

特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症の
新規原因遺伝子と予後規定因子の同定

ち だ あ や こ

千 田 礼 子

(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

平成 26 年度

目 次

第1章 緒言	1 頁
第2章 特発性肺動脈性肺高血圧症における <i>BMPRI1B</i> 遺伝子変異の同定と機能解析	3 頁
第3章 特発性肺動脈性肺高血圧症における <i>NOTCH3</i> 遺伝子変異の同定と機能解析	6 頁
第4章 小児期発症 特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症における遺伝子変異と臨床像	10 頁
第5章 小児期発症 特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症における新規バイオマーカー	13 頁
第6章 考察	17 頁
第7章 結論	19 頁
謝 辞	20 頁
引用文献	21 頁
用語解説	27 頁
図 表	30 頁

第1章 緒言

肺高血圧症 (pulmonary hypertension、PH) は心臓カテーテル検査によって安静時の平均肺動脈圧が25mmHg以上である状態と定義される、予後不良の進行性の疾患である^{1,2)}。さらにPHの中で、左心系の循環器疾患・呼吸器疾患・低酸素状態・慢性血栓塞栓性肺高血圧症・代謝性疾患などの全身性疾患を除外した上で、肺換気血流シンチグラフィにおいて換気血流不均等がないものが肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension、PAH) と定義されている¹⁾。PAHは年間1,000,000人中1-2人が罹患すると推察され、時に致命的となりうる³⁾。成人期発症のPAHに対して治療を行わなかった場合の予後は非常に不良であり、平均生存期間は2.8年とされている⁴⁾。

PAHはさらに膠原病・門脈病変・先天性心疾患・薬剤性・住血吸虫症・ヒト免疫不全ウイルス感染による二次性PAHと、特発性PAH (idiopathic PAH、IPAH) および遺伝性PAH (heritable PAH、HPAH) に分類される²⁾。IPAHは家族歴がなく、上記の他疾患のようなこれまでに同定されているリスク因子を持たずに発症した孤発例である⁵⁾。これに対してHPAHは常染色体優性遺伝形式で伝播する。その浸透率は10-20%と比較的低く、また、女性の罹患率は男性の2倍以上と高いことが知られている⁶⁾。

HPAHの疾患原因遺伝子として形質転換成長因子 (transforming growth factor - beta、TGF- β) スーパーファミリーに属する骨形成タンパク (bone morphogenetic protein、BMP) シグナル伝達経路内の2型骨形成タンパク受容体 (bone morphogenetic protein receptor 2、*BMPR2*) が2000年にはじめて報告された^{7,8)}。その後、同じくTGF- β /BMPシグナル伝達経路に属する1型アクチビン受容体様キナーゼ (activin receptor-like kinase 1、*ALK1*)、エンドグリン (endoglin、*ENG*)、転写調節因子である *SMAD1*、*SMAD4*、*SMAD8* が疾患原因遺伝子として相次いで報告された⁹⁻¹³⁾。さらに2012年、全エクソーム解析により、PAH発症に関与するメカニズムは現時点でははっきりしていないものの、細胞内脂質輸送に関与するカベオリン-1 (caveolin-1、*CAV1*) があらたに疾患原因遺伝子として報告された¹⁴⁾。

これらの原因遺伝子の同定により、分子生物学的側面からのPAHの病態についての理解が急速に進んできている。しかしHPAHの約30%、およびIPAHの60-90%ではこれらの遺伝子変異は見つかっておらず、その原因はいまだ不明である^{15,16)}。

そこで我々は、上記以外にもTGF- β /BMPシグナル伝達経路に属する遺伝子、またはそれ以外の遺伝子の異常がPAHの発症メカニズムに関与する可能性があるのではないかとの仮説をたて、まずはTGF- β /BMPシグナル伝達経路に属する複数の遺伝子の変異を、既知の原因遺伝子変異が見つかっていないIPAH患者において検索することとした。

また、PAH患者の肺小動脈平滑筋細胞においてNOTCH3タンパクが過剰発現している

こと、さらには PAH 患者およびマウス・ラット PAH モデルにおいて、肺における NOTCH3 タンパクの量が PAH の重症度と関連していることが報告されている¹⁷⁾。この報告を元に、我々は BMP シグナル伝達経路のみならず、NOTCH3 シグナル伝達経路も PAH の発症に関与するのではないかという仮説をたて、IPAH 患者において *NOTCH3* 遺伝子およびその経路内の遺伝子変異の検索を試みることにした。

さらに、前述のように一部の PAH 患者においては原因遺伝子が同定されてきているが、各々の遺伝子変異が臨床像に与える影響はいまだ不明である。この遺伝子変異と臨床像との関連に言及した報告はわずかであり¹⁸⁻²⁰⁾、特に小児期発症 PAH に関する解析は皆無である。無治療の場合の小児期発症 PAH の平均生存期間は 10 か月と成人よりも短いこと^{21, 22)}、小児期発症 PAH 患者の男女比はほぼ 1:1 であること²³⁾、肺血管拡張試験への反応率が成人期発症例では 25% であるのに対し小児では 40% と比較的良好であること²⁴⁾などが報告されており、成人期発症 PAH と小児期発症 PAH の病態は異なる可能性が示唆されている。以上を踏まえ、小児期発症 PAH の遺伝子変異と臨床像の関連について後方視的に検討することとした。

加えて、PAH の日常診療における問題点として、PAH 患者の現時点での重症度および予後予測が困難なことがあげられる。特に小児においては各種検査時に鎮静が必要であることなどから、しばしば重症度の推定が困難となる。脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide、BNP) および脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 末端フラグメント (N-terminal proBNP、NT-proBNP) は小児・成人に関わらず PAH における有用なバイオマーカーとして考えられており、臨床の場でも利用されているが²⁵⁻²⁸⁾、予後や肺移植の必要性を予測するには感度が低いことが指摘されている²⁷⁾。ここ数年で、PAH の新しいバイオマーカー候補として複数の物質が報告されているものの²⁹⁻³³⁾、これらのバイオマーカー候補の有用性は十分には確認されておらず、実際の臨床現場では活用されていない。

そこで我々は、小児 PAH の重症度および予後予測に有用なバイオマーカーの探索を試みた。具体的には、PAH によってもたらされる右心不全や血管新生、細胞増殖などのメカニズム、そして先行論文を考慮した上で 10 項目の物質をバイオマーカー候補として選び出し、小児期発症 PAH 患者の残余血漿検体で測定し、臨床像と後方視的に照合することでその有用性を評価することとした。

第2章 特発性肺動脈性肺高血圧症における *BMPR1B* 遺伝子変異の同定と機能解析

第1節 背景

近年、TGF- β /BMP シグナル伝達経路に属する *BMPR2*、*ALK1* などの遺伝子変異が、PAH の発症に深く関わるとして次々と同定されてきている⁷⁻¹³⁾。しかし HPAH の約 30%、および IPAH の 60-90%ではこれらの遺伝子変異は発見されておらず、その原因はいまだ不明である^{15, 16)}。そこで我々は、既知の原因遺伝子変異が見つかっていない IPAH 患者において、TGF- β /BMP シグナル伝達経路に属する 10 遺伝子の変異を検索した。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

東京女子医科大学倫理委員会の承認を得た上で、原因遺伝子変異の検索を依頼された 74 名（発症時年齢 12.3 $\pm$ 11.3 歳）の PAH 患者から、本人または保護者から文書で同意を得て末梢血全血 5-10ml を採取した。小児患者の場合は、疾患の治療に必要な血液検査を施行した際の残余検体を利用した。なお、この 74 症例の一部は先行研究の対象にも含まれている^{12, 34)}。この末梢血からゲノム DNA (genomic deoxyribonucleic acid、genomic DNA) を抽出し、既知の疾患原因遺伝子である *BMPR2*、*ALK1* 遺伝子について直接シーケンス法で変異の有無を検索した。その後 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification 法 (MLPA 法) で *BMPR2*、*ALK1* および *ENG* 遺伝子の大規模欠失・重複の有無を検索し、これらの遺伝子の変異を持たない 44 名について TGF- β /BMP ファミリーに属する *SMAD1*、*SMAD2*、*SMAD3*、*SMAD4*、*SMAD5*、*SMAD6*、*SMAD8* 遺伝子変異の有無を直接シーケンス法で確認した。この際に認められた *SMAD8* 変異は新規疾患原因遺伝子として既に報告されている¹²⁾。残る 43 名（発症時年齢 12.2 $\pm$ 12.7 歳）についてさらに *SMAD7*、*BMPR1A*、*BMPR1B* 遺伝子変異の有無を直接シーケンス法で検索した (図 1)。

(2) 遺伝子変異の検索

直接シーケンス法による遺伝子変異の検索には ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) を使用した。新規の遺伝子変異が同定された場合には、健常者コントロール 450 例の genomic DNA においてその変異がないことを確認した。そのうち 150 例については東京女子医科大学倫理委員会の承認を得た上で、心血管疾患を含む重篤な疾患がないことが確認されている者から同意を得て採取した。ただし、小児の健常者コントロールについては保護者から同意を得た上で、他疾患の治療に必要な血液検査を受けた際の残余検体を利用した。残りの 300 例については、Genomic DNA - Human Adult Normal Tissue: Peripheral Blood Leukocyte, from a single donor (BioChain) を使用した。

(3) プラスミドの準備

東京大学 宮園研究室から譲渡されたマウス pcDNA3.0-hemagglutinin(HA)-*Bmpr1b* お

よび constitutively active (ca)-Bmpr1b、ヒト pcDNA3.0-6×Myc-SMAD8、pcDNA3.0-SMAD4、3GC2-Lux を使用した。Ca-Bmpr1b は 203 番目のグルタミンをアスパラギン酸に変異させる方法により作成されていた。pcDNA3.0-HA-Bmpr1b および ca-Bmpr1b については site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて目的の変異体を作製した。

(4) 遺伝子導入とウェスタンブロッティング

10% fetal bovine serum (FBS) を加えた DMEM/F12 液体培地 (Sigma) を使用して COS1 細胞を培養し、これに Lipofectamine2000 reagent (Invitrogen) を用いてそれぞれのプラスミドを導入した。一部の COS1 細胞については導入 20 時間後に培地を 0.1% FBS-DMEM/F12 へと変更して 4 時間細胞を飢餓状態に曝し、同時に BMP4 刺激を行った。遺伝子導入から 24 時間後に細胞を溶解してタンパクを抽出し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate - poly-acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を行った。その後ゲルからタンパクをポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜へとセミドライ式の転写装置を用いて転写した。その後、1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) でブロッキングを行い、抗リン酸化 SMAD1/5/8 抗体、抗 Myc 抗体、抗 HA 抗体をそれぞれの目的に応じて 1 次抗体として室温で 1 時間 PVDF 膜と反応させた。その後 PVDF 膜を洗浄し、それぞれの 1 次抗体に対応した horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。反応後洗浄し、化学発光法を利用して目的タンパク質を検出した。

(5) ルシフェラーゼアッセイ

Lipofectamine2000 reagent を用いて 3GC2-Lux プラスミドと野生型または変異型の pcDNA3.0-HA-bmpr1B を、さらに目的に応じて pcDNA3.0-SMAD8 と pcDNA3.0-SMAD4 を組みあわせて COS1 細胞に導入した。そのうちの一部は 0.1% FBS-DMEM/F12 で 12 時間飢餓状態に曝し、同時に BMP4 刺激を行った。遺伝子導入から 24 時間後に全ての細胞を回収し、Dual luciferase reporter assay (Promega) を用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。結果はホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の比で表した。

(6) 統計学的解析

本研究において計測値を示す場合には、平均値±標準偏差で表した。全ての統計学的解析には JMP for Windows version 8 (SAS Institute) を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差があるとみなした。

第 3 節 結果

43 名の IPAH 患者において前述の 10 種類の遺伝子変異を検索した結果、2 名の患者において *BMPR1B* 遺伝子のミスセンス変異を検出した (c. 479 G>A p. S160N、c. 1176 C>A p. F392L。図 2)。この検出された *BMPR1B* 変異がタンパク機能に与える影響について解

析を行うため、COS1 細胞に *BMPR1B* 遺伝子の野生型と変異型をそれぞれ導入してタンパク機能を解析した。その結果、BMP4 刺激を加えられた F392L 変異を導入した BMPR1B および F392L 変異 ca-BMPR1B は野生型 BMPR1B および ca-BMPR1B と比較して SMAD8 のリン酸化を増強させることがウエスタンブロット法により判明した (図 3、図 4)。また、これらの変異タンパクおよび S160N 変異 BMPR1B が SMAD8 および SMAD4 と相互作用した場合には、野生型 BMPR1B および ca-BMPR1B と比較して BMP 特異的ルシフェラーゼレポーターを活性化させることがルシフェラーゼアッセイによって明らかとなった (図 5)。

第 4 節 考察

BMPR1B は TGF- β スーパーファミリーに属する骨形成タンパク (bone morphogenetic protein、BMP) の受容体の一つであり、リガンドである BMP と結合することで細胞質の SMAD1/5/8 をリン酸化する。リン酸化された SMAD1/5/8 は co-activator である SMAD4 とともに核内に移行し、転写調節因子に働きかけて細胞増殖を抑制する^{35, 36)}。

BMPR2 遺伝子変異による PAH の発症メカニズムについては既に多くの報告があり、その変異により BMP シグナリングが低下することで血管平滑筋細胞の増殖を抑制できなくなり、さらに相対的に TGF- β シグナリングが亢進することで血管平滑筋細胞の増殖・成熟が促されると考えられている^{12, 37, 38)}。しかし、今回同定した *BMPR1B* 遺伝子変異は BMP シグナリングを増強させており、前述の定説に反する結果であった。一方で、*BMPR2* をノックアウトした肺動脈平滑筋細胞は BMP2 および BMP4 による刺激を受けた際には BMP シグナリングの低下を示すものの、BMP6 および BMP7 で刺激された際には BMP シグナリングの増強をもたらすとの報告や³⁹⁾、*BMPR2* 変異を認めない PAH 患者の肺動脈平滑筋細胞では、健常者コントロールと比較して BMPR1B の発現が有意に増強していたとの報告があり⁴⁰⁾、本研究の結果はこれらの報告の主旨と合致する。今回の結果および上記の文献を踏まえると、BMP シグナリングの低下だけではなく、BMP シグナリングの亢進によって起こる BMP および TGF- β シグナリング間の不均衡も、PAH を発症させる可能性が考えられる。

第 5 節 小括

特発性肺動脈性肺高血圧症のあらたな疾患原因遺伝子候補として、*BMPR1B* を同定した。今回同定した 2 種類の *BMPR1B* 変異のうち F392L 変異はウエスタンブロッティングおよびルシフェラーゼアッセイの両方で BMP シグナリングの亢進を示した。これは PAH の発症機序には BMP シグナリングの低下のみならず、その亢進も関与する可能性を示唆しており、治療戦略としての TGF- β /BMP 伝達経路への介入を考える上で非常に重要である。

第3章 特発性肺動脈性肺高血圧症における *NOTCH3* 遺伝子変異の同定と機能解析

第1節 背景

近年 PAH の疾患原因遺伝子が次々と同定されてきているなか、我々も新規の疾患原因遺伝子候補として *BMPR1B* 遺伝子を同定した⁴¹⁾。しかし、大多数の PAH 患者では依然として原因遺伝子が同定されていない。

2009 年に PAH 患者の肺小動脈平滑筋細胞において *NOTCH3* タンパクが過剰発現していること、さらに PAH 患者およびマウス・ラット PAH モデルにおいて、肺における *NOTCH3* タンパクの量が PAH の重症度と関連していることが報告された¹⁷⁾。そこで我々は、*NOTCH3* およびそのターゲット遺伝子である *HES1*・*HES5* の遺伝子変異の検索を試みることにした。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

東京女子医科大学倫理委員会の承認を得た上で、原因遺伝子変異の検索を依頼された 74 名（発症時年齢 12.3 ± 11.3 歳）の PAH 患者から、依頼時に本人または保護者から文書で同意を得て末梢血全血 5-10ml を採取した。小児患者の場合は疾患の治療に必要な血液検査を施行した際の残余検体を利用した。なお、この 74 症例の一部は先行研究の対象にも含まれている^{12, 34, 41)}。この末梢血から genomic DNA を抽出し、この時点における既知の疾患原因遺伝子である *BMPR2*、*ALK1*、*SMAD1/4/8*、*BMPR1B* および *Caveolin-1* 遺伝子について直接シーケンス法および MLPA 法で変異の有無を検索し、これらの遺伝子の変異を持たない 41 名（発症時年齢 11.9 ± 12.5 歳）を今回の研究の対象とした（図 6）。

(2) 遺伝子変異の検索

対象者の genomic DNA について *NOTCH3* およびそのターゲット遺伝子である *HES1*、*HES5* の 3 種類の遺伝子の変異の有無を ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて直接シーケンス法で検索した。新規の遺伝子変異が同定された場合には、健常者コントロール 470 例の genomic DNA においてその変異がないことを確認した。そのうち 170 例については、東京女子医科大学倫理委員会の承認を得た上で、心血管疾患を含む重篤な疾患がないことが確認されている健常者から同意を得て採取した。ただし、小児の健常者コントロールについては、保護者から同意を得た上で、他疾患の治療に必要な血液検査を受けた際の残余検体を利用した。残りの 300 例については、Genomic DNA - Human Adult Normal Tissue: Peripheral Blood Leukocyte, from a single donor (BioChain) を使用した。

(3) プラスミドおよび抗体の準備

国立長寿医療センター研究所 血管性認知症研究部から譲渡されたヒト pcDNA4/T0-NOTCH3、ウサギポリクローナル抗ヒト NOTCH3 抗体 (AbN2)、モノクローナル NOTCH3 抗体 (3A2)、および京都大学 影山研究室から譲渡された pHes5-luc を使用した。pcDNA4/T0-NOTCH3 については site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて目的の変異体を作製した。なお AbN2 および 3A2 については特異的に NOTCH3 タンパクを認識できることが既に報告されている⁴²⁾。

(4) 安定細胞株の樹立

NOTCH3 を血管平滑筋細胞に強制発現した場合、2 日以内に細胞死するために機能解析が困難であることが既に知られている⁴²⁾。このため、HEK293 細胞およびテトラサイクリンによる発現調整システムを利用して、NOTCH3 野生型および変異型の安定細胞株を樹立した。具体的には T-REx 293 cells (Invitrogen) に pcDNA4/T0-NOTCH3 野生型または変異型を Lipofectamine2000 reagent (Invitrogen) を用いて導入し、その後 Zeocin (100 µg/ml) および Blasticidin-S (5 µg/ml) を含む高糖度 DMEM/10%FBS 液体培地で培養することにより、プラスミドが確実に導入された細胞のみを選別した。この細胞をテトラサイクリン (2 µg/ml) を含む高糖度 DMEM/10%FBS 液体培地で 24 時間培養して NOTCH3 を発現させた後、ウェスタンブロッティング法により NOTCH3 タンパクの発現量を確認した。発現量が高い株を野生型と変異型のそれぞれで 3 株以上抽出し、Zeocin (5 µg/ml)、Blasticidin-S (5 µg/ml) を含む高糖度 DMEM/10%FBS 液体培地で培養を継続した。

(5) ウェスタンブロッティングと共免疫沈降

強制発現させた NOTCH3 を活性化させるために、一部の安定発現株については、あらかじめ抗 Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) と 20 時間かけて結合させたヒト Jagged-1 Fc (R&D Systems) を加えて 4 時間培養した。その後細胞を溶解してタンパクを抽出し、SDS-PAGE を行った。ゲルからタンパクを PVDF 膜へとセミドライ式の転写装置を用いて転写した。1%BSA でブロッキングを行い、抗 NOTCH3 抗体 (AbN2)、抗 Calnexin 抗体、抗 ERp 抗体、抗 GRP78/BiP 抗体、抗 β -actin 抗体をそれぞれの目的に応じて 1 次抗体として室温で 1 時間 PVDF 膜と反応させた。その後 PVDF 膜を洗浄し、それぞれ 1 次抗体に対応した HRP 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。反応後洗浄し、化学発光法を利用して目的タンパク質を検出した。一部の細胞溶解液 (タンパク 200 µg 分) については Dynabeads Protein G (Invitrogen) および抗 NOTCH3 抗体 (AbN2) と一緒に反応させて免疫沈降を行った後、ウェスタンブロッティングによる解析を行った。

(6) 免疫染色

それぞれの安定細胞株をポリ-L-リジンでコーティングされたカバーガラス上で培養し、4%パラフォルムアルデヒドで 15 分間固定した。固定後洗浄し、3%BSA でブロッキングを行った。その後、抗 NOTCH3 抗体 (AbN2) および抗 GRP78/BiP 抗体と室温で 1 時

間反応させた。1次抗体反応後、カバーガラスを洗浄し、抗ウサギ Alexa Fluor 568 抗体、抗マウス Alexa Fluor 488 抗体と反応させた。最後に Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) で標本として、LSM 5 PASCAL Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss) を用いて観察し、記録した。

(7) 細胞増殖率の比較と細胞生存性の評価

それぞれの安定細胞株 (2×10^4 個/well) を 24 well plate でテトラサイクリン (2 μ g/mL) を加えた場合と加えない場合の両方の条件下で培養した。開始時、1日目、3日目、5日目に細胞を回収してトリパンブルー染色を利用して細胞数を測定した。さらに WST-1 reagent (Roche) を用いて、テトラゾリウム塩が生細胞中ミトコンドリア脱水素酵素によってホルマザン色素へ変換されることを利用して定量的に細胞生存能力を評価した。

(8) ルシフェラーゼアッセイ

Lipofectamine2000 reagent を用いて pHes5-Luc プラスミドと野生型または変異型の pcDNA4/T0-NOTCH3 あるいは空の pcDNA4/T0 ベクターを T-REx293 細胞に導入した。そのうちの一部については抗 Fc 抗体を結合させた Jagged-1 Fc を加えて 4 時間培養した。遺伝子導入から 32 時間後に全ての細胞を回収し、Dual luciferase reporter assay (Promega) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。結果はホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の比で表した。

(9) 統計学的解析

本研究において計測値を示す場合には、平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。全ての統計学的解析には SAS version 9.3 (SAS Institute) を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差があるとみなした。

第3節 結果

41 名の IPAH 患者において *NOTCH3*、*HES1*、*HES5* の各遺伝子の変異を検索した結果、2 名の患者において *NOTCH3* 遺伝子のミスセンス変異を検出した (c. 2519 G>A p. G840E、c. 2698 A>C p. T900P。図 7)。樹立した野生型 NOTCH3 および変異型 G840E、T900P の安定細胞株を利用して機能解析を行った結果、共免疫沈降後のウェスタンブロッティングでは、野生型 NOTCH3 がシャペロンの一つである GRP78/BiP と強く結合していたのに対し、2 種類の変異型と GRP78/BiP との結合は軽度であった (図 8)。次に、免疫染色で NOTCH3 タンパクと GRP78/BiP タンパクの局在を調べたところ、野生型 NOTCH3 が導入された細胞では NOTCH3 タンパクと共に小胞体内に存在していたのに対し、変異型が導入された細胞では、GRP78/BiP は核内に移行していた。さらに変異型 NOTCH3 が導入された細胞では NOTCH3 タンパクは野生型導入細胞のそれよりも迅速に分解された (図 9)。

また、各安定細胞株の細胞増殖能および細胞生存性を検討したところ、変異型は野生

型よりも細胞増殖および細胞生存能力を亢進させることが明らかになった（図 10）。さらに Jagged-1 による刺激にも関わらず、変異型 NOTCH3 はいずれも NOTCH3-HES5 シグナリングを亢進しないことがルシフェラーゼアッセイの結果から示された（図 11）。

第 4 節 考察

NOTCH3 は 1 回膜貫通型の膜タンパク質であり、近接する細胞上に発現している Jagged-1、Jagged-2、Delta ファミリーなどのリガンドにより活性化され、その細胞内領域が切り離されて核内へと移行し、*HES1*、*HES5* などのターゲット遺伝子の転写を促進する^{43, 44)}。

今回 NOTCH3 との関係性を調べた GRP78/BiP は熱ショックタンパク質の一つで、小胞体内の主要なシャペロンとされており、小胞体のストレス応答や、カルシウム結合、各タンパクの折りたたみや集合などに関わるとされている⁴⁵⁾。さらに外的ストレスが小胞体に過剰にかかった場合、GRP78/BiP が核内で観察されることが報告されている^{46, 47)}。免疫染色の結果とあわせて考えると、変異型の NOTCH3 タンパクは過度の小胞体ストレスを引き起こし、GRP78/BiP の核内への移動をもたらしたのではないかと推察される。

NOTCH3 変異型が発現している細胞では、野生型が発現している細胞よりも細胞増殖および細胞生存能力が高く、死細胞の増加や形態異常は特に認められなかった。このことから、正常の NOTCH3 タンパクが存在しない状況では細胞増殖能が上昇する可能性が示唆された。しかし、この結果は Li らの先行論文¹⁷⁾とは逆の結果であった。この原因として変異のタイプ、研究に使用した細胞や種の相違が考えられる。NOTCH3 の機能は当初考えられていた以上に複雑である可能性があり、さらなる検討が必要である。

また、ルシフェラーゼアッセイの結果から、今回同定された *NOTCH3* 変異体は NOTCH3-HES5 シグナル活性の低下をもたらすことが明らかとなった。文献報告によると、*NOTCH3* 変異体はその変異部位によって、機能亢進をもたらすもの、リガンド結合を阻害するもの、特にシグナル活性に影響を与えないものとさまざまである⁴⁸⁻⁵¹⁾。今回同定された 2 種類の *NOTCH3* 変異はいずれもこれまでに報告されたことがなく、変異部位を含むエクソン 16・エクソン 17 における変異自体の報告がない。この点についてもさらなる検討が必要と考えられる。

第 5 節 小括

特発性肺動脈性肺高血圧症のあらたな疾患原因遺伝子候補として、*NOTCH3* を同定した。同定された 2 種類の *NOTCH3* 変異はいずれも細胞増殖能および細胞生存能の亢進をもたらした。PAH では、肺動脈平滑筋細胞が異常増殖して肺血管抵抗が増加し、右心不全をもたらすことが判明しており、この候補遺伝子の変異がその機序に関与する可能性が示唆された。

第4章 小児期発症 特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症における遺伝子変異と臨床像

第1節 背景

PAHの疾患原因遺伝子として *BMPR2* 遺伝子、*ALK1* 遺伝子、*SMAD8* 遺伝子などが同定されているものの、PAHにおける遺伝子変異と臨床像に関する報告は少なく¹⁸⁻²⁰⁾、小児期発症PAHに限定した報告は皆無である。そこで、小児期に発症したPAH症例について、遺伝子変異の有無と臨床像の関係を明らかにすることとした。

第2節 対象および方法

東京女子医科大学循環器小児科に遺伝子変異検索の依頼があった小児期発症 PAH 57 症例（発症時年齢 8.5 ± 3.9 歳）について、同大学倫理委員会の承認を得た上で本人または保護者から文書で同意を得て末梢血全血 5-10ml を採取した。小児患者の場合は疾患の治療に必要な血液検査を施行した際の残余検体を利用した。なお、この 57 症例の一部は先行研究の対象にも含まれている^{12, 34, 41, 52)}。この検体から genomic DNA を抽出し、まずは直接シーケンス法で *BMPR2/ALK1* 遺伝子変異を検索したところ、*BMPR2* 変異例を 14 例、*ALK1* 変異例を 7 例認めた。さらに *BMPR2/ALK1/ENG* の大規模欠失・重複を検索するために MLPA 法を施行したところ *BMPR2* 遺伝子のエクソン単位での欠失を 4 例で認めた。18 症例の *BMPR2* 変異群、7 症例の *ALK1* 変異群、先に述べた BMP シグナル伝達経路内の遺伝子変異を認めない 29 症例（以下非変異群）の 3 群において、遺伝子変異検索依頼時の診療録などを参考に臨床像を検討した（図 12）。なお、*BMPR2* 遺伝子および *ALK1* 遺伝子において、新規部位の変異が同定された場合には、健常者コントロール 200 例の genomic DNA においてその変異がないことを確認した。そのうち 150 例については東京女子医科大学倫理委員会の承認を得た上で、心血管疾患を含む重篤な疾患がないことが確認されている健常者から同意を得て採取した。ただし、小児の健常者コントロールについては、保護者から同意を得た上で、他疾患の治療に必要な血液検査を受けた際の残余検体を利用した。残りの 50 例については Genomic DNA - Human Adult Normal Tissue: Peripheral Blood Leukocyte、from a single donor (BioChain) を使用した。

本研究において計測値を示す場合には、平均値±標準偏差もしくは中央値（四分位範囲）で表した。全ての統計学的解析には SAS version 9.3 (SAS Institute) を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差があるとみなした。

第3節 結果

男女比、発症時年齢、BNP 値、6 分間歩行距離については 3 群間で有意差は認めなかった。ただし、*ALK1* 変異群で PAH の家族歴が多い傾向がみられた（表 1）。次に血行動態的指標の比較を行ったが、これについても 3 群間で有意差は認めなかった（表 2）。

さらに、治療方法の変遷によるバイアスの有無を確認するため、各群の最新の治療内容を比較したが、3群間で治療内容に有意差は認められなかった（表3）。

続いて、それぞれの治療開始後に New York Heart Association 心機能分類（NYHA class）が改善したかどうかについて検討した。治療内容の検討が可能であった30症例全体では、エポプロステノール持続静注が突出して奏功しており、在宅酸素療法、シルデナフィル・タダラフィルも比較的奏功していた。*ALK1* 変異群については評価可能であった症例が少なく、有意差はないものの、エポプロステノール持続静注以外の治療が効きにくい印象が得られた。*BMP2* 変異群と非変異群については、全体と同様の傾向がみられた。いずれの治療法についても3群間で効果に有意な差は認められなかった（図13）。

最後に各群の転帰を比較した。その結果、*ALK1* 変異群では7症例中2症例、*BMP2* 変異群では18症例中8症例、非変異群では29症例中3症例が死亡していた。死亡数を人年で割って算出した Rate of death は *BMP2* 変異群で有意に高値であった（表4）。次に、Kaplan-Meier の生存曲線で全体の転帰を確認した。5年生存率は76%、10年生存率は72%であった（図14）。*ALK1* 変異群、*BMP2* 変異群、非変異群の3群に分けて施行した log-rank 検定では、非変異群では5年生存率、10年生存率ともに90%であったのに対して、*BMP2* 変異群では55%、37%と明らかに予後は不良であった（図15 log-rank test $p=0.0005$ ）。死亡をエンドポイントとして Cox の比例ハザードモデルで計算したところ、*BMP2* 変異群は非変異群と比較したイベント発生リスクが12倍以上と非常に高値であった（表5 $p=0.0003$ ）。また、有意差はないものの *ALK1* 変異群もイベント発生リスクが非変異群の約5倍と予後不良な傾向にあることが示唆された（表5 $p=0.1205$ ）。さらに性別の影響を検討したところ、男性におけるイベント発生リスクが女性の約2.6倍と有意差は認められなかったものの、比較的高めであった（表5 $p=0.0869$ ）。

なお、本研究を通じ、これまでに報告されたことのない部位における *BMP2* 変異5症例（c.38 G>A, W13X、c.248-3 T>G、c.529+2 T>C、c.727 G>C, E243Q、c.2289 del C、T762fsX9）と *ALK1* 変異2症例（c.854 T>C, L285P、c.1433 C>A, A478D）を同定した。

第4節 考察

今回の検討から、小児期発症 PAH において *BMP2* 変異群は *ALK1* 変異群および非変異群と比較して有意に予後不良であり、*ALK1* 変異群も非変異群と比較すると予後不良な傾向があることが明らかとなった。

2010年に Girerd らが行った全世代の PAH 症例の遺伝子変異と転帰に関する meta-analysis によると、*ALK1* 変異群が *BMP2* 変異群および非変異群と比較して予後不良であった。この結果は我々の検討結果とは異なる¹⁸⁾。さらにこのグループは *BMP2* 変異群と非変異群では予後に差はなかったことも報告している¹⁹⁾。これに対して Sztrymf らは *BMP2* 変異群と非変異群を比較し、診断から死亡までの期間または肺移植までの期間は *BMP2* 変異群で有意に短いと報告している²⁰⁾。

それぞれの研究結果の乖離の原因を確定することは困難であるが、今回の研究は小児期発症例のみに限定して検討したため、*BMPR2*変異群における PAH 進行が非常に速く予後が不良なために成人に至る例が少なく、全世代の検討には含まれにくくなっている可能性が考えられる。また、緒言で述べたような、小児期発症例と成人期発症例における PAH の発症メカニズムの相違が予後の違いに影響している可能性も考えられる²¹⁻²⁴⁾。

今回の検討結果からは、*BMPR2* 変異群および *ALK1* 変異群については早期のエポプロステノール持続静注の導入や肺移植を含めた、より積極的な治療の選択を検討する必要があると考えられる。また、症例数は少ないものの、*ALK1* 変異群についてはエポプロステノール持続静注以外の治療はあまり有効ではない可能性があり、現在の状態から予測されるよりもさらに踏み込んだ治療を考慮する必要性が示唆された。

第5節 小括

小児期発症 PAH において *BMPR2* 変異群は *ALK1* 変異群および非変異群と比較して有意に予後不良であり、*ALK1* 変異群も非変異群と比較すると予後不良な傾向があることが示唆された。*BMPR2* 変異群および *ALK1* 変異群については肺移植を含めた、より積極的な治療の選択を検討することが重要であると考えられる。

第1節 背景

PAH患者の診療における問題点として、その重症度および予後予測が困難であることがあげられる。特に小児においては各種検査時の鎮静の必要性などのために、しばしば重症度の推定が困難となる。BNP および NT-proBNP は小児・成人に関わらず PAH における有用なバイオマーカーとして臨床の場でも利用されているが²⁵⁻²⁸⁾、予後や肺移植の必要性を予測するには感度が低いことが指摘されている²⁷⁾。

近年、マトリックスメタロプロテナーゼ2 (matrix metalloproteinase 2、MMP-2)、テネイシンC (tenascin-C、TNC)、ペントラキシン3 (pentraxin 3、PTX3)、アンギオポエチン2 (angiopoietin-2、Ang-2)、可溶性ST2 (soluble ST2、sST2) などがPAHの新しいバイオマーカー候補として報告されているが²⁹⁻³³⁾、これらの候補の有用性は不明瞭であり、実際の臨床現場には普及していない。そこで、小児PAHの重症度および予後予測に真に有用なバイオマーカーの探索を試みることにした。PAHによってもたらされる右心不全や血管発生、細胞増殖などのメカニズム、そして先行研究を考慮した上で10項目の指標を測定し、臨床像と後方視的に照合することでその有用性を評価することとした。

第2節 対象および方法

東京女子医科大学循環器小児科に遺伝子検索依頼があった小児期発症 PAH59 症例(発症時年齢 8.4 ± 4.0 歳、採血時年齢 11.3 ± 6.0 歳)について、同大学倫理委員会の承認を得た上で、本人または保護者から文書で同意を得て末梢血全血 5-10ml を採取した。小児患者の場合は疾患の治療に必要な血液検査を施行した際の残余検体を利用した。なお、この 59 症例の一部は先行研究の対象にも含まれている^{12, 34, 41, 52, 53)}。この末梢血から genomic DNA を抽出し、遺伝子検査に使用した。その後、高感度トロポニン T (high-sensitive troponin T、hsTnT)、ヒト脂肪酸結合タンパク (human fatty acid-binding protein、H-FABP)、NT-proBNP、PTX3、sST2、Ang-2、MMP-2、TNC、エンドスタチン (endostatin、ES)、チミジンキナーゼ (thymidine kinase、TK) の 10 項目をバイオマーカー候補として選び出し、新たに東京女子医科大学倫理委員会に追加申請・承認を受けた上で、DNA 抽出時に生じる残余検体である血漿成分を用いて各項目を測定し、臨床像と後方視的に照合することでその有用性を評価した。

PTX3、sST2、Ang-2、TNC および ES についてはそれぞれ sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いて測定した (PTX3 ; Aviscera Bioscience、sST2・Ang-2・ES ; R&D Systems、TNC ; IBL)。NT-proBNP および H-FABP (電気化学発光免疫測定法)、hsTnT (ラテックス凝集法)、TK (放射酵素測定法)、MMP-2 (ELISA 法) については三菱化学メディエンスに測定を依頼した。全てのバイオマーカーは、各測定者が各症例の臨床情報から遮蔽された状態で測定された。

本研究において計測値を示す場合には、平均値±標準偏差もしくは中央値（四分位範囲）で表した。全ての統計学的解析には SAS version 9.3 (SAS Institute)を使用し、 $p<0.05$ を統計学的有意差があるとみなした。

第3節 結果

今回対象とした小児期発症 PAH 59 症例のうち 11 症例が検体採取後に死亡しており、その原因は全て PAH によるものであった（表 6）。生存群と死亡群を比較して、発症時年齢、性別、家族歴、血行動態、最近の治療内容には有意差はみられなかった。生存群・死亡群における各バイオマーカーの測定値を表 7 に示した。t 検定では 10 項目中 8 項目、Wilcoxon 検定では 5 項目の測定値が、生存群と比較して死亡群において有意に高値であった。

まずは、この 10 項目のバイオマーカー候補の測定値と検体採取時の NYHA class を比較した（図 16）。NT-proBNP、sST2、Ang-2、ES の 4 項目の測定値は NYHA class の悪化に応じて有意に上昇していた。

次に、receiver operating curve (ROC) 曲線下の下部領域（area under the curve、AUC）を比較したところ、sST2、Ang-2、ES については各々の測定値と予後が有意に関連していた（表 8）。さらに sST2 の AUC は 0.830 と 10 項目中で最大であった。NT-proBNP の AUC も 0.796 と比較的大きかったものの、統計学的には有意ではなかった。

ROC 解析で得られた NT-proBNP と sST2 のカットオフ値（それぞれ 537 pg/ml、11.1 ng/ml）を用いて Kaplan-Meier の生存曲線を作成し、予後との関係を検討した。NT-proBNP 値および sST2 値はそれぞれ単独で、予後と有意に関連していた（図 17 log-rank test NT-proBNP: $p=0.004$, sST2: $p<0.0001$ ）。さらに両項目ともにカットオフ値以上である群と、それ以外の群の 2 群に分けて検討したところ、前者の予後が有意に不良であることが明らかとなった（図 17 log-rank test $p<0.0001$ ）。

死亡をエンドポイントとして Cox の比例ハザードモデルで計算したところ、NT-proBNP と sST2 はそれぞれ単独で予後に強く関与していることがわかった（表 9 NT-proBNP: リスク比 10.9、95%信頼区間: 1.4-85.3、 $p=0.023$; sST2: リスク比 24.6、95%信頼区間: 3.1-192.9、 $p=0.002$ ）。さらに、この 2 項目の両方が上昇している場合も、不良な予後と有意に関連していることが明らかとなった（表 9 リスク比 14.4、95%信頼区間: 3.1-66.7; $p=0.001$ ）。

さらに我々は、NT-proBNP が高値である PAH 患者群において、sST2 値が予後に影響するかどうかを検討した。最初に NT-proBNP と sST2 のカットオフ値を用いて、PAH 59 症例を 4 群に分割した（表 10）。その結果、両項目とも高値であった群では 17 症例中 9 症例が死亡していた。次に、Cox の比例ハザードモデルで検討したところ、NT-proBNP が高値である PAH 患者群において、sST2 の高値が不良な予後と有意に関連していた（表 11 リスク比 8.9、95% 信頼区間: 1.1-70.4、 $p=0.0387$ ）。

第4節 考察

今回の研究で我々は10項目のバイオマーカー候補について検討し、NT-proBNPとsST2の同時測定が、現在の重症度予測および予後の推定に有用であることをはじめて示した。

ST2はインターロイキン1受容体の一つであり、可溶成分(soluble ST2、sST2)と膜貫通成分とに分けられる^{54,55)}。ST2は心臓へのストレスのバイオマーカーの一つとして認識されており、心筋が引き延ばされると心筋細胞内のST2遺伝子の発現が増加することが報告されている⁵⁶⁾。さらに、ST2のリガンドであるインターロイキン33(interleukin 33、IL-33)についても、心筋細胞が引き延ばされることでその産生が増加することが分かっている⁵⁷⁾。また、野生型マウスおよびST2ノックアウトマウスを用いて心筋梗塞モデルを作製した場合、前者においてIL-33は心室の拡大を抑えて収縮能を向上させるが、後者ではこのような現象がみられないことも報告されている⁵⁸⁾。

2003年にWeinbergらがsST2を心不全のバイオマーカーとして有用であると報告して以降⁵⁹⁾、sST2が急性心不全、慢性心不全、ST上昇型心筋梗塞、そして右心不全のバイオマーカーとしても有用であるとの報告が相次いだ⁶⁰⁻⁶⁴⁾。さらにSatoらは川崎病の急性期においてもsST2が上昇しており、それが心筋の弛緩障害と関連していると報告した⁶⁵⁾。この研究対象となった症例の年齢の中央値は2.8歳であったことから、成人だけではなく小児の心筋障害の評価にもsST2が有用である可能性を示唆している。

2013年にCarlomagnoらがPAH患者でsST2値が上昇していること、さらにsST2値が右室の拡張と収縮障害の重症度を反映していることをはじめて報告した³³⁾。しかし、この論文ではsST2と予後の関連には言及しておらず、sST2が他のバイオマーカー候補よりも有用なのかどうかについても不明のままであった。そこで我々は今回、他のバイオマーカー候補と比較した上でsST2が理想的なバイオマーカーであるのかどうかを検討した。その結果、ROC解析ではsST2値は予後と統計学的に非常に密接な関連を示し、sST2値上昇は不良な予後の指標となっていた。さらにNT-proBNP値とsST2値の両者の上昇は小児期発症PAHの予後予測に非常に有用であった。

PAHにおけるsST2の役割はまだ推測の段階であるが、PAHが惹起する右室圧上昇に対して心筋細胞が線維化していく反応と関連するのではないかと考えられる。加えて、肺動脈とsST2上昇の関係もまだはっきりしていない。しかし、Willemsらが末梢血管の手術や動脈バイパス術、大腿動脈内膜剥離術を受けた患者において24時間後にsST2値が明らかに上昇したことを報告していることから⁶⁶⁾、sST2値の上昇は右心不全のみならず、動脈へのダメージとも関係している可能性が示唆される。さらに、ST2のリガンドであるIL-33のmRNAがヒトの肺動脈平滑筋細胞で比較的多量に発現しているとの報告もあり⁶⁷⁾、sST2とPAHのメカニズムとの関連を考える上で重要な知見といえる。しかしながら、sST2値とPAHにおける肺動脈病変の関係についてはまだ十分には明らかになっていない。これを解明するため、今後さらなる研究が必要である。

第5節 小括

sST2 と NT-proBNP の同時測定は、小児期発症 PAH の重症度および予後を予測するための有用なバイオマーカーになることを明らかにした。

第6章 考察

近年、BMP シグナル伝達経路が血管平滑筋細胞の増殖に強く関与することが明らかに
なり^{12, 37, 38)}、PAH の原因遺伝子解明、機能解析などにより病態解明が進んでいる。さら
に BMP シグナリングと NOTCH は相互に作用していることが知られるようになった (図
18)。

そこで我々は *BMPR1B* と *NOTCH3* に着目し、PAH 患者の一部でこれらの遺伝子変異を同
定した。さらにそれらの変異が機能的に異常をきたすことを新たに解明し、新規の PAH
原因候補遺伝子であると判断した。

今回、PAH の原因候補遺伝子の一つとして同定した *NOTCH3* は BMP シグナル伝達経路
外に存在しており、直接そのシグナル伝達が肺動脈平滑筋細胞の増殖に関与するかどうか
は不明である。しかし近年、BMP シグナリングと NOTCH シグナリングのクロストーク
に関する報告が相次いでいる (図 18)。BMP シグナル伝達経路が活性化すると、同経路
内の SMAD1 が NOTCH 細胞内ドメインを介して、NOTCH のターゲット遺伝子である *HRT1*
などの転写を促進する⁶⁸⁻⁷⁰⁾。逆に *HRT1* は BMP シグナル伝達経路の下流のエフェクター
である Id1 の阻害物質に結合して、その分解を惹起する⁷¹⁾。

したがって、肺動脈における NOTCH3 の役割を明らかにすることで PAH の発症メカニ
ズムの理解がより深まると考えられる。

また、小児期発症 PAH における遺伝子変異と臨床像との関係を検討し、*BMPR2* 遺伝子
変異群が最も予後が悪く、*ALK1* 遺伝子変異群も比較的予後不良な傾向にあることを示
した。今回同定した *BMPR1B* 遺伝子変異および *NOTCH3* 遺伝子変異についても、今後さら
に検索を重ねて症例数を増やし、臨床像との関連を検討する必要がある。

本研究で小児期発症 PAH における有用なバイオマーカーとして同定した sST2 と PAH
の病態との関連についてはまだ不明な点が多いが、IL-33/sST2 シグナル伝達経路の下
流のターゲットである MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase、MAPK) は肺
動脈平滑筋細胞の増殖に直接関与することが知られている^{72, 73)}。さらにヒト臍帯静脈内
皮細胞において、NOTCH シグナリングを阻害する作用を持つ γ -セクレターゼ阻害剤が
ST2 のリガンドである IL-33 の発現を抑制すること、そして NOTCH シグナリングのリガ
ンドである Jagged-1、Jagged-2 などをヒト臍帯静脈内皮細胞に投与すると IL-33 の発
現が促進されることが報告されている⁷⁴⁾。加えて BMP シグナリングは SMAD を介して
MAPK シグナリングを活性化させ、また、*BMPR2* の発現低下は TGF- β 関連キナーゼ 1 の
発現とリン酸化の亢進を通じて、SMAD 非依存的に MAPK シグナリングの活性化をもたら
すことがわかっている⁷²⁾。

これらの報告を踏まえると、ST2 は NOTCH シグナル伝達経路と BMP シグナル伝達経路
の両者からその発現をコントロールされている可能性がある (図 18)。したがって、本

研究でバイオマーカーとして同定した ST2 は、PAH の発症メカニズムにも密接に関与している可能性がある。そのため、今後は *ST2* ノックアウトマウスと野生型マウスの肺動脈平滑筋細胞の増殖能を比較するなど、遺伝学的側面からのアプローチも含めてさらなる検討が必要と考えられる。

第7章 結論

PAHの原因遺伝子候補として、2症例において *BMPRI1B* 遺伝子の変異 (S160N、F392L) を同定した。そして、これらの変異が PAH の病態に深く関わり、従来から考えられている BMP シグナリングを亢進させることを明らかにした。

また、PAH の2症例において *NOTCH3* 遺伝子の変異 (G840E、T900P) を同定した。これらの変異は、細胞増殖能および細胞生存性を亢進させ、同疾患の病態に深く関与する肺動脈平滑筋細胞の増殖に関連する可能性を示した。

さらに、小児期発症 PAH における遺伝子変異と臨床像の関係を検討した結果、*BMPR2* 遺伝子変異群は最も予後が悪く、*ALK1* 遺伝子変異群も非変異群より予後不良な傾向にあることを明らかにした。*BMPR2* および *ALK1* 遺伝子変異を持つ患者については、より積極的な治療を考慮する必要がある。

最後に、小児期発症 PAH においてバイオマーカーの同定を試みたところ、sST2 と NT-proBNP の同時測定が、重症度および予後を予測するために有用であることを明らかにした。

謝 辞

本研究を行うにあたり、研究全般にわたって御指導御鞭撻を賜りました防衛医科大学校小児科学講座 野々山恵章教授に謹んで感謝申し上げます。また、多大なるご指導を賜りました先生方、そして検体採取に御同意くださいました患者およびその保護者の方々に心より感謝いたします。

防衛医科大学校 小児科学講座

畠井芳穂先生

石渡隆寛先生

川村陽一先生

防衛医科大学校 衛生学公衆衛生学
講座

佐藤弘樹先生

東京女子医科大学 循環器小児科

中西敏雄先生

稲井慶先生

古谷喜幸先生

新谷正樹先生

羽山恵美子先生

東京女子医科大学

国際統合医科学インスティテュート

松岡瑠美子先生

今村伸一郎先生

八木寿人先生

松下愉久先生

東邦大学大森病院 小児科

佐地勉先生

中山智孝先生

藤原摩耶先生

小島泰子先生

北海道立子ども総合医療・療育
センター 循環器科 横澤正人先生

岩手県立北上病院 小児科

小野寺典夫先生

筑波大学 小児科 堀米仁志先生

群馬県立小児医療センター

循環器科 小林富男先生

慶応義塾大学 小児科 福島裕之先生

東京医科歯科大学 小児科

土井庄三郎先生

西山光則先生

静岡県立こども病院

循環器科 小野安生先生

長野県立こども病院

循環器科 安河内聰先生

富山大学 小児科 市田蒨子先生

京都第二赤十字病院

小児科 藤本一途先生

岡山大学 小児科 大月審一先生

栄徳隆裕先生

長崎医療センター

小児科 手島秀剛先生

大分大学 小児科 川野達也先生

鹿児島大学 小児科 野村裕一先生

Department of Pediatric Cardiology,
Anzhen Hospital, Beijing

Dr. Hong Gu

引用文献

1. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D42-50.
2. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
3. Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 1998;352:719-725.
4. D'Alonzo GG, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a natural prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991;115:343-349.
5. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(1 Suppl.):S43-54.
6. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1 Suppl.):S32-S42.
7. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, et al. Familial primary Pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:737-744.
8. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, Loyd JE, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension: the International PPH Consortium. *Nat Genet*. 2000;26:81-84.
9. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, et al. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2003.40:865-871.
10. Harrison RE, Berger R, Haworth SG, Tulloh R, Mache CJ, Morrell NW, et al. Transforming growth factor-beta, receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation*. 2005;111:435-441.
11. Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, et al. Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2012;32:1385-1389.
12. Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, and Matsuoka R. A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2009;46:331-337.
13. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, et al.

- Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2001;345:325-334.
14. **Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, et al.** Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5:336-343.
 15. **Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, et al.** Mutations of the TGF Beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat.* 2006;27:121-132.
 16. **Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, et al.** High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:590-598.
 17. **Li X, Zhang X, Leathers R, Makino A, Huang C, Parsa P, et al.** Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 2009;15:1289-1297.
 18. **Girerd B, Montani D, Coulet F, Sztrymf B, Yaici A, Jaïs X, et al.** Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1(ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:851-861.
 19. **Girerd B, Montani D, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Coulet F, et al.** Absence of influence of gender and BMPR2 mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 2010;11:73.
 20. **Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, et al.** Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1377-1383.
 21. **Runo JR, Loyd JE.** Primary pulmonary hypertension. *Lancet.* 2003;361:1533-1544.
 22. **Barst RJ.** Primary pulmonary hypertension in children in primary pulmonary hypertension. In: Rubin LJ, Rich S, eds. *Lung Biology in Health and Disease.* 99th ed. New York: Dekker, 1997:179-225.
 23. **Hansmann G, Hoeper MM.** Registries for paediatric pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2013;42(3):580-583.
 24. **Barst RJ, Maislin G, Fishman AP.** Vasodilator therapy for primary pulmonary hypertension in children. *Circulation.* 1999;99:1197-1208.
 25. **Van Albada ME, Loot FG, Fokkema R, Roofthoof MT, Berger RM.** Biological serum markers in the management of pediatric pulmonary arterial hypertension. *Pediatr Res.* 2008;63:321-327.
 26. **Bernus A, Wagner BD, Accurso F, Doran A, Kaess H, Ivy DD.** Brain natriuretic peptide levels in managing pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2009;135:745-751.
 27. **Lammers AE, Hislop AA, Haworth SG.** Prognostic value of B-type natriuretic peptide in children with pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* 2009;135:21

28. Takatsuki S, Wagner BD, Ivy DD. B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Congenit Heart Dis.* 2012;7:259-267.
29. Schumann C, Lepper PM, Frank H, Schneiderbauer R, Wibmer T, Kropf C, et al. Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension. *Biomarkers.* 2010;15:523-532.
30. Kumpers P, Nickel N, Lukasz A, Golpon H, Westerkamp V, Olsson KM, et al. Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2010;31:2291-2300.
31. Tamura Y, Ono T, Kuwana M, Inoue K, Takei M, Yamamoto T, et al. Human pentraxin 3 (PTX3) as a novel biomarker for the diagnosis of pulmonary arterial hypertension. *PLoS One.* 2012;7:e45834.
32. Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, et al. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circ J.* 2013;77:447-455.
33. Carlomagno G, Messalli G, Melillo RM, Stanziola AA, Visciano C, Mercurio V, et al. Serum soluble ST2 and interleukin-33 levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol.* 2013;168:1545-1547.
34. Fujiwara M, Yagi H, Matsuoka R, Akimoto K, Furutani M, Imamura S, et al. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMP2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2008;72:127-133.
35. Laurent D, Jean-Jacques F, Sabine B. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(3):203-212.
36. Murakami M, Kawachi H, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M. Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor-beta signaling pathways. *Genes Cells.* 2009;14(4):469-482.
37. Newman JH, Phillips JA 3rd, Loyd JE. Narrative review: the enigma of pulmonary arterial hypertension: new insights from genetic studies. *Ann Intern Med.* 2008;148(4):278-283.
38. Gu Y, Jin P, Zhang L, Zhao X, Gao X, Ning Y, et al. Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-beta receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood.* 2006;107(5):1951-1954.
39. Yu PB, Beppu H, Kawai N, Li E, Bloch KD. Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005;280(26):24443-24450.
40. Takeda M, Otsuka F, Nakamura K, Inagaki K, Suzuki J, Miura D, et al.

- Characterization of the bone morphogenetic protein (BMP) system in human pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from a sporadic case of primary pulmonary hypertension: roles of BMP type 1B receptor (activin receptor-like kinase 6) in the mitotic action. *Endocrinology*. 2004;145(9):4344-4354.
41. Chida A, Shintani M, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Inai K, et al. Missense mutations of the BMPR1B (ALK6) gene in childhood idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2012;76(6):1501-1508.
 42. Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, Kunimoto S, Kalaria RN, Watanabe A. Mutations in NOTCH3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation. *Hum Mol Genet*. 2010;19:79-89.
 43. Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:543-553.
 44. Weber DS. A novel mechanism of vascular smooth muscle cell regulation by Notch: platelet-derived growth factor receptor-beta expression? *Circ Res*. 2008;102:1448-1450.
 45. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*. 2011;434:181-188.
 46. Huang SP, Chen JC, Wu CC, Chen CT, Tang NY, Ho YT, et al. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res*. 2009;29:165-174.
 47. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem*. 2003;278:20915-20924.
 48. Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling pathway. *Am J Hum Genet*. 2004;74:338-347.
 49. Peters N, Opherck C, Zacherle S, Capell A, Gempel P, Dichgans M. CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp Cell Res*. 2004;299:454-464.
 50. Low WC, Santa Y, Takahashi K, Tabira T, Kalaria RN. CADASIL-causing mutations do not alter Notch3 receptor processing and activation. *NeuroReport*. 2006;17:945-949.
 51. Monet-Leprêtre M, Bardot B, Lemaire B, Domenga V, Godin O, Dichgans M, et al. Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the

- Notch3 ligand binding domain. *Brain*. 2009;132:1601-1612.
52. Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, et al. Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol Genet Genomic Med*. 2014;2(3):229-239.
 53. Chida A, Shintani M, Yagi H, Fujiwara M, Kojima Y, Sato H, et al. Outcomes of childhood pulmonary arterial hypertension in BMPR2 and ALK1 mutation carriers. *Am J Cardiol*. 2012;110(4):586-593.
 54. O' Neill L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: A molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans*. 2000;28:557-563.
 55. Sims JE. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:117-122.
 56. Weinberg EO, Shimp M, De Keulenaer GW, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD, et al. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:2961-2966.
 57. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, Coglianese E, McCabe EL, Cheng S, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2012;126:1596-1604.
 58. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhäuser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail*. 2009;2: 684-691.
 59. Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation*. 2003;107:721-726.
 60. Sabatine MS, Morrow DA, Higgins LJ, MacGillivray C, Guo W, Bode C, et al. Complementary roles for biomarkers of biomechanical strain ST2 and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117:1936-1944.
 61. Pascual-Figal DA, Ordonez-Llanos J, Tornel PL, Vazquez R, Puig T, Valdes M, et al. Soluble ST2 for predicting sudden cardiac death in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54:2174-2179.
 62. Manzano-Fernandez S, Mueller T, Pascual-Figal D, Truong QA, Januzzi JL. Usefulness of soluble concentrations of interleukin family member ST2 as predictor of mortality in patients with acutely decompensated heart failure relative to left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol*. 2011;107:259-267.
 63. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernandez S, Boronat M, Casas T, Garrido IP, Bonaque JC, et al. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: Complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011;13:718-725.

64. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RR, Januzzi JL. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acute dyspnea. *Circ Heart Fail.* 2009;2:311-319.
65. Sato YZ, Molkara DP, Daniels LB, Tremoulet AH, Shimizu C, Kanegaye JT, et al. Cardiovascular biomarkers in acute Kawasaki disease. *Int J Cardiol.* 2013;164:58-63.
66. Willems S, Sels JW, Flier S, Versteeg D, Buhre WF, de Kleijn DP, et al. Temporal changes of soluble ST2 after cardiovascular interventions. *Eur J Clin Invest.* 2013;43:113-120.
67. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23:479-490.
68. Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, Falk A, Moliner A, Lendahl U, et al. Cross-talk between the Notch and TGF- β signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol.* 2003;163:723-728.
69. Bai G, Sheng N, Xie Z, Bian W, Yokota Y, Benezra R, et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative auto-regulation of Hes1. *Dev Cell.* 2007;13:283-297.
70. Klüppel M, Wrana JL. Turning it up a notch: cross-talk between TGF β and notch signaling. *Bioessays.* 2005;27:115-118.
71. Itoh F, Itoh S, Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Iso T, Dotto GP, et al. Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *EMBO J.* 2004;23(3):541-551.
72. Nasim MT, Ogo T, Chowdhury HM, Zhao L, Chen CN, Rhodes C, Trembath RC. BMPRII deficiency elicits pro-proliferative and anti-apoptotic responses through the activation of TGF β -TAK1-MAPK pathways in PAH. *Hum Mol Genet.* 2012;21(11):2548-2558.
73. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:827-840.
74. Sundlisaeter E, Edelmann RJ, Hol J, Sponheim J, Küchler AM, Weiss M, et al. The alarmin IL-33 is a notch target in quiescent endothelial cells. *Am J Pathol.* 2012;181(3):1099-1111.
75. Schmierer B, Hill CS. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):970-982.
76. Staal FJ, Langerak AW. Signaling pathways involved in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2008;93(4):493-497.

[アルファベット順]

ALK1 (activin receptor-like kinase 1、1 型アクチビン受容体様キナーゼ)

TGF- β /BMP シグナル伝達経路に属する I 型受容体の一つ。リガンドである BMP と結合することで細胞質の SMAD1/5/8 をリン酸化する。リン酸化された SMAD1/5/8 は SMAD4 とともに核内に移行し、転写調節因子に働きかけて細胞増殖を抑制する。

Ang-2 (angiopoietin-2、アンギオポエチン 2)

血管新生とその成熟に必須の血管成長因子の一つ。Ang-2 は Ang-1 のアンタゴニストであり、血管内皮細胞内で発現している。低酸素状態やヒスタミン刺激などによって分泌が増加する。

BMP (bone morphogenetic protein、骨形成タンパク)

骨形成を誘導するタンパク因子。筋組織内で異所性骨化を誘導するサイトカインとして発見され、その後筋芽細胞の分化成熟の抑制に関わることが明らかになっている。

BMPR (bone morphogenetic protein receptor、骨形成タンパク受容体)

哺乳類では 7 種類の I 型受容体 (ALK1、ALK2、ALK3 [BMPR1A]、ALK4、ALK5、ALK6 [BMPR1B]、ALK7) と 5 種類の II 型受容体 (BMPR2、TGF β R2、ACTR2、ACTR2B、AMHR2) が同定されている。リガンドである BMP がこの I 型受容体・II 型受容体と複合体を形成することで I 型受容体がリン酸化されてキナーゼ活性を有するようになり、細胞内の SMAD をリン酸化することで核内へ情報を伝達することが可能となる。

BNP (brain natriuretic peptide、脳性ナトリウム利尿ペプチド)

心臓、主に心室筋で合成されるホルモン。心筋肥大により分泌が増加する。急性および慢性心不全の診断、重症度評価のためのバイオマーカーとして広く利用されている。

ES (endostatin、エンドスタチン)

XVIII 型コラーゲンの C 末端側フラグメントであり、内皮細胞の増殖・遊走および血管新生を抑制する機能を持つ。

GRP78/BiP (Glucose-regulated protein/binding immunoglobulin protein)

小胞体シャペロンの一つであり、熱ショックタンパク 70 群に属する。タンパク質の折りたたみ、新たに合成されたペプチドの輸送、異常タンパク質の分解に関与する。

HES (hairy and enhancer of split)

抑制型の basic helix-loop-helix 型転写制御因子であり、ヒトでは HES1~7 の 7 種

類が同定されている。NOTCH シグナルを受けた場合には HES1 と HES5 の発現が亢進する。

H-FABP (human fatty acid-binding protein、ヒト脂肪酸結合タンパク)

心筋細胞の細胞質内に存在する可溶性タンパクであり、遊離脂肪酸の細胞内輸送に関与している。超急性期における心筋梗塞および急性冠症候群の診断に利用されている。

hsTnT (high-sensitive troponin T、高感度トロポニン T)

心筋筋原線維タンパクであるトロポニン T は心筋特異性が非常に高いが、心筋梗塞の発症早期には上昇しないという欠点を持つ。高感度トロポニン T は微小心筋傷害を反映して発症早期の心筋梗塞の診断に寄与するため、臨床の場で広く用いられている。

Jagged ファミリー

NOTCH シグナル伝達経路におけるリガンドの一つであり、Jagged-1 と Jagged-2 から成る。NOTCH 受容体と結合して NOTCH 細胞内ドメインを放出させることでシグナル伝達を促進させる。

MMP-2 (matrix metalloproteinase 2、マトリックスメタロプロテナーゼ 2)

亜鉛およびカルシウム依存性の分泌型タンパク質分解酵素の一つ。コラーゲンなどの細胞外マトリックスの分解に関わる他、生体内での血管新生を促進する。

NOTCH シグナル伝達経路

血管、心臓、神経、内分泌系などのさまざまな分化に関係する調節経路。哺乳類では 5 種類のリガンド (Jagged-1、Jagged-2、DLL1、DLL3、DLL4) と 4 種類の受容体 (Notch1 ~4) が発見されている。

NT-proBNP (N-terminal pro brain natriuretic peptide、脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 末端フラグメント)

心筋細胞の伸展刺激などによって分泌される proBNP は BNP と NT-proBNP に切断されて血中に放出される。BNP は半減期が約 20 分で EDTA 加血漿で測定されるのに対して、NT-proBNP は半減期が 60-120 分と長く、血清でも血漿でも測定が可能という違いがある。BNP と同様に、心不全診断および治療効果判定のバイオマーカーとして利用されている。

PAH (pulmonary arterial hypertension、肺動脈性肺高血圧症)

肺動脈内膜・中膜の増殖によって血管内腔が狭窄し、肺血管抵抗が上昇するために PH をきたす疾患群。特発性、遺伝性、薬物性、各種疾患に伴うもの（膠原病、先天性心疾患、肝疾患、後天性免疫不全症候群、住血吸虫症）に分類される。

PH (pulmonary hypertension、肺高血圧症)

様々な原因により肺動脈圧が持続的に上昇した病態であり、右心不全および呼吸不全をもたらす予後不良の難治性疾患。安静時の平均肺動脈圧が 25mmHg 以上である状態と定義される。肺動脈性肺高血圧症、左心性心疾患に伴う肺高血圧症、肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症、慢性血栓性および/または塞栓性疾患による肺高血圧症、その他の肺高血圧症に分類される。

PTX3 (pentraxin 3、ペントラキシン 3)

C-reactive protein、serum amyloid P component などと同様の pentraxin super family に属する急性期反応性タンパク。IL-1 β や TNF- α などの炎症性刺激を受けて血管内皮細胞・血管平滑筋細胞などから産生されるため、血管炎症を特異的に反映すると考えられ、急性冠症候群のバイオマーカーとしての可能性が期待されている。

SMAD

TGF- β スーパーファミリーによる細胞内情報伝達を担う転写因子。ヒトでは 8 種類の SMAD が同定されており、特異型 SMAD (TGF- β やアクチビンによって活性化される SMAD2/3、BMP によって活性化される SMAD1/5/8)、共有型 SMAD (SMAD4)、抑制型 SMAD (SMAD6/7) の 3 種類に分類される。

sST2 (soluble ST2、可溶性 ST2)

ST2 は IL-1 受容体ファミリーの一つであり、可溶性成分(sST2)と膜貫通成分に分類される。血中 sST2 は心疾患、潰瘍性大腸炎、肺炎などで上昇する事が知られている。

TGF- β superfamily (transforming growth factor-beta、形質転換成長因子スーパーファミリー)

細胞増殖・分化を制御し、細胞死を促進する約 40 種類のサイトカインにより構成されるグループ。TGF- β ファミリー、アクチビンファミリー及び BMP (bone morphogenetic protein) ファミリーの 3 つのサブファミリーに分類される。

TK (thymidine kinase、チミジンキナーゼ)

デオキシチミジン (Deoxythymidine) をデオキシチミジナーリン酸 (Deoxythymidine monophosphate) に変換する酵素で、細胞の分裂増殖の際にその活性が上昇する。悪性リンパ腫、白血病、骨髄種で高値を示すため、これらの疾患における治療効果や予後の判定に有用なバイオマーカーとして利用されている。

TNC (tenascin-C、テネイシン C)

細胞外マトリックスタンパクの一つ。多数のバリエーションを持ち、低分子量バリエーションは正常組織で発現しているが、高分子バリエーションは癌組織や炎症後の組織修復部位で発現している。

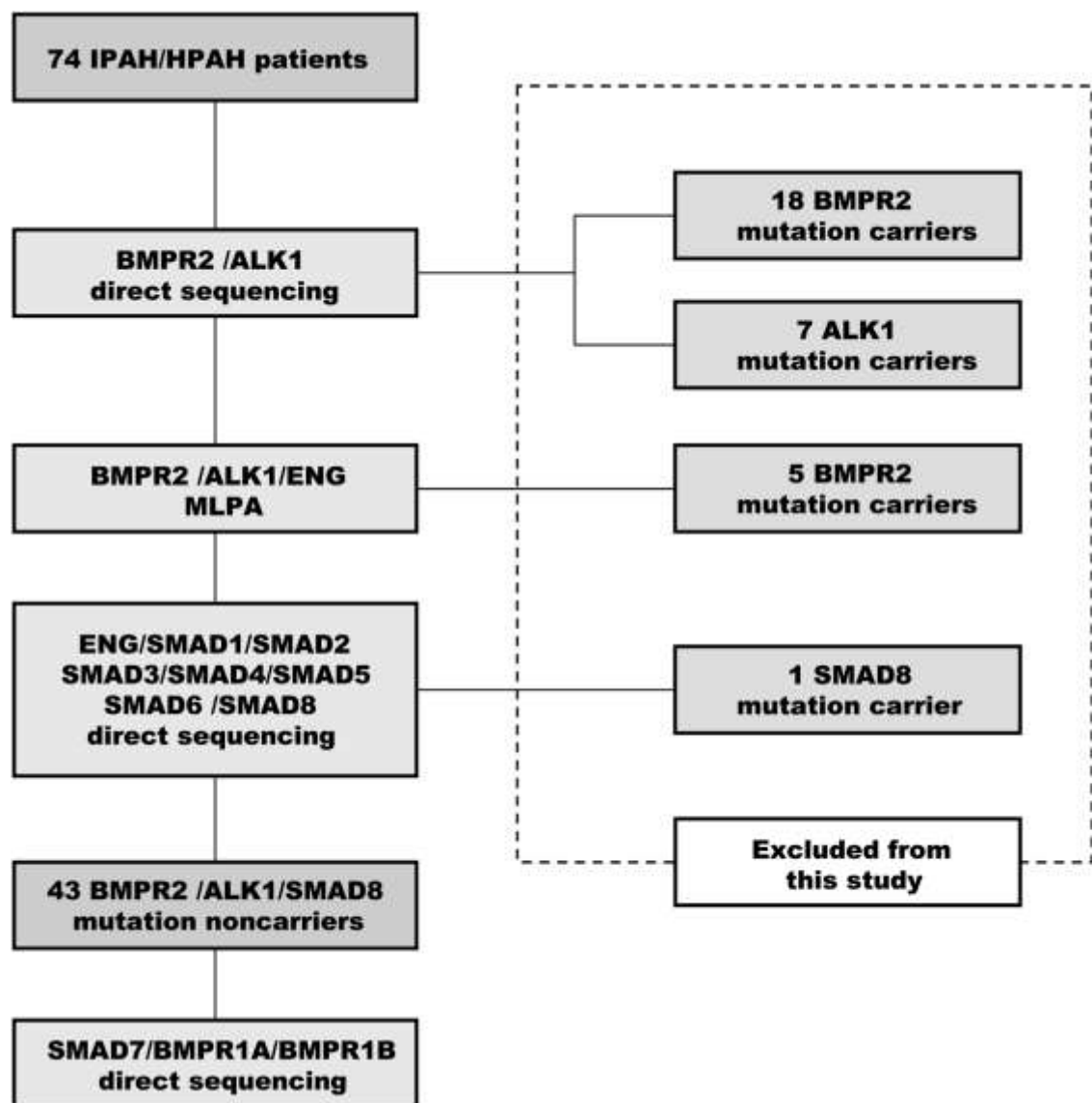


図1 研究対象(肺高血圧症症例)の選定

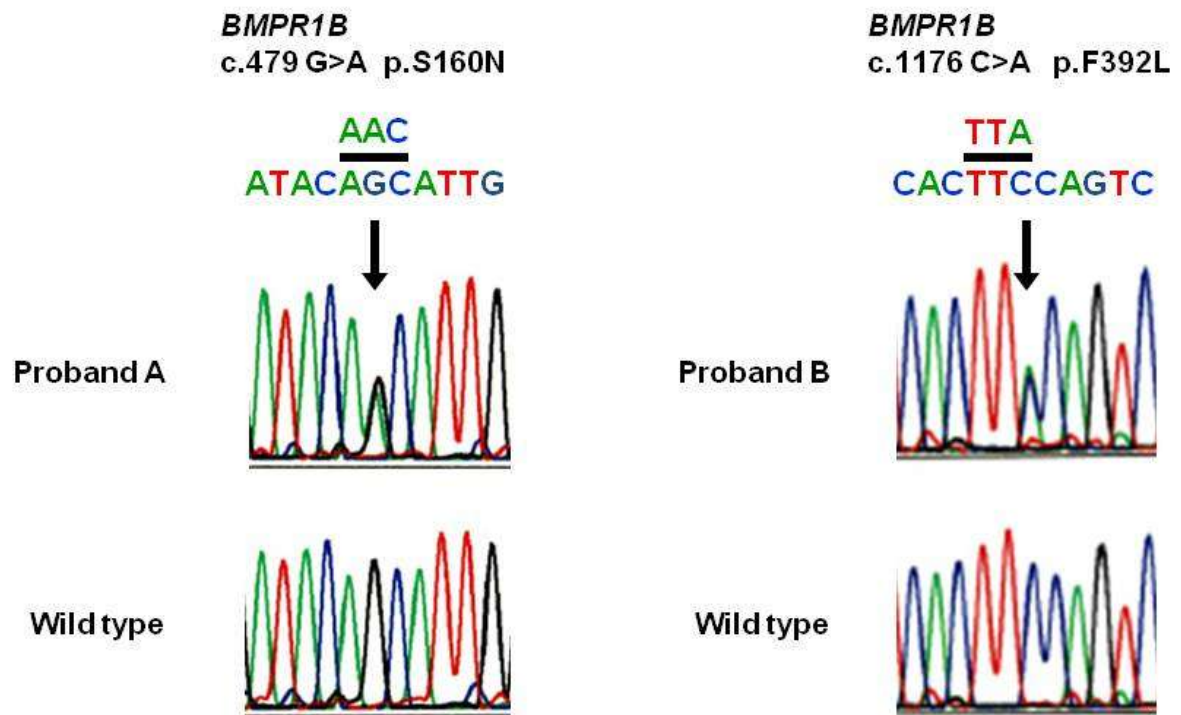


図2 *BMPR1B* 遺伝子変異の検出

IPAH 43 症例中 2 症例において、*BMPR1B* 遺伝子のミスセンス変異を検出した。

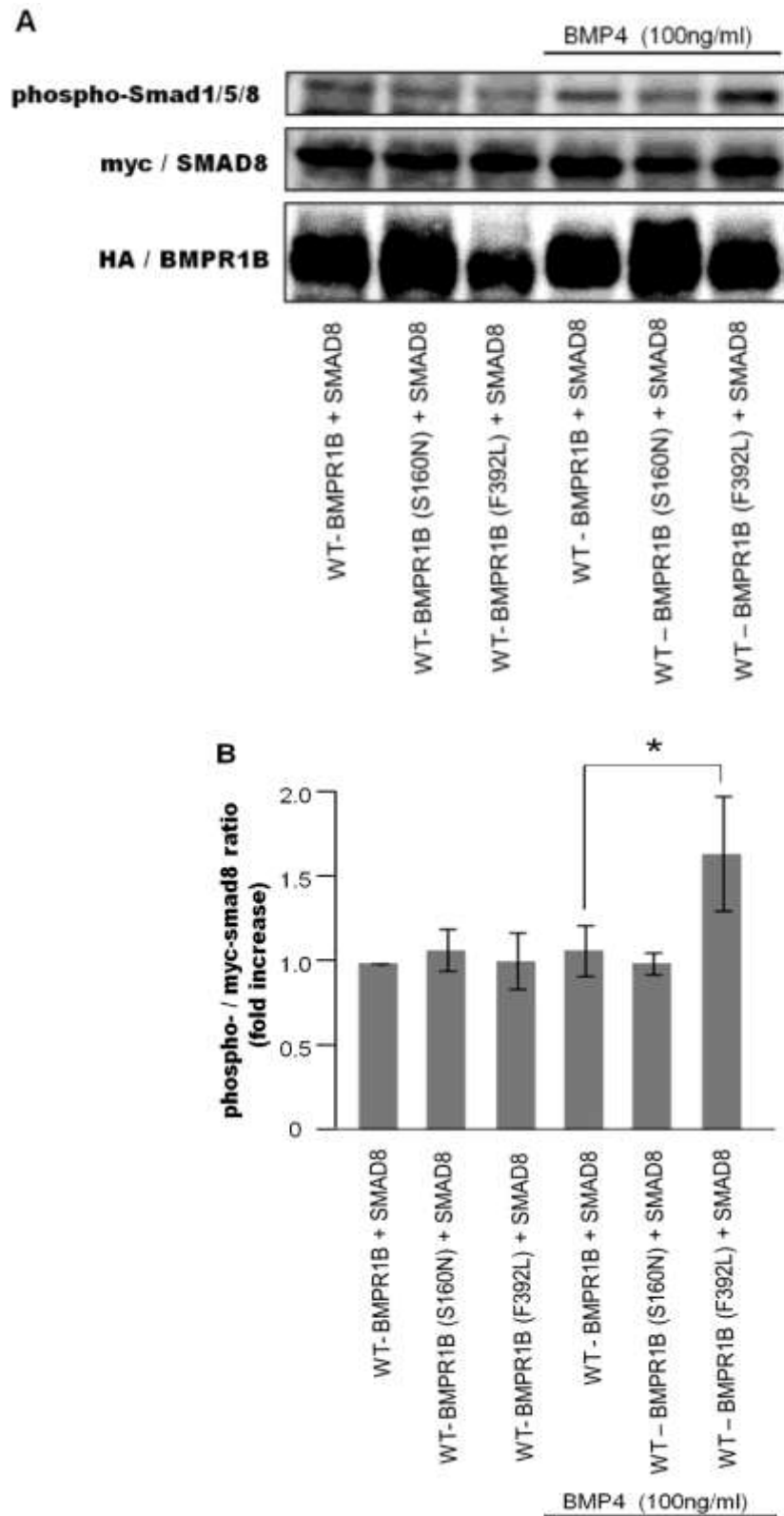


図3 BMPR1BにおけるF392L変異導入がSMAD8のリン酸化に及ぼす影響

(A) ウェスタンブロッティング法。BMP4による刺激を加えることによりF392L変異BMPR1Bは野生型と比較してSMAD8のリン酸化を増強させた。(B) 同様のウェスタンブロッティングを独立して3回施行し、myc-SMAD8に対するリン酸化SMAD8のバンド濃度比を比較した。* $p < 0.05$ 。WT:wild type(野生型)。

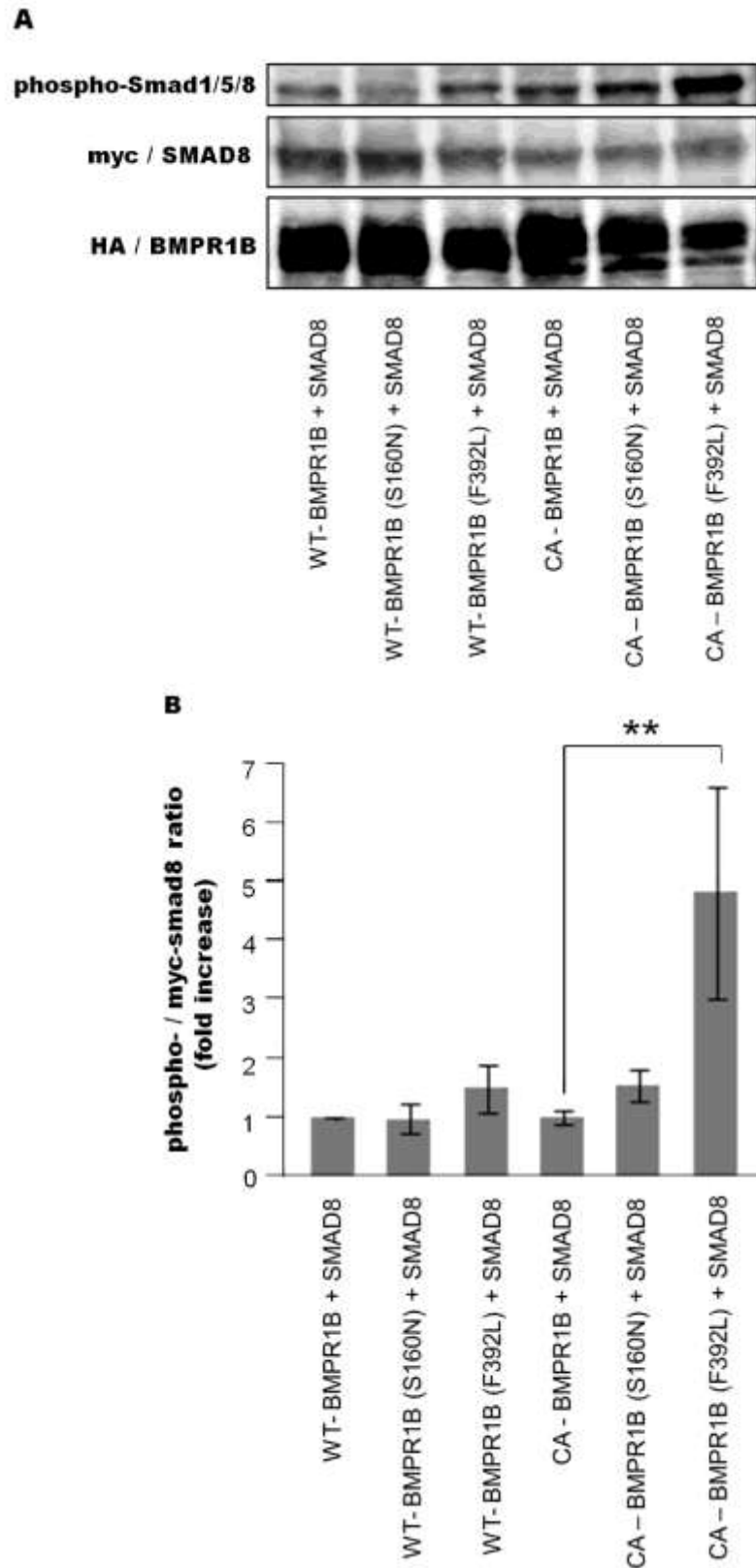


図4 constitutively active(ca)-BMPR1Bに対するF392L変異導入がSMAD8のリン酸化に及ぼす影響

(A) ウェスタンブロッティング法。F392L変異ca-BMPR1Bはca-BMPR1Bと比較してSMAD8のリン酸化を増強させた。(B) 同様のウェスタンブロッティングを独立して3回施行し、myc-SMAD8に対するリン酸化SMAD8のバンド濃度比を比較した。** $p < 0.005$ 。

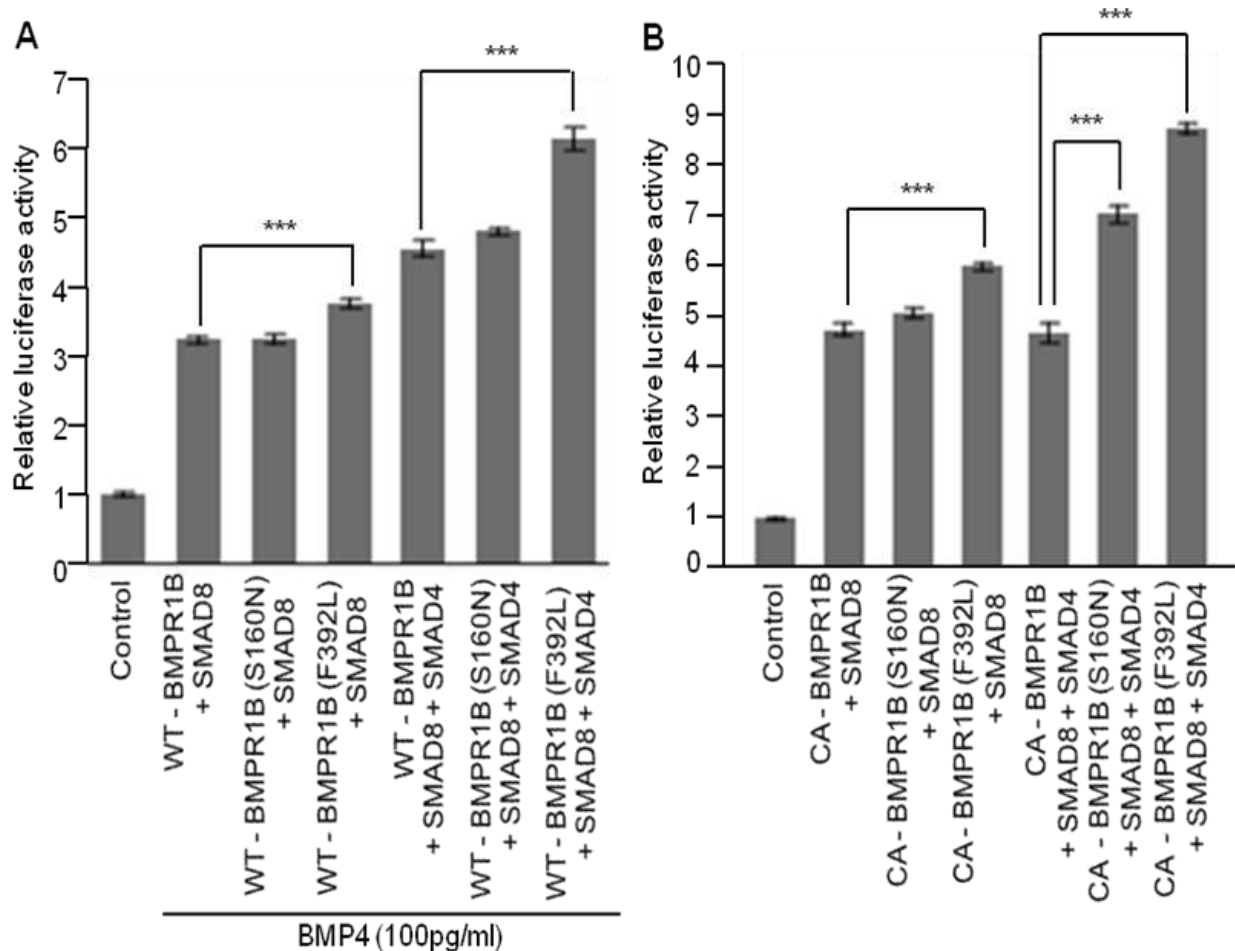


図5 ルシフェラーゼアッセイを用いた、BMPR1Bの変異がBMPシグナル伝達経路にもたらす影響の評価

(A) BMP4刺激下において、SMAD8あるいはSMAD8・SMAD4と同時に導入したF392L変異BMPR1Bはそれぞれ野生型BMPR1Bと比較してBMPシグナル伝達経路の亢進をもたらした。

(B) SMAD8と同時に導入したF392L変異ca-BMPR1Bは、野生型BMPR1Bと比較してBMP特異的ルシフェラーゼレポーターを活性化させた。SMAD8・SMAD4と同時に導入した場合、S160N変異ca-BMPR1BおよびF392L変異ca-BMPR1Bはca-BMPR1Bと比較して有意に強くBMP特異的ルシフェラーゼレポーターの活性化を惹起した。コントロールサンプルとしてプラスミドを導入していないCOS1細胞を用いた。SMAD8はBMPR1Bによりリン酸化されたのち、SMAD4と結合して核内へ移行し、シグナルを調節する。このためSMAD8単独のみならず、より生理的な状態を目指してSMAD4と同時に導入した細胞でも評価を行った。このルシフェラーゼアッセイは独立して3回施行した。*** $p < 0.0001$ 。

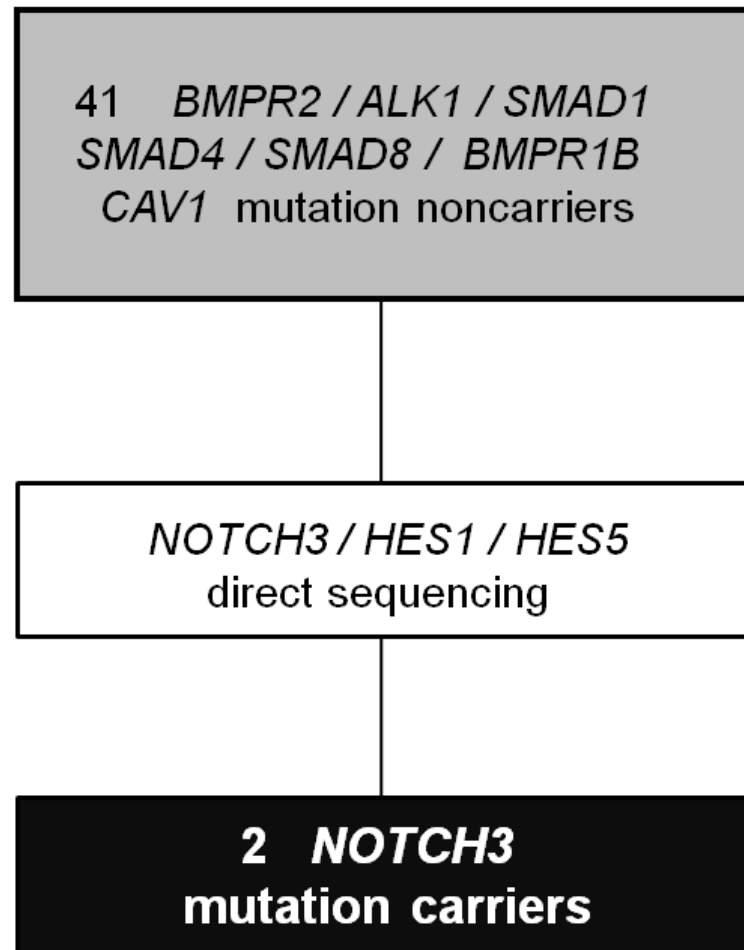


図 6 研究対象（肺高血圧症症例）の選定

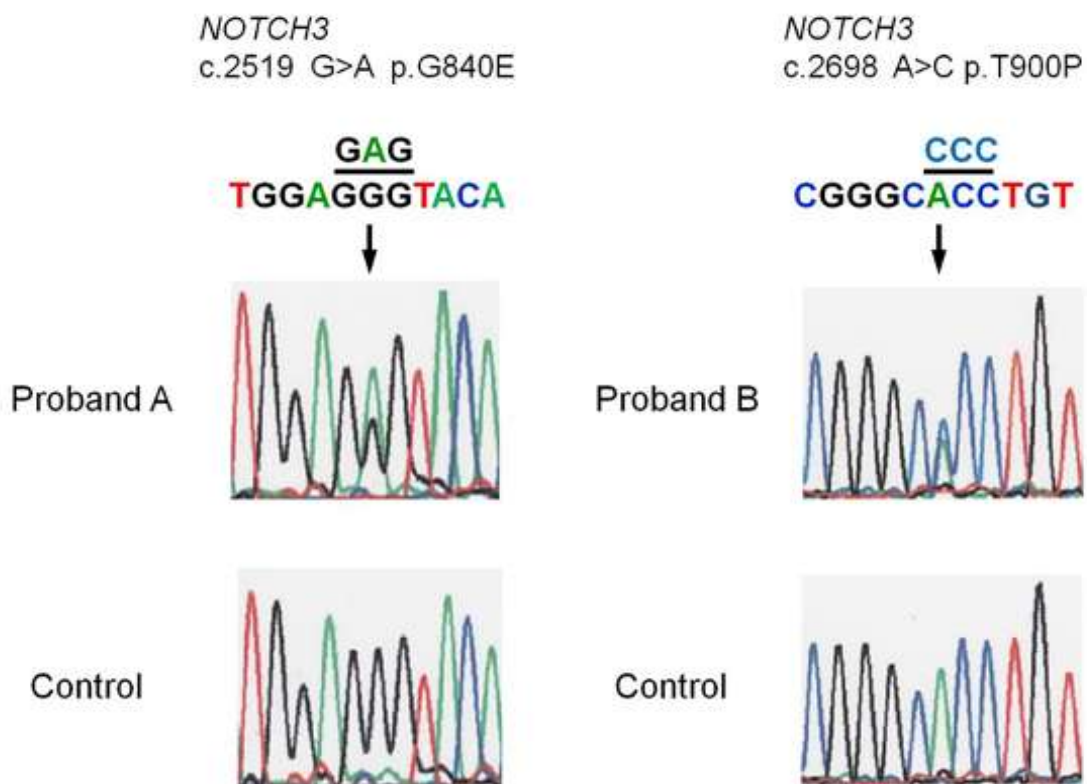


図 7 *NOTCH3* 遺伝子変異の検出

IPAH 41 症例中 2 症例において、*NOTCH3* 遺伝子のミスセンス変異を検出した。

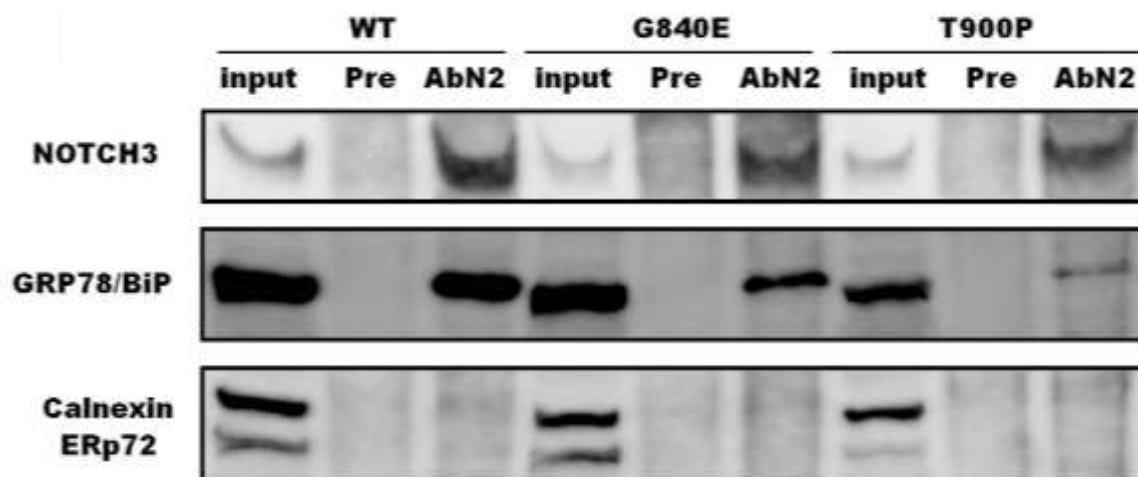


図8 野生型および変異型 NOTCH3 と小胞体シャペロンの相互作用

野生型および変異型の安定細胞株から抽出されたタンパク (200 μ g/サンプル) を用いて、抗 NOTCH3 抗体 (AbN2) もしくはネガティブコントロールとしての pre-immune ウサギ IgG 抗体 (pre) と免疫沈降を施行した。免疫複合体は SDS-PAGE、その後ウェスタンブロッティングに供された。Input は免疫沈降を行わずに各タンパクを SDS-PAGE に用いた結果を示す。野生型 NOTCH3 は小胞体シャペロンの一つである GRP78/BiP と強く結合しているのに対して、2 種類の変異型と GRP78/BiP との結合は軽度であった。この実験はそれぞれの安定細胞株について計 3 回施行し、ほぼ同様の結果を得た (本図は野生型 WT-No. 17、変異型 G840E-No. 36、変異型 T900P-No. 33 での結果を示す)。

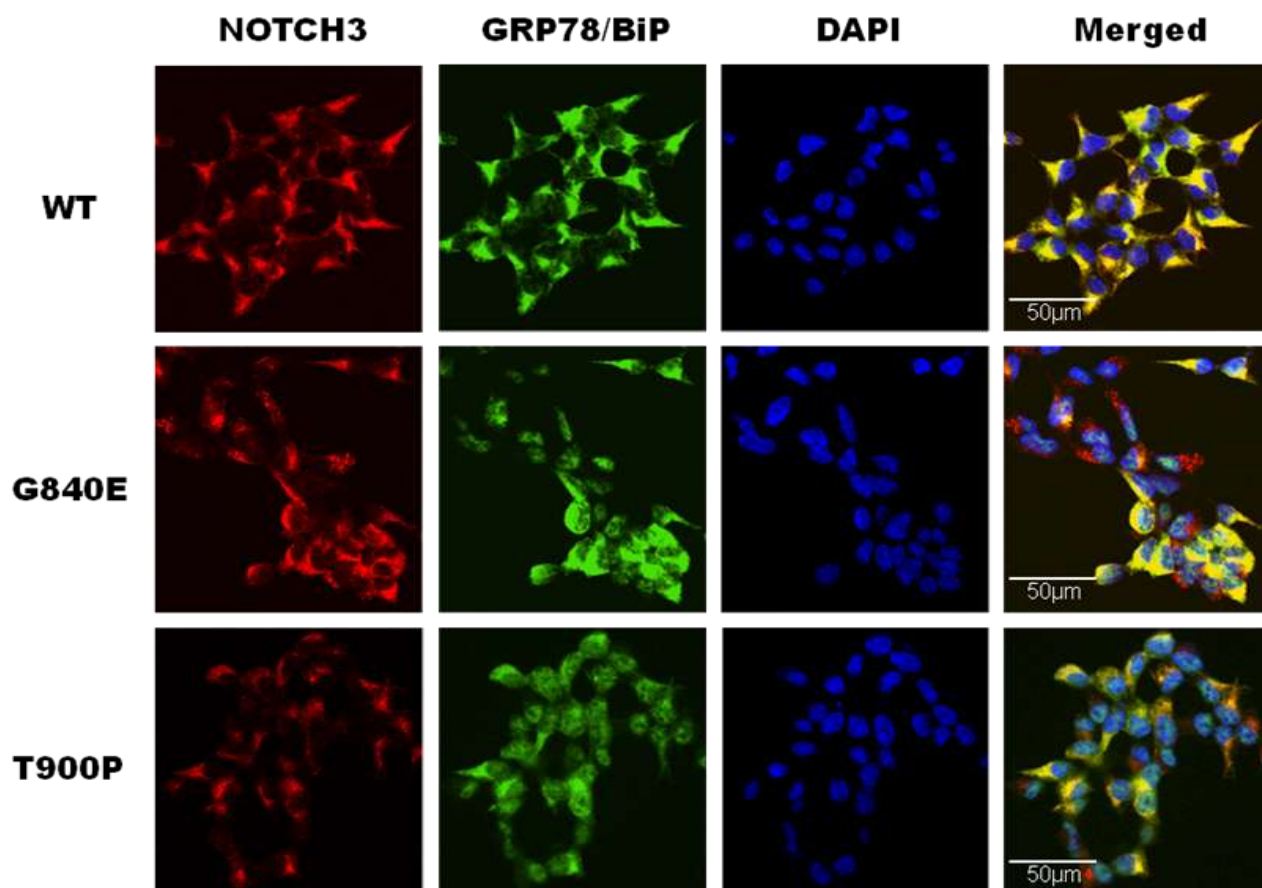
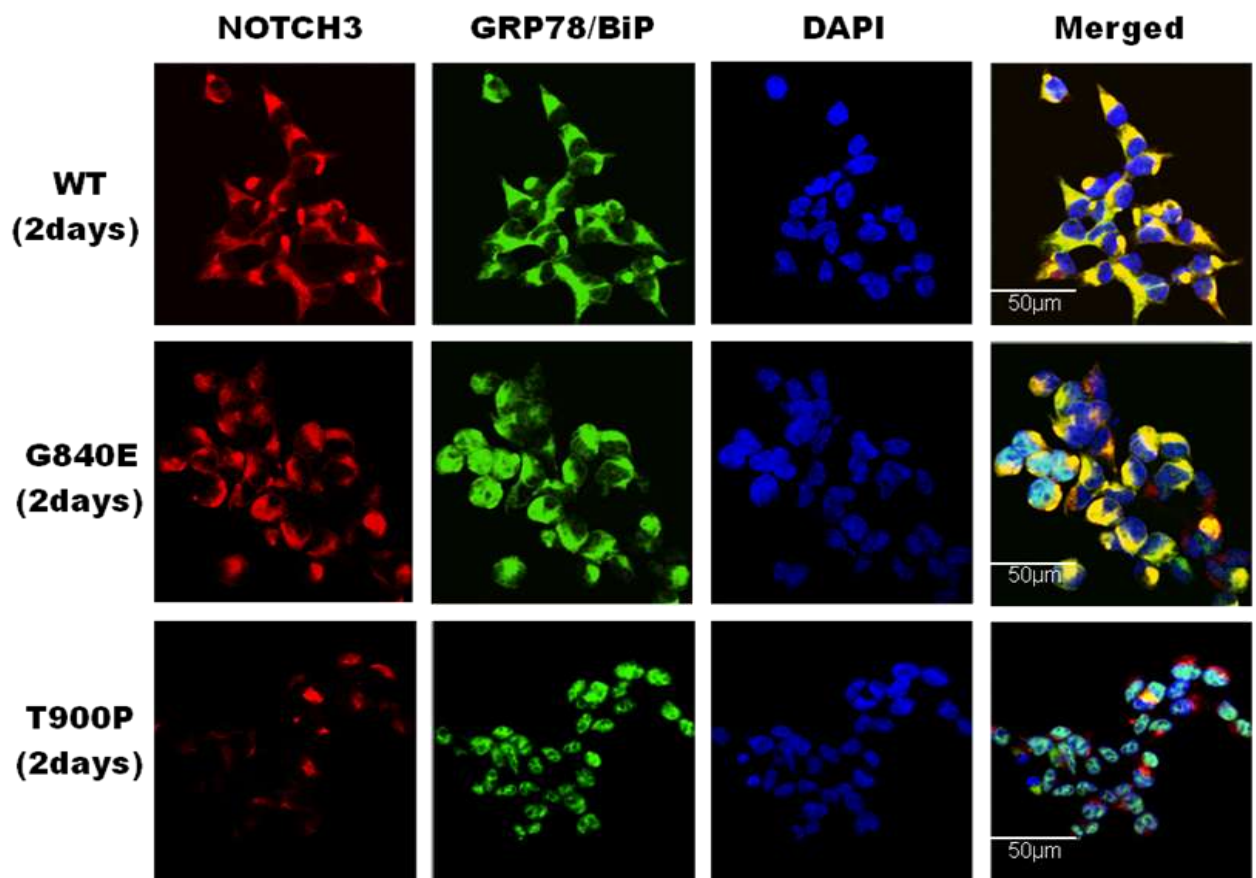


図9 変異型 NOTCH3 がもたらす GRP78/BiP の局在変化、および野生型 NOTCH3 タンパクと変異型 NOTCH3 タンパクの分解速度の相違

(A) 9 つの安定細胞株（野生型 WT-No. 17・21・38、変異型 G840E-No. 5・21・36、変異型 T900P-No. 14・28・33）をテトラサイクリン（2 μ g/ml）と共に培養することで NOTCH3 を発現させ、24 時間後に抗 NOTCH3 抗体（AbN2）、抗 GRP78/BiP 抗体で免疫染色を行った。NOTCH3 野生型の安定細胞株では GRP78/BiP は NOTCH3 と共に小胞体内に存在していたが、変異型細胞株では GRP78/BiP は核内に移行していた。



(B) (A)と同様に NOTCH3 を発現させた後、テトラサイクリンを除去して2日間培養し、免疫染色を施行した。変異型細胞株では NOTCH3 タンパクは野生型細胞株のそれよりも迅速に分解された。

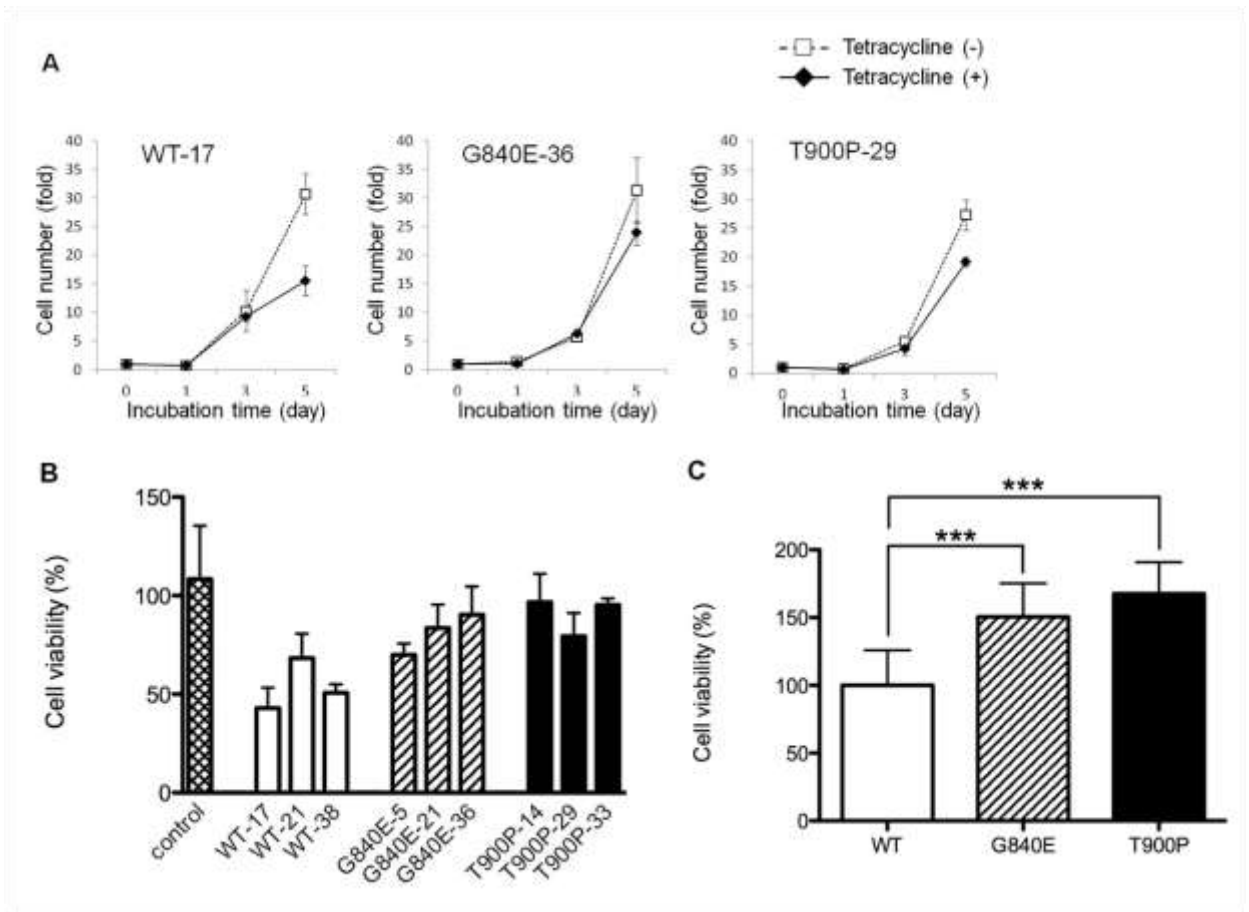


図 10 NOTCH3 変異が細胞増殖能と細胞生存性に及ぼす影響

(A) 安定細胞株を誘導剤を添加しない状態で、もしくはテトラサイクリン ($2 \mu\text{g/ml}$) と共に培養し、1 日目、3 日目、5 日目にそれぞれ回収し、細胞数を測定した。5 日目における、テトラサイクリン非添加の細胞数に対するテトラサイクリン添加後の細胞数の比を比較したところ、変異型 G840E-No. 36、T900P-No. 29 の両方とも、野生型 WT-No. 17 よりも有意に高いことが示された (それぞれ $p=0.004$ 、 0.021)。細胞数は 4 回分の独立した実験結果の平均値および標準偏差で示した。9 つの細胞株 (野生型 WT-No. 17・21・38、変異型 G840E-No. 5・21・36、変異型 T900P-No. 14・28・33) で同様の実験を実施した。(B) 安定細胞株をそのまま、もしくはテトラサイクリン ($2 \mu\text{g/ml}$) と共に 3 日間培養した後、WST-1 試薬を用いて細胞生存性を評価した。コントロールとして NOTCH3 遺伝子未導入の T-REx 293 細胞を用いた。細胞生存性はテトラサイクリン非添加の細胞株の生存性に対する、テトラサイクリン添加後の細胞株の生存性の割合として示した。各実験は 3 回独立して施行した。(C) (B) の結果を、野生型 NOTCH3 の安定細胞株を基準として補正した。*** $p<0.001$ 。

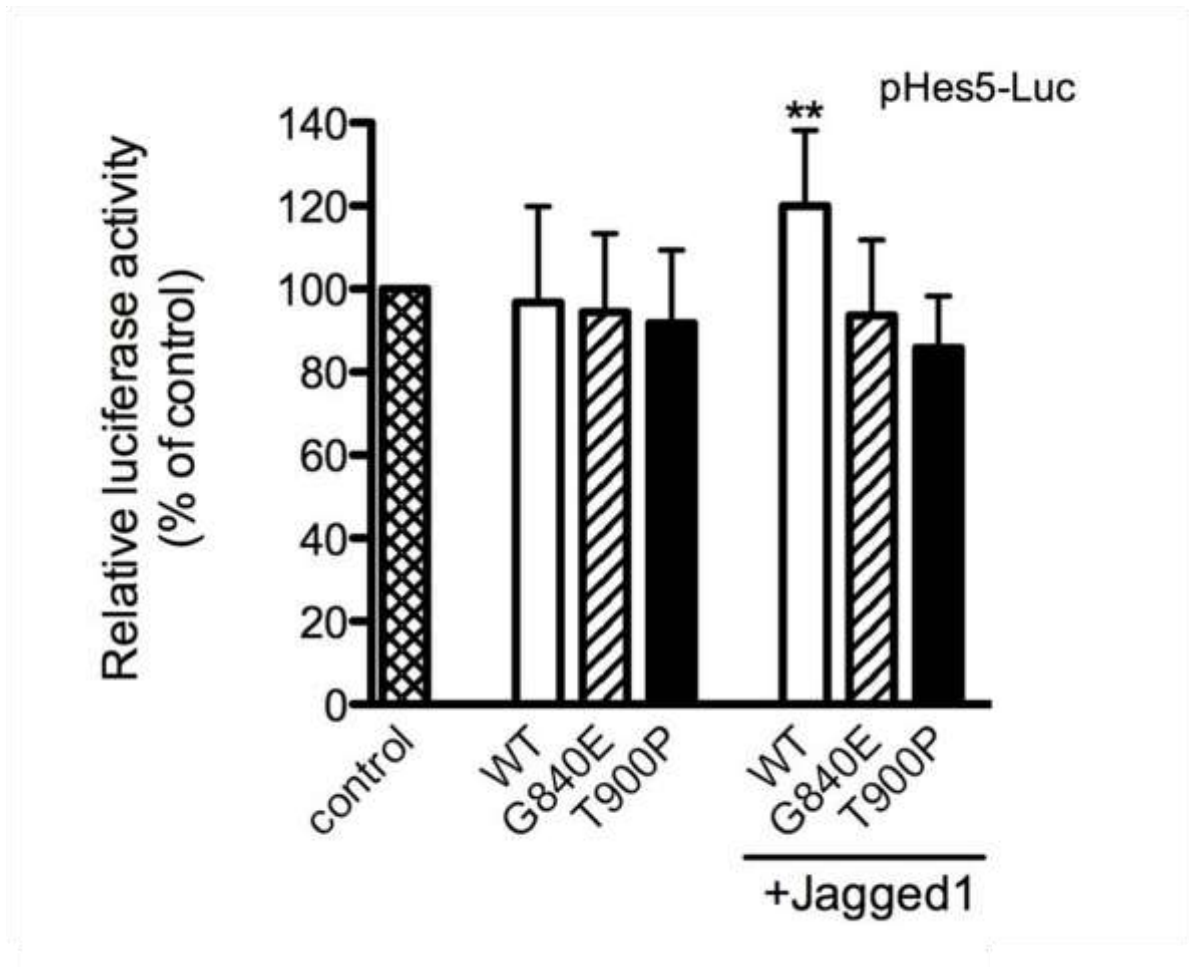


図 11 変異型 NOTCH3 が NOTCH3-HES5 シグナリングに与える影響

野生型または変異型 NOTCH3、あるいはコントロールとしての空の pcDNA4/T0 ベクターを、pHes5-Luc と共に T-REx 293 細胞に導入した。一部の細胞については、あらかじめ抗 Fc 抗体と結合させた Jagged-1 Fc (100 ng/ml) と共に 4 時間培養した。全ての細胞を、遺伝子導入から 32 時間培養した後に回収して、ルシフェラーゼアッセイを行った。この実験を独立して 4 回施行し、Jagged-1 刺激を受けていない野生型 NOTCH3 導入細胞を基準として活性度を比較したところ、変異型 NOTCH3 導入細胞は Jagged-1 による刺激にも関わらず、NOTCH3-HES5 シグナリングを亢進させられなかった。** $p < 0.01$ 。

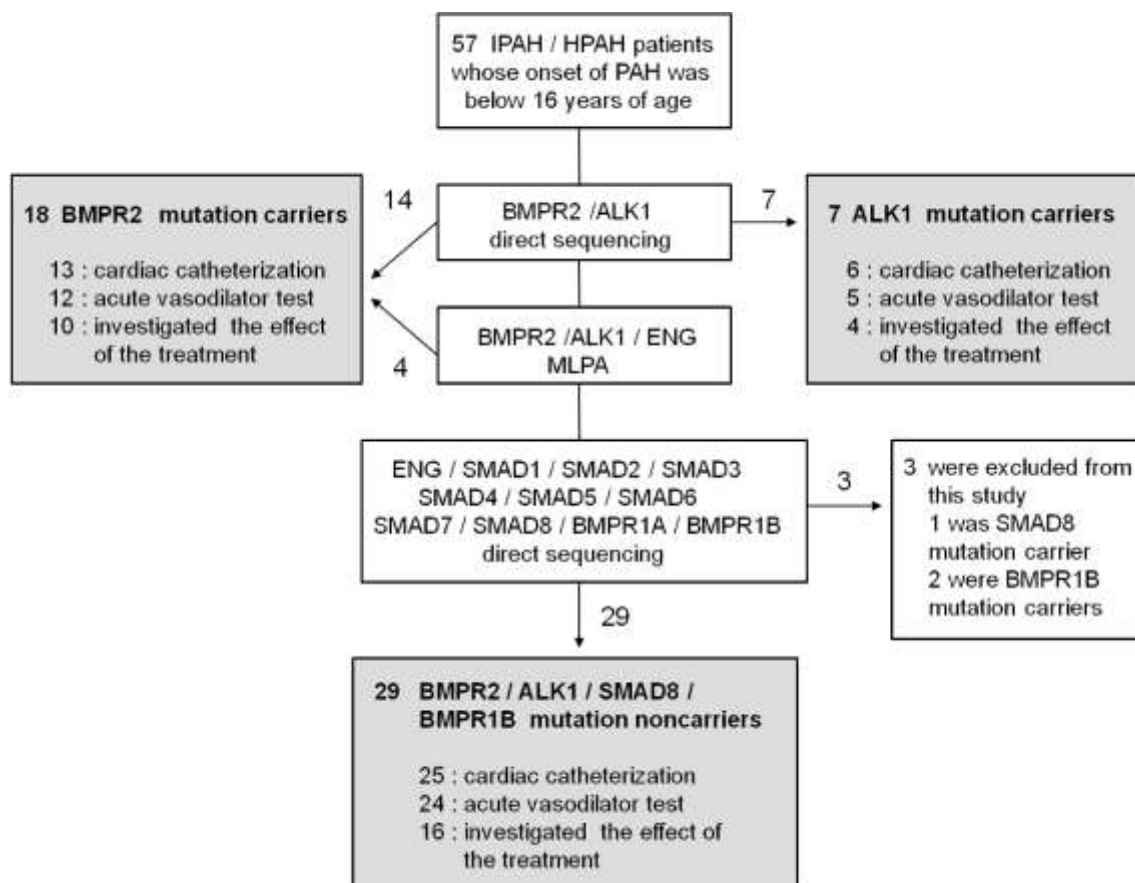


図 12 研究対象症例の選定と分類

BMPR2 変異群（18 症例）、*ALK1* 変異群（7 症例）、非変異群（29 症例）の 3 群に分けてそれぞれの臨床像を検討した。

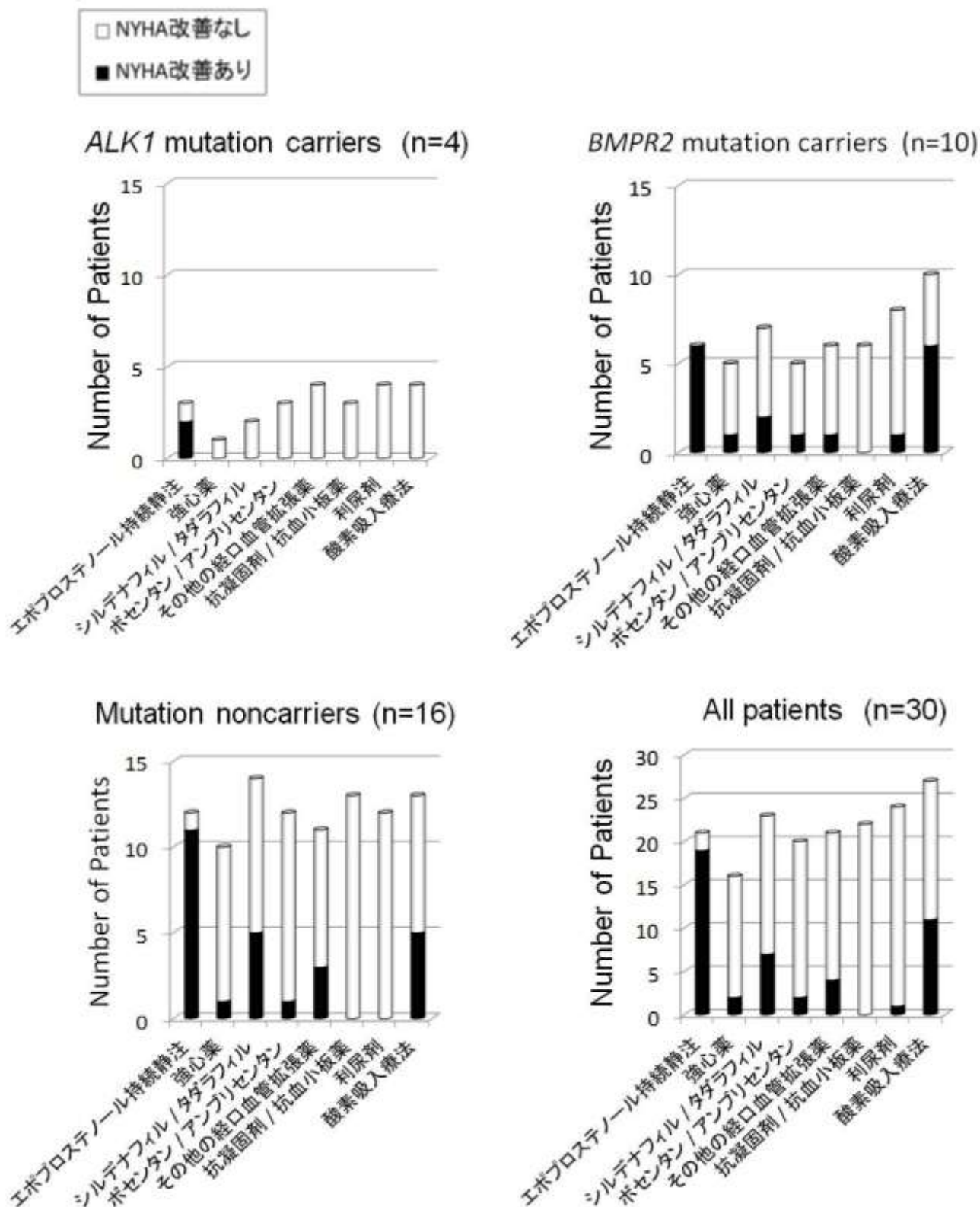


図 13 各治療による NYHA class の変化

ALK1 変異群では 7 症例中 4 症例、BMPR2 変異群では 18 症例中 10 症例、非変異群では 29 症例中 16 症例について治療効果の判定を行うことが可能であった。

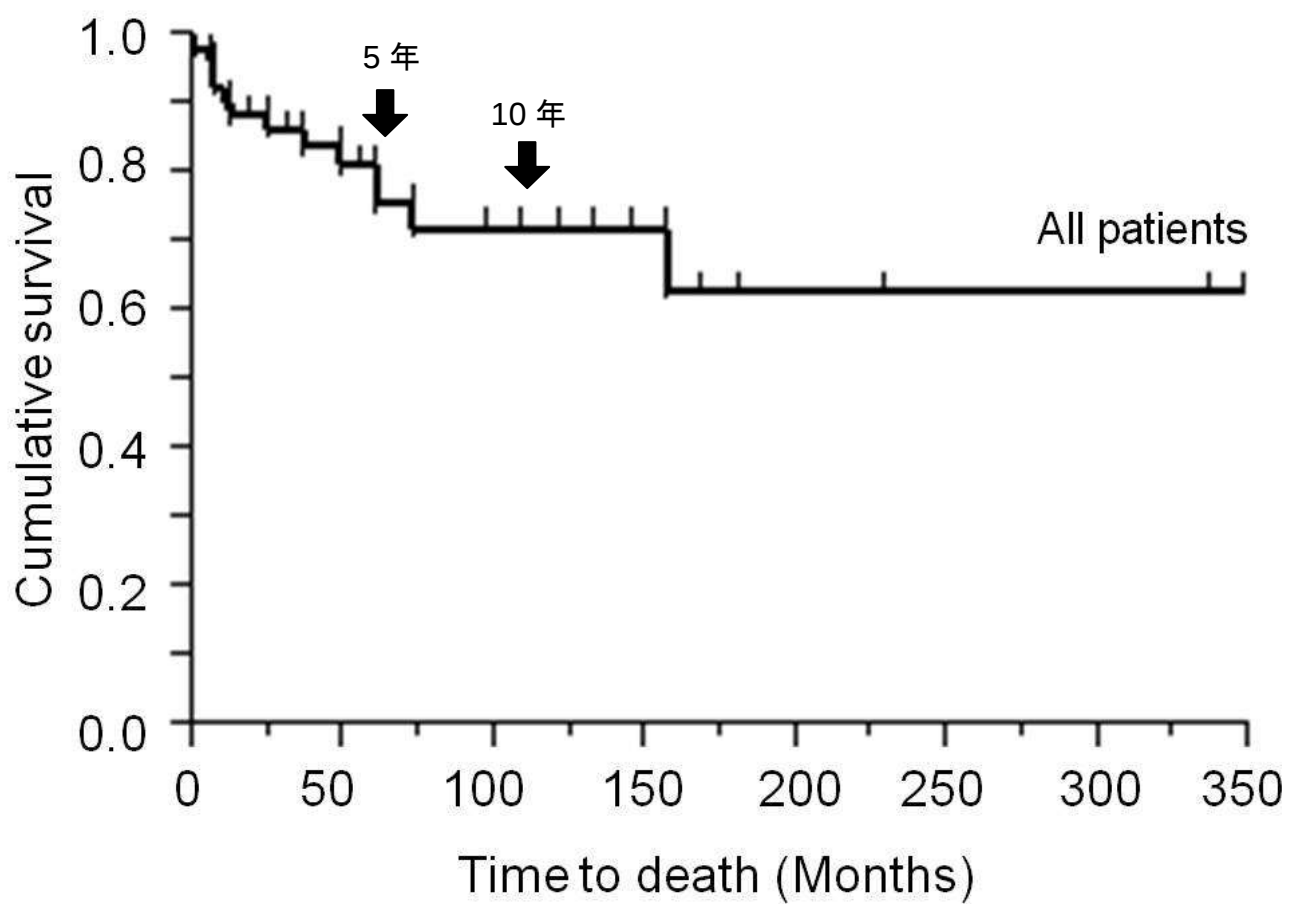


図 14 全症例の Kaplan-Meier 生存曲線
5 年生存率は 76%、10 年生存率は 72%であった。

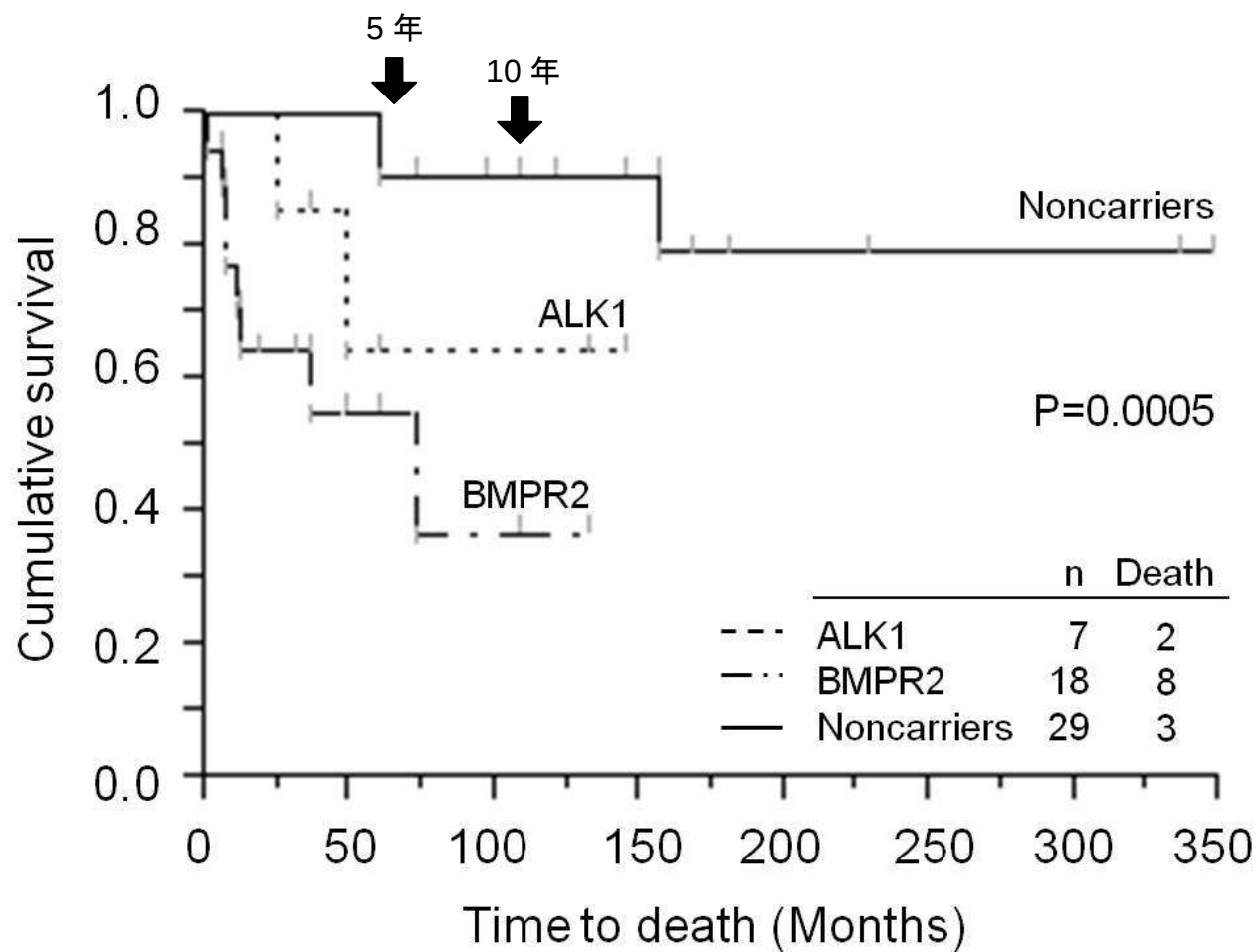


図 15 各群毎の Kaplan-Meier 生存曲線

5 年生存率および 10 年生存率は非変異群がともに 90%であったのに対して、*BMPR2* 変異群は 55%および 37%、*ALK1* 変異群はともに 64%と不良であった (log-rank test $p=0.0005$)。

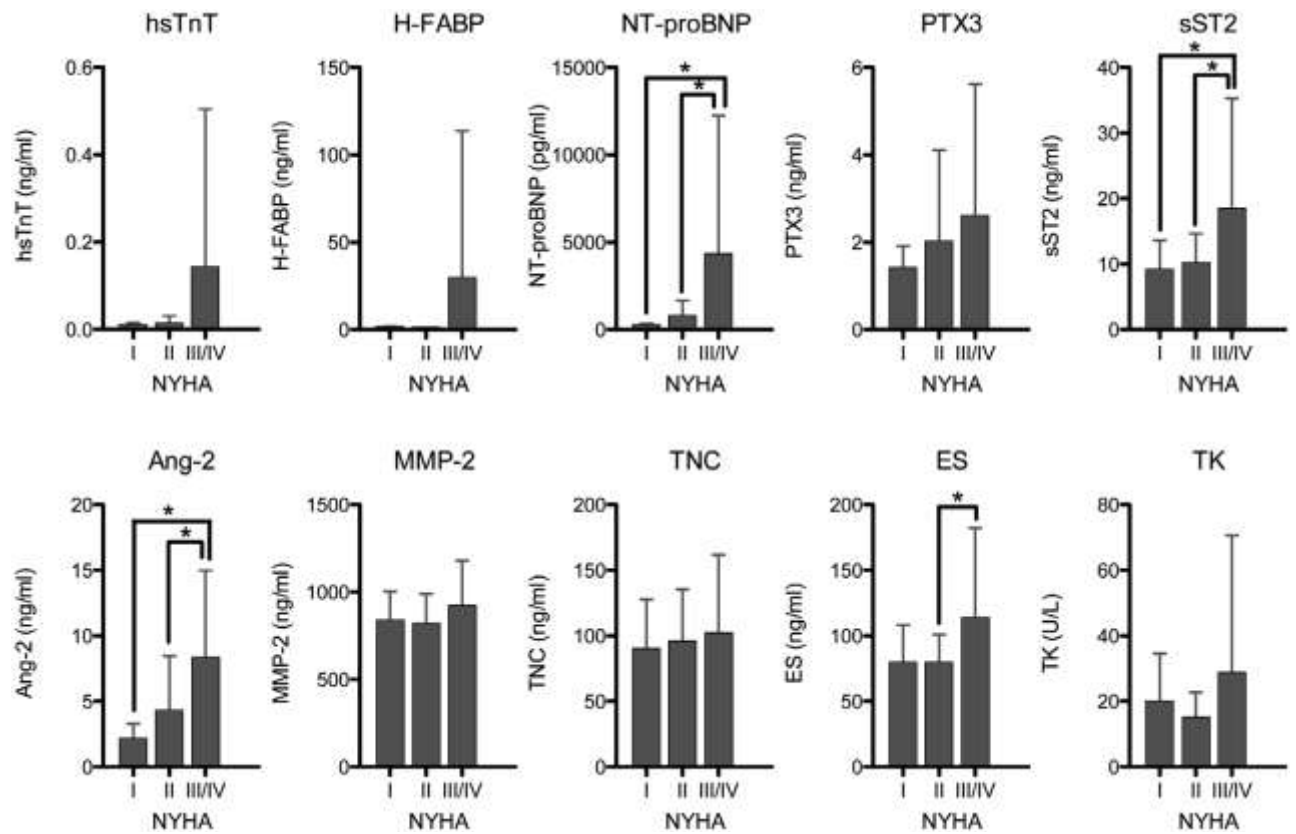


図 16 各バイオマーカー候補の測定値と NYHA class の関係

NYHA class に従って各症例を I、II、III/IV の 3 グループに分け、グループ毎の計測値を比較検討した。NT-proBNP、sST2、Ang-2 および ES の 4 項目は NYHA class の悪化に伴い有意に上昇していた。* $p < 0.05$ 。

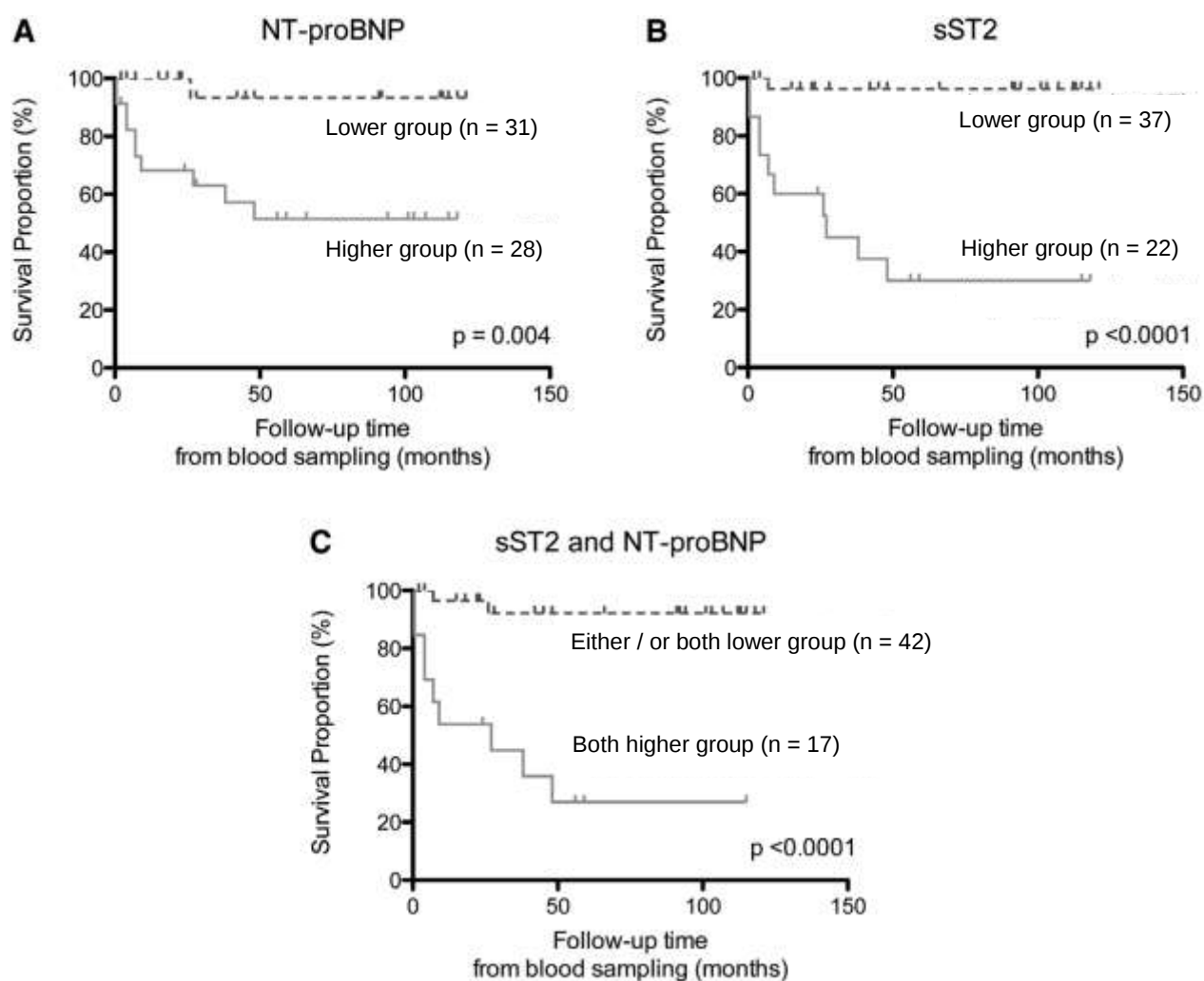


図 17 NT-proBNP 値および sST2 値が小児期発症 PAH 患者の予後に与える影響

(A) ROC 解析で求められたカットオフ値を基準として NT-proBNP 低値群 (<537 pg/ml)、高値群 (≥ 537 pg/ml) の 2 群に分類して解析したところ、高値群の方が有意に予後が不良であった (log-rank test $p=0.004$)。 (B) (A) と同様に sST2 低値群 (<11.1 ng/ml)、高値群 (≥ 11.1 ng/ml) の 2 群に分類して解析したところ、高値群が有意に予後不良であった (log-rank test $p<0.0001$)。 (C) NT-proBNP および sST2 の両方がカットオフ値よりも高値である群と、それ以外の群の 2 群に分類して解析したところ、前者の予後は後者よりも有意に不良であった (log-rank test $p<0.0001$)。

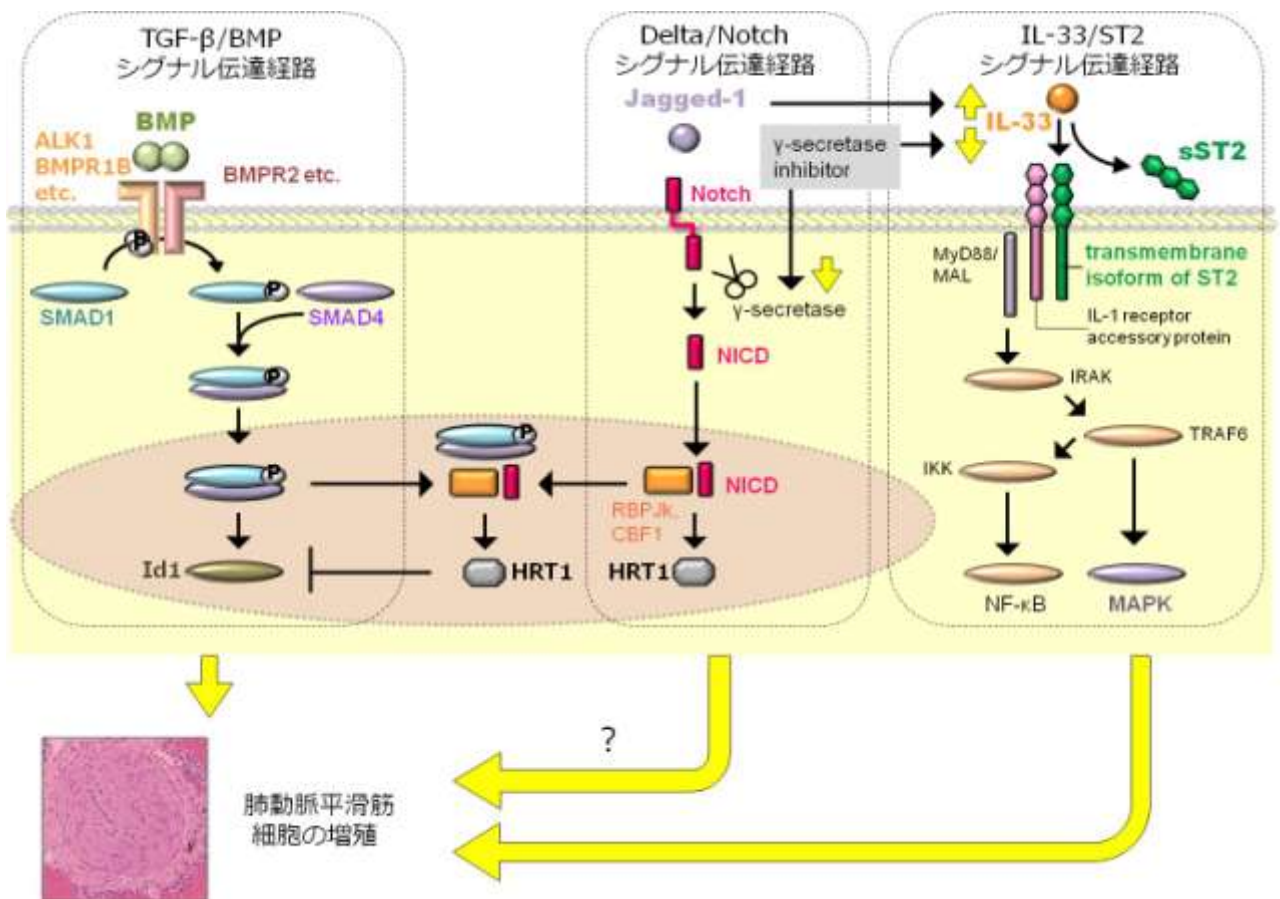


図 18 BMP、NOTCH、ST2 各シグナル伝達経路のクロストーク

BMP シグナル伝達経路が活性化すると、同経路内の SMAD1 がリン酸化され、NOTCH 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain、NICD) を介して、NOTCH のターゲット遺伝子である *HRT1* などの転写を促進する。反対に *HRT1* は BMP シグナル伝達経路の下流のエフェクターである *Id1* の阻害物質に結合して、その分解を惹起する。ST2 シグナル伝達経路の下流のターゲットである MAPK も、BMP シグナル伝達経路と同様に肺動脈平滑筋細胞の増殖に直接関与する。また、NOTCH シグナリングを阻害する作用を持つ γ-セクレターゼ阻害剤は ST2 のリガンドである IL-33 の発現を抑制する作用を持ち、さらに NOTCH シグナリングのリガンドである Jagged-1 は IL-33 の発現を促す (文献 68-76 より改変)。

表 1 小児期発症 PAH 54 症例の各群毎の概略

	<i>ALK1</i> 変異群 (n=7)	<i>BMPR2</i> 変異群 (n=18)	非変異群 (n=29)	全症例 (n=54)	p 値
男性	3 (43%)	10 (56%)	11 (38%)	24 (44%)	0.496
PAH 家族歴	4 (57%)	3 (17%)	3 (10%)	10 (19%)	0.012
発症時年齢 (年)	9.3 ± 4.2	9.1 ± 3.7	8.0 ± 4.0	8.5 ± 3.9	0.589
BNP (pg/ml)	94.8 (7.8 – 752.0)	159.2 (18.8 – 1,451.5)	39.6 (12.2 – 117.1)	57.0 (12.8 – 335.9)	0.366
6 分間歩行 距離 (m)	525 ± 176	379 ± 93	448 ± 113	442 ± 126	0.125

BNP 値および 6 分間歩行距離は、各症例の最新のデータを用いた。BNP は *ALK1* 変異群 6 症例・*BMPR2* 変異群 12 症例・非変異群 22 症例で、6 分間歩行距離は *ALK1* 変異群 5 症例・*BMPR2* 変異群 8 症例・非変異群 15 症例で測定されていた。

表 2 各群毎の血行動態的指標

	<i>ALK1</i> 変異群 (n=6)	<i>BMPR2</i> 変異群 (n=13)	非変異群 (n=25)	全症例 (n=44)	p 値
平均肺動脈圧 (mmHg)	61.8 ± 18.2	69.8 ± 19.7	62.1 ± 21.8	64.3 ± 20.6	0.529
右房圧 (mmHg)	6.7 ± 4.5	7.5 ± 4.5	6.6 ± 2.9	6.8 ± 3.6	0.758
心係数 (L/min/m ²)	3.7 ± 0.8	2.8 ± 1.1	3.3 ± 0.9	3.2 ± 1.0	0.196
全肺抵抗 (wood•U/m ²)	14.8 ± 4.3	26.3 ± 14.2	21.6 ± 11.9	21.9 ± 12.0	0.321
肺血管抵抗 (wood•U/m ²)	17.1 ± 10.4	23.9 ± 14.6	17.6 ± 10.5	19.1 ± 11.6	0.411
肺動脈楔入圧 (mmHg)	9.0 ± 2.8	9.0 ± 2.9	9.0 ± 2.6	9.0 ± 2.7	0.999
肺血管拡張 試験反応あり	1 / 5 (20%)	4 / 12 (33%)	10 / 24 (42%)	15 / 41 (37%)	0.646

表 3 各群毎の最近の治療内容

	<i>ALK1</i> 変異群 (n=4)	<i>BMP2</i> 変異群(n=10)	非変異群 (n=23)	全症例 (n=37)	p 値
エポプロステノール 持続静注	2 (50%)	6 (60%)	13 (57%)	21 (57%)	0.781
強心薬	1 (25%)	4 (40%)	9 (39%)	14 (38%)	0.709
シルデナフィル / タダラフィル	3 (75%)	8 (80%)	17 (74%)	28 (76%)	0.485
ボセンタン / アンブリセンタン	4 (100%)	7 (70%)	15 (65%)	26 (70%)	0.273
その他の経口 血管拡張薬	4 (100%)	8 (80%)	14 (61%)	26 (70%)	0.179
抗凝固薬 / 抗血小板薬	3 (75%)	6 (60%)	16 (70%)	25 (68%)	0.654
利尿剤	2 (50%)	6 (60%)	16 (70%)	24 (65%)	0.134
酸素吸入療法	3 (75%)	10 (100%)	21 (91%)	34 (92%)	0.310

死亡例および肺移植例については、最近の治療を評価するのが困難であるため除外した。

表 4 各群毎の転帰

	<i>ALK1</i> 変異群 (n=7)	<i>BMPR2</i> 変異群 (n=18)	非変異群 (n=29)	全症例 (n=54)	p 値
NYHA I/II	4 (57%)	7 (39%)	18 (62%)	29 (54%)	
NYHA III/IV	0	3 (17%)	5 (17%)	8 (15%)	
肺移植	1 (14%)	0	3 (10%)	4 (7%)	
死亡	2 (29%)	8 (44%)	3 (10%)	13 (24%)	
Rate of death (Death/Person-Year)	0.051	0.159	0.012	0.038	0.0002

表 5 Cox の比例ハザードモデルによる予後の比較

	リスク比 (95%信頼区間)	p 値
遺伝子変異の有無		
<i>ALK1</i> 変異群 vs 非変異群	5.14 (0.61 – 43.03)	0.1205
<i>BMPR2</i> 変異群 vs 非変異群	12.54 (3.06 – 84.21)	0.0003
性別		
男性 vs 女性	2.62 (0.87 – 8.73)	0.0869

死亡をエンドポイントと定めた。

表 6 小児期発症 PAH 59 症例の概略

	全症例 (n=59)	生存群 (n=48)	死亡群 (n=11)	p 値
発症時年齢(年)	8.4 ± 4.0	8.2 ± 3.8	9.3 ± 4.7	0.789
採血時年齢(年)	11.3 ± 6.0	11.0 ± 5.5	12.4 ± 7.9	0.751
男性/女性	26 / 33	29 / 19	4 / 7	0.147
PAH 家族歴 (%)	12 (20)	8 (17)	4 (36)	0.143
採血時 NYHA class I/II/III-IV/unclear	13 / 28 / 17 / 1	11 / 25 / 12 / 0	2 / 3 / 5 / 1	0.110
血行動態的指標				
平均肺動脈圧(mmHg)	65.5 ± 19.0	64.9 ± 20.1	68.5 ± 12.9	0.684
右房圧(mmHg)	7.3 ± 3.9	7.1 ± 1.6	7.4 ± 4.2	0.446
心係数(L/min/m ²)	3.1 ± 1.3	2.6 ± 0.5	3.2 ± 1.4	0.140
全肺抵抗(wood・U/m ²)	27.6 ± 12.1	33.7 ± 10.1	25.8 ± 12.6	0.827
肺血管抵抗(wood・U/m ²)	21.3 ± 12.0	21.0 ± 8.8	21.4 ± 13.0	0.476
肺動脈楔入圧(mmHg)	9.4 ± 2.6	10.6 ± 2.8	9.2 ± 2.6	0.903
最近の治療 (%)				
エポプロステノール 持続静注	24 (41)	21 (44)	3 (27)	0.316
強心薬	18 (31)	15 (31)	3 (27)	0.796
シルデナフィル / タダラフィル	27 (46)	24 (50)	3 (27)	0.172
ボセンタン / アンブリセンタン	23 (39)	21 (44)	2 (18)	0.117
その他の経口血管拡張薬	23 (39)	21 (44)	2 (18)	0.117
抗凝固薬 / 抗血小板薬	26 (44)	22 (46)	4 (36)	0.568
利尿剤	28 (47)	24 (50)	4 (36)	0.414
酸素吸入療法	31 (53)	27 (56)	4 (36)	0.234

血行動態的指標に関するデータは 59 症例中 51 症例で得られた。

表7 生存群・死亡群における各バイオマーカー候補の測定値

	全症例 (n=59) mean ± SD [median, range]	生存群 (n=48) mean ± SD [median, range]	死亡群 (n=11) mean ± SD [median, range]	p 値 t 検定 [Wilcoxon 検定]
hsTnT (ng/ml)	0.05 ± 0.20 [0.01, 0 – 1.33]	0.01 ± 0.01 [0.01, 0 – 0.07]	0.22 ± 0.44 [0.01, 0.01 – 1.33]	0.002 [0.009]
H-FABP (ng/ml)	8.66 ± 46.3 [0, 0 – 331]	0.75 ± 1.34 [0, 0 – 6.6]	43.18 ± 104.10 [1, 0 – 331]	0.005 [0.274]
NT-proBNP (pg/ml)	1668.77 ± 4578.11 [361, 0 – 31200]	763.39 ± 1283.03 [309.5, 0 – 7750]	5619.55 ± 9629.20 [1850, 65 – 31200]	0.001 [0.002]
PTX3 (ng/ml)	2.02 ± 2.21 [1.37, 0.72 – 13.51]	1.86 ± 1.77 [1.33, 0.72 – 11.84]	2.73 ± 3.60 [1.69, 0.88 – 13.51]	0.242 [0.063]
sST2 (ng/ml)	12.34 ± 10.59 [9.08, 3.98 – 55.56]	9.99 ± 7.07 [8.59, 3.98 – 49.26]	22.59 ± 16.55 [17.12, 4.74 – 55.56]	< 0.001 [0.001]
Ang-2 (ng/ml)	5.07 ± 5.27 [2.63, 0.59 – 21.25]	4.12 ± 4.36 [2.23, 0.59 – 20.32]	9.23 ± 6.94 [6.49, 1.28 – 21.25]	0.003 [0.009]
MMP-2 (ng/ml)	844.61 ± 207.05 [812, 502 – 1600]	819.13 ± 191.39 [810.5, 502 – 1600]	955.82 ± 244.47 [812, 612 – 1300]	0.047 [0.147]
TNC (ng/ml)	96.45 ± 46.94 [85.08, 28.50 – 248.01]	91.99 ± 44.04 [78.16, 28.50 – 230.23]	115.93 ± 56.15 [122.71, 52.33 – 248.01]	0.128 [0.134]
ES (ng/ml)	89.44 ± 44.88 [76.05, 70.67 – 319.55]	80.41 ± 26.84 [73.62, 30.67 – 146.12]	128.85 ± 78.80 [100.23, 63.26 – 319.55]	< 0.001 [0.009]
TK (U/L)	20.00 ± 24.64 [13, 2.5 – 156]	16.44 ± 10.48 [13, 2.5 – 49]	35.31 ± 51.82 [11, 3 – 156]	0.021 [0.778]

表 8 各バイオマーカー候補毎の ROC 解析

	カット オフ値	AUC	AUC 95%信頼区間		p 値
			下限値	上限値	
hsTnT (ng/ml)	0.03	0.752	0.593	0.911	0.061
H-FABP (ng/ml)	1.0	0.598	0.401	0.794	0.470
NT-proBNP (pg/ml)	537.0	0.796	0.643	0.950	0.084
PTX3 (ng/ml)	1.5	0.681	0.515	0.847	0.269
sST2 (ng/ml)	11.1	0.830	0.667	0.994	0.015
Ang-2 (ng/ml)	4.2	0.756	0.568	0.943	0.010
MMP-2 (ng/ml)	1160.0	0.642	0.431	0.853	0.062
TNC (ng/ml)	122.7	0.646	0.454	0.838	0.138
ES (ng/ml)	87.2	0.753	0.598	0.908	0.024
TK (U/L)	9.4	0.527	0.325	0.730	0.077

表 9 NT-proBNP 値および sST2 値と予後との関係

	リスク比	リスク比 95%信頼区間		p 値
		下限値	上限値	
NT-proBNP higher (≥ 537 pg/ml)	10.9	1.4	85.3	0.023
sST2 higher (≥ 11.1 ng/ml)	24.6	3.1	192.9	0.002
Both NT-proBNP and sST2 higher	14.4	3.1	66.7	0.001

死亡をエンドポイントとして解析した。

表 10 NT-proBNP 値および sST2 値のカットオフ値による分類

		NT-proBNP	
		Lower	Higher
sST2	Lower	0/26	1/11
	Higher	1/5	9/17

数値は 死亡症例数/全症例数 を示す。

表 11 NT-proBNP 高値群 28 症例の予後に対する sST2 値の影響

	リスク比	リスク比 95%信頼区間		p 値
		下限値	上限値	
sST2 higher (≥ 11.1 ng/ml)	8.9	1.1	70.4	0.0387

NT-proBNP 高値群 28 症例を sST2 のカットオフ値 11.1 ng/ml によって 2 群に分け、死亡をエンドポイントとして Cox の比例ハザードモデルで解析した。