



Title	小児の遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究
Author(s)	早坂, 格
Description	配架番号 : 2309
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12568号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12568
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68730
Type	doctoral thesis
File Information	Itaru_Hayasaka.pdf



学位論文

小児の遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究

(Diagnostic approach for the hereditary interstitial lung disease
in childhood)

2017年3月

北海道大学

早坂格

学位論文

小児の遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究

(Diagnostic approach for the hereditary interstitial lung disease
in childhood)

2017年3月

北海道大学

早坂格

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	8 頁
研究方法	10 頁
研究結果	15 頁
考察	29 頁
総括および結論	34 頁
謝辞	35 頁
付表	36 頁
引用文献	39 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。

Itaru Hayasaka, Kazutoshi Cho, Takuma Akimoto, Masahiko Ikeda, Yutaka Uzuki, Masafumi Yamada, Koh Nakata, Itsuko Furuta, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami
Genetic variations associated with infantile respiratory failure not explained by prematurity in Japanese infants.
Pediatric Research(投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 早坂格、卯月ゆたか、森岡圭太、秋元琢真、長和俊
遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究
日本新生児成育医学会(第60回日本新生児成育医学会学術集会)
2015年10月23-25日・岩手
2. 早坂格、卯月ゆたか、森岡圭太、秋元琢真、長和俊、水上尚典
遺伝子診断でTTF-1異常症と診断した3症例
日本周産期・新生児医学会(第52回日本周産期・新生児医学会学術集会)
2016年7月16-18日・富山
3. Itaru Hayasaka, Kazutoshi Cho, Masahiko Ikeda, Yutaka Uzuki, Takuma Akimoto, Masafumi Yamada, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami
The diagnostic support for hereditary interstitial lung disease in Japan
Hot topics in Neonatology 2016
2016年12月5-7日・ワシントンD.C.

緒言

遺伝性間質性肺疾患(hereditary interstitial lung disease, HILD)は、遺伝子変異が原因で発症する間質性肺疾患であり、酸素化障害を主体とする進行性の呼吸不全を呈し、時に致死的となる稀な疾患群である。HILD の責任遺伝子としては、*SFTPB*、*SFTPC*、*ABCA3*、*CSF2RA*、*CSF2RB*、*GATA2*、*NKX2.1*、*MARS* などが知られているが、家族内発症などから HILD と考えられるものの未だ責任遺伝子が同定されていない症例も多い。

HILD の病像は肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis, PAP)と間質性肺炎(interstitial pneumonitis, IP)が主体であり、その発症時期には新生児期から成人までの幅がある。また、HILD の病態はⅡ型肺胞上皮細胞の異常、肺胞マクロファージの異常および肺の形成障害に大きく分けることができる。Ⅱ型肺胞上皮細胞側の異常としては、サーファクタント蛋白(surfactant protein, SP)-B 欠損症、SP-C 異常症、ATP 結合カセット輸送蛋白 A3(ATP-binding cassette transporter A3, ABCA3)異常症が知られている。肺胞マクロファージの異常には、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、単球減少に肺胞蛋白症と非定型抗酸菌症を続発する MonoMAC および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が知られている。最近、Réunion 島とその周辺に多発する小児の肺胞蛋白症の原因が Methionyl-tRNA Synthetase(MARS)をコードする *MARS* の両アリル変異であることが報告された¹。また、肺胞・肺毛細血管の発生異常により重症の肺高血圧症を来す alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary vein(ACD/MPV)や、脳・甲状腺・肺の形成に関わる転写因子である甲状腺転写因子(thyroid transcription factor, TTF)-1 異常症も HILD の範疇である。

PAP は気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage, BAL)液および病理組織の所見から診断され、IP や ACD/MPV は病理組織の所見から診断される。しかし、小児科および新生児科領域においては、BAL や肺生検が困難であるため、臨床経過、胸部 X 線写真や高解像度肺 computed tomography(CT)などの画像情報、血清マーカーの値とその推移に加えて、遺伝子解析が診断にとって重要となる。

肺サーファクタントは、Ⅱ型肺胞上皮細胞で生合成され、リン脂質とともにラメラ体に貯蔵され、エキソサイトーシスにより肺胞腔へ放出される脂質・蛋白質複合体であり、その機能は円滑な呼吸の維持に必要である。脂質がラメラ体に輸送されるには ABCA3 が必要である(図 1)。ヒトの肺サーファクタントは約 90%の脂質と約 10%の蛋白

質から構成される。脂質のうちホスファチジルコリン(phosphatidylcholine, PC)が70～80%ほどを占めており、とくに、表面活性作用発現に必須であるジパルミトイルホスファチジルコリン(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)が多いことが肺サーファクタントの特徴である。また、他の組織には痕跡程度しか存在しないホスファチジルグリセロール(phosphatidylglycerol, PG)が脂質の10%ほど含まれている。肺サーファクタントの機能発現にはSP-A、SP-B、SP-C、SP-Dの4種類の特異蛋白質が必須である²。SP-BとSP-Cは非常に疎水性が強く、リン脂質と会合して、肺胞が虚脱するのを防いでいる。SP-AとSP-Dは親水性糖蛋白質であり、肺サーファクタントの表面活性には関与しない一方で、気道-肺胞系における生体防御作用、Ⅱ型肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージに発現する受容体を介する作用、肺サーファクタント脂質との結合など多彩な機能を持っている(図2)。SP-CはⅡ型肺胞上皮細胞でのみ産生されるが、SP-A、SP-BおよびSP-DはⅡ型肺胞上皮細胞以外にクラブ細胞でも合成される。肺胞腔に分泌された肺サーファクタントは、肺胞表面の気液界面に吸着して表面活性を発揮する。

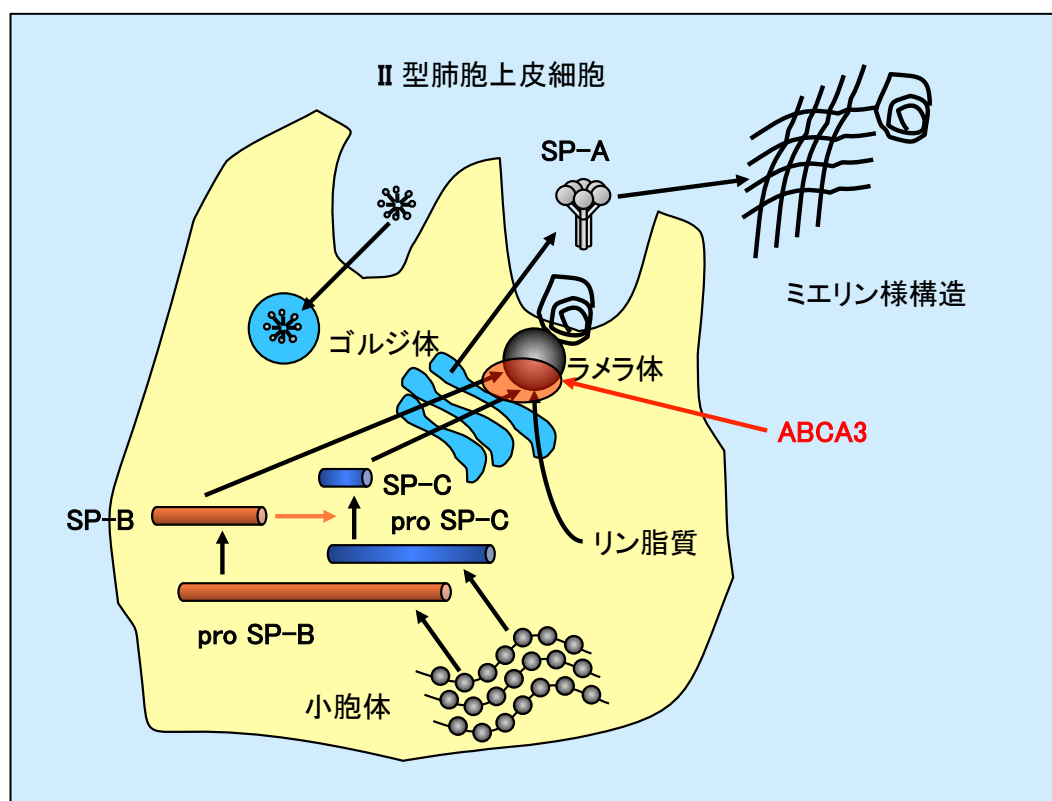


図1. 肺サーファクタントの産生・分泌

(長和俊. 肺サーファクタント. Neonatal Care. 2008. 21 巻4 号. P16-24)

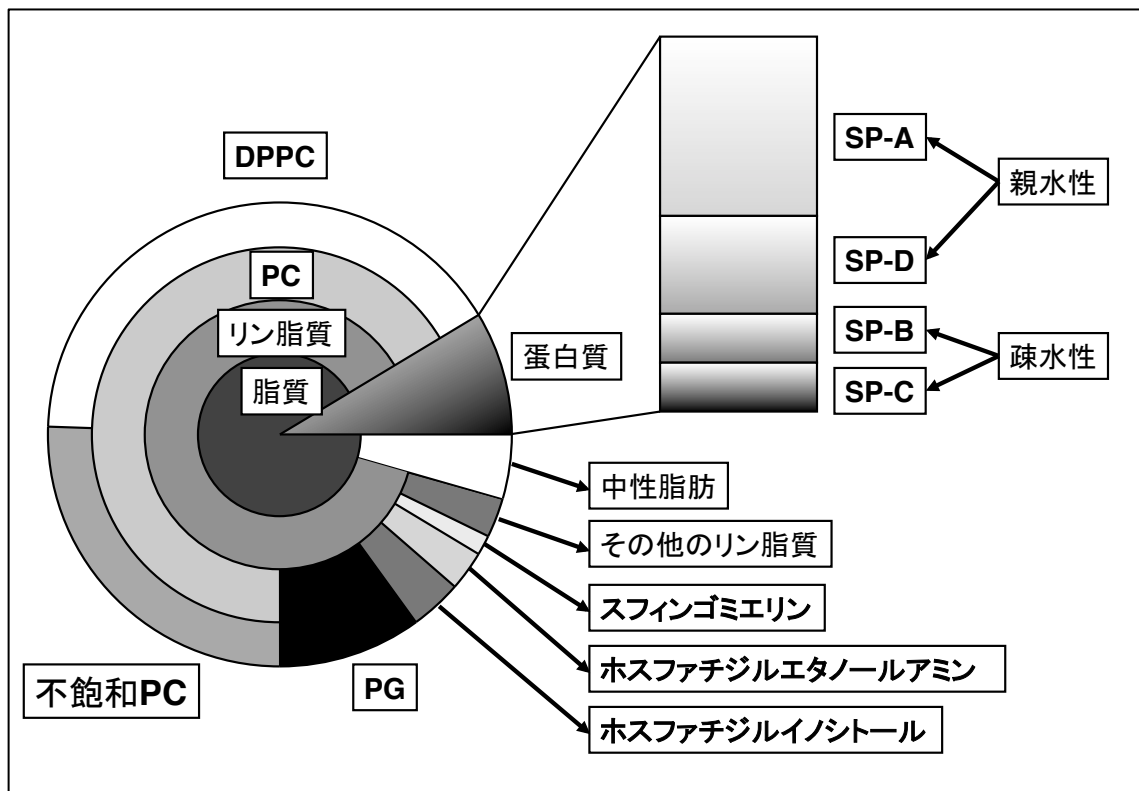


図2. 肺サーファクタントの構成成分

(長和俊. 肺サーファクタント. Neonatal Care. 2008. 21 巻4 号. P16-24)

SP-Bをコードする *SFTPB* は2番染色体(2p12-11.2)に存在する。*SFTPB* は11個の exon からなり、1～10 の exon が分子量 42kDa のプレプロ蛋白質をコードしている。SP-B は前駆体蛋白質からプロセッシングを受けて成熟蛋白質となる。プレプロ蛋白質からシグナルペプチドが除去されたのち、N-グリコシド糖鎖の付加を受け、プロ蛋白質が生成される。次に、N末端側とC末端側からそれぞれ176個と102個のアミノ酸が除去されてアミノ酸79個からなる活性型の成熟SP-Bが作られる。成熟したSP-Bは肺胞腔に分泌され、肺サーファクタントの表面活性の発現に強く関与する。

SP-B欠損症は、1993年にNogeeらにより初めて報告された³。SP-Bが欠損しているとSP-Cも成熟しないため、肺サーファクタントは十分な表面活性を発揮することができない。SP-B欠損症例の多くは正期産児であり、出生直後から呼吸窮迫症状を呈し、人工呼吸器や人工肺サーファクタントなどによる治療に抵抗し、肺移植を行わない限り致死的な経過をたどる⁴。SP-BとSP-Cが分泌されない一方で、SP-AとSP-Dはラメラ体を介さないで肺胞腔に分泌されて蓄積し、SP-B欠損症はPAPの病像に移行する。遺伝形式は常染色体劣性であり、海外で報告されている多くの症例では121ins2と呼ば

れるフレームシフト変異が関与して SP-B の欠損が生じている⁴。SP-B 欠損症患者の BAL 液中には SP-B が検出されず、プロ SP-C の N 末端側断片が出現する。これは、SP-B 欠損のため SP-C の細胞内プロセッシングがうまく進行できないためと考えられている。

SP-C をコードする *SFTPC* は 8 番染色体短腕 (8p23.1) に存在し、6 個の exon と 5 個の intron からなる。分子量 21~23KDa の前駆体蛋白質であるプロ SP-C がプロセッシングを受けて、24~58 個のアミノ酸からなる活性型のペプチドができる。SP-C はサーファクタント特異蛋白質の中で最も疎水性が高い。SP-C はラメラ体とともに肺胞腔に分泌され、SP-B とともに肺サーファクタントの表面活性に寄与する。

2001 年に初めて報告された SP-C 異常症は、*SFTPC* の exon 4 が欠失した IP の母親と児の症例であった⁵。遺伝形式は常染色体優性である。免疫組織学的には II 型肺胞上皮細胞内に SP-C が同定されず、構造異常を伴うプロ SP-C 蛋白が存在した。その後も様々な *SFTPC* の変異が報告されている。SP-C 異常症は新生児期から成人まで発症時期の幅が広く、PAP の病像を呈する場合と IP の病像を呈する場合がある。

SP-C 異常症における IP の発症機序については、次のように考えられている。通常、プロ SP-C 蛋白は 2 量体を形成した後に細胞内で修飾される。構造異常を伴うプロ SP-C 蛋白は正常なプロ SP-C 蛋白とも 2 量体を形成し、異常なラメラ体を形成して肺サーファクタントの肺胞腔への分泌を障害する。また、小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) に蓄積された unfolded プロ SP-C 蛋白が ER ストレスによるアポトーシスを誘導し、II 型肺胞上皮細胞の障害をもたらす⁶。SP-C 異常症が PAP になる機序はまだ解明されていない。SP-C のノックアウト・マウスが PAP にならないことから、単純に SP-C 蛋白の機能が低下していることが原因ではなく、異常な SP-C 蛋白やプロ SP-C 蛋白による II 型肺胞上皮細胞の障害が関与していると考えられる。

ABC transporter は膜輸送を担う蛋白質のうち、最も大きなスーパーファミリーを形成する一群であり、A~G のサブグループに分けられる。ABCA3 をコードする *ABCA3* は、16 番染色体 (16p13.3) に存在し、全長 53.97kb で 32 個の exon により構成されている。*ABCA3* はサーファクタント脂質の膜を介するトランスポーターとして機能している^{7,8}。

ABCA3 異常症は、2004 年に初めて報告された⁷。この報告では、*SFTPB* と *SFTPC* に変異を認めない 21 症例の致死的な新生児サーファクタント欠乏症例のうち、16 症例に *ABCA3* 変異が認められた。*ABCA3* 異常症は正期産の新生児期に発症することが多く PAP の病像をとる場合と IP の病像をとる場合がある。遺伝形式は常染色体劣性である。*ABCA3* 異常症の II 型肺胞上皮細胞が異常なサーファクタント蛋白を産生し、肺胞の不

安定性を誘導すると考えられている。

多くが出生直後から重症の RDS として発症し、人工肺サーファクタント投与や人工呼吸管理、または膜型人工心肺(extracorporeal membrane ECMO)により治療される。病理組織学的には、ラメラ体が正常に比べて著しく小さく、その辺縁に密度の濃い領域を認める異常な構造をしており⁷、腫大化した肺泡マクロファージやⅡ型肺泡上皮細胞を呈する。

ABCA3 異常症の重症度(死亡率)と *ABCA3* の変異および ABCA3 の細胞内分布の間には相関関係がある。フレームシフト変異またはナンセンス変異を“null”、ミスセンス変異、splice site の変異、挿入および欠失を“other”とした場合、null/null のホモ接合または複合ヘテロ接合による ABCA3 異常症は、新生児期から発症し重症の経過をたどり、多くの生命予後は一年以内とされている。null/other や other/other のホモ接合または複合ヘテロ接合による ABCA3 異常症は、発症時期が遅く、1 年以上の生存例も多くみられる⁹。年長の子どもや大人においては、剥離型間質性肺炎(desquamative interstitial pneumonia, DIP)として発症することがある¹⁰。一方、Matsumura らの報告では、ABCA3 異常症はⅠ型とⅡ型に分けられている。野生型 ABCA3 蛋白は大部分がラメラ体や多小胞体のマーカーである LAMP3 陽性の細胞内小胞に局在するのに対し、Ⅰ型変異では大部分が小胞体に局在し細胞内局在に異常が生じる。Ⅱ型変異では細胞内局在の異常は見られず、ATP 加水分解能に異常が生じる¹¹。致死的な患者の多くの場合はⅠ型変異をホモで持つか、あるいはⅠ型と重度のⅡ型変異をヘテロで有しており、ABCA3 の著しい機能異常が致死性サーファクタント欠乏を引き起こすと考えられている。

SFTPB のプロモーター領域には、肝細胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)-3 や甲状腺転写因子(thyroid transcription factor, TTF)-1 などの転写因子が結合可能な部位が存在し、発現の段階でこれらの転写因子が働いて、*SFTPB* が肺特異的に発現するよう調節している。TTF-1 は SP-A をコードする *SFTPA1* および *SFTPA2* や *SFTPC* のプロモーターの活性も調整する。*NKX2.1* がコードする TTF-1 はホメオドメインを含む蛋白で、甲状腺ペルオキシダーゼやサイログロブリンなどの甲状腺に特異的な遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白として 1989 年に報告された¹²。後に、TTF-1 が甲状腺、肺原基ならびに視床下部領域などの中枢神経系で発現すること、肺においては、TTF-1 が上皮細胞に特異的に分布することが報告された¹³。

NKX2.1 異常症は TTF-1 異常症とも呼ばれることもあり、1998 年に初めて報告された¹⁴。肺症状、甲状腺機能低下症、舞蹈病や精神運動発達遅滞などの脳神経症状が知られている¹⁵。

ACD/MPV は、出生後数時間以内に重症の呼吸不全と肺高血圧症を呈し、新生児期に死亡することが多いことが報告されている^{16,17}。病理学的には、肺胞上皮に隣接する毛細血管の数が減少し、肺胞壁が厚く、中小肺動脈壁の筋層が薄く、肺静脈の不正配列が見られる。さらに、肺以外に先天性心疾患や消化管疾患、泌尿器疾患を合併する事が知られている^{17,18,19}。また、*FOXF1* のミスセンス変異や 16q24.1 領域の欠失、*FOXF1* の上流における変異・欠失などが ACD/MPV の原因として報告されている^{20,21}。

肺胞マクロファージの成熟には GM-CSF による刺激が必須である。自己免疫性肺胞蛋白症(autoimmune pulmonary alveolar proteinosis, APAP)では、GM-CSF に対する自己抗体が過剰産生される結果、肺胞マクロファージの機能が障害されて、肺サーファクタント関連物質が肺胞内に蓄積する²²。PAP 患者において、血中あるいは BAL 液中の抗 GM-CSF 自己抗体が高値であることから APAP と診断される²³。

GM-CSF 受容体には α サブユニットと β サブユニットがあり、それぞれの変異による先天性肺胞蛋白症(congenital pulmonary alveolar proteinosis, CPAP)が報告されている^{24,25}。GM-CSF 受容体の機能が障害されると、肺胞マクロファージの成熟が阻害されて PAP の病態となる。GM-CSF の刺激は signal transducer and activator of transcription(STAT)-5 をリン酸化することで細胞内に伝達される。そのため、PAP 患者の末梢血単球を GM-CSF で刺激した結果、STAT-5 がリン酸化されないことを用いて GM-CSF 受容体の機能異常をスクリーニングすることが可能である²⁵。

HILD は非常に稀な疾患であり、新生児科医・小児科医に十分に知られていない。2011 年 2 月に日本新生児成育医学会(旧日本未熟児新生児学会)の新生児稀有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業を通じて日本の周産期センターに周知を開始した。サーベイランス事業を介した症例の集積は自体は 2016 年 2 月で終了したが、相談件数は増え続けている。

日本における Akimoto らによる報告では、2011 年 2 月～2013 年 7 月の期間に 4 症例の *SFTPC* の変異、1 症例の *ABCA3* の変異、1 症例の *FOXF1* の変異を同定した。日本における HILD では、SP-C 異常症が最も多く、*ABCA3* 異常症は少なかった。また、SP-B 欠損症の確定診断例は見られなかった。ACD/MPV については、日本でも過去に多く報告があることから頻度が高い可能性があり、ACD/MPV も HILD の中では主要な原因と考えられた。*NKX2.1* については解析がなされていなかった²⁶。

本研究の目的は、日本における HILD の疾病構造を明らかにし、診断システムの構築に寄与することである。また、本研究では、HILD の中で TTF-1/*NKX2.1* 異常症が一定割合を占めるとわかるようになったため、Akimoto らの研究では検討していなかった *NKX2.1* を新たに検討対象とした。

略語表

本文および図中で使用した略語は以下の通りである。

ABCA3	ATP-binding cassette transporter A3
ACD/MPV	alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins
APAP	autoimmune pulmonary alveolar proteinosis
BAL	bronchoalveolar lavage
CPAP	congenital pulmonary alveolar proteinosis
CT	computed tomography
DIP	desquamative interstitial pneumonia
DNA	deoxyribonucleic acid
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
ECMO	extracorporeal membrane oxygenation
ER	endoplasmic reticulum
ft4	free thyroxine
GGO	ground-glass opacification
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HCQ	hydroxychloroquine
HILD	hereditary interstitial lung disease
HOT	home oxygen therapy
ILD	interstitial lung disease
iNO	inhaled nitric oxide
IP	interstitial pneumonitis
JIA	juvenile idiopathic arthritis
KL-6	Krebs von den Lungen-6
LDH	lactate dehydrogenase
MARS	Methionyl-tRNA Synthetase
mPSL	methylprednisolone
NICU	neonatal intensive care unit
NSIP	nonspecific interstitial pneumonia
PAP	pulmonary alveolar proteinosis
PC	phosphatidylcholine

PCR	polymerase chain reaction
PG	phosphatidylglycerol
PGE1	prostaglandin E1
PGI2	prostaglandin I2
PH	pulmonary hypertension
PID	primary immunodeficiency disease
pIP	possible interstitial pneumonitis
PSL	prednisolone
STAT-5	signal transducer and activator of transcription-5
SP	surfactant protein
TAPVC	total anomalous pulmonary venous connection
TSH	thyroid stimulating hormone
TTF-1	thyroid transcription factor-1
uPH	unexplained pulmonary hypertension

研究方法

I 対象

1. 研究対象

2013 年 8 月～2016 年 6 月までの期間に紹介を受けた症例のうち、以下の 1) と 3) の両方、あるいは 2) と 3) の両方を満たす症例を研究の対象とした。

- 1) 1 歳未満で発症し治療抵抗性の呼吸不全があること。
- 2) 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と考えられる疾患と診断あるいは疑診されていること。
- 3) 両親などの代諾者が本研究への参加について十分な説明を受けた後に、十分な理解の上で自由意思に基づき文書で同意を行っていること。

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の既知の原因により呼吸不全の説明が可能な症例を除外した。

II 方法

1. 症例の集積

日本新生児成育医学会(旧 日本未熟児新生児学会)の新生児稀有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業を通じて日本全国の周産期センター、新生児診療施設に HILD の概要とその診断支援について周知を行った。周知は、学会のホームページおよび年 4 回発行される学会雑誌などを通して行った。原因不明の呼吸不全が遷延する症例について、電子メールや電話により、北海道大学病院周産母子センターで紹介を受けた。臨床経過、胸部 X 線写真や肺 CT などの画像所見および血清マーカーの値などから HILD が疑われる症例について、追加検査や治療法選択について助言を行うとともに、症例の遺伝子解析を行った。

2. 倫理的配慮

研究の内容について主治医から家族へ説明書を用いて説明していただき、研究への参加について家族から書面で同意を得た。症例は連結可能な形で匿名化して個人情報保護に努めた。本研究は北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科・医の倫理委員会より承認を得ている。

3. 解析項目

2015 年 1 月までは *SFTPC*、*ABCA3*、*FOXF1* の解析および GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化試験、抗 GM-CSF 抗体測定を行い、2015 年 2 月から *NKX2.1* の解析を追加した。この期間 SP-B 欠損症を疑う症例が無かったため、*SFTPB* の解析は行わなかった。

筆者は主に診療情報の集約とサンガー法による遺伝子解析を担当した。

4. 解析項目ごとの対象症例

1) *SFTPC*、*ABCA3*

生検にて IP と診断された症例、BAL または生検にて PAP と診断された症例、画像から IP が疑われた症例に対して *SFTPC* と *ABCA3* の解析を行った。

2) *FOXF1*

治療に抵抗性の持続する肺高血圧症を呈した症例に *FOXF1* の解析を行った。

3) *NKX2.1*

2015 年 2 月から開始した。生検にて IP と診断された症例、BAL または生検にて PAP と診断された症例、画像から IP が疑われた症例に対して、*SFTPC* と *ABCA3* に加えて *NKX2.1* の解析を行った。

4) GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化の解析

BAL または生検にて PAP と診断された症例のうち、*SFTPC* と *ABCA3* に異常を認めない症例に行った。北海道大学小児科に依頼した。

5) 抗 GM-CSF 抗体の測定

BAL または生検にて PAP と診断された症例のうち、*SFTPC* および *ABCA3* に異常を認めない症例に行った。新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターに依頼した。

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、改めて遺伝カウンセリングを受けた上で自らの遺伝子解析を希望された場合に限って、両親の末梢血白血球から抽出した deoxyribonucleic acid (DNA) を用いて、同一変異の有無の解析を行った。

5. 診療情報の収集

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、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、ステロイド投与の有無など)とその効果

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、Krebs von den Lungen(KL)-6、甲状腺機能、血液ガス分析など

- 4) 画像検査所見：胸部 X 線写真、肺 CT、心エコー検査所見
 - 5) BAL：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
6. 遺伝子解析

以下に示す Sanger 法により遺伝子解析を行った

1) DNA の抽出

EDTA 化した末梢血 2ml から白血球を分離し、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 μ 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 μ 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/ μ l の濃度に調製した。

2) Polymerase Chain Reaction (PCR)

(1) プライマーの作成

PCR に用いたプライマーを付表 1~4 に示す。*SFTPC* 増幅用のプライマーは、W. E. Lawson らの論文に記載のものを使用した²⁷。*ABCA3*、*FOXF1*、*NKX2.1* 増幅用のプライマーは、Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用い、coding-region 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 μ M の濃度に 1xTE Buffer (10mM Tris, pH 7.5~8.0, 1mM EDTA) を用いて調整した。

(2) PCR 反応液の調製

AmpliTaQ Gold 360 PCR Master Mix (Life Technologies、アメリカ合衆国) 10 μ l を含み、PCR 反応液は総量を 20 μ l とした。各プライマーの濃度は 0.5 μ M として、DNA テンプレート量は 40ng となるよう調製した (表 1)。*ABCA3* の exon 1 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 μ l に対して 4 μ l 添加した。

表 1 - PCR 反応液の組成

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

(3) PCR

PCR は GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems、アメリカ合衆国) を用いた。反応条件は、下記の表 2 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、*FOXFI* では 58°C、その他では 60°C とした。非特異的バンドが現れやすい *ABCA3* の exon 8、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。

表 2 - PCR 反応条件

3 ステップ		2 ステップ	
95°C	10 分間	95°C	10 分間
95°C	30 秒間	95°C	30 秒間
58~60°C	30 秒間	63°C	60 秒間
72°C	60 秒間	×30~40 サイクル	
×30~40 サイクル		72°C	7 分間
72°C	7 分間		

3) 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 (TBS) 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。

4) 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 μ l の大きさに 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。

5) シークエンス

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 forward および reverse の両方向からシークエンスを行った。PCR 産物を抽出した溶液 13.4 μ l とプライマー溶液 0.64 μ l (プライマー 6.4 pmol) を混合し、8 連チューブまたは 96 ウェルを用いて株式会社ファスマックに依頼・提出した。

6) シークエンス波形解析・比較

シークエ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>)、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_001079668.2 (*NKX2.1*)

7. 症例の比較

症例を病理組織から IP と診断された群 (IP)、胸部 X 線像や肺 CT 所見から IP が疑われた群 (possible interstitial pneumonitis, pIP)、BAL や病理組織で PAP と診断された群 (PAP)、原因不明の肺高血圧 (pulmonary hypertension, PH) を持つ群 (unexplained pulmonary hypertension, uPH)、病理組織から ACD/MPV と診断された群 (ACD/MPV) の 5 つの群に分けて比較した。統計学的方法には Fisher の直接法を用い、危険率 0.05 未満を有意とした。

研究結果

1. 対象症例のまとめ

2013 年 8 月から 2016 年 6 月までの 2 年 11 ヶ月の期間に、日本全国 56 施設から紹介された 70 症例が対象となった。相談時の年齢は出生直後から 16 歳までであった。

対象症例のまとめを表 3 に示す。病理組織から IP と診断された症例(IP)が 8 症例、胸部 X 線像や肺 CT 所見から IP が疑われた症例(pIP)が 45 症例、BAL や病理組織で PAP と診断された症例(PAP)が 6 症例、原因不明の PH を持つ症例(uPH)が 7 症例、病理組織から ACD/MPV と診断された症例(ACD/MPV)は 4 症例であった。pIP 症例のうち、18 症例が PH を合併していた。病理組織や BAL で確定診断がなされた症例は 25%(18/70 症例)であった。これらの症例のうち、甲状腺機能低下症と精神運動発達遅滞を合併する症例は 2 症例、甲状腺機能低下症のみを合併する症例は 2 症例、精神運動遅滞のみを合併する症例は 2 症例であった。また、PAP 症例のうち 1 症例は基礎に原発性免疫不全症(primary immunodeficiency disease, PID)があり、もう 1 症例は若年性特発性関節炎(juvenile idiopathic arthritis, JIA)に罹患していた。PH なしの症例と PH ありの症例を比較すると、PH ありの症例は PH なしの症例に比べて死亡率が有意に高かった(4/41 (9.8%) 対 13/29 (45%)、 $p=0.0014$)。

表 3 -対象症例のまとめ

	肺高血圧					
	なし			あり		
臨床診断	IP	pIP	PAP	pIP	uPH	ACD/MPV
症例数	8	27	6	18	7	4
在胎週数中央値(週)	39	38	38	39	38	39
範囲 (週)	(35-41)	(35-41)	(30-40)	(33-41)	(35-38)	(37-41)
発症時期中央値	12 m	0 d	2 m	0 d	0 d	0 d
範囲	(0-12m)	(0d-9y)	(0d-84m)	(0d-30d)	(0d-90d)	(0d-0d)
出生直後の発症	3 (38%)	16 (59%)	2 (33%)	16 (89%)	7 (100%)	4 (100%)
生後 4 週以内の発症	3 (38%)	16 (59%)	2 (33%)	17 (94%)	7 (100%)	4 (100%)
死亡率	0 (0%)	2 (7.4%)	2 (33%)	4 (22%)	5 (71%)	4 (100%)

d:day、m:month、y:year

2. 解析結果

解析結果を表 4 に示す。

1) *SFTPC* および *ABCA3* の解析結果

対象症例のうち、62 症例(IP 8 症例全例、pIP 45 症例全例、PAP 6 症例全例、ACD/MPV 4 症例のうち 3 症例)について *SFTPC* および *ABCA3* の解析を行った。ACD/MPV の 1 症例については、相談時点ですでに ACD/MPV と診断されていたため、*SFTPC* および *ABCA3*

の解析は行わなかった。IP 8 症例のうち 1 症例(*SFTPC* c. 218T>C, p. Ile73Thr)、pIP 45 症例のうち 3 症例(*SFTPC* c. 541delC p. Leu181Trpfs5X、*SFTPC* c. 218T>C p. Ile73Thr が 2 症例)、PAP 6 症例のうち 2 症例(*SFTPC* c. 134T>G p. Leu45Arg、*SFTPC* c. 181A>G p. Ser61Gly)に *SFTPC* の変異を認めた。*ABCA3* については本研究期間内には変異症例を認めなかった。

2) *FOXF1* の解析結果

PH ありの 29 症例に *FOXF1* の解析を行ったところ、pIP 症例のうち 1 症例(*FOXF1* c. 256C>T, p. Arg86Trp)、ACD/MPV のうち 1 症例 (*FOXF1* c. 852_856delTATCA, p. Tyr284X)に *FOXF1* の変異を認めた。

3) *NKX2. 1* の解析結果

2015 年 2 月から解析を開始し、18 症例(IP 5 症例、pIP 11 症例、PAP 2 症例)について施行した。甲状腺機能低下症と精神運動発達遅滞を合併する症例は 2 症例、甲状腺機能低下症のみを合併する症例は 2 症例、精神運動発達遅滞のみを合併する症例は 2 症例にみられた。IP 症例のうち 1 症例(*NKX2. 1* c. 1117C>T p. Gln373X)、pIP 症例のうち 1 症例(*NKX2. 1* c. 1016_1017insCCATCTCCGTGGGCAGCGG p. Gly339fs)、PAP 症例のうち 1 症例(*NKX2. 1* c. 954delG c. 958delG p. Gln318fs)に *NKX2. 1* の変異を認めた。また、*NKX2. 1* に変異を認めた 3 症例のうち、甲状腺機能低下症と精神運動発達遅滞を共に合併する症例は 2 症例および甲状腺機能低下症のみを合併する症例は 1 症例であった。1 症例(表 4 Case 10)は総肺静脈還流異常症(total anomalous pulmonary venous connection, TAPVC)を合併していた。

4) GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化の解析結果

PAP 6 症例のうち 2 症例に施行した。2 症例ともに STAT-5 の正常なリン酸化が確認され、GM-CSF 受容体異常による congenital pulmonary alveolar proteinosis(CPAP)は否定的であった。

5) 抗 GM-CSF 抗体測定結果

PAP 6 症例のうち 2 症例に抗 GM-CSF 抗体測定を施行したところ、1 症例(発症時 4 歳)に陽性の結果を認めた。

表 4 -原因が同定された症例

Case	臨床診断	性別	発症	転帰	遺伝子変異/その他異常
1	IP	男	1 歳	S (2y4m)	<i>SFTPC</i> c. 218T>C, p. Ile73Thr
2	IP/HT	女	11 ヶ月	S (11y)	<i>NKX2.1</i> c. 1117C>T, p. Gln373X
3	pIP/HT/PMD	男	出生直後	S (1y6m)	<i>NKX2.1</i> c. 1016_1017insCCATCTCCGT- GGGCAGCGG, p. Gly339fs
4	pIP	男	出生直後	S (6y)	<i>SFTPC</i> c. 541delC, p. Leu181Trpfs5X
5	pIP	男	1 歳 5 ヶ月	S (2y8m)	<i>SFTPC</i> c. 218T>C, p. Ile73Thr
6	pIP	男	1 歳 7 ヶ月	S (2y5m)	<i>SFTPC</i> c. 218T>C, p. Ile73Thr
7	pIP/PH	女	出生直後	S (4m)	<i>FOXF1</i> c. 256C>T, p. Arg86Trp
8	PAP	女	出生直後	D (2y5m)	<i>SFTPC</i> c. 134T>G, p. Leu45Arg
9	PAP	男	出生直後	D (9y4m)	<i>SFTPC</i> c. 181A>G, p. Ser61Gly
10	PAP/HT/PMD	女	3 ヶ月	S (2y9m)	<i>NKX2.1</i> c. 954delG, c. 958delG, p. Gln318fs
11	ACD/MPV	女	出生直後	D (5d)	<i>FOXF1</i> c. 852_856delTATCA, p. Tyr284X
12	PAP	女	4 歳 4 ヶ月	S (5y)	Anti GM-CSF antibody

S:生存、D:死亡、HT:甲状腺機能低下症、PMD:精神運動発達遅滞

以上のように、遺伝子変異/その他異常を全部で 17%(12/70 症例)に認めた。その内訳は、IP 症例の 25%(2/8 症例)、pIP(PH なし)症例の 15%(4/27 症例)、PAP 症例の 67%(4/6 症例)、pIP(PH あり)の 5.6%(1/18 症例)、uPH 症例の 0%(0/7 症例)、ACD/MPV の 25%(1/4 症例)であった(表 5)。

表 5 -対象症例における原因の分布

臨床診断 (症例数)	肺高血圧						Overall (70)
	なし			あり			
	IP (8)	pIP (27)	PAP (6)	pIP (18)	uPH (7)	ACD/MPV (4)	
<i>SFTPC</i> の変異	1/8	3/27	2/6	0/18	NE	0/3	6/62
<i>ABCA3</i> の変異	0/8	0/27	0/6	0/18	NE	0/3	0/62
<i>FOXF1</i> の変異	NE	NE	NE	1/18	0/7	1/4	2/29
<i>NKX2.1</i> の変異	1/5	1/6	1/2	0/5	NE	NE	3/18
pSTAT-5	NE	NE	0/2	NE	NE	NE	0/2
抗 GM-CSF 抗体	NE	NE	1/2	NE	NE	NE	1/2
合計	2/8	4/27	4/6	1/18	0/7	1/4	12/70

NE: not examined

3. 原因が同定された症例

原因が同定された 12 症例の臨床経過および検査結果を以下に示す。

Case 1

感冒を契機に 1 歳頃から体重増加不良となり、1 歳 5 ヶ月時に発熱、咳嗽および酸素化不良のため入院となった。酸素投与、抗生剤投与および短時間作用型 $\beta 2$ 刺激薬吸入にて加療され、翌日には解熱し全身状態は改善したが、酸素化不良は改善せず、入院 3 日目から methylprednisolone (mPSL) を投与されたが酸素投与を中止することができなかった。KL-6 が 1111U/ml と高値であり、入院 2 週間目に肺 CT を撮影したところ、肺野全体にスリガラス状陰影 (ground-glass opacification, GGO) を認めた。肺生検にて非特異性間質性肺炎 (nonspecific interstitial pneumonia, NSIP) の診断となった。prednisolone (PSL) および hydroxychloroquine (HCQ) にて加療し、在宅酸素療法 (home oxygen therapy, HOT) を導入して退院となった。*SFTPC* の解析にて、exon 3 に c. 218T>C, p. Ile73Thr の変異をヘテロ接合性に認めた (図 3)。これは 2004 年に報告された変異であり²⁸、*SFTPC* の変異の報告の 25% を占め、最も多い変異とされている²⁹。これらのことから、Case 1 は p. Ile73Thr による IP である可能性が高いと考えられた。いずれかの発症前診断に結びつく可能性についての説明を含めた遺伝カウンセリングの後に両親の遺伝子解析を行ったところ、母親に同変異を認め、父親には同部位に遺伝子変異を認めなかった。母親は未発症であり、発症前診断を行った可能性があると考えられた。

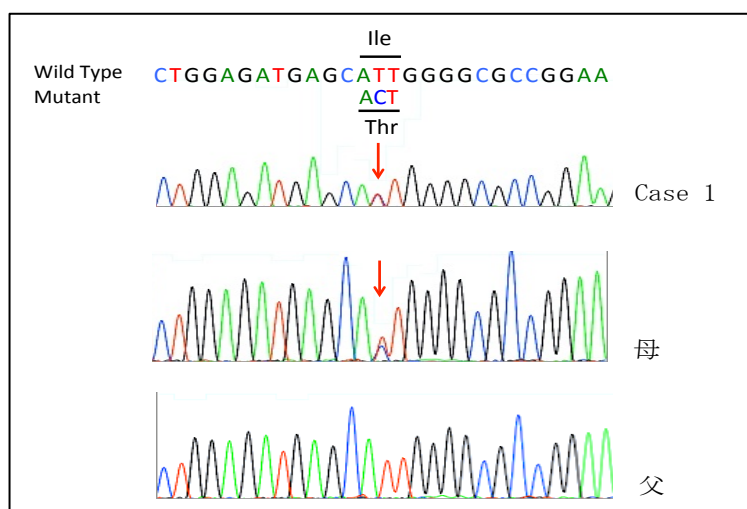


図 3. Case 1 と両親の遺伝子解析結果

Case 1 と母親に *SFTPC* exon 3 において c. 218T>C, p. Ile73Thr の変異をヘテロ接合性に認めた。父親には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 2

10歳女児。生後11ヶ月頃から呼吸障害を認めておりHOTを導入されていた。thyroid stimulating hormone(TSH) 14.7 μ IU/ml と甲状腺機能低下症を認め生後6ヶ月からレボチロキシンを内服していた。KL-6は最高6520 U/ml まで上昇しており、1歳時に行った肺生検でIPの診断となった。発達遅滞や舞踏病などの神経学的異常は見られなかった。NKX2.1の解析にて、exon 3にc.1117C>T, p.Gln373Xの変異をヘテロ接合性に認めた(図4)。ナンセンス変異であり、完全な蛋白が合成されないと考えられることから、Case 2はp.Gln373XによるIPの可能性が高いと考えられた。両親の遺伝子解析は行っていない。

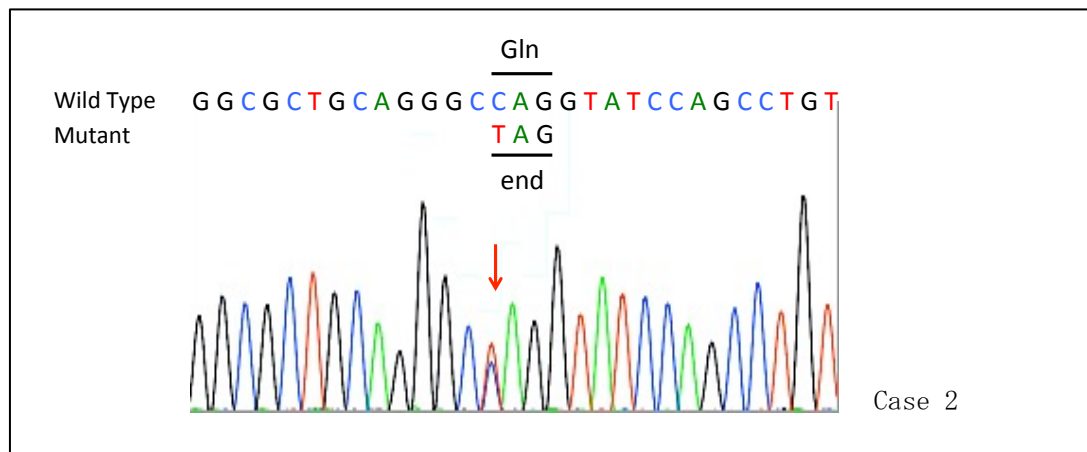


図4. Case 2の遺伝子解析結果

NKX2.1 exon 3においてc.1117C>T, p.Gln373Xの変異をヘテロ接合性に認めた。

Case 3

出生直後から重症新生児一過性多呼吸と PH の診断で挿管管理された。日齢 14 に抜管され、日齢 31 まで経鼻持続気道陽圧を継続し、HOT を導入して日齢 61 に退院した。TSH $359 \mu\text{IU/ml}$ 、free thyroxine (fT4) 0.67ng/ml と甲状腺機能低下症を合併しており、レボチロキシンを開始された。3 ヶ月半で啼泣時のチアノーゼが出現し、肺 CT では不均一な GGO と airbronchogram が見られ、KL-6 は 929U/ml と上昇していた。生検は行っていないが、ステロイド薬投与の効果があつたことから、IP の可能性が高いと考えた。NKX2.1 の解析にて exon 3 において、19 塩基の挿入によるフレームシフト変異 c.1016_1017insCCATCTCCGTGGGCAGCGG, p.Gly339fs をヘテロ接合性に認めた(図 5)。フレームシフト変異により、正常のアミノ酸配列とは異なった蛋白が翻訳されることが考えられた。両親の遺伝子解析では、同部位に遺伝子異常を認めなかったため、*de novo* 変異と考えられた。これらのことから、Case 3 は p.Gly339fs による IP の可能性が高いと考えられた。

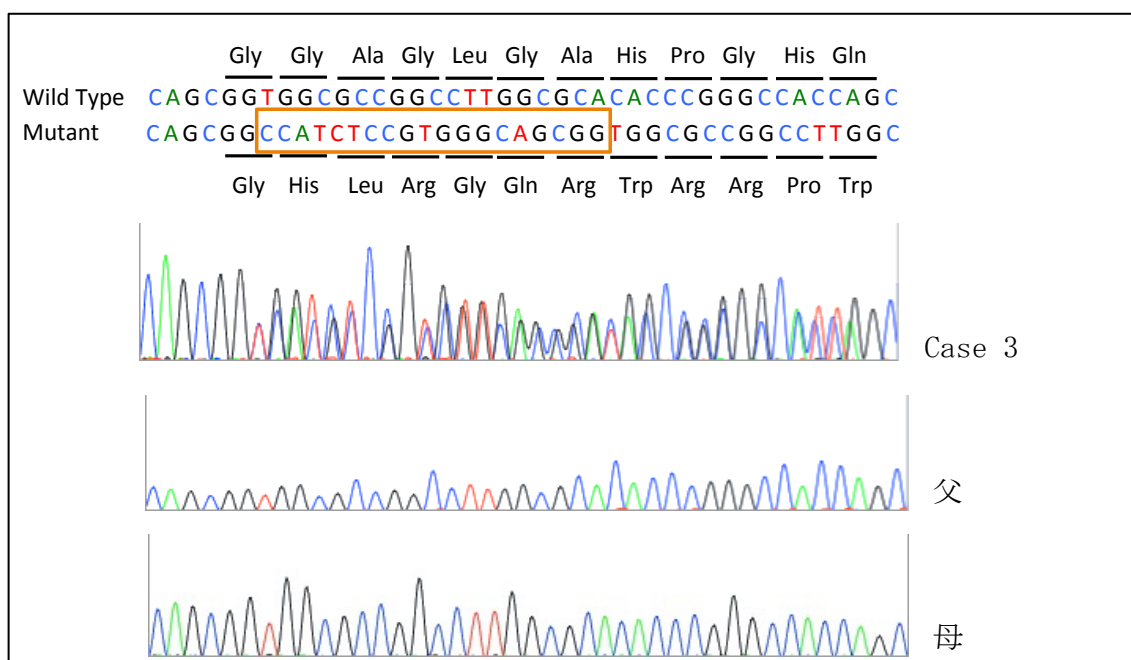


図 5. Case 3 と両親の遺伝子解析結果

Case 3 に NKX2.1 exon 3 において、19 塩基の挿入によるフレームシフト変異 c.1016_1017insCCATCTCCGTGGGCAGCGG, p.Gly339fs をヘテロ接合性に認めた。父母には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 4

出生直後から呼吸障害を呈し、人工呼吸管理を行った。何度か抜管を試みたが二酸化炭素貯留のため再挿管を繰り返した。日齢 30 に抜管し経鼻持続気道陽圧に変更、日齢 57 にステロイド薬内服を開始し、日齢 58 に鼻カヌラ酸素に変更し、生後 3 ヶ月に HOT を導入して退院となった。ステロイド薬は漸減し 6 ヶ月に中止、在宅酸素は 9 ヶ月に中止となった。5 歳 5 ヶ月時に当院に相談を受け、6 歳時には呼吸障害なく、成長・発達ともに問題なく経過している。SFTPC の解析で exon 5 に c. 541delC, p. Leu181TrpfsX5 の変異をヘテロ接合性に認めた(図 6)。ナンセンス変異であることから完全な蛋白が合成されないこと、p. 181 以降のアミノ酸が置換されプロ SP-C 蛋白が短くなっていること、p. 181 以降の変異では成人発症も含め IP 症例が多いことから、Case 4 は p. Leu181TrpfsX5 による IP である可能性が高いと考えられた。発症前診断に結びつく可能性についての説明を含めた遺伝カウンセリングの後に両親の遺伝子解析を行ったところ、母親に同変異を認め、父親には同部位に遺伝子変異を認めなかった。母親は未発症であり、発症前診断を行った可能性があると考えられた。

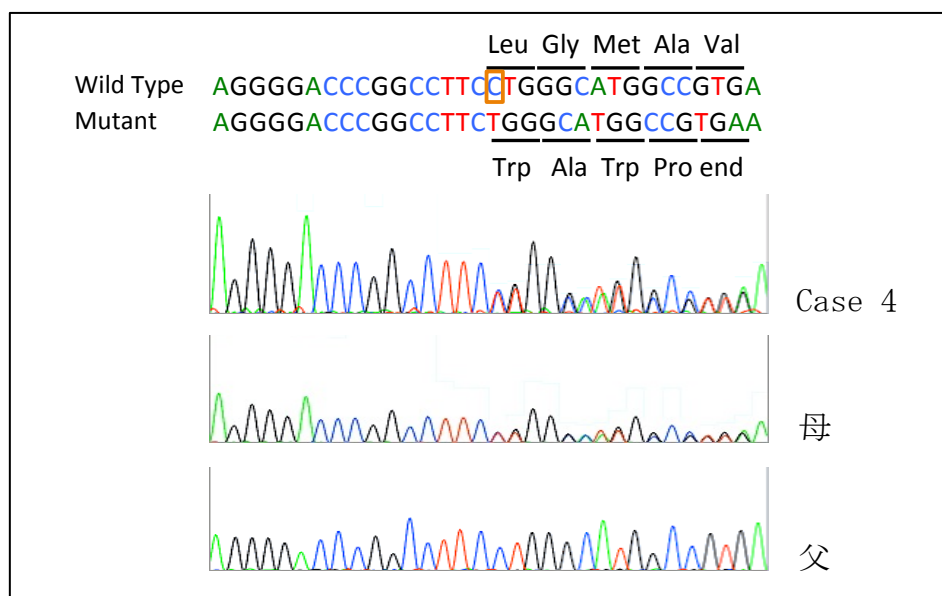


図 6. Case 4 と両親の遺伝子解析結果

Case 4 と母親に SFTPC exon 5 において、1 塩基の欠失によるフレームシフト変異 c. 541delC, p. Leu181TrpfsX5 をヘテロ接合性に認めた。父親には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 5

1歳5ヶ月男児。RSウイルス感染時に呼吸不全あり、入院の上酸素投与をされた。肺CTでGGOを認めたためPSL投与を開始した。漸減中止し退院となったが、翌月にノロウイルスに感染し、呼吸不全を認めたため、再び入院となった。PSLを再開したが、肺CTでは軽快していたためPSLは漸減中止となった。その後の定期受診でSpO₂が80%半ばであったため入院の上、PSL再開され継続のまま退院となった。*SFTPC*の解析でexon 3にc.218T>C, p. Ile73Thrのヘテロ変異を認めた(図7)。Case 1で認めた変異と同様の変異であり、Case 5は*SFTPC* p. Ile73ThrによるIPの可能性が高いと考えられた。両親の遺伝子解析は行っていない。

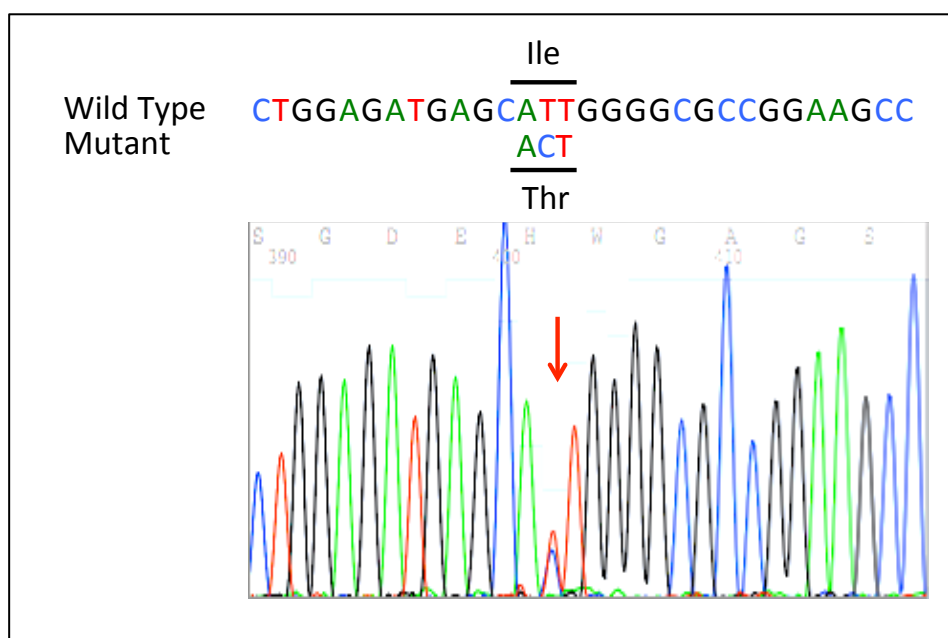
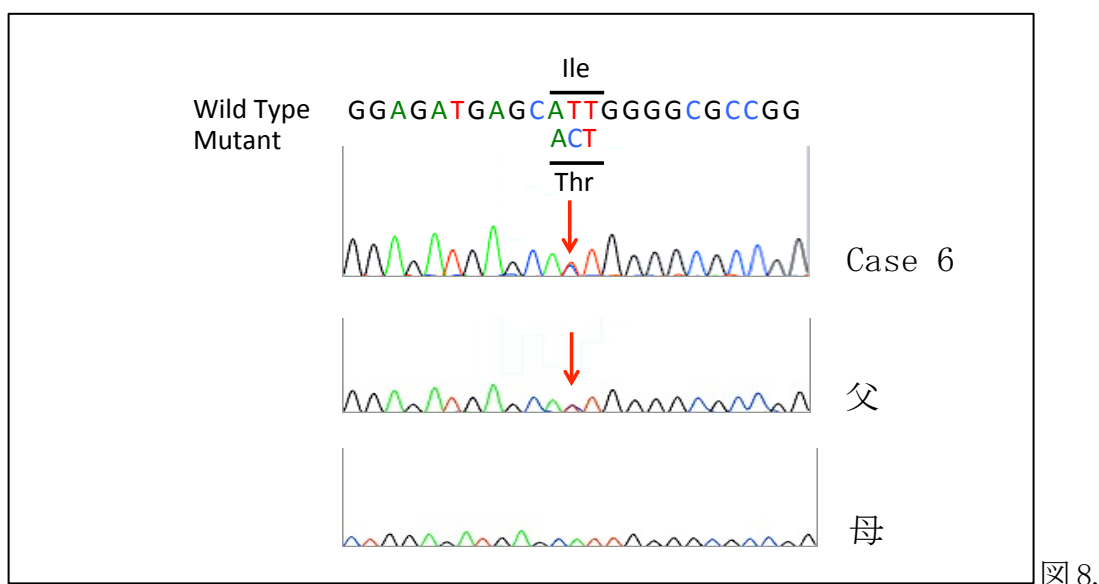


図7. Case 5の遺伝子解析結果

SFTPC exon 3において、c.218T>C, P. Ile73Thrの変異をヘテロ接合性に認めた。

Case 6

1歳7ヶ月時に発熱、酸素化障害、多呼吸、呻吟および陥没呼吸を認めたため入院となった。胸部X線写真でGGOを認め、KL-6 1259 U/ml と上昇していた。抗生剤を投与し酸素化は軽快したが酸素投与は続いた。BALを行ったところ、PAPの所見はなく、IPと推定した。*SFTPC*の解析で exon 3 に c.218T>C, p. Ile73Thr の変異をヘテロ接合性に認めた(図8)。Case 1 で認めた遺伝子変異と同様の遺伝子変異であり、Case 6 は *SFTPC* p. Ile73Thr による IP の可能性が高いと考えられた。発症前診断に結びつく可能性についての説明を含めた遺伝カウンセリングの後に両親の遺伝子を解析したところ、父親に同変異を認め、母親には同部位に遺伝子変異を認めなかった。父親は未発症であり、発症前診断を行った可能性があると考えられた。



Case 6 と両親の遺伝子解析結果

Case 6 と父親に *SFTPC* exon 3 において c.218T>C, p. Ile73Thr の変異をヘテロ接合性に認めた。母親には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 7

出生直後にエアリーク、PHを認め、気管挿管による100%酸素投与、ニトログリセリン投与、inhaled nitric oxide (iNO) 吸入療法、prostaglandin I₂ (PGI₂) 投与および鎮静にて加療された。日齢15の肺CTではGGOを認めた(図9)。日齢31に抜管したがPHが増悪したため、再度気管挿管しiNO吸入療法が開始された。*FOXF1*の解析でexon 1 に c. 256C>T, p. Arg86Trpの変異をヘテロ接合性に認めた(図10)。2013年にSenらが報告した遺伝子変異であり、その報告の症例は日齢120に死亡した²¹。Case 7では、生後4ヶ月時点で同治療を継続し生存していた。両親の遺伝子を解析したところ、同部位に遺伝子変異を認めなかったため、*de novo*変異と考えられた。生検は行われていないが、遺伝子変異と臨床症状をあわせて考えると、Case 7は*FOXF1* exon 1 c. 256C>T, p. Arg86TrpによるACD/MPVの可能性が高いと考えられた。

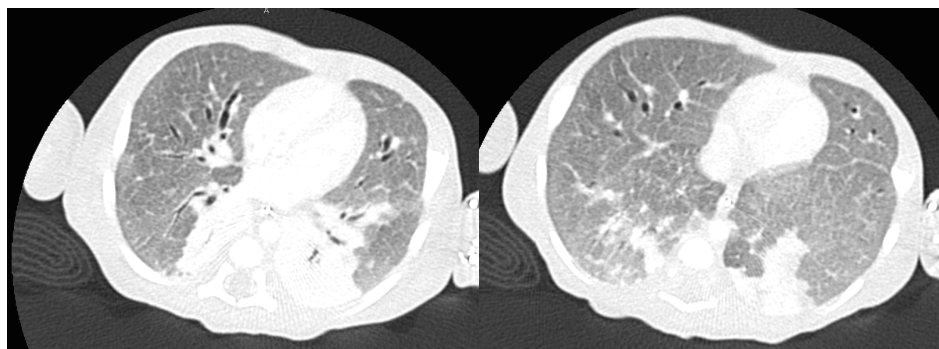


図9. Case 7の肺CT(日齢15)

全肺野にびまん性のGGOを認め、両肺野肺側に強い浸潤影を認める。

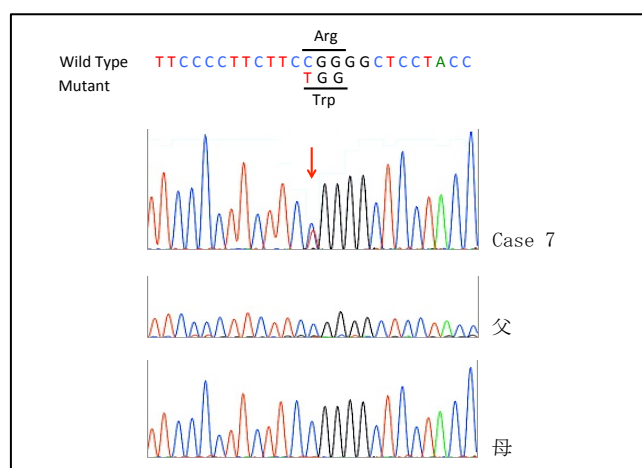


図10. Case 7と両親の遺伝子解析結果

Case 7に*FOXF1* exon 1において、c. 256C>T, p. Arg86Trpの変異をヘテロ接合性に認めた。父母には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 8

出生直後から呼吸障害があり、人工呼吸管理および人工肺サーファクタント投与を行った。日齢2に人工肺サーファクタントで気管洗浄した後、日齢4に抜管した。日齢16の肺CTで背側を中心にGGOを認め(図11)、同日呼吸障害が増悪し再度人工呼吸管理となった。気管洗浄したところ、粘稠性の高い乳白色の液体を回収し、吸引物の病理所見では好酸性の無構造物を認め、PAPの診断となった。日齢44に抜管し、日齢50までネーザルハイフローによる管理を行った。日齢77に自宅退院となった。退院後はRSV感染症にて入院となることがあった。HOTにて肺移植を待機していたが、体重増加不良であり2歳5ヶ月に誤嚥性肺炎のため死亡した。*SFTPC*の解析でexon2にc.134T>G, p. Leu45Argの変異をヘテロ接合性に認めた(図12)。2010年にPotterjoy BSらにより報告された変異である³⁰。両親の遺伝子を解析したところ父母には、同部位に遺伝子変異を認めなかったことより、*de novo* 変異と考えられた。これらのことから、Case 8は*SFTPC* exon 2 c.134T>G, p. Leu45ArgによるPAPの可能性が高いと考えられた。

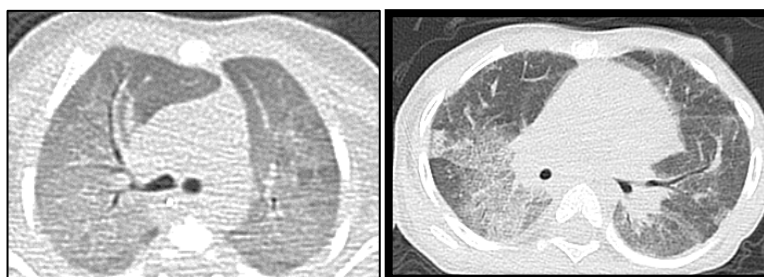


図11. Case 8の肺CT

左(日齢16)では背側を中心にGGOを認める。右(1歳2ヶ月)では地図状のGGOとcrazy paving patternを認める。

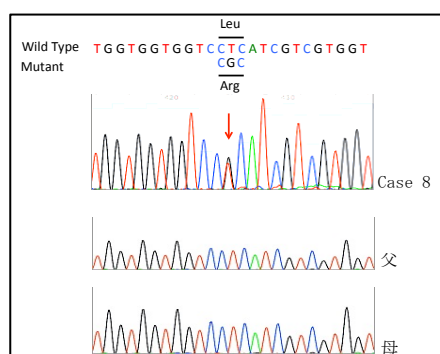


図12. Case 8と両親の遺伝子解析結果

Case 8に*SFTPC* exon 2において、c.134T>G, p. Leu45Argの変異をヘテロ接合性に認めた。父母には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 9

出生時から呼吸障害を認め、気管挿管され、人工呼吸管理となり、日齢 30 に BAL にて PAP と診断された。PSL 及び HCQ にて加療し、1 歳 9 ヶ月で人工呼吸器から離脱し、2 歳 9 ヶ月時に HOT で退院となった。8 歳 4 ヶ月時に気腫像の増悪あり PSL の副作用も強く、9 歳 0 ヶ月に両側生体肺移植を行った。術後は PH、気管支吻合部狭窄、出血を合併し、ECMO 下に人工換気、iNO 吸入療法、経静脈的血管拡張薬にて加療したが、敗血症を合併し 9 歳 4 ヶ月時に死亡した。生体肺移植を行う前の *SFTPC* の解析で exon 2 に c.181A>G, p.Ser61Gly の変異をヘテロ接合性に認めた(図 13)。SIFT では“probably damaging”、Polyphen-2 では“damaging”の判定であった。Ser61 は多種間でよく保存されている(図 14)。これらのことから、Case 9 の PAP は *SFTPC* p.Ser61Gly が原因と考えられた。両親の遺伝子解析は行っていない。

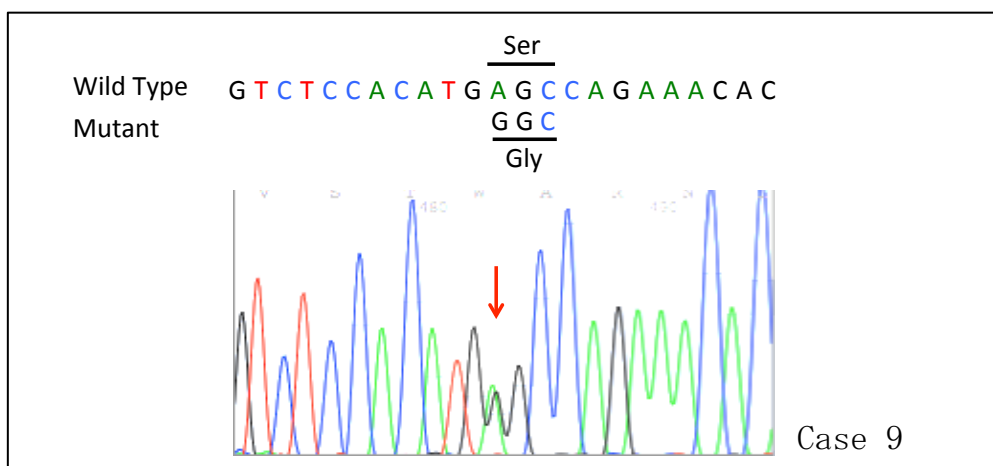


図 13. Case 9 の遺伝子解析結果

SFTPC exon 2 において、c.181A>G, p.Ser61Gly の変異をヘテロ接合性に認めた。

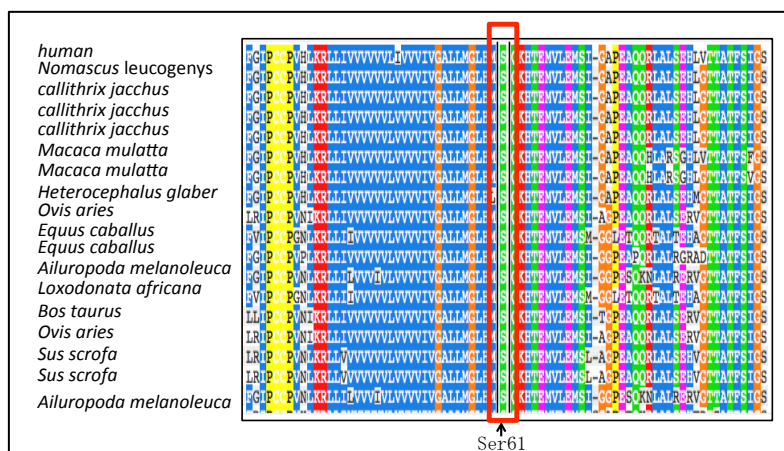


図 14. 前駆 SP-C 蛋白のアミノ酸配列の多種間比較

Case 10

1歳11ヶ月女児。TAPVCに対して新生児期に根治術を行った。生後3ヶ月頃から胸部X線写真にてGGOを認め(図15)、SpO2低値であったため、HOTを導入された。ステロイド薬投与は無効であった。生後9ヶ月に行われた肺生検でPAPが疑われた。甲状腺機能低下症を認め、レボチロキシンを内服している。NKX2.1の解析で exon 3 に c. 954delG, c. 958delG, p. Gln318fs の変異をヘテロ接合性に認めた(図16)。フレームシフト変異により、正常のアミノ酸配列とは異なった蛋白が翻訳されと考えられた。両親の遺伝子を解析した結果、父母には同部位に遺伝子変異を認めなかったことより、*de novo* 変異と考えられた。これらのことから、Case 10 は NKX2.1 p. Gln318fs による PAP である可能性が高いと考えられた。



図15. Case 10 の肺 CT (2歳)

全肺野に地図状のGGOを認め、両肺野背側に強い浸潤影を認める。

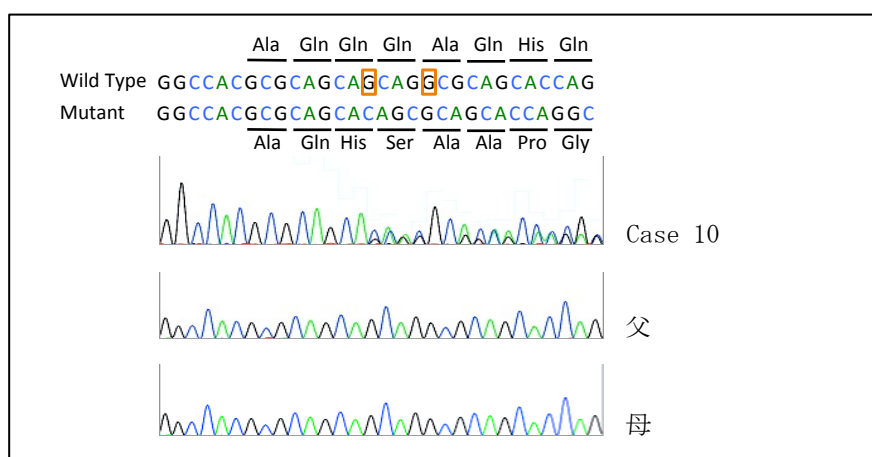


図16. Case 10 の遺伝子解析結果

Case 10 に NKX2.1 exon 3 において c. 954delG, c. 958delG, p. Gln318fs の変異をヘテロ接合性に認めた。父母には同部位の遺伝子変異は認められなかった。

Case 11

出生時から PH が続き、人工呼吸管理、高濃度酸素投与、鎮静、iNO 吸入療法、prostaglandin E1 (PGE₁) 投与、mPSL パルス療法、人工肺サーファクタント投与にて加療された。症状改善なく、日齢 5 に気胸を併発し胸腔ドレナージを行ったが、心拍・血圧低下の回復が乏しく死亡した。剖検の結果は ACD/MPV であった。合併症として、鎖肛を認めた。FOXFI の解析で exon 1 に c. 852_856del5, p. Tyr284X の変異をヘテロ接合性に認めた (図 17)。ナンセンス変異により、完全な蛋白が合成されないため、Case 11 は FOXFI p. Tyr284X による ACD/MPV の可能性が高いと考えられた。両親の遺伝子解析は行っていない。

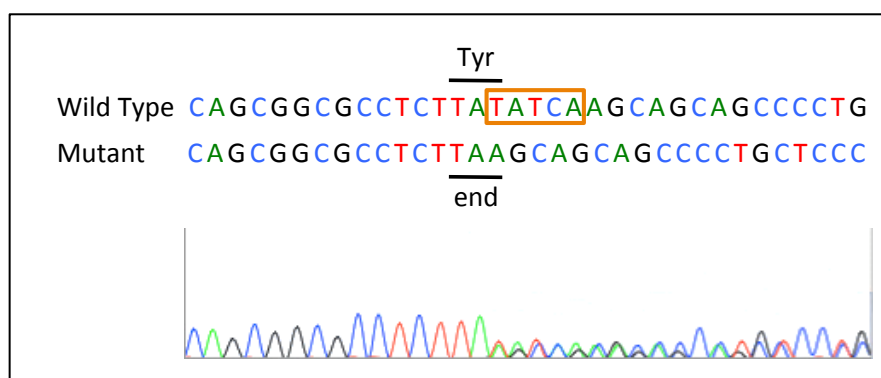


図 17. Case 11 の遺伝子解析結果

FOXFI exon 1 において、c. 852_856del5, p. Tyr284X の変異をヘテロ接合性に認めた。

Case 12

4 歳 4 ヶ月頃から体重減少がみられ、咳、微熱が持続した。胸部 CT でメロンの皮様の所見があり、BAL を行い PAP と診断された。SFTPC, ABCA3 の解析では遺伝子変異を認めず、pSTAT-5 を行ったが STAT-5 のリン酸化に異常はなかった。抗 GM-CSF 抗体を測定したところ、抗 GM-CSF 抗体価が高値であったことから、APAP と診断された。GM-CSF 吸入療法が有効であったが、再燃を繰り返し治療に難渋している。

考察

本研究の対象症例については、日本新生児成育医学会の新生児稀有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業を通じて全国の周産期センターおよび新生児診療施設に周知した。日本新生児成育医学会の会員数は約 3000 人で、会員が属する施設は、日本の新生児特定集中治療室(neonatal intensive care unit, NICU)病床の 90%以上を網羅している。

2013年8月から2016年6月までの間にHILDを疑う70症例中に対して*SFTPC*、*ABCA3*、*FOXF1*の解析を中心とした原因検索を行い、2015年2月からは*NKX2.1*の解析を加えた。11/70 症例(16%)に遺伝子変異を認め、1 症例に抗 GM-CSF 抗体陽性症例を認めた。遺伝子変異を認めた 11 症例のうち、臨床診断の内訳は、IP が 2 症例、PAP が 3 症例、pIP が 5 症例(PH なし 4 症例、PH あり 1 症例)、ACD/MPV が 1 症例であった。また、遺伝子変異の内訳は、*SFTPC* の変異は 6 症例、*ABCA3* の変異は 0 症例、*FOXF1* の変異は 2 症例、*NKX2.1* の変異は 3 症例であった。抗 GM-CSF 抗体陽性症例は 1 症例であった。

本研究で遺伝子解析を行った症例をみると、pIP 症例が最も多かった。そのなかでも新生児期から症状を認める症例が多かった。新生児期においては肺生検やBALは体格が小さい、呼吸状態が悪い、家族の同意が得られないなどの理由で困難である場合が多いため、胸部X線写真や肺CTなどの画像情報とKL-6などの血清マーカーの値からIPを疑い遺伝子解析を相談される症例が多かったと考えられる。

SFTPC に変異を認めた 6 症例のうち、p. Ile73Thr (Case 1、Case 5、Case 6)、p. Leu45Arg (Case 8) は既報変異である^{28,30}。Case 1、Case 5、Case 6 にみられた p. Ile73Thr は海外でも多く報告されており、IP と PAP の両方の病像を呈することがあり、*SFTPC* の変異の 25%以上を占めるとされている²⁹。発症時期や表現型などの臨床像は様々である³¹。Akimoto らの報告では、*SFTPC* p. Ile73Thr は同定されなかったが、Akimoto らの報告(2011年2月～2013年7月)と合わせると SP-C 異常症例のうち 33%(3 症例/10 症例)であり、海外の報告と同様に最も多かった。3 症例とも幼児期発症の IP であった。p. Ser61Gly (Case 9) は出生直後から発症した PAP の診断であり、PSL、HCQ の治療を受けた後、9 歳時に肺移植を行ったが、その 4 ヶ月後に死亡した。P. Leu181Trpfs5X (Case 4) は我々の知る限り同変異の報告はみられない。しかし、フレームシフト変異であることから異常な蛋白が翻訳されると考えられる。Case 1、Case 4、Case 6、Case 8 は責任変異について両親の遺伝子解析を行った。Case 1、Case 4 では母親に症例と同一の変異を認め、Case 6 では父親に症例と同一の変異を認めた。Case 4 はナンセンス変異であること、p. 181 以降のアミノ酸が置換されプロ SP-C 蛋白

が短くなっていること、p. 181 以降の変異では成人発症も含め IP 症例が多いことから、疾患の原因である可能性が高いと考えられた。SP-C 異常症は発症時期に幅があるため、親の遺伝子変異を同定することは親の発症前診断となり得ることが考えられる。Case 8 では両親に遺伝子変異を認めず、児の *de novo* 変異であると考えられた。

Akimoto らの報告と本研究における *SFTPC* の変異の分布を図 18 に示す。*SFTPC* の 5' 側には PAP が多く分布し、3' 側には IP が多く分布していると考えられた。しかし、3' 側にも PAP の症例は見られるため、遺伝子変異の場所と臨床症状が一致するとは一概には言えない。

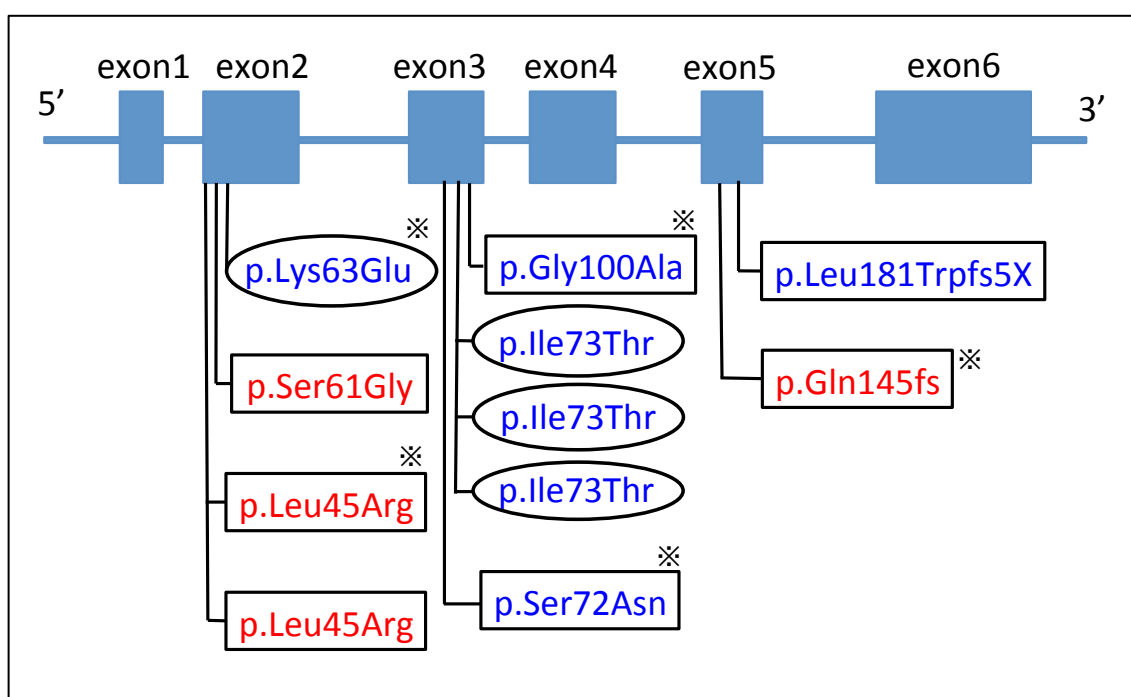


図 18. *SFTPC* にみられた責任変異の分布

□ : 新生児期発症 ○ : 乳児期以降発症

赤 : 肺胞蛋白症 青 : 間質性肺炎

※Akimoto らの報告症例

今回の研究においては、SP-B 欠損症を疑う症例を認めず *SFTPB* の解析は行わなかった。SP-B 欠損症は欧米から報告される肺サーファクタント関連疾患の中で最も頻度が高いが、日本では SP-B 欠損症の確定診断例がなく、韓国や南アフリカからも報告がない²⁹。欧米から報告されている SP-B 欠損症の異常アレルの 2/3 が 121ins2 と呼ばれるであり、121ins2 には創始者効果があると考えられている³²。日本人には SP-B 欠損症

の保因者が極端に少ないと考えられる。

今回の研究において 62 症例に *ABCA3* の解析を行ったが、変異を認めたものはいなかった。Akimoto らの報告とあわせても 2011 年 2 月から 2016 年 6 月までの期間に 1 症例しか同定できなかった。しかし、保因者は多いとの報告があり²⁹、軽症例は見逃されている可能性がある。

FOXF1 の変異は、2 症例で同定された。1 症例は剖検で ACD/MPV と診断された 4 症例のうちの 1 症例であった。もう 1 症例は PH を伴う pIP の症例 (Case 7) であり、生検を行っていないが遺伝子解析結果から ACD/MPV と診断した。ACD/MPV の約 80% は先天性心疾患、消化管疾患、泌尿器疾患を認めると報告されている³³。多くは出生直後から重症の PH を呈するが、長期生存する症例も報告されている³⁴。p. Arg86Trp (Case 7) は既報変異であり Sen による既報症例は日齢 120 に死亡している²¹。Case 7 は出生直後から肺高血圧を呈し、人工呼吸器管理、鎮静、iNO 吸入療法や PGI₂ 投与などによる治療が行われ、生後 4 ヶ月の時点では生存していた。Sen らによる既報例は合併症を有しておらず Case 7 にも先天性心疾患、消化器疾患、泌尿器疾患のいずれも認めなかった。Case 11 と同一の変異 (*FOXF1* c. 852_856delTATCA, p. Tyr284X) は我々が知る限り過去に報告がないが、ナンセンス変異であり責任変異である可能性が高いと考えられた。出生直後から PH が強く、人工呼吸管理、鎮静、iNO 吸入療法や PGI₂ 投与などによる集中治療を行われたが日齢 5 に死亡した。合併症として、鎖肛を認め人工肛門造設術が行われた。剖検で ACD/MPV と診断された 4 症例のうち、3 症例には coding-region 全体と exon と intron 境界でのダイレクトシーケンスでは変異を認めなかった。*FOXF1* は、270kb 上流に肺特異的なエンハンサーがあり、イントロン内にもエンハンサーがある。また、*de novo* 変異の病原性欠失は主に母由来の 16 番染色体にあり、家族内発症があることから、*FOXF1* にはインプリンティング現象が存在すると考えられている³⁵。そのため、現在行っている遺伝子解析以外に、他に *FOXF1* 上流の変異・欠失についての解析、*FOXF1* を含む領域の欠失の解析、*FOXF1* 以外の責任遺伝子の解析について調査することが今後必要であると考ええる。

我々は、Akimoto らの研究が対象にしていなかった *NKX2.1* を新たに解析対象に加えた。

2015 年 2 月から 18 症例に *NKX2.1* の解析を行い、*NKX2.1* に変異を 3 症例 (Case 2、Case 3、Case 10) に同定した。これら 3 種の変異は我々が知る限り既報変異ではないが、case 2 はナンセンス変異、case 3 と case 10 ではフレームシフト変異であることから、病原変異である可能性が高いと考えられる。Carré らの報告によると、*NKX2.1* 変異による症状のうち、肺症状は 54%、甲状腺機能低下症は 87%、神経症状を持つのは

93%である。症状の組み合わせの中で3症状全てを有するのは50%である。次に多いのは甲状腺機能低下症と神経症状の2症状を有すもので30%である³⁶。本研究における症例では、肺症状以外にCase 2では甲状腺機能低下症を、Case 3とCase 10では甲状腺機能低下症と精神運動発達遅滞を認め、甲状腺機能低下症は3症例全てに見られた。また、Case 10ではTAPVCを合併しており、新生児期に手術された。

我々が知る範囲内では、これまでに本邦においてNKX2.1/TTF-1異常症の17症例について7つの論文が報告されている³⁷⁻⁴³。肺疾患としては繰り返す呼吸器感染が6症例について報告されているが、IPやPAPの報告は見られなかった。11症例は甲状腺機能低下症を合併しており、神経運動発達遅滞は4症例にみられ、舞蹈病は14症例にみられた。また、我々が知る限りTAPVCの合併は報告されていない。

NKX2.1異常症の発症時期は様々である。また、肺症状にはIPやPAP以外にもRDSや繰り返す呼吸器感染などが知られており、その内訳はRDSが76%、interstitial lung disease (ILD)が19%、繰り返す呼吸器感染は43%である⁴⁴。本研究はIPやPAPの臨床症状のみにて研究を行っているため、RDSや繰り返す呼吸器感染を伴う症例についての把握は不十分である。また、日本新生児成育医学会を通じて全国のNICU施設へ本調査について通知しているが、小児科施設への周知は不十分であると思われる。今後、小児科施設を含めた全国調査を行うことが必要であると考ええる。

抗GM-CSF抗体陽性症例(Case 12)は4歳で診断されており、報告されているAPAP症例の中では最年少と考えられる。

Akimotoらの報告と本研究を合わせると、合計9症例のPAP症例を認めた。9症例のうち6症例に遺伝子変異を認め、*SFTPC*の変異が4症例、*ABCA3*の変異、*NKX2.1*の変異がそれぞれ1症例ずつであった。他にはJIA、PID、APAPが各1症例であった。日本における小児期のPAPに対する遺伝子解析は有用であると考えられた。

海外の報告では、アメリカでは保因者頻度から推定される罹患率は*ABCA3*異常症が最も多いとされており⁴⁵、Turcuらの報告では、*ABCA3*異常症が最も多く、SP-C異常症、SP-B欠損症がそれについている⁴⁶。それらに対して、日本ではSP-C異常症が最も多いと考えられた。今回の調査の結果、Akimotoらの報告と同様に*SFTPC*の変異が日本では一番多いと考えられ、本研究により*NKX2.1*の変異はそれに次ぐと予想された。

アメリカではchILD foundationが症例の集積を行い発表している。ヨーロッパではchILD-EUが症例を集積している。アジアでは現在のところ、日本での症例を集積している我々のグループ以外に系統的にHILDの症例を集積している研究はない。

我々の考えるHILDに対する診断アプローチについて図19に示す。原因不明で治療抵抗性の酸素化障害を主体とする呼吸不全がある症例の診療にあたっては、臨床症状、

胸部X線写真や肺CTなどの画像情報、KL-6、SP-A、SP-D、lactate dehydrogenase (LDH) といった血清マーカーの値から HILD が疑われるか否かを判断する。HILD と判断されない場合には、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の鑑別を行う。HILD が疑われる場合、PAP と IP では治療方法が異なるため、PAP と IP を鑑別するために BAL を行う。PAP と診断された場合には、抗 GM-CSF 抗体を測定し、APAP である場合には、全肺洗浄や GM-CSF 吸入療法にて治療を開始する。CPAP である場合には、原因遺伝子により治療が異なる。Ⅱ型肺胞上皮細胞側の異常に対しては肺移植、肺胞マクロファージ側の異常に対しては造血幹細胞移植による治療を考慮する。IP が疑われる場合には、PSL や HCQ、マクロライドによる治療を行う。根本的治療は PAP と同様にⅡ型肺胞上皮細胞側の異常では肺移植、肺胞マクロファージ側の異常では造血幹細胞移植である。

本研究は、日常臨床に取り入れられるなど、将来発展する可能性のある研究である。

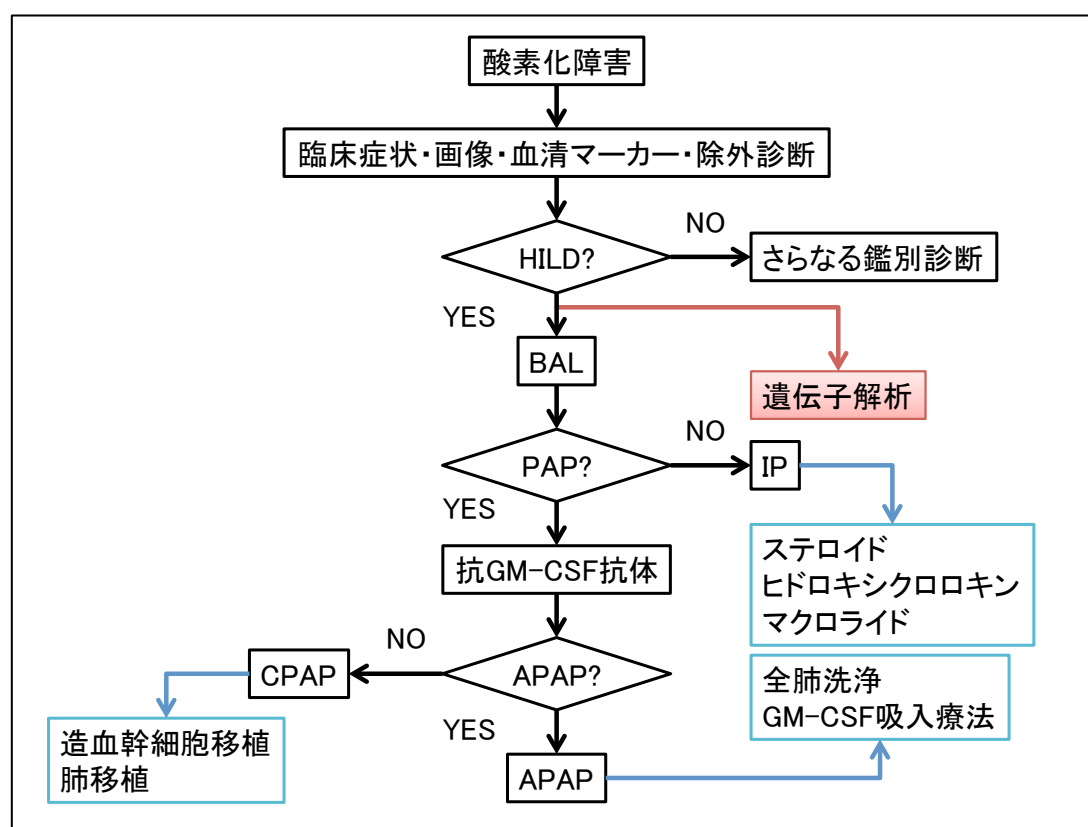


図 19 HILD に対する診断アプローチ

総括および結論

2年11ヶ月の研究期間内に、全国56施設から間質性肺疾患が疑われた70症例が紹介された。その内訳は、間質性肺炎と診断された症例が8症例、間質性肺炎が疑われた症例が45症例、肺胞蛋白症と診断された症例が6症例、ACD/MPVと診断された症例が4症例、原因不明の肺高血圧症例が7症例であった。

70症例のうち、11症例に疾患の原因と考えられる9種類の遺伝子変異(*SFTPC* p. Ile73Thr、*SFTPC* p. Leu181Trpfs5X、*SFTPC* p. Leu45Arg、*SFTPC* p. Ser61Gly、*FOXF1* p. Arg86Trp、*FOXF1* p. Tyr284X、*NKX2.1* p. Gln373X、*NKX2.1* p. Gly339fs、*NKX2.1* p. Gln318fs)を同定した。

遺伝子変異を同定した11症例のうち、間質性肺炎と診断された症例は1症例、間質性肺炎を疑われた症例は6症例、肺胞蛋白症と診断された症例は3症例、ACD/MPVと診断された症例は1症例であった。

SP-C異常症の原因としては、日本でも海外と同様に*SFTPC* p. Ile73Thrの頻度が最も高いと考えられた。

肺胞蛋白症6症例のうち、3症例に遺伝子変異を同定し、1症例に抗GM-CSF抗体陽性例を認めた。残る2症例は二次性肺胞蛋白症であった。本研究において、肺胞蛋白症に対する遺伝子解析は疾患の原因を明らかにするために有用であると考えられる。

ACD/MPVと診断された4症例のうち、*FOXF1*に変異を認めたのは1症例のみであった。今後の課題として、*FOXF1*の上流の変異や欠失、*FOXF1*を含む領域の欠失および*FOXF1*以外の遺伝子の変異による発症などの可能性について検討する必要がある。

日本人における小児のHILDの原因としてはSP-C異常症が最も頻度が高いことが再確認された。SP-C異常症に次いでTTF-1/*NKX2.1*異常症の頻度が高いことが新たに判明し、ABCA3異常症が稀であること、SP-B欠損症が極めて稀であることが再確認された。

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小児科学分野 有賀正教授、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 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。また、様々な面から研究をサポートして下さいました、秋元琢真先生、兼次洋介先生、森岡圭太先生、卯月ゆたか先生、池田雅彦先生にお礼申し上げます。

本研究は、日本医療研究開発機構研究費【肺胞蛋白症、遺伝子間質性肺疾患に関する研究:重症難治化要因とその克服】、および、公益財団法人森永奉仕会【森永奉仕会研究奨励金】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。

付表

付表 1 - *SFTPC* プライマーと増幅産物の長さ

プライマー名	プライマー (5' to 3')	増幅産物の長さ
PP1F	CTCACCAGGTTTGCTCTTG	551
PP1R	TGAAGTTTCTCATGGCTTCTGA	
PP2F	GGGACACCAAGACCACTAAGC	
PP2R	CATGAGGTCATGAGGCTGTC	531
PP3F	CTCTGTATCACCGCATGGAG	
PP3R	CCTCTGTCTGGCATGTCCT	
PP4F	CATGGGTCTCCACATGAGC	540
PP4R	ACCCACCTGCTGGTAGTCAT	
PP5F	CCAGGTTCTGGAGATGAGCA	
PP5R	CTGGCTTGTAAGCGATCAGC	381
PP6F	CTGGTTACCACTGCCACCTT	
PP6R	AATAGCCACCATTTCGACAC	
PP7F	CCGAATGGTGGCTATTTGTC	484
PP7R	AGCGAGCCTCCTCCACAG	
PP8F	CCGGTGAGCAGGTGTGAT	
PP8R	CCACTTTGCTCTCCCAAGG	508
PP9F	ATGGGAGTGGGCAGAGGT	
PP9R	AAAGCCCGTGGATGCTCCCT	

付表 2 - *ABCA3* プライマーと増幅産物の長さ

プライマー名	プライマー (5' to 3')	増幅産物の長さ
EXON1F7	AGACTTCCACTGCTGCGAAAC	909
EXON1R3	GCTGTCGGTCGCTACATATCC	
EXON2F	CGGCCAGGTGTTTATTTTCTA	
EXON2R	CCTCCCTTACTGGAAGTCTGG	514
EXON3F	GAGCGCTAGCTCATGGTGAT	
EXON3R	GGCAACATAGCAAGACCCTATC	
EXON4F2	AAGTGGCACAAAAGAAGGTGA	328
EXON4R2	ATACAATAGGGCACGGTGATG	
EXON5F2	CAGACTCTGGAGGGAGGTCAG	
EXON5R2	GAAGAAGCAGAGGCCAAGTCT	531
EXON6F	AGAGGATTTGCCGTCTTTCAT	
EXON6R	AAGGGAAAGCAGTGCCTTTTA	
EXON7F	GAGTGGTGAGTTCTCGGCTGT	399
EXON7R	GCCAAATGTCCTGAAAAGTATT	
EXON8F	AAGTCACTCTGTTGCCCAAG	
EXON8R	ACAGAGCGAGACTCCAACCTCA	490
EXON9F	ATCACTTGAGCCAGGAGTTT	
EXON9R	GAGAGGAGTGGGACATTGACA	
EXON10F	TGGGAAGAACTTTGTGGTCAG	438
EXON10R	CTTTCCTCCTTCCAGTCCAAC	

EXON11F	AGCTTGTGTCCCGTGTAGATG	
EXON11R	AGCTATCCAGCCCACACTCAG	488
EXON12F	GCTTGAAGAAAGCTGTCCAAC	
EXON12R2	GCTCTGAAGCGGAAGGATTAC	579
EXON13F	CACAGGGATGAAACAAGTTGG	
EXON13R	CTGCCGTGCTGGTAAGTCTTC	393
EXON14F	CAGGGTTGCAGAGACACTGAG	
EXON14R	GCGCTGAGATGGTGTAAAGG	419
EXON15F	TCAGAGGAAATTAGGGGAGACA	
EXON15R	TCCCTTCCTCCAGTTTAGCTC	352
EXON16F	GGTTCCTCTCACCAGAACCTC	
EXON16R	GAGTCCTCCAAGGATGGTGAT	365
EXON17F	CATCACCATCCTTGGAGGACT	
EXON17R	CAGAGGCAACAGACAGGAAGT	466
EXON18F	CTCCGGTTCTCTAGCCTCCTT	
EXON18R	CTCTGAGCACAAGCCCTCAT	351
EXON19F	GACTGGTATCGAACTCCTGATCT	
EXON19R3	ACTTCCTCCATGGTGGTGATG	248
EXON20F	CATAAGCAGATGCATGAGCAA	
EXON20R	GTGCCTGAGGTAGAGCATGAG	535
EXON21F	CGTCACACAGAACAGCACCTG	
EXON21R	GAACAGCCAAGAACCATCCTC	510
EXON22F	CTATTGGGTCCCTGATTAGCC	
EXON22R	GGGCAGACACAATGCTCTATC	466
EXON23F	CTCCCATAAGCCCCCTTAGTG	
EXON23R	ATTCCAGCTGTCCTCCCTGAG	470
EXON24F	ACCTCCAAATGCTCCTCTCAC	
EXON24R	CTTATCCGTGCTGTGTGGAGT	562
EXON25F	ACTCCACACAGCACGGATAAG	
EXON25R	CCTTGTTACAGATGCCCAGAC	504
EXON26F	TGACCTACTGGCCTTCACATC	
EXON26R	CCGTACAGTGGGAGACCATCT	453
EXON27F	AAGGCCTTAGTCCCACCAGAC	
EXON28R	CATTTCAAGCCACAGATGCAG	711
EXON29F	ACTGGCAGGAACCACAGACAG	
EXON29R	GCTCTATGCTATGGGGACCTT	374
EXON30F	ATGGGAGCCAATGCTAACTCT	
EXON30R	GAACTTGCTCTTGAGGTGCTG	545
EXON31F	CACAGCATGGAGGAGTGTGAG	
EXON32R	TGGAAAGTGACTCCTCTGTGG	591
EXON33F3	CTTAGCCAGCGTCCCTTACCT	
EXON33R3	CATTCTGTGCATACTGCCTTG	473
EXON33F4	GGCCCATCTTACATCCTCTCT	
EXON33R4	TGCTTCTAGGAGATGCTGTGG	570
EXON33F5	GAATGGACCATGCAGATCACT	
EXON33R5	CAGTGTATTCTCTGCGTGTGC	489

付表 3 - *FOXF1* プライマーと増幅産物の長さ

プライマー名	プライマー (5' to 3')	増幅産物の長さ
EXON1aF	GTCTCTTCCTCCTCCTCCTC	493
EXON1aR	CCCTCCTCGAACATGAACTC	
EXON1bF	TGCTTCATCAAGCTACCCAAG	645
EXON1bR	GTGGCTGTTCTGGTGCAGATA	
EXON1cF	CAAGCCCATGTACAGCATGA	583
EXON1cR	CTGCCACTCAGACTCGACTTC	
EXON2F	CCTCTGCCTGAACTCTGAGC	398
EXON2R	GTGTCTTTGCATTGGGGACT	

付表 4 - *NKX2.1* プライマーと増幅産物の長さ

プライマー名	プライマー (5' to 3')	増幅産物の長さ
EXON1F	AGCAGAGGTGTCCCTCTGACG	368
EXON1R	AGAGATGGTTGAGAGGAAGGA	
EXON2F	AAAAAGCAGCGAGGCTTCGCC	512
EXON2R	CTCTCGCCGCACCTCC	
EXON3aF	GCCAATGGCGCGGAAAACA	514
EXON3aR	CTGGCACGGTTTGCCGTCTT	
EXON3bF	GCTACAAAATGAAGCGCCAG	584
EXON3bR	AAGAAAAGTCGAAGCGCGTG	

引用文献

1. Hadchouel, A., Wieland, T., Griesse, M., Baruffini, E., Lorenz-Depiereux, B., Enaud, L., Graf, E., Dubus, JC., Halioui-Louhaichi, S., Coulomb, A., Delacourt, C., Eckstein, G., Zarbock, R., Schwarzmayer, T., Cartault, F., Meitinger, T., Lodi, T., de, Blic, J. & Strom, TM. Biallelic Mutations of Methionyl-tRNA Synthetase Cause a Specific Type of Pulmonary Alveolar Proteinosis Prevalent on Réunion Island. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 826-831 (2015).
2. Kuroki, Y. & Voelker, DR. Pulmonary surfactant protein. *J. Biol. Chem.* 269, 25943-25946 (1994).
3. Nogee, LM., de Mello, DE., Dehner, LP. & Colten, HR. Brief report ; deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N. Engl. J. med.* 328, 406-410 (1993).
4. Nogee, LM., Garnier, G., Dietz, HC., Singer, L., Murphy, AM., deMello DE. & Colten, HR. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J. Clin. Invest.* 93, 1860-1863 (1994).
5. Nogee, LM., Dunbar, AE 3rd., Wert, SE., Askin, F., Hamvas, A. & Whitsett, JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* 344, 573-579 (2001).
6. Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, SJ., Muniswamy, M. & Beers, MF. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 32, 521-530 (2005).
7. Shulenin, S., Nogee, LM., Annilo, T., Wert, SE., Whitsett, JA. & Dean, M.. ABCA3 gene mutations in newborns with fetal surfactant deficiency. *N. Engl. J. Med.* 350, 1296-1303 (2004).
8. Yamano, G., Funahashi, H., Kawanami, O., Zhao, LX., Ban, N., Uchida, Y., Morohoshi, T., Ogawa, J., Shioda, S. & Inagaki, N. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS. Lett.* 508, 221-225 (2001).

9. Wambach, JA., Casey, AM., Fishman, MP., Wegner, DJ., Wert SE., Cole, FS., Hamvas, A. & Nogee, LM. Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 189, 1538-1543 (2014).
10. Bullard, JE., Wert, SE., Whitsett, JA., Dean, M. & Nogee, LM. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 172, 1026-1031 (2005).
11. Matsumura, Y., Ban, N, Ueda, K. & Inagaki, N. Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fetal surfactant deficiency. *J. Biol. Chem.* 281, 34503-34514 (2006).
12. Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, AJ. & Di Lauro, R. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO. J.* 8, 2537-2542 (1989).
13. Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M. & Di Lauro, R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 113, 1093-1104 (1991).
14. Devriendt, K., Vanhole, C., Matthijs, G. & de Zegher, F. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N. Engl. J. Med.* 338, 1317-1318 (1998).
15. Peall, KJ. & Kurian, MA. Benign Hereditary Chorea: An Update. *Tremor. Other. Hyperkinet. Mov (N Y)*. 14, 314 (2015).
16. Langston, C. Misalignment of pulmonary veins and alveolar capillary dysplasia. *Pediatr. Pathol.* 11, 163-170 (1991).
17. Bishop, NB., Stankiewicz, P. & Steinhorn, RH. Alveolar capillary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 184, 172-179 (2001).
18. Sen, P., Thakur, N., Stockton, DW., Langston, C. & Bejjani, BA. Expanding the phenotype of alveolar capillary dysplasia (ACD). *J. Pediatr.* 145, 646-651 (2004).
19. Galambos, C., Sims-Lucas, S., Ali, N., Gien, J., Dishop, MK. & Abman, SH. Intrapulmonary vascular shunt pathways in alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins. *Thorax* 70, 84-85 (2015).

20. Stankiewicz, P., Sen, P., Bhatt, SS., Storer, M., Xia, Z., Bejjani, BA., Ou, Z., Wiszniewska, J., Driscoll, DJ., Maisenbacher, MK., Bolivar, J., Bauer, M., Zackai, EH., McDonald-McGinn, D., Nowaczyk, MM., Murray, M., Hustead, V., Mascotti, K., Schultz, R., Hallam, L., McRae D, Nicholson, AG., Newbury, R., Durham-O'Donnell, J., Knight, G., Kini, U., Shaikh, TH., Martin, V., Tyreman, M., Simonc, I., Willatt, L., Paterson, J., Mehta, S., Rajan, D., Fitzgerald, T., Gribble, S., Prigmore, E., Patel, A., Shaffer, LG., Carter, NP., Cheung, SW., Langston, C. & Shaw-Smith, C. 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).
21. 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).
22. Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida., Kanegasaki, S., Yamada, Y. & Nakata, K. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 190, 875-80 (1999).
23. Uchida, K., Nakata, K., Carey, B., Chalk, C., Suzuki, T., Sakagami, T., Koch, DE., Stevens, C., Inoue, Y., Yamada, Y. & Trapnell, BC. Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *J. Immunol. Methods.* 15, 57-70 (2014).
24. Dirksen, U., Hattenhorst, U., Schneider, P., Schroten, H., Göbel, U., Böcking, A., Müller, KM., Murray, R. & Burdach, S. Defective expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 receptor common beta chain in children with acute myeloid leukemia associated with respiratory failure. *Blood* 15, 1097-1103 (1998).
25. Suzuki, T., Sakagami, T., Rubin, BK., Noguee, LM., Wood, RE., Zimmerman, SL., Smolarek, T., Dishop, MK., Wert, SE., Whitsett, JA., Grabowski, G., Carey, BC., Stevens, C., van der Loo, JC. & Trapnell, BC. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J. Exp. Med.* 24, 2703-2710 (2008).

26. Akimoto, T., Cho, K., Hayasaka, I., Morioka, K., Kaneshi, Y., Furuta, I., Yamada, M., Ariga, T. & Minakami, H. Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan. *Pediatr. Res.* 76, 453–458 (2014).
27. Lawson, WE., Grant, SW., Ambrosini, V., Womble, KE., Dawson, EP., Lane, KB., Markin, C., Renzoni, E., Lympny, P., Thomas, AQ., Roldan, J., Scott, TA., Blackwell, TS., Phillips JA, 3rd, Loyd, JE. & du Bois, RM. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* 59, 977–980 (2004).
28. Brasch, F., Griesse, M., Tredano, M., Johnen, G., Ochs, M., Rieger, C., Mulugeta, S., Müller, KM., Bahuau, M. & Beers, MF. Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur. Respir. J.* 24, 30–39 (2004).
29. Garmany, TH., Wambach, JA., Heins, HB., Watkins-Torrey, JM., Wegner, DJ., Bennet, K., An, P., Land, G., Saugstad, OD., Henderson, H., Nogee, LM., Cole, FS. & Hamvas, A. Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency. *Pediatr. Res.* 63, 645–649 (2008).
30. Poterjoy, BS., Vibert, Y., Sola-Visner, M., McGowan, J., Visner, G. & Nogee, LM.. Neonatal respiratory failure due to a novel mutation in the surfactant protein C gene. *J. Perinatol.* 30, 151–153 (2010).
31. Salerno, T., Peca. D., Menchini, L., Schiavino, A., Boldrini, R., Esposito, F., Danhaive, O. & Cutrera, R. Surfactant Protein C-associated interstitial lung disease; three different phenotypes of the same SFTPC mutation. *Ital. J. Pediatr.* 29, 42–43 (2016).
32. Tredano, M., Cooper, DN., Stuhmann, M., Christodoulou, J., Chuzhanova, NA., Roudot-Thoraval, F., Boëlle, PY., Elion, J., Jeanpierre, M., Feingold, J., Couderc, R. & Bahuau, M. Origin of the prevalent SFTPB indel g.1549C > GAA (121ins2) mutation causing surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 62–69 (2006).
33. 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.* 9, 43–46 (2008).

34. Ito, Y., Akimoto, T., Cho, K., Yamada, M., Tanino, M., Dobata, T., Kitaichi, M., Kumaki, S. & Kinugawa, Y. A late presenter and long-term survivor of alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins. *Eur. J. Pediatr.* 174, 1123–1126 (2015).
35. Szafranski, P. *et al.* Pathogenetics of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins. *Hum. Genet.* 135, 569–586 (2016).
36. Carré, A., Szinnai, G., Castanet, M., Sura-Trueba, S., Tron, E., Broutin-L'Hermite, I., Barat, P., Goizet, C., Lacombe, D., Moutard, ML., Raybaud, C., Raynaud-Ravni, C., Romana, S., Ythier, H., Léger, J. & Polak, M. Five new TTF1/NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2266–2276 (2009).
37. Iwatani, N., Mabe, H., Devriendt, K., Kodama, M. & Miike, T. Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J. Pediatr.* 137, 272–276 (2000).
38. Nagasaki, K., Narumi, S., Asami, T., Kikuchi, T., Hasegawa, T. & Uchiyama, M. Mutation of a gene for thyroid transcription factor-1 (TTF1) in a patient with clinical features of resistance to thyrotropin. *Endocr. J.* 55, 875–878 (2008).
39. Narumi, S., Muroya, K., Asakura, Y., Adachi, M. & Hasegawa, T. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1981–1985 (2005).
40. Ito, K., Iwata, S., Nakashima, Y., Suzuki, E., Hasegawa, Y. & Taketani, T. Father and Daughter Cases with Benign Hereditary Chorea, Hypothyroidism, and Recurrent Pulmonary infections Having TTF1/NKX2-1 Gene Mutations (In Japanese). *The Journal of the Japan Pediatric Society.* 115, 113–117 (2011).
41. Uematsu, M., Haginoya, K., Kikuchi, A., Nakayama, T., Kakisaka, Y., Numata, Y., Kobayashi, T., Hino-Fukuyo, N., Fujiwara, I. & Kure, S. Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome. *J. Neurol. Sci.* 315, 77–81 (2012).
42. Konishi, T., Kono, S., Fujimoto, M., Terada, T., Matsushita, K., Ouchi, Y. & Miyajima, H. Benign hereditary chorea: dopaminergic brain imaging in

- patients with a novel intronic NKX2.1 gene mutation. *J. Neurol.* 260, 207-213 (2013).
43. Hayashi, S., Yagi, M., Morisaki, I. & Inazawa, J. Identical deletion at 14q13.3 including PAX9 and NKX2-1 in siblings from mosaicism of unaffected parent. *J. Hum. Genet.* 60, 203-206 (2015).
 44. Hamvas, A., Deterding, RR., Wert, SE., White, FV., Dishop, MK., Alfano, DN., Halbower, AC., Planer, B., Stephan, MJ., Uchida, DA., Williames, LD., Rosenfeld, JA., Lebel, RR., Young, LR., Cole, FS. & Nogee, LM. Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1. *Chest* 144, 794-804 (2013).
 45. Gower, WA. & Nogee, LM. Surfactant dysfunction. *Paediatr. Respir. Rev.* 12, 223-229 (2011).
 46. Turcu, S., Ashton, E., Jenkins, L., Gupta, A. & Mok, Q. Genetic testing in children with surfactant dysfunction. *Arch. Dis. Child.* 98, 490-495 (2013).