



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
Author(s)	池田, 雅彦
Description	配架番号 : 2572
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14169号
Issue Date	2020-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14169
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95750
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiko_Ikeda.pdf



学位論文

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

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

目次

発表論文及び学会発表目録	1
緒言	2
略語表	6
研究方法	7
研究結果	12
考察	20
総括及び結論	23
謝辞	24
引用文献	25
附表	28

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。

Masahiko Ikeda, Yuta Furuse, Tetsuo Onda, Akiko Ando, Yuichi Nakamura, Atsushi Manabe, Kazutoshi Cho. Genetic Lesions associated with Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of Pulmonary Veins in Japanese Infants. *Ped Research* (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 池田雅彦、長和俊、恩田哲雄、卯月ゆたか、古瀬優太：MLPA 法で *FOXF1* exon1 上流の欠失を同定した ACD/MPV の 3 例. 第 54 回日本周産期・新生児医学会（東京）2018/07/08-10
2. Ikeda M, Cho K, Furuse Y, Onda T, Ando A, Watari H: Genetic diversity of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins in Japanese infants. 日本肺サーファクタント・界面医学会第 54 回学術研究会（福岡）2018/10/27
3. Ikeda M, Cho K, Furuse Y, Onda T, Ando A, Watari H: Genetic diversity of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins in Japanese infants. Hot topics in Neonatology 2018 (Washington D.C.) 2018/12/11-13
4. 池田雅彦、長和俊、古瀬優太、恩田哲雄、安藤明子、中村雄一： *FOXF1* 上流の欠失により ACDMPV を発症した一家系. 第 32 回日本新生児慢性肺疾患研究会（東京）2019/10/26
5. 池田雅彦、長和俊、古瀬優太、恩田哲雄、安藤明子、中村雄一： *FOXF1* 上流の欠失により ACDMPV を発症した一家系. 第 64 回日本新生児成育医学会・学術集会（鹿児島）2019/11/27-29

緒言

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。MacMahon らは 1948 年に、生後早期に呼吸窮迫症状を呈して死亡した肺外合併症を伴う先天性肺胞形成異常の 3 例を報告した(1)。また、Janney らは 1981 年に、新生児期早期に肺高血圧（pulmonary hypertension, PH）を呈し死亡した児について、特徴的な肺血管の不整配列と肺毛細血管異形成からなる病理学的所見を報告した(2)。さらに、Shohet らは 1984 年に、同様の経過で死亡した 3 例の同胞例について報告した(3)。その後、少数の家族発症例を含む同様の症例報告が蓄積し、alveolar capillary dysplasia という概念が提唱されるようになった。Sen らは 2004 年に、組織学的に診断された 23 例の ACD/MPV について報告し、以下の診断基準を提唱した(4)。

- 1) 気管支壁や肺細動脈に沿って広がる肺動脈内膜の強い肥厚
- 2) 肺静脈が肺細動脈に接する位置異常
- 3) 容量減少と構造の単純化を伴う肺胞の発育不良

図 1 に ACD/MPV の病理組織像を示す。

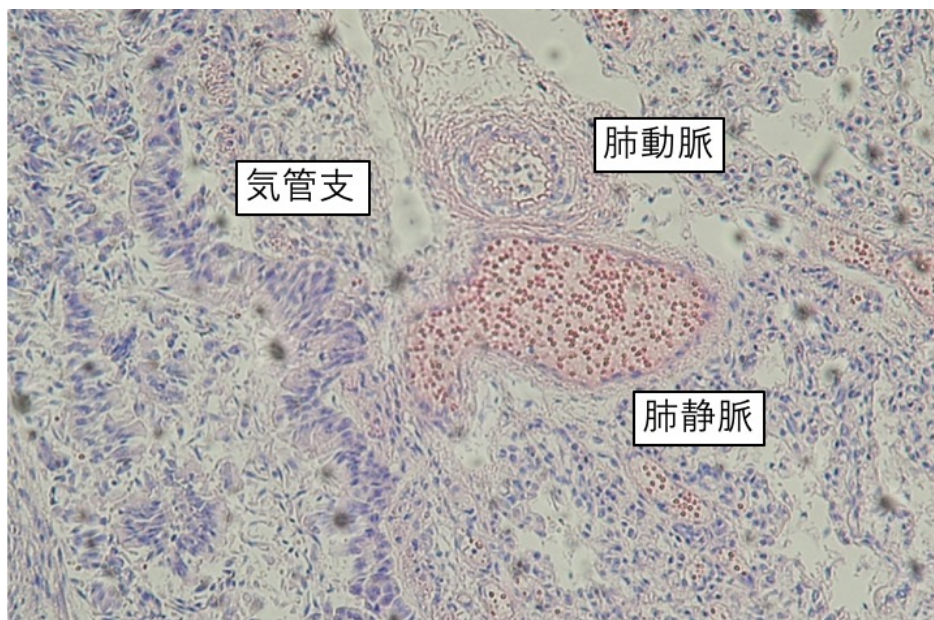


図 1. ACD/MPV の病理組織像
肺静脈が気管支に並行している。
肺動脈内膜の肥厚を認める。

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 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(5) (6)。ACD/MPV は、PH の分類である 2018 年の新ニース分類では Class3 PH (due to lung disease and/or hypoxia) の小分類 3.5 developmental lung disorders に分類されている(7)。

ACD/MPV 症例の多くは新生児期に発症し、強い PH とそれに起因する酸素化障害を呈するため、新生児集中治療室 (neonatal intensive care unit, NICU) に収容されて治療を受けることになる。治療としては、原因不明の新生児遷延性肺高血圧 (persistent pulmonary hypertension of the newborn, PPHN) として、酸素投与、高頻度人工換気などによる人工換気、鎮静、一酸化窒素吸入療法、シルデナフィル、エポプロステノールなどの肺血管拡張薬投与が行われ、最終的には体外式膜型人工肺 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) の導入が検討される(8)。しかし、いずれの治療も十分に奏功しないことが多い。一方、発症時期が遅かった例や内科的治療により生存が可能であった ACD/MPV 症例で、肺移植により治癒に至った報告が少数ながら存在する(9)。しかし、ACD/MPV 症例に対する肺移植には、成人からの肺移植が可能な体格に到達するまでの生存・成長が難しいこと、日本では乳幼児の臓器移植ドナーが極めて少ないことなどの問題が存在する。

ACD/MPV のもう一つの臨床的特徴は、一部の症例が様々な肺外合併症を呈することであり、先天性心疾患、食道気管瘻を含む先天性消化管異常、腎尿路異常、椎体異常の合併が報告されている(4) (5)。

Stankiewicz らは 2009 年に、染色体 16q24.1 に存在する *FOXF1* のヘテロ接合性点変異や、*FOXF1* またはその上流に位置するエンハンサーを含む領域のコピー数変異 (copy number variations, CNVs) が ACD/MPV の原因となることを報告した(10)。ACD/MPV 症例のうち約 4 割に *FOXF1* のヘテロ接合性点変異、約 4 割に *FOXF1* 自体またはその上流に位置するエンハンサーを含む領域の CNVs が認められたと報告されている(11)。

FOXF1 は forkhead box F1 (FOXF1) をコードする遺伝子である。FOXF1 はフォークヘッドファミリーに属する転写因子であり、肺間葉および血管内皮に発現し、肺上皮からのソニックヘッジホックシグナルの標的である。FOXF1 は転写因子として、他の多くの遺伝子の発現制御に関与し、ヘテロ接合性の変異により、肺、消化管、尿生殖器および椎体の発生に異常が生じる(12)。

ACD/MPV は常染色体優性遺伝性の致死的疾患であるため報告の大半は *de novo* での発症であるが、家族発症の報告も存在する。父親性インプリンティングで説明される母親由来の変異による家族発症例の報告が複数ある一方で、それに反する父親由来の変異による家族発症例の報告も存在し、家族発症

ACD/MPV の遺伝様式については未だ解明されていない(11) (13)。

我々は、同胞発症例の先天性肺胞蛋白症を診療したことを契機に、2011 年から遺伝性間質性肺疾患 (hereditary interstitial lung disease, HILD) の症例集積を開始した(14) (15) (16) (17)。HILD には先天性肺胞蛋白症と遺伝子変異が原因で発症する間質性肺炎が含まれる。全国から相談を受けた HILD 疑いの症例について、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。当初は *FOXF1* を解析対象に含めていなかったが、間質性肺炎を疑って行った肺生検で ACD/MPV と診断された症例に遭遇したことから、*FOXF1* を解析対象に追加した(6)。ACD/MPV を HILD に含めて検討することは、Nogee による HILD の総説でも同様に述べられている(18)。我々が構築した HILD 遺伝子解析パネルは、2020 年 4 月に肺胞蛋白症 (自己免疫性および先天性) 遺伝子検査として保険収載された。

Akimoto および Hayasaka による先行研究では、*FOXF1* のエクソン領域の塩基配列は解析したが *FOXF1* およびその上流の CNVs の解析は行っていない。しかし、海外からの報告では *FOXF1* のヘテロ接合性点変異とほぼ同程度の割合で *FOXF1* またはその上流に位置するエンハンサーを含む領域の CNVs が ACD/MPV の原因であったとされている(11)。そのため、Akimoto および Hayasaka の研究のみでは、日本における ACD/MPV 症例の遺伝学的診断が十分になされているとは言えないと考えられた。また、Akimoto および Hayasaka の研究では海外の報告と比較して、ACD/MPV に多いとされる先天性心疾患、先天性消化管異常、腎尿路異常、椎体異常などの肺外合併症が少なかった。その原因として、重症 PH による死亡症例のうち肺外合併症がない症例ではより積極的に剖検がなされるために ACD/MPV と診断されている可能性が考えられた。すなわち、日本では特に肺外合併症がある場合に、病理学的検査が行われていないことによる ACD/MPV の未診断症例が多く存在する可能性があり、日本での ACD/MPV の全容は未だ明らかになっていないと考えられた。

ACD/MPV 症例は生後早期から NICU において重症 PPHN として治療を受けていることが多く、酸素化障害が重篤であるために肺生検を安全に行うことが困難である。一方、その生命予後は一般的に極めて不良である。海外からの報告と同様に、日本においても ACD/MPV の約 90%に *FOXF1* の点変異あるいは CNVs が同定されるのであれば、重症 PH 症例に対して積極的に遺伝子解析を行うことで肺生検の代用とすることが可能になると考えられる。また、日本における ACD/MPV 症例における *FOXF1* の点変異および CNVs の割合が明らかになれば、病理学的に未診断の重症 PH 症例の遺伝子解析を行うことで、日本における ACD/MPV 症例の総数や遺伝子変異の割合が推定可能となり、ACD/MPV 症例の合併症の有無や疾患の重症度、自然経過などの全容が明らかになると考

えられる。しかし、日本において ACD/MPV 症例に対する網羅的な遺伝子解析を行った報告はこれまでになかった。

そこで我々は、新たに相談を受けた HILD 疑い症例に対する *FOXF1* のエキソン領域の塩基配列解析を継続するとともに、2011 年から集積した症例のうち ACD/MPV 確定診断症例を含む、一酸化窒素吸入療法を施行あるいは ECMO を導入した重症 PH 症例について、*FOXF1* のエキソン領域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。

本研究では、重症 PH 症例のうち病理学的に ACD/MPV と診断された症例についてのみ検討した。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* およびその上流の 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を明らかにし、これらの遺伝学的診断が病理学的診断の代用となり得るか否かを評価するとともに、ACD/MPV の遺伝的多様性を明らかにすることである。

略語表

本文中および図表中で使用了た略語は以下のとおりである。

ACD/MPV; alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins

CNVs; copy number variations

ECMO; extracorporeal membrane oxygenation

FOXF1; forkhead box F1

HILD; hereditary interstitial lung disease

NICU; neonatal intensive care unit

MLPA; multiplex ligation-dependent probe amplification

PCR; polymerase chain reaction

PH; pulmonary hypertension

PPHN; persistent pulmonary hypertension of the newborn

TBS; tris buffered saline

研究方法

1. 対象

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) 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、自由意思に基づき文書で同意を行っていること

2. 症例の蓄積

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あるいは酸素化障害例について、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相談を受けた。臨床経過に加えて、胸部 X 線写真や肺 CT などの画像検査所見、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、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の研究が周知されたため、サーベイランス期間終了後も HILD 疑い症例についての相談が同様の頻度で続いている。

全国から相談を受けた HILD 疑い症例の中には、ACD/MPV 症例が一定の割合で含まれていた。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。

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た。収集した情報は以下の通りである。

- 1) 患者基本情報：年齢、性別、体重、在胎週数、出生体重、アプガースコア
- 2) 疾患情報：臨床経過、人工肺サーファクタント投与、ステロイド投与および一酸化窒素吸入療法の有無などの治療内容とその効果
- 3) 血液検査所見：血算、肝機能、腎機能、電解質、免疫グロブリン、SP-A、SP-D、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
- 5) 病理検査所見：気管支肺胞洗浄液、肺生検、剖検、肺移植時の摘出肺
- 6) 周産期情報：母親の妊娠経過、合併症、検査所見
- 7) 家族歴：肺疾患家族歴の有無とその内容

4. 遺伝子解析

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ケ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。

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 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 の溶出は付属の緩衝液 (10mM Tris-Cl, 0.5mM 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 40ng/ μ l 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附表 1 に示す。*FOX1* 増幅用のプライマーは、Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いて、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 10 μ M の濃度に調整した。

(2) PCR の条件

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)。

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
水	7 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
DNA (40ng/ μ l) または水 (negative control)	1 μ l

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 2. PCR 反応条件

95°C	10 分間
95°C	30 秒間
58°C	30 秒間
72°C	60 秒間 ×40 サイクル
72°C	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、QIAquick 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 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って行った。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 13.4 μ l とプライマー溶液 0.64 μ 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ケンスを行った。

(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。シーケ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) 次世代シーケンサーによる解析

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(19) (20)。次世代シーケ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。

4) MLPA 法

FALCO HOLDINGS に依頼して SALSA MLPA kit[®]、SALSA MLPA probemix P431-A1 FOXF1[®] (MRC-Holland、オランダ) を用いて行った。MLPA kit は、2 種類のオリゴヌクレオチドプローブが目的とする DNA 配列に隣接してハイブリダイズされるように設計されており、ハイブリダイズ後に結合が行われ、連結化されたプローブを PCR で増幅する。それぞれのプローブで挿入配列の長さが調節されており電気泳動でそれぞれの産物が分離されることで、各領域のコピー数が定量できる(21)。図 2 に MLPA 法の概念を示す。

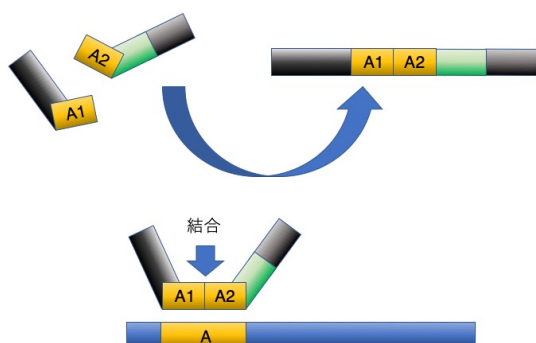


図 2-1

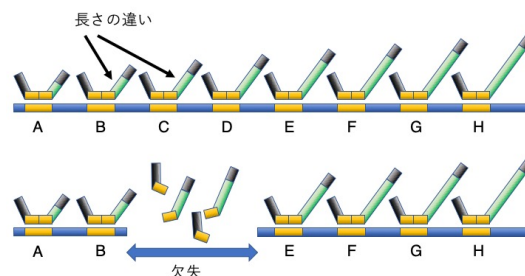


図 2-2

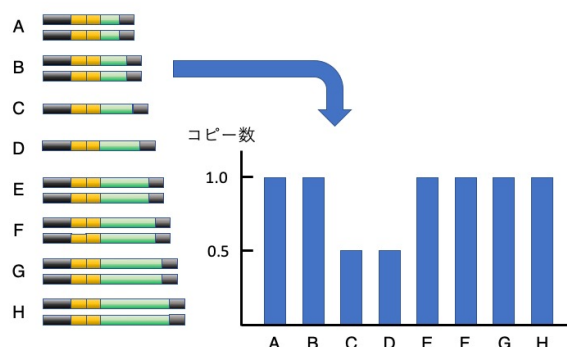


図 2-3

図 2 : MLPA 法の概念

図 2-1 : プローブ A1 と A2 が DNA の領域 A 上で結合する。

図 2-2 : 一方のアリルに欠失があると合成されるプローブの数が減る。

図 2-3 : プローブの長さで認識する領域を区別してコピー数を決定する。

5. 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り、両親の末梢血白血球から抽出した DNA を用いて、発端者と同一の変異の有無を解析した。

6. 同胞の遺伝子解析

家族内発症の可能性が強い場合、改めて遺伝カウンセリングを受けた上で、両親が発端者の同胞の遺伝子解析を希望された場合に限り、同胞の末梢血白血球または乾燥臍帯から抽出した同胞の DNA を用いて、発端者と同一の変異の有無を解析した。

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。

研究結果

1. 対象症例のまとめ

2011年2月から2018年9月までの7年間余の期間に、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。症例のまとめを表3に示す。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、全例が重度のPHを呈した。発症時期は12症例が新生児期であり、4症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。

16症例のうち3症例（症例14～16）では解析に利用可能なDNAが得られなかった。11症例についてはSanger法、2症例（症例3、11）については次世代シーケンサーによる解析を行い、変異を認めなかった症例（症例7～13）に対しMLPA法によるCNVs解析を行った。

2. 解析結果

1) *FOXF1* エキソン領域の塩基配列解析結果

解析に利用可能なDNAが得られた13症例のうち6症例で*FOXF1*のエキソン領域の点変異（c.222C>G, p.Ile74Met、c.256C>T, p.Arg86Trp、c.272G>C, p.Gly91Ala、c.691_698delGCGGCGGC, p.Ala231ArgfsX61、c.852_856delTACTA, p.Tyr284X、c.899delT, p.Leu300Argfs）を認めた。

*FOXF1*のエキソン領域に認められた6種類の点変異を表4に示す。6種類の変異のうち、3種類がミスセンス変異（症例1～3）、2種類がフレームシフト変異（症例4、6）であり、1種類がナンセンス変異（症例5）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、6種類の点変異全てがMutationTasterでdisease causingと評価された。また、4種類が既報変異であり、症例6はAkimoto、症例2と5はHayasakaによる報告と同一症例である。症例1と3の変異は新規変異であるが、PolyPhen-2およびMutationTasterの結果から病原性変異であると判断した。6種類の変異は、1000GenomeおよびgnomADには登録がなかった。

図5に病原性と考えられる変異の位置を示す。変異は全てエキソン1の内部に認められた。

表 3. 症例のまとめ

症例番号	DNA	性別	発症時期	GA (週)	BW (g)	新生児仮死	PH	肺外合併症	予後	変異	欠失
1	有り	男	4 か月	32	1606	無し	有り	VSD、PDA	死亡(7 か月)	c.222C>G	解析無し
2	有り	女	出生時	40	2702	無し	有り	無し	生存(肺移植)	c.256C>T	解析無し
3	有り	男	1 か月	37	3580	無し	有り	腸回転異常	死亡(3 か月)	c.272G>C	解析無し
4	有り	男	出生時	38	2728	無し	有り	AVSD、鎖肛	死亡(2 か月)	c.691_698delGCGGCGGC	解析無し
5	有り	女	出生時	39	2994	無し	有り	無し	死亡(日齢 5)	c.852_856delTATCA	解析無し
6	有り	男	3 か月	41	3344	無し	有り	無し	生存(肺移植)	c.899delT	解析無し
7	有り	女	出生時	37	2684	無し	有り	無し	死亡(日齢 2)	無し	上流
8	有り	男	出生時	41	3436	無し	有り	無し	死亡(6 日)	無し	上流
9	有り	女	出生時	38	3183	無し	有り	無し	死亡(1 か月)	無し	上流
10	有り	男	出生時	38	3696	無し	有り	無し	死亡(日齢 6)	無し	上流
11	有り	女	出生時	38	3300	無し	有り	多指	死亡(日齢 2)	無し	上流
12	有り	男	出生時	37	2900	無し	有り	無し	死亡(日齢 2)	無し	無し
13	有り	男	3 か月	38	2630	無し	有り	無し	死亡(3 か月)	無し	無し
14	無し	女	出生時	39	3024	無し	有り	無し	死亡(日齢 4)	解析不能	解析不能
15	無し	男	出生時	39	3762	無し	有り	無し	死亡(日齢 0)	解析不能	解析不能
16	無し	男	出生時	41	3466	無し	有り	無し	死亡(日齢 36)	解析不能	解析不能

GA；妊娠週数、BW；出生体重、PH；肺高血圧、VSD；心室中隔欠損、PDA；動脈管開存、AVSD；房室中隔欠損

表 4. *FOXF1* 変異のまとめ

症例番号	変異	アミノ酸変化	過去の報告	Polyphen-2	MutationTaster	1000Genome	gnomAD
1	c.222C>G	p.Ile74Met	無し	probably damaging	disease causing	登録なし	登録なし
2	c.256C>T	p.Arg86Trp	有り	probably damaging	disease causing	登録なし	登録なし
3	c.272G>C	p.Gly91Ala	無し	damaging	disease causing	登録なし	登録なし
4	c.691_698delGCGGCGGC	p.Ala231Argfs	有り	—	disease causing	登録なし	登録なし
5	c.852_856delTATCA	p.Tyr284X	有り	—	disease causing	登録なし	登録なし
6	c.899delT	p.Leu300Argfs	有り	—	disease causing	登録なし	登録なし

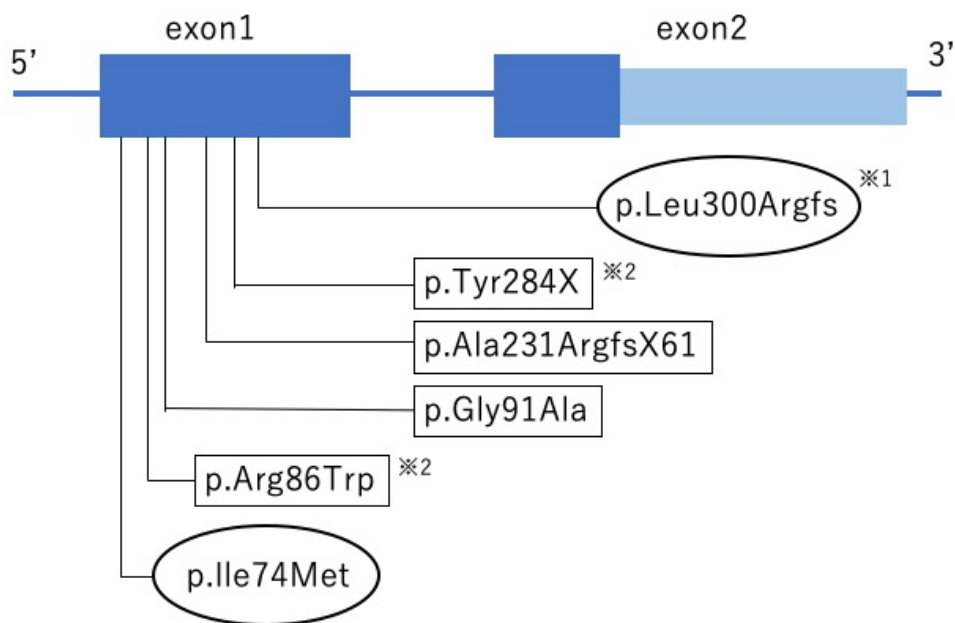


図 3. ACD/MPV 症例に認められた *FOXF1* 変異

四角は新生児期発症、楕円は乳児期発症の症例

※1; Akimoto らが報告した症例と同一症例

※2; Hayasaka らが報告した症例と同一症例

2) *FOXF1* のおよびその上流のコピー数解析結果

図 4 に正常例の MLPA 法による CNVs の解析結果を示す

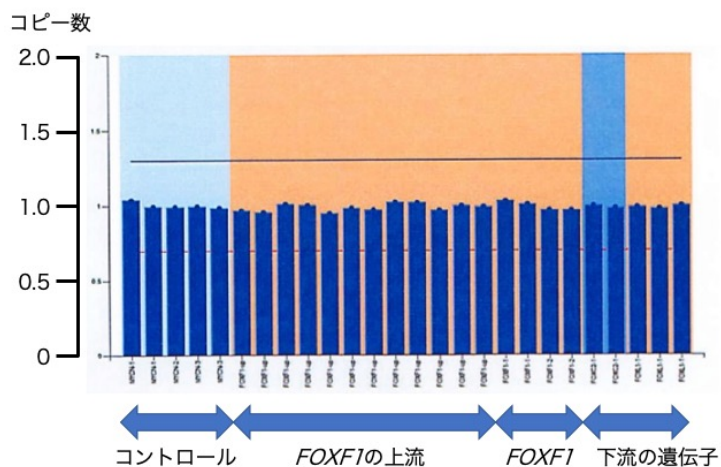


図 4：正常例の CNVs 解析結果

*FOXF1*のエキソン領域に変異を認めなかった7症例(症例7~13)に対し MLPA 法による CNVs 解析を行った結果、5 症例(症例 7~11) にコピー数低下を認めた。いずれの症例も *FOXF1* のコピー数低下はなく *FOXF1* の約 260~280kb 上流の領域からさらに上流に向かって 45kb 以上の範囲でコピー数低下を認めた(図 5~9)。いずれの症例も最も上流側に設定したプローブまでコピー数低下を認めており、*FOXF1* 上端から約 330kb 上流までは欠失していることがわかるが、それ以上上流の欠失の範囲については今回の解析では不明である。

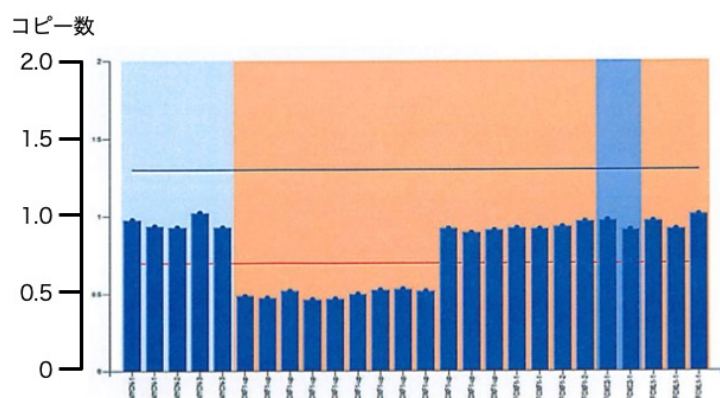


図 5：症例 7 の CNVs 解析結果
FOXF1 の上流に CNVs の低下を認める

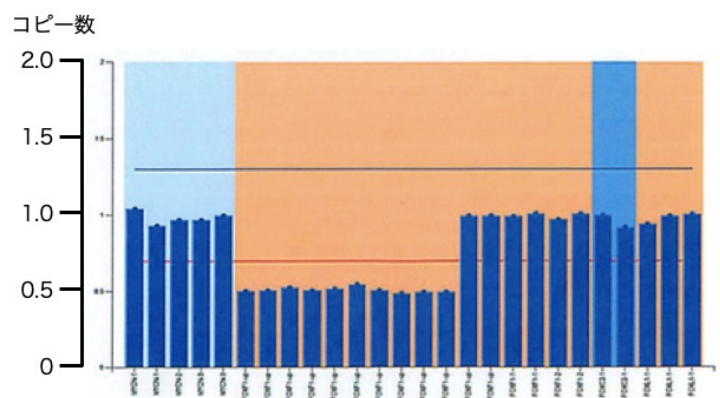


図 6：症例 8 の CNVs 解析結果
FOXF1 の上流に CNVs の低下を認める

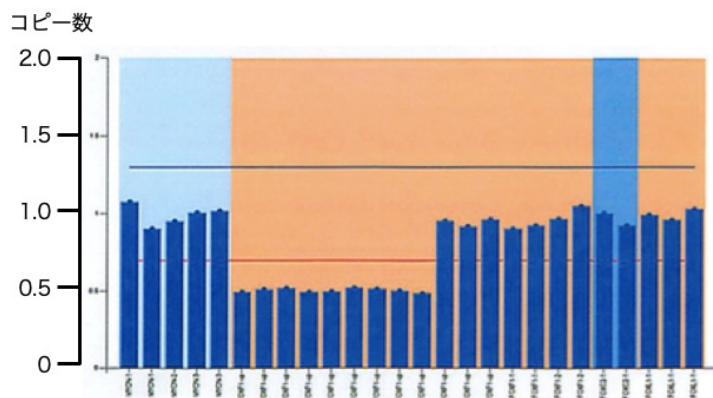


図 7：症例 9 の CNVs 解析結果
FOXF1 の上流に CNVs の低下を認める

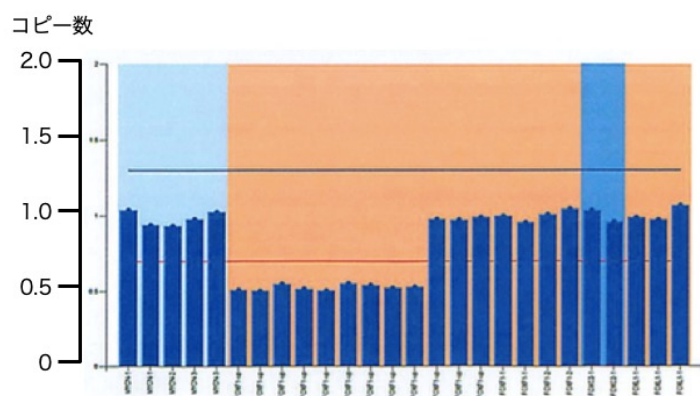


図 8：症例 10 の CNVs 解析結果
FOXF1 の上流に CNVs の低下を認める

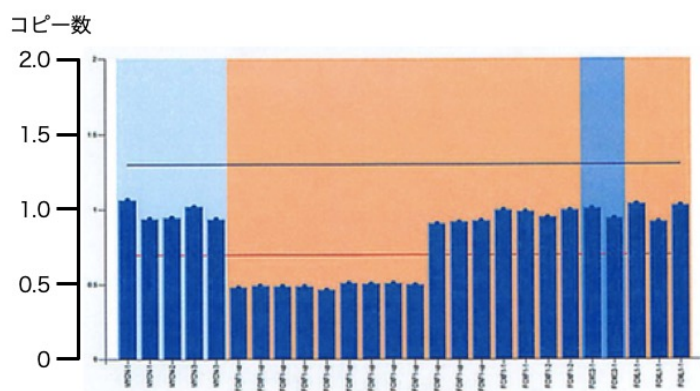


図 9：症例 11 の CNVs 解析結果
FOXF1 の上流に CNVs の低下を認める

表 1 の症例 10（図 8）と症例 11（図 9）は同胞例であった。図 10 にこの同胞例の家系図を示す。II-1 は出生時強い PH を認め生後 74 時間に死亡したが、

剖検は行われていなかった。II-2 は健康である。II-3 が発端者であり、*FOXF1* の上流にコピー数がおよそ 0.5 の部分を認めた。II-3 の欠失が判明した時点で II-4 は妊娠第 3 半期に入っていた。II-4 には II-2 と同様の欠失を認め、後に剖検により ACD/MPV と確定診断された。II-1 の乾燥臍帯から抽出した DNA にも同様の CNVs を認めた (図 11)。母親(I-2) には CNVs の低下を認めなかったが、父親(I-1) には II-1、II-3、II-4 と同様の範囲におよそ 0.7 の CNVs を認めた (図 12)。

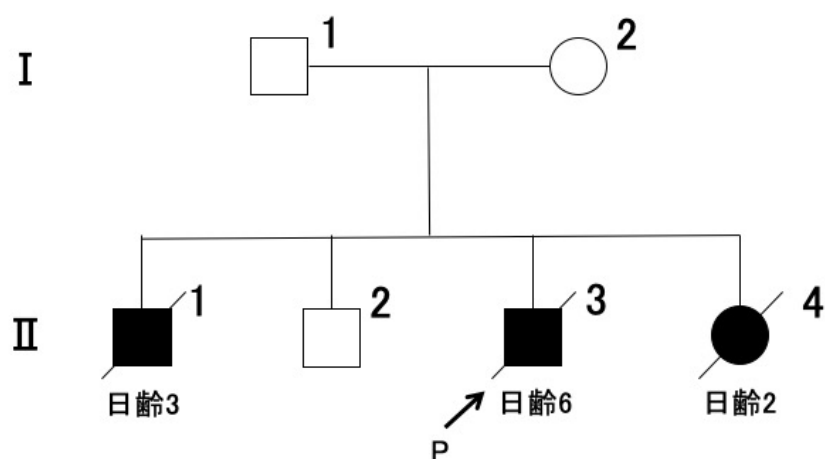


図 10：症例 10 と 11 の家系図
II-3 が症例 11、II-4 が症例 12 に相当する。

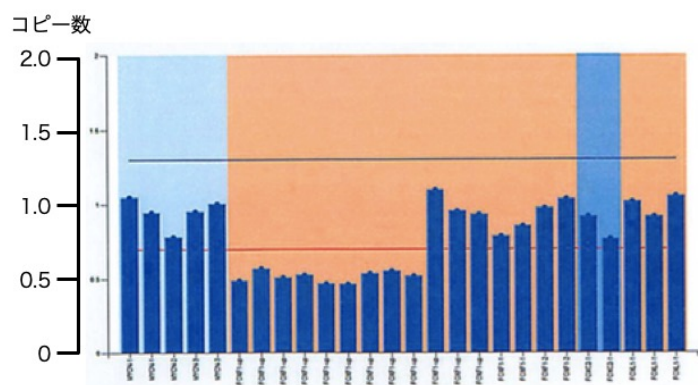


図 11：II-1 の CNVs 解析結果
保存された乾燥臍帯から抽出した DNA を用いて解析を行った。

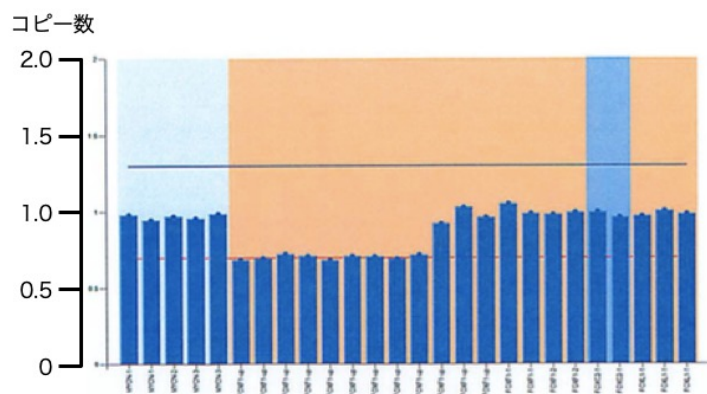


図 12：II-1（発端者の父親）の CNVs 解析結果

2 症例（症例 12、13）には変異もコピー数低下も認めなかった。この 2 症例についてはさらなる遺伝子解析についての同意が得られなかった。

解析結果のまとめを図 13 に示す。病理学的に確定診断された 16 症例の ACD/MPV 症例のうち、解析に利用可能な DNA が得られた 13 症例について *FOXF1* のエクソン領域の塩基配列解析を行ったところ、6 症例に病原性の点変異を同定した。エクソン領域の塩基配列に変異を認めなかった 7 症例に対して MLPA 法による CNVs の解析を行ったところ、5 症例に *FOXF1* の上流に欠失を認めた。

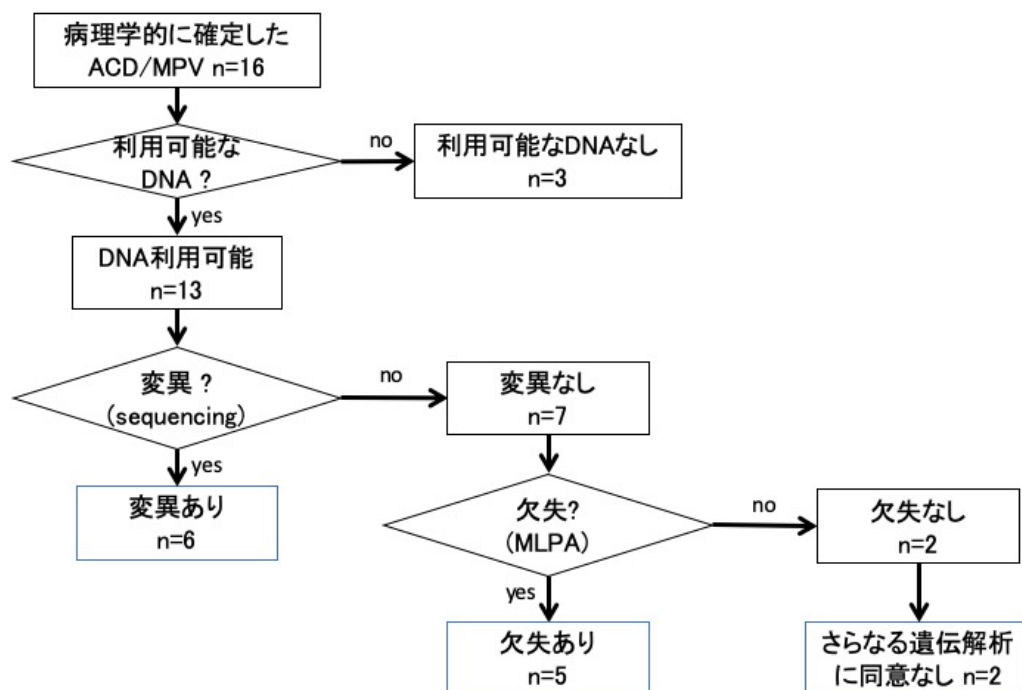


図 13：解析結果のまとめ

考察

ACD/MPV は新生児期に致死的な PH を来す疾患であり、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 割で *FOXF1* のエキソンに変異が認められ、同様の約 4 割で *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(11)。今回の我々の研究では、日本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、日本における ACD/MPV の遺伝的背景を明らかにすることができた。また、遺伝子解析の有用性を示すことができた。

今回の研究で同定された 6 種類の *FOXF1* の点変異は全てエキソン 1 上に存在した。特に 3 種類のミスセンス変異 (c.222C>G, p.Ile74Met、c.256C>T, p.Arg86Trp、c.272G>C, p.Gly91Ala) は *FOXF1* 蛋白の DNA 結合ドメインをコードするアミノ酸 44~148 の範囲に存在した(22)。またこれらのミスセンス変異は *in silico* 解析でも病原性ありと判定されたため、ACD/MPV の原因と考えられた。

今回の研究では 2 症例について、*FOXF1* のエキソン領域の変異も *FOXF1* およびその上流の CNVs の変化も見出させなかった。Szafranski らは同様の症例について全エキソーム解析を行い、5 種類の遺伝子 (*DOCK8*、*ESRP1*、*MPRIIP*、*SLC50A1*、*ZMYND11*) に *de novo* 変異を同定したと報告している(11)。これらの遺伝子は細胞シグナル伝達や転写制御に影響することから疾患の原因であることが想定されている。今回の 2 症例については、更なる遺伝子解析に対する同意が得られなかった。

FOXF1 がコードする *FOXF1* は転写因子であり、肺血管のみならず心臓、消化管、腎泌尿器、椎体などの臓器の発生に関与することが知られている。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(10)。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。

図 14 にこれまでに報告されている ACD/MPV 症例に見られた遺伝子欠失の範囲を示す(11)。今回の CNVs 解析で認められた欠失は *FOXF1* の上流のエンハンサー領域を含む範囲の欠失のみであった。*FOXF1*、*FOXC2*、*FOXL1*を含む広い範囲の欠失の症例では肺外合併症が多いという報告があり、今後も症例を蓄積して検討する必要がある(10)。今回症例 7-11 で欠失を認めた範囲は、エンハンサー領域を含んでおり、この領域のノンコーディング RNA 遺伝子である *LINC01081* や *LINC01082* の欠失が *FOXF1* の読み取りを低下させることが報告されている(23)。

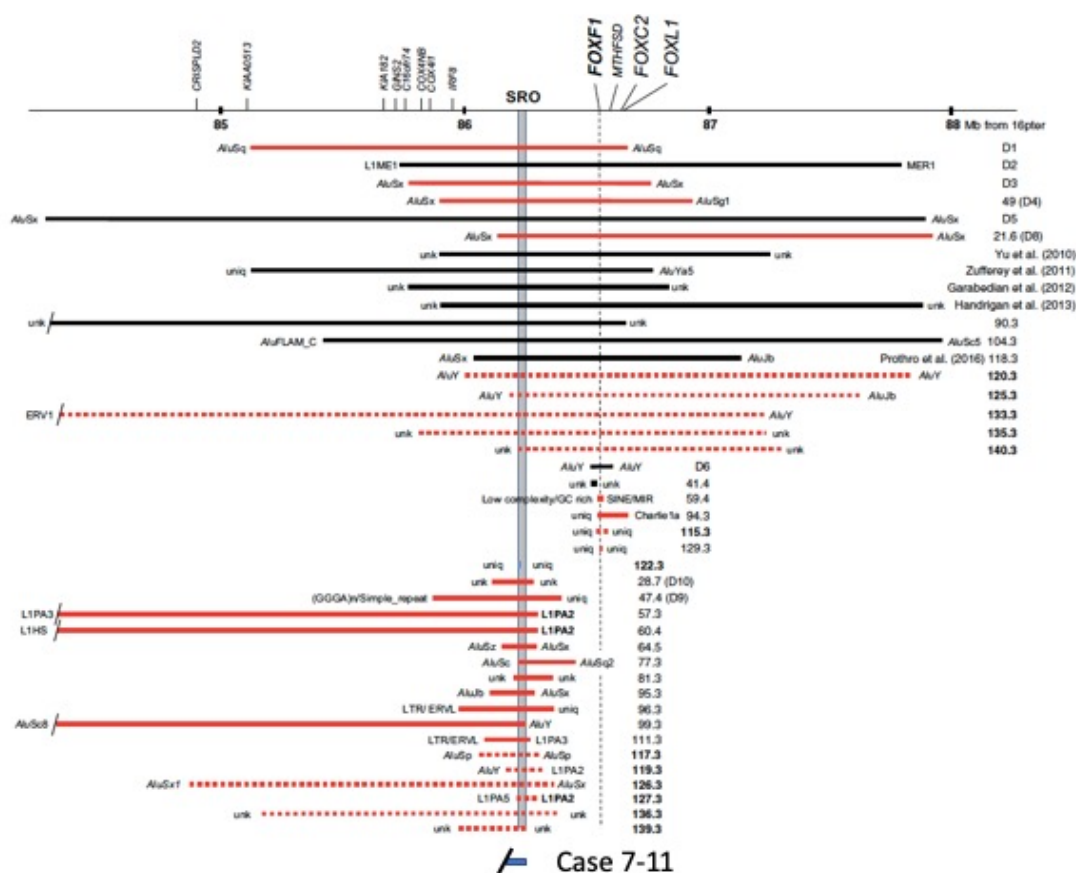


図 14：ACD/MPV 症例における遺伝子欠失範囲
文献 15 から引用・改変。今回の検討で認められた欠失範囲を青線で示す。

ACD/MPV 症例の多くが新生児期発症で致死的であるが、16 例のうち乳児期発症例を含む 2 例が肺移植により現在も生存している。今回の研究では、変異の種類や欠失の範囲と症状や重症度の相関は見出させなかった。遺伝子型と表現型の相関については今後症例を蓄積して検討する必要がある。

今回の我々の研究で行ったように、*FOXF1* のシーケンスを行い、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 90% を診断することができると考えられる。*FOXF1* に変異と欠失のどちらも認められない場合は、全エキソーム解析あるいは全ゲノム解析が有用である可能性がある。

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、父親性インプリンティングの存在が想定されている(11)。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。欠失部位のコピー数が同胞 3 人では 0.5 であるのに対して父親では 0.7 程度であったことから、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。体細胞モザイクが証明された健康な父親から *FOXF1* のエキソン 1 に存在する変異が遺伝子した 2 家系の報告があるが(11)、父親の欠失が遺伝した報告は現在までにない。

総括および結論

7 年間余の研究期間内に、ACD/MPV の病理学的診断がされた 16 症例の相談を受けた。解析可能であった 13 症例のうち、6 症例で *FOXF1* のエキソン領域に点変異(c.222C>G, p.Ile74Met、c.256C>T, p.Arg86Trp、c.272G>C, p.Gly91Ala、c.691_698delGCGGCGGC, p.Ala231ArgfsX61、c.852_856delTACTA, p.Tyr284X、c.899delT, p.Leu300Argfs) を認め、5 症例で *FOXF1* の約 280kb 上流の領域に 45kb 以上の範囲でコピー数低下を認めた。

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 4 割は *FOXF1* 変異、約 4 割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。

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、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。次世代シーケンサーによる解析につきましてはかずさ DNA 研究所ゲノム事業推進部 小原収部長をはじめ研究所の方々にご協力をいただきました。深く御礼申し上げます。また、様々な面から研究をサポートして下さいました、北海道大学病院周産母子センター古瀬優太先生、恩田哲雄先生、安藤明子先生、中村雄一先生に御礼申し上げます。

引用文献

1. Mac Mahone HE 1948 Congenital alveolar dysplasia; a developmental anomaly involving pulmonary alveoli. *Pediatrics* 2(1):43-57.
2. Janney CG, Askin F, Kuhn C 3rd. 1981 Congenital alveolar capillary dysplasia – an unusual cause of respiratory distress in the newborn. *Am J Clin Pathol* 76(5):722-727.
3. Shohet I, Reichman B, Schibi G, Brish M 1984 Familial persistent pulmonary hypertension. *Arch Dis Child* 59(8):783-785.
4. Sen P, Thakur N, Stockton DW, Langston C, Bejjani BA 2004 Expanding the phenotype of alveolar capillary dysplasia (ACD). *J Pediatr* 145(5):646-651.
5. Bishop NB, Stankiewicz P, Steinhom RH 2011 Alveolar capillary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 184(2):172-179.
6. Ito Y, Akimoto T, Cho K, Yamada M, Tanino M, Dobata T, Kitaichi M, Kumaki S, Kinugawa Y 2015 A late presenter and long-term survivor of alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins. *Eur J Pediatr* 174(8):1123-1126.
7. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R 2019 Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53(1).
8. Pedersen J, Hedegaard ER, Simonsen U, Kruger M, Infanger M, Grimm D 2018 Current and Future Treatments for Persistent Pulmonary Hypertension in the Newborn. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 123(4):392-406.
9. Towe CT, White FV, Grady RM, Sweet SC, Eghtesady P, Wegner DJ, Sen P, Szafranski P, Stankiewicz P, Hamvas A, Cole FS, Wambach JA 2018 Infants with Atypical Presentations of Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of the Pulmonary Veins Who Underwent Bilateral Lung Transplantation. *J Pediatr* 194:158-164 e1.
10. 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, Simonic 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 2009 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(6):780-791.
11. Szafranski P, Gambin T, Dharmadhikari AV, Akdemir KC, Jhangiani SN, Schuette J, Godiwala N, Yatsenko SA, Sebastian J, Madan-Khetarpal S, Surti U, Abellar RG, Bateman

- DA, Wilson AL, Markham MH, Slamon J, Santos-Simarro F, Palomares M, Nevado J, Lapunzina P, Chung BH, Wong WL, Chu YWY, Mok GTK, Kerem E, Reiter J, Ambalavanan N, Anderson SA, Kelly DR, Shieh J, Rosenthal TC, Scheible K, Steiner L, Iqbal MA, McKinnon ML, Hamilton SJ, Schlade-Bartusiak K, English D, Henderson G, Roeder ER, DeNapoli TS, Littlejohn RO, Wolff DJ, Wagner CL, Yeung A, Francis D, Fiorino EK, Edelman M, Fox J, Hayes DA, Janssens S, De Baere E, Menten B, Loccupier A, Vanwallegheem L, Moerman P, Sznajder Y, Lay AS, Kussmann JL, Chawla J, Payton DJ, Phillips GE, Brosens E, Tibboel D, de Klein A, Maystadt I, Fisher R, Sebire N, Male A, Chopra M, Pinner J, Malcolm G, Peters G, Arbuckle S, Lees M, Mead Z, Quarrell O, Sayers R, Owens M, Shaw-Smith C, Liou J, McKay E, de Leeuw N, Feenstra I, Spruijt L, Elmslie F, Thiruchelvam T, Bacino CA, Langston C, Lupski JR, Sen P, Popek E, Stankiewicz P 2016 Pathogenetics of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins. *Hum Genet* 135(5):569-586.
12. Ustiyan V, Bolte C, Zhang Y, Han L, Xu Y, Yutzey KE, Zorn AM, Kalin TV, Shannon JM, Kalinichenko VV 2018 FOXF1 transcription factor promotes lung morphogenesis by inducing cellular proliferation in fetal lung mesenchyme. *Dev Biol* 443(1):50-63.
 13. Sen P, Gerychova R, Janku P, Jezova M, Valaskova I, Navarro C, Silva I, Langston C, Welty S, Belmont J, Stankiewicz P 2013 A familial case of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins supports paternal imprinting of FOXF1 in human. *Eur J Hum Genet* 21(4):474-477.
 14. Cho K, Yamada M, Agematsu K, Kanegane H, Miyake N, Ueki M, Akimoto T, Kobayashi N, Ikemoto S, Tanino M, Fujita A, Hayasaka I, Miyamoto S, Tanaka-Kubota M, Nakata K, Shiina M, Ogata K, Minakami H, Matsumoto N, Ariga T 2018 Heterozygous Mutations in OAS1 Cause Infantile-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis with Hypogammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 102(3):480-486.
 15. 長和俊 2018 家族性間質性肺疾患. 間質性肺炎・肺線維症と類縁疾患 (三嶋理晃 編) 中山書店 (東京) :231-233.
 16. 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.
 17. Hayasaka I, Cho K, Akimoto T, Ikeda M, Uzuki Y, Yamada M, Nakata K, Furuta I, Ariga T, Minakami H 2018 Genetic basis for childhood interstitial lung disease among Japanese infants and children. *Pediatr Res* 83(2):477-483.
 18. Noguee LM 2017 Interstitial lung disease in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med* 22(4):227-233.
 19. Fujiki R, Ikeda M, Yoshida A, Akiko M, Yao Y, Nishimura M, Matsushita K, Ichikawa T,

- Tanaka T, Morisaki H, Morisaki T, Ohara O 2018 Assessing the Accuracy of Variant Detection in Cost-Effective Gene Panel Testing by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn* 20(5):572-582.
20. Fujiki R IM, Ohara O 2019 Short DNA Probes Developed for Sample Tracking and Quality Assurance in Gene Panel Testing. *J Mol Diagn* 21(6):1079-1094.
21. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V 2012 Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* 13(3):3245-3276.
22. Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerbäck S, Carlsson P 1994 Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* 13(20):5002-5012.
23. Szafranski P, Herrera C, Proe LA, Coffman B, Kearney DL, Popek E, Stankiewicz P 2016 Narrowing the FOXF1 distant enhancer region on 16q24.1 critical for ACDMPV. *Clin Epigenetics* 8:112.
-

附表 1. *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	GTCCTCTTCCTCCTCCTCCTC	493
EXON1aR	CCCTCCTCGAACATGAACTC	
EXON1bF	TGCTTCATCAAGCTACCCAAG	645
EXON1bR	GTGGCTGTTCTGGTGCAGATA	
EXON1cF	CAAGCCCATGTACAGCATGA	583
EXON1cR	CTGCCACTCAGACTCGACTTC	
EXON2F	CCTCTGCCTGAACTCTGAGC	398
EXON2R	GTGTCTTTGCATTGGGGACT	