HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	小児期発症SP-C異常症の特徴に関する研究
Author(s)	本庄, 遼太
Description	配架番号：2850
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15916号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15916
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92187
Type	doctoral thesis
File Information	HONJO_Ryota.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

小児期発症 SP-C 異常症の特徴に関する研究

（Studies on clinical features of SP-C disorder with pediatric onset）

2024 年 3 月

北　海　道　大　学

本　庄　遼　太

学位論文

小児期発症 SP-C 異常症の特徴に関する研究

（Studies on clinical features of SP-C disorder with pediatric onset）

2024 年 3 月

北　海　道　大　学

本　庄　遼　太

目次

発表論文および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21 頁
結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27 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。

- Ryota Honjo, Kazutoshi Cho, Kahoko Hashimoto, Kenta Takeda, Yoshitaka Seto, Yosuke Kaneshi, Yuta Furuse, Atsushi Manabe

  Neonatal-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis is a Phenotype Associated with Poor Outcomes in Surfactant Protein-C Disorder

  Early Human Development
  (Accepted, DOI; 10.1016/j.earlhumdev.2023.105930)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

- Ryota Honjo, Kenta Takeda, Yoshitaka Seto, Yuichi Nakamura, Yuta Furuse, Kazutoshi Cho, Atsushi Manabe

  Neonatal-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis with *SFTPC* Gene Variation as an Indicator of Poor Outcome.

  INSPIRED Congress 2023 (converted from 22nd International Congress on Pediatric Pulmonology), 2023.6.30, Antibes Juan-les-Pin, France

要旨

【背景と目的】

肺サーファクタントシステムに関連する遺伝子の変異により発症する間質性肺疾患群を遺伝性間質性肺疾患（hereditary interstitial lung disease, HILD）と呼ぶ。HILD の病型は、間質性肺炎(interstitial pneumonitis, IP)、肺胞蛋白症（pulmonary alveolar proteinosis, PAP）、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, ACDMPV）等の肺の形成異常に大別される。欧米では、常染色体潜性遺伝形式をとるサーファクタント蛋白（surfactant protein）B（SP-B）欠損症と ATP-binding cassette transporter A3（ABCA3）異常症が HILD の主体であるが、日本では、SP-B をコードする *SFTPB*、ABCA3 をコードする *ABCA3* の病原性変異の遺伝子頻度が低いため、*SFTPC* の変異により発症する SP-C 異常症が相対的に主体となる。SP-C の前駆物質である pro SP-C をコードする *SFTPC* は 8 番染色体上にあり、6 つのエキソンからなり II 型肺胞上皮細胞にのみ特異的に発現する。SP-C 異常症は、2001 年に米国の間質性肺炎の母児例で初めて報告され、常染色体顕性遺伝形式をとる。病型は IP となることが多いが、PAP の病型をとる場合もある。発症時期は同一家系・同一変異であっても新生児期から成人期まで幅広く、呼吸器症状の程度も様々である。我々は、日本全国から原因不明の呼吸障害症例に関する相談を受けることを通して、2011 年より HILD の症例集積を行っている。我々が構築した HILD 遺伝子解析パネルの次世代シークエンサーによる解析が 2020 年 4 月に「肺胞蛋白症（自己免疫性または先天性）遺伝子検査」として保険収載され、2024 年 1 月現在、同パネルには *SFTPC*、*SFTPB*、*ABCA3*、*CSF2RA*、*CSF2RB*、*NKX2-1*、*FOXF1*、*GATA2*、*OAS1*、*MARS1*、*FARSB*、*FARSA*、*TBX4* の 13 遺伝子が含まれている。我々は HILD の症例を集積する中で、SP-C 異常症の中に予後不良な群が存在することに気づいた。SP-C 異常症の遺伝子変異と表現型には乖離があるという海外からの報告があるが、同報告には新生児期発症の症例や生命予後不良の症例が含まれていない。また、国内からの SP-C 異常症の報告は少数の症例報告が大部分であり、複数の症例を集積した報告は少ない。本研究の目的は、SP-C 異常症と診断された小児例のうち、重症例の特徴を明らかにすることである。

【対象と方法】

2011 年 4 月～2022 年 3 月の期間に我々が HILD の診断支援を行なった、発症年齢 16 歳未満の SP-C 異常症を対象とした。日本全国の周産期センターお

よび新生児診療施設に HILD の概要とその診断支援について周知を行い、原因不明の呼吸障害例について相談を受け、臨床経過、検査所見から HILD が疑われる症例について遺伝子解析を行った。また、2020 年 4 月以降は、「肺胞蛋白症（自己免疫性又は先天性）遺伝子検査」のかずさ DNA 研究所における診断書作成支援業務を通して情報提供を依頼した。対象全例について *SFTPC* の塩基配列解析を 2017 年 12 月までは Sanger 法を用いて、2018 年 1 月以降は次世代シークエンサーを用いて行なった。収集した診療情報のうち、患児の性別、発症時期（出生から生後 28 日未満か否か)、病型（IP または PAP)、診断方法、遺伝子解析時点の画像所見と呼吸補助、観察期間、観察期間終了時点の予後（死亡、肺移植後の生存、肺移植なしの生存）を用いた。観察期間中に死亡または肺移植を受けた症例を予後不良、それ以外の症例を予後良好として、予後不良と関連する因子を統計学的に検討した。

【結果】

291 例に対して遺伝子解析を実施し、20 例の SP-C 異常症を同定した。SP-C 異常症のうち新生児期発症が 9 例、乳児期以降発症が 11 例であり、病型は、PAP が 4 例、IP が 16 例であった。新生児期発症例のうち PAP が 4 例、IP が 5 例であり、乳児期以降発症の 11 例は全例が IP であった。新生児期発症例のうち 4 例が死亡し、1 例が肺移植により生存していた。乳児期以降発症例のうち 1 例が死亡し、残りの 10 例が生存していた。BRICHOS ドメイン外に変異のある 12 例のうち 3 例が死亡、または肺移植を受けていた。BRICHOS ドメイン内に変異のある 8 例のうち 3 例が死亡しており、そのうち 1 例はエキソン 4 内にフレームシフト変異を持つ新生児期発症 PAP 例であり、残りの 2 例はエキソン 4 のいずれかの末端のスプライシング変異を持つ IP 例であった。新生児期発症の PAP 症例はそれ以外の症例に比べて有意に予後不良の割合が高かった。

【考察】

SP-C 異常症 20 例のうち p.Ile73Thr 変異が 5 例と最も多く、これらは全て IP の病型を取り、かつ良好な生命予後を呈しており、海外の既報と同様の結果であった。成人発症の SP-C 異常症では変異が BRICHOS ドメインに集中しているとの報告があるが、本研究においては BRICHOS ドメインの変異は 20 例中 8 例のみであり成人とは異なる結果であった。一方で、5 例の死亡例が確認され、そのうち 3 例は新生児期に PAP の病型で発症した症例であった。さらに、新生児期発症 PAP の症例は、肺移植で生存した 1 人を除いて全例が死亡しており、新生児期発症 PAP 症例はそれ以外の症例に比べて有意に予後が不良であった。また、p.Leu45Arg 変異は、いずれも新生児期に PAP で発症して

おり、同変異は SP-C 異常症における予後不良と関連する遺伝子変異の一つである可能性が考えられた。その他 2 例の死亡例は、pro SP-C のエキソン 4 の 5’末端あるいは 3’末端のいずれかに変異を有する症例であった。エキソン 4 のスプライシング異常は、異常な pro SP-C を産生することで、dominant negative 様式により予後を不良にする可能性がある。SP-C 異常症を含めた小児の HILD に対する内科的治療には肺サーファクタント補充療法、ステロイド薬全身投与、ヒドロキシクロロキン投与、アジスロマイシン投与等の選択肢がある。内科的治療が奏功しない場合には、肺移植が考慮されるが、本研究で予後不良が示唆された新生児期発症 PAP 症例は、体格が小さいことや、ドナー発生の確率が低いことから現実的には肺移植の実施が困難であり、新たな治療法の確立が期待される。

【結論】

今回我々は長期間に渡って希少疾患である SP-C 異常症の症例を集積することで、SP-C 異常症の重症例の特徴を見出すことができた。予後不良が予測される、新生児期に PAP で発症する症例に対して、本研究で得られた知見を、重症化の機序解明、重症例に対する肺移植以外の新しい治療法開発へと発展させることが次の課題である。

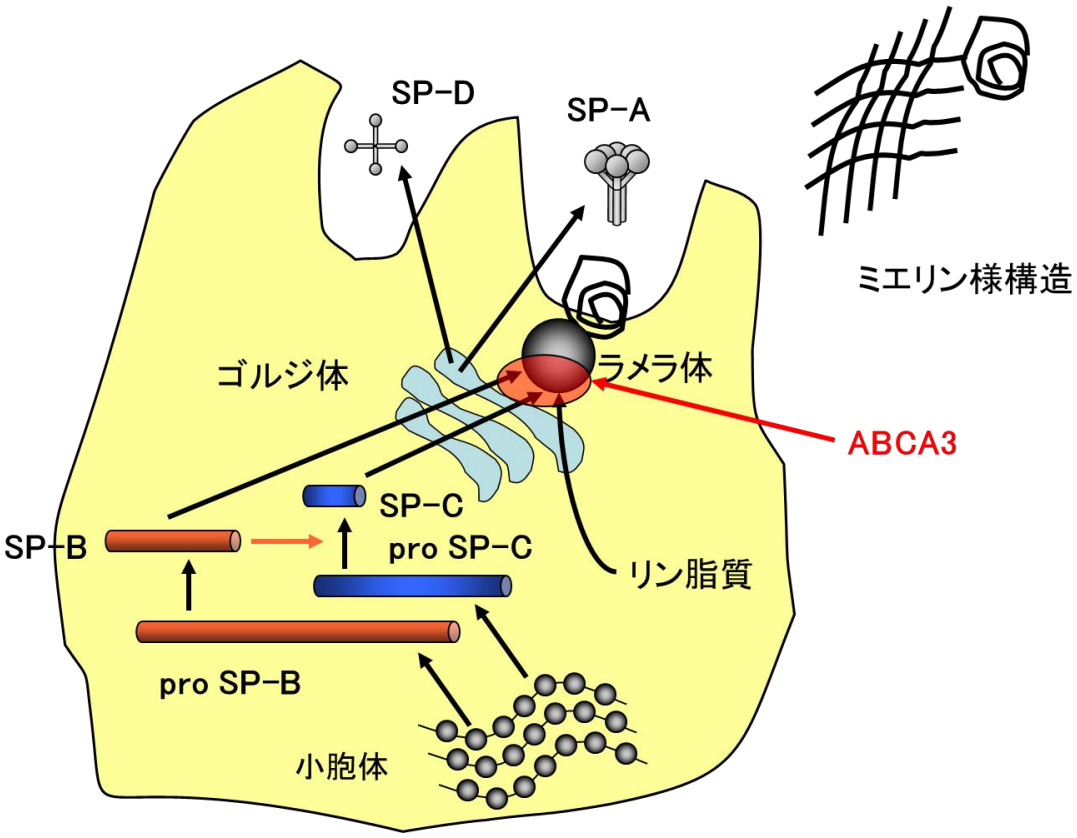
略語表

本文中および図表中で使用した略語は以下のとおりである。

ABCA3	ATP-binding cassette transporter A3
ABG	air bronchogram
ACDMPV	alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveolar lavage
CPAP	congenital pulmonary alveolar proteinosis
CPP	crazy-paving pattern
CSD	consolidation
CT	computed tomography
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
ECMO	extracorporeal membrane oxygenation
GGO	ground glass opacity
HILD	hereditary interstitial lung disease
IP	interstitial pneumonitis
PAP	pulmonary alveolar proteinosis
PCR	polymerase chain reaction
RDS	respiratory distress syndrome
SP-A	surfactant protein A
SP-B	surfactant protein B
SP-C	surfactant protein C
SP-D	surfactant protein D
TBLB	transbronchial lung biopsy
TBS	tris buffered saline
VATS	video assisted thoracic surgery

緒言

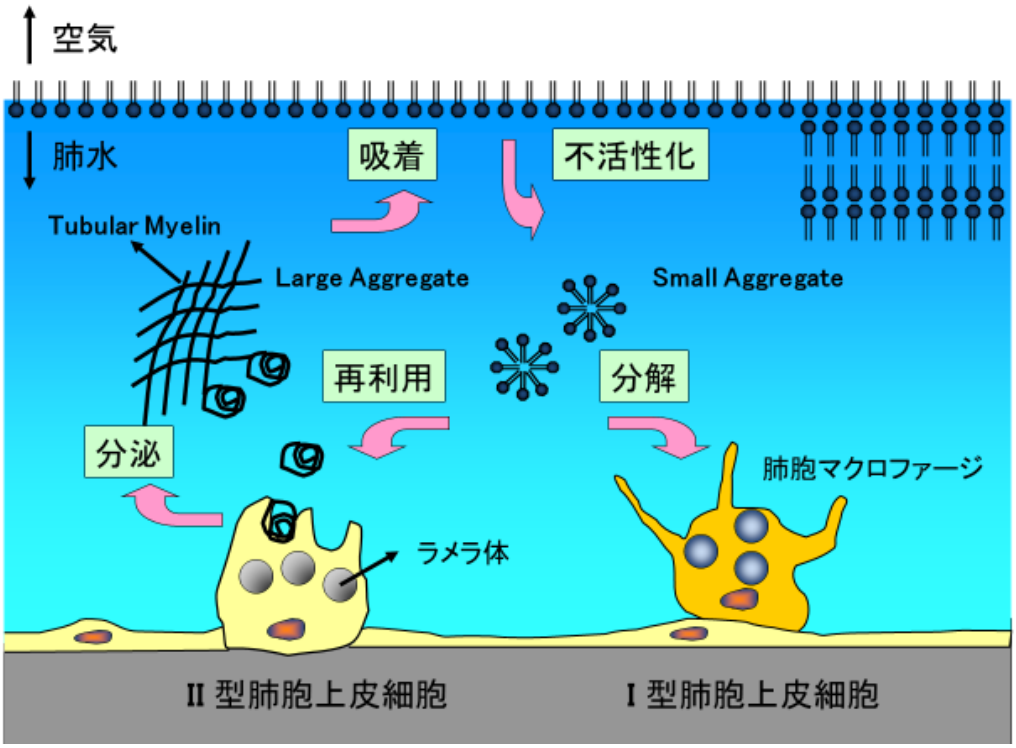
肺サーファクタントは脂質と蛋白質からなる複合物質であり、II 型肺胞上皮細胞で合成・蓄積・分泌される（Bernhard, 2016）。肺サーファクタント脂質の大部分はリン脂質であり、その主体はジパルミトイルホスファチジルコリン（dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC）である。肺サーファクタント蛋白としては、現在までにサーファクタント蛋白（surfactant protein）A（SP-A）、SP-B、SP-C、SP-D が報告されている。SP-A と SP-D は C タイプレクチンに分類される親水性蛋白であり、肺サーファクタントの表面活性には影響せず、肺胞表面の免疫機能と肺サーファクタントの代謝に関連する。一方、SP-B と SP-C は高度に疎水性の蛋白であり、肺サーファクタントの表面活性に寄与する（Liekkinen, et al, 2023）。肺サーファクタントの疎水性成分は、特異的脂質トランスポータである ATP-binding cassette transporter A3（ABCA3）により、II 型肺胞上皮細胞内でラメラ体に蓄積される（図 1）。



【図 1】II 型肺胞上皮細胞
肺サーファクタントの主成分であるリン脂質は、ABCA3 によりラメラ体に移送され蓄積する。SP-C は pro SP-C から SP-B の存在下で成熟する。

ラメラ体として肺胞表面の肺胞被覆層に分泌された肺サーファクタント

は、展開してミエリン様構造物となり、肺胞被覆層と肺胞気の間に成立する気液界面に吸着して表面活性を発揮する（図 2）。



【図 2】肺サーファクタントのホメオスターシス
II 型肺胞上皮細胞からラメラ体として分泌された肺サーファクタントは気液界面に吸着して表面活性を発揮する。ミセル化した肺サーファクタントの大部分は肺胞マクロファージにより異化され、一部が II 型肺胞上皮細胞で再利用される。

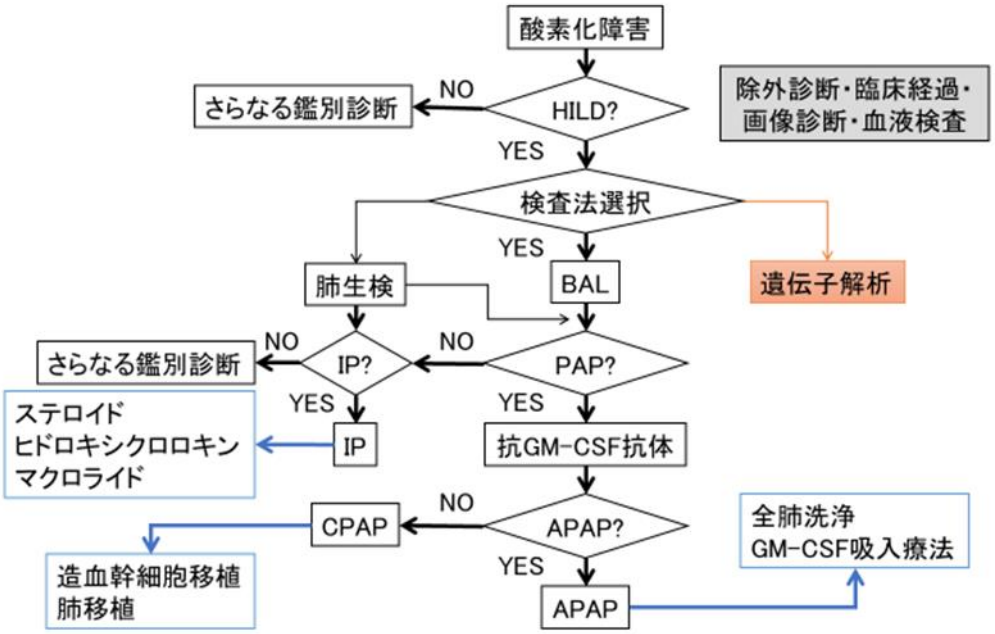
早産や遺伝的要因により肺サーファクタントが量的に欠乏した状態で出生すると、機能的残気量が維持できずに肺胞が虚脱して呼吸窮迫症候群（respiratory distress syndrome, RDS）を発症する（Sardesai et al, 2017）。また、高サイトカイン血症等に伴う肺水腫により肺サーファクタントの機能が阻害されると、急性呼吸窮迫症候群（acute respiratory distress syndrome ARDS）を発症する（Ware et al, 2020）。一方、肺胞マクロファージによる肺サーファクタントの異化が障害されると、肺胞内に肺サーファクタント由来物質が蓄積して肺胞蛋白症（pulmonary alveolar proteinosis, PAP）（Suzuki et al, 2016）を発症する。

肺サーファクタントシステムに関連する遺伝子の変異により発症する間質性肺疾患群を遺伝性間質性肺疾患（hereditary interstitial lung disease, HILD）と呼ぶ（Nogee, 2017; 長, 2016; 長, 2019; 井上, 2022）。HILD の症状の主体は

酸素化障害と肺高血圧である。また、HILD の病型は、1）間質性肺炎（interstitial pneumonitis, IP）、2）PAP、3）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, ACDMPV）等の肺の形成異常に大別される。欧米では、常染色体潜性遺伝形式をとる SP-B 欠損症と ABCA3 異常症が HILD の主体であるが、日本では、SP-B をコードする *SFTPB*、ABCA3 をコードする *ABCA3* の病原性変異の遺伝子頻度が低いため、*SFTPC* の変異により発症する SP-C 異常症が相対的に主体となる。（Hayasaka et al, 2018）。

我々は、日本全国から原因不明の呼吸障害症例に関する相談を受けることを通して、2011 年より HILD の症例集積を行っている。（Akimoto et al, 2014; 恩田ほか, 2019）。研究開始当時は *SFTPC* と *ABCA3* の Sanger シークエンスを行なっていたが、次第に解析対象の遺伝子が増え、我々が構築した HILD 遺伝子解析パネルの次世代シークエンサーによる解析が 2020 年 4 月に「肺胞蛋白症（自己免疫性または先天性）遺伝子検査」として保険収載された。2024 年 1 月現在、同パネルには *SFTPC*、*SFTPB*、*ABCA3*、*CSF2RA*、*CSF2RB*、*NKX2-1*、*FOXF1*、*GATA2*、*OAS1*、*MARS1*、*FARSB*、*FARSA*、*TBX4* の 13 遺伝子が含まれている。

感染症や先天性心疾患などの既知の原因を除外した上で原因が特定出来ない呼吸障害を認めた場合に HILD を疑う。胸部単純 X 線検査や肺 CT 検査では、びまん性のスリガラス陰影（ground glass opacity, GGO）を認めることが多い。PAP の初期では背側に強い浸潤影 consolidation (CSD)を認める場合があるが、画像診断で IP と PAP を鑑別することは困難である。HILD による呼吸障害は酸素化の障害が原則であり、高二酸化炭素血症を伴わないことが多い。IP や PAP では KL-6、SP-A、SP-D、LDH などの間質性肺炎血清マーカーの値が上昇することが多い。臨床経過、画像診断、血液検査の結果から HILD が強く疑われる場合には、肺生検あるいは気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage, BAL）による組織学的検査を検討する（図 3）。肺生検には開胸肺生検以外に経気管支肺生検（transbronchial lung biopsy, TBLB）や胸腔鏡下手術（video assisted thoracic surgery, VATS)による方法があるが、小児を対象とする場合は開胸肺生検が原則となる。BAL によって沈殿物の多い白濁した液体が回収されれば PAP の診断が可能であるが、BAL によって IP の診断を行うことは出来ない。呼吸不全のために気管挿管による人工換気を受けている例では、気管吸引液の塗沫標本を観察することが病態解明に寄与することがある。



【図 3】HILD の診断手順と治療法選択
HILD を強く疑う場合には、肺生検あるいは BAL による組織学的検査を検討するが、組織学的検査の侵襲性から遺伝子解析を先行することが多い。IP と診断したら、メチルプレドニゾロン・パルス療法を中心としたステロイド薬投与、ヒドロキシクロロキン投与、アジスロマイシン投与を組み合わせた治療を行う。先天性 PAP（congenital PAP, CPAP）に対しては、造血幹細胞移植あるいは肺移植を検討する。

小児では、呼吸障害が軽度の場合は肺生検や BAL を躊躇することが多い一方で、呼吸障害が重篤な症例では肺生検や BAL が不可能である。そのため、組織学的検査に先行あるいは並行して遺伝子解析を実施する場合が多い。遺伝子解析の結果、特定の遺伝子に変異が認められた場合、その変異が疾患の原因であるか否かは、American College of Medical Genetics and Genomics（ACMG）ガイドラインに従って判断する（Richards et al, 2017）。
HILD と診断した場合、病型が IP である場合は、メチルプレドニゾロン・パルス療法を中心としたステロイド薬投与、ヒドロキシクロロキン投与、アジスロマイシン投与を組み合わせた治療を行う（Bush et al, 2015）。病型が PAP で、抗 GM-CSF 自己抗体による自己免疫性 PAP（autoimmune PAP, APAP）が否定された場合は、先天性肺胞蛋白症（congenital PAP, CPAP）と診断する。CPAP に対する確立した治療法は存在しないが、一部の症例には

全肺洗浄が有効である。また、CPAP の原因が、肺胞マクロファージの異常であれば造血幹細胞移植、II 型肺胞上皮細胞の異常であれば肺移植が有効である可能性がある（Cho et al, 2018）。

我々は、新生児・小児を中心として HILD の症例を集積する間に、SP-C 異常症の中に予後不良な群が存在することに気づいた。2015 年に Kröner（Kröner et al, 2015）らは SP-C 異常症 17 例について、遺伝子変異と表現型には乖離があると報告をしているが、同報告では新生児期発症の症例や生命予後不良な症例が含まれていない。また、国内からの SP-C 異常症の報告は少数の症例報告が大部分であり、複数の症例を集積した報告は少ない（瀬戸口, 2012）。

SP-C は 35 アミノ酸（4.2kD）で構成され、197 アミノ酸（21kDa）の pro SP-C から SP-B の存在下で成熟する（Johansson et al, ）。SP-B の先天的な欠損症では、SP-B が存在せず SP-C も成熟しないため、正期産で出生しても RDS を発症する。一方、SP-C 欠損マウスは SP-B が表面活性に寄与するために出生時には呼吸障害を呈さない（Lawson et al, 2005）。SP-C の前駆物質である pro SP-C をコードする *SFTPC* は 8 番染色体上にあり、6 つのエキソンからなる。*SFTPC* は II 型肺胞上皮細胞にのみ特異的に発現する。*SFTPC* の変異により発症する SP-C 異常症は、2001 年に米国の間質性肺炎の母児例で初めて報告された（Nogee et al, 2001）。SP-C 異常症は、常染色体顕性遺伝形式をとり、発症時期は同一家系・同一変異であっても新生児期から成人期まで幅広く、呼吸器症状の程度にも大きな幅がある。SP-C 異常症は IP の病型をとることが多いが、PAP の病型をとることがある（Tredano et al, 2004）。

pro SP-C のうち 90 番から 197 番アミノ酸で構成される部分は BRICHOS ドメインと呼ばれる。成人の IP の責任変異は *SFTPC* の BRICHOS ドメインに集中しているという報告がある（Katzen et al, 2019）。また、SP-C 異常症のこれまでの報告では、pro SP-C の 73 番目のアミノ酸がイソロイシンからスレオニンに置換する p.Ile73Thr の報告が最も多く、p.Ile73Thr の病型はすべて IP であった（Salerno et al, 2016）。また、*SFTPC* の変異を共有する家族性間質性肺炎の報告がある（Setoguchi et al, 2006）。

本研究の目的は、SP-C 異常症と診断された小児例のうち、重症例の特徴を明らかにすることである。

方法

1. 対象

2011 年 4 月～2022 年 3 月の期間に我々が HILD の診断支援を行なった、発症年齢 16 歳未満の SP-C 異常症を対象とした。

2. 症例の集積

2011 年 4 月から症例の集積を開始した。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に 2012 年 2 月～2016 年 2 月の間登録して、日本全国の周産期センターおよび新生児診療施設に HILD の概要とその診断支援について周知を行った。原因不明の呼吸障害例について相談を受け、臨床経過、胸部 X 線検査や肺 CT 検査の所見、血清マーカーの値などの血液検査所見から HILD が疑われる症例について、担当医に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。サーベイランス事業を通して我々が HILD の診断支援を行なっていることが周知されたため、サーベイランス事業終了後も症例の集積が続いている。また、2020 年 4 月以降は、「肺胞蛋白症（自己免疫性又は先天性）遺伝子検査」のかずさ DNA 研究所における診断書作成支援業務を通して、情報提供を依頼している。

3. 診療情報の収集

各症例の入院施設の主治医から、匿名化した診療情報を入手しデータベース化した。今回解析に用いた診療情報は、患児の性別、発症時期（出生から生後 28 日未満か否か)、病型（IP または PAP)、診断方法、遺伝子解析時点の画像所見と呼吸補助、観察期間、観察期間終了時点の予後（死亡、肺移植後の生存、肺移植なしの生存）を用いた。

4. 遺伝子解析

対象全例について *SFTPC* 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。2020 年 4 月からは商業検査として、かずさ DNA 研究所への出検を行なっている。

1）DNA 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 200µl 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 の溶出は付属の緩衝液（10mM Tris-Cl, 0.5mM EDTA, pH 9.0）200µl 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 40ng/µl の濃度に調製した。

2）Sanger 法

（1）プライマーの設計

ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）に用いたプライマーを以下に示す（表 1）。*SFTPC* 増幅用のプライマーは、W.E. Lawson らの論文（Lawson et al, 2004）に記載のものを使用し、翻訳領域とその両端を含むエキソン領域全体が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発注し、TE 緩衝液（10mM Tris, pH 7.5～8.0, 1mM EDTA）を用いて 10µM の濃度に調整した。

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	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	AATAGCCACCATTCGGACAC	484
PP7F	CCGAATGGTGGCTATTTGTC	
PP7R	AGCGAGCCTCCTCCACAG	524
PP8F	CCGGTGAGCAGGTGTGAT	
PP8R	CCACTTTGCTCTCCCAAGG	508
PP9F	ATGGGAGTGGGCAGAGGT	
PP9R	AAAGCCCGTGGATGCTCCCT	257

（2）PCR の条件

AmpliTaq Gold 360 PCR Master Mix®（Life Technologies、アメリカ合衆国）10µl を含み、PCR 反応液は総量を 20µl とした。各プライマーの濃度は 0.5µM として、DNA テンプレート量は 40ng となるよう調製した（表 2）。

表 2. PCR 反応液の組成

試薬	1 反応当たり
AmpliTaq Gold 360 PCR Master Mix	10μl
水	7μl
Forward Primer（10μM）	1μl
Reverse Primer（10μM）	1μl
DNA（40ng/μl）または水（negative control）	1μl

PCR には GeneAmp PCR System 2700®（Applied Biosystems、アメリカ合衆国）を用いた。PCR 反応条件を表 2 に示す

表 3. PCR 反応条件

95℃	10 分間
95℃	30 秒間
58℃	30 秒間
72℃	60 秒間　×35 サイクル
72℃	7 分間

（3）電気泳動

2.0%アガロースゲルをアガロースと 0.5x トリス緩衝生理食塩水（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、QIAuick Gel Extraction Kit®（Qiagen、ドイツ）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 150μl 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緩衝液（10mM Tris-Cl, pH 8.5）にて行った。

（5）塩基配列の決定

2011 年から 2017 年までは、塩基配列決定法サービス（FASMAC、日本国神奈川県）に委託して塩基配列分析を行った。PCR 産物を抽出した溶液 13.4μl とプライマー溶液 0.64μl（プライマー6.4pmol）を混合し、8 連チューブまたは 96 ウェルプレートを用いて提出した。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順方向および逆方向の両方向からシークエンスを行った。

（6）塩基配列の評価

塩基配列は、既報の塩基配列（NM_001451.2（FOXF1））と比較した。シークエンス波形シグナルの確認は、フリーソフト 4peaks（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）および Microsoft Word を利用して行った。変異の病原性の評価には PolyPhen-2（http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/）および MutationTaster（http://www.mutationtaster.org）を用いた。また、変異の頻度については、1000 Genomes（https://www.internationalgenome.org）と gnomAD（https://gnomad.broadinstitute.org）を用いて確認した。

3）次世代シークエンサーによる解析

2018 年 1 月以降は次世代配列決定装置（かずさ DNA 研究所、日本国千葉県）を用いた。抽出した DNA をかずさ DNA 研究所に提出し、既報の方法により解析を行った（Fujiki et al, 2018; Fujiki R, 2019）。また、2020 年 4 月より、HILD の 8 遺伝子（2024 年 1 月現在 13 遺伝子）についての次世代シークエンサーによる遺伝子検査が保険収容されたため、担当医より直接末梢血検体をかずさ DNA 研究所に出検し、その結果の解釈を支援するという方法をとっている。

次世代シークエンサーライブラリーのサイズ分布は MCE-202 MultiNA システム®（島津製作所、日本国京都府）で分析され、KAPA ライブラリ定量キット®（Kapa Biosystems、アメリカ合衆国）および Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム®（Thermo Fisher Scientific、イギリス）で濃度を測定した。ライブラリーは NextSeq 500 Mid-Output flow cell®（Illumina、アメリカ合衆国）を用い、出力モードはペアアンドリード長 75bp で行った。

5. 病原性の解釈

SFTPC に変異が認められた場合、その病原性については ACMG ガイドラインに従って判断した。SP-C 異常症の責任変異として報告されている変異は責任変異と判断した。また、変異を共有している親族に間質性肺疾患が見られる場合は *in silico* 解析の結果を参考に判断した。新規変異で家族発症がない場合は、両親の遺伝子解析を行い、*de novo* 変異である場合は、*in silico* 解析の結果を参考に判断した。両親の遺伝子解析を行う場合は、両親のいずれかの SP-C 異常症の発症前診断となる可能性があるため、改めて遺伝カウンセリングを受けていただいた上で判断していただいた。

6. 統計学的方法

SP-C 異常症と判断された症例について、観察期間中に死亡または肺移植を受けた症例を予後不良、それ以外の症例を予後良好として、Kaplan-Meier 法

による生命表の解析を行なった。2 群間の比較には log rank test を用いて、発症時期・病型と予後の関係を解析した。解析には SPSS Statistics version 26（IBM Corp., Armonk, NY, USA） を用い、$p < 0.05$ を有意とした。

7. 倫理的配慮

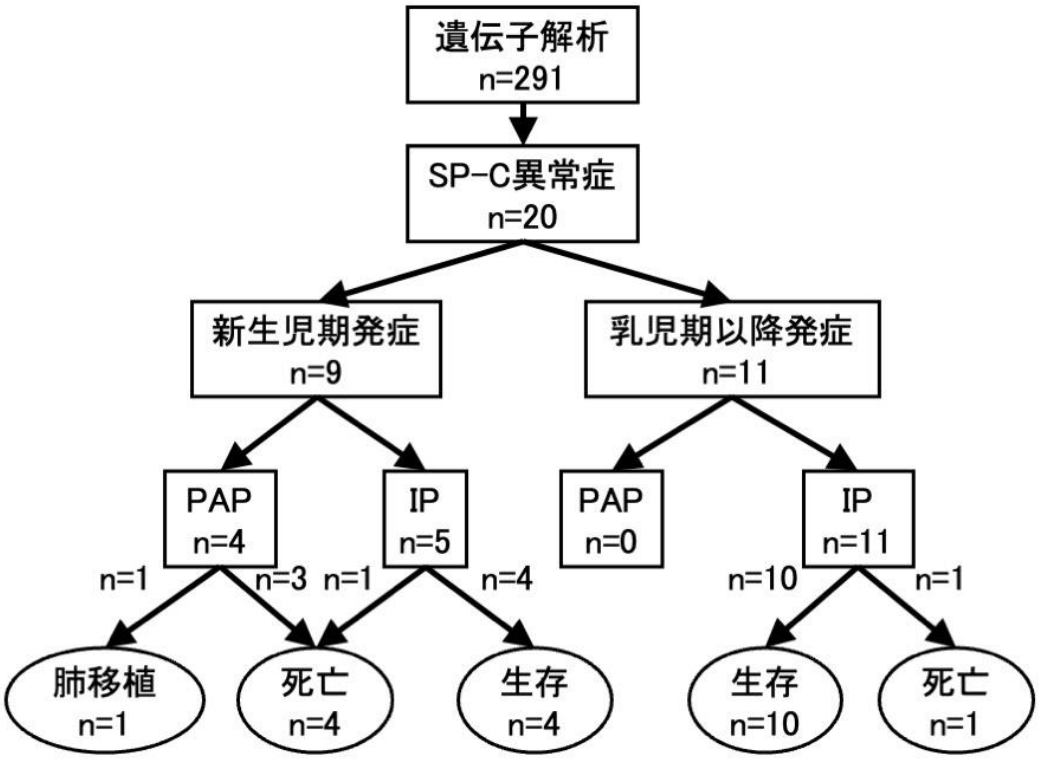
研究の内容について主治医から家族へ説明書を用いて説明していただき、研究への参加について書面で同意を得た。症例は連結可能な形で匿名化して個人情報保護に努めた。本研究は北海道大学大学院医学研究院医の倫理委員会より承認を得ている。

結果

1.　発症時期・病型と予後の関係

2011 年 4 月から 2023 年 3 月の期間に、原因不明の呼吸障害を呈した小児症例 291 例の遺伝子解析を実施した。そのうち、SP-C 異常症と診断された 20 例を今回の解析対象とした。

発症時期は生後 1 か月未満の新生児期発症が 9 例、生後 1 か月以降の発症が 11 例であった。病型は、新生児期発症のうち PAP は 4 例、IP は 5 例で、乳児期以降発症は全例が IP であった。新生児期発症は、死亡例が 4 例、肺移植による生存例が 1 例、その他の生存例が 4 例だった。乳児期以降の発症では 10 例が生存し死亡例が 1 例だった。PAP を発症した 4 例は全例新生児期に発症しており、そのうち 3 例は死亡、1 例は肺移植を受けて生存した。（図 4）



【図 4】発症時期・病型と予後

20 例の SP-C 異常症のうち、9 例が新生児期に発症していた。そのうち 4 例が PAP で、3 例が死亡し、1 例が肺移植を受けた。新生児期に IP で発症した 5 例中 1 例が死亡した。生後 1 か月以降に発症した症例は全例が IP で、そのうち 1 例が死亡した。

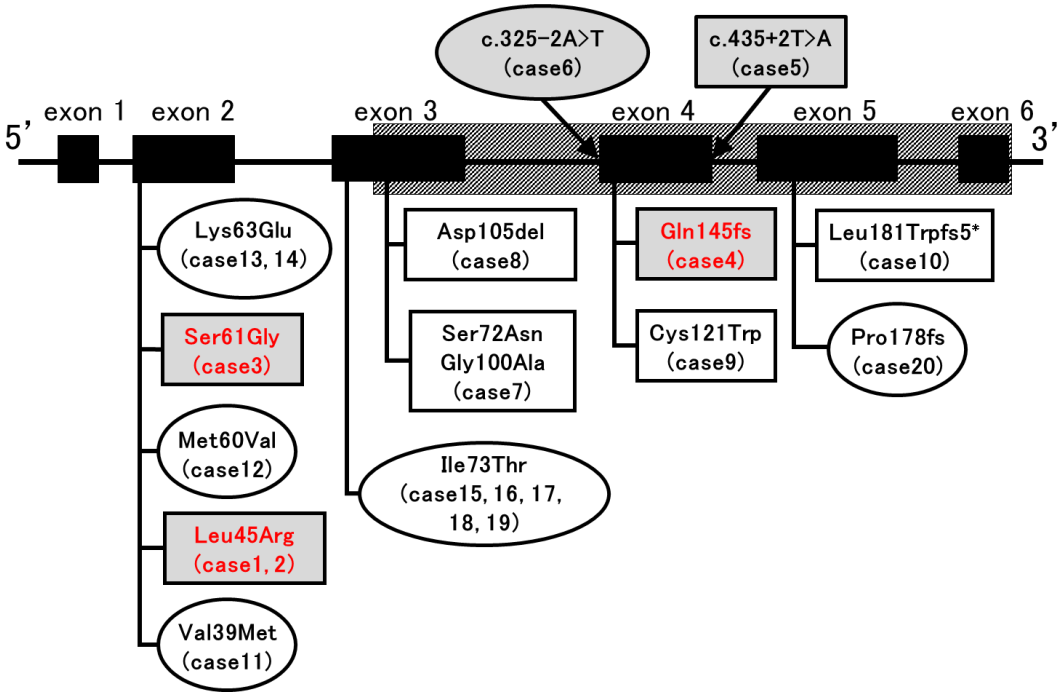
2.　臨床経過と遺伝子変異

SP-C 異常症 20 症例のうち男児が 12 例、女児が 8 例であった。遺伝子解析時点で、全例で CT 上 ground glass opacity（GGO）を認め、一部の症例では air bronchogram (ABG), consolidation (CSD), crazy-paving pattern (CPP), 嚢胞を認めた。人工換気を必要とした患者は 9 例であった。 PAP 患者は BAL または剖検で診断された。IP 患者 16 人のうち 4 人は生検を受け、残りの 12 人（BAL を受けた 1 人を含む）は臨床的に診断された。14 種類の遺伝子変異を認め、乳児期以降発症例の 11 例中 10 例にミスセンス変異が認められた。一方、新生児発症例の 9 例中ミスセンス変異が認められたのは 5 例のみであった。遺伝的変異の由来は、父、母、*de novo*、不詳がそれぞれ 2 例、5 例、3 例、9 例であった。1 例のみが 2 つの病原性変異を有し、一方は父由来で、もう一方は *de novo* であった（Case 7）。p.Ile73Thr 変異を有する症例が 5 例で最も多かった。p.Leu45Arg 変異を有する 2 例はいずれも新生児期に PAP を発症しており、1 例は 2 歳時に死亡、1 例は 6 歳時に脳死両肺移植を受けて生存していた。（表 4）

表4.臨床経過と変異の関係

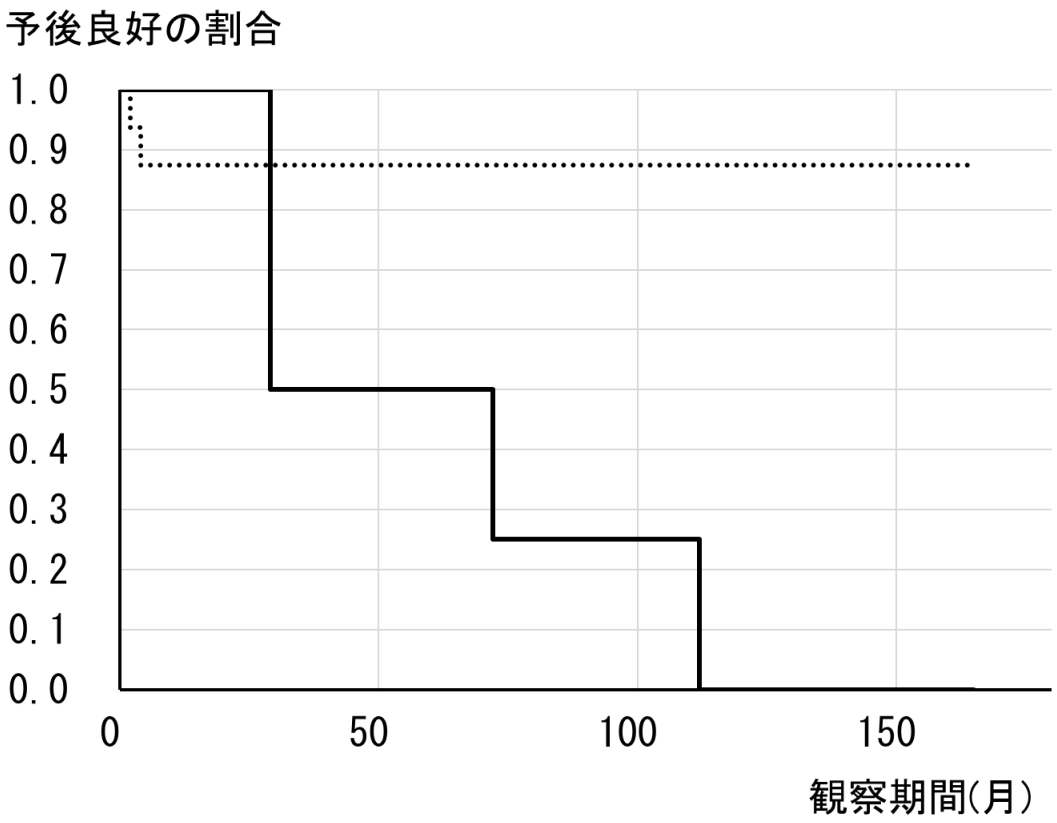
Case	性	発症時期	病型	診断方法	画像所見	呼吸補助	予後	遺伝子変異	アミノ酸変化	変異の由来
1	F	新生児期	PAP	BAL	GGO	人工換気	死亡	c.134T>G	p.Leu45Arg	*de novo*
2	F	新生児期	PAP	BAL	GGO, CSD, ABG	人工換気	肺移植	c.134T>G	p.Leu45Arg	*de novo*
3	M	新生児期	PAP	BAL	GGO	人工換気	死亡	c.181A>G	p.Ser61Gly	*de novo*
4	F	新生児期	PAP	剖検	GGO, CSD, CPP	人工換気	死亡	c.433delC	p.Gln145fs	不詳
5	F	新生児期	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	死亡	c.435+2T>A	splicing disorder	不詳
6	F	乳児期以降	IP	生検	GGO	人工換気	死亡	c.325-2A>T	splicing disorder	不詳
7	M	新生児期	IP	生検	GGO	人工換気	生存	c.215G>A c.299G>C	p.Ser72Asn Gly100Ala	c.215G>A; 父 c.299G>C; *de novo*
8	M	新生児期	IP	臨床経過	GGO, ABG	人工換気	生存	c.313_315del	p.Asp105del	不詳
9	F	新生児期	IP	生検	GGO	人工換気	生存	c.363C>G	p.Cys121Trp	母
10	M	新生児期	IP	臨床経過	GGO	人工換気	生存	c.541delC	p.Leu181Trpfs5*	母
11	M	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	生存	c.115G>A	p.Val39Met	不詳
12	F	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	生存	c.178A>G	p.Met60Val	不詳
13	M	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	生存	c.187A>G	p.Lys63Glu	母
14	M	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	生存	c.187A>G	p.Lys63Glu	母
15	M	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	無し	生存	c.218T>C	p.Ile73Thr	不詳
16	M	乳児期以降	IP	BAL	GGO	酸素投与	生存	c.218T>C	p.Ile73Thr	父
17	M	乳児期以降	IP	生検	GGO	酸素投与	生存	c.218T>C	p.Ile73Thr	母
18	M	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	生存	c.218T>C	p.Ile73Thr	不詳
19	M	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO	酸素投与	生存	c.218T>C	p.Ile73Thr	不詳
20	F	乳児期以降	IP	臨床経過	GGO, 嚢胞	無し	生存	c.533delC	p.Pro178fs	父

SFTPC に認められた変異の位置は、エキソン 2 が 7 例、エキソン 3 が 7 例、エキソン 4 の内部が 2 例、エキソン 4 の前後に接するものが各 1 例、エキソン 5 が 2 例であった。また、90-197 番アミノ酸の部位である BRICHOS ドメイン内に変異を有した症例は 8 例であった。BRICHOS ドメイン外では 3 例が死亡または肺移植を受け、その全例がエキソン 2 に変異を有し新生児期に PAP を発症した症例であった。BRICHOS ドメイン内に変異を持つ症例のうち 3 例が死亡しており、エキソン 4 内部のフレームシフト変異が 1 例、エキソン 4 のスプライシング異常が 2 例であった。（図 5）



【図 5】 pro SP-C における症例毎の変異の位置
四角で囲った症例が新生児期発症例、楕円で囲った症例が乳児期以降発症例、赤字は PAP、黒字は IP 症例を示す。塗りつぶしの症例が死亡、または肺移植を受けた症例を示す。エキソン 3 中盤以降の斜線の領域は BRICHOS ドメインを示す。

新生児期発症 PAP の症例は全例が死亡または肺移植による生存であったため、それ以外の新生児期発症あるいは乳児期以降発症 IP 症例との間で Kaplan-Meier 法による予後の比較を行った（図 6）。2 群間の予後を log rank test で比較した結果、新生児期発症 PAP 症例の予後はそれ以外の群に比べて不良だった（p=0.044）。



【図 6】生存曲線
実線が新生児期発症 PAP、点線がそれ以外の症例を示す。P=0.044 で、新生児期発症 PAP 症例の予後は不良だった。

考察

本邦で原因不明の呼吸障害を呈する 291 例の遺伝子解析を行った結果、小児期発症の SP-C 異常症を 20 例同定した。海外の既報では、小児期発症の SP-C 異常症は p.Ile73Thr 変異によるものが最多で、p.Ile73Thr 変異による SP-C 異常症は IP の病型をとり、小児期の生命予後は比較的良好であった（Guilot et al, 2009 ; Kröner et al, 2015 ; Chen et al, 2019 ; DeBoer et al, 2021）。今回の我々の研究でも 20 例中 5 例が p.Ile73Thr 変異によるもので、これらは全て IP の病型を取り、かつ良好な生命予後を呈しており、同様の結果であった。また、成人発症例では pro SP-C のうち 90 番から 197 番アミノ酸で構成される BRICHOS ドメインに変異が集中しているとの報告（Katzen et al, 2019）があるが、本研究においては BRICHOS ドメイン内の変異が確認されたのは 20 例中 8 例であり、小児においては成人とは異なる結果であった。

本研究では 5 例の死亡例を確認した。5 例の死亡例のうち、3 例は新生児期に PAP の病型で発症した症例であった。さらに、新生児期発症 PAP の症例は、肺移植で生存した 1 人を除いて全例が死亡していた。生存曲線解析では新生児期発症 PAP 例の予後はそれ以外の例に比べて不良だった。一方で Liptzin らは新生児期発症の SP-C 異常症について、PAP に適合する病理所見を呈するも生存可能であった症例を報告している（Liptzin et al, 2015）。同報告ではステロイド薬投与等の内科的治療に加え、気管切開、および数年間の人工呼吸管理が施行されており、新生児期発症の PAP 患者の一部では、肺移植以外にも予後不良の転帰を辿らない治療・管理方法が存在する可能性を示している。

本研究で 2 例確認された p.Leu45Arg 変異症例は、いずれも新生児期に PAP で発症していた。Poterjoy らによる報告（Poterjoy et al, 2010）でも同変異を持つ症例は肺移植を必要としており、同変異は SP-C 異常症における予後不良な遺伝子変異の一つである可能性が示唆された。同変異は成熟型 SP-C の領域に位置しており、疎水性のアミノ酸が酸性アミノ酸に置換することで、pro SP-C および肺サーファクタントを構成する成熟 SP-C の作用を阻害する可能性がある。

死亡例 5 例のうち新生児発症 PAP ではない 2 例は、pro SP-C のエキソン 4 の 5’末端、3’末端のスプライシング領域に変異を有していた。Guillot らは同部位の変異によるスプライシング異常により、pro SP-C のエキソン 4 全体をスキップすることを報告している（Guillot et al, 2011）。また、他にも同変異に近似した変異によってエキソン 4 のスプライシング異常が生じ、死亡または肺移植に至った重症例が報告されている（Litao et al, 2017; Delestrain et al, 2017）。Wang らは、エキソン 4 のスプライシング異常により産生される異常 pro SP-C は dominant

negative 様式により正常な pro SP-C の機能を阻害することを報告しており（Wang et al, 2002）、エキソン 4 のスプライシング異常が重症化の原因の一つと考えられる。更なる検討方法としては、肺組織から抽出した RNA から cDNA を作成して発現状態を解析する、あるいは疾患モデルを作成する等の方法が考えられる。

また多くの *SFTPC* 変異による IP は、遺伝子変異により生じた病的 pro SP-C が小胞体ストレスやタンパク質凝集を介して II 型肺胞上皮細胞を障害することで発症すると考えられている（Mulugeta et al, 2015）。一方、*SFTPC* 変異による PAP はその発症機序が未だ明らかになっていない。

SP-C 異常症を含めた小児の IP に対する内科的治療には肺サーファクタント補充療法、メチルプレドニゾロン・パルス療法を含むステロイド薬投与、ヒドロキシクロロキン投与、アジスロマイシン投与が奏功した報告がある。また、成人の *SFTPC* 変異による IP に対しては、ステロイド薬以外に、線維化抑制を目的としたニンテダニブやピルフェニドンが使用される。細川らは疾患特異的 iPS 細胞を用いて *SFTPC* 変異による IP の新しい治療薬候補化合物であるクリプトスタンシノンを見出した（Hosokawa et al, 2023）。一方、*SFTPC* 変異による PAP に対しては、特異的な治療法が確立していない。

IP および PAP に対して内科的治療が奏功しない場合には、肺移植が考慮される。*SFTPC* はⅡ型肺胞上皮細胞のみに発現するため SP-C 異常症による呼吸不全に対しては、肺移植は合理的な治療法である。しかし、本研究で予後不良因子と考えられた新生児期発症の PAP 症例は、生体肺移植が可能な体格まで成長することが非常に困難であり、体格が適合する脳死ドナーが発生する頻度も極めて低い。これら重症例に現状で可能な治療戦略は、移植可能な体格まで患児の成長と肺保護を両立させるよう内科的治療を行うことのみであり、新たな治療方法の確立が求められる。

肺移植が困難な現状において、予後不良が明らかな新生児期発症 PAP の病型をとる SP-C 異常症に対する新しい治療法として、理論的には遺伝子治療、細胞治療、組織治療が想定される。II 型肺胞上皮細胞は自己複製能を持つため、ES 細胞、ドナー由来 iPS 細胞、ドナー由来 II 型肺胞上皮細胞、遺伝子改変を施した自己 II 型肺胞上皮細胞からなるオルガノイドの経気道投与が治療法の選択肢となる可能性が考えられる（Louie et al, 2022）。本研究で得られた知見を礎とし、動物実験や肺胞オルガノイドを用いた研究が、新しい治療法開発へ繋がることが期待される。

本研究では、症例集積の方法として主治医、施設からの相談が基本となっているが、SP-C 異常症は 2001 年に初めて報告された比較的新しい疾患であるため疾患認知度の施設間差が依然大きい。また、比較的軽症な症例は未診断である可能性があり、悉皆性の担保には限界がある。しかし、2020 年に遺伝子検査が保

険収載されたことで診断例が増える可能性もある。

結論

本研究で得られた新知見は以下の通りである。

2011 年 4 月から 2022 年 3 月の期間に、原因不明の呼吸障害を呈した小児症例 291 例の遺伝子解析を実施し SP-C 異常症を 20 例同定した。20 例のうち、新生児期発症が 9 例、乳児期以降の発症が 11 例で、病型は、PAP が 4 例、IP が 16 例であった。

14 種類の遺伝子変異を認め、海外と同様に p.Ile73Thr が 5 例で最も多く、全て IP の病型を取り良好な生命予後を呈していた。

成人では多いとされる BRICHOS ドメイン内の変異を有した症例は 20 例中 8 例のみであった。

死亡例が 5 例、生存例は 15 例で、うち 1 例は肺移植を受けていた。生存曲線解析の結果、新生児期発症 PAP は予後不良と関連する要因である可能性が示唆された。

p.Leu45Arg 変異例は新生児期に肺胞蛋白症を発症し、1 例は 2 歳時に死亡、1 例は 6 歳時に脳死両肺移植を受けていた。海外の報告でも肺移植を受けており、予後不良な遺伝子変異の一つである可能性が考えられた。

死亡例のうち 2 例は pro SP-C のエキソン 4 の 5'末端、3'末端のスプライシング領域に変異を有した。スプライシング異常により産生される異常 pro SP-C は dominant negative 様式により正常な pro SP-C の機能を障害することが重症化の原因の一つである可能性が考えられたが、発現解析などによる詳細な検討が必要である。

SFTPC 変異による重症例には肺移植が合理的な治療法であるが、新生児期発症の PAP 症例は体格が小さく、ドナー発生の確率が低いことから現実的には実施が困難であり、新たな治療方法の確立が求められる。ES 細胞、ドナー由来 iPS 細胞、ドナー由来 II 型肺胞上皮細胞、遺伝子改変を施した自己 II 型肺胞上皮細胞からなるオルガノイドの経気道投与等が治療法の選択肢となる可能性が

考えられる。動物実験や肺胞オルガノイドを用いた研究が、新しい治療法開発へ繋がることが期待される。

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院　生殖・発達医学分野　小児科学教室　真部淳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、独立行政法人地域医療機能推進機構北海道病院　副院長　長和俊先生に感謝申し上げます。また、様々な面から研究をサポートして下さいました、北海道大学医学部小児科学講座周産母子センター・助教　古瀬優太先生、兼次洋介先生、医員　瀬戸康貴先生、武田賢大先生、橋本佳帆子先生にお礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Akimoto T, Cho K, Hayasaka I, Morioka K, Kaneshi Y, Furuta I, Yamada M, Ariga T, Minakami H (2014) Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan. Pediatr Res 76(5), 453-458

Bernhard W (2016) Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. Ann Anat 208, 146-150

Bush A, Cunningham S, de Blic J, Barbato A, Clement A, Epaud R, Hengst M, Kiper N, Nicholson AG, Wetzke M, Snijders D, Schwerk N and Griese M (2015) chILD-EU Collaboration. European protocols for the diagnosis and initial treatment of interstitial lung disease in children. Thorax 70 (11), 1078-1084

Chen J, Nong G, Lieu X, Ji W, Zhao D, Ma H, Wang H, Zheng Y, Shen K (2019) Genetic basis of surfactant dysfunction in Chinese children: A retrospective study. Pediatr Pulmonol, Aug 54(8),1173-1181

Cho K, Yamada M, Agematsu K, Kanegane H, Miyake N, Ueki M, Akimoto T, Kobayashi N, Ikemoto S, Tanino M et al (2018) Heterozygous Mutations in OAS1 Cause Infantile-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis with Hypogammaglobulinemia. Am J Hum Gene 102(3), 480-486

DeBoer EM, Liptzin DR, Humphries SM, Lynch DA, Robison K, Galambos C, Dishop MK, Deterding RR, Weinman JP (2021) Ground glass and fibrotic change in children with surfactant protein C dysfunction mutations. Pediatr Pulmonol. Jul, 56 (7), 2223-2231.

Delestrain C, Simon S, Aissat A, Medina R, Decrouny X, Nattes E, Tarze A, Costes B, Fanen P and Epaud R (2017) Deciphering the mechanism of Q145H SFTPC mutation unmasks a splicing defect and explains the severity of the phenotype. European Journal of Human Genetics 25, 779–782

Fujiki R, Ikeda M, Yoshida A, Akiko M, Yao Y, Nishimura M, Matsushita K, Ichikawa T, Tanaka T, Morisaki H et al (2018) Assessing the Accuracy of Variant Detection in Cost-Effective Gene Panel Testing by Next-Generation Sequencing. J Mol Diagn 20, 572-582.

Fujiki R, Ikeda M, Ohara O (2019) Short DNA Probes Developed for Sample Tracking and Quality Assurance in Gene Panel Testing. J Mol Diagn 21(6), 1079-1094.

Guillot L, Epaud R, Thouvenin G, Jonard L, Mohsni A, Coudere R, Counil F, Blic J, Taam RA, Bourgeois ML, et al (2011) New surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. Journal of Medical Genetics, 46 (7), 490-4.

Hayasaka I, Cho K, Akimoto T, Ikeda M, Uzuki Y, Yamada M, Nakata K, Furuta I, Ariga T and Minakami H (2018) Genetic basis for childhood interstitial lung disease among Japanese infants and children. Pediatr Res 83(2), 477-483
Hosokawa M, Mikawa R, Hagiwara A, Okuno Y, Awaya T, Yamamoto y, Takahashi S, Yamaki H, Osawa M, Setoguchi Y et al (2023) Cryptotanshinone is a candidate therapeutic agent for interstitial lung disease associated with a BRICHOS-domain mutation of SFTPC. iScience 26, 107731
Johansson H, Nordling K, Weaver TE, Johansson J (2006) The Brichos domain-containing C-terminal part of pro-surfactant protein C binds to an unfolded poly-val transmembrane segment. J Biol Chem 281(30), 21032-21039
Katzen J, Wagner BD, Venosa A, Kopp M, Tomer Y, Russo SJ, Headen AC, Basil MC, Stark JM, Mulugeta S et al (2019) An SFTPC BRICHOS mutant links epithelial ER stress and spontaneous lung fibrosis. JCI Insight 21,4(6), e126125
Kröner C, Reu S, Teusch V, Schams A, Grimmelt AC, Barker M, Brand J, Gappa M, Kitz R, Kramer BW et al (2015) Genotype alone does not predict the clinical course of SFTPC deficiency in paediatric patients. Eur Respir J 46(1), 197-206
Lawson WE, Grant SW, Ambrosini V, Womble KE, Dawson EP, Lane KB, Markin C, Renzoni E, Lympany P, Thomas AQ et al (2004) Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. Thorax. 59, 977-980
Lawson WE, Polosukhin VV, Stathopoulos GT, Zoia O, Han W, Lane KB, Li B, Donnelly EF, Holburn GE, Lewis KG, Collins RD, Hull WM, Glasser SW, Whitsett JA and Blackwell TS (2005) Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. Am J Pathol. 167(5), 1267-77
Liekkinen J, Olżyńska A, Cwiklik L, Bernardino de la Serna J, Vattulainen I and Javanainen M (2023) Surfactant Proteins SP-B and SP-C in Pulmonary Surfactant Monolayers: Physical Properties Controlled by Specific Protein-Lipid Interactions. Langmuir 39(12), 4338-4350
Litao M, Hayes D, Chiwane S, Nogee LM, Kurland G and Guglani L (2017) A Novel Surfactant Protein C Gene Mutation Associated With Progressive Respiratory Failure in Infancy. Pediatr Pulmonol. Jan, 52(1), 57–68.
Liptzin DR, Patel T, Deterding DD (2015) Chronic Ventilation in Infants with Surfactant Protein C Mutations: An Alternative to Lung Transplantation. Am J Respir Crit Care Med, 191, 1338.
Louie SM, Moye AL, Wong IG, Lu E, Shehaj A, Garcia-de-Alba C, Ararat E, Raby BA, Lu B, Paschini M, Bronson RT, Kim CF (2022) Progenitor potential of lung epithelial

organoid cells in a transplantation model. Cell Rep 39(2), 110662.
Mulugeta S, Nureki S, and Beers MF (2015). Lost after translation: insights from pulmonary surfactant for understanding the role of alveolar epithelial dysfunction and cellular quality control in fibrotic lung disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 309, L507-525
Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A and Whitsett JA (2001) A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. N Engl J Med 344(8), 573-579
Nogee LM (2017) Interstitial lung disease in newborns. Semin Fetal Neonatal Med.22(4), 227-233
Poterjoy BS, Vibert Y, Sola-Visner M, McGowan J, Visner G, Nogee LM (2010) Neonatal respiratory failure due to a novel mutation in the surfactant protein C gene. J. Perinatol. 30, 151-153
Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K and Rehm HL (2017) ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 17(5), 405-24
Salerno T, Peca D, Menchini L, Schiavino A, Boldrini R, Esposito F, Danhaive O and Cutrera R (2016) Surfactant Protein C-associated interstitial lung disease; three different phenotypes of the same SFTPC mutation. Ital J Pediatr 2, 23
Sardesai S, Biniwale M, Wertheimer F, Garingo A and Ramanathan R (2017) Evolution of surfactant therapy for respiratory distress syndrome: past, present, and future. Pediatr Res. 81(1-2), 240-248
Setoguchi Y, Ikeda T, Fukuchi Y (2006) Clinical features and genetic analysis of surfactant protein C in adult-onset familial interstitial pneumonia. Respirology 11 Suppl, S41-45
Suzuki T and Trapnell BC (2016) Pulmonary Alveolar Proteinosis Syndrome. Clin Chest Med 37(3), 431-40
Tredano M, Griese M, Brasch F, Schumacher S, de Blic J, Marque S, Houdayer C, Elion J, Couderc R and Bahuau M (2004) Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. Am J Med Genet 126A(1), 18-26
Wang WJ, Mulugeta S, Russo SJ, Beers MF (2002) Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggresome formation and generation of a dominant negative, J Cell Sci 116 (4), 683-692

Ware LB and Matthay MA (2020) The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 342(18), 1334-49
井上　義一 (2022) 日本呼吸器学会肺胞蛋白症診療ガイドライン 2022 作成委員会. 先天性肺胞蛋白症/遺伝性肺胞蛋白症（CPAP/HPAP）および肺サーファクタント関連遺伝子変異由来での病態、診断、治療、合併症、予後. 肺胞蛋白症診療ガイドライン 2022. メディカルレビュー社（東京）,pp133-136
恩田哲雄. 長 和俊 (2019) 当院における遺伝性肺疾患の診断支援. 分子呼吸器病 23(1), 85-88
瀬戸口靖弘. 間質性肺炎と SP-C 遺伝子変異. 分子呼吸器病 16(1), 151-156, 2012
長 和俊 (2016) 遺伝性間質性肺疾患. 周産期医学 46(11), 1365-1368
長 和俊 (2019) 間質性肺疾患. 小児科診療 82(1), 73-76