



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 遺伝性間質性肺疾患の診断システムに関する研究                                                                          |
| Author(s)           | 秋元, 琢真                                                                                          |
| Description         | 配架番号 : 2068                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第11196号                                                                                        |
| Issue Date          | 2014-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k11196">https://doi.org/10.14943/doctoral.k11196</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/58551">https://hdl.handle.net/2115/58551</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Takuma_Akimoto.pdf                                                                              |



# 学 位 論 文

## 遺伝性間質性肺疾患の診断システムに関する研究

(The diagnostic system for hereditary interstitial lung disease in Japan)

2014 年 3 月

北海道大学

秋 元 琢 真

## 目 次

|                 |      |
|-----------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 | 1 頁  |
| 緒言              | 2 頁  |
| 略語表             | 5 頁  |
| 研究方法            | 6 頁  |
| 研究結果            | 13 頁 |
| 考察              | 25 頁 |
| 総括および結論         | 28 頁 |
| 謝辞              | 29 頁 |
| 引用文献            | 30 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. Takuma Akimoto, Kazutoshi Cho, Itaru Hayasaka, Keita Morioka, Yosuke Kaneshi, Itsuko Furuta, Masafumi Yamada, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami.  
Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan.  
*Pediatric Research* (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 秋元 琢真、早坂 格、森岡 圭太、兼次 洋介、長 和俊  
新生児遺伝性間質性肺疾患の診断支援  
第 12 回肺サーファクタント分子病態研究会、2013 年 6 月 22 日・札幌
2. 秋元 琢真、早坂 格、森岡 圭太、兼次 洋介、長 和俊  
「先天性間質性肺疾患」の診断支援：新生児希有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業中間報告  
第 58 回日本未熟児新生児学会学術集会、2013 年 11 月 30 日・金沢
3. Takuma Akimoto, Kazutoshi Cho, Itaru Hayasaka, Keita Morioka, Yosuke Kaneshi, Masafumi Yamada, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami  
Diagnostic support including genetic testing for hereditary interstitial lung disease in Japan.  
Hot Topics in Neonatology 2013, Dec 8, 2013, Washington D.C., USA

## 緒 言

小児の間質性肺疾患は、さまざまな難治性疾患を含む稀な疾患群であり、胸部X線写真あるいはCT画像上のびまん性間質性陰影と呼吸障害を呈する。間質性肺疾患のうち、遺伝子変異などの遺伝性の原因によるものを遺伝性間質性肺疾患 (hereditary interstitial lung disease, HILD) と呼ぶ。多くは新生児・乳児期に発症するが、一部に遺伝性の原因でありながら成人になって発症するものがある。HILDの主体は先天性肺胞蛋白症 (congenital pulmonary alveolar proteinosis, CPAP) と遺伝子変異による間質性肺炎であり、その原因疾患はII型肺胞上皮細胞の異常と、肺胞マクロファージの異常に大別できる。現在までにII型肺胞上皮細胞側の異常による疾患として、サーファクタント蛋白 (surfactant protein, SP) -B欠損症<sup>1</sup>、SP-C異常症<sup>2</sup>、ATP-binding cassette transporter A3 (ABCA3) 異常症<sup>3</sup>が報告されている。また、肺胞マクロファージ側の異常による疾患として、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 受容体異常症<sup>4,5</sup>、低ガンマグロブリン血症を合併する肺胞マクロファージ機能異常症<sup>6</sup>が報告されている。また、肺胞・肺毛細血管の発生異常である alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins (ACD/MPV)<sup>7</sup>、甲状腺機能低下と肺胞蛋白症類似の呼吸障害を呈する thyroid transcription factor -1 (TTF-1) 異常症<sup>8</sup>もHILDに含まれる。HILD全体の頻度は不明であるが極めて稀と考えられている。日本におけるCPAPの発生頻度は、後方視的検討から出生10万あたり0.07～0.09人と推定されている。

肺サーファクタントは肺胞腔内において、気相と液相の境界の表面張力を下げ、肺胞の虚脱を防いでいる。肺サーファクタントは約90%の脂質と約10%の蛋白質からなり、II型肺胞上皮細胞で合成・分泌される。サーファクタント蛋白としては、SP-A、SP-B、SP-CおよびSP-Dが知られている。SP-BとSP-Cは疎水性の強い小さな蛋白であり、脂質とともにラメラ体に蓄積されたのちに肺胞腔に分泌され、肺表面活性に重要な役割を担っている。SP-AとSP-Dはコレクチンに属する水溶性の蛋白であり、II型肺胞上皮細胞からSP-B・SP-Cとは独立して分泌され、主に肺における宿主防御の役割を担っている。ABCA3は大きな膜貫通型蛋白であり、II型肺胞上皮細胞のラメラ体における肺サーファクタント脂質の能動輸送に関与している。肺胞腔内で活性を失った肺サーファクタントの一部は肺胞マクロファージにより異化され、一部はII型肺胞上皮細胞にて再利用される。肺胞マクロファージは肺胞上皮細胞から分泌されるGM-CSFの刺激により単球から分化する。GM-CSF受容体は $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖から成り、GM-CSFのシグナルはsignal transducer and activator of transcription-5 (STAT-5) のリン酸化を経て下流へ伝達される。SP-B、SP-C、ABCA3の欠損や異常は間質性肺疾患の原因となるが、SP-A、SP-Dの異常による肺疾患は報告されていない<sup>9</sup>。肺胞マクロファージの機能低下は肺サーファクタントの肺胞内蓄積により肺胞蛋白症を引き起こす。

SP-B欠損症は 1993 年にNogeeらにより初めて報告された<sup>1</sup>。出生時から呼吸窮迫症候群と同様の重度の呼吸障害を呈し、人工肺サーファクタント補充療法、人工換気療法などを含む集中治療に抵抗性で致死的な疾患である。II型肺胞上皮細胞におけるSP-Cの成熟にはSP-Bが必要であるため、SP-B欠損症ではSP-BとSP-Cの両方が欠乏する<sup>10</sup>。一方、肺胞腔内にはSP-Aが蓄積してCPAPの病理像を形成する。SP-Bは2番染色体上にある*SFTPB*遺伝子にコードされており、前駆蛋白からスプライシングを経て生成される約8.7kDaの小さな蛋白である。SP-B欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとり、変異の保因者は無症状である。これまでに30以上の*SFTPB*遺伝子変異が報告されており<sup>11-14</sup>、121ins2と呼ばれるg.1549C>GAA変異が約3分の2を占めている<sup>11</sup>。欧米諸国においてはSP-B欠損症は約170万出生に1人の頻度と推定されており<sup>9</sup>、CPAPの主要な原因の一つであるが、日本においては現在までにSP-B欠損症の確定診断例の報告はない<sup>15</sup>。

SP-C異常症は2001年に間質性肺炎の母児例で初めて報告された<sup>2</sup>。発症時期は新生児期から成人期まで幅があり、呼吸症状の程度も同様に大きな幅がある。乳児期から成人期に発症する症例では間質性肺炎の症状と病理像を呈する。新生児期発症の症例では呼吸窮迫症候群と同様の呼吸障害を呈し重症であり、肺胞蛋白症の病理像を呈する例がある<sup>16</sup>。SP-Cは8番染色体上にある*SFTPC*遺伝子にコードされており、197アミノ酸からなる前駆蛋白からスプライシングを経て35アミノ酸(4kDa)の成熟SP-C蛋白が生成される。SP-C異常症は常染色体優性遺伝形式をとり、家族性間質性肺炎、家族性肺線維症の原因となる<sup>17</sup>。また、*de novo*の遺伝子変異による症例も多く存在する。これまでに40以上の*SFTPC*遺伝子変異が報告されており<sup>2,9,16-25</sup>、欧米諸国においてはp.Ile73Thr変異が最も多い<sup>9</sup>。日本においては8年間で少なくとも8例の小児期発症のSP-C異常症が報告されている。

ABCA3異常症は2004年に致死性呼吸窮迫症候群の症例において初めて報告された<sup>3</sup>。新生児期から乳児期に発症することが多く、新生児期発症例の多くは致死性である。臨床症状は肺サーファクタント欠乏に起因するものが主体であり、病理学的には間質性肺炎または肺胞蛋白症の所見を呈する。ABCA3蛋白は1704アミノ酸からなり、16番染色体上の*ABCA3*遺伝子にコードされている。ABCA3異常症は常染色体劣性遺伝形式をとり、同胞発症、血族婚の症例が多く存在する。これまでに150以上の*ABCA3*遺伝子変異が報告されており<sup>9,14,27-32</sup>、p.Glu292Val変異が最も多く報告されている。日本においては10年間で3例(うち2例は兄弟例)の症例が確認されている<sup>31,32</sup>。

GM-CSF受容体異常症は、受容体を構成する $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖の異常により引き起こされる。1997年に $\beta$ 鎖の異常によるCPAP7例が報告され<sup>4</sup>、全例が2歳未満の発症であり、そのうち3例が新生児期の発症であった。2008年に $\alpha$ 鎖の異常によるCPAPの2つの報告があり<sup>5,33</sup>、その発症時期は3歳、4歳であった。病理学的には肺胞蛋白症の所見を示すが、呼吸障害の程度は症例により様々であり、成人期に発症した

症例が存在する<sup>34</sup>。 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖はそれぞれ、X染色体偽常染色体領域上の*CSF2RA*遺伝子、22番染色体上の*CSF2RB*遺伝子にコードされており、常染色体劣性遺伝形式をとると考えられている。

ACD/MPVは肺胞と肺毛細血管の発生異常であり、重度の肺高血圧と呼吸不全を来するのが特徴である<sup>7</sup>。出生直後から特発性の新生児遷延性肺高血圧症として発症し、ほとんどが致死性であるが、稀に生後数か月で発症する症例が存在する<sup>35,36</sup>。この疾患の頻度はよくわかっていない。合併症として、先天性心疾患、腸回転異常症や消化管閉鎖などの消化器疾患、腎泌尿器異常、脊椎肋骨奇形が多く報告され、VACTER連合に合致する症例が少なくない<sup>37,38</sup>。2009年以降、ACD/MPVの症例で*FOXF1*遺伝子の欠失、変異が数多く報告されている<sup>38,39</sup>。多くは孤発例であるが、一部に同胞発症が存在する。

TTF-1は甲状腺、肺、脳に発現している転写因子の一つである。TTF-1はSP-B、SP-Cの発現の調節に関与し、肺の発達に必須と考えられている。TTF-1は*NKX2-1*遺伝子にコードされ、遺伝子変異により間質性肺疾患、甲状腺機能低下、神経症状を引き起こすことが知られている<sup>8</sup>。

間質性肺疾患の診断は、臨床経過、肺高解像度CT所見、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage, BAL)液所見、肺生検または剖検の病理学的所見によってなされる。しかし体格が小さく重篤な呼吸障害や肺高血圧を呈する児に対してBALや肺生検などの侵襲性の高い検査や、肺CTなどの搬送が必要な検査を行うことが困難である。そのため多くの場合診断に必要な情報が制限されている。また、病理学的所見に基づいた診断が重要であると同時に、治療法の選択には原因疾患の診断が必要である。急性期の治療は人工換気療法、酸素療法、肺サーファクタント補充療法を含む支持療法であり、重度の肺高血圧を合併する症例には一酸化窒素吸入療法が併用される。SP-C異常症の一部にはステロイド投与が有効であり<sup>18</sup>、SP-C異常症と*ABCA3*異常症の一部にハイドロキシクロロキンが有効である<sup>41</sup>。*ABCA3*異常症にアジスロマイシンが有効であったという報告がある<sup>42</sup>。根治的治療は、II型肺胞上皮細胞の異常であれば肺移植<sup>43</sup>、肺胞マクロファージの異常であれば骨髄移植である<sup>44,45</sup>。肺胞マクロファージの異常による肺胞蛋白症に対して肺移植を行うと再発する危険があり、移植治療には原因の確定が必要である。

しかし、HILDは非常に稀な疾患群であり、新生児科医、小児科医に十分に広く知られているとは言い難い。原因疾患の診断のための遺伝子検査についての情報は十分に周知されておらず、診断プロセスが確定していない。そのため、HILDが疑われた症例に対する診断プロセスの提示と診断の補助、さらには治療法選択の助言を行うためのシステム構築が必要である。

本研究の目的は、小児期に発症した原因不明の肺疾患からHILDを抽出し、確定診断へ誘導し有効な治療法を提案するために必要な診断システムを構築すること、および日本におけるHILDの頻度と特徴を明らかにすることである。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

|         |                                                                   |
|---------|-------------------------------------------------------------------|
| ABCA3   | ATP-binding cassette transporter A3                               |
| ACD/MPV | alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins |
| Ap.S.   | Apgar score                                                       |
| AV      | assisted ventilation                                              |
| BAL     | bronchoalveolar lavage                                            |
| BW      | birth weight                                                      |
| CAH     | congenital adrenal hypoplasia                                     |
| CLD     | chronic lung disease                                              |
| CPAP    | congenital pulmonary alveolar proteinosis                         |
| DWS     | Dandy-Walker syndrome                                             |
| GA      | gestational age                                                   |
| GERD    | gastroesophageal reflux disease                                   |
| GM-CSF  | granulocyte macrophage colony-stimulating factor                  |
| HILD    | hereditary interstitial lung disease                              |
| HLHS    | hypoplastic left heart syndrome                                   |
| HRP     | horseradish peroxidase                                            |
| ID      | immunodeficiency                                                  |
| ILD     | interstitial lung disease                                         |
| iNO     | inhaled nitric oxide                                              |
| IP      | interstitial pneumonitis                                          |
| KL-6    | Krebs von den Lungen -6                                           |
| KMS     | Kabuki make-up syndrome                                           |
| MAS     | meconium aspiration syndrome                                      |
| PAGE    | polyacrylamide gel electrophoresis                                |
| PAP     | pulmonary alveolar proteinosis                                    |
| PH      | pulmonary hypertension                                            |
| SCID    | severe combined immunodeficiency                                  |
| SP      | surfactant protein                                                |
| STAT-5  | signal transducer and activator of transcription-5                |
| TTF-1   | thyroid transcription factor-1                                    |
| URD     | unexplained respiratory distress                                  |

## 研 究 方 法

### 1. 診断システムの構築

北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科医倫理委員会に臨床研究の承認を得た後、2011年2月から電子メールとメーリングリストを利用してHILDの診断支援について日本全国の新生児科医に周知を行い、HILDを疑う症例の集積を開始した。また、2012年2月から日本未熟児新生児学会の稀有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業に登録し、日本全国の周産期センター、新生児診療施設を網羅できる体制とした。電子メール、電話等で症例に関する紹介を受け、診断に有用な検査、検査結果の解釈、鑑別診断に関する情報を提供した。また本研究の対象症例に対して、下記に記載の検査を提供した。

### 2. 対象

#### (1) 対象症例

下記1)～3)を満たす症例を対象とした。

- 1) 1歳未満で発症した治療抵抗性の呼吸不全の症例。または、16歳未満の小児で、肺胞蛋白症、特発性間質性肺炎、肺サーファクタント異常症などの間質性肺疾患が疑われたあるいは診断された症例。
- 2) 北海道大学病院周産母子センターまたは小児科に入院中の患者および日本未熟児新生児学会の新生児希有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業などを通して北海道大学病院周産母子センターへ紹介のあった症例。
- 3) 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、両親などの代諾者の自由意思による文書同意が得られた症例。

#### (2) 除外基準

感染症、先天性心疾患、染色体異常を含む奇形症候群、呼吸器の形態異常、骨系統疾患、神経筋疾患、重症新生児仮死による新生児遷延性肺高血圧症、早産や子宮内炎症に起因する慢性肺疾患など、既知の原因により説明可能な呼吸不全を除外した。

### 3. 検査項目と検査対象

- (1) *SFTPC* 遺伝子、*ABCA3* 遺伝子のダイレクトシーケンスによる遺伝子解析  
対象症例全例に行った。

- (2) *SFTPB* 遺伝子のダイレクトシーケンスによる遺伝子解析

新生児期に発症した症例のうち、呼吸障害が軽快せず人工換気療法を継続中の症例、または肺胞蛋白症が疑われた症例に行った。

- (3) BAL液または気道吸引液からのウェスタンブロッティングによるSP-B蛋白の検出  
(2)の症例のうち、BAL液または気道吸引液が利用可能な症例に行った。

- (4) GM-CSF刺激によるSTAT-5リン酸化の解析

肺胞蛋白症と診断された、または強く疑われた症例のうち、解析時点で *SFTPC* 遺伝子と *ABCA3* 遺伝子に異常を認めなかった症例に行った。

(5) *FOXF1* 遺伝子のダイレクトシーケンスによる遺伝子解析

治療に抵抗性の持続する肺高血圧症の症例に行った。

(6) 両親の遺伝子解析

疾患の原因となりうる遺伝子変異が同定された場合、十分な説明と文書による同意を得たのちに遺伝子変異部位の解析を行った。

#### 4. 診療情報の入手

各症例の入院施設の診療録から、入院施設の主治医を通して情報を入手した。

- 1) 患者基本情報:年齢、性別、身長、体重、在胎週数、出生体重
- 2) 疾患情報:臨床経過、治療内容(人工肺サーファクタント投与の有無とその効果など)
- 3) 血液検査結果:血算、肝機能、腎機能、電解質、免疫グロブリン、SP-A、SP-D、シアル化糖鎖抗原 Krebs von den Lungen -6 (KL-6)、甲状腺機能、血液ガス分析など
- 4) 画像検査所見:胸部レントゲン画像、肺 CT 画像、心エコー検査結果
- 5) 気管支肺胞洗浄:施行の有無、洗浄液の肉眼所見および病理所見
- 6) 周産期の情報:母親の妊娠経過、合併症、検査所見
- 7) 家族歴:肺疾患の家族歴の有無とその内容

#### 5. 実験方法

##### 5.1. ダイレクトシーケンス

###### (1) DNA の抽出

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen、ドイツ)を用いて行った。EDTA-2Na 採血管に採取された血液 2ml を 2500 回転で 10 分間遠心しバフィーコートを得た。溶血検体のためバフィーコートが得られない場合は全血を使用した。バフィーコートと血漿を含むサンプル 200 $\mu$ l に対して付属のカラム 1 個を用い、添付のプロトコルに従い行った。DNA の溶出は付属の buffer (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) 200 $\mu$ l にて行い、NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific、アメリカ合衆国)を用いて DNA 濃度を測定したのち 40 ng/ $\mu$ l の濃度に調製した。

###### (2) Polymerase Chain Reaction (PCR)

###### 1) プライマー

PCR に用いたプライマーを Table 1~4 に示した。*SFTPC* 増幅用のプライマーは、W.E. Lawson らの論文<sup>17</sup>に記載のものを使用した。*ABCA3*、*SFTPB*、*FOXF1* 増幅用

のプライマーは、Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を使い、coding-exon の全体と、exon と intron の境界を含んで増幅されるように設計した。設計したプライマーはシグマアルドリッチジャパン社に注文し、10 $\mu$ M の濃度に 1xTE Buffer (10mM Tris, pH 7.5~8.0, 1mM EDTA)を用いて調整した。

**Table 1 – Primer sequences and amplicon length in PCR for *SFTPC***

| Primer Name | Primers (5' to 3')     | Length |
|-------------|------------------------|--------|
| PP1F        | CTCACCCAGGTTTGCTCTTG   |        |
| PP1R        | TGAAGTTTCTCATGGCTTCTGA | 551    |
| PP2F        | GGGACACCAAGACCACTAAGC  |        |
| PP2R        | CATGAGGTCATGAGGCTGTC   | 531    |
| PP3F        | CTCTGTATCACCGCATGGAG   |        |
| PP3R        | CCTCTGTCTGGCATGTCCT    | 540    |
| PP4F        | CATGGGTCTCCACATGAGC    |        |
| PP4R        | ACCCACCTGCTGGTAGTCAT   | 511    |
| PP5F        | CCAGGTTCTGGAGATGAGCA   |        |
| PP5R        | CTGGCTTGTAGGCGATCAGC   | 381    |
| PP6F        | CTGGTTACCACTGCCACCTT   |        |
| PP6R        | AATAGCCACCATTTCGGACAC  | 484    |
| PP7F        | CCGAATGGTGGCTATTTGTC   |        |
| PP7R        | AGCGAGCCTCCTCCACAG     | 524    |
| PP8F        | CCGGTGAGCAGGTGTGAT     |        |
| PP8R        | CCACTTTGCTCTCCCAAGG    | 508    |
| PP9F        | ATGGGAGTGGGCAGAGGT     |        |
| PP9R        | AAAGCCCGTGGATGCTCCCT   | 257    |

**Table 2 - Primer sequences and amplicon length in PCR for *SFTPB***

| Primer Name | Primers (5' to 3')    | Length |
|-------------|-----------------------|--------|
| EXON1F      | AGGGCTCTTCAGAGCAAAGAC |        |
| EXON1R      | AAGCAGTGCTCAGTGAGTGGT | 244    |
| EXON2F      | AAATCATGATGCCAGGTGTGT |        |
| EXON2R      | CCAGCACCCCTTCATTCAGAC | 245    |
| EXON3F      | CCTAAGAGAACCTCCCCATTG |        |
| EXON3R      | TGCTCTGTCCCTCATCTCTTG | 207    |
| EXON4F      | GCGGGGTAGACCTCAGAGAG  |        |
| EXON4R      | CAGGCAGGAGGTGAGCTTG   | 206    |
| EXON5F      | CTGAATAGGGGTGGGCTTC   |        |
| EXON5R      | TGGAGCTTCCTATCACCTTC  | 366    |
| EXON6F      | GGGAGAGAAAAGGAGGAAGAG |        |
| EXON6R      | CTGCAGGGAGCTACAGGTATG | 241    |
| EXON7F      | GAGGCTTGCCAAGTGAAGGT  |        |
| EXON7R      | AGGGTAGGGGGAGGAGGAG   | 292    |
| EXON8F      | ACCAAGGAGGACAGAAACCAA |        |
| EXON8R      | CTCAGCCTTCTGCCTTGAAC  | 278    |
| EXON9F      | AGGACCACACGACAGGAGAGT |        |
| EXON9R      | GGAGTGAGGCCTCTGAGGAT  | 235    |
| EXON10F     | GGAGGTGGAGTGAGTGCTGTT |        |
| EXON10R     | CTCCATGCCCTGATGGTC    | 239    |

**Table 3 - Primer sequences and amplicon length in PCR for *FOXFI***

| Primer Name | Primers (5' to 3')    | Length |
|-------------|-----------------------|--------|
| EXON1aF     | GTCCTCTTCCTCCTCCTCCTC |        |
| EXON1aR     | CCCTCCTCGAACATGAAGTC  | 493    |
| EXON1bF     | TGCTTCATCAAGCTACCCAAG |        |
| EXON1bR     | GTGGCTGTTCTGGTGCAGATA | 645    |
| EXON1cF     | CAAGCCCATGTACAGCATGA  |        |
| EXON1cR     | CTGCCACTCAGACTCGACTTC | 583    |
| EXON2F      | CCTCTGCCTGAAGTCTGAGC  |        |
| EXON2R      | GTGTCTTTGCATTGGGGACT  | 398    |

**Table 4 - Primer sequences and amplicon length in PCR for *ABCA3***

| Primer Name | Primers (5' to 3')      | Length |
|-------------|-------------------------|--------|
| EXON1F7     | AGACTTCCACTGCTGCGAAAC   | 909    |
| EXON1R3     | GCTGTCCGTCGCTACATATCC   |        |
| EXON2F      | CGGCCAGGTGTTTATTTTCTA   |        |
| EXON2R      | CCTCCCTTACTGGAAGTCTGG   | 514    |
| EXON3F      | GAGCGCTAGCTCATGGTGAT    |        |
| EXON3R      | GGCAACATAGCAAGACCCTATC  |        |
| EXON4F2     | AAGTGGCACAAAAGAAGGTGA   | 519    |
| EXON4R2     | ATACAATAGGGCACGGTGATG   |        |
| EXON5F2     | CAGACTCTGGAGGGAGGTCAG   |        |
| EXON5R2     | GAAGAAGCAGAGGCCAAGTCT   | 531    |
| EXON6F      | AGAGGATTTGCCGTCTTTCAT   |        |
| EXON6R      | AAGGGAAAGCAGTGCCTTTTA   |        |
| EXON7F      | GAGTGGTGAGTTCTCGGCTGT   | 331    |
| EXON7R      | GCCAAATGTCCTGAAAAGTATT  |        |
| EXON8F      | AAGTCACTCTGTTGCCCCAAG   |        |
| EXON8R      | ACAGAGCGAGACTCCAACCTCA  | 490    |
| EXON9F      | ATCACTTGAGCCCAGGAGTTT   |        |
| EXON9R      | GAGAGGAGTGGGACATTGACA   |        |
| EXON10F     | TGGGAAGAACTTTGTGGTCAG   | 438    |
| EXON10R     | CTTCCTCCTTCCAGTCCAAC    |        |
| EXON11F     | AGCTTGTGTCCCGTGTAGATG   |        |
| EXON11R     | AGCTATCCAGCCCACACTCAG   | 488    |
| EXON12F     | GCTTGAAGAAAGCTGTCCAAC   |        |
| EXON12R2    | GCTCTGAAGCGGAAGGATTAC   |        |
| EXON13F     | CACAGGGATGAAACAAGTTGG   | 579    |
| EXON13R     | CTGCCGTGCTGGTAAGTCTTC   |        |
| EXON14F     | CAGGGTTGCAGAGACACTGAG   |        |
| EXON14R     | GCGCTGAGATGGTGTTAAAGG   | 419    |
| EXON15F     | TCAGAGGAAATTAGGGGAGACA  |        |
| EXON15R     | TCCCTTCCTCCAGTTTAGCTC   |        |
| EXON16F     | GGTTCCTCTCACCAGAACCTC   | 352    |
| EXON16R     | GAGTCCTCCAAGGATGGTGAT   |        |
| EXON17F     | CATCACCATCCTTGGAGGACT   |        |
| EXON17R     | CAGAGGCAACAGACAGGAAGT   | 466    |
| EXON18F     | CTCCGGTTCTCTAGCCTCCTT   |        |
| EXON18R     | CTCTGAGCACAAAGCCCTCAT   |        |
| EXON19F     | GACTGGTATCGAACTCCTGATCT | 351    |
| EXON19R3    | ACTTCCTCCATGGTGGTGATG   |        |
| EXON20F     | CATAAGCAGATGCATGAGCAA   |        |
| EXON20R     | GTGCCTGAGGTAGAGCATGAG   | 535    |
| EXON21F     | CGTCACACAGAACAGCACCTG   |        |
| EXON21R     | GAACAGCCAAGAACCATCCTC   |        |
| EXON22F     | CTATTGGGTCCCTGATTAGCC   | 510    |
| EXON22R     | GGGCAGACACAATGCTCTATC   |        |
| EXON23F     | CTCCCATAAAGCCCCTTTAGTG  |        |
| EXON23R     | ATTCCAGCTGTCCTCCCTGAG   | 470    |
| EXON24F     | ACCTCCAAATGCTCCTCTCAC   |        |
| EXON24R     | CTTATCCGTGCTGTGTGGAGT   |        |
| EXON25F     | ACTCCACACAGCACGGATAAG   | 562    |
| EXON25R     | CCTTGTTACAGATGCCCAGAC   |        |
| EXON26F     | TGACCTACTGGCCTTCACATC   |        |
| EXON26R     | CCGTACAGTGGGAGACCATCT   | 453    |
| EXON27F     | AAGGCCTTAGTCCCACCAGAC   |        |
| EXON28R     | CATTCAAGCCACAGATGCAG    |        |
| EXON29F     | ACTGGCAGGAACCACAGACAG   | 711    |
| EXON29R     | GCTCTATGCTATGGGGACCTT   |        |
| EXON30F     | ATGGGAGCCAATGCTAACTCT   |        |
| EXON30R     | GAACCTTGCTCTTGAGGTGCTG  | 545    |
| EXON31F     | CACAGCATGGAGGAGTGTGAG   |        |
| EXON32R     | TGGAAAGTGACTCCTCTGTGG   |        |
| EXON33F3    | CTTAGCCAGCGTCTCTACCT    | 591    |
| EXON33R3    | CATTCTGTGCATACTGCCTTG   |        |
| EXON33F4    | GGCCCATCTTACATCCTCTCT   |        |
| EXON33R4    | TGCTTCTAGGAGATGCTGTGG   | 570    |
| EXON33F5    | GAATGGACCATGCAGATCACT   |        |
| EXON33R5    | CAGTGTATTCTCTGCGTGTGC   |        |

## 2) PCR反応液の調製

PCR 反応液は総量を 20 $\mu$ l とし、AmpliTaq Gold 360 PCR Master Mix (Life Technologies、アメリカ合衆国) 10 $\mu$ l を含み、各プライマーの最終濃度は 0.5 $\mu$ M、DNA テンプレート量は 40ng となるよう調製した(Table 5)。ABCA3 の exon1 は、GC 濃度が高く増幅されにくいいため、酵素キット付属の 360 GC Enhancer を 20 $\mu$ l に対して 4 $\mu$ l 添加した。

**Table 5 - PCR 反応液の組成**

| 試薬                                              | 1 反応当たり    |
|-------------------------------------------------|------------|
| AmpliTaq Gold 360 PCR Master Mix                | 10 $\mu$ l |
| Water                                           | 7 $\mu$ l  |
| Forward Primer (10 $\mu$ M)                     | 1 $\mu$ l  |
| Reverse Primer (10 $\mu$ M)                     | 1 $\mu$ l  |
| DNA (40ng/ $\mu$ l) or Water (negative control) | 1 $\mu$ l  |

## 3) PCR 反応

PCR 反応は GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems、アメリカ合衆国) を用いて行った。反応条件は、下記の Table 6 に示したように、3 ステップまたは 2 ステップで行った。3 ステップのアニーリング温度は、FOXF1 では 58 $^{\circ}$ C、その他では 60 $^{\circ}$ C とした。非特異的バンドが現れやすい ABCA3 の exon8,9,16,19,27,28 と、SFTPC の PP9F/9R の反応は 2 ステップの条件で行った。

**Table 6 - PCR 反応条件**

| <u>3 ステップ</u>             |                      | <u>2 ステップ</u>   |                      |
|---------------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| 95 $^{\circ}$ C           | 10分間                 | 95 $^{\circ}$ C | 10分間                 |
| 95 $^{\circ}$ C           | 30秒間                 | 95 $^{\circ}$ C | 30秒間                 |
| 58 $\sim$ 60 $^{\circ}$ C | 30秒間                 | 63 $^{\circ}$ C | 60秒間 $\times$ 40サイクル |
| 72 $^{\circ}$ C           | 60秒間 $\times$ 40サイクル | 72 $^{\circ}$ C | 7分間                  |
| 72 $^{\circ}$ C           | 7分間                  |                 |                      |

#### (4) アガロースゲル電気泳動

2.0%アガロースゲルをアガロースと 0.5X Tris buffered saline を用いて作成し、135V で 30 分間電気泳動した。泳動後紫外線照射撮影を行い PCR 産物のバンドを確認した。サイズマーカーは TriDye 100bp DNA Ladder (New England Biolabs、イギリス)を使用した。

#### (5) PCR 産物の抽出

電気泳動したアガロースゲルから、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて PCR 産物の抽出を行った。メス刃を用いて目的のバンドをおよそ 150 $\mu$ l の大きさで 1.5ml のマイクロチューブに切り出し、添付のプロトコルに従い行った。PCR 産物の溶出は付属の buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5)にて行った。

#### (6) ダイレクトシーケンス

株式会社ファスマックに依頼して行った。それぞれの PCR 産物につき、PCR に使用したプライマーを用いて両方向からシーケンスした。PCR 産物を抽出した溶液 13.4 $\mu$ l とプライマー溶液 0.64 $\mu$ l (プライマー6.4pmol)を混合し、8 連チューブまたは 96 ウェルで提出した。

#### (7) シークエンス波形解析・比較

シーケンス波形シグナルの確認は、4peaks (フリーソフト、Mek&Tosj.com)を用いて目視で行った。参照配列との比較は、Clustalw (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)、Identity X (フリーソフト、<http://home.hiroshima-u.ac.jp/kei/IdentityX/>)、Microsoft Word を利用して行った。参照配列は以下を用いた。: NM\_003018.3 (*SFTPC*), NM\_001089.2 (*ABCA3*), NM\_001451.2 (*FOXFI*), NM\_198843.2 (*SFTPB*).

### 5.2 BAL 液または気道吸引液からの SP-B 蛋白検出

#### (1) サンプル調製

BAL 液または気道吸引液の蛋白濃度を BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific)により測定し、蛋白 20 $\mu$ g に相当する BAL 液または気道吸引液を、1/5 量の 6X Laemmli サンプルバッファーと混合し 95 $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベートした。溶液の総量が 30 $\mu$ l を超える場合は 30 $\mu$ l に減量できるまで濃縮した。

#### (2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Schrägerらが報告した Tricine SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)<sup>46</sup>を参考に、BIO-RAD ミニプロテイン3 セル (BIO-RAD、アメリカ合衆国)を用いて行った。16% ポリアクリルアミドゲルを使用し、泳動バッファーは、下部バッファー槽に 0.2M Tris-HCl (pH

8.9)、上部バッファー槽の内側に 0.1M Tris, 0.1M Tricine, 0.1% SDS を使用した。stacking まで 30mA、以降 50mA の定電流でサイズマーカーがゲルの下端に達する前まで泳動した。サイズマーカーには Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare、イギリス)を使用した。

### (3) ウェスタンブロッティング

セミドライ式ウェスタンブロッティング装置である BIO-RAD トランスブロット SD セル (BIO-RAD)を用いて行った。転写用PVDFメンブレンは0.2 $\mu$ mの Immobilon-P (Millipore、アメリカ合衆国)を使用し、転写バッファーは 10%メタノールを含む 10mM 3-(cyclohexyl amino)-1-propan sulfonic acid 溶液を使用した。ブロッキングは 3%スキムミルク、0.05% Tween20を含む Tris buffered saline で行い、一次抗体反応は 50 倍希釈した抗ヒト SP-B ポリクローナル抗体(Hycult、ドイツ)を用い室温で 1 時間、二次抗体反応は 1000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare)を用い 4°C、overnight で行った。発色は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を用いてプロトコルに従って行い、LAS-1000UV (Fujifilm、東京)で検出した。

## 5.3 GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化の解析

末梢血単核球を RPMI 10%FBS にて  $1 \times 10^6$ /ml に suspend し、コントロールと患者それぞれ 0.5ml ( $5 \times 10^5$  個細胞)を用いて、10 ng/ml の GM-CSF で 15 分間刺激群、無刺激群を用意した。それらを遠心して得られたペレットに 1xSDS サンプルバッファー12.5 $\mu$ l を加え、ペレットが完全に消失するまで sonication してから、0.5 $\mu$ l の Benzonase (25 units/ $\mu$ l, Novagen)を加え、室温で 30 分インキュベートした。さらに 15,000 回転で 10 分間遠心し 4 分間 boil したのち、15,000 回転、室温で 5~10 分間遠心し、その 12 $\mu$ l を SDS-PAGE に使用した。SDS-PAGEは10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、Glycine/SDS-PAGEの標準的プロトコルにて行った。ウェスタンブロッティングは、一次抗体として 500 倍希釈抗リン酸化 STAT-5 抗体 (BD、アメリカ合衆国)を用い、二次抗体として 2000 倍希釈 HRP 標識抗マウス IgG (GE Healthcare)を用いた。発色検出は ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を使用した。

## 研 究 結 果

### 1. 対象症例

2011 年 2 月から 2013 年 7 月までの 2 年 6 か月間に、43 例の対象症例があった。34 例が新生児期の発症であり(case E1～E34)、そのうち 29 例が出生時の発症であった。9 例が生後 4 週以降の発症であり(case L1～L9)、そのうち乳児が 7 例、幼児が 2 例であった。症例の臨床情報を、新生児期発症の症例と生後 4 週以降発症の症例に分けて Table 7.に示す。

新生児期発症の 34 例の在胎週数は中央値 38 週(範囲 28～41 週)であり、5 分のアプガースコア 7 点未満の新生児仮死は 5 例(15%)、人工換気療法が施行された症例は 30 例(88%)、一酸化窒素吸入療法(inhaled nitric oxide, iNO)が施行された症例は 16 例(47%)であった。紹介時点での暫定診断は、間質性肺炎が 2 例、肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis, PAP)が 1 例、不明の呼吸障害が 31 例であった。不明の呼吸障害 31 例のうち、出生直後の発症で羊水混濁を伴い胎便吸引症候群(meconium aspiration syndrome, MAS)の可能性のある症例が 8 例、早産に伴う慢性肺疾患(chronic lung disease, CLD)の合併がある症例が 4 例であった。生後 4 週以降発症の 9 例の発症時期は中央値 6 か月(範囲 3～60 か月)であり、人工換気療法が施行された症例は 5 例(55%)、一酸化窒素吸入療法を施行された症例は 2 例(22%)であった。紹介時点での暫定診断は、間質性肺炎(interstitial pneumonitis, IP)3 例、肺胞蛋白症の疑い 1 例、Dandy-Walker 症候群に合併した呼吸障害 1 例、免疫不全症に合併した呼吸障害 2 例、CLD に遅発性に発症した肺高血圧症 1 例、左心低形成症候群(hypoplastic left heart syndrome, HLHS)に合併した肺胞蛋白症の疑い 1 例であった。

最終的に診断された間質性肺疾患は 9 例あり、間質性肺炎 4 例、肺胞蛋白症 3 例、ACD/MPV 2 例であった。間質性肺炎 4 例のうち 3 例は肺生検組織所見により、1 例は 2 年間の臨床経過、肺 CT 所見、血清マーカー(KL-6)高値<sup>47,48</sup>により診断された。肺胞蛋白症の 3 例のうち 1 例が剖検病理組織所見により、2 例は肺 CT 所見と BAL 液の肉眼・光顕所見により診断された。ACD/MPV の 1 例は肺生検、1 例は剖検の組織所見により診断された。その他に呼吸障害との関連が示唆される診断として、胃食道逆流症<sup>49</sup>、先天性副腎低形成、Kabuki make-up syndrome<sup>50</sup>、重症複合型免疫不全症<sup>51</sup>がそれぞれ 1 例あり、その他の 30 例では呼吸障害の原因が確定されなかった。

**Table 7. Characteristics of referred 43 cases**

| Case              | Onset        | GA(wk)/BW(g) | Ap.S.(1,5min) | iNO | AV  | Presumptive Diagnosis | Final Diagnosis   |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|-----|-----|-----------------------|-------------------|
| Early Onset Cases |              |              |               |     |     |                       |                   |
| E1                | at birth     | 40/3204      | 9,10          | No  | Yes | PAP (BAL)             | PAP (CT, BAL)     |
| E2                | 6days        | 40/2600      | 10,10         | No  | Yes | IP (CT)               | PAP (autopsy)     |
| E3                | 2weeks       | 38/3520      | -,9           | No  | Yes | IP (biopsy)           | IP (biopsy)       |
| E4                | at birth     | 40/3230      | 9,9           | Yes | Yes | URD                   | PAP (CT, BAL)     |
| E5                | 1day         | 39/3024      | 9,10          | Yes | Yes | URD                   | ACD/MPV (autopsy) |
| E6                | at birth     | 40/3194      | 8,8           | No  | Yes | URD                   |                   |
| E7                | at birth     | 41/3092      | 4,5           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E8                | at birth     | 37/1822      | 3,9           | Yes | Yes | URD                   |                   |
| E9                | at birth     | 38/2869      | 7,9           | No  | Yes | MAS, URD              |                   |
| E10               | at birth     | 39/3300      | 7,8           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E11               | at birth     | 27/1028      | 1,7           | No  | Yes | CLD, URD              |                   |
| E12               | at birth     | 36/2164      | 8,9           | No  | Yes | URD                   |                   |
| E13               | at birth     | 37/3060      | 9,9           | Yes | Yes | URD                   | CAH               |
| E14               | at birth     | 39/3190      | 5,9           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E15               | at birth     | 39/2894      | 7,7           | Yes | Yes | URD                   |                   |
| E16               | at birth     | 38/2634      | 8,9           | Yes | Yes | URD                   |                   |
| E17               | at birth     | 41/3852      | 2,5           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E18               | 11days       | 37/2630      | 8,9           | No  | No  | URD                   | GERD              |
| E19               | at birth     | 28/1153      | 1,5           | No  | Yes | CLD, URD              |                   |
| E20               | at birth     | 37/2766      | 8,9           | No  | Yes | URD                   |                   |
| E21               | at birth     | 27/1278      | 2,6           | No  | Yes | CLD, URD              |                   |
| E22               | 5days        | 41/3504      | 8,8           | No  | No  | URD                   |                   |
| E23               | at birth     | 25/814       | 2,2           | No  | Yes | CLD, URD              |                   |
| E24               | at birth     | 39/3216      | 8,8           | No  | No  | URD                   |                   |
| E25               | at birth     | 41/3120      | 8,8           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E26               | at birth     | 38/3328      | 7,9           | No  | Yes | URD                   |                   |
| E27               | at birth     | 40/3242      | 7,8           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E28               | at birth     | 41/3800      | 6,7           | Yes | Yes | MAS, URD              |                   |
| E29               | at birth     | 36/3260      | 6,9           | No  | Yes | URD                   |                   |
| E30               | at birth     | 31/1500      | 1,1           | Yes | Yes | URD                   |                   |
| E31               | at birth     | 38/3292      | 9,10          | No  | No  | URD                   | KMS               |
| E32               | at birth     | 37/2685      | 8,8           | No  | Yes | URD                   |                   |
| E33               | at birth     | 38/2868      | 8,8           | Yes | Yes | URD                   |                   |
| E34               | at birth     | 40/3076      | -             | Yes | Yes | URD                   |                   |
| Late Onset Cases  |              |              |               |     |     |                       |                   |
| L1                | 5months      | 41/3060      | -             | No  | No  | IP (CT)               | IP (CT)*          |
| L2                | 3months      | 41/3344      | -             | Yes | Yes | PAP (CT)              | ACD/MPV (biopsy)  |
| L3                | 8months      | 27/778       | -             | No  | Yes | CLD, PH               |                   |
| L4                | 5years       | 41/3912      | -             | No  | No  | IP (biopsy)           | IP (biopsy)       |
| L5                | 1year6months | -/-          | -             | No  | No  | IP                    | IP (biopsy)       |
| L6                | 1year        | 37/2856      | -             | No  | Yes | ID                    | SCID              |
| L7                | 3months      | -/-          | -             | No  | No  | ID                    |                   |
| L8                | 3months      | 40/2994      | 8,9           | No  | Yes | DWS, IP (CT)          |                   |
| L9                | 6months      | 38/2838      | 8,5           | Yes | Yes | HLHS, PAP             |                   |

GA, gestational age; BW, birth weight; Ap.S., Apgar score; iNO, inhaled nitric oxide; AV, assisted ventilation; PAP, pulmonary alveolar proteinosis; IP, interstitial pneumonitis; URD, unexplained respiratory distress; MAS, meconium aspiration syndrome; CLD, chronic lung disease; ID, immunodeficiency; DWS, Dandy-Walker syndrome; HLHS, hypoplastic left heart syndrome; CAH, congenital adrenal hypoplasia; GERD, gastroesophageal reflux disease; KMS, Kabuki make-up syndrome; ACD/MPV, alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins; SCID, severe combined immunodeficiency; \*, IP was diagnosed based on medical history, computed tomography, and blood parameter of KL-6.

## 2. 検査結果

### (1) *SFTPC*、*ABCA3* のダイレクトシーケンスによる遺伝子解析

対象症例 43 例の全例に *SFTPC* と *ABCA3* の遺伝子解析を行い、間質性肺疾患と診断された 5 例に遺伝子変異を認めた。肺胞蛋白症の 2 例と間質性肺炎の 2 例の 4 例にヘテロ接合性の *SFTPC* 遺伝子変異を認め (Case E1～E3, L1)、肺胞蛋白症の 1 例に複合ヘテロ接合性の *ABCA3* 遺伝子変異を認めた (Case E4)。また、出生直後に発症し生後 1 か月で軽快した呼吸障害の症例 (case E6) と、生後 8 か月時に呼吸障害と肺高血圧を発症した早産児の症例 (case L3) の 2 例に、それぞれ 2 つの *ABCA3* 遺伝子変異を認めた。

### (2) *SFTPB* のダイレクトシーケンスによる遺伝子解析

### (3) BAL 液または気道吸引液からのウェスタンブロッティングによる SP-B 蛋白の検出

*SFTPB* の遺伝子解析を行った 21 例に遺伝子変異を認めなかった。また、21 例のうち 17 例に SP-B 蛋白の解析を行い、全例の検体から SP-B 蛋白を検出した。以上から解析を行った 21 例全例において SP-B 欠損症が否定された。

### (4) GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化の解析

臨床的に肺胞蛋白症と診断された症例と肺 CT にて肺胞蛋白症が強く疑われた症例のうち、遺伝子変異が同定されていなかった 2 症例 (Case E2, L2) に施行した。両例ともに STAT-5 のリン酸化が正常に確認され、GM-CSF 受容体異常による CPAP は否定的であった。

### (5) *FOXF1* のダイレクトシーケンスによる遺伝子解析

治療抵抗性の肺高血圧症の 4 例に行った。肺 CT にて肺胞蛋白症が強く疑われ、肺生検にて ACD/MPV と診断された症例 (Case L2) にヘテロ接合変異を認めた。剖検にて ACD/MPV と診断された症例 (Case E5) については *FOXF1* 遺伝子解析の同意が得られなかった。

### 3. 遺伝子変異に関する検討(Case E1～E4, E6, L1～L3)

本研究内で同定された遺伝子変異・多型について疾患の原因となりうるか検討した。dbSNP 等の一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)データベースにて1%以上の頻度であるものは検討から除外した。

#### (1) Case E1

出生当日に重度の呼吸障害を発症し、肺 CT にてびまん性スリガラス影を認め、BAL 液は乳白色の外観とPAS 染色陽性かつ SP-A 染色陽性であり、臨床的に肺胞蛋白症と診断された。肺生検は施行されていない。3か月間の人工換気療法を経て現在在宅酸素療法で肺移植待機中であり、ハイドロキシクロロキン投与は無効であった。*SFTPC* の exon2 に p.Leu45Arg のヘテロ接合体を認めた(図1)。2010年にPoterjoy BS らが p.Leu45Arg による HILD を報告しており、同様に生後間もなく重度の呼吸障害を発症し肺移植を必要とした症例であった<sup>36</sup>。両親の遺伝子解析を施行したところ同部位に変異は確認されなかった。Case E1 に発症した肺胞蛋白症は *SFTPC* p.Leu45Arg による CPAP であり、*de novo* で発症した可能性が高いと考えられた。

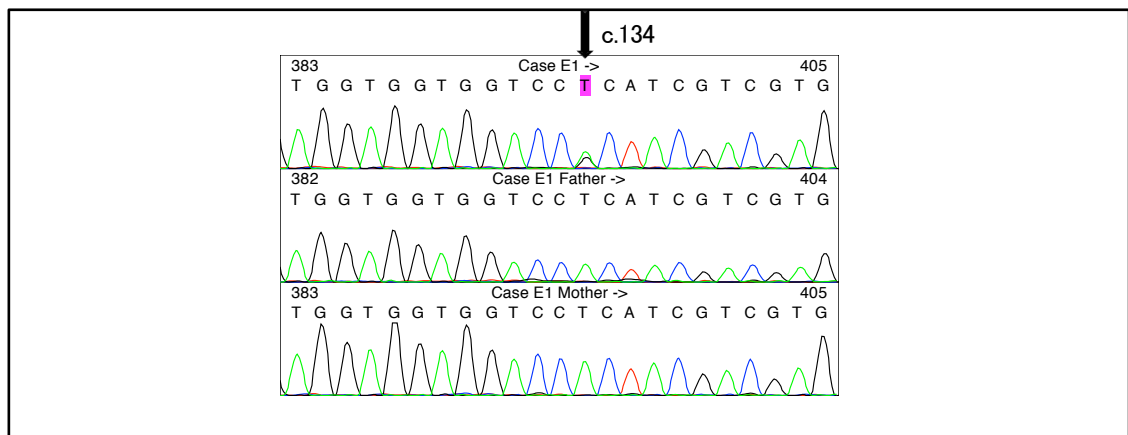


図1 Case E1 と両親の *SFTPC* 遺伝子解析結果

Case E1 では exon2 の c.134 で T/G の mixed signal となっており、c.134T>C, p.Leu45Arg のヘテロ接合体と考えられる。両親の塩基配列には変異を認めない。

## (2) Case E2

生後 6 日に重度の呼吸障害を発症し、肺 CT にて地図状分布のスリガラス影を認めた。人工換気療法、人工肺サーファクタント補充療法、ステロイド剤投与、ハイドロキシクロロキン投与などを含む治療が行われたが、生後 77 日に死亡した。剖検肺組織にて炎症細胞浸潤、間質の線維化、肺腔内の SP-A 染色陽性物質の充満があり、肺胞蛋白症の所見であった。*SFTPC* exon4 に p.Gln145fs のヘテロ接合体を認めた(図 2)。p.Gln145fs の文献報告は過去にないが、p.Gln145His を初めとして、数多くの Gln145 以降のアミノ酸の変異が HILD と関連することが報告されており<sup>20,21</sup>、Case E2 は *SFTPC* p.Gln145fs による CPAP の可能性が高いと考えられた。

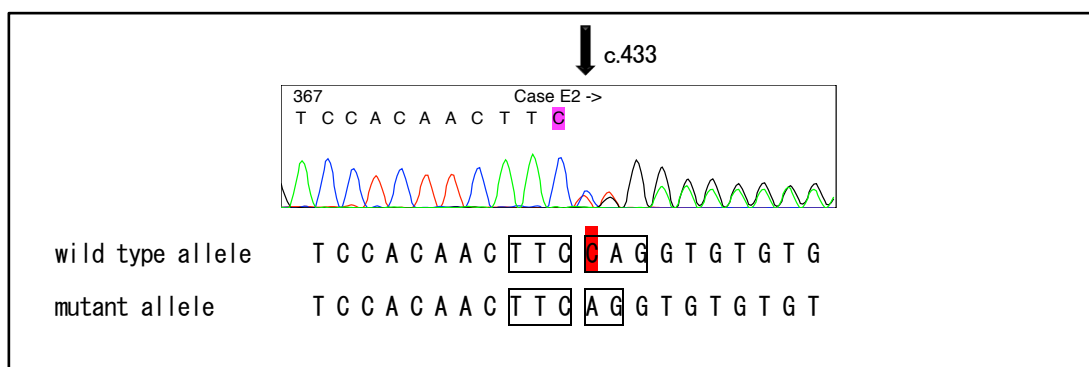


図 2 Case E2 の *SFTPC* 遺伝子解析結果

c.433 以降の mixed signal の解析から c.433delC のヘテロ接合体であることがわかる。exon4 の最後の codon である codon145 以降フレームシフトが起こるが、splice site であるため置換されるアミノ酸は断定できない。(c.433delC, p.Gln145fs)

### (3) Case E3

生後2週で呼吸障害を発症し、肺CTにてびまん性スリガラス影が認められ、肺生検にて間質性肺炎と診断された。生検後に呼吸障害が悪化し、数か月間の人工換気療法と気管切開、ステロイドパルス療法、免疫抑制剤などで治療された。*SFTPC* 遺伝子解析にて、exon3 に p.Ser72Asn のヘテロ接合体と、p.Gly100Ala のヘテロ接合体を認めた(図 3)。これら 2 つの変異の文献報告はない。蛋白機能への影響の予測は、SIFT、Polyphen-2 などのツールと、多種間でのアミノ酸の保存度の併用が有用である<sup>52</sup>。Ser72、Gly100 はいずれも多種間でよく保存されており(図 4)、p.Ser72Asn は SIFT、Polyphen-2 のいずれによっても”damaging”の判定であった(Table 8.)。p.Gly100Ala は polyphen-2 では”damaging”、SIFT では”tolerated”の判定であったが、同じ Gly100 の変異である、p.Gly100Val、p.Gly100Ser による HILD が報告されている<sup>20,25</sup>。以上から、2 つの変異いずれも Case E3 の HILD の原因である可能性が高いと考えられたが、これまでに 2 つの変異を有する SP-C 異常症の報告はない。

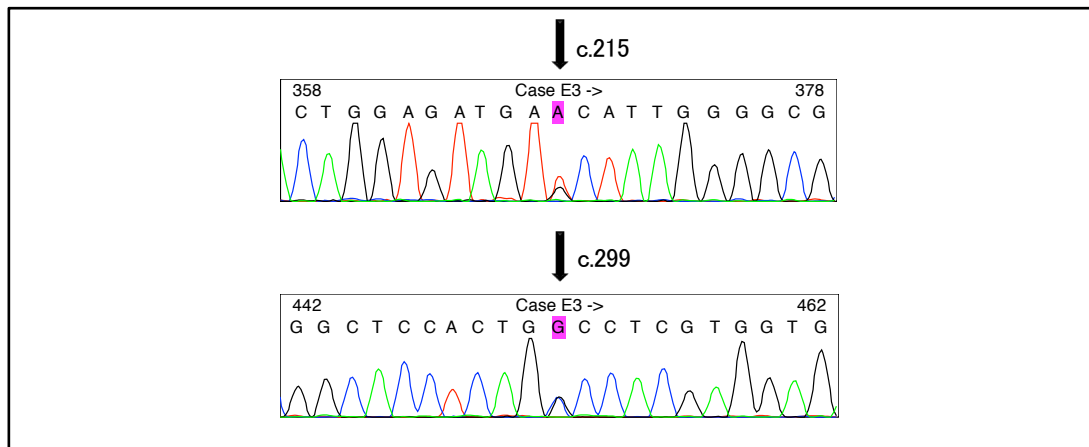


図3 Case E3 の *SFTPC* 遺伝子解析結果

上段: *SFTPC* exon3 に c.215G>A, p.Ser72Asn のヘテロ接合体を認める。

下段: *SFTPC* exon3 に c.299G>C, p.Gly100Ala のヘテロ接合体を認める。

|                             |                                                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| <u><i>H.sapiens</i></u>     | VGALLMGLHMSQKHTEMVLEMSIGAPEAQQRLLALSEHLVTTATFSIGSTG |
| <u><i>P.troglodytes</i></u> | VGALLMGLHMSQKHTEMVLEMSIGAPEAQQRLLALSEHLVTTATFSIGSTG |
| <u><i>M.mulatta</i></u>     | VGALLMGLHMSQKHTEMVLEMSIGAPEAQQHLARSGHLVTTATFSFGSTG  |
| <u><i>B.taurus</i></u>      | VGALLMGLHMSQKHTEMVLEMSITGPEAQQRLLALSERVGTATFSIGSTG  |
| <u><i>R.norvegicus</i></u>  | VGALLMGLHMSQKHTEMVLEMSIGGPETQKRLALSEHTDTIATFSIGSTG  |
| <u><i>C.lupus</i></u>       | VGALLMGLHMSQKHTEMVLEMSMGGPEAQQRLLALQERVGTATFSIGSTG  |

図4 前駆 SP-C 蛋白のアミノ酸配列の多種間比較(Val51～Gly100)

は乳類の前駆 SP-C 蛋白のアミノ酸配列の一部を示す。Lys63、Ser72、Gly100 のいずれも多種間でよく保存されている。

#### (4) Case L1

生後 5 か月時に多呼吸、チアノーゼの初発症状で発症し、肺 CT にてびまん性スリガラス影と多発嚢胞が認められ、2 年の治療経過と KL-6 高値(最大値 15400 U/ml)の所見と合わせ、間質性肺炎と診断された。肺生検は施行されておらず、酸素療法、ステロイド剤、ハイドロキシクロロキン等により治療を継続されている。母方祖父に肺線維症、母方伯父に気胸の既往がある。*SFTPC* exon2 に p.Lys63Glu のヘテロ接合体を認め、母親にも同じ変異を認めた(図 5)。p.Lys63Glu による HILD の文献報告はないが、SIFT、Polyphen-2 のいずれも”damaging”の判定であり(Table 8.)、Lys63 は多種間でよく保存されている(図 4)。母親は未発症であるが、母方祖父が肺線維症を発症していることから、Case L1 の間質性肺炎は p.Lys63Glu が原因と考えられた。

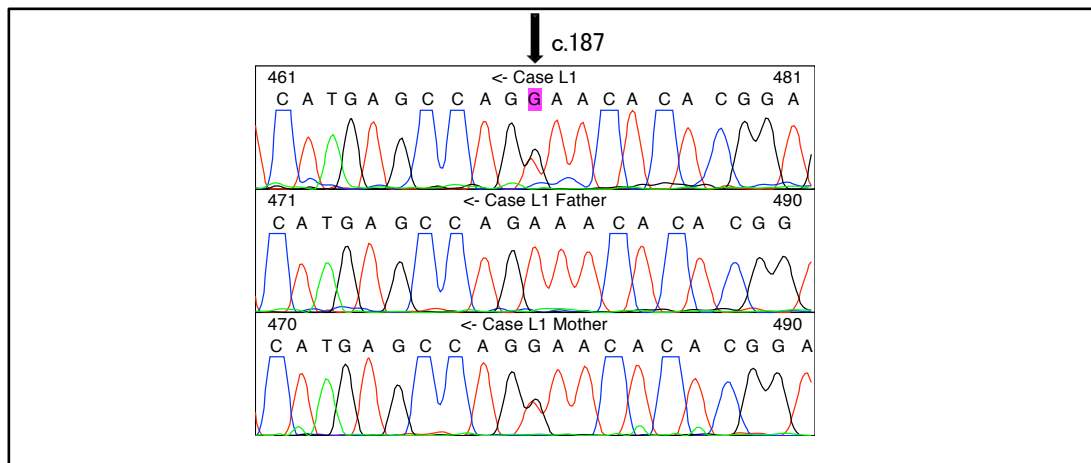


図 5 Case L1 と両親の *SFTPC* 遺伝子解析結果

Case L1 とその母親の *SFTPC* exon2 に c.187A>G, p.Lys63Glu のヘテロ接合体を認める。父親には変異を認めない。

(5) Case E4

出生 1 時間後に呼吸障害を発症し、人工換気療法、人工肺サーファクタント補充療法、ステロイド剤などによる治療が継続された。肺 CT にてびまん性の間質陰影、crazy paving pattern が認められ、BAL にて白濁の外観を呈する BAL 液が得られ、臨床的に肺胞蛋白症と診断された。*ABCA3* exon29 に p.Val1495CysfsX21 のヘテロ接合体と、exon31 に p.Arg1583Trp のヘテロ接合体を認めた(図 6)。これら 2 つの変異の文献報告はない。p.Arg1583Trp は、SIFT、Polyphen-2 では”damaging”の判定であり(Table 8.)、Arg1583 は多種間でよく保存されたアミノ酸であった(図 7)。

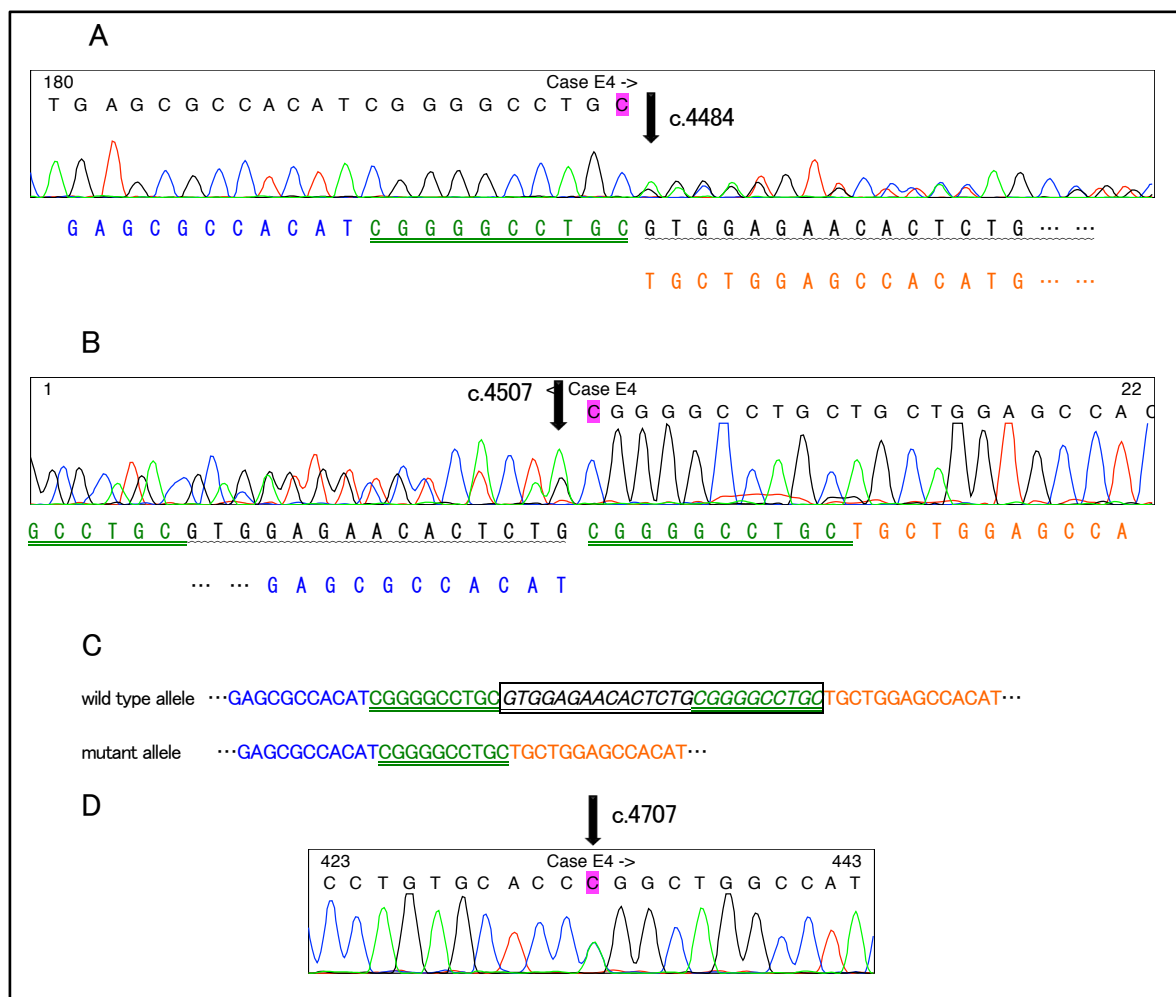


図 6 Case E4 の *ABCA3* 遺伝子解析結果

A: Forward primer による *ABCA3* exon29 c.4484 の前後の塩基配列

B: Reverse primer による *ABCA3* exon29 c.4507 の前後の塩基配列

C: 15 塩基 GTGGAGAACAACACTCTG の前後、緑色で示した 10 塩基 CGGGGCCTGC は相同な配列である。A, B の波形から、四角で囲まれた 25 塩基の欠失 (c.4483\_4507del25, p.Val1495CysfsX21) のヘテロ接合体と判断できる。

D: *ABCA3* exon31 c.4747 の前後の塩基配列

*ABCA3* exon31 に c.4747C>T, p.Arg1583Trp のヘテロ接合体を認める。

|                             |                                                    |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| <u><i>H.sapiens</i></u>     | RLLWDTVARARESGKAIITSHSMEECEALCTRLAIMVQGQFKCLGSPQH  |
| <u><i>P.troglodytes</i></u> | RLLWDTVARARESGKAIVITSHSMEECEALCTRLAIMVQGQFKCLGSPQH |
| <u><i>M.mulatta</i></u>     | RLLWDTVARARESGKAIVITSHSMEECEALCTRLAIMVQGQFKCLGSPQH |
| <u><i>E.caballus</i></u>    | RLLWDTVARARESGKAIVITSHSMEECEALCTRLAIMAQGQFKCLGSPQH |
| <u><i>B.taurus</i></u>      | RLLWDTVARARESGKAIVITSHSMEECEALCTRLAIMVQGQFKCLGSPQH |
| <u><i>M.musculus</i></u>    | RLLWDTVARARESGKAIVITSHSMEECEALCTRLAIMVQGQFKCLGSPQH |
| <u><i>R.norvegicus</i></u>  | RLLWDTVARARESGKAIVITSHSMEECEALCTRLAIMVQGQFKCLGSPQH |
| <u><i>C.lupus</i></u>       | RLLWDTVARARESGKAIITSHSMEECEALCTRLAIMVEGQFKCLGSPQH  |

図7 ABCA3 蛋白のアミノ酸配列の多種間比較(Arg1551～His1600)

は乳類の ABCA3 蛋白のアミノ酸配列の一部を示す。Arg1583 は多種間でよく保存されている。

また、両親について、*ABCA3* の変異部位の解析を行い、2 つの変異が両親から1 つずつ遺伝した複合ヘテロ接合であることを確認した(図8)。Case E4 は *ABCA3* の複合ヘテロ接合体変異による CPAP であると考えられた。

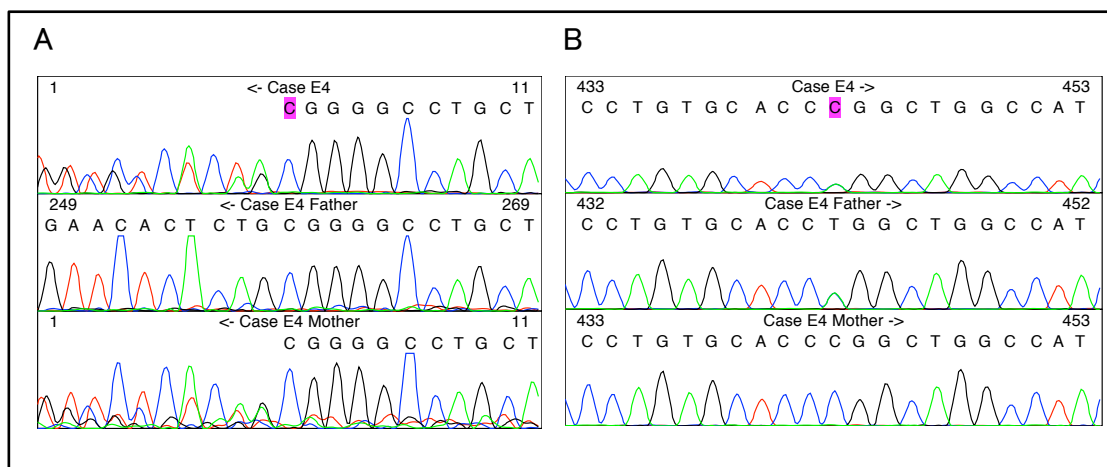


図8 Case E4 と両親の *ABCA3* 遺伝子解析結果の比較

A: Reverse primer によるシーケンス

母親に Case E4 と同じ p.Val1495CysfsX21 のヘテロ接合体を認める。

父親には同部位に変異を認めない。

B: 父親に Case E4 と同じ p.Arg1583Trp のヘテロ接合体を認める。

母親には同部位に変異を認めない。

## (6) Case L2

生後 3 か月時から呼吸症状と体重増加不良があり、生後 5 か月に入院した。呼吸不全と重度の肺高血圧が認められ、人工換気療法、一酸化窒素吸入療法、血管拡張薬投与などにより加療された。肺 CT 上の地図状のスリガラス影から CPAP が疑われ BAL が施行されたが、CPAP を支持する所見はなかった。肺生検にて ACD/MPV と診断され、非侵襲的人工換気療法施行下に退院した。*SFTPC*, *ABCA3*, *SFTPB* の遺伝子解析、SP-B 蛋白解析、pSTAT-5 解析に異常がなく、*FOXF1* 遺伝子解析にて exon1 に p.Leu300ArgfsX79 のヘテロ接合体を認めた(図 9)。この変異の文献報告はなかったが、2013 年に Sen らにより新規変異として報告されている<sup>39</sup>。両親の遺伝子解析では同部位に変異を認めなかった。Case L2 は *FOXF1* 遺伝子変異による ACD/MPV であり、*de novo* で発症した可能性が高いと考えられた。

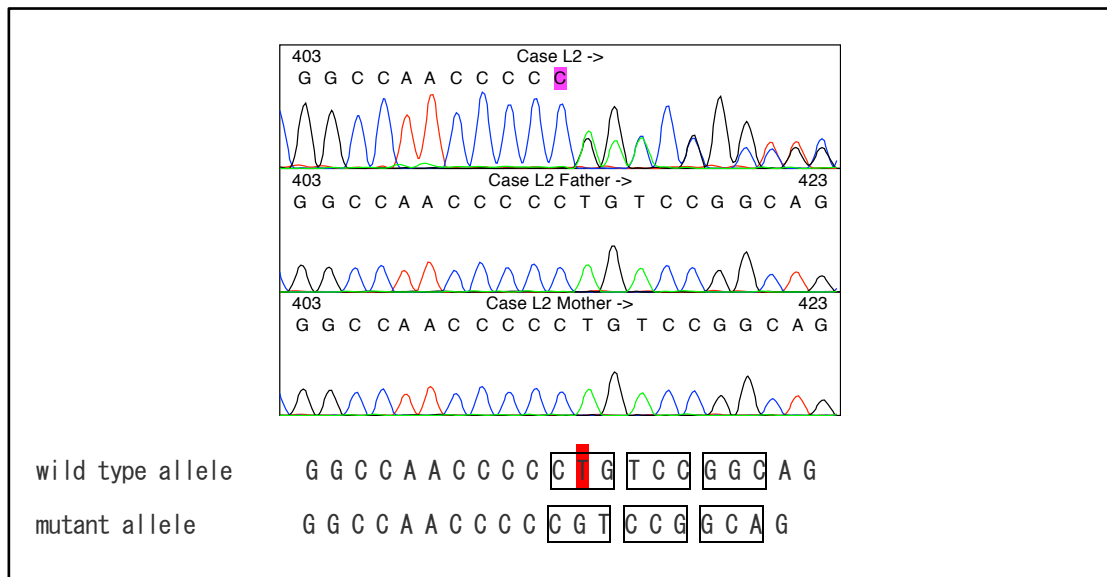


図 9 Case L2 と両親の *FOXF1* 遺伝子解析結果

Case L2 では、c.899delT によるフレームシフト変異 p.Leu300ArgfsX79 のヘテロ接合体を認める。両親には同部位に変異を認めない。

(7) Case E6, L3

臨床的に間質性肺疾患と診断されなかった2例にそれぞれ2つの *ABCA3* 遺伝子変異を認めた。Case E6 に c.218C>T, p.Pro73Leu と c.3613G>A, Gly1205Arg を認め、Case L3 に c.2282C>T, p.Thr761Met と c.4085C>T, p.Ala1362Val を認めた。SIFT、polyphen-2 により p.Pro73Leu、p.Gly1205Arg、p.Ala1362Val の3つの変異は、良性であると推定された。p.Thr761Met は NHLBI Exome Sequencing Project によると0.01%の頻度であり、SIFT、Polyphen-2 により”damaging”と推定された。Case L3 は *ABCA3* の病的変異の保因者の可能性があるが、p.Ala1362Val は良性の変異である可能性があり、それによる HILD と断定できなかった。

**Table 8. Twelve genetic variations which can cause interstitial lung diseases**

| Case | Onset    | Diagnosis | Genetic variations                                          | SIFT                   | Polyphen-2           | Outcomes                        |
|------|----------|-----------|-------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------|
| E1   | 0 day    | CPAP      | <i>SFTPC</i> p.Leu45Arg (heterozygous)                      | Damaging               | Damaging             | Undergoing treatment, 43 months |
| E2   | 6 days   | CPAP      | <i>SFTPC</i> p.Gln145fs (heterozygous)                      | N.D.                   | N.D.                 | Died, 77 days                   |
| E3   | 2 weeks  | IP        | <i>SFTPC</i> p.Ser72Asn,<br><i>SFTPC</i> p.Gly100Ala        | Damaging<br>Tolerated  | Damaging<br>Damaging | Undergoing treatment, 13 years  |
| E4   | 0 day    | CPAP      | <i>ABCA3</i> p.Val1495CysfsX21<br><i>ABCA3</i> p.Arg1583Trp | N.D.<br>Damaging       | N.D.<br>Damaging     | Undergoing treatment, 5 months  |
| E6   | at birth | URD       | <i>ABCA3</i> p.Pro73Leu,<br><i>ABCA3</i> p.Gly1205Arg       | Tolerated<br>Tolerated | Benign<br>Benign     | Recovered                       |
| L1   | 5 months | IP*       | <i>SFTPC</i> p.Lys63Glu (heterozygous)                      | Damaging               | Damaging             | Undergoing treatment, 54 months |
| L2   | 5 months | ACD/MPV   | <i>FOXF1</i> p.Leu300ArgfsX79 (heterozygous)                | N.D.                   | N.D.                 | Undergoing treatment, 24 months |
| L3   | 8 months | CLD, PH   | <i>ABCA3</i> p.Thr761Met,<br><i>ABCA3</i> p.Ala1362Val      | Damaging<br>Tolerated  | Damaging<br>Benign   | Undergoing treatment, 19 months |

CPAP, congenital pulmonary alveolar proteinosis; IP, interstitial pneumonitis; URD, unexplained respiratory distress; ACD/MPV, alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins; CLD, chronic lung disease; PH, pulmonary hypertension; \*, IP was diagnosed based on medical history, computed tomography, and blood parameter of KL-6; N.D., not done

#### 4. HILD 症例の臨床情報の検討

遺伝子変異が認められた HILD 6 例と認められなかった 37 例で臨床情報について比較検討した(Table 9)。低出生体重児、5 分のアプガースコア7点未満の新生児仮死、発症時期、一酸化窒素吸入療法の有無にはいずれも有意差がなかった。肺胞蛋白症を支持する BAL 液所見、病理学的に証明された間質性肺疾患、30 日以上的人工換気療法期間の 3 つが HILD の 6 例で有意に多かった。

**Table 9. Comparison of demographic characteristics between 6 and 37 patients**

|                            | 6 patients* | 37 patients | <i>p</i> -value |
|----------------------------|-------------|-------------|-----------------|
| Preterm birth (<37 weeks)  | 1 (17%)     | 5 (14%)     | 0.6187          |
| Birth-weight < 2500g       | 1 (17%)     | 7 (19%)     | 0.6922          |
| Apgar score < 7 at 5-min   | 0 (0.0%)    | 5 (14%)     | 0.3195          |
| Timing of onset            |             |             |                 |
| Immediately after birth    | 2 (33%)     | 27 (73%)    | 0.0767          |
| Within 4 weeks after birth | 4 (66%)     | 30 (81%)    | 0.3686          |
| iNO                        | 2 (33%)     | 16 (43%)    | 0.5034          |
| Assisted ventilation       | 5 (83%)     | 28 (76%)    | 0.5710          |
| More than 30days           | 5 (83%)     | 10 (27%)    | 0.0146          |
| Positive for PAP on BAL    | 3 (50%)     | 0 (0.0%)    | 0.0045          |
| Hisotology-proven ILD      | 3 (50%)     | 3 (8.1%)    | 0.0272          |

\*, Six infants in whom causative genetic abnormalities were detected; iNO, use of inhaled nitric oxide; PAP, pulmonary alveolar proteinosis; BAL, bronchoalveolar lavage; ILD, interstitial lung disease

## 考 察

HILD には、SP-B 欠損症、SP-C 異常症、ABCA3 異常症などの II 型肺胞上皮細胞の異常、GM-CSF 受容体異常症などによる肺胞マクロファージの異常、ACD/MPV および TTF-1 異常症が含まれ、原因が多岐に渡る。また、HILD は極めて稀であるために診療に当たる新生児科医、小児科医が独自で確定診断過程に到達することは困難である。一方で、患者の状態は刻一刻と悪化することが多く、診断と治療法選択についての指針が必要である。また、確定診断は根治的治療法の選択にとって不可欠であるとともに、対症的治療法の選択や遺伝カウンセリングにとっても有用な情報となる。本研究は、HILD 症例を確定診断へ導くための診断支援システムを構築するとともに、日本における HILD の特徴を明らかにした。

本研究の診断支援システムの周知に用いたメーリングリスト、日本未熟児新生児学会の稀有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業は、いずれも日本の周産期センターのほとんどを網羅していると考えられる。原因不明の重症な呼吸障害の症例の多くはわれわれの診断支援システムに紹介され、HILD の診断が確定した場合には前方視的サーベイランスにより症例が登録される。2011 年 2 月以降 2013 年 7 月まで の 2 年半の間に本診断支援システムを介して 6 例の HILD 症例が診断されたが、本システムを介さずに診断され、サーベイランス事業に登録された症例はなかった。このことから、特に新生児においては、日本の HILD 症例のほとんどを網羅できていると考えられる。

(1) 間質性肺疾患の 67%において原因となる遺伝子変異を特定した。

HILD の原因となる 6 つの新規遺伝子変異を同定した。

本診断支援システムを通して紹介された 43 症例のうち 6 例(14%)の原因が特定され、臨床的に診断された間質性肺疾患 9 例のうち 67%を占めていた。6 例の HILD のうち、4 例が SP-C 異常症、1 例が ABCA3 異常症、1 例が *FOXF1* 遺伝子変異による ACD/MPV であった。SP-B 欠損症の症例はなかった。ACD/MPV の 1 例は *FOXF1* 遺伝子解析の同意が得られなかった。TTF-1 の解析を行わなかったが、43 例に甲状腺機能低下を合併した症例はなかった。

SP-C 異常症による CPAP の 1 例と *FOXF1* 遺伝子変異による ACD/MPV の 1 例は肺移植を想定して治療継続中である。遺伝子解析により原因を確定し、肺移植を行うと再発する可能性が高い肺胞マクロファージの異常による CPAP を除外したことには重要な意義がある。ハイドロキシクロロキンは SP-C 異常症の一部に有効であり、ABCA3 異常症においても効果があるという報告がある。SP-C 異常症の 3 例(CPAP 2 例、間質性肺炎 1 例)、ABCA3 異常症による CPAP の 1 例にハイドロキシクロロキンは投与されたがいずれの症例に対しても無効であった<sup>41</sup>。ABCA3 異常症の症例にはアジスロマイシン投与が行われたが無効で

あった<sup>42</sup>。

HILDの原因となる6つの新規遺伝子変異(*SFTPC* p.Lys63Glu, p.Ser72Asn, p.Gly100Ala, p.Gln145fs, *ABCA3* p.Arg1583Trp, p.Val1495Cysfs21X)を同定した(Table 8.)。アミノ酸置換の原因となる5つの変異については、多種間でのアミノ酸の保存度、SIFTとPolyphen-2による蛋白機能への影響の推定結果を基に判断した。いずれも哺乳類においてよく保存されているアミノ酸の変異であり、*SFTPC* p.Gly100Alaを除きSIFTとPolyphen-2の両方で”damaging”と判定された。p.Gly100AlaはSIFTでtoleratedと判定されたが、Gly100における複数の変異によるHILDが報告されている<sup>20,25</sup>。これまでに2つの*SFTPC* 遺伝子変異を持つSP-C 異常症の症例は報告されていない。

*FOXF1* 遺伝子変異によるACD/MPVが1例同定された。p.Leu300ArgfsX79の変異は2013年に報告された37の新規変異のうちの1つである<sup>39</sup>。*FOXF1*は肺、心臓、腎泌尿器、消化器等の発生にかかわる転写因子であり、およそ8割のACD/MPV症例で心臓、腎泌尿器、消化器などに合併奇形を持つ<sup>40</sup>。遅発例の報告はあるが、ほとんどは出生数時間以内に呼吸不全と肺高血圧症を発症し、予後は極めて不良である<sup>7</sup>。今回の症例は生後3か月で発症した遅発例であり、他臓器の合併症がないACD/MPV症例の中でも稀な症例であった。生後24か月時点で血管拡張薬投与と在宅酸素療法を継続されており、根治的治療には肺移植が必要である。

(2) 日本においてSP-C 異常症とACD/MPVはHILDの主要な原因である。

*ABCA3* 異常症は欧米諸国に比して少なく、SP-B 欠損症は極めて稀である。

本研究で診断されたSP-C 異常症は2年6か月の研究期間内で4例であった。期間内の日本における出生数を約260万人とすると、小児のSP-C 異常症の罹患率は約65万人に1人と推定される。医学中央雑誌、Pubmedによって検索できる範囲において、小児のSP-C 異常症は2006年以降の約8年間に国内で7例が報告されており、上記の罹患率からの大きな乖離はない。

本研究では、SP-B 欠損症の可能性を考慮する21例について*SFTPB* 遺伝子解析を、そのうちBAL液または気道吸引液が得られた17例にSP-B蛋白の解析を行ったが異常は検出されなかった。日本においてはこれまでにSP-B 欠損症の確定診断例の報告はなく<sup>15</sup>、極めて稀であると考えられた。韓国やアフリカにおいても、欧米諸国においてSP-B 欠損症の原因の60～70%を占める121ins2変異は報告されていない<sup>53</sup>。

*ABCA3* 異常症はHILD 6例中1例(17%)であった。日本においては過去6年間にこの他に3例の報告<sup>31,32</sup>があり、最初の報告以降6年間の出生数を約640万人とすると、*ABCA3* 異常症の罹患率は約160万人に1人と推定される。

イギリスにおいて6年間に同定された肺サーファクタント異常症25例のうち、SP-B 欠損症が6例(24%)、SP-C 異常症が7例(28%)、*ABCA3* 異常症が12例(48%)であり、*ABCA3*

異常症が最も多かったと報告されている<sup>14</sup>。また、アメリカにおいて保因者頻度から推定された罹患率は、SP-B 欠損症が 170 万人に 1 人、ABCA3 欠損症が 3000 人に 1 人であり、SP-C 異常症の頻度に関するデータはない<sup>11</sup>。日本においては SP-B 欠損症は極めて稀であり、ABCA3 異常症は欧米諸国に比して少ないと考えられた。

ACD/MPV は稀であるが、小児 ILD の主要な原因のひとつとされている。ACD/MPV は本研究内に 2 例あり、その罹患率は 130 万人に 1 人と推定される。しかし、日本における ACD/MPV の報告は 1998 年以降 15 年間に少なくとも 19 例あり、その罹患率は 100 万人に 1 人よりも高い可能性がある。

日本において SP-C 異常症と ACD/MPV は HILD の主要な原因であると考えられた。

(3) 日本における新生児期発症の間質性肺疾患に対しては SP-C 異常症を第一に考えるべきである。

SP-C 異常症の発症時期は、10～15%が新生児期、約40%が生後1～6か月、約半数がそれ以降であり、咳・体重増加不良・酸素依存などの症状が多いとされる<sup>9</sup>。ABCA3 異常症は新生児期に呼吸窮迫症候群と同様の呼吸障害で発症するか、乳児期までに間質性肺炎を発症する。SP-B 欠損症は部分欠損などの特殊な例を除いて例外なく出生時に発症する。Turcu らの報告<sup>14</sup>では、SP-C 異常症 7 例のうち 2 例が新生児期、5 例が 2 か月以降の発症であり、ABCA3 異常症 12 例のうち 10 例が出生時の発症であった。本研究の症例では SP-C 異常症 4 例のうち新生児期の発症が 3 例 (75%) で他の報告に比して早い傾向があり、ABCA3 異常症 1 例は出生時の発症であった。また、新生児期に発症した間質性肺疾患 5 例のうち、SP-C 異常症が 3 例 (60%) を占めた。

Turcu らは、新生児期に発症した原因不明の呼吸障害症例に対して SP-B と ABCA3 に関する検査を、呼吸障害が遷延し間質性肺疾患と診断された場合には *SFTPC* の遺伝子解析を推奨している<sup>14</sup>。しかし日本においては SP-B 欠損症と ABCA3 異常症が少なく SP-C 異常症が比較的多く、さらに SP-C 異常症の中で新生児期に発症する割合が高い。本研究の診断支援システムにおいて、新生児期発症例に対して SP-C、SP-B、ABCA3 の全てについて第一に検索したことは妥当であったと考えられた。

また、ACD/MPV が日本人の HILD の中で比較的多いことが示され、肺高血圧が重症である症例には *FOXF1* の遺伝子解析を考慮すべきであると考えられた。

## 総括および結論

HILD 症例を確定診断へ導くための診断支援システムを構築し、新生児・小児診療施設に対して診断支援を行った。

間質性肺疾患が疑われた 43 症例が 2 年 6 か月の研究期間内に紹介された。そのうち 9 症例 (21%) が臨床的に間質性肺疾患と診断され、間質性肺炎が 4 例、肺胞蛋白症が 3 例、ACD/MPV が 2 例であった。

臨床的に診断された 9 症例の間質性肺疾患のうち、6 症例に疾患の原因となる遺伝子変異を同定し HILD と診断した。そのうち 4 症例に 6 つの新規遺伝子変異 (*SFTPC* p.Lys63Glu, p.Ser72Asn, p.Gly100Ala, p.Gln145fs, *ABCA3* p.Arg1583Trp, p.Val1495Cysfs21X) を同定した。

日本においては HILD の中で SP-C 異常症と ACD/MPV が多く、*ABCA3* 異常症は欧米諸国に比べて稀であると考えられた。これまでに SP-B 欠損症の報告はなく、日本人には極めて稀であることが再確認された。

日本における SP-C 異常症は欧米諸国の報告に比べ発症時期が早いものが多く、新生児期発症の間質性肺疾患に対しては、SP-C 異常症を第一に考慮すべきであると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究にご協力を頂きました患者様とご家族、本研究に患者様をご紹介頂きました全国の諸先生に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さり、ご指導賜りました、北海道大学大学院医学研究科産科・生殖医学分野 水上尚典教授、北海道大学病院周産母子センター 長和俊診療教授に深く感謝致します。また、直接様々なご指導を下さりました、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 有賀正教授、山田雅文先生、北海道大学大学院医学研究科産科・生殖医学分野 古田伊都子先生に深く感謝致します。SP-B 蛋白の解析につき丁寧にご指導を下さりました札幌医科大学医学部医学科医化学講座 黒木由夫教授、西谷千明先生に深く感謝致します。また、様々な面から研究をサポートして下さいました、水島正人先生、盛一享徳先生、古瀬優太先生、兼次洋介先生、森岡圭太先生、早坂格先生にお礼申し上げます。

本研究は、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業【難治性稀少肺疾患(肺胞蛋白症、先天性間質性肺疾患、オスラー病)に関する調査研究班】(H24-難治等(難一般-035))から一部援助を受け行われました。本研究を進めるにあたり様々なご指導を頂きました、国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 井上義一先生、新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 中田光先生、東京医科大学内科学第一講座 瀬戸口靖弘先生を始め、研究班の諸先生に深く感謝致します。

## 引用文献

1. Nogee, L.M., de Mello, D.E., Dehner, L.P. & Colten, H.R. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* **328**, 406-410 (1993).
2. Nogee, L.M. *et al.* A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* **344**, 573-579 (2001).
3. Shulenin, S. *et al.* ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1296-1303 (2004).
4. Dirksen, U. *et al.* Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J. Clin. Invest.* **100**, 2211-2217 (1997).
5. Suzuki, T. *et al.* Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J. Exp. Med.* **205**, 2703-2710 (2008).
6. Cho, K. *et al.* Successful treatment of congenital pulmonary alveolar proteinosis with intravenous immunoglobulin G administration. *Respirology* **11**, S74-77 (2006).
7. Bishop, N.B., Stankiewicz, P. & Steinhorn, R.H. Alveolar capillary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **184**, 172-179 (2011).
8. Guillot, L. *et al.* NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in "Brain-Lung-Thyroid Syndrome". *Hum. Mutat.* **31**, E1146-1162 (2010).
9. Wert, S.E., Whitsett, J.A. & Nogee, L.M. Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr. Dev. Pathol.* **12**, 253-274 (2009).
10. Vorbroker, D.K., Profitt, S.A., Nogee, L.M. & Whitsett, J.A. Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am. J. Physiol.* **268**, L647-656 (1995).

11. Gower, W.A. & Noguee, L.M. Surfactant dysfunction. *Paediatr. Respir. Rev.* **12**, 223-229 (2011).
12. Hartl, D. & Griesse, M. Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes. *Respir. Res.* **6**, 32 (2005).
13. Noguee, L.M. *et al.* Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 973-981 (2000).
14. Turcu, S. *et al.* Genetic testing in children with surfactant dysfunction. *Arch. Dis. Child.* **98**, 490-495 (2013).
15. 清水浩他. わが国における先天性肺胞蛋白症, 先天性 SP-B 欠損症の患者発生: 新生児希有疾患(病態)サーベイランス事業報告. 日本未熟児新生児学会雑誌 **15**, 107-111 (2003).
16. Tredano, M. *et al.* Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am. J. Med. Genet. A.* **126A**, 18-26 (2004).
17. Lawson, W.E. *et al.* Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* **59**, 977-980 (2004).
18. Thouvenin, G. *et al.* Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C. *Arch. Dis. Child.* **95**, 449-454 (2010).
19. Poterjoy, B.S. *et al.* Neonatal respiratory failure due to a novel mutation in the surfactant protein C gene. *J. Perinatol.* **30**, 151-153 (2010).
20. Noguee, L.M. *et al.* Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* **121**, 20S-21S (2002).
21. Guillot, L. *et al.* New surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. *J. Med. Genet.* **46**, 490-494 (2009).
22. Cameron, H.S. *et al.* A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *J. Pediatr.* **146**, 370-375 (2005).

23. Baekvad-Hansen, M., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A. & Dahl, M. Two novel mutations in surfactant protein-C, lung function and obstructive lung disease. *Respir. Med.* **104**, 418-425 (2010).
24. Hamvas, A. Inherited surfactant protein-B deficiency and surfactant protein-C associated disease, clinical features and evaluation. *Semin. Perinatol.* **30**, 316-326 (2006).
25. Ono, S. *et al.* Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. *Eur. Respir. J.* **38**, 861-869 (2011).
26. Deutsch, G.H. *et al.* Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 1120-1128 (2007).
27. Shulenin, S. *et al.* ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1296-1303 (2004).
28. Bullard, J.E. *et al.* ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1026-1031 (2005).
29. Flamein, F. *et al.* Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 765-775 (2012).
30. Brasch, F. *et al.* Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 571-580 (2006).
31. Yokota, T. *et al.* Heterozygous ABCA3 mutation associated with non-fatal evolution of respiratory distress. *Eur. J. Pediatr.* **167**, 691-693 (2008).
32. Kitazawa, H. *et al.* Interstitial lung disease in two brothers with novel compound heterozygous ABCA3 mutations. *Eur. J. Pediatr.* **172**, 953-957 (2013).
33. Martinez-Moczygemba, M. *et al.* Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFRalpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J. Exp. Med.* **205**, 2711-2716 (2008).

34. Tanaka, T. *et al.* Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J. Med. Genet.* **48**, 205-209 (2011).
35. Ahmed, S., Ackerman, V., Faught, P. & Langston, C. Profound hypoxemia and pulmonary hypertension in a 7-month-old infant: late presentation of alveolar capillary dysplasia. *Pediatr. Crit. Care Med.* **9**, e43-46 (2008).
36. Licht, C. *et al.* Prolonged survival in alveolar capillary dysplasia syndrome. *Eur. J. Pediatr.* **163**, 181-182 (2004).
37. Agochukwua, N.B. *et al.* Analysis of FOXF1 and the FOX gene cluster in patients with VACTERL association. *Eur. J. Med. Genet.* **54**, 323-328 (2011).
38. Stankiewicz, P. *et al.* Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of FOXF1 cause alveolar capillary dysplasia and other malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 780-791 (2009).
39. Sen, P. *et al.* Novel FOXF1 mutations in sporadic and familial cases of alveolar capillary dysplasia with misaligned pulmonary veins imply a role for its DNA binding domain. *Hum. Mutat.* **34**, 801-811 (2013).
40. Sen, P. *et al.* Expanding the phenotype of alveolar capillary dysplasia (ACD). *J. Pediatr.* **145**, 646-651 (2004).
41. Williamson, M. & Wallis, C. Ten-year follow up of hydroxychloroquine treatment for ABCA3 deficiency. *Pediatr. Pulmonol.* doi: 10.1002/ppul. 22811 (2013).
42. Thouvenin, G., Nathan, N., Epaud, R. & Clement, A. Diffuse parenchymal lung disease caused by surfactant deficiency: dramatic improvement by azithromycin. *BMJ Case Rep.* doi: 10.1136/bcr-2013-009988 (2013).
43. Palomar, L.M. *et al.* Long-term outcomes after infant lung transplantation for surfactant protein B deficiency related to other causes of respiratory failure. *J. Pediatr.* **149**, 548-553 (2006).

44. Nakata, K. *et al.* Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **93**, 667-673 (1999).
45. Nishinakamura, R. *et al.* The pulmonary alveolar proteinosis in granulocyte macrophage colony-stimulating factor/interleukins 3/5 beta c receptor-deficient mice is reversed by bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* **183**, 2657-2662 (1996).
46. Schägger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).
47. Al-Salmi, Q.A. *et al.* Serum KL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease. *Chest* **127**, 403-407 (2005).
48. Doan, M.L. *et al.* Serum KL-6 differentiates neuroendocrine cell hyperplasia of infancy from the inborn errors of surfactant metabolism. *Thorax* **64**, 677-681 (2009).
49. Herbst, J.J., Minton, S.D. & Book, L.S. Gastroesophageal reflux causing respiratory distress and apnea in newborn infants. *J. Pediatr.* **95**, 763-768 (1979).
50. Adam, M.P. & Hudgins, L. Kabuki syndrome: a review. *Clin. Genet.* **67**, 209-219 (2005).
51. Deerojanawong, J. *et al.* Pulmonary diseases in children with severe combined immune deficiency and DiGeorge syndrome. *Pediatr. Pulmonol.* **24**, 324-330 (1997).
52. Hicks, S., Wheeler, D.A., Plon, S.E. & Kimmel, M. Prediction of missense mutation functionality depends on both the algorithm and sequence alignment employed. *Hum. Mutat.* **32**, 661-668 (2011).
53. Garmany, T.H. *et al.* Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency. *Pediatr. Res.* **63**, 645-649 (2008).