

と考えられる。今回、フォンタン術後遠隔期の現状を把握するために成人期（20歳以上）に達した本症候群の現状について診療録を後方視的に調査し、今後の患者管理向上の一助とすることが目的である。

【研究対象】

フォンタン術後成人期（20歳以上）に達した内臓錯位症候群33例（死亡2例を含む）とした。

【研究方法】

方法は、1. 患者プロフィール、2. NYHAクラス分類、就学就職状況及び婚姻状況、3. 心機能評価：A) 心臓カテーテル検査：中心静脈圧、心係数および肺血管抵抗、B) 心エコー検査：心室駆出率とTEI index、C) 運動負荷試験：最高酸素摂取量、D) 血中BNP濃度、4. 経皮酸素飽和度の経年的変化、5. 肝機能；生化学検査でのAST、ALT、 γ -GTP、T.B.、総胆汁酸、P-III-P、4型collagenおよびヒアルロン酸、6. 合併症：不整脈と肺動静脈瘻、7. 内服薬状況；ワーファリン、アスピリン、ACE阻害薬、アンギオテンシン受容体拮抗薬および β 遮断薬の内服率、8. 死亡症例について調べた。

【研究結果】

1. 患者プロフィール（表1）

年齢は、中央値23歳9か月、年齢範囲20歳から32歳であった。フォンタン手術時年齢は、中央値7歳8か月、年齢範囲2歳から15歳であった。性別は、男性15（死亡1）例、45.5%、女性18（死亡1）例、54.5%であった。心室形態は、右室性単心室27（死亡2）例、81.8%、左室性単心室5例、15.2%、C型単心室1例、3.0%であった。また、33例中8例、24.2%に下大静脈欠損の合併を、3例、9.1%に総肺静脈還流異常の合併を認めた。フォンタン術式は、心外導管法15（死亡1）例、45.5%、ラテラルトンネル法17（死亡1）例、51.5%、心内導管法1例、3.0%であった。

2. NYHAクラス分類、就学就職状況および婚姻状況（図1）

NYHAクラスは、クラスIが80.4%、クラスIIが19.6%であった。学生が24.2%、full time workerが54.5%、part time workerが12.1%、無職が9.3%であった。また、未婚者が90.9%、既婚者が9.1%であった。

3. 心機能評価

A) 心臓カテーテル検査 (図2)

中心静脈圧は、平均9.6 mmHg、圧範囲は、6から13 mmHgであった。心係数は平均2.8 L/分/m²、範囲は1.8から6.3 L/分/m²であった。肺血管抵抗は、平均1.3 wood·u/m²、範囲は0.6から2.5 wood·u/m²であった。

B) 心エコー検査 (図3)

心室駆出率は、平均57%、範囲は36から73%であった。TEIindexは、平均0.51、範囲は0.23から1.18であった。

C) 運動負荷試験 (図4)

トレッドミル運動負荷試験 (Bruce プロトコール) は、性・年齢を一致させた健常者を対照群とし、その% of normal 値で表現した。日常生活活動性の指標である最高酸素摂取量は男性12例で、平均74.6% of normal、女性10例で、平均71.5% of normal、また、β遮断薬内服者11例で、平均73.8% of normal、非内服者11例で、平均72.6% of normal であり、男女間、β遮断薬内服の有無別による統計学的有意差は認めなかった。

D) 血中BNP濃度 (図5)

測定できた31例で、平均47.0 pg/mL であった。また、左室性か右室性かの心室別による測定値はそれぞれ、平均39.2と49.7 pg/mL であった。両群間には有意差を認めなかった。

4. 経皮酸素飽和度の経年的変化 (図6)

心外導管法とラテラルトンネル法別で術後早期、6か月、1年、2年、3年、4年、5年、7年、10年、12年および15年後のSpO₂計測をおこなったが、全経過を通じ概ね90%以上を保っており、低酸素血症の状態としては安定していた。

5. 肝機能検査 (図7, 8)

生化学検査のAST、ALT、γ-GTP および総ビリルビン値 (T. B) は、平均値でASTが26 IU/L、ALTが23 IU/L、γ-GTPが71 IU/L、総ビリルビン値が1.2 mg/dL であった。また、肝うつ血や線維化指標である総胆汁酸、P-III-P (プロコラーゲンIIIペプチド)、4型コラーゲンおよび

ヒアルロン酸は平均値で総胆汁酸が $10.7 \mu\text{mol/L}$ 、P-III-P が 0.6U/ML 、4型コラーゲンが 176ng/mL およびヒアルロン酸が 39ng/mL であった。

6. フォンタン術後遠隔期の合併症（表2）

フォンタン術後に治療を要する不整脈として、心房頻拍が3症例認められた。いずれも β 遮断薬を内服していた。また、肺動静脈瘻による低酸素血症を4症例に認めたが、いずれも下大静脈欠損症例であった。

7. 内服状況（図9）

当院では、フォンタン術後症例において抗凝固、抗血小板および心筋保護療法は基本的治療法である。今回の33症例の中で、抗凝固薬（ワーファリン）は、90.9%、抗血小板薬（アスピリン）は72.7%、ACE阻害薬は39.4%、アンギオテンシン受容体拮抗薬は36.4%および β 遮断薬は42.4%の使用率であった。

8. 死亡症例

死亡症例は2例で、一例は男性で診断は右室性単心室、肺動脈閉鎖、12歳8か月時にラテラルトンネル法によるフォンタン術をうけたが、術後心室機能があまりよくない状況で外来フォローを行っていた。高校卒業後 full time で就労していた。しかし、過労がきっかけで27歳時に肺出血のため死亡した。他例は女性で診断は右室性単心室、肺動脈閉鎖、総肺静脈還流異常（心臓型）、4歳10か月時に心外導管法によるフォンタン術をうけたが、術後早期に左肺静脈閉塞を来し、さらに右肺動静脈瘻のため低酸素血症を来し、低酸素血症悪化のため20歳時に死亡した。

【考 察】

外科手術手技、周術期管理法、遠隔期内科的管理法などの向上に伴い、成人期に達する先天性心疾患患者が年々増加し、成人循環器科領域においても患者管理を回避できない数に達してきている。その中で、フォンタン術後症例は、肺循環への駆出心室がないフォンタン循環という特殊な循環動態を示す一群であり、特に小児循環器医と成人循環器医との綿密な情報交換を要し、長期的な患者管理を実施する必要がある患者群である。しかし、本邦ではその移行がスムーズにできているとは言い難く、早期の診療体系の構築が切望される。今回、その一群の中で、内臓錯位症候群の成人期に達したフォンタン術後症例の患者状況を調査した。

日常生活状況では、80%の症例が、NYHAクラスIで、67%の症例が full timeあるいはpart timeいずれかの形で就労していた。また、9%が結婚していた。患者管理として、就労内容を把握し、本人の循環動態に見合った就労にこころがけるよう助言し、脱水予防、規則的な生活（睡眠不足の回避、禁煙など）、感染予防など日々啓蒙することに勤める必要がある。また、既婚者とくに女性では、妊娠出産について患者本人と綿密な、可能であれば産科医の協力も受けながら話し合いを行い、挙児計画をたてることが肝要で、成人領域の医療関係者の参加が不可避と考える。

今回の33症例では、心機能について、心臓カテーテル検査や心エコー検査では、概ねフォンタン術後遠隔期症例として安定した結果であった。また、術後15年程度は90%以上の酸素飽和度が維持されていることが判明した。

次に、今回の症例では、中心静脈圧が平均10mmHgでフォンタン循環としては比較的良好な状態といえるが、この値は正常よりは高く、確実に肝うっ血が存在すると考えられる。また、フォンタン術後症例では若年層で心臓性肝硬変、肝癌を発症した報告もあり、成人期に達した症例では長期にわたるうっ血肝状況を把握する必要がある。定期的な肝臓に焦点をあてた検査を行う必要がある。今回行った通常の生化学検査に加え、胆汁うっ滞や肝線維化マーカーおよび画像評価（腹部エコーや腹部CT検査）を定期的に行い、専門医との連携をとることが大切となろう。

さらに、術後遠隔期の心臓自体の問題として、治療を要する不整脈があげられる。現在、本邦では、心外導管法によるフォンタン術が行われる割合が増えているが、術後の頻拍性不整脈で薬物抵抗性であれば、非薬物治療としてのカテーテルアブレーション治療が望まれる。しかし、心房性頻拍であればアクセスルートの問題で治療不能な症例も存在し、そのような症例をいかに治療するか今後の課題といえよう。また、今回の調査で判明したように術後に発生した低酸素血症の原因が肺動静脈瘻（肺内短絡）によるものがある。これらは下大静脈欠損例で、いわゆるhepatic factorをいかにフォンタン術後両側肺野に均等に流れるよう肝静脈血流路を作製するかが課題であり、さらなる術式の工夫が必要と考えられる。

2005年のACC/AHAの心不全治療ガイドラインでは、症状として発症する前の危険因子を有するのみの患者群（Stage A）でさえも、RAS系抑制剤（アンギオテンシン変換酵素阻害剤、アンギオテンシン受容体拮抗剤）の投与が推奨されている。フォンタン術後（循環）は肺循環と体循環がひとつの心室で直列に駆動される非生理循環で、ACC/AHA分類ではあきらかにStage B（無症状であっても器質的心臓血管の異常がある）である。遠隔期に導管内や盲端となった血管内、死腔となった心内に血栓形成および塞栓子の飛散による肺梗塞や脳梗

塞など重大な合併症の報告が散見されるが、フォンタン循環は凝固能異常（過凝固状態）が報告されており、当院では抗凝固と抗血小板療法を徹底している。ただ、この点についてはまだ、意見の一致をみていないことも事実である。今回の報告で言えることは、抗凝固・抗血小板療法と質のよい患者生活を保つための良好な心機能維持に向けての心血管保護療法は術後遠隔期ことに成人領域に達した症例においては、ますます重要性が高まると考えられる。

総括として、成人期に達した内臓錯位症候群では、良好な心室機能維持に努め、不整脈や肺動静脈瘻による低酸素血症に注意し、また、うっ血肝障害、日常生活での脱水予防、感染対策(歯科口腔衛生維持、ピアスの防止)などが重要で、外来での繰り返しの患者啓蒙が大切である。

【結論】

成人期に達したフォンタン術後内臓錯位症候群症例は、現状、ほぼ満足いく日常生活を送れているが、質のよい生活維持のためには、あらゆる角度から患者状態を把握する必要があるとあり、循環器専門医だけでなく産科、消化器科、肝臓科、腎臓科、精神科などの専門医と連携し、総合的な患者管理が要求される。

【研究発表】

研究発表なし。

【知的財産権の出願・登録状況】

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

福岡市立こども病院・感染症センター
201202015

表1 患者プロフィール

- 33 例(死亡2例) -

年齢	中央値	23歳9か月 (20歳~32歳)
フォンタン術時年齢	中央値	7歳8か月 (2歳~15歳)
性別		
男性	15(1)例	45.5%
女性	18(1)例	54.5%
心室形態		
右室性	27(2)例	81.8
左室性	5例	15.2
C型	1例	3.0
IVC欠損	8例	24.2
心外型TAPVC合併	3例	9.1
フォンタン術式		
TCPC-EC	15(1)例	45.5
EC conversion; 2例 (LT→EC:2例)		
TCPC-LT	17(1)例	51.5
TCPC-IC	1例	3.0

図1 NYHA クラス分類、就学就職、婚姻状況

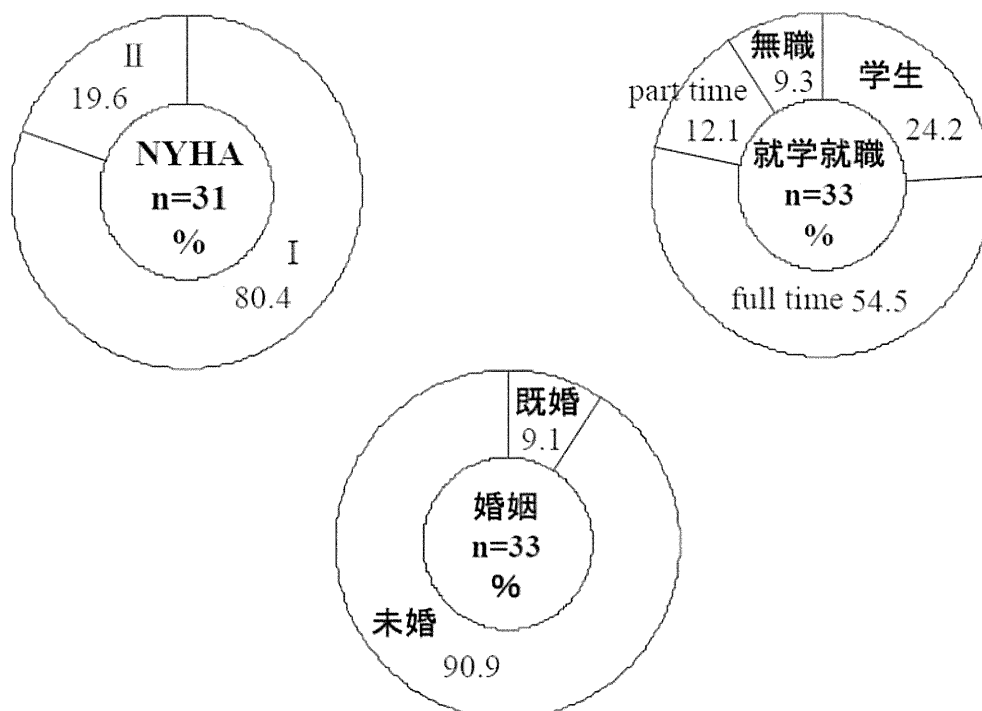


図2 3-A) 心臓カテーテル検査

n=12

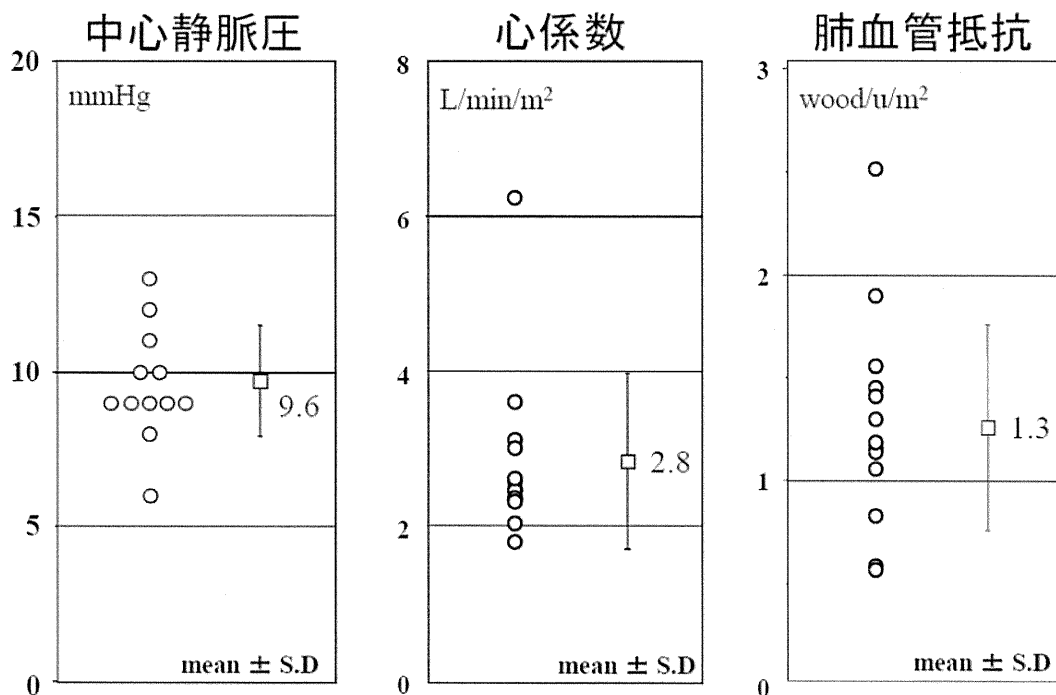


図3 : 3-B) UCG検査

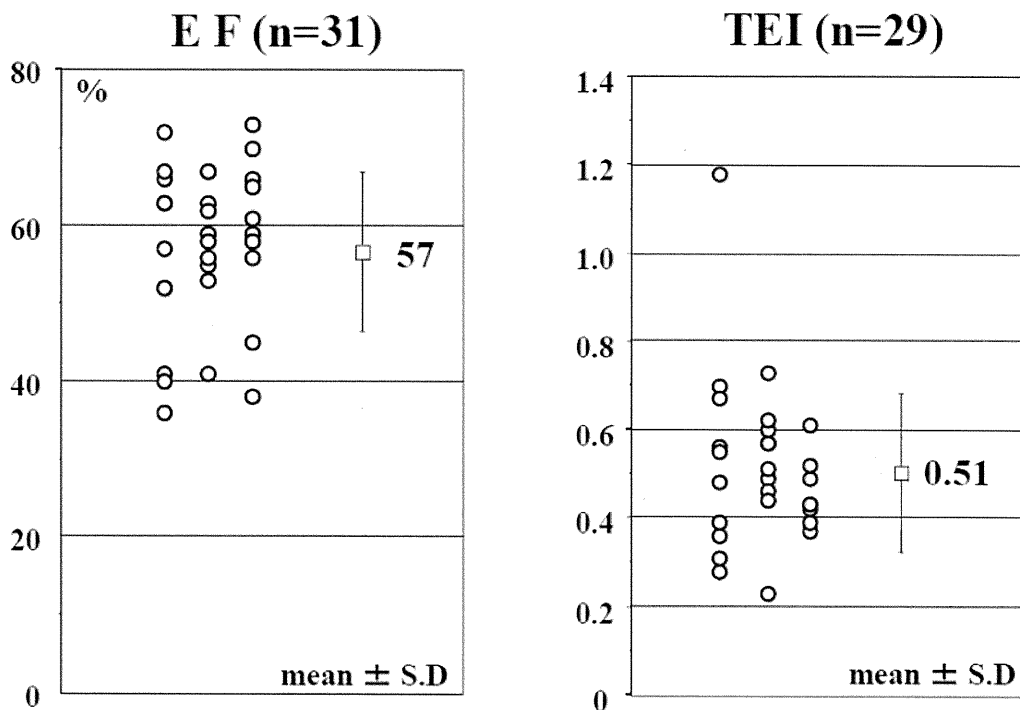


図4 3-C) Exercise tolerance test (peak VO2)

Treadmill, Bruce protocol, self-limited peak exercise
 性・年齢を一致させた健常群を対照群

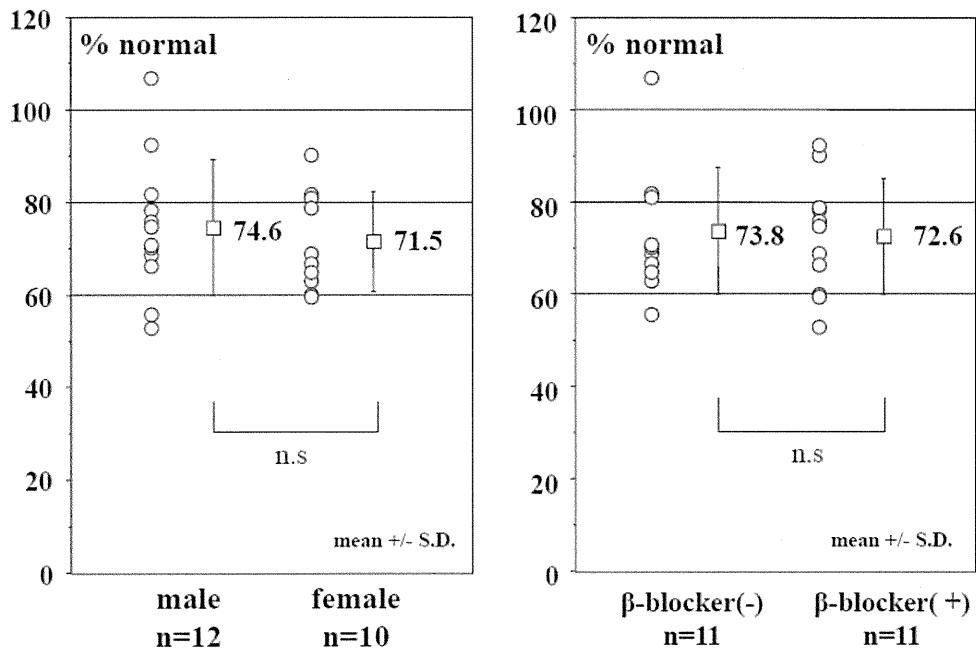


図5 3-D) 血漿BNP濃度(最新)

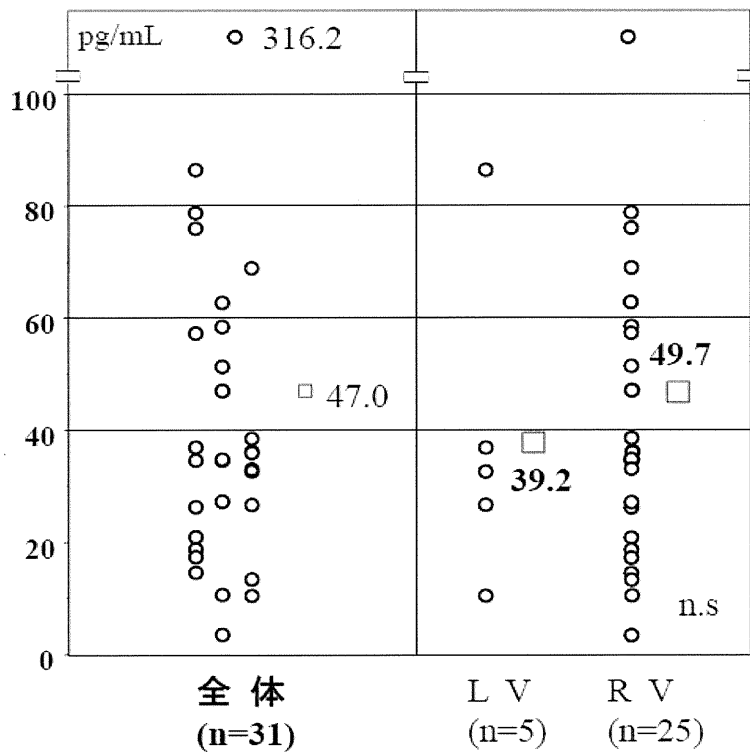


図6 4. 経皮酸素飽和度の経年的変化

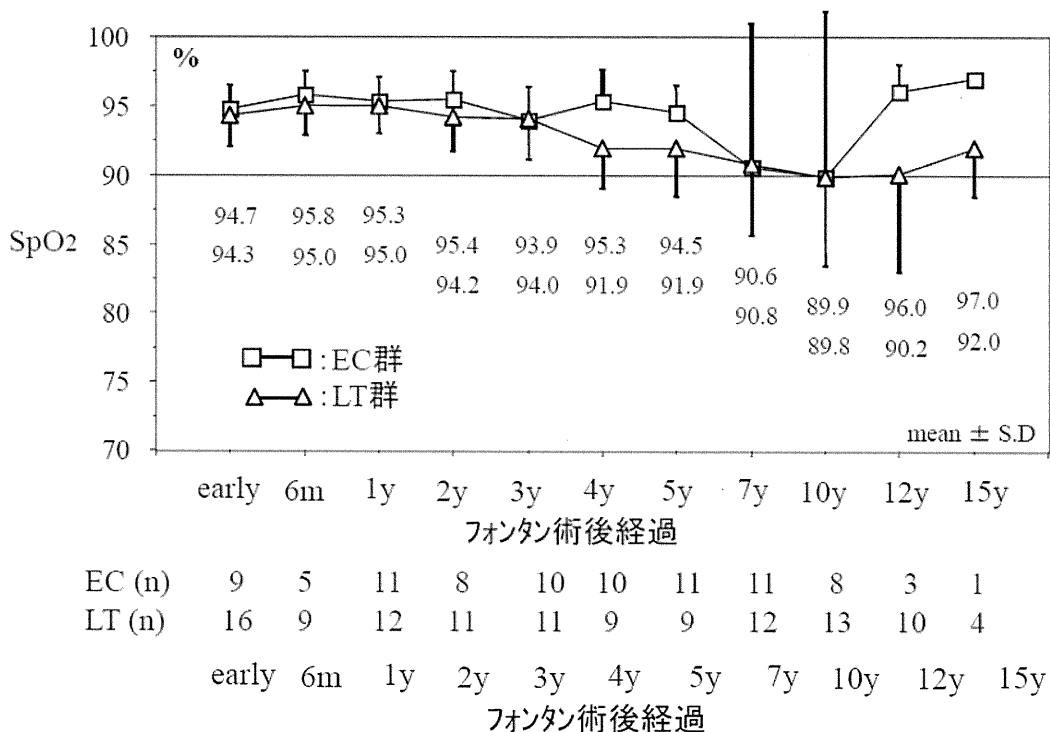


図7 5. 肝機能検査 - 1

血液生化学検査

n=31

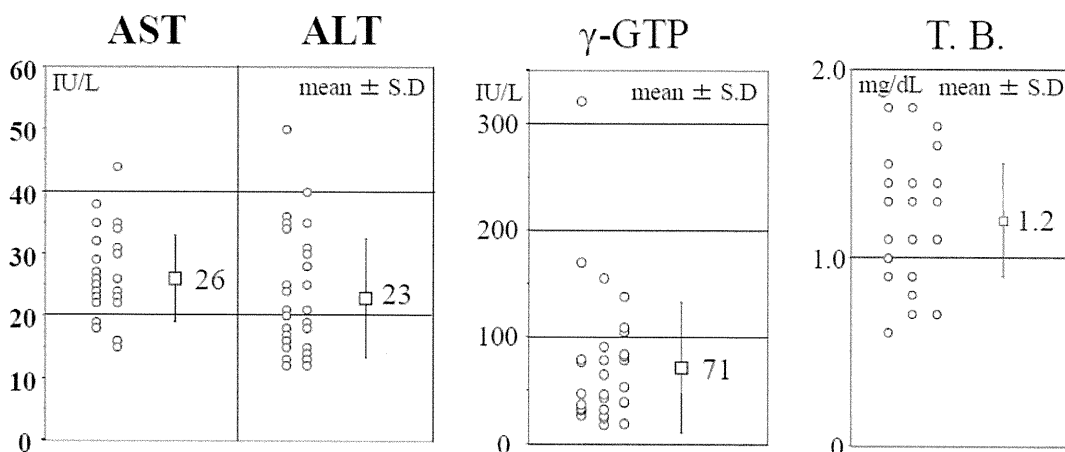


図8 5.肝機能検査 - 2

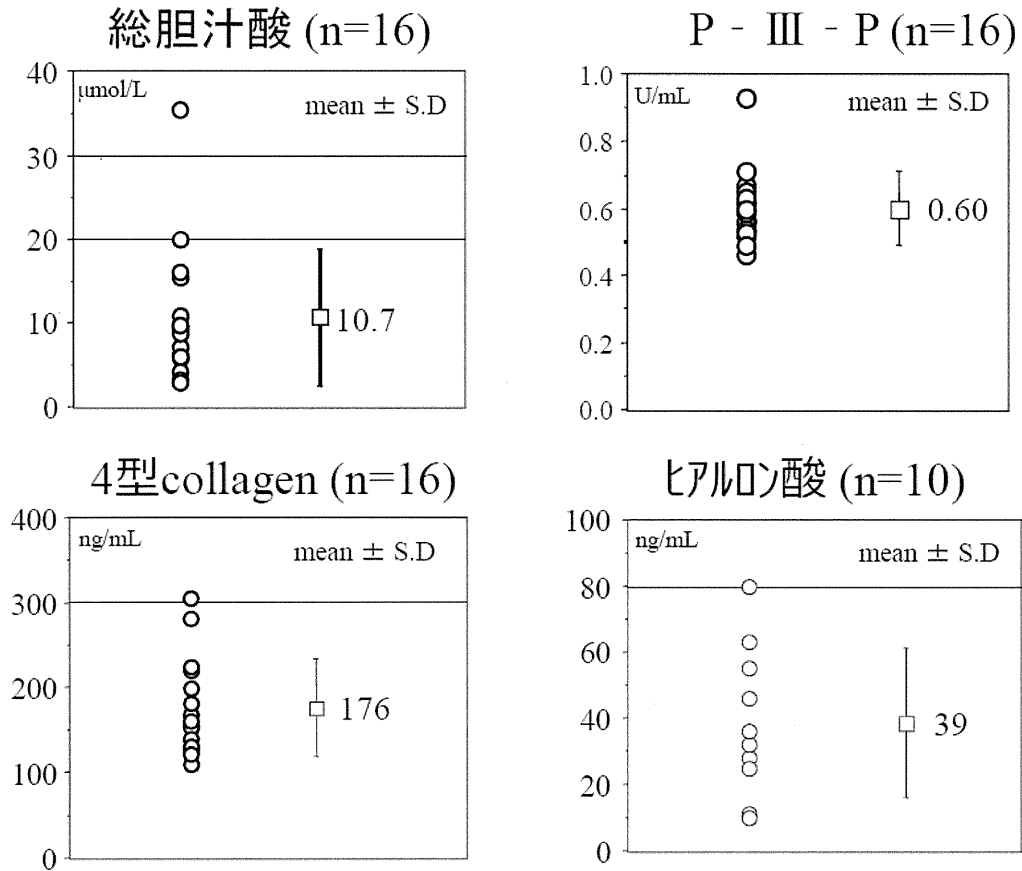


表2 6.フォンタン術後遠隔期の合併症

不整脈: 3 例

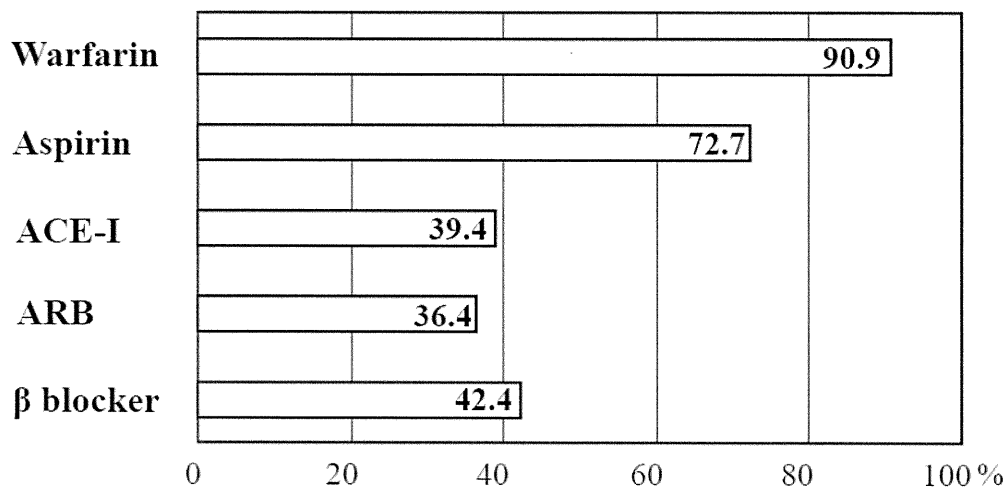
age	性	診 断	術式	種類	発症時期	不整脈治療
24y	F	SRV,CAVC,PA,IVC defect, dex.	LT	AT	術後5年8か月	βblocker
20y	M	SRV,CAVC,hypo LV, PA	LT	AT	術後12年	βblocker
26y	F	SRV,CAVC,PA, TAPVC	EC	AT	術後9か月	βblocker

肺動静脈瘻(低酸素血症): 4例

age	性	診 断	術式	発症時期	最新SpO2
22y	F	DORV, PA, IVC defect	EC	術後4年6か月	80
23y	F	TGA(III), IVC defect, dextrocardia	LT	術後6年9か月	75
24y	F	SRV, CAVC, PA, IVC defect, dextro.	LT	術後5年3か月	76
21y	F	SRV, CAVC, DORV, PS, IVC defect	LT	術後7年6か月	88

図9 7.内服状況

当院では、フォンタン術後症例には、ワーファリン、アスピリン及び心筋保護療法 (ACE-I/ARB/ β 遮断薬) は基本的治療法である。



V 研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
瀧山亮平、 山岸敬幸	チアノーゼ	五十嵐隆	小児科診療ガイドライン(第2版)	総合医学社	東京	2011	26-30
山岸敬幸、 仲澤麻紀	循環器疾患	五十嵐隆	小児科臨床ピクシス26 小児慢性疾患のサポート	中山書店	東京	2011	18-24
土橋隆俊、 山岸敬幸	EBM に基づく先天性心疾患へのアプローチ分子発生遺伝学から考える診断・病態・管理	五十嵐隆	EBM 小児疾患の治療 2010-2011	中外医学社	東京	2011	60-69
小川俊一	「心室中隔欠損症」、 「房室中隔欠損症」	水野杏一、安武正弘、平山悦之	循環器内科学	シュブリンガー・ジャパン株式会社	東京	2010	271-277
小川俊一	「その他の先天性心疾患」	水野杏一、安武正弘、平山悦之	循環器内科学	シュブリンガー・ジャパン株式会社	東京	2010	290-297

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawaguchi N, Hayama E, Furutani Y, and <u>Nakanishi T</u>	Prospective In Vitro Models of Channelopathies and Cardiomyopathies.	StemCells International Review			in press
Chida A, Shintani M, Yagi H, Fujiwara M, Kojima Y, Sato H, Imamura S, Yokozawa M, Onodera N, Horigome H, Kobayashi T, Hatai Y, Nakayama T, Fukushima H, Nishiyama M, Doi S, Ono Y, Yasukouchi S, Ichida F, Fujimoto K, Ohtsuki S, Teshima H, Kawano T, Nomura Y, Gu H, Ishiwata T, Furutani Y, Inai K, Saji T, Matsuoka R, Nonoyama S, <u>Nakanishi T</u>	Outcomes of Childhood Pulmonary Arterial Hypertension in BMPR2 and ALK1 Mutation Carriers.	Am J Cardiol			in press
Chida A, Shintani M, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Inai K, Saji T, Nonoyama S, <u>Nakanishi T</u>	Missense Mutations of the BMPR1B (ALK6) Gene in Childhood Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension.	Circ J		Epub ahead of print	2012
Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Ishihara K, Oda M, Makino S, Fukuda K, Takahashi T, Nakanishi T, Matsuoka R, <u>Yamagishi H</u>	Genetic Analysis of Essential Cardiac Transcription Factors in 256 Patients with Non-Syndromic Congenital Heart Defects.	Circulation Journal		Epub ahead of print	2012
Nakayama Y, Hiramatsu T, Iwata Y, Okamura T, Konuma T, Matsumura G, Suzuki K, Hobo K, <u>Nakanishi T</u> , Kurosawa H, Yamazaki K	Surgical results for functional univentricular heart with total anomalous pulmonary venous connection over a 25-year experience.	Ann Thorac Surg.	93(2)	606-13	2012
Ishibashi N, Park I, Waragai T, Yoshikawa T, Murakami Y, Mori K, Mimori S, Ando M, Takahashi Y, Doi S, Mizukami S, <u>Nakanishi T</u>	Effect of carvedilol on heart failure in patients with a functionally univentricular heart.	Circulation J	75	1394-1397	2011
Tateishi M, Hiramatsu T, Tomizawa Y, Matsumura G, Konuma T, Yamazaki K, Yamamura H, <u>Nakanishi T</u>	Cardiac tamponade due to perforation by an Amplatzer septal defect occluder in a patient with Marfan syndrome.	J Artificial Organs	14	261-263	2011
<u>Nakanishi T</u> , Sun F, Momma K, Matsuoka R	Dilatation of the ductus arteriosus by nicotandil.	Therapeutic Research	32	273	2011
Obayashi K, Mityagawa-Tomita S, Matsumoto H, Kodama H, <u>Nakanishi T</u> , Hirose H	Effects of transforming growth factor-beta3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs.	Am J Vet Res	72	194-202	2011
Higaki T, Kodo C, Tomimatsu H, Yamamura E, Yamamoto E, Konishi K, Nagashima M, <u>Nakanishi T</u>	Asynchronous contraction of the 2 ventricles caused by ventricular pacing after a Fontan-type operation in a patient with a biventricular heart.	International J Cardiology	150	e116-118	2011
Nakazawa M, Uchida K, Aramaki M, Kodo K, Yamagishi C, Takahashi T, Mikoshiba K, <u>Yamagishi H</u>	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are essential for the development of the second heart field.	Journal of Molecular Cellular Cardiology	51	58-66	2011
Maeda J, <u>Yamagishi H</u> , Furutani Y, Mitsuhiro Kamisago, Tadashi Waragai, Shinji Oana, Hiroki Kajino, Hiroyuki Matsuura, Katsuhiko Mori, Rumiko Matsuoka, Toshio Nakanishi	The Impact of Cardiac Surgery in Patients with Trisomy 18 and Trisomy 13 in Japan.	American Journal of Medical Genetics	155A	2641-2646	2011
Tsuchihashi T, Maeda J, Shin CH, Ivey KN, Black BL, Olson EN, <u>Yamagishi H</u> , Srivastava D	Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis.	Developmental Biology	351	62-69	2011

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, <u>Yamagishi H</u> , Srivastava D, Bagchi MK, Bagchi IC	The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2.	Science	331	912-916	2011
Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogihara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T, <u>Takehima H</u>	TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance.	Cell Metab.	14	231-241	2011
Elisa Venturi, Kazuhiro Mio, Miyuki Nishi Toshihiko Ogura, Toshio Moriya, Samantha J. Pitt, Kazutaka Okuda, Sho Kakizawa, Rebecca Sitsapesan, Chikara Sato, and <u>Hiroshi Takeshima</u>	Mitsugumin 23 forms massive bowl-shaped assembly and cation-selective channel.	Biochemistry	50	2623-2632	2011
Sun F, Hayama E, Katsube Y, Matsuoka R, <u>Nakanishi T</u>	The role of the large-conductance voltage-dependent and calcium activated potassium channels in the regulation of rat ductus arteriosus tone.	Heart & Vessels	25	556-564	2010
Tomita H, <u>Nakanishi T</u> , Hamaoka K, Kobayashi T, Ono Y	Stenting in congenital heart disease.	Circulation J	74	1676-1683	2010
Toyoshima K, Momma K, <u>Nakanishi T</u>	In vivo dilatation of the ductus arteriosus induced by furosemide in the rat.	Ped Res	67	173-176	2010
<u>Shunichi Ogawa</u>	Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease (JCS 2008) JCS Joint Working Group.	Circ J	74	1989-2020	2010
Toyoshima K, Momma K, <u>Nakanishi T</u>	Fetal Reversed Constrictive Effect of Indomethacin and Postnatal Delayed Closure of the Ductus Arteriosus following Administration of Transplacental Magnesium Sulfate in Rats.	Neonatology	96	125-131	2009
Kajimoto H, Nakazawa M, Murasaki K, Hagiwara N, <u>Nakanishi T</u>	Increased P-selectin expression on platelets and decreased plasma thrombomodulin in Fontan patients.	Circ J	73	1705-1710	2009
Momma K, Toyoshima K, Ito K, Sugiyama K, Imamura S, Sun F, <u>Nakanishi T</u>	Delayed neonatal closure of the ductus arteriosus following early in utero exposure to indomethacin in the rat.	Neonatology	96	69-79	2009
<u>山岸敬幸</u> 、柴田映道	成人期の先天性心疾患の理解に必要な形態学-発生と解剖-1) 小児期の先天性心疾患 -術前例を中心に	新・心臓病診療プラクティス 18 大人になった先天性心疾患			2012
<u>小川俊一</u>	一診断と治療の進歩-XV. 川崎病の診断・治療の現状	冠動脈疾患(下)		529-535	2011
<u>小川俊一</u>	川崎病後遺症の診断と治療のガイドラインのポイント	日本臨床	69 (Suppl 9)	529-535	2011
<u>小川俊一</u>	特集 川崎病の本体にせまる -古くて新しい研究から-II. 検査にせまる (検査結果から本態にせまる)「冠循環」	小児科診療	79	1163-1170	2011
<u>小川俊一</u> 、落 雅美	冠動脈障害を有する川崎病既往者の冠循環動態および侵襲的治療前後の冠循環動態を考察する	J Jpn Coron Assoc	17	66-74	2011
<u>山岸敬幸</u>	先天性心疾患の遺伝子研究 進歩する心臓研究	Tokyo Heart Journal	58	31-39	2011

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
内田敬子、 <u>山岸敬幸</u>	心臓の発生・発達とカルシウムシグナル	心臓	43	615-619	2011
柴田映道、 <u>山岸敬幸</u>	身体所見の取り方：血圧測定、脈の触診。乳幼児診療 A to Z	小児科	52	551-556	2011
<u>小川俊一</u>	特集：成人期における川崎病冠動脈瘤を考える 「急性期一回復期—成人期の虚血性心疾患を考察する」	Vascular Medicine	6	15-21	2010
<u>小川俊一</u>	学校心臓検診で育った日本の子どもたち「先天性心疾患」	心臓	42	163-169	2010
<u>小川俊一</u>	川崎病後冠動脈狭窄のカテーテル治療	小児科	51	403-410	2010

VI 研究成果の刊行物・別冊



Missense Mutations of the *BMPR1B* (*ALK6*) Gene in Childhood Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension

Ayako Chida, MD; Masaki Shintani, PhD; Tomotaka Nakayama, MD; Yoshiyuki Furutani, PhD;
 Emiko Hayama, PhD; Kei Inai, MD, PhD; Tsutomu Saji, MD, PhD;
 Shigeaki Nonoyama, MD, PhD; Toshio Nakanishi, MD, PhD

Background: Mutations in the bone morphogenetic protein receptor type 2 (*BMPR2*) gene, the activin receptor-like kinase 1 (*ALK1*) gene, and *SMAD8* gene have been reported in heritable pulmonary arterial hypertension (HPAH) and in idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH). However, almost 30% of HPAH cases and 60–90% of IPAH cases have no mutations in those genes. This suggests that there remain unidentified genes associated with HPAH and IPAH.

Methods and Results: This study screened for mutations in *endoglin*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6*, *SMAD7*, bone morphogenetic protein receptor type 1A (*BMPR1A*) and bone morphogenetic protein receptor type 1B (*BMPR1B*) genes in 43 IPAH patients who had no mutations in *BMPR2*, *ALK1* and *SMAD8*. Two missense mutations (c.479 G>A S160N, c.1176 C>A F392L) in *BMPR1B* were each identified in 2 IPAH patients. Immunoblot analysis revealed that the *BMPR1B* F392L protein promoted *SMAD8* phosphorylation. The response to BMP was analyzed using promoter-reporter activities. The transcriptional activation of the *BMPR1B* F392L protein with *SMAD8* increased above that of wild-type *BMPR1B* with *SMAD8*, and those of *BMPR1B* S160N and F392L with *SMAD8* and *SMAD4* were each increased above those of the wild-type *BMPR1B* with *SMAD8* and *SMAD4*.

Conclusions: We identified 2 novel mutations in *BMPR1B* in 2 patients with IPAH. Our study suggests that *BMPR1B* mutations are associated with the pathogenesis of IPAH.

Key Words: *BMPR1B*; Gain-of-function; Gene mutation; Pulmonary arterial hypertension

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive, severe, potentially fatal disease with an estimated incidence of approximately 1–2 patients per million per year.¹ In the absence of treatment, PAH leads to death with a median survival of 2.8 years for adults.²

Editorial p ???

The latest classification of PAH, the “Dana Point classification”, proposed 5 subgroups of PAH: idiopathic PAH (IPAH); heritable PAH (HPAH); drug- and toxin-induced PAH; PAH associated with other diseases such as collagen disease, HIV infection, portal hypertension, congenital heart disease, schistosomiasis and chronic hemolytic anemia; and persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN). IPAH corre-

sponds to sporadic disease in which there is neither a family history of PAH nor an identified risk factor.³

HPAH is inherited in an autosomal dominant fashion with 10–20% penetrance and affects females approximately twice as often as males.⁴

Bone morphogenetic protein (BMP) receptor 2 (*BMPR2*), a member of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, was identified as a primary gene for HPAH on chromosome 2q33 in 2000.^{5,6} *BMPR2* mutations have been identified in more than 70% of subjects with one or more affected relatives and 11–40% of IPAH.^{3,4}

Other studies of the TGF- β superfamily revealed 2 further genes responsible for PAH. Heterozygous mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (*ALK1*), located on chromosome 12q13, were demonstrated in patients with hereditary hemor-

Received November 8, 2011; revised manuscript received January 17, 2012; accepted January 24, 2012; released online February 25, 2012
 Time for primary review: 37 days

Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Tokorozawa (A.C., S.N.); Department of Pediatric Cardiology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo (A.C., M.S., Y.F., E.H., K.I., T. Nakanishi); and Department of Pediatrics, Toho University Medical Center, Omori Hospital, Tokyo (T. Nakayama, T.S.), Japan

Grant: none.

Mailing address: Toshio Nakanishi, MD, PhD, Department of Pediatric Cardiology, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan. E-mail: pnakanis@hij.twmu.ac.jp

ISSN-1346-9843 doi:10.1253/circj.CJ-11-1281

All rights are reserved to the Japanese Circulation Society. For permissions, please e-mail: cj@j-circ.or.jp

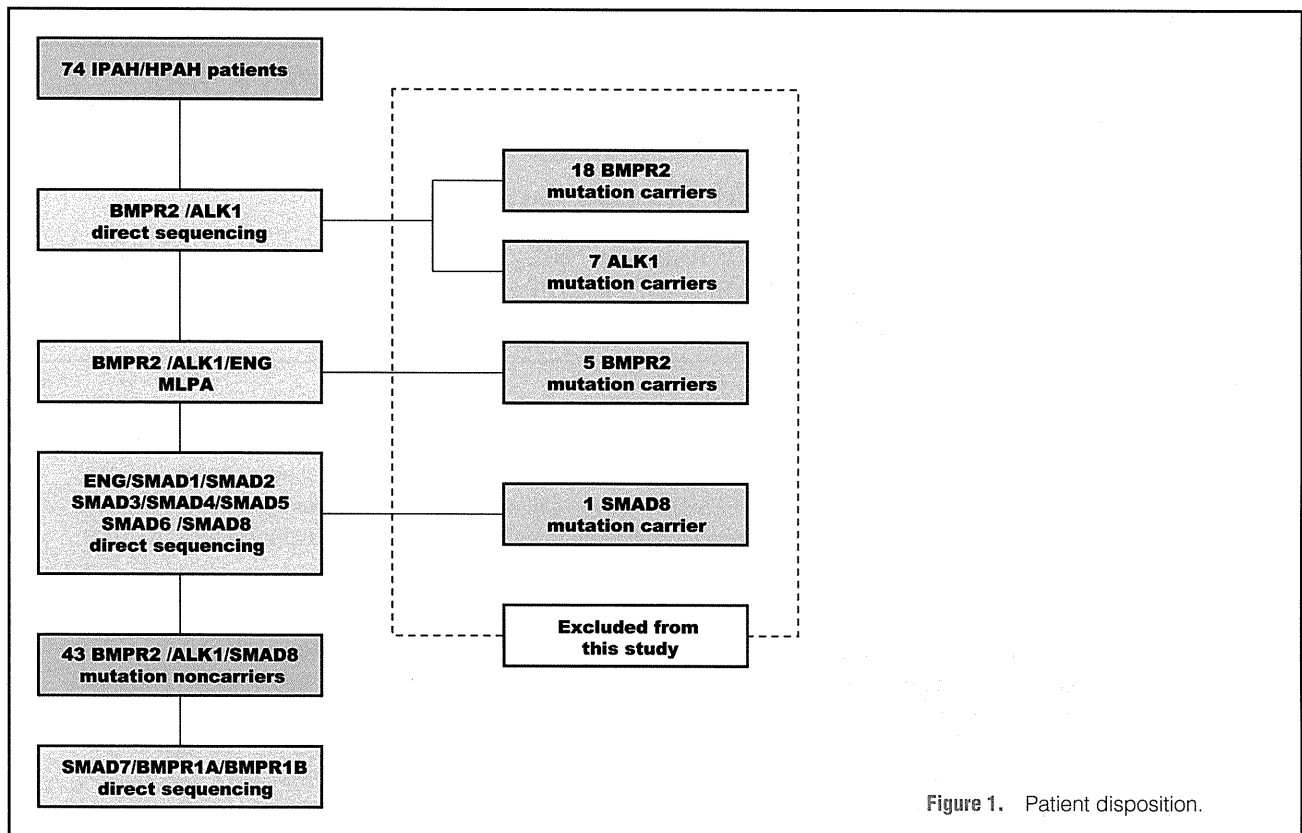


Figure 1. Patient disposition.

rhagic telangiectasia (HHT) in association with PAH in 2001.⁷ Furthermore, Harrison et al demonstrated a *ALK1* mutation in 1 IPAH patient without a family history of HHT in 2005.⁸ In addition, we reported 5 *ALK1* mutations in children with IPAH/HPAH.⁹ More rarely, mutations in *endoglin* (*ENG*) have been identified in patients with PAH, predominantly with coexistent HHT.^{10–13}

In 2009, we reported the first nonsense mutation of *SMAD8* in an IPAH patient who had no mutations in *BMPR2* or *ALK1*.¹⁴ In the same year, another group reported that pulmonary hypertension and lung tumorigenesis are promoted in *Smad8* mutant mice, which reinforced our hypothesis that *SMAD8* is involved in the pathogenesis of IPAH.¹⁵

These genetic studies have considerably increased our understanding of the molecular basis of PAH. However, almost 30% of HPAH cases and 60–90% of IPAH cases have no mutations in *BMPR2*, *ALK1*, *ENG* and *SMAD8*.

We hypothesized that other genes that belong to the TGF- β superfamily or other signal pathways (BMP/MAP kinase p38 pathway, Toll-like pathway, Rho-kinase pathway, and so on),^{16,17} might be associated with the onset of IPAH/HPAH. At the beginning, we attempted to screen for 10 genes: *ENG*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6*, *SMAD7*, BMP receptor type 1A (*BMPRIA*) and BMP receptor type 1B (*BMPR1B*), involved in the TGF- β /BMP signaling pathway in IPAH/HPAH patients who had no mutations in *BMPR2*, *ALK1* and *SMAD8*.

Methods

Subjects

Seventy-four unrelated IPAH/HPAH patients were recruited from Tokyo Women's Medical University, Toho University,

Tohoku University, Kagoshima University, Sakakibara Memorial Hospital, National Hospital Organization Nagasaki Medical Center, Social Insurance Chukyo Hospital, Toyama University, Keio University, Nagano Children's Hospital, Kyoto Second Red Cross Hospital, Tsukuba University, Hokkaido Children's Hospital and Medical Center, Gunma Children's Medical Center, Okinawa Prefectural Nambu Medical Center and Children's Medical Center, Okayama University, Oita University, Shizuoka Children's Hospital, Kitano Hospital and Beijing Anzhen Hospital (Figure 1). These subjects include 21 IPAH/HPAH patients from our previous study⁹ and 21 patients from the second cohort of another study.¹⁴ The diagnosis of IPAH/HPAH was made through clinical evaluation, chest radiography, electrocardiography, echocardiography and cardiac catheterization on the basis of current international consensus criteria; mean pulmonary artery pressure >25 mmHg at rest or >30 mmHg during exercise.¹⁸ Patients with PAH associated with another disease such as portal hypertension, congenital heart disease including small ventricular septal defect and atrial septal defect and PPHN were excluded from this study by trained cardiologists. This study was approved by an institutional review committee of Tokyo Women's Medical University. Written informed consent was obtained from all patients or their guardians in accordance with the Declaration of Helsinki.

Molecular Analysis

Genomic DNA was prepared from peripheral blood lymphocytes or lymphoblastoid cell lines transformed by the Epstein-Barr virus, as described previously.¹⁹ The *BMPR2* and *ALK1* coding regions and exon-intron boundaries were amplified from genomic DNA using primers, as described in previous reports (PRIMER information was obtained from Deng et

al⁶).²⁰ Amplified products were purified using the QIAquick polymerase chain reaction (PCR) purification method (QIAGEN, Hilden, Germany) and screened with bi-directional direct sequencing with a ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Eighteen *BMPR2* mutations and 7 *ALK1* mutations were detected by direct sequencing. Some of these results were described in previous reports.^{9,14}

After direct sequencing of *BMPR2* and *ALK1*, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was used to detect exonic deletions/duplications of *BMPR2*, *ALK1* and *ENG* in 49 patients who had no mutations in *BMPR2* and *ALK1*. MLPA was performed with 100 ng of genomic DNA according to the manufacturer's instructions using a SALSA MLPA HHT/PPH1 probe set (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Probe amplification products were run on an ABI 3130xl DNA Analyzer using a GS500 size standard (Applied Biosystems). MLPA peak plots were visualized using GeneMapper software v4.0 (Applied Biosystems). For each sample, peak heights of *BMPR2* probes were normalized against the sum of all control peaks. Patients' samples were then normalized to the mean of 3 normal control samples. MLPA analysis revealed that 5 of 49 patients had exonic deletions in *BMPR2*. Some of these results were described in previous studies.¹⁴ The 30 patients who had *BMPR2* or *ALK1* mutations were excluded from this study.

Among the 44 patients with no mutations in *BMPR2* or *ALK1*, all coding exons and adjacent intronic regions for *ENG*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6* and *SMAD8* were amplified using polymerase chain reaction. PCR amplified products were purified and directly sequenced like *BMPR2* and *ALK1*. *SMAD8* nonsense mutation was detected in 1 patient, as described previously.¹⁴ After the above mutation screening, we also screened *SMAD7*, *BMPRIA* and *BMPRIB* mutations for the remaining 43 patients by direct sequencing (Figure 1). Available data on the characteristics and hemodynamic parameters of the 43 patients with IPAH/HPAH are provided in Table S1 in the online supplement.

All sequences generated were compared with wild-type *BMPR2* (GenBank NM_001204), *ALK1* (GenBank NM_000020), *ENG* (GenBank NM_000118), *SMAD1* (GenBank NM_005900), *SMAD2* (GenBank NM_005901), *SMAD3* (GenBank NM_005902), *SMAD4* (GenBank NM_005359), *SMAD5* (GenBank NM_005903), *SMAD6* (GenBank NM_005585), *SMAD8* (GenBank NM_005905), *SMAD7* (GenBank NM_005904), *BMPRIA* (GenBank NM_009009) and *BMPRIB* (GenBank NM_001203).

When a mutation was detected, we confirmed that it was not present in 450 healthy controls by direct sequencing.

Preparation of Plasmid

Mouse pcDNA3.0-hemagglutinin (HA)-Bmpr1b, human pcDNA3.0-6xMyc-SMAD8, pcDNA3.0-SMAD4 and BMP-responsive promoter reporter construct 3GC2-Lux were kindly provided by Dr K. Miyazono (Tokyo, Japan). 3GC2-Lux contains 3 repeats of a GC-rich sequence derived from the proximal BMP response element in the *Smad6* promoter.²¹ We previously utilized the 3GC-Lux reporter gene for functional analysis of the SMAD8 mutant in PAH patients.¹⁴ In other reports, 3GC2-Lux has also been used to assess the interaction of genes belonging to the BMP signal pathway.²²⁻²⁴ Mouse constitutively active (ca) Bmpr1b was generated by mutation of Gln-203 into aspartic acid.

Site-directed mutagenesis was carried out using a site-directed mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA). The constructed plasmids were verified by sequencing. The antibodies used

were as follows: anti-HA rat antibody (Roche, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany), anti-Myc rabbit antibody (Cell Signaling Technology, MA, USA) and anti-phospho-Smad1/Smad5/Smad8 rabbit antibody (Cell Signaling Technology). A human BMP4 enzyme-linked immunosorbent assay was from R&D Systems (Abingdon, Oxon, UK).

Cells, Transfection and Western Blotting

COS1 cells were grown in DMEM/F-12 (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, New York, NY, USA) and 100 units/ml penicillin-streptomycin (Gibco). Transfection was performed with a Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For experiments on SMAD8 phosphorylation and gene expression, some of the cells were cultured in DMEM/F12 containing 0.1% FBS for 4 h, before the addition of human BMP4 in DMEM/F-12 containing 0.1% FBS for 1 h. Twenty-four h after transfection, the cells were lysed in lysis buffer (1 mol/L Tris-HCl [pH 8.0] 50 mmol/L, 0.5 mol/L EDTA 1 mmol/L [pH 8.0], 5 mol/L NaCl 120 mmol/L, NP-40 0.25%). For Western blotting, the lysates were separated on 10% resolving SDS-polyacrylamide gels, and proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane by semidry blotting. For phospho-SMAD8 and SMAD8 detection, the membranes were blocked in TBS-T (50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.6], 137 mmol/L NaCl, 0.1% [w/v] Tween 20) containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. The membranes were rinsed with TBS-T and incubated with primary antibody against phospho-SMAD1/SMAD5/SMAD8 (1:5,000), Myc-SMAD8 (1:30,000) and HA-BMPR1B (1:2,000) for 1 h at room temperature. The membranes were rinsed with TBS-T and incubated with HRP-goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) for phospho-Smad8 and Smad8 detection, or with anti-rat IgG (Rockland, Pennsylvania, USA) for *BMPR1B* detection. Blots were then washed with TBS-T and bound complexes were detected using enhanced chemiluminescence (ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare).

Luciferase Assay

COS1 was transfected using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) with 3GC2-Lux and wild-type or mutant pcDNA3.0-BMPR1B and/or pcDNA3.0-SMAD8 and/or pcDNA3.0-SMAD4. Some of the cells were treated with human BMP4 in DMEM/F-12 containing 0.1% FBS for 12 h. Twenty-four h after transfection, the cells were harvested. Firefly and renilla luciferase activities were measured with the Dual luciferase reporter assay (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Results are expressed as the ratio of firefly luciferase activity to renilla luciferase activity. All assays were performed in triplicate.

Immunocytochemistry

COS1 cells grown on glass coverslips were transfected with wild-type or mutant pcDNA3.0-HA-BMPR1B using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) 48 h after transfection. Cells were then fixed for 15 min at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS and washed 2 times with PBS. Cells were incubated in 3% BSA in TBS-T for 30 min at room temperature for blocking nonspecific binding. After blocking, cells were incubated with anti-HA rat antibody (Roche, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany; 1:3,000), at room temperature for 1 h. After washing, detection was achieved by incubation with anti-rat IgG antibody CY2 (Rockland; 1:3,000). Cells were mounted with Prolong Gold anti-