



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	画像診断の不確実性を補完する末梢血 cell-free DNA による脈管奇形の遺伝子診断に関する研究
Author(s)	三田村, 真太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17033号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17033
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100086
Type	doctoral thesis
File Information	MITAMURA_Shintaro.pdf, 全文



学 位 論 文

画像診断の不確実性を補完する

末梢血 cell-free DNA による

脈管奇形の遺伝子診断に関する研究

(A study on genetic diagnosis of vascular malformations

using peripheral blood cell-free DNA

as an adjunct to imaging-based diagnosis)

2026 年 6 月

北 海 道 大 学

三田村 真太郎

学 位 論 文

画像診断の不確実性を補完する

末梢血 cell-free DNA による

脈管奇形の遺伝子診断に関する研究

(A study on genetic diagnosis of vascular malformations

using peripheral blood cell-free DNA

as an adjunct to imaging-based diagnosis)

2026 年 6 月

北 海 道 大 学

三田村 真太郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
緒言	4 頁
略語表	9 頁
第 1 章 脈管奇形の画像診断における正確性に関する研究	
緒言	11 頁
方法	13 頁
結果	14 頁
考察	22 頁
第 2 章 リキッドバイオプシーによる脈管奇形の遺伝子診断に関する研究	
緒言	27 頁
方法	31 頁
結果	37 頁
考察	50 頁
総括および結論	55 頁
利益相反	57 頁
謝辞	58 頁
引用文献	59 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shintaro Mitamura, Kosuke Ishikawa, Yuki Sasaki, Naoki Murao and Satoru Sasaki
Pitfalls in Ultrasound Diagnosis of Vascular Malformations: A Retrospective Review of 14
Nonvascular Tumors Treated as Vascular Malformations
Diagnostics, 15: 506 • 2025
2. Shintaro Mitamura, Kosuke Ishikawa, Kanaki C. Hatanaka, Tatsuro Saito, Yuki Sasaki,
Takahiro Miura, Taku Maeda, Emi Funayama, Naoki Murao, Satoru Sasaki and Yutaka
Hatanaka
Ultra-deep targeted next-generation sequencing with peripheral blood in patients with vascular
malformations: a cohort of 40 patients
Molecular Biology Reports, 53: 214 • 2026

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 三田村 真太郎, 石川 耕資, 佐々木 雄輝, 村尾 尚規, 佐々木 了.
脈管奇形の術前診断で切除した腫瘍性病変の検討
第 68 回日本形成外科学会総会・学術集会, 2025 年 4 月 16–18 日・東京

要旨

【背景と目的】脈管奇形は、胎生期の血管・リンパ管系の形成に関する先天性異常から生じ、皮膚、皮下組織、筋、骨に至るまで多様な部位に病変を形成する。

International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) 分類に基づく病型診断

(arteriovenous malformation: AVM、capillary malformation: CM、lymphatic malformation: LM、*PIK3CA*-related overgrowth spectrum: PROS、venous malformation: VM など) は治療選択に直結するが、実際の診療では超音波検査 (ultrasound, US)、磁気共鳴画像 (magnetic resonance, MR) を中心とした画像診断に依存し、出血リスクなどから病理組織学的診断は必ずしも行われなない。また、脈管奇形の各病型は互いに重複する表現型をもち、非血管性腫瘍や嚢胞性病変とも混同し得る。時にそれは悪性疾患であり、診断の遅れが治療開始を遅らせ患者の予後に関わりうるが、脈管奇形の診断の困難さがその稀な頻度のため十分に認識されているとは言い難い。加えて、鎮静下 MR や血管造影など侵襲的検査を要することがあり、確実かつ低侵襲な診断補助の整備が望まれる。近年、脈管奇形の分子病態として rat sarcoma (RAS)/mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) 経路に関わる遺伝子の体細胞モザイクが明らかとなり、客観的補助診断として遺伝子診断の重要性が高まっている。一方、体細胞モザイクは末梢血中のバリエーションアレル頻度 (variant allele frequency, VAF) が極めて低い領域に分布し得るため、高感度検出系の整備が課題である。本研究は、(1) 画像診断における不確実性を体系化し、(2) 末梢血 cell-free deoxyribonucleic acid (cfDNA) を用いたリキッドバイオプシーと ultra-deep targeted next-generation sequencing (NGS) による遺伝子診断の実現性を検討することを目的とした。

【対象と方法】第 1 章では、2008 年 7 月～2023 年 9 月に斗南病院形成外科で「脈管奇形の術前診断」で切除された症例を後ろ向きに検索し (536 名 759 病変)、術後に非血管性腫瘍と病理診断された 14 症例を抽出した。診療録から、画像所見、術前診断、最終病理診断、診断変更までの期間などの情報を収集し、臨床診断と病理診断が不一致となった背景と診断再検討を要する臨床状況を整理した。第 2 章では、北海道大学病院および斗南病院で前向きに登録した脈管奇形 40 例 (AVM 11 例、PROS 9 例、VM 20 例) を対象とし、末梢血から cfDNA を抽出した。Unique molecular identifier (UMI) によるエラー補正を備えた ultra-deep targeted NGS (*BRAF*、*KRAS*、*MAP2K1*、*PIK3CA*、*TEK* の頻出バリエーション領域をターゲットとするカスタムパネル) を実施し、Ion Reporter でバリエーション同定を行った。陽性・陰性対照を併用し、偽陽性抑制と超低 VAF 領域の検出可能性を検証した。

【結果】第 1 章では、臨床診断と病理診断が不一致であった 14 症例の最終病理診断は神経鞘腫 6 例、表皮嚢腫 2 例、血管平滑筋腫 2 例、軟部血管線維腫 1 例、外傷性神経腫 1 例であり、骨外性粘液性軟骨肉腫（悪性）1 例および孤立性線維性腫瘍（中間悪性）1 例を含んだ。初診時診断から最終診断までの期間は平均 370±539 日（範囲 14–1893 日）で、臨床診断の過誤の長期化が患者負担を増大させ得た。硬化療法などの不適切な治療は治療無効に留まらず、炎症・癒着により後続の切除難易度を上昇させ、周囲組織の拡大切除を余儀なくした。第 2 章では、アンプリコン平均カバレッジ 104,000×（範囲 28,000–153,000×）を達成し、40 例中 23 例（57.5%）で計 44 バリエントを検出した。VAF は中央値 0.11%（範囲 0.05%–1.88%）で、0.1%未満が 38.6%（17/44）を占めた。疾患群別の陽性例は、AVM 11 例中 6 例（10 バリエント）、PROS 9 例中 7 例（15 バリエント）、VM 20 例中 10 例（19 バリエント）であった。AVM では *BRAF* p.V600E や *KRAS* p.G12D など既知ホットスポットに加え、*TEK*、*PIK3CA*、*MAP2K1* の併存例を認めた。PROS では *PIK3CA* ホットスポット（p.E542K、p.E545K、p.Q546R）を複数例で同定し、新規バリエント候補（フレームシフトバリエント/終止バリエント）も含まれた。VM では *TEK* バリエントが多く、頻出部位に加えて新規候補を含み、*TEK* 二重バリエントや他遺伝子バリエントの併存を認めた。PROS の一部症例では、病変組織の formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) 検体で既報のバリエントと同一のバリエントが末梢血 cfDNA から検出された。未検出例（17/40）および単一症例で複数バリエントが検出され、臨床解釈の整理が必要であった。

【考察】画像診断は低侵襲で反復可能な一次評価として有用である一方、脈管奇形における診断の困難性により不一致が生じ得るため、非典型所見（充実性成分、圧迫で変形しない、など）や治療反応不良、短期間の増大などを契機に診断を再検討する枠組みが重要である。分子診断の観点では、末梢血 cfDNA を用いた ultra-deep targeted NGS により、超低 VAF 領域の体細胞モザイクに対してもバリエント同定が可能であり、組織採取が困難な症例の補助診断として有用性が高い。一方、AVM では cfDNA が循環血中で希釈され検出量が少ない可能性も報告されており、未検出例の解釈を含めた検査戦略の最適化が課題である。また、既知バリエントに絞る droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) と、スペクトラムの広いバリエント探索に強い targeted NGS は補完関係にあり、目的に応じた使い分けが求められる。

【結論】第 1 章で脈管奇形の画像診断における診断の不確実性および治療方針の不適合リスクと再評価の契機を整理し、第 2 章で末梢血 cfDNA を用いた ultra-deep targeted NGS により超低 VAF バリエントの検出が可能なことを示した。画像診断と分子診断の相補的な運用は、低侵襲かつ高精度な診断の実現につながる可能性がある。

緒言

脈管異常は、血管腫と脈管奇形に大別される。血管腫の代表である乳児血管腫は、かつて蕁状血管腫と呼ばれていた乳児期に最も多い良性の血管腫であるが、海外の報告では乳児の約 4.5% にみられるとされ (Smith et al. 2017)、本邦における全国規模調査による有病率は 0.72% である (Mizawa et al. 2021)。乳児血管腫の自然経過では、出生後数日から数週間で出現し 1 歳頃までの増殖期を経たのち徐々に退縮して 7 歳頃までに大部分が消退する。病変の形態によって、局面型、腫瘤型、皮下型および混合型に分けられるが、特に腫瘤型では消退後に皮膚萎縮や毛細血管拡張などの整容的な後遺症を残す。ほかにも、頸部や腋窩などの間擦部では潰瘍を形成するリスクが高く、眼周囲では視覚遮断性弱視などの機能障害を合併し得るため、症例により治療介入が必要となる (佐々木 ほか. 2022)。また、皮膚変化が明瞭な場合には診断は比較的容易であるが、皮下型では他の軟部腫瘍との鑑別が問題となり得る。

乳児血管腫に対する薬物療法として、 β 遮断薬であるプロプラノロール内服療法が 2016 年に本邦でも承認され治療として確立している。プロプラノロール内服療法は増殖期に開始した場合に高い治療効果が期待できる一方で、 β 遮断薬の薬理作用に由来する徐脈や低血圧、低血糖、気管支攣縮などの重大な副作用に留意しなければならない。また、乳児血管腫は低出生体重児および早産児における発症率が高く、慎重に治療開始時期を判断する必要がある (三田村 ほか. 2023)。治療効果の一例として、眼周囲の乳児血管腫に対するプロプラノロール内服療法の治療前後写真を示す (図 0-1)。

生後 29 日, プロプラノロール内服開始直前



生後 727 日, 治療終了 3 カ月時点



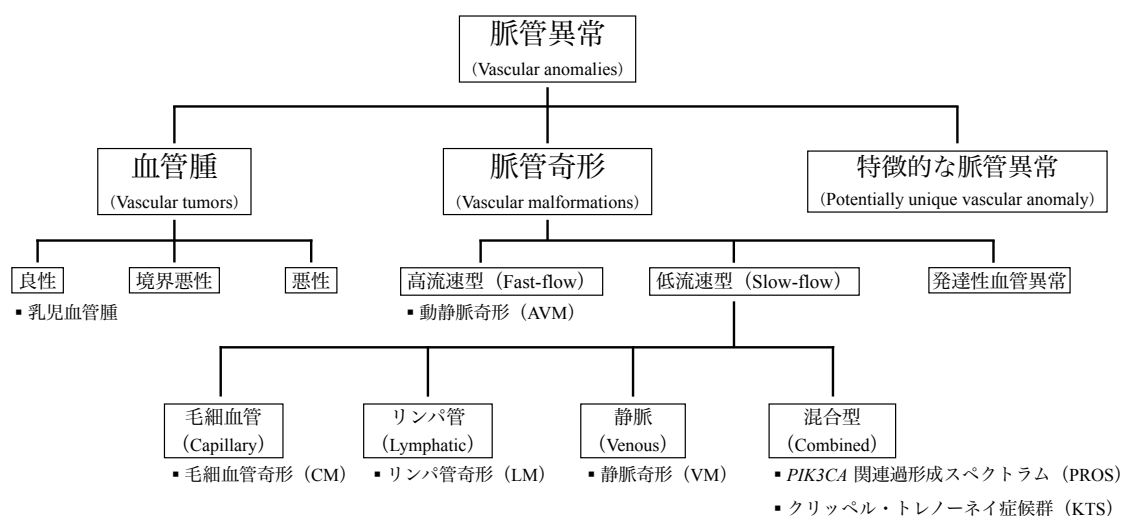
三田村真太郎, ほか. 形成外科 (2023). 66, 1336–1345. から一部抜粋して引用

図 0-1. 眼周囲の乳児血管腫に対するプロプラノロール内服療法の治療前後写真

左：生後 29 日（内服開始直前）。右：生後 727 日（治療終了 3 カ月時点）

（三田村 ほか. 2023 から一部抜粋して引用）

上記のとおり、乳児血管腫では薬物治療としてすでに確立された治療法がある一方で、脈管奇形は自然退縮が期待できない上に、病型や重症度、進行様式が多様で、薬物治療は近年導入が進みつつあるものの、乳児血管腫のように標準化された治療として広く確立しているとは言い難い。脈管奇形は、胎生期の血管・リンパ管系の形成に関する先天性異常から生じ、皮膚、皮下組織、筋、骨に至るまで多様な部位に病変を形成する。病変は出生時から存在しうるが、成長に伴って徐々に増大し、疼痛、出血、整容障害、機能障害をきたす。臨床的には、ISSVA 分類に基づき、低流速型（LM、VM など）と高流速型（AVM）を含む病型に整理される。こうした病型分類は、治療選択（硬化療法、経カテーテル動脈塞栓術（transcatheter arterial embolization, TAE）、切除術、薬物療法など）や予後の見通しに直結するため、初期段階での適切な診断が不可欠である。また、本邦の多施設調査では血管腫・脈管奇形患者の約 4 割が難治性と判定され、治療の長期化や反復介入を要する症例が多い（力久ほか, 2013）。本学位論文で扱う疾患の位置付けを明確にするため、ISSVA 分類（2025 年改訂版）に基づく脈管異常の概略を図 0-2 に示す（ISSVA, 2025）。



ISSVA Classification of Vascular Anomalies 2025 から一部抜粋して作成

図 0-2. ISSVA 分類（2025 年改訂版）に基づく脈管異常の概略図
（ISSVA, 2025 を参照し、本学位論文で扱う主要疾患を抜粋して著者作成）

脈管奇形は自然退縮が期待できる乳児血管腫とは対照的に、病変が生涯にわたり遷延し進行する点が患者にとって大きな負担となる。VM では病変がびまん性で主要な静脈系と交通を有する場合には治療回数が増え再発リスクも高い。AVM は進行性の経過をとる病型であり、病期が進むと重篤な合併症を来す。よって、脈管奇形では長期にわたる症状管理と計画的な反復治療、再燃リスクを前提とした経過観察が不可避となる症例が少なくなく、患者負担および医療資源の観点からも重要な臨床課題である。

まずVMは、かつて海綿状血管腫と呼ばれていた低流速型脈管奇形の代表であり、脈管奇形の中で最も頻度が高く、全体の44–64%を占めるとされ、頭頸部（40%）、四肢（40%）、体幹（20%）と全身いずれの部位にも生じうる（Loose 2007）。VMは出生時から存在する例が多いが、成長に伴って徐々に増大して顕在化する場合もある。臨床的には淡青色あるいは青紫色調の局面や腫瘤として認められ、圧迫で縮小し、体位変換やバルサルバ手技により膨隆が増強するなど、静脈還流の影響を反映した所見を示す。疼痛は重要な症状であり、うっ血や血栓形成、静脈石に関連して出現し得るほか、VMが筋や関節、骨に及ぶ場合には機能障害の原因となる（Colmenero et al. 2021）。また、限局型とびまん型では治療反応性や再燃傾向が異なり、びまん型では反復治療を要しやすい（Mulligan et al. 2014）。

VMの画像診断ではMRが局在評価の中心となり、T2強調画像で高信号を呈する病変として描出される。静脈石はコンピュータ断層撮影（computed tomography, CT）で検出やすく、USでは高エコー領域と音響陰影として捉えられる。USとMRを併用することで、低流速の血流評価や圧迫変形の所見が得られ、診断に有用である。治療は、圧迫療法などの保存的治療に加え、疼痛などの症状がある場合には硬化療法が中心となり、病変の局在や広がりに応じて切除術を含む集学的治療を検討する。硬化療法では無水エタノールなどの硬化剤を選択するに際し有効性と合併症（皮膚潰瘍や神経障害など）を天秤にかけなければならない（Mulligan et al. 2014）。また、局所血管内凝固症候群を伴う症例では静脈血栓塞栓症リスクの観点から抗凝固療法が考慮されるほか、四肢病変では機能障害に対するリハビリテーションも含めた介入が重要となる（佐々木 ほか. 2022）。さらに、たとえ良性疾患といえども感染を契機に重篤化することがあり、筋肉内VMに劇症型溶連菌感染症を合併し経口挿管管理が9日間に及んだ小児例の報告は、部位に応じたリスク評価の重要性を示す（Matsuda et al. 2022）。

次にAVMは、動脈と静脈が毛細血管床を介さずに異常吻合する高流速型脈管奇形であり、病変内にナイドスを形成して流入動脈と拡張した流出静脈が短絡する。AVMは頭頸部に多いとされるが、全身いずれの部位にも生じ得る。外傷や手術、妊娠、出産などを契機に増悪する場合があります。シャント血流の増加や血管抵抗の低下に伴って病勢が進行すると、疼痛や潰瘍、動脈性出血などの局所症状に加え、全身循環動態への影響をきたす。Schöbingerの病期分類では、第Ⅰ期（静止期）は皮膚の紅斑や皮膚温上昇を主徴とし、第Ⅱ期（拡張期）では腫瘤の増大に加えて拍動、スリルの触知、血管雑音の聴取が明瞭となる。さらに第Ⅲ期（破壊期）に進行すると、疼痛、潰瘍形成、出血、感染、壊死などの破壊性変化が顕在化し、四肢では末梢循環障害や骨関節変形に伴う機能障害を呈し得る。最終的に第Ⅳ期（代償不全期）では高拍出性心不全に至る（Rosenberg et al. 2018）。AVMの診断と治療は血行動態の評価を前提とし、TAE、硬化療法、切除術など

を組み合わせた集学的治療を要する。不適切なタイミングでの治療介入は AVM の再燃を招くため慎重に長期管理を行う必要がある（佐々木 ほか, 2022）。

AVM の診断では、US で拡張あるいは蛇行した血管腔が描出され、カラードップラーで高流速を示すモザイク状を呈し、パルスドップラーで拍動性波形が確認される。三次元 CT 血管造影では流入動脈や流出静脈が同定されることがあり、MR では高流速血管が flow void（無信号域）を示すなど、病態に応じて画像所見も変化する。また、思春期など特定の時期での進行が目立つことが示唆されており、長期的な評価と治療計画が求められる（Liu et al. 2010）。

さらに、混合型脈管奇形を含む病型の一つとして、PROS が代表的である。ISSVA 分類（2018 年改訂版）に基づく、PROS に含まれる疾患には、CLOVES 症候群（先天性脂肪過形成、血管奇形、表皮母斑、骨格異常）、異形成性巨大脳症、過成長を伴う線維脂肪性過形成、線維脂肪性浸潤性脂肪腫症（顔面病変では顔面浸潤性脂肪腫症とも呼ばれる）、片側過形成多発性脂肪腫症、クリッペル・トレノーネイ症候群（Klippel-Trenaunay syndrome, KTS）、巨指症、巨頭症-毛細血管奇形-多小脳回症がある（ISSVA, 2018）。なお、PROS は病的な *PIK3CA* モザイクの存在（ただし、モザイクのため確認が困難な場合がある）、先天性あるいは早期発症、孤発性、複数の臨床所見の組合せを骨格とする診断の枠組みで整理されている。一方、*PIK3CA* 関連病変の中には過成長を明瞭に伴わない表現型も少なくないため、近年は「*PIK3CA* 関連疾患」としてより広い枠組みで捉えることも提案されており、上記のほかに線維脂肪性血管異常を含めて論じる既報もある（Chen et al. 2024）。KTS は、CM、VM、患肢過成長を中核所見とし、低流速型脈管奇形と過成長が併存するという点で、PROS の臨床像を理解するのに重要な代表例である（Canaud et al. 2021）。

以上のように、脈管奇形の診断は、視診・触診所見と画像検査（US、MR を中心とする）に大きく依存しており、病理組織学的診断は出血リスクや創傷治癒遅延の懸念から必ずしも実施されるわけではない。したがって、画像所見の解釈が診断の要となる。脈管奇形の各病型は多様かつ互いに重複する表現型をもち、ときに鑑別に苦慮するが、非血管性腫瘍や嚢胞性病変など、類似所見を呈する“Mimicker”（注：本学位論文では、脈管奇形と臨床的・画像的に類似し鑑別を要する非血管性病変を“Mimicker”と呼称する）も存在し、鑑別診断は常に容易ではない。

診断の不一致の下で硬化療法が先行すると、治療無効に留まらず、炎症・癒着により後続治療（特に切除術）の難易度が上昇する。悪性腫瘍に対して脈管奇形の診断で治療介入を行った例も報告されており、腫瘍の増悪・播種など、腫瘍学的に不利益となる状況を招く可能性がある。本領域においては、より正確に診断を行うための方法の開発が喫緊の課題である。

近年、脈管奇形の分子病態の理解が進み、RAS/MAPK 経路 (*BRAF*、*KRAS*、*MAP2K1* など) や PI3K/AKT/mTOR 経路 (*PIK3CA*、*TEK* など) に関わる遺伝子の体細胞モザイクが病態形成に関与することが明らかとなった。遺伝子診断は病型分類の精緻化や重症度評価に資するだけでなく、さまざまな分子標的治療の適応判断や治療反応性の予測にもつながる。臨床診断を補完する客観的指標として、遺伝子診断の重要性が高まっている。NGS の実用化は、悪性腫瘍の領域における遺伝子診断の枠を超えて、先天奇形や非腫瘍性疾患における体細胞モザイクの同定へと応用範囲を拡大している。これを背景として、*PIK3CA* 遺伝子の体細胞活性化バリエーションを基盤とする疾患概念として、PROS が提唱され、脈管奇形と過成長を併存し得る病型の理解が進んだ。

一方で、遺伝子診断の標準法は病変組織を用いた解析である。しかし、深部病変や高流速型病変、あるいは小児症例では、侵襲性・安全性の観点から組織採取が困難な場合が少なくない。血液や尿などの体液由来の cfDNA を用いたりキッドバイオプシーは、悪性腫瘍の領域では診断あるいは治療効果判定においてすでに実用化されており、低侵襲に反復採取可能な検体からの遺伝子診断を可能にするが、脈管奇形では末梢血中の VAF が極めて低いため、高い感度と特異度が求められる。

脈管奇形の診療では、病型診断（血行動態と進展範囲の把握）に基づく治療選択が、その後の再燃や機能障害を含む長期転帰に直結する。画像診断はその基盤である一方、表現型の重複や “Mimicker” の存在により診断の不確実性が残る症例もある。したがって、画像診断の精度向上と、低侵襲に実施可能な遺伝学的補助診断の整備は、適切な治療戦略と長期転帰の改善に向けて重要である。

本学位論文は、脈管奇形診療における診断の不確実性を、(1) 画像診断における診断の不一致パターンの分析、(2) 低侵襲な分子診断としてのリキッドバイオプシーの実現性検証、という二つのアプローチで補完し実用可能な診断戦略を提示することを目的とする。

第1章では、脈管奇形として診断・治療された後に非血管性腫瘍と病理診断された症例を後ろ向きに解析し、診断の不一致を生みやすい臨床的・画像的背景、不適切な治療介入による影響、診断再評価の契機を整理する。

第2章では、UMI によるエラー補正を備えた ultra-deep targeted NGS を用いて、末梢血 cfDNA から脈管奇形関連遺伝子バリエーションの検出を試み、検出率、VAF 分布、未検出例の解釈、複数バリエーション検出例の位置付けなど、臨床運用上の論点を検討する。両章を通して、画像診断と分子診断を相補的に位置付け、正確な診断に基づいた適切な治療の実現に向けた基盤を構築する。

略語表

AKT	protein kinase B
AVM	arteriovenous malformation
BRBNS	blue rubber bleb nevus syndrome
CDS	coding sequence
CM	capillary malformation
CT	computed tomography
DNA	deoxyribonucleic acid
cfDNA	cell-free deoxyribonucleic acid
dbSNP	database of short genetic variations
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
ISSVA	International Society for the Study of Vascular Anomalies
KTS	Klippel–Trenaunay syndrome
LM	lymphatic malformation
MAPK	mitogen activated protein kinase
MR	magnetic resonance
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NGS	next-generation sequencing
PCR	polymerase chain reaction
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKS	Parkes Weber syndrome
PROS	<i>PIK3CA</i> -related overgrowth spectrum
RAS	rat sarcoma
STIR	short τ inversion recovery
TAE	transcatheter arterial embolization
UMI	unique molecular identifier
US	ultrasound
VAF	variant allele frequency
VM	venous malformation
VUS	variants of uncertain significance

脈管奇形の画像診断における
正確性に関する研究

緒言

脈管奇形は、先天的な血管・リンパ管の分化異常・過形成に由来し、皮膚・皮下組織・筋・骨など多様な部位に病変を形成する。臨床では、ISSVA 分類に基づき、AVM、CM、LM、VM、混合型などに分類される。

脈管奇形の診断は、主に臨床経過と視診・触診所見、画像検査によって行われる (Kunimoto et al. 2022; Serio et al. 2022)。しかし、これらの臨床症状には重複する部分があり、病型診断を複雑にしている (Pahl et al. 2018; Strübing et al. 2024)。特に US と MR は、血流動態（低流速型・高流速型）や病変内部構造の評価に有用であり、非侵襲的な一次評価として広く用いられている。重要な点として、病理組織学的診断は必ずしも行われない (Mulliken and Glowacki 1982)。その理由の一つとして、病変組織の採取は出血や創傷治癒遅延のリスクがあり、生検に伴う侵襲・合併症リスクに見合う臨床的利益が得られにくい場合がある。

脈管奇形の診断精度を高める上では、画像検査で病変の性状と血流動態の両面を系統的に評価することが重要である。US は簡便・非侵襲・即時性という利点から、最初に施行されることが多い。B モードとドップラー法を適切に使い分けることで、病変の大きさ、内部の性状（充実性か、嚢胞性か）、深さ（表在性か、深在性か）、周囲組織との位置関係に加え、血流の有無と方向、流速、拍動流の検出など、低流速型／高流速型の判定に直結する情報を得ることができ、診断の初期段階で得られる情報量が大きい。さらに US は診断に留まらず、脈管奇形に対する硬化療法における穿刺ガイドや硬化剤注入のモニタリングとしても有用であり、診断と治療のいずれにおいても必須の画像検査として位置付けられる。

一方、MR は多様な撮像法と優れた組織分解能により、脈管異常における必須検査として位置付けられる。病変の進展範囲や局在、周囲の重要構造（血管、神経など）との関係を詳細に評価でき、特に深部病変や広範囲病変の全体像把握に強みを有する。造影 MR は、血流動態や内部の血管成分に関する情報を付加でき、血管性病変では診断精度向上に寄与する。MR 血管造影も立体構造把握に有用であるが、微細血管の構築評価には限界があるため、必要に応じて三次元 CT 血管造影などを組み合わせる。脈管奇形では一般に T1 強調画像で低から中等度信号を、T2 強調画像で高信号を呈す。さらに造影剤を組み合わせることで内部構造と血管成分の詳細な評価が可能となる。

なお、CT は短時間で広範囲を撮像できる一方、脈管異常においては組織コントラストの点から第一選択とはなりにくいが、三次元 CT 血管造影は血管描出に優れており、AVM や VM における異常血管と周囲組織との位置関係を可視化でき、切除範囲や塞栓すべき血管の検討に資する。

また、血管造影は高流速病変の評価に有用であるが、近年は US や MR の発展により必要性は相対的に低下している。ただし、デジタル差分血管造影は AVM の診断および術前評価において価値が高く、ナイダスや流入動脈、流出静脈、シャント構造の同定など、治療戦略（塞栓術および切除術）に不可欠な情報を与える。以上の所見を踏まえ、US と MR を相補的に用いることが、脈管奇形の病型推定と治療方針決定の基盤となる（Mulligan et al. 2014; 佐々木 ほか. 2022）。が、実際には“Mimicker”が存在し、診断は常に容易ではない。実際に、脈管奇形と非血管性腫瘍を取り違えて診断したとする報告がしばしば見られる（Altuwaijri 2024; Armstrong et al. 2024; Lee et al. 2019; Liu et al. 2020; Ng Hung Shin et al. 2023; Olivieri et al. 2016; Torresetti et al. 2024; White et al. 2016）。診断の不一致の下に硬化療法や TAE などが先行すると、炎症・癒着により後に行われる切除術は困難化する。とりわけ、肉腫などの悪性腫瘍に対して不必要な治療が進むことは医原性の浸潤あるいは播種をきたし著しい不利益を生む。したがって、画像診断の限界を明確化し、「どのような状況で診断を再検討すべきか」を明らかにすることは、脈管奇形の診断アルゴリズムを改善する上で重要である。

“脈管奇形らしき”が臨床や画像で示唆されても、診断が一義的に定まらない理由として、(1) 脈管奇形自体が多様な病型から構成され、かつ、互いに臨床症状が重複し得ること、(2) 脈管奇形以外の軟部腫瘍・嚢胞性病変でも、出血や炎症、二次性変化により血管性病変に類似した所見を呈し得ること、が挙げられる。US は簡便で反復可能な一次評価として有用である一方、観察可能な深さや視野には限界があり、病変の深部進展や周囲の骨や空気の介在により病変全体像の把握が困難となる場合がある。さらに、ドップラーで血流信号を認めること自体は非特異的であり、腫瘍血管や炎症性変化を反映した所見、周辺血管の巻き込みなどによっても血流が観察され得るため、低流速か高流速の判定は血流の有無のみならず、血流波形、シャント所見、血管構築を含めて総合的に解釈する必要がある。MR は病変の局在と進展範囲を評価するうえで中心的役割を担うが、T2 強調画像における高信号や造影効果もまた脈管奇形にとって確定的な所見ではなく、嚢胞変性や粘液性成分、出血や壊死を伴う腫瘍性病変でも類似所見を呈し得る。したがって、臨床経過と整合しない画像所見が存在する場合、あるいは短期間の増大、疼痛の増悪、治療に対する反応不良など想定と乖離する状況下では、MR の追加シーケンスや三次元 CT 血管造影を用いた血管構築の再評価、必要に応じた生検、専門機関への紹介も考慮して診療を組み立てることが望ましい。

本章では、脈管奇形として診断・治療経過をたどった後に、最終的に非血管性腫瘍と確定した症例を解析し、(1) 診断の不一致が生じる臨床的・画像的背景、(2) 不適切な治療による不利益、(3) 画像診断が不確実となる要因を整理することで、画像診断の限界と診断の再検討が必要となる臨床状況を明らかにすることを目的とした。

方法

① 対象症例

2008 年 7 月から 2023 年 9 月に斗南病院形成外科において、脈管奇形の術前臨床診断で切除術を受けたすべての患者を病理部の台帳から検索した。該当した計 536 名 759 病変を対象として、術後診断が非血管性腫瘍に変更された 14 症例を抽出した。うち、術後診断が脈管奇形あるいは血管腫であった 745 病変は除外された（図 1-1）。

本研究は斗南病院倫理委員会の承認（承認番号 15-3-1）を得て、ヘルシンキ宣言に基づき実施した後ろ向き観察研究である。匿名化した診療情報を用い、研究情報を施設内掲示およびウェブサイトにて公開してオプトアウトによる拒否機会を確保したため、書面による同意取得は免除された。

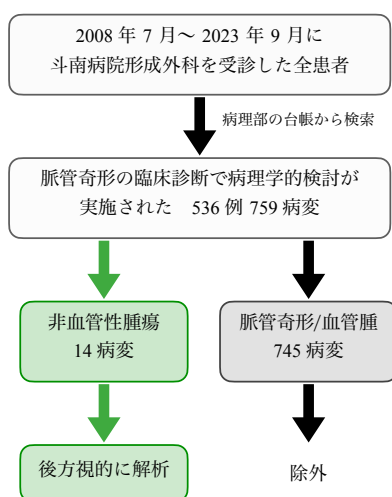


図 1-1. 対象症例抽出の流れ

② 評価項目の設定

診療録を後ろ向きに検討し、患者の初診時年齢、性別、病変の部位、術前臨床診断、切除術までの治療歴、臨床経過、画像検査所見（US および MR 所見を含む）、手術時年齢、術後病理診断、診断変更までに要した日数などのデータを収集した。

画像検査所見の主な項目は以下の通りである。ただし、未施行のシーケンスや該当しない項目は除外した。

- US 所見として、腫瘍のサイズ、深さ、嚢胞性・充実性、血流信号の有無および分布、周囲構造との連続性など
- MR 所見として、腫瘍のサイズ、深さ、T1 強調画像・T2 強調画像・short τ inversion recovery (STIR) 画像での信号強度および信号分布、ガドリニウム (Gd) 造影画像での造影パターン、周囲構造との連続性など

結果

① 患者背景

脈管奇形と診断され治療を受けた 14 例の患者が該当した。表 1-1 に 14 例の臨床的特徴を記載した。男性 3 名、女性 11 名、平均年齢は 41.9 ± 24.2 (標準偏差) 歳 (範囲 2–82 歳) であった。初期症状は、全例で腫瘍を認め、11 例で疼痛があった。病変の局在は下肢が 7 例、上肢が 5 例、頭部と体幹が各 1 例であった。

表 1-1. 脈管奇形の臨床診断と病理診断が不一致であった非血管性腫瘍 14 例

Case No.	初診時年齢	性別	病変の部位	初診時の診断	当院での画像検査	前医での検査	切除術までに行われた治療	最終的な病理組織学的診断	手術時年齢	診断変更までの日数
1	2	女	右 手、前腕	VM	US, MR, RI	なし	硬化療法 4回	神経鞘腫	7	1893
2	15	女	右 殿部	VM	US, MR, CT	なし	硬化療法 2回	神経鞘腫	18	1186
3	25	女	左 頭部	VM	US	MR, 部分生検	なし	神経鞘腫	25	37
4	39	女	右 上腕	VM	US, MR, 3D-CTA	MR, 針生検	硬化療法 1回、部分生検	神経鞘腫	41	788
5	52	女	右 前腕	VM	US, MR	なし	生検	神経鞘腫	52	55
6	31	女	右 下腿	VM	US, MR	MR	なし	神経鞘腫	32	343
7	35	女	右 大腿	LM	US, MR	CT	硬化療法 2回	表皮嚢腫	36	440
8	29	女	左 下腿	VM	US	MR	なし	表皮嚢腫	29	74
9	66	男	右 手	AVM	US, MR, 3D-CTA	US	なし	血管平滑筋腫	66	19
10	82	男	左 下腿	VM	US, MR, 3D-CTA	US	なし	血管平滑筋腫	82	75
11	50	女	右 足	VM	US, MR	CT	なし	軟部血管線維腫	50	14
12	13	女	右 母指	VM	US, MR	なし	なし	外傷性神経腫	14	33
13	78	女	右 下腿	VM	US, MR	MR	なし	骨外性粘液性軟骨肉腫	78	26
14	70	男	右 大腿	AVM	US, 3D-CTA, DSA	CT, MR	TAE 2回	孤立性線維性腫瘍	71	199

DSA: デジタル減分血管造影, RI: 核医学検査

② 施行された検査と術前臨床診断

全例で US と MR を含む画像検査が行われた。CT は 7 例で行われた。TAE 中のデジタル減分血管造影が 1 例で行われた。2 例で当院受診前に組織生検を受けていた。

US 所見による画像診断では、低流速型脈管奇形が 12 例、高流速型脈管奇形が 2 例であった。単純 MR は 2 例に、Gd 造影 MR は 12 例に施行された。このうち、2 例は造影の増強がなく、6 例は部分的な増強があり、4 例は著明な増強があった。臨床経過および上記の画像所見をもとに、VM 11 例、AVM 2 例、LM 1 例と診断されていた。その後、当院で 4 例に硬化療法を、2 例に部分切除生検を、1 例に TAE を施行していた。

③ 最終病理診断と診断変更に要した日数

切除術後に下された病理組織学的診断は、神経鞘腫が6例、表皮嚢腫および血管平滑筋腫が2例ずつ、軟部血管線維腫および外傷性神経腫が1例ずつであった。また、骨外性粘液性軟骨肉腫（悪性）および孤立性線維性腫瘍（中間悪性）が1例ずつ含まれていた。初診時の臨床診断から最終病理診断まで要した日数は、平均 370 ± 539 （標準偏差）日（範囲 14–1893 日）であった。

なお、脈管奇形ならびに“Mimicker”の頻度分布を把握する目的で、2011年3月から2023年9月の期間中に病理学的検討を行った症例のうち、脈管奇形あるいは代表的な腫瘍性病変の病理診断が得られた件数を図1-2に示す。

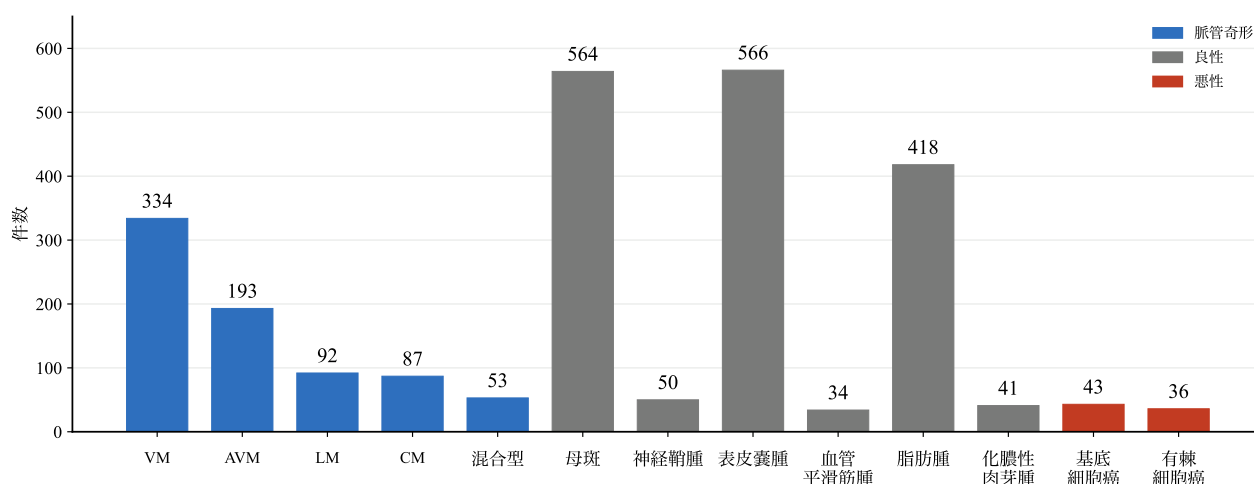


図1-2. 病理学的検討を行った症例で得られた病理診断ごとの件数分布

④ 代表症例

イ) Case 1

2歳女児。右手の腫脹を主訴に当科を紹介受診した。右手尺骨側に弾性軟の圧痛を伴わない腫瘍が右手から前腕に認められた(図1-3a)。USでは低エコー領域(図1-3b)と血流信号の低下(図1-3c)を認めた。MRではGd造影T1強調画像(図1-3d)で造影効果を示さない等信号性の腫瘍が、STIR画像(図1-3e,f)では右手から前腕に高信号性の腫瘍を認めた。VMと診断し、3%ポリドカノールを用いた硬化療法を4回実施した(図1-3g,h)。しかし病変は縮小せず初診から約5年後に切除術を行った(図1-3i)。病理組織学的診断は神経鞘腫であった。

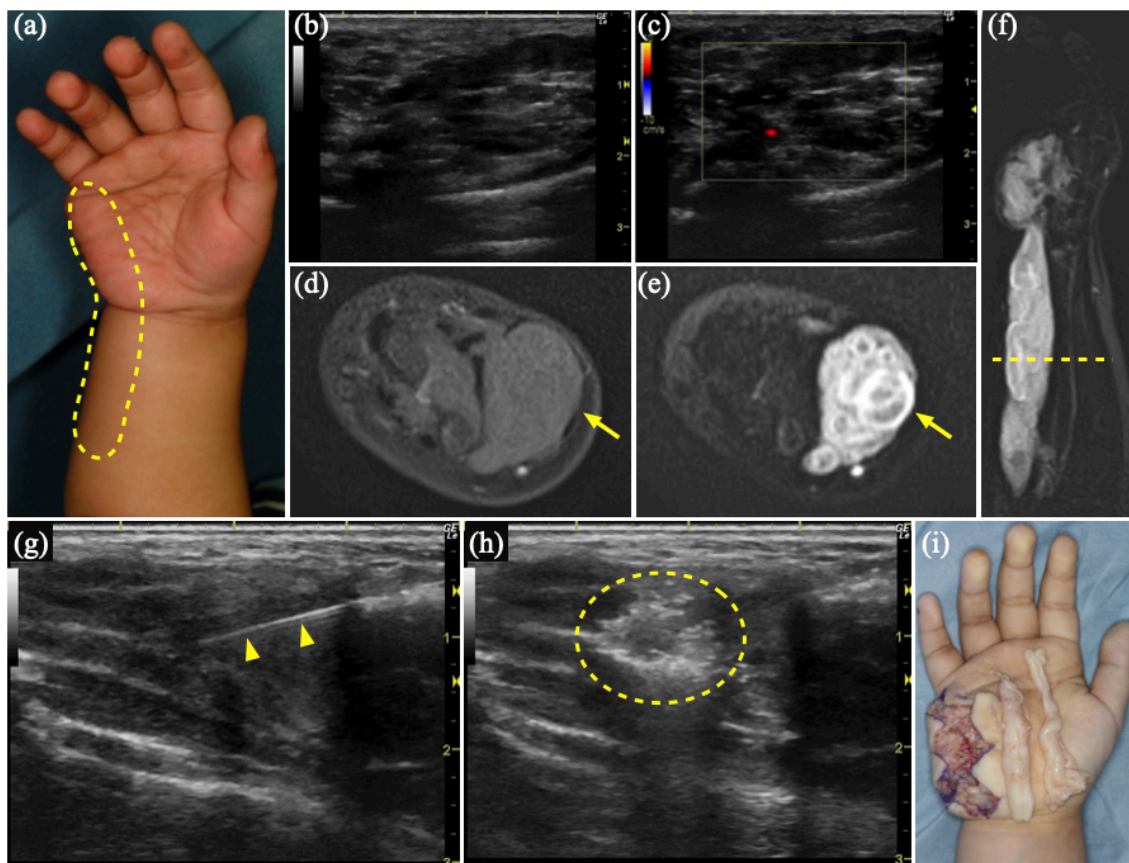


図1-3. VMと初期診断した神経鞘腫

(a) 右手の尺側から前腕に、弾性軟の圧痛を伴わない腫瘍を認める(破線円)。(b) BモードUSで低エコー領域を認める。(c) カラードップラーUSで病変内の血流信号は乏しい。(d) MRではGd造影T1強調画像で造影増強効果を伴わない等信号性の腫瘍を認める(矢印)。(e) STIR画像で高信号性の腫瘍を認める(矢印)。(f) 腫瘍は右手から前腕にかけて広がっている(破線はd,eの断面を示す)。(g) 3%ポリドカノールを用いたUSガイド下硬化療法における低エコー領域への針挿入を示す(矢頭)。(h) 薬剤注入後、高エコー領域が出現している(破線円)。(i) 切除術の術中写真では右手尺側に白色調の索状腫瘍を認める。

ロ) Case 2

15 歳女性。5 年前から自覚する右殿部の腫瘍を主訴に当科を紹介受診した。病歴聴取で、初診の 5 年前に右殿部を打撲したことが判明した。US では、プローブ圧迫下でも変形しない均一な低エコー領域を皮下に認めた (図 1-4a)。MR では STIR 画像で 5 cm の不規則な形状で均一な信号強度の腫瘍を認め (図 1-4b)、Gd 造影増強効果を伴っていた (図 1-4c)。右殿部の皮下に弾性硬の軽い圧痛を伴う腫瘍を触知した (図 1-4d)。血栓を伴った大殿筋に及ぶ VM と診断した。その後、無水エタノールを用いた硬化療法を 2 回実施した。硬化療法後、US では血流信号を認めない不明瞭な嚢胞が見られた (図 1-4e)。MR では STIR 画像で低信号性の腫瘍を認めた (図 1-4f,g)。しかし、持続的な圧痛を伴う病変が残存したため、初診時から約 3 年後に切除術を行った (図 1-4h)。病理組織学的診断は神経鞘腫であった。

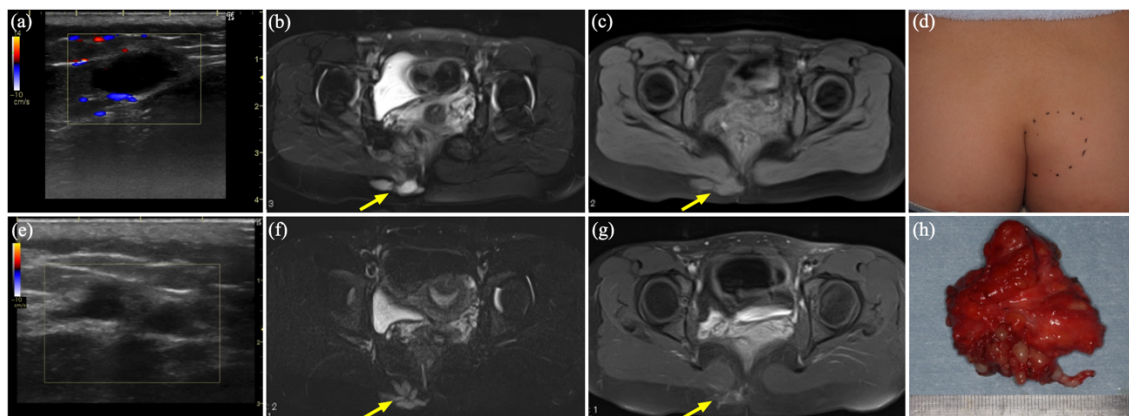


図 1-4. VM と初期診断した神経鞘腫

(a) カラードップラー US で周囲組織に多数の微細な血流信号を伴う低エコー領域を認める。(b) MR では STIR 画像で高信号の腫瘍を認める (矢印)。(c) Gd 造影 T1 強調画像で造影増強効果を示さない低信号の腫瘍を認める (矢印)。(d) 右臀部に弾性硬の有痛性腫瘍を認める (破線円)。(e) カラードップラー US で境界不明瞭な縮小した病変と、周囲組織の血流信号低下を認める。(f) MR では STIR 画像で縮小した腫瘍を認める (矢印)。(g) Gd 造影 T1 強調画像で造影増強効果を示さない縮小した低信号の腫瘍を認める (矢印)。(h) 切除術の術中写真では切除検体は 5×3.5 cm の大きさである。

ハ) Case 3

25 歳女性。5 年前から自覚する後頭部の無痛性皮下腫瘍を主訴に紹介受診した。前医で切開生検が行われ、VM と診断されていた。初診時、右後頭部に 30 mm の軟らかく隆起した腫瘍が触知された。MR では T2 強調画像で境界明瞭の低～等信号性の腫瘍を認め（図 1-5a）、Gd 造影 T1 強調画像で不均一な造影増強効果を示した（図 1-5b,c）。US では、低エコー領域が認められ、血流は乏しく、後方エコーは増強していた（図 1-5d）。VM の診断で切除術を行った。病理組織学的診断は神経鞘腫であった。摘出標本では腫瘍の表層側と深層側の両方で出血巣を認めた（図 1-5e）。前医による生検では出血巣と血管様構造の組織のみを採取したため、VM の初期診断につながった可能性がある。

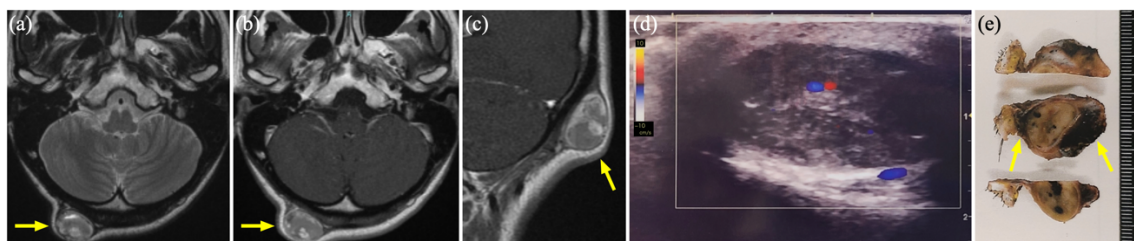


図 1-5. VM と初期診断した神経鞘腫

(a) MR では T2 強調画像で液面形成を伴う境界明瞭な腫瘍を認める（矢印）。
(b,c) Gd 造影 T1 強調画像で腫瘍は不均一な造影増強効果を示す（矢印）。(d) カラー Doppler US で血流信号が乏しく後方エコーが増強された低エコー性嚢胞を認める。(e) ホルマリン固定された切除標本：腫瘍の表層側と深層側の両方に出血巣を認める（矢印）。

二) Case 4

39 歳女性。9 年間から自覚する右上腕部の有痛性腫瘤を主訴に前医を受診した。前医で針生検が行われ、筋肉内 VM と診断されていた。硬化療法または切除術のため当科を紹介受診した。当科初診時、右上腕部に 6×5 cm の軟らかく隆起し圧痛を伴う腫瘤を触知した (図 1-6a)。B モード US では内部不均一な領域を認め、部分的に高流速の血流信号と後方エコー増強を呈していた (図 1-6b-d)。MR では STIR 画像で等信号～高信号を示す境界明瞭な腫瘤を認めた (図 1-6e)。Gd 造影 T1 強調画像で不均一な造影増強効果を示す部分が見られ、流出血管と推定した (図 1-6f)。これらの所見に基づき、筋肉内 VM と診断し、3% ポリドカノールを用いた硬化療法を 1 回施行した。しかし、その後に追加検査として実施した三次元 CT 血管造影では、流入・流出血管は確認できなかった (図 1-6g,h)。その後、病変が増大したため部分生検を施行したところ、血腫の病理所見であった。当科初診から 1 年後、切除術を行った。摘出した腫瘍は変性した嚢胞であり、4×3 cm の被膜に覆われ、骨膜を含む周囲組織と癒着していた (図 1-6i)。病理組織学的診断は変性した神経鞘腫であった。

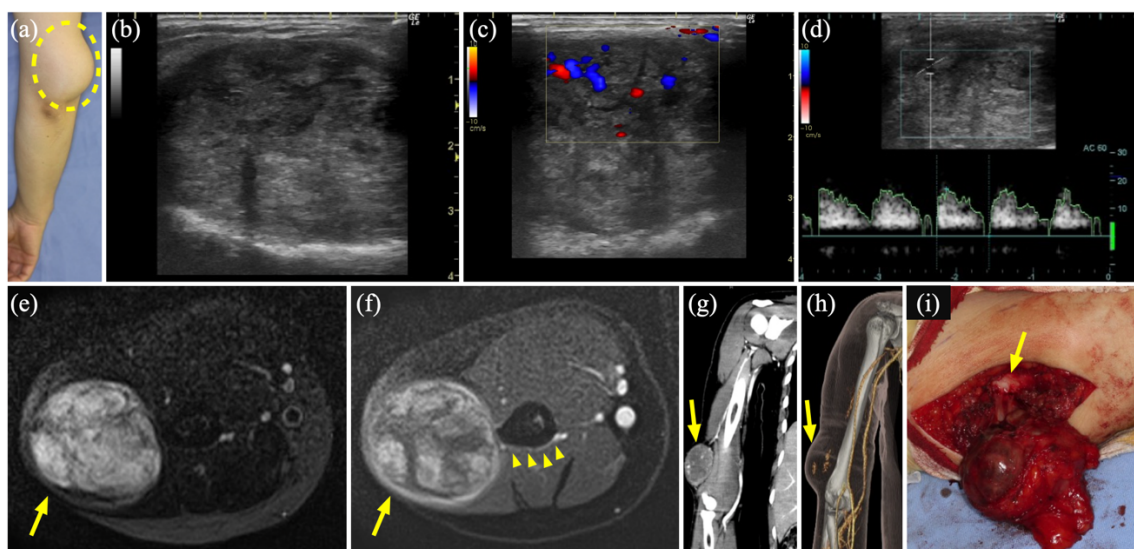


図 1-6. VM と初期診断した神経鞘腫

(a) 右上腕部に弾性軟の有痛性腫瘤を認める (破線円)。 (b) B モード US では内部不均一な領域が認められる。 (c) カラードップラー US では部分的に高流速の血流信号を認める。 (d) パルスドップラー US では流速波形が 18 cm/秒のピークを示す。 (e) MR では STIR 画像で等～高信号性の腫瘤を認める (矢印)。 (f) Gd 造影 T1 強調画像で不均一な腫瘍 (矢印) と流出血管 (矢頭) を認める。 (g) 造影 CT では不均一な腫瘍 (矢印) を認める。 (h) 三次元 CT 血管造影では明らかな流入・流出血管を認めない (矢印)。 (i) 切除術の術中写真では上腕骨上部の骨膜 (矢印) に癒着した 6.5×5.0×4.0 cm の病変を認める。

ホ) Case 7

35 歳女性。5 年前から自覚する右大腿部の有痛性腫瘤を主訴に当科を受診した（図 1-7a）。US では、不均一な低エコー性嚢胞を認め、血流信号やプローブ圧迫による変形はなかった（図 1-7b）。MR では、境界明瞭な拡張した管腔構造（5.6×1.4 cm）を認め、STIR 画像では高信号を示し、Gd 造影 T1 強調画像では造影効果はなかった（図 1-7c）。出血を伴う LM と診断し、無水エタノールを用いた硬化療法を 2 回施行した。しかし、病変が残存した（図 1-7d）ため切除術を行った。術中、腫瘍は深筋膜を含む周囲組織に癒着しており、硬化療法による炎症後変化と考えられた。病理組織学的診断は表皮嚢腫であった。

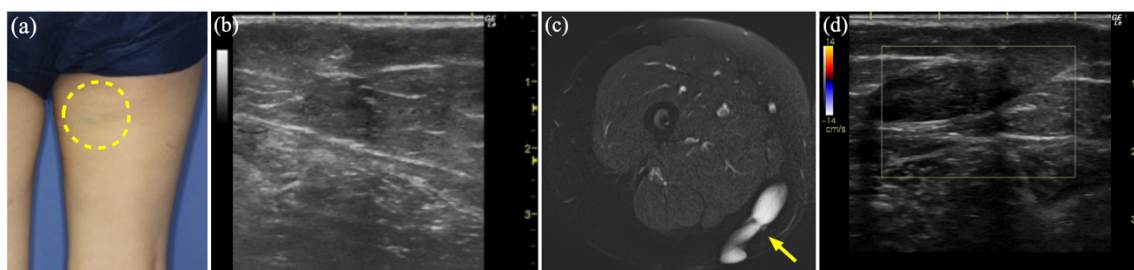


図 1-7. LM と初期診断した表皮嚢腫

(a) 右大腿部に 4×2 cm の有痛性腫瘤を認める（破線円）。(b) B モード US では後方エコーがわずかに増強された低エコー領域を認める。(c) MR では STIR 画像で境界明瞭な 5.6×1.4 cm の高信号性の管腔構造を認める（矢印）。(d) カラー Doppler US では血流信号を伴わない嚢胞の残存を認める。

へ) Case 9

66 歳男性。右環指基部の腫脹と指尖部の知覚消失を主訴に当科を受診した。第 4 中手骨部の掌側に弾性軟の無痛性腫瘤を認めた (図 1-8a)。US では、不均一な低エコー領域と比較的高流速の血流信号を認めた (図 1-8b)。MR では、T1 強調画像で低～等信号、STIR 画像で高信号、Gd 造影 T1 強調画像で不均一な造影増強効果を示した (図 1-8c)。一方、三次元 CT 血管造影では、病変の中心部から早期動脈相で造影効果を示す境界明瞭な病変を認めた (図 1-8d)。流入・流出血管は同定できなかった。AVM と診断し、限局性病変であったため切除術を行った (図 1-8e)。病理組織学的診断は血管平滑筋腫であった。

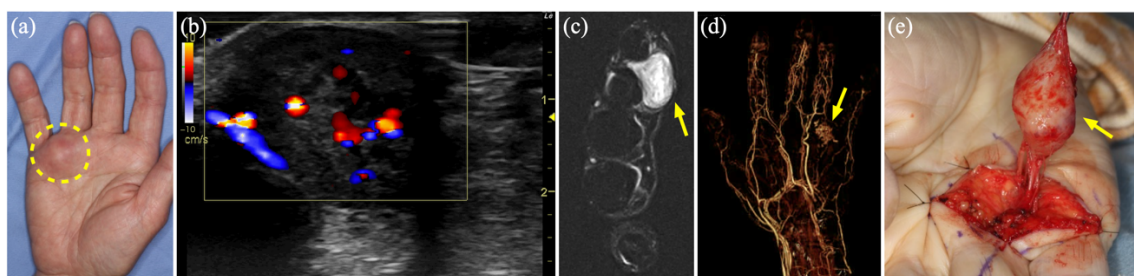


図 1-8. AVM と初期診断した血管平滑筋腫

(a) 右環指基部に 3×2.5 cm の無痛性腫瘤を認める (破線円)。 (b) カラー Doppler US では比較的血流信号の速い低エコー領域を認める。 (c) MR では STIR 画像で高信号性の腫瘤を認める (矢印)。 (d) 三次元 CT 血管造影では、病変の中心部から早期動脈相で造影効果を示す境界明瞭な病変を認める (矢印)。 (e) 切除術の術中写真では切除直前の腫瘍を認める (矢印)。

考察

① 脈管奇形の“Mimicker”となりやすい非血管性腫瘍

脈管奇形の誤診を報告した症例集積はほとんどない (Liu et al. 2020; Scorletti et al. 2018)。Liu らは、VM と診断された 11 例が spindle cell hemangiomatosis と判明した症例集積を報告しているが、専門家にとっても両者の鑑別は難しい (Liu et al. 2020)。また、Scorletti らは、VM と診断され治療を受けた 3 例が肉腫と最終診断されたと報告している (Scorletti et al. 2018)。

本研究の症例集積では、US で低流速型脈管奇形として解釈され得る血流所見を呈した腫瘍性病変が 14 例中 12 例と多数を占めた。どのような場合に「血管性病変らしさ」が高いと判断されるのかを検討した。

特に、神経鞘腫は病変内部の血流が豊富なことが多く (Tsai et al. 2008; Yang et al. 2017)、臨床的には「血管性病変らしさ」が高い。神経鞘腫は充実性腫瘍であることから血流を伴わないことが多いと理解されている場合があるが、必ずしも適切ではない。四肢では神経と血管はしばしば伴走するが、血管に隣接する腫瘍は神経鞘腫である可能性が高いと言える。腫瘍と末梢神経との連続を示唆する尾状 (tail-like) 所見や、神経由来腫瘍を示唆する標的様所見 (target sign) などの画像所見は鑑別に有用だが (Crist et al. 2017; Park et al. 2020)、日常診療では脈管奇形の枠組みで所見が解釈され、見落とされる可能性がある。Olivieri らは、VM と混同されがちな“Mimicker”として神経鞘腫を挙げているが (Olivieri et al. 2016)、神経鞘腫が出血を合併している場合は特に VM との診断が難しく、たとえ生検を行ったとしても診断の誤りに繋がりうる (Case 3 および 4)。

次に、表皮嚢腫は皮膚外科診療において圧倒的多数の症例を占める腫瘍性病変 (注：厳密には、腫瘍ではなく嚢胞である) であるため (Golden and Zide 2005)、取り違える症例 (Case 7 および 8) は必然的に多いと考えられる。White らは、LM と混同される可能性のある“Mimicker”として表皮嚢腫を報告している (White et al. 2016) が、特に開口部が不明瞭な場合や、嚢胞壁が破裂して不規則な形態を呈する場合や、炎症をきたして嚢胞周囲の血流が増加した場合 (Clarke et al. 2016) などは、「血管性病変らしさ」が高くなると考えられる。

また、血管平滑筋腫は血管平滑筋由来の有痛性の皮下腫瘍で、四肢に多く、カラードップラー US では一般的に豊富な血流信号を示すが（De Iruarizaga Gana et al. 2024）、約 60%で血流信号が検出されないという報告もあり（Zhang et al. 2016）、血流の多寡はバリエーションに富む。また、古賀らは、14 例中 3 例で石灰化を認めたとしており（Koga et al. 2023）、脈管奇形における静脈石との混同に注意が必要である（Trop et al. 1999）。

注意すべき点として、生検を行ったからと言って、脈管奇形の病理診断が必ずしも正しくなかった症例が複数存在した（Case 3 および 4）。Case 3 では、腫瘍の表層のみが採取された結果、出血巣と血管様構造に焦点が当てられ、VM の初期診断が誤って導かれた可能性がある。生検結果を過大評価してはならず、期待される治療効果が見られなかった場合や治療経過に問題がある場合には、診断を見直す必要がある。また、生検は十分量の組織を必要とし、経験豊富な専門医が行うべきである。

以上を踏まえ、脈管奇形と上記 3 つの鑑別点を表 1-2 にまとめた。

表 1-2. 脈管奇形と“Mimicker”の鑑別点

		脈管奇形			代表的な 'Mimicker'			
		VM	LM		AVM	神経鞘腫	表皮嚢腫	血管平滑筋腫
			大嚢胞性	微小嚢胞性				
臨床所見	皮膚色	青や紫	正常	黄や赤の小嚢胞	赤や紫	正常	正常	正常～褐色
	圧痛	場合による	場合による		場合による	+	－	+
	境界	明瞭～不明瞭	明瞭	不明瞭	明瞭～不明瞭	明瞭	明瞭	明瞭
	拍動	－	－		+	－	－	+
穿刺吸引		±	+	－	±	－	－	－
US	形態	多房性	嚢胞性	多房性	拡張・蛇行した血管	充実性	嚢胞性	充実性
	血流	低流速	血流なし		高流速	血流豊富	血流なし	血流豊富
	圧迫変形	+	－		－	－	－	－
MR	T1 強調画像	低～等信号	低信号		Flow void（無信号）	低信号	等信号	等信号
	T2 強調画像	高信号	高信号		Flow void（無信号）	中心部で等信号 辺縁で高信号	高信号	高信号
	Gd 造影	+	－		++	中心部で++ 辺縁で+	辺縁で+	++
その他		静脈石	出血や感染に伴う液面形成				DWI で ADC低値	

深部病変では皮膚色が正常のことがある。ADC: 見かけの拡散係数、DWI: 拡散強調画像

② 不適切な治療がもたらす患者への不利益

まず、本研究でも示した通り、硬化療法は非血管性腫瘍に対して治療効果はない（Case 1, 2, 4 および 7）。Case 1 では、診断変更までに約 5 年という長期間を要した。本邦の報告によると、脈管奇形では難治性と判断される症例が約 4 割を占め、治療が反復、長期化し得る（力久 ほか. 2013）。したがって、不適切な治療介入は侵襲の累積および治療期間の延長を通じて、患者に身体的あるいは精神的負担を増大させやすい。

さらに、非血管性腫瘍に対して硬化療法を誤って適用した場合、腫瘍は周囲組織と炎症を起こし、皮下組織、筋、骨と癒着し、その後の切除術が一層困難となる。実際に、本研究でも腫瘍が周囲の組織と癒着していたため本来は切除不要なはずの周囲組織を拡大切除せざるを得なかった（Case 1, 2 および 7）。さらに Case 4 では、腫瘍は上腕骨の骨膜に強く癒着しており切除自体が困難であった。もし、腫瘍に近接した重要血管や神経を犠牲にすることになれば、血流障害や知覚鈍麻、麻痺などの神経障害をもたらすことに繋がり、看過し得ない不利益を患者に強いることになる。

次に、悪性腫瘍に治療介入（硬化療法や TAE など）を誤って適用した場合、医原性に浸潤や転移を促進するリスクがある。Case 14 では、50 年来の石灰化を伴う拡大傾向の右大腿部腫瘤を AVM と診断し TAE を 2 回行ったが、切除（減量）術後の病理組織学的診断は孤立性線維性腫瘍（中間悪性）で、術後 3 カ月で腫瘍の急速な再増大と肺転移をきたして患者は死亡した（佐々木 ほか. 2022）。Scorletti らは、脈管奇形として治療を受けるも後に肉腫であったと判明した患者が 12 年間で 11 例あったと報告している（Scorletti et al. 2018）。ほか、中間悪性に分類される隆起性皮膚線維肉腫も AVM と取り違いやすい腫瘍の一つで、Torresetti らは、「血管腫」と診断され治療されたが約 30 年後に隆起性皮膚線維肉腫と判明した症例を報告している。以上のように、悪性腫瘍は多血性腫瘍を高い割合で含んでいることに注意が必要で、これを AVM と判断することは極めて重大な不利益を患者にもたらす。

③ 脈管奇形診療における不確実性と再評価の契機

脈管奇形診療において、画像診断が中心的な役割を果たしている一方で、病変の性状や血流の多寡がバリエーションに富んでいる点、病理組織学的診断は必ずしも実施されない点、誤った治療が炎症や癒着を招きその後の診断を一層困難としうる点など、診断プロセスに複数の不確実性が露呈した。

診断の再検討を促す契機として、以下のようなポイントが挙げられる。

- 非典型的 US 所見：明確な腔や嚢胞がない、充実性成分、境界明瞭、など
- 非典型的な血流所見：局在性の豊富な血流、プローブで圧迫変形しない、など
- 非典型的な臨床経過：放散痛、短期間での増大傾向、治療効果が乏しい、など

しかしながら、より確度の高い検査には、小児における鎮静下の造影 MR や血管造影検査、深部病変に対する全身麻酔下での部分切除生検など、高い侵襲性の検査を要求されることが一般的である。

④ 第 2 章に向けた小括

本章で示したように、脈管奇形の診断は臨床経過と視診・触診所見、US と MR の画像検査が主として行われるが、“Mimicker” が存在し、鑑別診断は常に容易ではない。今回提示した鑑別点を意識することは、診断の不一致を避けるための一助となる。しかしながら、血管腫・脈管奇形は専門性の高い分野であり、診断精度は医師や施設の知識と経験に大きく左右される。さらに、誤った治療によって患者が被る不利益はときに重大である。一方で、確定診断に資する検査は高い侵襲を伴うことが多く、診断精度と侵襲性の間には葛藤が存在する。

よって、低侵襲で実施可能な補助診断の枠組みを整備することが臨床上の課題と言える。第 2 章では、日常臨床の場で導入可能で、かつ、特異性の高い分子診断技術として、末梢血を用いた体細胞モザイクに由来するバリエーション検出の実現性を検討する計画とした。

リキッドバイオプシーによる
脈管奇形の遺伝子診断に関する研究

緒言

第1章では、脈管奇形の診断が画像所見を中心に行われる一方で、“Mimicker”の存在により診断の不確実性および治療方針の不適合リスクが生じ得ることを示した。こうした診断の不確実性を補完する手段として、分子病態に基づく遺伝子診断の臨床的意義が注目されている。近年、脈管奇形の分野においても、原因遺伝子の同定や分子レベルでの病態解明が進みつつある (Serio et al. 2022)。

近年の次世代シーケンス解析の進展により、脈管異常の多くで原因遺伝子が同定され、ISSVA 分類 (2018 年改訂版) では多数の疾患に原因遺伝子が付記されるに至った (ISSVA, 2018)。脈管異常に関与する遺伝子異常は、主として RAS/MAPK シグナル伝達経路と PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路のいずれかの活性化に集約され、これらはそれぞれ RASopathies、PIKopathies として整理される (Mansur and Radovanovic 2023)。このような病態理解の進展により、遺伝子診断は病型分類の精緻化に加えて、分子標的治療を含む治療戦略の合理化と個別化に関わる基盤情報としての重要性を増している (Al-Olabi et al. 2018; Couto et al. 2017; El Sissy et al. 2022)。

脈管奇形における遺伝子診断は、病型分類の精緻化にとどまらず、治療戦略の合理化と個別化に直結する臨床的意義を有する。すなわち、シグナル伝達経路の異常は病変の進行様式や治療反応性と関連し得るため、遺伝学的情報は治療選択の根拠となり得る。さらに近年、病態に即した薬物療法の導入が進みつつあり、従来は局所治療を反復せざるを得なかった難治例に対しても治療選択肢が拡大している。一方で、薬物療法には薬剤特有の有害事象が伴い得ることから、適応判断に加えて副作用モニタリングと長期管理の枠組みが重要となる (Canaud et al. 2023)。したがって、低侵襲に取得可能な分子情報は、治療選択・適応検討・有害事象リスクを踏まえた分子標的薬の適正使用を含む総合的な診療計画を支える基盤情報として期待できる。

脈管奇形の多くは先天性であるが、一部は *de novo* 発生する。原因として RAS/MAPK 経路あるいは PI3K/AKT/mTOR 経路に関わる遺伝子の体細胞モザイクが関与する (Stor et al. 2024)。すなわち、先天性病変の数%は生殖細胞系列の機能喪失型変異に二次的な体細胞モザイクが加わることで生じ、大多数は非生殖細胞集団での機能獲得型変異に起因するという枠組みが考えられている (Mansur and Radovanovic 2023)。体細胞モザイクによる表現型は、変異が生じるタイミングや遺伝子、活性化の進行速度など、さまざまな要因によって影響を受ける (Hoeger 2021)。

このような原因遺伝子が同定される以前、脈管奇形は臨床所見と画像診断をもとに病型診断がなされていた。例えば、四肢の過成長や肥大を伴う脈管奇形患者は画一的

に KTS と診断される傾向があるが、KTS は *PIK3CA* を原因遺伝子とする PROS の範疇に属する低流速型脈管奇形である一方、高流速型の AVM も同様の表現型を呈することがあり、*GNAQ* を原因遺伝子とする Sturge-Weber 症候群など PROS 以外の病型は見逃されがちである (Stor et al. 2024)。このように、遺伝学的知見の解明は補助診断や病型分類の精密化に資するのみならず (Canaud et al. 2021; Colmenero and Knöpfel 2021)、分子標的治療を含む治療選択の根拠ともなり得る (El Sissy et al. 2025; Mansur and Radovanovic 2023)。

実際に、mTOR 阻害剤であるシロリムス (ラパマイシン) は小児の難治性脈管異常に対する後ろ向き検討で臨床的改善と忍容性が報告され、以後の臨床研究へ展開した (Hammill et al. 2011)。PI3K α 阻害剤であるアルペリシブは、PROS に対する後ろ向き検討で病変体積の縮小を示す症例が報告され (Canaud et al. 2023)、さらに重症または生命予後に関わる合併症を有する PROS 患者で形態学および機能的改善が報告されている (Venot et al. 2018)。また、有効な治療法が不足している毛細血管静脈奇形において治療効果を認めた報告もある (Zerbib et al. 2024)。現在開発中の薬剤として、選択的 AKT 阻害剤ミランセルチブは AKT リン酸化と細胞増殖を抑制し、mTOR 阻害剤とは異なる作用点として経路遮断の選択肢になり得ることが示されている

(Ranieri et al. 2018)。さらに、アロステリック MAP2K1/MAP2K2 阻害剤トラメチニブが重症リンパ管病変に奏功したとする報告もある (Foster et al. 2020)。このように分子標的治療の選択肢が拡大する一方で、治療選択や中止判断を支える分子情報の取得はなお限定的である。

このうち、PROS の原因遺伝子である *PIK3CA* は PI3K の触媒サブユニットである p110 α をコードし、その体細胞活性化バリエーションは PI3K シグナルを恒常的に亢進させる。下流では AKT や mTOR を介して細胞増殖や代謝が制御され、血管形成あるいは組織増殖の異常として表現型に反映される。とくに *PIK3CA* のヘリカルドメインに位置する E542 や E545、キナーゼドメインに位置する H1047 に集積するホットスポットバリエーションは、乳癌など多数の悪性腫瘍でも高頻度に観察されることが知られており、悪性腫瘍の領域で蓄積された遺伝子パネルや解析資源が、体細胞モザイク疾患の遺伝子解析にも応用され得るという背景がある (Canaud et al. 2021)。加えて、悪性腫瘍では分子標的薬の適応決定に際して遺伝子変異を検出するコンパニオン診断が整備され、血液検体による検査が偽陰性となり得ることを前提に、リキッドバイオプシーで陰性の場合には腫瘍組織で再検する運用が明記されている (Narayan et al. 2021)。この実例は、低侵襲な検体による分子診断が臨床的に有用である一方、陰性結果の解釈と次の検査方針を含めた診断戦略が重要であることを示している。

AVMにおいては、RAS/MAPK 経路に属する遺伝子の体細胞モザイクが高頻度で同定されつつある。新鮮凍結検体を用いたパネル解析では、病的なバリエーションが約 8 割に認められ、主として *MAP2K1* および *KRAS* に集中し、*BRAF* や *RASAI* は比較的少数であった (El Sissy et al. 2022)。さらに、*KRAS* バリエーションが広範例や重症例、再燃を伴いやすい病型と関連し、*MAP2K1* バリエーションが比較的限局した病変と関連するなど、臨床像との相関も示されている。また、*MAP2K1* バリエーションが頭蓋外 AVM の原因遺伝子の一つであること、バリエーションアレルが病変内（とくに血管内皮細胞）に偏在することが報告されており (Couto et al. 2017)、体細胞モザイクとしての理解は、組織検体の重要性とともに、リキッドバイオプシーでの検出が困難となり得る理由を説明する上でも重要である。

一方で、遺伝子バリエーション検出の標準法は病変組織（新鮮凍結検体、あるいは、FFPE 検体）であるものの (Serio et al. 2022)、脈管奇形では出血や創傷治癒遅延のリスクなどから組織生検の障壁が高く、診断過程で必ずしも行われない (Mulliken and Glowacki 1982)。また、深部病変や高流速型の脈管奇形では、侵襲性と安全性の観点から検体採取は一層困難を増し、組織検体を用いた遺伝学的診断を一律に適用することは現実的でない。この臨床上の制約が、低侵襲に反復採取可能な検体を用いた分子診断法の必要性を生む。

また、体細胞モザイクの検出は、検体の種類と解析感度に強く依存する。PROS では末梢血や唾液での検出が困難であることが指摘されてきたが、FFPE 検体を用いた解析では、ターゲットパネルを用いた超深度シーケンスにより低頻度モザイクが検出可能であることが示されている。当教室の前回研究では、KTS の FFPE 検体を用いて、*PIK3CA* の全コーディング配列を対象としたターゲットシーケンスにより平均 10 万倍以上のカバレッジが得られ、85.7% (12/14) で *PIK3CA* バリエーションが同定された。さらに、陽性対照 DNA を用いた検証により低アレル頻度領域の検出能が示された (Sasaki et al. 2023)。

このように、脈管奇形における遺伝子診断は臨床的意義が大きい一方、標準法である組織検体は安全性や侵襲性の制約を受けやすく、代替手段の確立が課題となる。そこで注目されるのが、体液由来の cfDNA を用いたリキッドバイオプシーである。悪性腫瘍の領域では cfDNA を用いた診断や治療効果判定が実用化されている (Corcoran and Chabner 2018) が、脈管奇形への応用には特有の課題があり先行研究は数少ない

(El Sissy et al. 2025; Michel et al. 2018; Palmieri et al. 2020; Palmieri et al. 2021a; Palmieri et al. 2021b; Serio et al. 2022; Zenner et al. 2021)。すなわち、(i) 体細胞モザイクに由来するバリエーションの VAF が超低値となりやすいこと、(ii) cfDNA 収量が限定的で入力分子数が制約されること、(iii) 超低 VAF 領域ではシーケンスエラー由来の偽陽性を厳

密に抑制する必要があること、が脈管奇形におけるリキッドバイオプシーの主要な課題となる。病変由来 cfDNA の放出量は病変サイズや炎症、血栓などの病態に左右され、循環血中では造血細胞等のベース cfDNA が優位であるため相対的希釈が生じる。したがって、末梢血 cfDNA から脈管奇形関連バリエントを同定するには、深いシーケンス深度と偽陽性抑制を前提とした高感度かつ高特異度の解析系が求められる (El Sissy et al. 2022; Serio et al. 2022)。そこで本章では、UMI によるエラー補正を備えた ultra-deep targeted NGS を用いて、末梢血 cfDNA から脈管奇形関連遺伝子バリエントを検出し、低侵襲な分子診断法としての実現性を検討することを目的とした。

方法

① 第2章での対象疾患選定

本章では、第1章で得られた知見をもとに、臨床的に鑑別困難となりうる脈管奇形および遺伝子診断を行う意義の大きさを考慮し、以下の通りに解析対象を設定した。

VMは、第1章で最多の症例数を占めていること、脈管奇形の中で頻度が最も高いこと（Loose 2007）、遺伝子診断に関する先行研究が少なく新規性の高いデータが期待できることから、解析対象に含めることは非常に意義深いと判断した。

AVMは、第1章で該当した症例数は決して多くはなかったものの、多血性腫瘍との鑑別が課題であり、すなわち悪性腫瘍を見逃す危険性を孕んでいる。治療の遅れが生死を左右する症例があり、不適切な治療介入がもたらす不利益の重大性を考慮すると、客観的補助診断の必要性は極めて高く、解析対象に含めた。

PROSは、脈管奇形における遺伝子診断の中心的存在であり、*PIK3CA* 体細胞モザイクに関する先行研究が豊富であること、さらに病変組織を用いた当教室の前回研究（Sasaki et al. 2023）があることから、本章で得られるバリエーションの妥当性を比較評価する目的でも、解析対象と設定した。

一方で、LMは上記3つと比較すると相対的に典型的な所見が得られやすく、診断は比較的容易なことも多い。予算と人的資源には制約があり、シーケンス可能数には限りがあるため、今回はLMを解析対象外とした。

② 患者登録および検体収集

AVM、PROS、VM と診断した 40 例を、北海道大学病院および斗南病院の 2 施設において 2024 年 1 月～2024 年 10 月の期間中、前向きに登録し、遺伝カウンセリングを行った。遺伝子解析に関する十分な説明を行い同意が得られた患者のみが登録され、文書同意を患者またはその保護者から全例で取得した。

本研究は北海道大学病院（承認番号 23-0001）および斗南病院（承認番号 016-0314）の倫理審査委員会の承認を受けて行い、倫理性が確保された研究を遂行するためにヘルシンキ宣言に基づいて行った。

40 例中、38 例は肘窩静脈から末梢血を採取した。2 例（VM-18、VM-19）では US ガイド下硬化療法の際に嚢胞内血液を採取した。

全例とも脈管奇形の専門家により診断され、US と MR を含む画像検査を受けた。14 例は切除術が行われ病理組織学的診断が確認された。このうち 3 例（PROS-3、PROS-4、PROS-5）では、当教室の前回研究にて FFPE を用いた *PIK3CA* 全コーディング領域の targeted NGS の結果を報告済みである（Sasaki et al. 2023）。

診療録を参照し、性別、脈管奇形の病型、検体採取日と採取時年齢、病変部位、臨床写真、画像所見などを収集した。登録した 40 例を ISSVA 分類（2018 年改訂版）に基づき病型分類し（ISSVA, 2018）、内訳は AVM 11 例、PROS 9 例、VM 20 例であった。性別は、男性 16 例、女性 24 例で、検体採取時年齢の平均値は 39.6 歳（範囲 2–77 歳）で、17 歳以下の小児は 6 例（15%）が含まれた。

③ 血液検体からの血漿回収

採取された全血 10 mL は、Cell-Free DNA BCT® CE 採血管（Streck, La Vista, NE, USA）に回収し、採血直後に採血管を 8–10 回転倒混和して攪拌し、室温 15–25 °C で静置した。採血後 14 日以内に遠心分離を行い、血漿分画を回収した。血漿調製は、300 ×g、室温、20 分の条件で遠心分離後、上清（血漿）を新しいチューブに分注した。続いて、上清を新しいチューブに移し、5,000×g、室温、10 分の条件で遠心分離を追加し、上清（血漿）のみを cfDNA 抽出に用いた。血漿調製後は凍結保存せず、速やかに cfDNA 抽出に供した。

④ cfDNA の抽出

cfDNA の抽出は、QIAasympy® DSP Circulating DNA Kit（QIAGEN, Hilden, Germany, Cat. No. 937556）で実施した。各検体につき血漿 4.0 mL を入力とし（circDNA_4000 に相当）、溶出量を 60 µL と設定して、自動抽出により cfDNA を精製した。一部で血漿 4.0 mL に満たなかった検体は、リン酸緩衝生理食塩水を 0.5–1.0 mL 追加して計 4.0 mL に調整した。

⑤ cfDNA の定量および品質評価

抽出した cfDNA の濃度は、Qubit 3.0 Fluorometer（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて定量し、Qubit dsDNA HS Assay（Cat. No. Q32854）を用いた。cfDNA 抽出後の品質評価として、断片長分布は TapeStation（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）にて評価し、High Sensitivity D1000 ScreenTape®（Agilent Technologies）を用いて電気泳動解析を計 14 回の解析ロットで実施した。

⑥ 解析系の対照設定

本研究では、解析系の感度・特異度およびコンタミネーションの有無を評価するため、陰性・陽性対照 deoxyribonucleic acid (DNA) を設け、検体と同一の工程で並行処理した。陰性対照として、GM24385 細胞株由来ゲノム DNA（野生型 DNA）を用いた。陽性対照として、既知バリエーション DNA である Sereq ctDNA Mutation Mix v2, AF 0.5%（SeraCare, LGC Clinical Diagnostics, Milford, MA, USA）を用いた。さらに、Mutation Mix v2 に含まれないバリエーション（*MAP2K1* c.167A>C、*MAP2K1* c.171G>T、*TEK* c.2740C>T）については、当該バリエーション配列をコードする合成 DNA（人工遺伝子）を GM24385 にスパイクインしたものを陽性対照として用いた。

⑦ Ultra-deep targeted NGS

5 遺伝子 (*BRAF*、*KRAS*、*MAP2K1*、*PIK3CA*、*TEK*) の頻出バリエーション領域をターゲットとするカスタムパネル (Ion AmpliSeq™ HD Made-to-Order Panel: IAH251015_388) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。本パネルは 24 アンプリコンから構成され、Ion AmpliSeq™ Designer (Thermo Fisher Scientific) を用いて、後述する文献検索を通して選定した下記のターゲット領域 (Chen et al. 2024; El Sissy et al. 2025; Limaye et al. 2015; Serio et al. 2022; Zenner et al. 2021) を 100% カバーした (表 2-1)。Ion AmpliSeq™ Designerは、複数のアンプリコンに跨がるターゲット領域をカバーする複数の PCR プライマーを設計し、その周囲配列を含むよう自動設計するツールである。

- *BRAF* (p.V600E)
- *KRAS* (p.G12D、p.G12C、p.G12V)
- *MAP2K1* (p.Q56P、p.K57N)
- *PIK3CA* (p.I143V、p.C420R、p.E542K、p.E545D、p.E545K、p.H1047R、p.H1047L)
- *TEK* (p.L914F)

表 2-1. カスタムパネルを構成する 24 のアンプリコン

遺伝子	RefSeq ^a	染色体番号	アンプリコン名	開始	終了	塩基対
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	Chr 3	AMPH7174447172	178917513	178917589	77
			AMPH7174447522	178917452	178917524	73
			AMPH7174447450	178917579	178917645	67
			AMPH7171244830	178927933	178927995	63
			AMPH7171261590	178927991	178928062	72
			AMPH7171261966	178928048	178928102	55
			AMPH7171261662	178936021	178936091	71
			AMPH7174447084	178936080	178936128	49
			AMPH7171405274	178951999	178952074	76
			AMPH7174447158	178952064	178952135	72
<i>BRAF</i>	NM_004333.6	Chr 7	AMPH7174893185	140453065	140453135	71
			AMPH7171262344	140453130	140453205	76
<i>TEK</i>	NM_000459.5	Chr 9	AMPH7171741298	27212693	27212739	47
			AMPH7171741696	27212724	27212805	82
			AMPH7176496870	27212804	27212887	84
			AMPH7176496880	27212852	27212931	80
<i>KRAS</i>	NM_004985.5	Chr 12	AMPH7174132883	25398185	25398255	71
			AMPH7174390459	25398234	25398309	76
			AMPH7174132880	25398300	25398369	70
<i>MAP2K1</i>	NM_002755.4	Chr 15	AMPH7174428663	66727319	66727395	77
			AMPH7174244018	66727377	66727456	80
			AMPH7174247277	66727455	66727535	81
			AMPH7174248701	66727534	66727618	85

^a アメリカ国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の 分子配列データベースにおける識別番号

以下の過程は、委託機関の理研ジェネシス（東京、日本）にて実施した（図 2-1）。

ライブラリ調製は、Ion AmpliSeq™ HD Library Kit および Ion AmpliSeq™ HD Dual Barcode Kit 1-24（いずれも Thermo Fisher Scientific）を用いて実施した。ターゲット増幅に用いた入力 cfDNA 量は収量に応じて設定し、各検体で投入可能な最大量（上限 100 ng）を用いた。つづいて、増幅産物のプライマー配列の部分的分解、バーコード配列を付加するプライマーでライブラリ DNA を PCR で増幅し、MagMAX™ Pure Bind Beads（Thermo Fisher Scientific）を用いて精製した。

テンプレート調製は、Ion Chef™ System、Ion 540 Kit–Chef、Ion 540 Chip Kit（いずれも Thermo Fisher Scientific）を用いた。エマルジョン PCR によりライブラリ DNA をビーズ（Ion Sphere Particle）上でクローナルに増幅し、テンプレートビーズを回収した後、シーケンシング反応を Ion S5 XL system（Thermo Fisher Scientific）にて実施した。

ライブラリの濃度測定および品質評価は定量 PCR により実施した。使用機器は ABI7500FastDx（Thermo Fisher Scientific）、使用試薬は Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit を用いた。得られた最終ライブラリは、モル濃度換算のうえ等モル比でプールした。

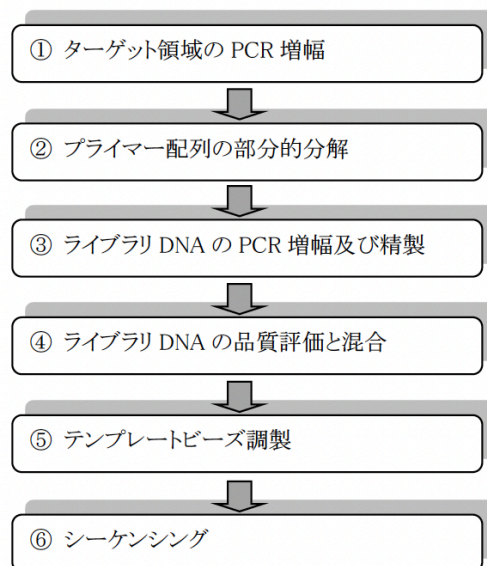


図 2-1. DNA シーケンシングの流れ

⑧ バイオインフォマティクス解析

バイオインフォマティクス解析は、Torrent Suite ソフトウェア (Ver. 5.18.1; Thermo Fisher Scientific) の Torrent Mapping Alignment Program を用いた。参照配列は human genome build 19 (UCSC Genome Browser) を用いた。バリエーション検出には Ion Reporter ソフトウェア (Ver. 5.18.2; Thermo Fisher Scientific) を用いた。工程は “AmpliSeq HD for Liquid Biopsy - w2.5 - DNA - Single” (ver. 5.18, revision 0) を使用し、Target Regions は IAH251015_388_Designed、Hotspot Regions は IAH251015_388_hotspot を指定した。パラメータは以下の通りに設定した。

- Downsample To Coverage: 20,000
- SNP/MNP/INDEL Min Allele Freq: 0.05%
- SNP/MNP Min Variant Score: 6
- INDEL Min Variant Score: 10

⑨ 文献検索

PubMed で以下のキーワードを用いて系統的に先行研究の文献検索を行い (検索日: 2025 年 2 月 10 日)、脈管奇形における体細胞モザイクの既報を整理した。

- Arteriovenous malformation (AVM)
- *BRAF*
- *KRAS*
- Klippel–Trenaunay syndrome (KTS)
- *MAP2K1*
- *PIK3CA*
- *PIK3CA*-related overgrowth Spectrum (PROS)
- *TEK* あるいは *TIE2*
- Vascular malformation
- Venous malformation (VM)

採用基準は以下の通りである。

- 末梢脈管奇形
- 原著論文および 2 例以上の患者コホート

除外基準は以下の通りである。

- 中枢神経脈管奇形 (例えば、脳動静脈奇形)
- 病型の表現型や記述が明確でない
- 遺伝子検査の結果が明記されていない

結果

① cfDNA 収量

Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で定量した cfDNA 収量は、中央値 43.26 ng (範囲 10.5–283.2 ng) であり、全例で 10 ng 以上が得られた (図 2-2)。TapeStation (Agilent Technologies) による断片長分布解析では、主ピークの中央値 193 bp (範囲 176–231 bp) で、単一ヌクレオソーム由来断片に相当するピークであることを確認した。

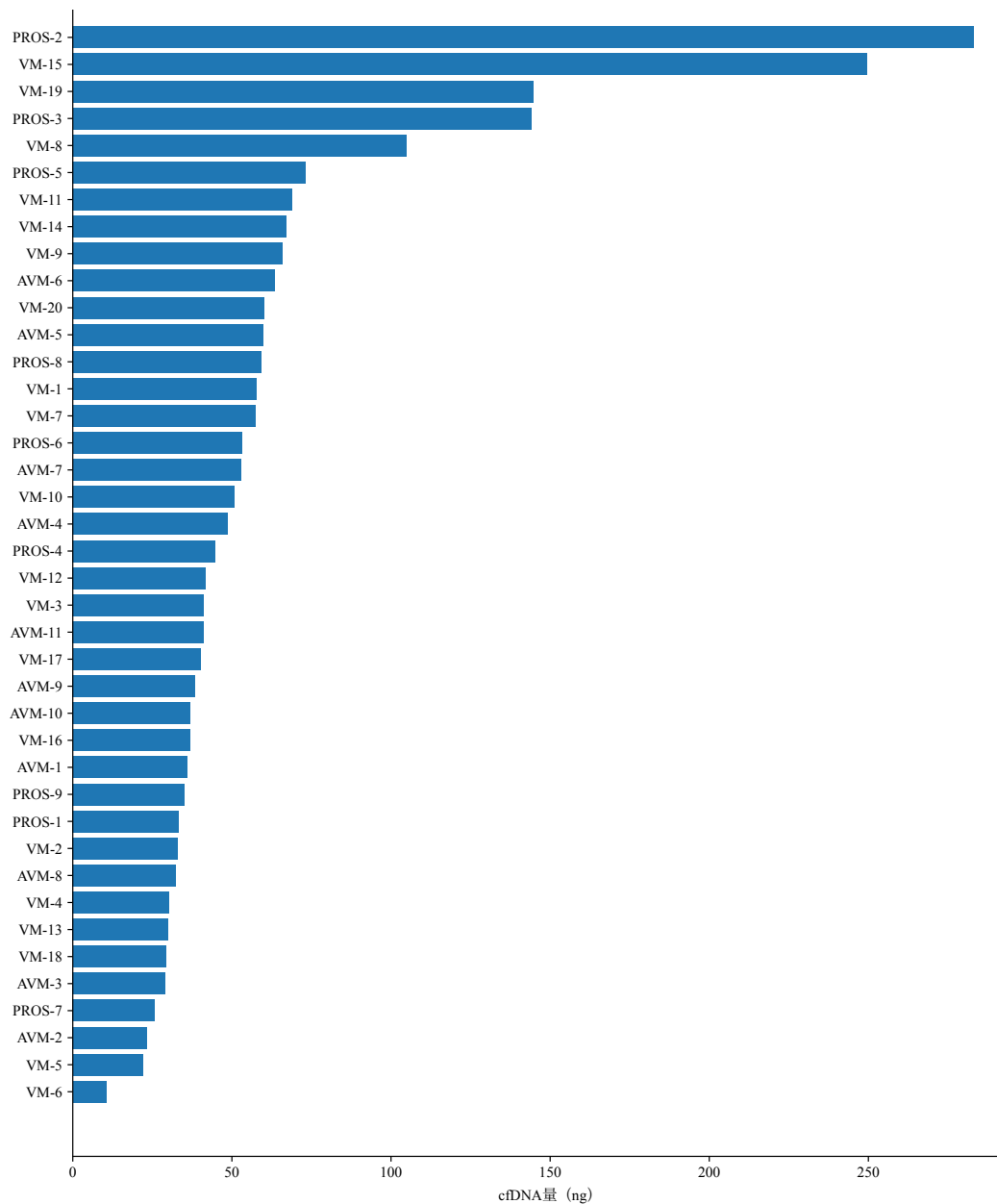


図 2-2. cfDNA 収量

② 入力 cfDNA 量およびライブラリ濃度

Ion AmpliSeq™ HD (Thermo Fisher Scientific) を用いたターゲット増幅に入力した cfDNA 量は、中央値 24.8 ng (範囲 3.5–100.0 ng) であった。また、定量 PCR で評価したライブラリの濃度は、中央値 36.9 pM (範囲 1.3–690.6 pM) であった (表 2-2)。

表 2-2. 入力 cfDNA 量およびライブラリ濃度

ID	入力 cfDNA 量 (ng)	ライブラリ濃度 (pM)
AVM-1	24.1	60.7
AVM-2	12.4	101.5
AVM-3	18.5	47
AVM-4	25.4	18.7
AVM-5	31.3	26.2
AVM-6	39.2	21.7
AVM-7	22.1	23.1
AVM-8	19.9	7.5
AVM-9	20.5	131.4
AVM-10	24.3	1.3
AVM-11	25.3	129.5
PROS-1	19.3	109.4
PROS-2	100	690.6
PROS-3	76.1	88.1
PROS-4	22.9	28.5
PROS-5	38.8	9.7
PROS-6	29.4	13
PROS-7	13.7	50.8
PROS-8	33.1	220.2
PROS-9	18.4	6.6
VM-1	7.9	7.1
VM-2	33.2	57.7
VM-3	27.8	44
VM-4	19.2	88.9
VM-5	11.7	45.7
VM-6	3.5	7.8
VM-7	27.6	46.5
VM-8	56.9	85.2
VM-9	33.2	57.7
VM-10	27.8	44
VM-11	34.5	41.1
VM-12	29.1	14.5
VM-13	11.6	15.7
VM-14	26.6	32.6
VM-15	100	166.6
VM-16	14.2	6
VM-17	20.4	6.3
VM-18	15.2	7.4
VM-19	21	19.5
VM-20	33.3	1.5

③ 検出されたバリエーション一覧

末梢血 cfDNA を用いた ultra-deep targeted NGS により、アンプリコン平均カバレッジは 104,000×（範囲 28,000–153,000×）を達成した。40 例中 23 例（57.5%）で合計 44 バリエーションを同定した。VAF は中央値 0.11%（範囲 0.05%–1.88%）であり、0.1%未満の超低 VAF バリエーションが 38.6%（17/44）を占めた。なお、PROS の一部症例では、病変組織（FFPE 検体）を用いた当教室の前回研究（Sasaki et al. 2023）と同一のバリエーションが本研究の末梢血 cfDNA から検出され、超低 VAF 領域での検出結果の妥当性を支持した。バリエーションが検出されなかった 17 例（42.5%）については、カスタムパネルでカバーされない領域・遺伝子にバリエーションが存在した可能性が考えられる。

なお、陽性対照とした Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 では、15 のシーケンスサンプルのうち 14 において予想された VAF でバリエーションが検出された（各遺伝子について、 $n=3$ ）。検出できなかった 1 サンプルについては、確率的に PCR プライマー増幅が失敗した可能性がある。陰性対照ではバリエーションは検出されなかった。以下、本研究で検出されたバリエーションに関して、遺伝子名、コーディング配列（CDS）変化、アミノ酸変化、VAF を病型ごとに整理する。

イ) AVM

AVM 11 例のうち 6 例で計 10 バリエントを検出した（表 2-3）。Parkes Weber 症候群（PKS）の 1 例（AVM-2）では *BRAF* のホットスポットバリエント（p.V600E）を検出し、*MAP2K1* の非ホットスポットバリエント（p.A95T）および *PIK3CA* バリエント（p.P447S）を併存した。別の 1 例（AVM-11）では *KRAS* のホットスポットバリエント（p.G12D）を検出し、2 つの *TEK* バリエント（p.A933T および p.A905V）を併存した。さらに、*TEK* バリエント（p.A901T、p.A905V、p.R918H）や *PIK3CA* バリエント（p.P447S）が複数例で検出された。AVM における VAF は 0.08%–1.88% であり、0.1% 前後の超低 VAF バリエントも含まれた。

表 2-3. AVM 患者の臨床的特徴と検出されたバリエントのまとめ

患者 ID	年齢	性別	診断	部位	cfDNA 量 (ng)	遺伝子	CDS 変化	アミノ酸変化	VAF
AVM-1	52	女	AVM ^a	頸部、上肢、胸部	20.7	<i>TEK</i>	c.2701G>A	p.A901T	0.10%
AVM-2	57	女	PKS ^a	上肢	11.4	<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.V600E	1.88%
						<i>MAP2K1</i>	c.283G>A	p.A95T	0.14%
						<i>PIK3CA</i>	c.1339C>T	p.P447S	0.11%
AVM-3	30	女	AVM ^a	指	17.2	<i>PIK3CA</i>	c.1339C>T	p.P447S	0.14%
AVM-4	18	女	AVM	顎	24.1		バリエント検出なし		
AVM-5	46	女	AVM	大腿	29.7	<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.11%
AVM-6	58	女	AVM	手	36.7		バリエント検出なし		
AVM-7	77	男	AVM ^a	胸部	21.0		バリエント検出なし		
AVM-8	21	男	AVM ^a	頭部	18.3		バリエント検出なし		
AVM-9	22	女	AVM	下腿	18.3	<i>TEK</i>	c.2753G>A	p.R918H	0.20%
AVM-10	53	女	PKS	下肢	20.9		バリエント検出なし		
AVM-11	63	女	AVM	頸部、胸部	22.5	<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.G12D	0.31%
						<i>TEK</i>	c.2797G>A	p.A933T	0.11%
						<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.08%

^a 病理組織学的診断が確認された。

ロ) PROS

PROS 9 例のうち 7 例で計 15 バリエントを検出した (表 2-4)。*PIK3CA* のヘリカルドメインに位置するホットスポットバリエント (p.E542K、p.E545K、p.Q546R) が複数例で同定され、PROS の分子病態と整合する所見であった。加えて、*PIK3CA* の新規バリエント候補 (フレームシフトバリエントや終止バリエントを含む: p.P124fs、p.W446*、p.P447S など) も検出された。*PIK3CA* 以外では、*MAP2K1* (p.A95T、splice acceptor バリエント)、*TEK* (p.A929V、p.T922M)、*BRAF* (p.Q612*) などのバリエントが一部症例で併存した。PROSにおける VAF は 0.06%–1.54% であり、*PIK3CA* ホットスポットバリエントを含めて超低 VAF 領域のバリエントが多くを占めた。なお、病変組織 (FFPE 検体) を用いた当教室の前回研究 (Sasaki et al. 2023) と比較して、PROS-3 および PROS-4 では同一バリエントを末梢血 cfDNA でも検出した一方、PROS-5 では末梢血 cfDNA では検出されなかった。

表 2-4. PROS 患者の臨床的特徴と検出されたバリエントのまとめ

患者 ID	年齢	性別	診断	部位	cfDNA 量 (ng)	遺伝子	CDS 変化	アミノ酸変化	VAF	FFPE 検体の VAF
PROS-1	9	男	KTS*	下肢	16.6	<i>PIK3CA</i>	c.1633G>A	p.E545K	0.34%	該当なし
						<i>MAP2K1</i>	c.283G>A	p.A95T	0.20%	
PROS-2	62	女	KTS*	下肢	217.2	<i>PIK3CA</i>	c.1633G>A	p.E545K	0.19%	該当なし
						<i>MAP2K1</i>	c.283G>A	p.A95T	0.06%	
PROS-3	65	女	KTS*	下肢	66.7	<i>PIK3CA</i>	c.1624G>A	p.E542K	0.64%	p.E542K/10.9%
						<i>PIK3CA</i>	c.1339C>T	p.P447S	0.09%	
						<i>TEK</i>	c.2786C>T	p.A929V	0.07%	
						<i>MAP2K1</i>	Splice acceptor site		0.09%	
PROS-4	36	女	KTS*	下肢	20.3	<i>PIK3CA</i>	c.1637A>G	p.Q546R	0.33%	p.Q546R/3.9%
PROS-5	46	男	KTS*	下肢	33.4	バリエント検出なし				p.C420R/1.6%
PROS-6	42	男	KTS	上肢、体幹	27.9	バリエント検出なし				該当なし
PROS-7	20	男	CM with overgrowth	下肢	12.2	<i>PIK3CA</i>	c.371_372insT	p.P124fs	0.14%	該当なし
PROS-8	60	男	KTS	下肢	30.4	<i>PIK3CA</i>	c.1633G>A	p.E545K	0.17%	該当なし
						<i>PIK3CA</i>	c.1338G>A	p.W446*	0.07%	
						<i>TEK</i>	c.2765C>T	p.T922M	0.09%	
						<i>BRAF</i>	c.1834C>T	p.Q612*	0.08%	
PROS-9	6	男	KTS	下肢、体幹	16.4	<i>PIK3CA</i>	c.1637A>G	p.Q546R	1.54%	該当なし

* 病理組織学的診断が確認された。

ハ) VM

VM 20 例のうち 10 例で計 19 バリエントを検出した（表 2-5）。*TEK* バリエントは 9 例で計 12 バリエントと比較的多く、既報の頻出バリエント部位に位置するバリエント（例：p.L914F、p.R915C、p.R918H）に加えて、新規バリエント候補（p.A905V、p.T922M、p.S938fs、p.A949V）も含まれた。複合バリエントとして、*TEK* の二重バリエントを 3 例で認め、また *TEK* バリエントと *PIK3CA* バリエントの併存を複数例で認めた。blue rubber bleb nevus syndrome（BRBNS）の 3 例では、2 例で *TEK* バリエントに加えて他遺伝子のバリエント併存がみられた。さらに、1 例（VM-15）では *TEK*（p.A905V）、*PIK3CA*（p.P447S）、*MAP2K1*（p.G80D）、*KRAS*（p.G15D）からなる多重の複合バリエントを認めた。VM における VAF は 0.05%–1.52% であり、0.1% 前後の超低 VAF バリエントが多数含まれた。

表 2-5. VM 患者の臨床的特徴と検出されたバリエントのまとめ

患者 ID	年齢	性別	診断	部位	cfDNA 量 (ng)	遺伝子	CDS 変化	アミノ酸変化	VAF
VM-1	41	女	BRBNS ^a	口腔内、下肢、腹部、殿部	7.7	<i>TEK</i>	c.2753G>A	p.R918H	0.25%
						<i>PIK3CA</i>	c.3075_3076insT	p.L1026fs	0.05%
VM-2	24	女	VM	頬部、頸部、咽頭	16.0		バリエント検出なし		
VM-3	74	女	VM	頭部、顔面、口腔内	18.9		バリエント検出なし		
VM-4	24	女	VM	足	17.1	<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.06%
						<i>PIK3CA</i>	c.1338G>A	p.W446*	0.08%
VM-5	19	男	VM	下腿	10.8		バリエント検出なし		
VM-6	44	女	BRBNS	上肢、背部	3.1		バリエント検出なし		
VM-7	53	男	VM	頭部、顔面、喉頭、頸部、胸部	23.8	<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.10%
VM-8	76	女	VM	頭部、顔面、頸部	53.1	<i>PIK3CA</i>	c.1339C>T	p.P447S	0.08%
VM-9	17	男	VM ^a	下腿、足	31.0	<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.17%
						<i>TEK</i>	c.2765C>T	p.T922M	0.17%
VM-10	21	男	VM	喉頭、舌、下口唇、大腿	26.4	<i>TEK</i>	c.2743C>T	p.R915C	1.52%
						<i>TEK</i>	c.2739_2740delCCinsTT	p.L914F	0.08%
VM-11	22	女	BRBNS ^a	口腔内、頸部、手、大腿、膝、足、外陰部、殿部	31.6	<i>TEK</i>	c.2812delT	p.S938fs	0.11%
						<i>MAP2K1</i>	c.100C>T	p.Q34*	0.09%
VM-12	13	男	VM	大腿	26.3	<i>TEK</i>	c.2846C>T	p.A949V	0.14%
						<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.12%
VM-13	64	女	VM	顎、頸部	11.0		バリエント検出なし		
VM-14	66	女	VM	上肢	25.6		バリエント検出なし		
VM-15	61	男	VM	頸部、咽頭	108.9	<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.07%
						<i>PIK3CA</i>	c.1339C>T	p.P447S	0.06%
						<i>MAP2K1</i>	c.239G>A	p.G80D	0.14%
						<i>KRAS</i>	c.44G>A	p.G15D	0.09%
VM-16	23	女	VM ^a	前腕	13.3		バリエント検出なし		
VM-17	57	女	VM	肩	18.1		バリエント検出なし		
VM-18	2	男	VM	頬部	13.1		バリエント検出なし		
VM-19	33	男	VM	上肢	20.6		バリエント検出なし		
VM-20	7	女	VM	下腿	28.7	<i>TEK</i>	c.2714C>T	p.A905V	0.29%

^a 病理組織学的診断が確認された。

④ 既報バリエーションの整理と本研究結果の位置づけ

脈管奇形における体細胞モザイクに関して先行研究の系統的検索より、5 遺伝子 (*BRAF*、*KRAS*、*MAP2K1*、*PIK3CA*、*TEK*) について病型ごとにまとめた (表 2-6, 7, 8, 9, 10)。

イ) AVM

AVM における体細胞 *MAP2K1* バリエーションは、これまでに 10 報で計 13 種類が報告されており (Al-Olabi et al. 2018; Couto et al. 2017; El Sissy et al. 2022; El Sissy et al. 2025; Goss et al. 2019; Hernandez et al. 2023; Konczyk et al. 2020; Li et al. 2023; Serio et al. 2022; Zenner et al. 2021)、検出率は 32.3% (226 例中 73 例) であった。報告頻度の高いバリエーションとして、p.Q56P (18/75、24%) および p.K57N (41/75、54.7%) が挙げられ、これらはタンパク質の negative regulatory domain 内または隣接領域に位置するとされる (Couto et al. 2017)。また、キナーゼドメイン内には複数の非ホットスポットバリエーションが同定されている (表 2-6)。AVM における *KRAS* バリエーションについては、これまでに 11 報で計 12 種類の体細胞バリエーションが報告されており (Al-Olabi et al. 2018; Diociaiuti et al. 2022; El Sissy et al. 2022; El Sissy et al. 2025; Goss et al. 2019; Hernandez et al. 2023; Palmieri et al. 2020; San Basilio et al. 2025; Serio et al. 2022; Sudduth et al. 2020; Ten Broek et al. 2019)、検出率は 21.3% (296 例中 63 例) であった。頻度の高いバリエーションとして、P-loop に位置する p.G12D (26/66、39.4%) および switch-II domain に位置する p.Q61H (16/66、24.2%) が報告されている (表 2-7) (Pantsar 2020)。*BRAF* に関しては、p.V600E のみが報告されている (表 2-8) (Al-Olabi et al. 2018; El Sissy et al. 2022; Hernandez et al. 2023; Zenner et al. 2021)。一方で、*TEK* および *PIK3CA* バリエーションは少数報告にとどまる (El Sissy et al. 2022; Hernandez et al. 2023; Ye et al. 2011)。なお、毛細血管奇形-動静脈奇形などの遺伝性 AVM が存在する一方で、PKS を含む多くの AVM は散発例である。本研究においても、家族内発症を示唆する症例は認めなかった。

ロ) PROS

PROS における *PIK3CA* 体細胞バリエントは、これまでに 44 報で計 81 種類が報告されており、検出率は 65.5% (1,428 例中 935 例) であった (Blackburn et al. 2020; Brouillard et al. 2021; Chang et al. 2017; Chen et al. 2021; Chen et al. 2024; Davis et al. 2019; Diociaiuti et al. 2022; Garde et al. 2021; Gökpınar et al. 2022; Hori et al. 2022; Huchtagowder et al. 2016; Keppler-Noreuil et al. 2014; Kim et al. 2022; Kuentz et al. 2017; Kurek et al. 2012; Lalonde et al. 2019; Le Cras et al. 2020; Leiter et al. 2017; Li et al. 2022; Li et al. 2023; Lindhurst et al. 2012; Loconte et al. 2015; Luks et al. 2015; Maclellan et al. 2014; Michel et al. 2018; Mirzaa et al. 2016; Mussa et al. 2023; Nozawa et al. 2022; Osborn et al. 2015; Palmieri et al. 2021b; Park et al. 2020; Piacitelli et al. 2018; Quindipan et al. 2021; Rios et al. 2013; Sasaki et al. 2023; Serio et al. 2022; Siegel et al. 2018; Tian et al. 2020; Tian et al. 2022; Triana et al. 2023; Wu et al. 2018; Xue et al. 2023; Yeung et al. 2017; Zhang et al. 2023)。PROS で報告される *PIK3CA* の体細胞活性化バリエントには、ヘリカルドメインの p.E542K (112/937、12.0%) および p.E545K (107/937、11.4%)、キナーゼドメインの p.H1047L (47/937、5.0%) および p.H1047R (205/937、21.9%) の 4 つのホットスポットバリエントが中心である (Brouillard et al. 2021; Canaud et al. 2021; Keppler-Noreuil et al. 2014)。さらに、linker region および C2 membrane 領域には、30 種類を超える非ホットスポットバリエントが同定されている (表 2-9)。 *PIK3CA* バリエントの機能ドメイン別の分布に着目すると、congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevi, scoliosis/skeletal and spinal 症候群および KTS は主としてホットスポットバリエント、または強い中等度の活性化バリエントにより生じるとされる (Brouillard et al. 2021)。一方で、megalencephaly-CM は、より活性化の程度が低い別系統のバリエントセットにより主として生じ、バリエントスペクトラムはより広範であることが示されている (Mirzaa et al. 2016)。PROS における *PIK3CA* バリエントプロファイルは癌における *PIK3CA* バリエントの分布と類似しており、ホットスポットバリエントが高度の肥大と関連し得る一方、より軽度の肥大は稀な非ホットスポットバリエントと関連する可能性が示唆されている (Sasaki et al. 2023)。なお、*PIK3CA* 以外の遺伝子バリエントについての報告は限られている (表 2-6, 7, 8, 10) (Chen et al. 2024; Diociaiuti et al. 2022; Hori et al. 2022; Kim et al. 2022; Siegel et al. 2018)。

ハ) VM

VMにおける *TEK* 体細胞バリエーションは、これまでに 19 報で計 45 種類が報告されており、検出率は 46.4% (571 例中 265 例) であった (Castel et al. 2016; Castillo et al. 2016; Diociaiuti et al. 2022; Du et al. 2021; Goines et al. 2018; Hirose et al. 2024; Li et al. 2023; Limaye et al. 2009; Limaye et al. 2015; Martinez-Glez et al. 2021; Nozawa et al. 2022; Paolacci et al. 2020; Soblet et al. 2013; Soblet et al. 2017; Sudduth et al. 2021; Ten Broek et al. 2019; Ye et al. 2011; Zenner et al. 2021; Zhang et al. 2023)。また、VMにおける *PIK3CA* 体細胞バリエーションは 11 報で計 19 種類が報告されており、検出率は 22.3% (377 例中 84 例) であった (Castel et al. 2016; Castillo et al. 2016; Goines et al. 2018; Hirose et al. 2024; Li et al. 2023; Limaye et al. 2015; Martinez-Glez et al. 2021; Nozawa et al. 2022; Paolacci et al. 2020; Serio et al. 2022; Ten Broek et al. 2019)。 *TEK* バリエーションのうち最も頻度の高いバリエーション部位は、N 末端キナーゼドメインに位置する p.L914 であり (163/330、44.9%)、次いで p.Y897 (48/330、14.5%)、p.R915 (28/330、8.5%)、p.R918 (27/330、8.2%) が報告されている (表 2-10)。さらに、19 報に含まれる *TEK* 関連 VM を集計すると、19.7% (330 例中 65 例) が二重 *TEK* バリエーションを有していた。二重バリエーションの組合せとしては、p.Y897 と p.R918 の組合せが最も頻度が高い (Du et al. 2021)。一方、*PIK3CA* バリエーションの最頻部位は p.H1047 (84 例中 32 例、38.1%) であり、次いで p.E542 (19/84、22.6%)、p.E545 (16/84、19.0%) が報告されている (表 2-9)。 *TEK* バリエーション単独、*PIK3CA* バリエーション単独、および *TEK* バリエーションと *PIK3CA* バリエーションの併存について、検出率はそれぞれ 41.3%–43%、11.4%–26.7%、1.3%–1.75% と報告されており (Du et al. 2021; Hirose et al. 2024)、これらは本研究で得られた検出率 (それぞれ 45%、20%、15%) と概ね整合していた。さらに、*TEK* バリエーション陽性の VM は、*TEK/PIK3CA* 陰性の VM と比較して若年発症が多いと報告されている (Hirose et al. 2024)。なお、*TEK* および *PIK3CA* 以外の遺伝子バリエーションについての報告は少数に限られている (表 2-6, 7, 8) (Castel et al. 2016; Ten Broek et al. 2019)。familial cutaneomucosal venous malformation など遺伝性 VM も存在するが、BRBNS を含む多くの VM は散発性である。本研究においても、家族内発症を示唆する症例は認めなかった。

表 2-6. 脈管奇形における *MAP2K1* バリエントの分布

				ERK-binding domain (AA1-32)	LR	Negative regulatory domain (AA44-51)	LR (AA52-67)	Kinase domain (AA68-361)	C-terminal tail (AA362-393)
Patients with AVM	Cohort (n)	Patients with <i>MAP2K1</i> variants	Detected <i>MAP2K1</i> variants ^a	N29S	Q34*		F53L F53_Q58delinsL Q56P K57N Q58_E62del D67Y	G80D A95T P105_A106del P105_I107delinsL V117A C121S P124L G210R S218P	
Al-Olabi L, et al, 2018	25	4	4				1 2 1		
Couto JA, et al, 2017	25	16	17				1 4 9 2 1		
El Sissy FN, et al, 2022	23	7	8				1 5		
El Sissy FN, et al, 2025	55	10	11				2 4		
Goss JA, et al, 2019	6	4	4				2 1	1	
Hernandez PV, et al, 2023	54	12	12				5 7		
Konczyk DJ, et al, 2020	3	3	3				3		
Li D, et al, 2023	12	7	7				3 3	1	
Serio VB, et al, 2022	15	2	2				2		
Zenner K, et al, 2021	8	7	7				1 6		
Our cohort	11 (2 ^b)	1	1					1	
Total	237	73	76				1 1 18 41 4 1	1 1 1 1 2 2 1 1	

Patients with VM	Cohort (n)	Patients with <i>MAP2K1</i> variants	Detected <i>MAP2K1</i> variants ^a	N29S	Q34*		F53L F53_Q58delinsL Q56P K57N Q58_E62del D67Y	G80D A95T P105_A106del P105_I107delinsL V117A C121S P124L G210R S218P	
Castel P, et al, 2016	32	1	1				1		
Our cohort	20 (3 ^c)	2	2		1			1	
Total	52	3	3		1		1	1	

Patients with PROS	Cohort (n)	Patients with <i>MAP2K1</i> variants	Detected <i>MAP2K1</i> variants ^a	N29S	Q34*		F53L F53_Q58delinsL Q56P K57N Q58_E62del D67Y	G80D A95T P105_A106del P105_I107delinsL V117A C121S P124L G210R S218P	
Chen H, et al, 2024	82	1	1	1					
Siegel DH, et al, 2018	57	1	1				1		
Our cohort	9	3	3 ^d					2	
Total	148	5	2	1			1	2	

LR, linker region; **Bold** is a novel variant found in the present study; ^a Sum of the numbers shown in the columns to the right; ^b Including patients with PKS; ^c Including patients with BRBNS

表 2-7. 脈管奇形における *KRAS* バリエントの分布

				N-terminal tail	P-loop (AA10-14)								LR	Switch I domain (AA30-40)	Inter-switch region	Switch II domain (AA58-72)	LR	Hypervariable region (AA167-188)		
Patients with AVM	Cohort (n)	Patients with KRAS variants	Detected KRAS variants ^a	K5E	G12A	G12R	G12D	G12C	G12S	G12V	G13R	G13D	G15D	Q22R	Q22K	D33G		Q61H	A146T	
Al-Olabi L, et al, 2018	25	4	4				1	1		1								1		
Diociaiuti A, et al, 2022	2 (2 ^b)	1	1															1		
El Sissy FN, et al, 2022	23	6	6				1	1										4		
El Sissy FN, et al, 2025	55	7	7				1	3	1							1		1		
Goss JA, et al, 2019	6	2	4	1			2						1							
Hernandez PV, et al, 2023	54	9	9				3	1	1	1			1					2		
Palmieri M, et al, 2020	5	5	5				3			2										
San Basilio M, et al, 2025	60	16	16				9				2							5		
Serio VB, et al, 2022	15	9	9				4			3								2		
Sudduth CL, et al, 2020	2	2	3									1	1		1					
Ten Broek RW, et al, 2019	49	2	2					2												
Our cohort	11 (2 ^b)	1	1				1													
Total	307	64	67	1	1	27	6	1	7	3	1		2	1		1		16		

Patients with VM	Cohort (<i>n</i>)	Patients with <i>KRAS</i> variants	Detected <i>KRAS</i> variants ^a	K5E	G12A	G12R	G12D	G12C	G12S	G12V	G13R	G13D	G15D	Q22R	Q22K	D33G			Q61H	A146T	
Serio VB, et al, 2022	13	1	1			1															
Ten Broek RW, et al, 2019	MD	3	3		1				1											1	
Our cohort	20 (3 ^c)	1	1										1								
Total	33	5	5		1	1			1			1								1	

Patients with PROS	Cohort (n)	Patients with <i>KRAS</i> variants	Detected <i>KRAS</i> variants ^a	K5E	P-loop (AA10-14)							Switch I domain (AA30-40)			Q61H	A146T	
					G12A	G12R	G12D	G12C	G12S	G12V	G13R	G13D	G15D				
Chen H, et al, 2024 ¹¹	82	1	1				1										
Diociaiuti A, et al, 2022 ²⁴	34	1	1						1								
Kim YM, et al, 2022 ⁴⁰	15	2	2			2											
Siegel DH, et al, 2018 ⁶¹	57	2	2		1	1											
Total	188	6	6		1	3	1	1									

LR, linker region; MD, missing data; **Bold** is a novel variant found in the present study; ^a Sum of the numbers shown in the columns to the right; ^b Including patients with PKS; ^c Including patients with BRBNS.

表 2-8. 脈管奇形における *BRAF* バリエントの分布

				Conserved region 1				Conserved region 2		Conserved region 3	
				N-terminal tail	Ras-binding domain (AA155–227)	Cysteine rich domain (AA234–280)	LR	Serine/threonine rich domain (AA360–375)	LR	Kinase domain (AA457–717)	C-terminal tail
Patients with AVM	Cohort (n)	Patients with <i>BRAF</i> variants	Detected <i>BRAF</i> variants ^a							V600E Q612*	
	Al-Olabi L, et al, 2018	25	1	1						1	
	El Sissy FN, et al, 2022	23	2	2						2	
	Hernandez PV, et al, 2023	54	4	4						4	
	Zenner K, et al, 2021	8	1	1						1	
	Our cohort	11 (2 ^b)	1	1						1	
Total		121	9	9						9	

	Cohort (n)	Patients with <i>BRAF</i> variants	Detected <i>BRAF</i> variants ^a										
Patients with PROS											V600E Q612*		
Siegel DH, et al, 2018	57	1	1								1		
Our cohort	9	1	1								1		
Total	68	2	2								1	1	

LR, linker region; **Bold** is a novel variant found in the present study; ^a Sum of the numbers shown in the columns to the right; ^b Including patients with PKS.

表 2-9. 脈管奇形における *PIK3CA* バリエントの分布

[illegible]

g, immunoglobulin; LR, linker region; **MD**, missing data; ^a Sum of the numbers shown in the columns to the right; ^b Including patients with BRBNS; ^c Including two splice variants c.2936 + 5G > A and c.2666 + 1G > T.

表 2-10. 脈管奇形における *TEK* バリエアントの分布[illegible]

^aImmunoglobulin; LR, linker region; MD, missing data; **Bold** is a novel variant found in the present study; ^bSum of the numbers shown in the columns to the right; ^cIncluding patients with BRNS; ^dIncluding patients with PKS; ^eSum of the numbers shown in the columns to the left side variant.

考察

① 脈管奇形における遺伝子検査戦略

脈管奇形の分子病態には、RAS/MAPK 経路あるいは PI3K/AKT/mTOR 経路に関連する体細胞モザイクが関与するという枠組みが広く共有されつつある (Stor et al. 2024)。これらの知見は、(1) 病型分類の精密化、(2) 分子標的治療を含む治療選択の裏付け、(3) 画像診断で鑑別困難な症例に対する補助診断、という観点で臨床的意義を持つ。前述の通り、先天性病変の一部では生殖細胞系列の機能喪失型変異に二次的な体細胞モザイクが加わる一方、大多数は非生殖細胞集団での機能獲得型変異に起因するという枠組みも提示されている (Mansur and Radovanovic 2023)。

一方で、バリエント検出の標準法は病変組織 (新鮮凍結、あるいは FFPE) であるものの (Serio et al. 2022)、脈管奇形では出血や創傷治癒遅延のリスクなどから組織生検の障壁が高く、診断過程で必ずしも行われない (Mulliken and Glowacki 1982)。よって、臨床では、必要十分な診断精度を、許容可能な侵襲で、再検可能性も担保しながら得る検査戦略が求められる。

② 本研究で得られた所見と第 1 章との接続

本研究では、末梢血由来 cfDNA を用いた ultra-deep targeted NGS (UMI によるエラー補正を含む) により、脈管奇形関連遺伝子の体細胞バリエントを低侵襲に検出し得るかを検討した。脈管奇形は画像診断を基盤とする一方、第 1 章で示したように“Mimicker”の存在により診断の不確実性および不適切な治療方針が選択されるリスクが生じ得る。したがって、形態情報(画像)に加えて、分子情報(遺伝子)を併用できることは、診断の確度向上と治療選択の根拠強化の両面から重要である。

本研究で得られたバリエント検出の実績は、組織採取の障壁が大きい症例からでも、解析系を適切に設計すれば末梢血 cfDNA から超低 VAF 領域バリエント検出が現実的になり得ることを示唆する。具体的には、平均カバレッジ 104,000× の超深度解析により、40 例中 23 例 (57.5%) で計 44 バリエントを検出し、末梢血中 VAF は 0.05%–1.88% の範囲 (中央値 0.11%) に分布した。さらに、検出されたバリエントの VAF を疾患群別 (AVM、PROS、VM) に箱ひげ図で可視化したところ、超低 VAF 領域に分布することが確認できた (図 2-3)。本図では、各症例の代表値として当該症例で検出されたバリエントの最大 VAF を用い、症例単位で群間分布を示した。

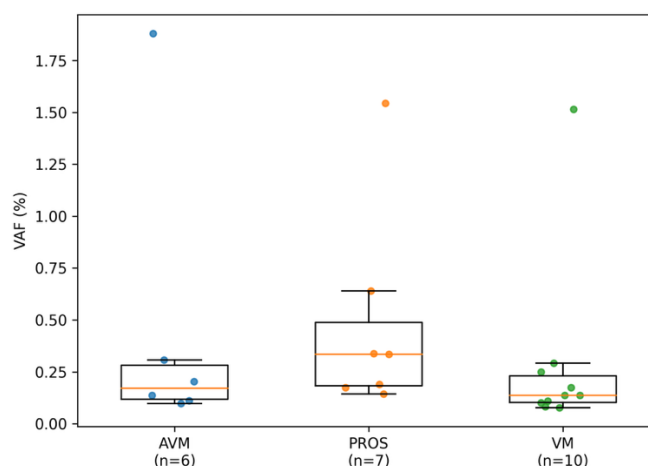


図 2-3. 疾患群別における末梢血 cfDNA の VAF 分布
各症例の最大 VAF (%) を示す。n は症例数を示す。

一方で、バリエントが検出されない症例が一定数存在すること、複数バリエントが検出される症例があることなど、臨床での実用に向けては解釈と運用の整理が不可欠である。以下では、複数バリエントの位置付け、組織検体を用いた検査との使い分け、ならびに未検出例の解釈を含む検査戦略について論じる。

③ 複数バリエントが検出された症例

本研究では、単一症例で複数のバリエントが検出される症例が存在した。脈管奇形の体細胞モザイクは、発生時期や細胞系譜に依存して病変内で不均一に分布し得るため、複数バリエントの検出は必ずしも例外ではないが、その解釈には注意を要する。

複数バリエントが検出された症例では、各バリエントの既報性や臨床的意義の強さ（病的意義の程度、あるいは、意義不明のバリエント（variants of uncertain significance, VUS））を整理したうえで解釈する必要がある。そこで本研究で検出されたバリエントについて、遺伝子名、CDS 変化、アミノ酸変化、本研究での症例数、がん体細胞変異カタログ（COSMIC）での登録状況、ClinVar における病原性クラス、dbSNP の ID を一覧化した。太字は本研究で新規に同定したバリエントを示す（表 2-11）。

表 2-11. 本研究で検出されたバリエントの注釈情報

遺伝子	CDS 変化	アミノ酸変化	本研究での検出数	COSMIC ^a	ClinVar ^b	dbSNP ^c
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.V600E	1	30,304	病原性	rs113488022
	c.1834C>T	p.Q612*	1	2	該当なし	rs781529187
<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.G12D	1	16,492	病原性	rs121913529
	c.44G>A	p.G15D	1	2	該当なし	rs1555195579
<i>MAP2K1</i>	c.100C>T	p.Q34*	1	N/A	該当なし	rs2140578466
	c.239G>A	p.G80D	1	N/A	VUS	rs2140579699
	c.283G>A	p.A95T	3	N/A	該当なし	該当なし
	Splice acceptor site		1	N/A	該当なし	rs2093483994
<i>PIK3CA</i>	c.371_372insT	p.P124fs	1	N/A	該当なし	該当なし
	c.1338G>A	p.W446*	2	2	該当なし	該当なし
	c.1339C>T	p.P447S	5	N/A	該当なし	rs573490174
	c.1624G>A	p.E542K	1	1,926	病原性	rs121913273
	c.1633G>A	p.E545K	3	3,104	病原性	rs104886003
	c.1637A>G	p.Q546R	2	125	病原性	rs397517201
	c.3075_3076insT	p.L1026fs	1	N/A	該当なし	該当なし
<i>TEK</i>	c.2701G>A	p.A901T	1	N/A	該当なし	該当なし
	c.2714C>T	p.A905V	8	2	該当なし	該当なし
	c.2739_2740delCCinsTT	p.L914F	1	N/A	該当なし	該当なし
	c.2743C>T	p.R915C	1	2	病原性	rs1825682922
	c.2753G>A	p.R918H	2	N/A	病原性が疑われる	rs1554701458
	c.2765C>T	p.T922M	2	1	該当なし	rs754385594
	c.2786C>T	p.A929V	1	N/A	該当なし	rs1455660810
	c.2797G>A	p.A933T	1	1	該当なし	rs1307510192
	c.2812delT	p.S938fs	1	N/A	該当なし	該当なし
	c.2846C>T	p.A949V	1	N/A	該当なし	rs751789573

^a COSMIC ver.99 における登録数。 ^b ClinVar における病原性クラス（検索日：2025年11月18日）。 ^c NCBI dbSNP Build 156 における SNP ID

病原性の明らかではないバリエーションが得られた場合、少なくとも次のような可能性を区別して考える必要がある。第一に、病変形成に直接関与する“driver”と、病態への寄与が不明確な VUS が混在している可能性である。特に超低 VAF 領域では、解析上の閾値を満たしても臨床的解釈は保留すべき状況があり得る。第二に、同一経路上の複数バリエーションが累積効果として病変形成に関与する可能性である。第三に、異なるクローン由来のモザイクが同時に存在する（ポリクローナル）可能性である。

また、TEK については、頻出部位のバリエーションと他遺伝子バリエーションとの併存が、病態形成における“追加ヒット”や機能的強度の差を反映している可能性がある。これらは、単に超低 VAF で得られた複数バリエーションを VUS と一括りに判断せず、バリエーションの既報性、機能ドメイン、VAF、同一症例内での VAF の相対関係、表現型との整合を踏まえて段階的に位置付けることが重要と考える。

④ 組織検体を用いた NGS vs cfDNA によるリキッドバイオプシー

組織検体を用いた遺伝子検査は、病変由来細胞の含有率が相対的に高いことから、バリエーション検出の観点では有利である。一方、FFPE では DNA 品質のばらつきや断片化が問題となり得るほか、そもそも組織採取自体が侵襲的で、脈管奇形では実施困難な症例が少なくない（Mulliken and Glowacki 1982）。これに対して末梢血 cfDNA は低侵襲に反復採取が可能であり、検査が実用された場合の意義は非常に高い。しかし、悪性腫瘍の領域で実用化されているリキッドバイオプシー（Corcoran and Chabner 2018）を脈管奇形へ応用する場合、末梢血中の VAF が極めて低くなり得ること、特に AVM のような高流速型脈管奇形では病変由来 DNA が循環血中で希釈されやすく、検出可能な cfDNA 量が限定的である可能性（El Sissy et al. 2025）、超低 VAF 領域でシーケンスエラー由来の偽陽性を抑制する必要があることが本質的課題である。したがって、cfDNA を用いる場合には、(1) 解析深度の確保、(2) UMI などによるエラー補正、(3) 病原性判定のルール明確化、が不可欠となる。

さらに、検出法の選択も重要である。ddPCR は特定バリエーションの高感度検出に有用である一方、対象が限定されるため、変異スペクトラムが広い病型や、非典型バリエーションを拾う必要がある場面では、targeted NGS の利点が高い。逆に、既知の *PIK3CA* ホットスポットなどに絞って診断効率を最大化する運用では、ddPCR や限定的パネルが合理的である。今後は、目的（診断補助、治療選択など）に応じて、検体と手法の種類を適切に組み合わせた運用が望ましい。

⑤ 本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、リキッドバイオプシー前の治療歴（硬化療法や薬物療法など）を系統的に考慮していない点である。治療により病変量が変われば、cfDNA 中の病変由来 DNA 比率が変動し、検出感度に影響し得る。第二に、対象が限られた施設由来である点である。したがって、前処理の標準化と運用アルゴリズムの確立は、検出率向上だけでなく施設間比較可能性の担保に直結する。第三に、超低 VAF バリエントについて、ddPCR など別の手法や対応する組織検体による追認が一律には行えていない点である。第四に、末梢血由来の検査である以上、厳密には生殖細胞系由来の可能性を完全に排除するには追加検討が必要となる（ただし既報知見との整合から起源推定が可能な場合も多い）。

今後の展望としては、リキッドバイオプシーの実用化に向け、(1) 解析費用の低下、(2) 診断率の向上（最適な血漿量・cfDNA 入力量・深度設計）、(3) 対象遺伝子・領域設計（ターゲット領域中心か、より広い領域か）、(4) 手法選択（targeted NGS か ddPCR か、あるいは併用か）、を現実的制約の中で最適化していくことが求められる。加えて、第 1 章の知見を踏まえれば、分子診断をすべての症例で一律に適用するのではなく、診断の不確実性が高い状況（鑑別が難しい、治療選択が分岐する、侵襲的検査の追加を要するが困難な場面など）において重点的に適用するのが、臨床上もっとも合理的と考えられる。

総括および結論

本学位論文は、脈管奇形診療における診断不確実性（第1章）と、それを補完する低侵襲分子診断の実現性（第2章）を、一続きの臨床課題として扱った。以下に、本研究から得られた新知見とその意義、今後の研究展開および課題を総括する。

① 本研究から得られた新知見

- ・画像診断（US と MR）を中心とする脈管奇形診療において、非血管性腫瘍などの“Mimicker”が脈管奇形と誤認され得ることを症例に基づき体系化し、診断の不一致が不適切な治療介入（硬化療法、塞栓術など）につながる臨床的リスクを示した。
- ・非典型的な画像所見や血流所見、臨床経過の不一致などを「再評価の契機」として位置づけ、診断プロセス上の不確実性を可視化した。
- ・末梢血由来 cfDNA を用いた UMI 付き ultra-deep targeted NGS により、超低 VAF 領域を含む脈管奇形関連遺伝子バリエーションを同定し得ることを示した（40 例中 23 例、57.5%; VAF 中央値 0.11%、範囲 0.05%–1.88%）。なお、cfDNA を用いた脈管奇形の遺伝子解析研究は、第2章に対応する原著論文が本邦初報告である。
- ・AVM を含む高流速型病変でも末梢血 cfDNA からバリエーション検出が可能である一方、病変由来 DNA 量が限定的となり得る点を明確化し、解析深度確保・エラー補正・解釈ルールの重要性を整理した。
- ・単一症例で複数バリエーションが得られ得ることを示し、driver バリエーションと VUS の両者の混在、同一経路上の累積効果、ポリクローナルな体細胞モザイクなどの可能性を区別して解釈する枠組みを提示した。

以上より、画像診断における再評価の契機（第1章）と低侵襲分子診断（第2章）を接続することで、疑わしい症例に対しては再評価し、分子情報で補強する実用可能な脈管奇形診断の流れを提案した。

② 新知見の意義

診断面では、画像所見が非典型で鑑別が難しい症例において、末梢血から客観的分子情報を得る選択肢を提示し、診断の不一致や不適切な治療方針が選択されるリスクの低減に資する。治療面では、体細胞モザイクに基づく病型理解を前提として、分子標的治療の適応判断や中止判断の根拠を補強し得る。研究面では、超低 VAF バリエーション検出の工程（検体、UMI、深度、閾値）を明示し、脈管奇形における cfDNA 解析の再現性および比較可能性の基盤を提供する。

③ 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

検体前処理（採血管、遠心条件、保存温度・期間、抽出法、cfDNA 入力量）について、プロトコルの標準化と品質管理の指標（収量や断片長）を定義したうえで、施設間での再現性（検出率や VAF のばらつき）を前向きに検証する多施設研究が必要である。対象遺伝子・領域設計は、ホットスポットや頻出バリエーション領域を中心とした効率設計と、非典型バリエーションを拾い上げる拡張設計を、臨床目的（診断補助、治療選択、研究探索）に応じて段階的に最適化する検討が必要である。

ddPCR などの高感度法と targeted NGS について、検出限界、偽陽性率、所要時間、解析費用などを同一基準で比較し、一次スクリーニング、確認検査、経時的モニタリングの運用を確立する。さらに、画像診断で再評価の契機を満たす症例を対象に、分子診断の追加が与える診断や治療方針の変更率調査、分子標的薬による有害事象の低減率調査、長期的な転帰などを前向きに評価する臨床研究への展開が期待できる。将来的には、治療介入前後の縦断採血により、検出されたバリエーションを指標とした病勢評価・治療反応性評価の実用化も検討する。

④ 今後の課題

本研究は対象数・施設数が限定されており、病型ごとの検出率推定や陰性例の要因分析には統計的制約がある。リキッドバイオプシー前の治療歴や病変量の変化を系統的に扱っておらず、cfDNA 量・VAF への影響を十分に評価できていない。陰性例は、(1) パネル外の遺伝子・領域、(2) 病変由来 DNA 量の不足（特に高流速型病変）、(3) 技術的限界、など複数要因が想定され、検体量・深度・設計の最適化が必要である。超低 VAF 領域では偽陽性・偽陰性のリスクが残るため、エラー抑制、閾値設定、臨床的意義付け（VUS 扱い）の標準化が不可欠である。臨床実用には、解析費用や検査所要時間、保険適用、検査前後の遺伝カウンセリング体制など、医療システム上の課題も同時に解決する必要がある。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

謝辞

本論文の作成と執筆にあたり、丁寧なご指導をいただきました石川耕資 助教に深く感謝申し上げます。

また、本研究のすべてに渡ってご指導、ご協力、ご支援をいただきました北海道大学大学院医学研究院 機能再生医学講座 形成外科学教室の山本有平 名誉教授、舟山恵美 准教授、前田拓 講師、同教室員の皆様、北海道大学病院 先端診断技術開発センターの畑中豊 先生、畑中佳奈子 先生、斗南病院 形成外科/血管腫・脈管奇形センターの佐々木了センター長、村尾尚規 科長、看護師の皆様に深く感謝申し上げます。

また、NGS ライブラリのパネル設計およびシーケンスに多大なるご協力をいただきました理研ジェネシスの齋藤辰朗 さま、血液試料の保管および cfDNA 抽出に技術協力をいただきました北海道大学病院医療・ヘルスサイエンス研究開発機構の下道真由美 さまに心から感謝を申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会 科学研究費助成事業（助成番号 JP23K09072）の助成を受けたものである。

引用文献

- Al-Olabi, L., Polubothu, S., Dowsett, K., Andrews, K. A., Stadnik, P., Joseph, A. P., Knox, R., Pittman, A., Clark, G., Baird, W., et al. (2018). Mosaic RAS/MAPK variants cause sporadic vascular malformations which respond to targeted therapy. *J Clin Invest* 128, 1496-1508.
- Altuwaijri, T. A. (2024). Soft tissue sarcoma mimicking an arteriovenous malformation - A case report and review of literature. *Int J Surg Case Rep* 119, 109727.
- Armstrong, D., Owens, R., Carlson, T. and Ching, B. (2024). Retained foreign body misdiagnosed as a low flow vascular malformation: A case report. *Radiol Case Rep* 19, 164-171.
- Blackburn, P. R., Milosevic, D., Marek, T., Folpe, A. L., Howe, B. M., Spinner, R. J. and Carter, J. M. (2020). PIK3CA mutations in lipomatosis of nerve with or without nerve territory overgrowth. *Mod Pathol* 33, 420-430.
- Brouillard, P., Schlögel, M. J., Hodayun Sepehr, N., Helaers, R., Queisser, A., Fastré, E., Boutry, S., Schmitz, S., Clapuyt, P., Hammer, F., et al. (2021). Non-hotspot PIK3CA mutations are more frequent in CLOVES than in common or combined lymphatic malformations. *Orphanet J Rare Dis* 16, 267.
- Canaud, G., Hammill, A. M., Adams, D., Vikkula, M. and Keppler-Noreuil, K. M. (2021). A review of mechanisms of disease across PIK3CA-related disorders with vascular manifestations. *Orphanet J Rare Dis* 16, 306.
- Canaud, G., Lopez Gutierrez, J. C., Irvine, A. D., Vabres, P., Hansford, J. R., Ankrah, N., Branle, F., Papadimitriou, A., Ridolfi, A., O'Connell, P., et al. (2023). Alpelisib for treatment of patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Genet Med* 25, 100969.
- Castel, P., Carmona, F. J., Grego-Bessa, J., Berger, M. F., Viale, A., Anderson, K. V., Bague, S., Scaltriti, M., Antonescu, C. R., Baselga, E., et al. (2016). Somatic PIK3CA mutations as a driver of sporadic venous malformations. *Sci Transl Med* 8(332):332ra42.
- Castillo, S. D., Tzouanacou, E., Zaw-Thin, M., Berenjano, I. M., Parker, V. E. R., Chivite, I., Milà-Guasch, M., Pearce, W., Solomon, I., Angulo-Urarte, A., et al. (2016). Somatic activating mutations in PIK3CA cause sporadic venous malformations in mice and humans. *Sci Transl Med* 8(332):332ra43.

Chang, F., Liu, L., Fang, E., Zhang, G., Chen, T., Cao, K., Li, Y. and Li, M. M. (2017). Molecular diagnosis of mosaic overgrowth syndromes using a custom-designed next-generation sequencing panel. *J Mol Diagn* 19, 613-624.

Chen, W., Tian, X., Chen, L. and Huang, W. (2021). Macrodactyly of the foot resulting from plantar nerve impairment. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 74, 1840-1847.

Chen, H., Sun, B., Liu, H., Gao, W., Qiu, Y., Hua, C. and Lin, X. (2024). Delineation of the phenotypes and genotypes of PIK3CA-related overgrowth spectrum in East Asians. *Mol Genet Genomics* 299, 66.

Clarke, R., Suresh, P., Thomas, R. and Freeman, S. (2016). Twinkle artefact in the ultrasound diagnosis of superficial epidermoid cysts. *Ultrasound* 24, 147-153.

Colmenero, I. and Knöpfel, N. (2021). Venous malformations in childhood: Clinical, histopathological and genetics update. *Dermatopathology (Basel)* 8, 477-493.

Corcoran, R. B. and Chabner, B. A. (2018). Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. *N Engl J Med* 379, 1754-1765.

Couto, J. A., Huang, A. Y., Konczyk, D. J., Goss, J. A., Fishman, S. J., Mulliken, J. B., Warman, M. L. and Greene, A. K. (2017). Somatic MAP2K1 mutations are associated with extracranial arteriovenous malformation. *Am J Hum Genet* 100, 546-554.

Crist, J., Hodge, J.R., Frick, M., Leung, F.P., Hsu, E., Gi, M.T. and Venkatesh, S.K. (2017). Magnetic resonance imaging appearance of schwannomas from head to toe: A pictorial review. *J Clin Imaging Sci* 7, 38.

Davis, S., Ware, M. A., Zeiger, J., Deardorff, M. A., Grand, K., Grimberg, A., Hsu, S., Kelsey, M., Majidi, S., Matthew, R. P., et al. (2019). Growth hormone deficiency in megalencephaly-capillary malformation syndrome: An association with activating mutations in PIK3CA. *Am J Med Genet A* 182(1):162-168.

De Iruarizaga Gana, M., Bueno Horcajadas, Á.L., Quílez Caballero, E., López-Vidauro Franco, I. and Martel Villagrán, J. (2024). Ultrasound and magnetic resonance imaging (MRI) features of angioleiomyoma. *Quant Imaging Med Surg* 14, 7817-7824.

Diociaiuti, A., Rotunno, R., Pisaneschi, E., Cesario, C., Carnevale, C., Condorelli, A. G., Rollo, M., Di Cecca, S., Quintarelli, C., Novelli, A., et al. (2022). Clinical and molecular spectrum of sporadic vascular malformations: A single-center study. *Biomedicines* 10, 1460.

Du, Z., Liu, J. L., You, Y. H., Wang, L. Z., He, J., Zheng, J. W., Zhang, Z. Y. and Wang, Y. A. (2021). Genetic landscape of common venous malformations in the head and neck. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 9, 1007-1016.e7.

El Sissy, F. N., Wassef, M., Faucon, B., Salvan, D., Nadaud, S., Coulet, F., Adle-Biasette, H., Soubrier, F., Bisdorff, A. and Eyries, M. (2022). Somatic mutational landscape of extracranial arteriovenous malformations and phenotypic correlations. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 36, 905-912.

El Sissy, F. N., Bisdorff, A., Perrier, A., Guillermin, E., Denis, J., Favre, L., Aubertin, M., Eyries, M. and Coulet, F. (2025). Identification of somatic genetic variants in superficial vascular malformations by liquid biopsy in a cohort of 88 patients from a French hospital. *Mol Diagn Ther* 29:367-380.

Foster, J. B., Li, D., March, M. E., Sheppard, S. E., Adams, D. M., Hakonarson, H. and Dori, Y. (2020). Kaposiform lymphangiomatosis effectively treated with MEK inhibition. *EMBO Mol Med* 12(10):e12324.

Garde, A., Guibaud, L., Goldenberg, A., Petit, F., Dard, R., Roume, J., Mazereeuw-Hautier, J., Chassaing, N., Lacombe, D., Morice-Picard, F., et al. (2021). Clinical and neuroimaging findings in 33 patients with MCAP syndrome: A survey to evaluate relevant endpoints for future clinical trials. *Clin Genet* 99(5):650-661.

Goines, J., Li, X., Cai, Y., Mobberley-Schuman, P., Metcalf, M., Fishman, S. J., Adams, D. M., Hammill, A. M. and Boscolo, E. (2018). A xenograft model for venous malformation. *Angiogenesis* 21, 725-735.

Golden, B.A. and Zide, M.F. (2005). Cutaneous cysts of the head and neck. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 1613-1619.

Goss, J. A., Konczyk, D. J., Smits, P. J., Kozakewich, H. P. W., Alomari, A. I., Al-Ibraheemi, A., Taghinia, A. H., Dickie, B. H., Adams, D. M., Fishman, S. J., et al. (2019). Intramuscular fast-flow vascular anomaly contains somatic MAP2K1 and KRAS mutations. *Angiogenesis* 22, 547-552.

Gökpınar, E., Taşdelen, E., Durmaz, C. D., Altın, T., Tuncalı, T., Martinez-Glez, V., Karabulut, H. G., Vural, S., Ceylaner, S., Acar, M. O., et al. (2022). Phenotypic and molecular characterization of five patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Am J Med Genet A* 188(6):1792-1800.

Hammill, A. M., Wentzel, M., Gupta, A., Nelson, S., Lucky, A., Elluru, R., Dasgupta, R., Azizkhan, R. G. and Adams, D. M. (2011). Sirolimus for the treatment of complicated vascular anomalies in children. *Pediatr Blood Cancer* 57, 1018-1024.

Hernandez, P. V., King, K. A., Evenson, M. J., Corliss, M. M., Schroeder, M. C., Heusel, J. W., Neidich, J. A. and Cao, Y. (2023). High-depth next-generation sequencing panel testing in the evaluation of arteriovenous malformations. *Am J Med Genet A* 191(6):1518-1524.

Hirose, K., Hori, Y., Ozeki, M., Motooka, D., Hata, K., Tahara, S., Matsui, T., Kohara, M., Maruyama, K., Imanaka-Yoshida, K., et al. (2024). Comprehensive phenotypic and genomic characterization of venous malformations. *Hum Pathol* 145, 48-55.

Hoeger, P. H. (2021). Genes and phenotypes in vascular malformations. *Clin Exp Dermatol* 46, 495-502.

Hori, Y., Hirose, K., Ozeki, M., Hata, K., Motooka, D., Tahara, S., Matsui, T., Kohara, M., Higashihara, H., Ono, Y., et al. (2022). PIK3CA mutation correlates with mTOR pathway expression but not clinical and pathological features in Fibro-adipose vascular anomaly (FAVA). *Diagn Pathol* 17(1):19.

Huchtagowder, V., Shenoy, A., Corliss, M., Vigh-Conrad, K. A., Storer, C., Grange, D. K. and Cottrell, C. E. (2016). Utility of clinical high-depth next generation sequencing for somatic variant detection in the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Clin Genet* 91(1):79-85.

International Society for the Study of Vascular Anomalies (2018). ISSVA Classification for Vascular Anomalies. <https://www.issva.org/UserFiles/file/ISSVA-Classification-2018.pdf>. Accessed 30 July 2025.

International Society for the Study of Vascular Anomalies (2025) ISSVA Classification for Vascular Anomalies. https://www.issva.org/UserFiles/file/ISSVAUpdatedflowdiagram_03152025_copyright_3.21.25.pdf. Accessed 30 July 2025.

- Keppler-Noreuil, K. M., Sapp, J. C., Lindhurst, M. J., Parker, V. E. R., Blumhorst, C., Darling, T., Tosi, L. L., Huson, S. M., Whitehouse, R. W., Jakkula, E., et al. (2014). Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 164(7):1713-1733.
- Kim, Y. M., Lee, Y., Choi, Y., Choi, I. H., Heo, S. H., Choi, J. M., Do, H. S., Jang, J. H., Yum, M. S., Yoo, H. W., et al. (2022). Clinical and genetic analyses of patients with lateralized overgrowth. *BMC Med Genomics* 15, 206.
- Koga, M., Nishio, J., Koga, T., Koga, K., Nakayama, S. and Yamamoto, T. (2023). An update on clinicopathological, imaging, and genetic features of angioleiomyoma. *Cancer Diagn Progn* 3, 145-150.
- Konczyk, D. J., Goss, J. A., Smits, P. J., Sudduth, C. L., Al-Ibraheemi, A. and Greene, A. K. (2020). Arteriovenous malformation MAP2K1 mutation causes local cartilage overgrowth by a cell-non autonomous mechanism. *Sci Rep* 10, 4428.
- Kuentz, P., St-Onge, J., Duffourd, Y., Courcet, J. B., Carmignac, V., Jouan, T., Sorlin, A., Abasq-Thomas, C., Albuissou, J., Amiel, J., et al. (2017). Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med* 19:989-997.
- Kunimoto, K., Yamamoto, Y. and Jinnin, M. (2022). ISSVA Classification of Vascular Anomalies and Molecular Biology. *Int J Mol Sci* 23(4):2358.
- Kurek, K. C., Luks, V. L., Ayturk, U. M., Alomari, A. I., Fishman, S. J., Spencer, S. A., Mulliken, J. B., Bowen, M. E., Yamamoto, G. L., Kozakewich, H. P. W., et al. (2012). Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *Am J Hum Genet* 90, 1108-1115.
- Lalonde, E., Ebrahimzadeh, J., Rafferty, K., Richards-Yutz, J., Grant, R., Toorens, E., Marie, R. J., Schindewolf, E., Ganguly, T., Kalish, J. M., et al. (2019). Molecular diagnosis of somatic overgrowth conditions: A single-center experience. *Mol Genet Genomic Med* 7(3):e536.
- Le Cras, T. D., Goines, J., Lakes, N., Pastura, P., Hammill, A. M., Adams, D. M. and Boscolo, E. (2020). Constitutively active PIK3CA mutations are expressed by lymphatic and vascular endothelial cells in capillary lymphatic venous malformation. *Angiogenesis* 23, 425-442.

Lee, H.N., Hyun, D., Do, Y.S., Park, K.B. and Bae, S.H. (2019). Soft-tissue tumors mimicking arteriovenous malformations. *J Vasc Interv Radiol* 30, 1660-1664.e1667.

Leiter, S. M., Parker, V. E. R., Welters, A., Knox, R., Rocha, N., Clark, G., Payne, F., Lotta, L., Harris, J., Guerrero-Fernández, J., et al. (2017). Hypoinsulinaemic, hypoketotic hypoglycaemia due to mosaic genetic activation of PI3-kinase. *Eur J Endocrinol* 177, 175-186.

Li, J. F., Tian, G. L., Pan, H., Zhang, W. T., Li, D. C., Liu, J. D., Zhao, L. and Li, H. L. (2022). An analysis of the pathogenic genes and mutation sites of macrodactyly. *Pharmgenomics Pers Med* 15, 55-64.

Li, D., Sheppard, S. E., March, M. E., Battig, M. R., Surrey, L. F., Srinivasan, A. S., Matsuoka, L. S., Tian, L., Wang, F., Seiler, C., et al. (2023). Genomic profiling informs diagnoses and treatment in vascular anomalies. *Nat Med* 29, 1530-1539.

Limaye, N., Wouters, V., Uebelhoer, M., Tuominen, M., Wirkkala, R., Mulliken, J. B., Eklund, L., Boon, L. M. and Vikkula, M. (2009). Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations. *Nat Genet* 41, 118-124.

Limaye, N., Kangas, J., Mendola, A., Godfraind, C., Schlögel, M. J., Helaers, R., Eklund, L., Boon, L. M. and Vikkula, M. (2015). Somatic activating PIK3CA mutations cause venous malformation. *Am J Hum Genet* 97, 914-921.

Lindhurst, M. J., Parker, V. E. R., Payne, F., Sapp, J. C., Rudge, S., Harris, J., Witkowski, A. M., Zhang, Q., Groeneveld, M. P., Scott, C. E., et al. (2012). Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nat Genet* 44, 928-933.

Liu, A. S., Mulliken, J. B., Zurakowski, D., Fishman, S. J. and Greene, A. K. (2010). Extracranial arteriovenous malformations: natural progression and recurrence after treatment. *Plast Reconstr Surg* 125, 1185-1194.

Liu, H., Rao, Y., Gu, H., Yang, X., Hu, L., Sun, Y., Chen, H. and Lin, X. (2020). Characteristic appearance of spindle cell hemangiomatosis, often misdiagnosed as venous malformation: A retrospective study of 11 cases. *J Dermatol* 47, 1424-1431.

- Loconte, D. C., Grossi, V., Bozzao, C., Forte, G., Bagnulo, R., Stella, A., Lastella, P., Cutrone, M., Benedicenti, F., Susca, F. C., et al. (2015). Molecular and functional characterization of three different postzygotic mutations in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) patients: Effects on PI3K/AKT/mTOR signaling and sensitivity to PIK3 inhibitors. *PLoS One* 10, e0123092.
- Loose, D. A. (2007). Surgical management of venous malformations. *Phlebology* 22, 276-282.
- Luks, V. L., Kamitaki, N., Vivero, M. P., Uller, W., Rab, R., Bovée, J. V. M. G., Rialon, K. L., Guevara, C. J., Alomari, A. I., Greene, A. K., et al. (2015). Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J Pediatr* 166, 1048-1054. e1-5.
- Maclellan, R. A., Luks, V. L., Vivero, M. P., Mulliken, J. B., Zurakowski, D., Padwa, B. L., Warman, M. L., Greene, A. K. and Kurek, K. C. (2014). PIK3CA activating mutations in facial infiltrating lipomatosis. *Plast Reconstr Surg* 133, 12e-19e.
- Mansur, A. and Radovanovic, I. (2023). Vascular malformations: An overview of their molecular pathways, detection of mutational profiles and subsequent targets for drug therapy. *Front Neurol* 14, 1099328.
- Matsuda, N., Ishikawa, K., Funayama, E., Mitamura, S., Sasaki, S., Yamamoto, Y. and Maeda, T. (2022). Streptococcal toxic shock syndrome in a pediatric patient with intramuscular venous malformation in the neck. *J Emerg Med* 63, e72-e76.
- Martinez-Glez, V., Rodriguez-Laguna, L., Viana-Huete, V., García, T. C., Hurtado, B., Lapunzina, P., Triana, P. and López-Gutiérrez, J. C. (2021). Segmental undergrowth is associated with pathogenic variants in vascular malformation genes: A retrospective case-series study. *Clin Genet* 101(3):296-306.
- Michel, M. E., Konczyk, D. J., Yeung, K. S., Murillo, R., Vivero, M. P., Hall, A. M., Zurakowski, D., Adams, D., Gupta, A., Huang, A. Y., et al. (2018). Causal somatic mutations in urine DNA from persons with the CLOVES subgroup of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Clin Genet* 93(5):1075-1080.
- Mirzaa, G., Timms, A. E., Conti, V., Boyle, E. A., Girisha, K. M., Martin, B., Kircher, M., Olds, C., Juusola, J., Collins, S., et al. (2016). PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight* 1, e87623.

- Mizawa, M., Matsumura, K., Hamazaki, K., Furukawa, F., Makino, T., Shimizu, T., Inadera, H. and Japan Environment and Children's Study Group (2021). Infantile hemangioma and the risk factors in a Japanese population: a nationwide longitudinal study—The Japan Environment and Children's Study. *J Invest Dermatol* 141, 2745-2748.e2.
- Mulligan, P. R., Prajapati, H. J. S., Martin, L. G. and Patel, T. H. (2014). Vascular anomalies: classification, imaging characteristics and implications for interventional radiology treatment approaches. *Br J Radiol* 87, 20130392.
- Mulliken, J.B. and Glowacki, J. (1982). Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: A classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* 69, 412-422.
- Mussa, A., Leoni, C., Iacoviello, M., Carli, D., Ranieri, C., Pantaleo, A., Buonuomo, P. S., Bagnulo, R., Ferrero, G. B., Bartuli, A., et al. (2023). Genotypes and phenotypes heterogeneity in PIK3CA-related overgrowth spectrum and overlapping conditions: 150 novel patients and systematic review of 1007 patients with PIK3CA pathogenetic variants. *J Med Genet* 60:163-173.
- Narayan, P., Prowell, T. M., Gao, J. J., Fernandes, L. L., Li, E., Jiang, X., Qiu, J., Fan, J., Song, P., Yu, J., et al. (2021). FDA approval summary: alpelisib plus fulvestrant for patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, advanced or metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 27, 1842-1849.
- Ng Hung Shin, P.B., Tie, B., Kanagarajah, V. and Tan, A. (2023). Nodulocystic basal cell carcinoma on the limb masquerading as vascular malformation on imaging. *J Surg Case Rep* rjac618.
- Nozawa, A., Fujino, A., Yuzuriha, S., Suenobu, S., Kato, A., Shimizu, F., Aramaki-Hattori, N., Kuniyeda, K., Sakaguchi, K., Ohnishi, H., et al. (2022). Comprehensive targeted next-generation sequencing in patients with slow-flow vascular malformations. *J Hum Genet* 67, 721-728.
- Olivieri, B., White, C.L., Restrepo, R., McKeon, B., Karakas, S.P. and Lee, E.Y. (2016). Low-flow vascular malformation pitfalls: From clinical examination to practical imaging evaluation-Part 2, venous malformation mimickers. *AJR Am J Roentgenol* 206, 952-962.
- Osborn, A. J., Dickie, P., Neilson, D. E., Glaser, K., Lynch, K. A., Gupta, A. and Dickie, B. H. (2015). Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Hum Mol Genet* 24, 926-938.

Pahl, K. S., Kim, K., Sams, C., Alvarez, H., Smith, S. V. and Blatt, J. (2018). Inconsistency in classifying vascular anomalies: What's in a name? *Pediatr Blood Cancer* 65, e26836.

Palmieri, M., Currò, A., Tommasi, A., Di Sarno, L., Doddato, G., Baldassarri, M., Frullanti, E., Giliberti, A. R., Fallerini, C., Spinazzola, A., et al. (2020). Cell-free DNA next-generation sequencing liquid biopsy as a new revolutionary approach for arteriovenous malformation. *JVS Vasc Sci* 1, 176-180.

Palmieri, M., Di Sarno, L., Tommasi, A., Currò, A., Doddato, G., Baldassarri, M., et al. (2021a). MET somatic activating mutations are responsible for lymphovenous malformation and can be identified using cell-free DNA next generation sequencing liquid biopsy. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 9, 740-744.

Palmieri, M., Pinto, A. M., di Blasio, L., Currò, A., Monica, V., Sarno, L. D., et al. (2021b). A pilot study of next generation sequencing-liquid biopsy on cell-free DNA as a novel non-invasive diagnostic tool for Klippel-Trenaunay syndrome. *Vascular* 29, 85-91.

Pantsar, T. (2020). The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. *Comput Struct Biotechnol J* 18, 189-198.

Paolacci, S., Mattassi, R. E., Marceddu, G., Manara, E., Zulian, A., Guerri, G., De Antoni, L., Arduino, C., Cavalca, D. and Bertelli, M. (2020). Somatic variant analysis identifies targets for tailored therapies in patients with vascular malformations. *J Clin Med* 9, 3387.

Park, H. J., Shin, C. H., Yoo, W. J., Cho, T. J., Kim, M. J., Seong, M. W., Park, S. S., Lee, J. H., Sim, N. S. and Ko, J. M. (2020). Detailed analysis of phenotypes and genotypes in megalencephaly-capillary malformation-polymicrogyria syndrome caused by somatic mosaicism of PIK3CA mutations. *Orphanet J Rare Dis* 15, 205.

Park, J.S., Moon, J., Cho, S.I. and Mun, J.H. (2020). Schwannoma presenting as a scalp mass: A case report with magnetic resonance imaging findings. *Ann Dermatol* 32, 64-68.

Piacitelli, A. M., Jensen, D. M., Brandling-Bennett, H., Gray, M. M., Batra, M., Gust, J., Thaker, A., Paschal, C., Tsuchiya, K., Pritchard, C. C., et al. (2018). Characterization of a severe case of PIK3CA-related overgrowth at autopsy by droplet digital polymerase chain reaction and report of PIK3CA sequencing in 22 patients. *Am J Med Genet A* 176(11):2301-2308.

Quindipan, C., Cotter, J. A., Ji, J., Mitchell, W. G., Moke, D. J., Navid, F., Thomas, S. M., VanHirtum-Das, M., Wang, L., Saitta, S. C., et al. (2021). Custom pediatric oncology next-generation sequencing panel identifies somatic mosaicism in archival tissue and enhances targeted clinical care. *Pediatr Neurol* 114, 55-59.

Ranieri, C., Di Tommaso, S., Loconte, D. C., Grossi, V., Sanese, P., Bagnulo, R., Susca, F. C., Forte, G., Peserico, A., De Luisi, A., et al. (2018). In vitro efficacy of ARQ 092, an allosteric AKT inhibitor, on primary fibroblast cells derived from patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Neurogenetics* 19:77-91.

Rios, J. J., Paria, N., Burns, D. K., Israel, B. A., Cornelia, R., Wise, C. A. and Ezaki, M. (2013). Somatic gain-of-function mutations in PIK3CA in patients with macrodactyly. *Hum Mol Genet* 22, 444-451.

Rosenberg, T. L., Suen, J. Y. and Richter, G. T. (2018). Arteriovenous malformations of the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am* 51(1): 185-195.

San Basilio, M., Rodríguez-Laguna, L., Triana Junco, P., Martínez-Glez, V., Ramirez-Amoros, C., Delgado-Miguel, C., Rodriguez-Arias, J. P. and Lopez-Gutierrez, J. C. (2025). Association of somatic KRAS variants with osteolysis in arteriovenous malformations. *Eur J Pediatr Surg* 35, 362-368.

Sasaki, Y., Ishikawa, K., Hatanaka, K. C., Oyamada, Y., Sakuhara, Y., Shimizu, T., Saito, T., Murao, N., Onodera, T., Miura, T., et al. (2023). Targeted next-generation sequencing for detection of PIK3CA mutations in archival tissues from patients with Klippel-Trenaunay syndrome in an Asian population. *Orphanet J Rare Dis* 18(1):270.

Scorletti, F., Hammill, A., Patel, M., Ricci, K. and Dasgupta, R. (2018). Malignant tumors misdiagnosed as benign vascular anomalies. *Pediatr Blood Cancer* 65, e27051.

Serio, V. B., Palmieri, M., Loberti, L., Granata, S., Fallerini, C., Vaghi, M., Renieri, A. and Pinto, A. M. (2022). Nosological and theranostic approach to vascular malformation through cfDNA NGS liquid biopsy. *J Clin Med* 11, 3740.

Siegel, D. H., Cottrell, C. E., Streicher, J. L., Schilter, K. F., Basel, D. G., Baselga, E., Burrows, P. E., Ciliberto, H. M., Vigh-Conrad, K. A., Eichenfield, L. F., et al. (2018). Analyzing the genetic spectrum of vascular anomalies with overgrowth via cancer genomics. *J Invest Dermatol* 138, 957-967.

- Smith, C. J. F., Friedlander, S. F., Guma, M., Kavanaugh, A. and Chambers, C. D. (2017). Infantile hemangiomas: an updated review on risk factors, pathogenesis, and treatment. *Birth Defects Res* 109, 809-815.
- Soblet, J., Limaye, N., Uebelhoer, M., Boon, L. M. and Vikkula, M. (2013). Variable Somatic TIE2 Mutations in Half of Sporadic Venous Malformations. *Mol Syndromol* 4(4):179-183.
- Soblet, J., Kangas, J., Nätyнки, M., Mendola, A., Helaers, R., Uebelhoer, M., Kaakinen, M., Cordisco, M., Domp Martin, A., Enjolras, O., et al. (2017). Blue rubber bleb nevus (BRBN) syndrome is caused by somatic TEK (TIE2) mutations. *J Invest Dermatol* 137, 207-216.
- Stor, M. L. E., Horbach, S. E. R., Lokhorst, M. M., Tan, E., Maas, S. M., van Noesel, C. J. M. and van der Horst, C. M. A. M. (2024). Genetic mutations and phenotype characteristics in peripheral vascular malformations: A systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 38, 1314-1328.
- Strübing, F., Laurich, A., Weiss, C., Kneser, U., Schoenberg, S. and Sadick, M. (2024). Patient characteristics and disease spectrum in a German vascular anomalies center. *Acta Radiol* 65, 145-151.
- Sudduth, C. L., McGuire, A. M., Smits, P. J., Konczyk, D. J., Al-Ibraheemi, A., Fishman, S. J. and Greene, A. K. (2020). Arteriovenous malformation phenotype resembling congenital hemangioma contains KRAS mutations. *Clin Genet* 98(6):595-597.
- Sudduth, C. L., Konczyk, D. J., Smits, P. J., Eng, W., Al-Ibraheemi, A., Upton, J. and Greene, A. K. (2021). Bockenheimer disease is associated with a TEK variant. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 7, a006119.
- Ten Broek, R. W., Eijkelenboom, A., van der Vleuten, C. J. M., Kamping, E. J., Kets, M., Verhoeven, B. H., Grünberg, K., Schultze Kool, L. J., Tops, B. B. J., Ligtenberg, M. J. L., et al. (2019). Comprehensive molecular and clinicopathological analysis of vascular malformations: A study of 319 cases. *Genes Chromosomes Cancer* 58:541-550.
- Tian, W., Huang, Y., Sun, L., Guo, Y., Zhao, S., Lin, M., Dong, X., Zhong, W., Yin, Y., Chen, Z., et al. (2020). Phenotypic and genetic spectrum of isolated macrodactyly: Somatic mosaicism of PIK3CA and AKT1 oncogenic variants. *Orphanet J Rare Dis* 15, 288.

- Tian, W., Sun, L., Zhang, Q., Zhao, J., Guo, Y., Zhong, W., Liu, L., Meirelles, K., Tang, S., Zhang, J., et al. (2022). Activating PIK3CA postzygotic mutations in segmental overgrowth of muscles with bone involvement in the body extremities. *Mol Genet Genomics* 297, 387-396.
- Torresetti, M., Brancorsini, D., Goteri, G. and Di Benedetto, G. (2024). An unusual case of dermatofibrosarcoma protuberans misdiagnosed as vascular malformation for over 30 years: A case report. *Int J Surg Case Rep* 116, 109407.
- Triana, P., Sarmiento, M. D. C., Rodriguez-Laguna, L., Martinez-Glez, V. and Lopez-Gutierrez, J. C. (2023). Undergrowth of first toe in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Ann Vasc Surg* 88, 233-238.
- Trop, I., Dubois, J., Guibaud, L., Grignon, A., Patriquin, H., McCuaig, C. and Garel, L.A. (1999). Soft-tissue venous malformations in pediatric and young adult patients: Diagnosis with Doppler US. *Radiology* 212, 841-845.
- Tsai, W.C., Chiou, H.J., Chou, Y.H., Wang, H.K., Chiou, S.Y. and Chang, C.Y. (2008). Differentiation between schwannomas and neurofibromas in the extremities and superficial body: The role of high-resolution and color Doppler ultrasonography. *J Ultrasound Med* 27, 161-166.
- Venot, Q., Blanc, T., Rabia, S. H., Berteloot, L., Ladraa, S., Duong, J. P., Blanc, E., Johnson, S. C., Huguin, C., Boccara, O., et al. (2018). Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature* 558, 540-546.
- White, C.L., Olivieri, B., Restrepo, R., McKeon, B., Karakas, S.P. and Lee, E.Y. (2016). Low-flow vascular malformation pitfalls: From clinical examination to practical imaging evaluation-Part 1, lymphatic malformation mimickers. *AJR Am J Roentgenol* 206, 940-951.
- Wu, J., Tian, W., Tian, G., Sumner, K., Hutchinson, D. T. and Ji, Y. (2018). An investigation of PIK3CA mutations in isolated macrodactyly. *J Hand Surg Eur Vol* 43(7):756-760.
- Xue, S., Liu, Q., Zhao, Y., Kong, L., Fu, F., Gong, Y., Guo, X., Dong, C. and Wang, M. (2023). Fibroadipose vascular anomaly: A clinicopathological study of 75 cases. *Histopathology* 83:286-297.
- Yang, F., Chen, X.X., Wu, H.L., Zhu, J.F., Chen, Y., Yu, L.F. and Huang, X.J. (2017). Sonographic features and diagnosis of peripheral schwannomas. *J Clin Ultrasound* 45, 127-133.

Ye, C., Pan, L., Huang, Y., Ye, R., Han, A., Li, S., Li, X. and Wang, S. (2011). Somatic mutations in exon 17 of the TEK gene in vascular tumors and vascular malformations. *J Vasc Surg* 54:1760-1768.

Yeung, K. S., Ip, J. J. K., Chow, C. P., Kuong, E. Y. L., Tam, P. K. H., Chan, G. C. F. and Chung, B. H. Y. (2017). Somatic PIK3CA mutations in seven patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 173, 978-984.

Zenner, K., Jensen, D. M., Cook, T. T., Dmyterko, V., Bly, R. A., Ganti, S., Mirzaa, G. M., Dobyns, W. B., Perkins, J. A. and Bennett, J. T. (2021). Cell-free DNA as a diagnostic analyte for molecular diagnosis of vascular malformations. *Genet Med* 23, 123-130.

Zerbib, L., Ladraa, S., Fraissenon, A., Bayard, C., Firpion, M., Venot, Q., Protic, S., Huguin, C., Thomas, A., Fraitag, S., et al. (2024). Targeted therapy for capillary-venous malformations. *Signal Transduct Target Ther* 9, 146.

Zhang, J.Z., Zhou, J. and Zhang, Z.C. (2016). Subcutaneous angioleiomyoma: Clinical and sonographic features with histopathologic correlation. *J Ultrasound Med* 35, 1669-1673.

Zhang, B., He, R., Xu, Z., Sun, Y., Wei, L., Li, L., Liu, Y., Guo, W., Song, L., Wang, H., et al. (2023). Somatic mutation spectrum of a Chinese cohort of pediatrics with vascular malformations. *Orphanet J Rare Dis* 18, 261.

佐々木雄輝, 石川耕資, 佐々木了. 特集／まずはここから！四肢のしこり診療ガイドⅡ. 各論 脈管奇形, 血管性腫瘍. *PEPARS* (2022). 181, 20-33

三田村真太郎, 石川耕資, 長和俊, 古瀬優太, 中村雄一, 本庄遼太, 前田拓, 山本有平. 低出生体重児の顔面に生じた乳児血管腫に対するプロプラノロール内服療法の2例. *形成外科* (2023). 66, 1336-1345.

力久直昭, 小坂健太郎, 松井裕輔, 三村秀文, 大須賀慶悟, 秋田定伯, 渡部茂, 佐々木了. 血管腫・血管奇形の全国疫学調査に向けての予備調査結果の報告 — 重症度と難治性の分析 —. *日形会誌* (2013). 33, 583-590