかにし、予防策を講じることは社会的に重要な課題である。今回の研究では、ウイルス感染症が引き金になり腱索断裂が発症すること、及びそのウイルスとしてヒトparvovirusが関与している可能性が示唆された。しかし、そのRNA解析における特異性や再現性に関しては、十分になされたとは言えない。今後新たなサンプルを用いて検証を重ねる予定である。

研究成果の概要(英文)：Infantile idiopathic mitral valve chordae tendineae rupture is a serious disease that causes sudden acute heart failure in 4-6 month old healthy infants. The etiology and pathogenesis remain unclear. DNA and RNA were extracted from paraffin sections of patients and they were analyzed for pathogenesis. RNA transcriptome analysis revealed increased expression of mRNAs associated with immune system, cell proliferation, and cell death in the patient group. High-sensitivity ISH on tissue sections confirmed the expression of parvovirus B19 mRNA in two cases mainly in the endocardium. We plan to further validate the involvement of this virus in new cases in the future.

研究分野：小児科学

キーワード：乳児特発性僧帽弁腱索断裂 腱索断裂 急性心不全 抗SSA抗体 川崎病 心内膜炎 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

乳児特発性僧帽弁腱索断裂とは、生来健康である生後 4-6 ヶ月の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である。早急に診断がなされ、小児心臓手術ができる施設に搬送しなければ、急性心不全により死に陥る (8.3%) もしくはショックによる有意な中枢神経系障害を残す (11%) ことがあり、また多くの症例で僧帽弁機械弁置換術を余儀なくされるなど(27%)、健康な乳児に突然発症する看過できない疾患である。これまでに行われた全国調査 (下図: Shiraishi et al, Circulation 2014;130:1053-61.) により、原因として、ウイルス感染、母体から移行した抗 SSA 抗体、川崎病回復期など、感染症や免疫学的異常が引き金となることが示唆されているが、病因と病態の詳細は不明である。

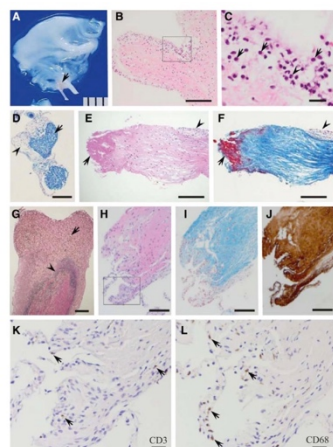
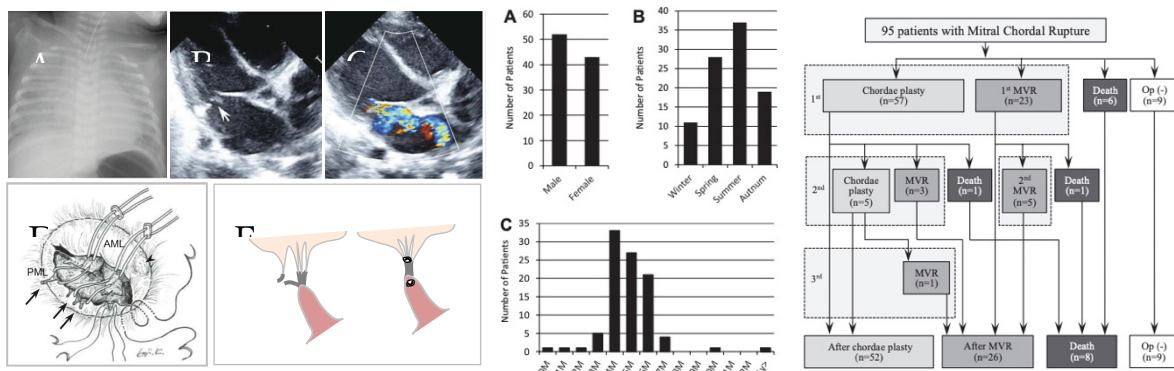


Figure 4. Gross and histopathologic findings of the mitral valves and ruptured chordae tendineae. A, Resected mitral leaflet of a patient (4-month-old male). B and C, Microphotographs of the valve and chordae tendineae of a 4-month-old female. The arrows indicate infiltrated mononuclear cells, and the arrowhead indicates a polymorphonuclear cell. D-F, Ruptured chordae tendineae of a 5-month-old female stained with Masson trichrome (D and F) and hematoxylin and eosin (E). D, The arrow indicates a central core of dense collagen bundles, and the arrowhead indicates fibrous thickening of the endocardial tissue. E and F, The arrows indicate fibrin deposition at the ruptured chordae tendineae, and the arrowheads indicate fibrous thickening with mononuclear cell infiltration at the endocardium. G, Marked increase of fibrous thickening (arrow) between the endocardium and fibrous core (arrowhead). H-J, Microphotographs of chordae tendineae stained with hematoxylin and eosin (H) and toluidine blue (I), as well as immunohistochemistry with tenascin C antibodies (J) of a 6-month-old female. K and L, Immunohistochemistry with CD3 (K) and CD68 (L) antibodies at the rectangular area in H. The arrows in K indicate CD3-positive T cells, and the arrows in L indicate CD68-positive macrophages. Scale in A, 1 mm. Scale bars in B and D-G, 200 μ m; H-J, 100 μ m; C, K, and L, 20 μ m.

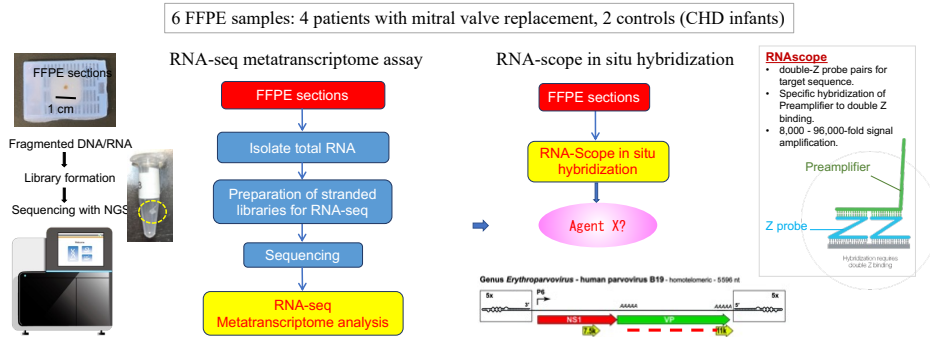
2. 研究の目的

本疾患の病因と病態を明らかにすることが最重要であるが、本疾患は年間の発症が全国でも 20 例程度と希少であるばかりでなく、急性発症かつ診断後すぐに外科手術に向かうため、病因腱索のための新鮮サンプルがほとんど思うように収集できないのが特徴である。そこで、我々の今回の研究では、近年確立された、過去のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) 標本から微量の DNA 及び RNA を抽出する方法を用いて、倫理審査を経て研究承諾の得られた患者の僧帽弁および腱索組織から、DNA 及び RNA 発現の網羅的解析を行う。トランスクリプトーム解析により腱索組織の遺伝子発現の全体像を把握するとともに、メタゲノム解析により原因として考えられる感染源を検索する。ある程度目標となる発現 RNA が絞られたら、近年開発された高感度 in situ hybridization 法である RNA scope 法を用いて、FFPE 標本を用いて ISH による検証を行う。最終的には、乳児特発性僧帽弁腱索断裂の病因および臨床経過および臨床検査所見を詳細に調査し、本疾患の早期診断および的確な内科的および外科的治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

原因となり得るウイルスなどの微生物の遺伝子を、過去のパラフィン切片から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより網羅的に解析する。この結果により、弁および腱索組織ではどのような遺伝子発現の更新もしくは減弱を明らかにし、腱索断裂の分子細胞生物学的メカニズムを明らかにする。また取り出した RNA からライブラリを作成してメタトランスクリプトーム解析を行い、組織内に含まれているウイルスなどの微生物遺伝子を網羅的に解析する（下図）。

一方で、次世代シーケンサーを使った DNA や mRNA の検討では、増幅過程で生じる偽陽性や偽陰性の懸念を払拭できない。より確かなものにするには、発現を組織切片上でも明らかにすることが必要である。そこで今回の研究では、新しく開発された高感度 in situ hybridization である RNA-scope 法を併用する。この方法では、target となる mRNA に対して複数の short probe を使い、さらに amplifier を使って 8,000 から 96,000 倍にシグナルを増幅させるので、1 つの mRNA を検出することも可能とされている。過去の FFPE では mRNA が断片化している可能性が高いので、この方法により target となる mRNA を検出できることが期待される。



✓ We isolated RNA from FFPE specimens and investigated RNA-seq metatranscriptome assay and RNA-scope in situ hybridization in 6 cases (4 patients and 2 control infants with CHD).

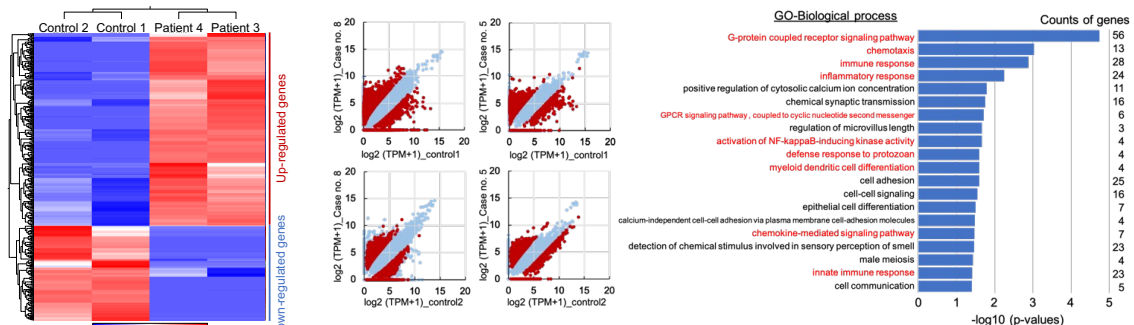
4. 研究成果

DNA メタゲノムアッセイ

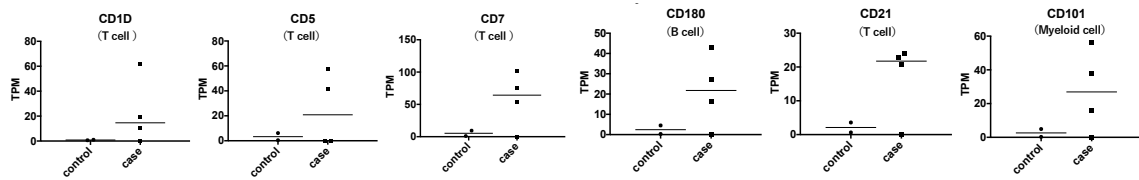
残念ながら FFPE からは網羅的分析に資するだけの良質な DNA が一定量得られなかった。いかに行うことができた RNA に比べ、DNA の絶対量が少ないのが原因ではないかと考えられた。

RNA トランスクリプトーム解析

これまでに行なった研究では、僧帽弁置換を行なった患者と、対照とした先天性心疾患乳児患者の僧帽弁および腱索組織の数例において、網羅的解析が可能な良好な RNA が抽出できた。予備的に行なった RNA トランスクリプトーム解析では、患者群において対象と比較して 10 倍以上亢進した 772 の遺伝子発現が認められた。その詳細について、免疫系に関連する遺伝子、細胞増殖に関連する遺伝子、細胞死に関連する遺伝子などの発現亢進が確認された（下図、GO enrichment assay、及び、次ページ図は各種リンパ球の発現を示す）。



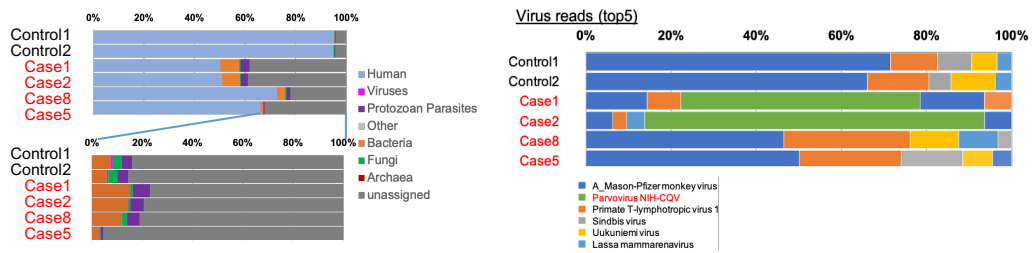
✓ 772 genes were differentially expressed in patients (Fold change abs value ≥ 5 in every comparisons).
 ✓ Signaling pathways of immune response and apoptosis were upregulated.



Lymphocytic infiltration was observed in the patient's tissue.

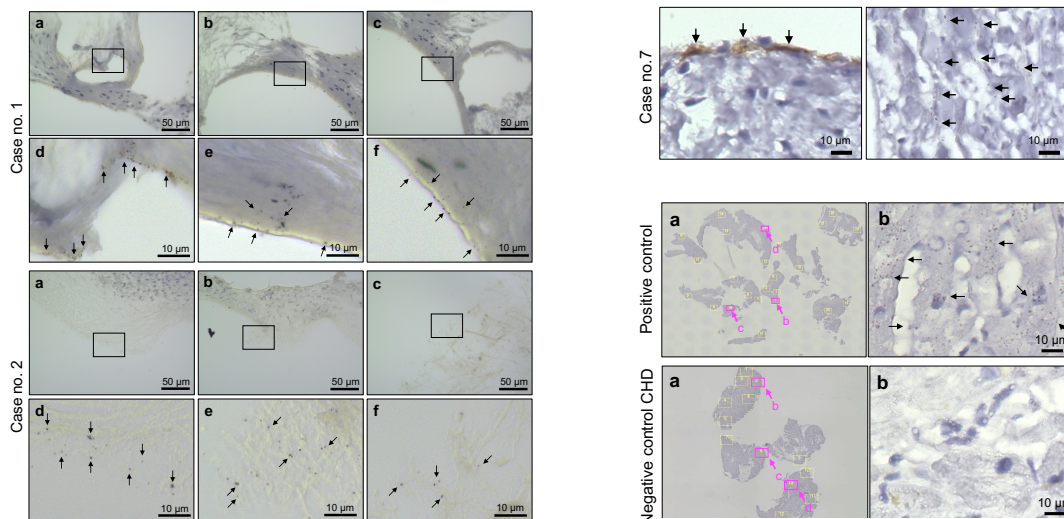
RNA メタトランスクリプトーム解析:

ウイルスなどの病原体 RNA を同定するために網羅的解析を行う。予備的研究では、図 5 のように 2 症例で parvovirus NIH-CQV のシーケンスが上位に同定されてきた。しかしながら、文献的にはしばしば偽陽性として認められるとの記載があるため、今後はさらに症例数を増やして parvovirus の関与について解析を進める予定である。



RNA scope in situ hybridization

次世代シーケンサーを使った網羅的解析は、数多くの候補となる mRNA を見出し、そこから可能性の高いものを絞り込むには都合がいいが、増幅過程で偽陽性が発生しやすい。そこで RNA トランスクリプトーム解析により候補が上がった病原体を、その特異度を確認するために FFPE 組織切片上で、高感度 in situ hybridization 法である RNA-scope により、mRNA が発現するかどうか、発現すればその組織上の局在が的確であるかを検討した。parvovirus の probe を使って RNA-scope を行ったところ、数例の患者で心内膜に沿った mRNA の発現が認められた（下図）。これらの所見より総合して、parvovirus が本疾患の発症に何らかの関与することが示唆された。



今後は parvovirus が本当に病態に関係しているかどうかについて、残された FFPE 切片を使って発現の再現と局在を確認する予定である。また、parvovirus 以外に心臓に親和性があることが知られているコクサッキーウイルス、エコーウイルス、ヘルペスウイルス、コロナウイルスについても RNA-scope で調べる予定である。それにより、本疾患の原因もしくは引き金となるウイルスを同定し、本疾患の予防法や治療法の確立に向けた研究を継続する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石公
2. 発表標題 乳児特発性僧帽弁腱索断裂の治療法の確立に向けた臨床研究委員会報告
3. 学会等名 第57回日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井学
2. 発表標題 過去のFFPE切片からを用いたRNAトランスクリプトーム解析および高感度in situ hybridization法による乳児特発性僧帽弁腱索断裂の病態および病原微生物の検討
3. 学会等名 第57回日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井学、白石公
2. 発表標題 過去のFFPE切片からを用いたRNAトランスクリプトーム解析および高感度in situ hybridization法による乳児特発性僧帽弁腱索断裂の病態および病原微生物の検討
3. 学会等名 第57回日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白井 学 (Shirai Manabu) (70294121)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------