

平成30年6月19日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09705

研究課題名(和文) 乳児特発性僧帽弁腱索断裂の病因研究 - 母親由来抗SSA抗体による組織障害について

研究課題名(英文) Research on Pathogenesis of Acute Rupture of Chordae Tendinae of the Mitral Valve in Infants: Possible involvement of maternally derived anti-SSA antibody

研究代表者

白石 公 (Shiraishi, Isao)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：80295659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：[方法と結果] 発症4日目の腱索新鮮標本からウイルスのメタゲノム解析を行った。また過去の腱索断裂4例と対象2例の僧帽弁ホルマリン固定切片からRNAを抽出し、腱索断裂組織のRNAトランスクリプトーム解析を行った。抗SSA抗体の関与についても検討した。メタゲノム解析では、病因と確定できる微生物ゲノムは検出されなかった。また6例のトランスクリプトーム解析でも、本疾患に特徴的な発現遺伝子のパターンや抗SSA抗体の特異的証拠は得られていない。
[結論] 今回の検討では症例数が少なく、本疾患の核心に至る所見は得られなかった。今後さらに症例数を重ねて、本疾患の病因と病態に迫り的確な治療および予防に繋げる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathogenesis and pathophysiology of the mitral chordal rupture in infants, metagenome analysis was performed using a fresh mitral valve tissue of an infant with mitral chordal rupture. RNA transcriptome analysis was also performed using formalin fixed paraformaldehyde embedded (FFPE) mitral valve tissues taken from the 4 patients and 2 controls. So far, specific viral or bacterial genome has not been detected in metagenome analysis. Specific RNA up regulation and down regulation have not been identified including pathways concerning anti-SSA antibody, either.
To be able to obtain convincing results and elucidate pathogenesis and pathophysiology of the disease, metagenome and RNA transcriptome analysis with more samples are necessary.

研究分野：小児科学

キーワード：僧帽弁腱索断裂 抗SSA抗体 メタゲノム解析 RNAトランスクリプトーム解析 川崎病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

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。本疾患は過去の報告例のほとんどが日本人という特徴をもつ。発症早期に的確に診断され、適切な外科治療がなされないと、急性心不全により短期間に死に至る。また救命し得た場合も人工弁置換を余儀なくされるか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、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。また最近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。

また同時に本疾患の全国実態調査を継続的に行うことで、発症頻度、発症状況、危険因子などを明らかにする。また、診断基準や治療ガイドラインを確立することで、早期診断や早期治療が可能にし、死亡例や重篤な合併症を減らすことができる。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

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。次世代シーケンサー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、国立循環器病研究センター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。

4. 研究成果

1) 臨床的特徴

本疾患は生後 4~6 ヶ月の乳児に好発する。ただし母親由来の SSA 抗体陽性患者では生後 1~2 ヶ月以内に発症することがある。数日の発熱、咳嗽、嘔吐などの感冒様の前駆症状に続き、突然に僧帽弁腱索が断裂する。重度の僧帽弁閉鎖不全により心拍出量の低下および著しい肺うっ血をきたし、短時間に多呼吸、陥没呼吸、呼吸困難、顔面蒼白、頻脈、ショック状態に陥る。少数で三尖弁の腱索断裂を合併することがある。複数の腱索が断裂すると、人工弁置換術を余儀なくされることがある。術後に別の腱索次々と断裂し、数日後に人工弁置換が必要となる症例も散見される。乳児時期に人工弁置換を行った場合は、生涯にわたる抗凝固剤の内服が必要であるとともに、再弁置換もしくは再々弁置換術が必要となる。また女兒では成人期に達した際、抗凝固薬の内服は妊娠や出産において大きな障害となる。

通常、胸骨左縁第 III 肋間から心尖部にかけて収縮期逆流性心雑音が聴取される。心雑音の指摘のない乳児が急速に呼吸循環不全に陥り、新たな心雑音が聴取された場合には、本疾患を疑う。ただし急性左心不全による肺水腫のため、肺野に全体に湿性ラ音が聴取されて心雑音が聴き取りにくい場合があるので注意が必要である。また急速な経過のために心拡大が顕著でなく、心疾患として認識されず、肺炎と初期診断する可能性があるので注意を要する。

典型的な症例を 1 例示す。図 1 は生後 4 ヶ月の乳児に発症した僧帽弁腱索断裂である。2 日間の発熱の後、顔面蒼白のショック症状

を呈した。二次救急病院での初期診断は肺炎であったが、心雑音に気づかれて心エコーを行ったところ、重度の僧帽弁逸脱および僧帽弁腱索断裂に気付かれ、三次救急病院に搬送された。強心利尿薬による内科的治療で循環不全が改善できなかったため、速やかに外科手術が執り行われた。搬送当初、ショック状態で人工呼吸を必要とし、速やかに外科手術が行われ、人工腱索による腱索修復と僧帽弁縫縮術が行われた。術後経過は順調で、軽度の僧帽弁閉鎖不全を遺残するのみで、現在外来で内服治療もなく良好に経過している。

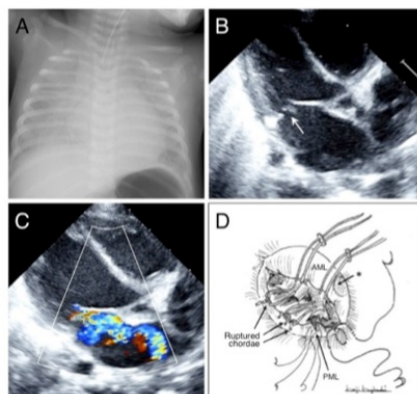


図1：生後4ヶ月の乳児に発症した僧帽弁腱索断裂 (A:胸部Xp所見、B:断層心エコー所見、C:ドプラー断層所見、D:手術所見)

全国調査の結果、過去16年間に発症した95例の臨床データを得た。発症は生後4~6ヶ月に集中した(85%, 図2)。性別では、やや男児に多かった(図3)。季節別では、春から夏の頻度が高かった(66%, 図4)。

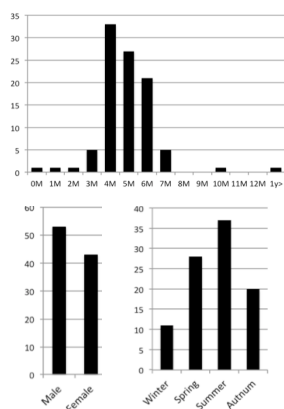


図2：発症月例の分布

図3：男女分布 図4：発症の季節分布

基礎疾患として、川崎病10例、抗SSA抗体陽性は調べた12例中2例に、細菌性心内膜炎1例が認められた(表1)。

Table 1. Clinical Characteristics of the 95 Patients

Clinical Findings	
Age at onset (months)	5 (4-6)*
Body weight at onset (kg)	6.83 (6.14-7.51)*
Gestational weeks	39 (38-40)*
Body weight at birth (kg)	2.97 (2.70-3.28)*
History of Kawasaki disease	10 cases; Acute and convalescent stage (day ≤ 30), 3 cases Beyond convalescent stage (day > 30), 7 cases
Anti-SSA antibody-positive (12 cases examined)	2 cases; 0 and 5 mo
Prodromal symptoms	88 cases; fever 37, cough 16, vomit 14, others 21
Cardiogenic shock after initial prodromes	2 (1-7)*

*Data are presented as median (interquartile range).

表1：95例の臨床所見

血液生化学所見では、急性循環不全によるショックから白血球数は中等度の増加(全国調査での中央値15,440/uL)がみられるが、一般にCRPは軽度の上昇に留まる(中央値1.60mg/dL)。トランスアミナーゼ値は心不全の強い症例では上昇するが多くの正常範囲で(AST, ALT中央値44, 21 IU/L)、心筋逸脱酵素、とくにCPK-MBや心筋トロポニンTの上昇は見られない。ほとんどの症例でBNP値は高度に上昇する(中央値1,450pg/mL)(表2)。

胸部X線所見では、急速に心不全が進行するため心拡大は軽度(心胸郭比中央値56%)にとどまるが、多くの症例(75%)において両肺野にうっ血像が認められる(図1)。一部の僧帽弁閉鎖不全の経過が長い症例では心拡大が明らかとなる。心電図では特徴的な所見は少なく、急性左心不全による左胸部誘導でT波の平定化や陰転が見られることがある。僧帽弁腱索断裂の診断は、断層心エコー検査で確定可能である。左室長軸断面および心尖部四腔断面像において、僧帽弁尖の逸脱および翻転、断裂により遊離した腱索、ドプラー断層で大量の僧帽弁逆流シグナルが確認できる。僧帽弁閉鎖不全の程度は、全国調査では高度70例(73%)、中等度22例(23%)、軽度4例(4%)であった。しかしながら、急性心不全のために左室腔の拡大は明らかでなく(左室拡張末期径z value中央値1.47)、左室短縮率は高度な僧帽弁閉鎖不全のため軽度亢進する(中央値0.41)。全国調査では、断層心エコーで特徴的な所見として乳頭筋頂部の腱索附着部位にエコー輝度の亢進が8例(8.4%)に認められた。粘液変性と考えられる僧帽弁尖の有意な肥厚は9例(9.5%)に認められた。全国調査では僧帽弁前尖の断裂が28例、後尖の断裂が33例、両者の断裂が22例に認められた。まれに三尖弁の腱索断裂を伴う症例も存在し(6例)、心不全が重篤になるので注意が必要である。

Table 2. Laboratory Findings of the 95 Patients

Examinations	On Admission	At Discharge	P Value
WBC (/uL)	15440 (11990-21650)	9160 (7330-11100)	<0.0001
Hb (g/dL)	10.2 (8.9-11.1)	11.8 (10.9-13.0)	<0.0001
PLT ($\times 10^3$ /uL)	501 (338-600)	368 (302-439)	0.0003
CRP (mg/dL)	1.60 (1.97-3.15)	0.11 (0.16-0.31)	<0.0001
AST (IU/L)	44 (30-105)	36 (29-44)	0.0003
ALT (IU/L)	21 (13-135)	22 (16-36)	0.0160
LDH (IU/L)	421(267-763)	332 (264-484)	0.0046
CPK (IU/L)	119 (77-247)	76 (45-123)	0.0002
CPK-MB (IU/L)	27 (12-91)	31 (20-42)	0.0749
BNP (pg/mL)	1,450 (839-2545)	72 (32-114)	0.0007
cTnT (n=22, ng/mL)	0.027 (0-0.132)	—	—

Data are presented as median (interquartile range). ALT indicates alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BNP, brain natriuretic protein; CPK, creatine phosphokinase; CRP, C reactive protein; cTnT, cardiac troponin T; Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; MB, myocardial band; PLT, platelets; and WBC, white blood cells.

表 2 : 95 例の血液生化学所見

生来健康で心雑音が指摘されたことがない生後 4~6 ヶ月の乳児に、数日の感冒要症状に引き続き、突然の多呼吸、陥没呼吸、顔面蒼白、ショック症状がみられ、聴診で収縮期の逆流性心雑音が聴取された場合、本疾患を疑う。断層心エコーにより診断がつき次第、可及的に乳児の開心術が行える小児循環器専門施設に紹介する。必要な治療としては、診断がつき次第まず呼吸循環動態の改善に努める。全身蒼白のショック状態で呼吸困難が強い場合には、鎮静下に気管内挿管による人工呼吸管理を行い、動脈ラインおよび中心静脈ラインの確保による集中治療管理を開始し、アシドーシスの補正、強心薬の持続静脈投与、利尿薬の静脈内投与により、左心不全および肺うっ血の改善を試みる。診断がついた後も、内科的治療により経過観察している間に次々と新たな腱索が断裂する可能性があるため、集中治療によっても呼吸管理および循環動態が維持できない場合は、時期を逃さず外科手術に踏み切ることが重要である。

手術は一般に人工腱索を用いた僧帽弁腱索形成術を行う。僧帽弁輪が拡大した症例では弁輪縫縮術も併用する。ただし複数の腱索が断裂した症例や、断裂が前尖と後尖の広範囲にわたり、人工腱索だけでは修復不可能と判断される場合は、機械弁置換術を行う。好発年齢である生後 4~6 ヶ月の乳児では、通常 16mm の機械弁を挿入する。

今回の調査では、外科治療は、最終的に腱索形成もしくは弁輪縫縮が 52 例 (55%)、機械弁置換が 26 例 (27%) に行われた。死亡例は 8 例 (8.4%) であった。中枢神経系後遺症は 10 例 (11%) 認められた。全体では 35 例 (40%) が何らかの後遺症/続発症を残し、本疾患の罹病率は極めて高い。(図 5)。

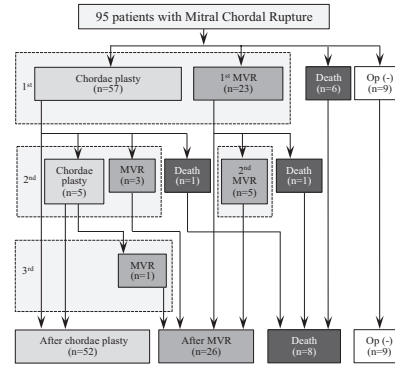


図 5 : 95 例の外科的治療内容

腱索の病理組織 (21 例) では、単核球を主体 (とする心内膜下の炎症細胞浸潤が 18 例 (64%) に認められた。多核白血球の浸潤はごく少数のみ認められた。断裂部位は線維性組織で置換され癒着化していた。粘液様変成が 11 例 (39%) に認められた。急性炎症のマーカーであるテネイシン C は腱索全体にわたり陽性であった (図 6)。免疫組織科学では、浸潤した単核球は、CD3 陽性 T リンパ球および CD68 陽性マクロファージであった。剖検のえられた 2 症例では、他の内臓臓器に腱索と同様な炎症所見は認められなかった。

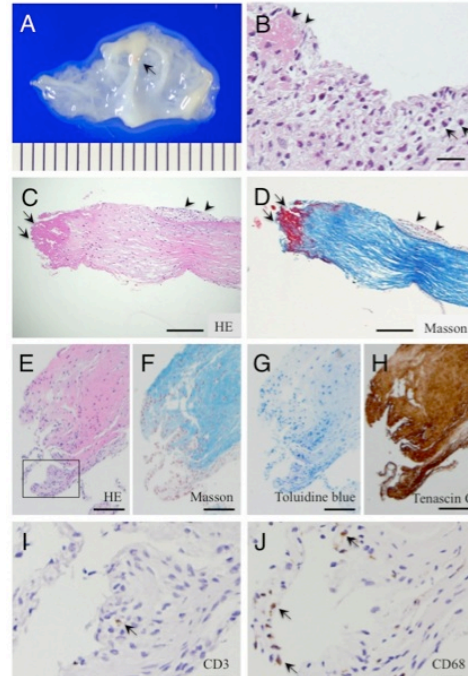


図 6 : 断裂した腱索の病理組織所見

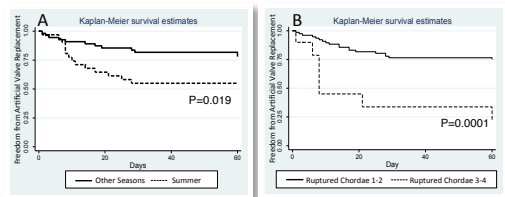


図7：A：発症季節から見た機械弁置換術回避のKaplan-Meier survival、夏に発症した患者の回避率が他の季節に比べて有意に低い。

B：断裂した検索数から見た機械弁置換から回避のKaplan-Meier survival。断裂部位が3-4箇所患者は、1-2箇所患者に比べて人工弁回避率が低い。

1) メタゲノム解析

僧帽弁組織が提供された1乳児症例において、大阪大学附属微生物病研究所で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。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	Notit
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

科種	バクテリア		真菌		ウイルス		その他	
	reads	species	reads	species	reads	species	reads	species
細菌	18,224	29	1,104	10	1,104	10	1,104	10
真菌	1,104	10	1,104	10	1,104	10	1,104	10
ウイルス	1,104	10	1,104	10	1,104	10	1,104	10
その他	1,104	10	1,104	10	1,104	10	1,104	10

2) RNA トランスクリプトーム解析：

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、RNA トランスクリプトーム解析を実施した。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サンプルを用いて、病理解析のためにホルマリン固定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。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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- 1) 白石 公. 僧帽弁閉鎖不全. 特集：小児の治療指針. 小児科診療. 2018;81:355-6.

〔学会発表〕 (計1件)

- 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.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者：白石 公 (SHIRAI, Isao)
国立研究開発法人
国立循環器病研究センター・病院・部長
研究者番号：80295659

- (2) 研究分担者
該当なし

- (3) 連携研究者：白井 学 (SHIRAI, Manabu)
国立研究開発法人
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
研究者番号：70294121

- (4) 研究協力者
該当なし