HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肺静脈の連結不良を伴う肺毛細管形成異常の遺伝的多様性に関する研究［全文の要約］
Author(s)	池田, 雅彦
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2572 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14169号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78911
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiko_Ikeda_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

肺静脈の連結不良を伴う肺毛細管形成異常
の遺伝的多様性に関する研究
(Studies on Genetic Lesions associated with
Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of
Pulmonary Veins in Japanese Infants)

2020 年 6 月

北海道大学

池田雅彦

学位論文(要約)

肺静脈の連結不良を伴う肺毛細管形成異常
の遺伝的多様性に関する研究
(Studies on Genetic Lesions associated with
Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of
Pulmonary Veins in Japanese Infants)

2020 年 6 月

北海道大学

池田雅彦

【背景と目的】

肺静脈の連結不良を伴う肺毛細管形成異常（alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins, ACD/MPV）は新生児期に発症し、特徴的な病理学的所見により診断される致死的な希少肺疾患である。ACD/MPV に罹患した児は、出生後数時間以内に重篤な呼吸不全と肺高血圧（pulmonary hypertension, PH）を呈する。ほとんどの患児は新生児期に死亡し、長期生存の報告は極めて少ない。特異的な治療法はないが、肺移植により治癒に至った報告例が少数ながら存在する。我々は全国の周産期センターおよび新生児診療施設に周知を行い、2011 年 2 月から遺伝性間質性肺疾患（hereditary interstitial lung disease, HILD）疑い症例を集積している。HILD 疑い症例の中には、ACD/MPV 症例が一定の割合で含まれており、本研究では、遺伝子解析の前あるいは後に病理学的検査で ACD/MPV と確定診断された症例を対象とした。我々の先行研究では、*FOXF1* のエキソン領域の塩基配列は解析したが *FOXF1* およびその上流のコピー数変異（copy number variations, CNVs）の解析は行っていなかった。そこで今回は、*FOXF1* のエキソン領域の解析を継続するとともに、エキソン領域の塩基配列に変異を認めなかった症例に対する *FOXF1* の CNVs 解析を開始した。本研究の目的は、病理学的に ACD/MPV と確定診断された症例について、エキソン領域の塩基配列に加えて *FOXF1* の CNVs を解析することにより、日本における ACD/MPV の遺伝子変異の内訳、遺伝的多様性を明らかにし、遺伝学的診断が病理学的診断の代用になり得るか否かを評価することである。

【対象と方法】

2011 年 2 月～2018 年 8 月の期間に全国から相談を受けた症例のうち以下の 2 項目の両方

を満たす症例を研究の対象とした。

1） 病理学的に ACD/MPV と確定診断されていること

2） 本研究への参加について十分な説明を受けた後に、両親などの代諾者が自由意思に基づき文書で同意を行っていること

対象全例について *FOXF1* のエキソンとその両端のイントロンを含むエキソン領域の塩基配列解析を行った。塩基配列解析には、2011 年 2 月から 2017 年 12 月までは Sanger 法を用い、2018 年 1 月以降は次世代シークエンサーによる解析を行なった。エキソン領域に変異を認めなかった症例については、*FOX1* およびその上流のエンハンサー領域を含む範囲について multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA）法による CNVs 解析を行った。

【結果】

2011 年 2 月から 2018 年 8 月までの 7 年間の期間に、日本全国から相談を受けた症例の中から、病理学的に ACD/MPV と確定診断された 16 症例が対象となった。15 症例が正期産児で 1 症例が早産児であった。全例において出生体重は妊娠期間相当であり、新生児仮死を認めず、重度の PH を呈した。発症時期は 12 例が新生児期であり、4 例が乳児期であった。10 症例が 1 ヶ月以内に死亡し 4 症例が 1 年以内に死亡した。2 症例が長期生存して肺移植を施行された。2 症例に先天性心疾患の合併があり、2 症例に先天性の消化管異常の合併があった。腎泌尿器異常や椎体異常の合併例はなく、1 症例に多指の合併があった。

病理学的に確定診断された 16 例の ACD/MPV 症例のうち、解析に利用可能な DNA が得られた 13 例について *FOXF1* のエキソン領域の塩基配列解析を行ったところ、6 例に病原性の点変異を同定した。6 種類の変異のうち、3 種類がミスセンス変異（c.222C>G, p.Ile74Met、c.256C>T, p.Arg86Trp、c.272G>C, p.Gly91Ala）、2 種類がフレームシフト変異（c.691_698delGCGGCGGC, p.Ala231ArgfsX61、c.899delT, p.Leu300Argfs）であり、1 種類がナンセンス変異（c.852_856delTACTA, p.Tyr284X）であった。ミスセンス 3 種類は PolyPhen-2 では probably damaging あるいは damaging と評価され、MutationTaster では disease causing と評価された。6 種類の変異は、1000Genome および gnomAD には登録がなかった。

エキソン領域の延期配列に変異を認めなかった 7 例に対して MLPA 法による CNVs の解析を行ったところ、5 例に *FOXF1* の上流に欠失を認めた。*FOXF1* 自体の欠失を認めた症例はなかった。

【考察】

ACD/MPV は新生児期に致死的な PH を来たす疾患であり、確定診断は特徴的な病理所見によりなされるが、ACD/MPV 症例は重篤な PH のために肺生検を行うことが困難な症例

が大半であり、生前の診断確定が難しい。また、死後の病理学的検査が行われないことによる未診断例が多いことが想定される。遺伝子解析により ACD/MPV を診断することが出来れば、ACD/MPV 疑い症例の予後予測および治療方針決定に大きく寄与することが出来る。また、ACD/MPV 症例の多くは *de novo* 発症であるが、家族発症例の報告も散見され、その遺伝学的背景を明らかにすることは病態の解明のみならず、再発率の推察においても重要である。海外の報告では、病理学的に診断された ACD/MPV のうち約 4 割強で *FOXF1* のエキソンに変異が認められ、約 4 割強で *FOXF1* を含む範囲または上流のエンハンサー領域を含む範囲の欠失が認められ、約 1 割で原因が同定されなかった。今回の我々の研究では、本邦でも変異と欠失が概ね海外の報告と同様の割合で認められ、本邦における ACD/MPV の遺伝的背景を明らかにすることができた。また、まず *FOXF1* のシークエンスを行い、変異を認めなかった例に対しコピー数解析を行うという手順により ACD/MPV の約 9 割を診断することができ、遺伝子解析の有用性を示すことができた。過去の報告では ACD/MPV には先天性心疾患、先天性消化管異常、腎尿路異常、椎体異常などの肺外合併が高率に見られるとされている。しかし、今回の報告では心疾患が 2 例、消化管疾患が 2 例認めるのみであった。今回の研究では病理学的検査がなされた症例のみを対象としているため、選択バイアスが存在した可能性がある。すなわち、今回の対象は肺外合併症がないにも関わらず臨床的に説明できない重篤な PH を呈していたために病理学的検査が積極的になされた可能性がある。今後は、日本での ACD/MPV の全体像を明らかにするために、病理学的検査がなされていない、ACD/MPV が疑われる重症 PH 症例に対して遺伝子解析を行うことで、新生児の原因不明の重症 PH に占める ACD/MPV の割合を推定する計画である。また、今回の研究期間に 4 人中 3 人が ACD/MPV を発症した同胞例に遭遇した。過去の同胞例では母親由来のアリルに変異があることが多いことから、父性インプリンティングの存在が想定されている。しかし、今回の家系では健康な父親と ACD/MPV を発症した同胞 3 人が同じ範囲の欠失を共有していた。父親の性線モザイクが同胞発症の原因であることを想定しているが、未だ証明には至っていない。

【結論】

日本人における ACD/MPV は、これまでの海外からの報告と同様、約半数は *FOXF1* 変異、約半数は欠失により発症し、約 1 割は原因不明であった。ACD/MPV については、まずエキソン領域の塩基配列解析を行い、変異が同定されない症例について MLPA 法による CNVs 解析を行い、いずれでも原因が同定されない場合には全エキソーム解析あるいは全ゲノム解析を行うことで効率良い遺伝子診断が可能であると考えられた。