

図17. TCPC手術未施行時の予後

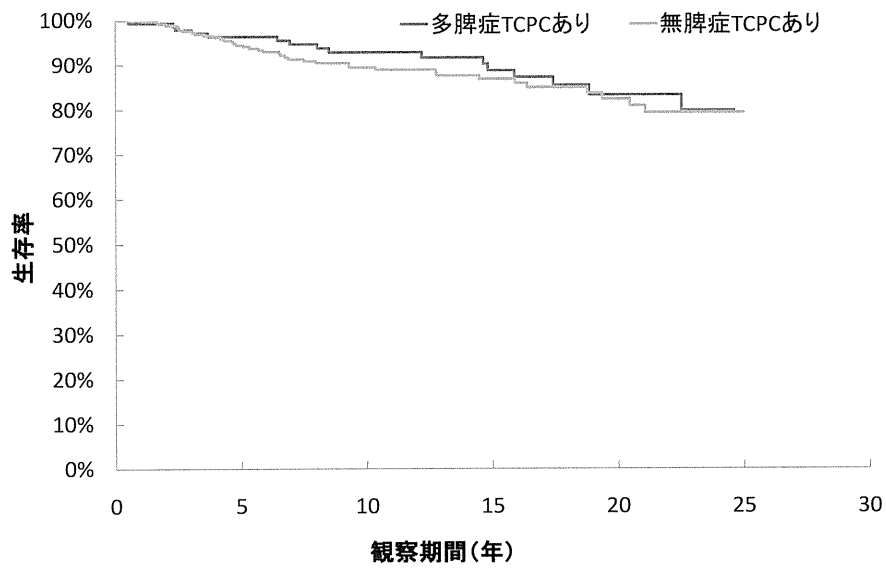


図18. TCPC手術施行時の予後

表 1.無脾症 698 例における心疾患内訳

(各症例での診断名は重複している)

心疾患	例数
共通房室弁	585
右室性単心室	373
単心房	371
右側大動脈弓	322
肺動脈狭窄	321
両側上大静脈	279
肺動脈閉鎖	257
両大血管右室起始	232
心房中隔欠損（一次孔）	72
心室中隔欠損	71
左右単心室	63
左上大静脈遺残	50
心房中隔欠損（二次孔）	39
左室性単心室	39
動脈管開存	37
右胸心	31
総肺静脈還流異常	28
大血管転換	19
肺高血圧（meanPAp>25mmHg）	18
主要大動脈肺動脈側副血行路	14
左室低形成	11
その他	183

表 2.多脾症 395 例における心疾患内訳

(各症例での診断名は重複している)

心疾患	例数
共通房室弁	141
肺動脈狭窄	127
心室中隔欠損	122
右室性単心室	110
単心房	108
両大血管右室起始	99
両側上大静脈	90
奇静脈結合	77
肺高血圧 (meanPAp>25mmHg)	60
左上大静脈遺残	53
肺動脈閉鎖	49
大動脈縮窄	43
心房中隔欠損 (二次孔)	40
心房中隔欠損 (一次孔)	18
大血管転換	17
動脈管開存	15
その他	146

表 3. 無脾症における重症感染症内訳

重症感染症	例数
菌血症	72
心内膜症	14
髄膜炎	14
脳膿瘍	9
肺炎	9
その他	36
	154

表 4. 多脾症における重症感染症内訳

重症感染症	例数
心内膜症	11
菌血症	9
脳膿瘍	6
肺炎	4
その他	8
	38

表5. 無脾症の重症感染症(n=131)における起炎菌

起炎菌	件数	頻度
肺炎球菌	31	24%
MRSA	10	8%
a-streptococcus	4	3%
真菌	3	2%
H.influenzae	2	2%

表6. 無脾症患者におけるワクチン及び抗生物質投与の効果

無脾症 698 人(そのうち重症感染者 131 人)

ワクチン接種者(ニューモバックス接種のみ)	110 人	5%
接種後重症感染症罹患患者(ニューモバックス接種のみ)	5 人	(7/110)
ワクチン接種者(プレベナー接種のみ)	15 人	0%
接種後重症感染症罹患患者(プレベナー接種のみ)	0 人	(0/15)
非ワクチン接種者	415 人	18%
重症感染者数	75 人	(75/415)

予防的抗生剤投与者	100 人	6%
内服期間中の重症感染症罹患患者	6 人	(6/100)
予防的抗生剤非投与者	440 人	19%
重症感染者数	83 人	(83/440)

表 7. 無脾症 手術施行時年齢

手術	例数	年齢
TCPC	321	4.79±5.25 (3d~38y)
Shunt	193	1.25±2.68 (1d~17y)
TAPVC	102	1.23±2.94 (0d~16y)
PAB	93	0.44±1.29 (1d~9y)
Glenn	76	3.80±5.87 (3m~30y)

## II 治療指針

## 内臓錯位症候群の疫学と治療実態に関する研究に基づいた

### 内臓錯位症候群の治療指針

#### ■概念

無脾症と多脾症からなる内臓錯位症候群は、複雑心奇形に内臓異常、免疫低下などを合併する症候群である。10,000 人に1人の頻度で発生する希な、原因不明の、予後不良の疾患である。先天性心疾患は、単心室、単心房、共通房室弁、肺動脈狭窄、両大血管右室起始症などが合併し、その症状は、胎児期からの心不全、新生児期からのチアノーゼ、心不全（哺乳障害、多呼吸、体重増加不良）などである。手術がしばしば困難であるうえに、手術しても手術後遠隔期に心不全などによる死亡例もある。無脾症では無脾にともなう易感染性を認める。無脾症、多脾症では重症感染症の頻度も高く、無脾症では特に重症感染症による死亡率が高い。

#### ■病因

遺伝子異常が一因と考えられるが、その発症機序は不明である。

#### ■主な合併症

重症感染症（敗血症、細菌性心内膜炎、肺炎など）を合併する。先天性心疾患に伴う心不全、チアノーゼが多い。心疾患の外科治療に伴う死亡があり得る。チアノーゼが長年続くと、腎不全を合併する。重症な心疾患や重症感染症のために、長期予後は不良である。突然死も多発する。消化管の回転異常による胃軸捻転、小腸イレウスをきたすこともある。

#### ■治療方法の指針

新生時期、乳児期、小児期には先天性心疾患に対する外科治療、乳児期—成人期には、感染症、心不全に対する内科治療が重点である。

無脾症では単心室、共通房室弁が多い。最終の心内手術はフォンタン手術であるが、新生時期や乳児期早期には短絡術や肺動脈絞扼術などの姑息術が施行される。肺動脈閉鎖なら生直後からプロスタグランジン E1 の点滴を開始し、生後2-3週で短絡術を施行する。肺高血圧があれば生後2ヶ月以内に肺動脈絞扼術が選択される。乳児期、幼児期にはグレン手術、フォンタン手術が施行される。

総肺静脈還流異常を合併した無脾症は予後が悪い。特に、下心臓型や、混合型の総肺静脈還流異常を合併した無脾症では、肺静脈狭窄をきたしやすく、予後が悪い。手術の早期成績は悪いが、手術を乗り切れば、中期成績は比較的良好である。新生児期に肺静脈還流



経路に狭窄が存在する場合には、総肺静脈還流異常に対しての手術が必要となる。肺静脈還流経路に狭窄が存在しない場合には、新生児期を過ぎてからの手術が望ましい。肺静脈が共通腔を作らないで直接右房や上大静脈に環流する場合には、共通腔と左房との吻合手術は必要ないこともある。

新生児期、乳児期に中等度以上の共通房室弁の逆流がある時は、予後が悪い。共通房室弁の形成が必要になることがあるが、弁形成術を施行しても弁逆流は改善しないこともあり、人工弁置換術が必要となることもある。乳児期までの共通房室弁形成術の適応に関しては、いまだ不明である。共通房室弁逆流がある患者で、短絡術や肺動脈絞扼術が必要な時は、共通房室弁形成術を同時に施行すべき否かの判断に難渋する。

フォンタン手術は、無脾症の予後を改善する。フォンタン手術施行に向けて、新生時期、乳児期に最適の内科、外科管理をしていくべきである。

多脾症では、房室中隔欠損、両大血管右室起始症、修正大血管起始症が多い。多脾症では 2 心室修復にいたる例はまれで、最終的にフォンタン手術が施行されることが多い。まれに、多脾症でも心内奇形が比較的単純な場合には 2 心室修復が可能な場合がある。心房中隔欠損、房室中隔欠損、両大血管右室起始症の一部などである。

多脾症でも新生時期や乳児期早期には、高度の肺動脈狭窄や肺動脈閉鎖なら短絡術、肺高血圧があれば肺動脈絞扼術が施行される。乳児期、幼児期にはグレン手術、フォンタン手術が施行される。両大血管右室起始症、修正大血管起始症では幼児期—小児期に 2 心室を使った心内修復術や、ダブルスイッチ手術がなされることがある。

多脾症で房室弁閉鎖不全が高度だと、新生時期から心不全を発症し、予後不良である。房室弁閉鎖不全が中等度以上なら房室弁の形成術が施行される。

多脾症では、肺高血圧になりやすい傾向があるので注意する必要がある。

小児期での手術が困難で手術が施行されなかった場合や、姑息術でとまって心内修復術がなされていない場合がある。そのような例ではチアノーゼが持続していることがあるので在宅酸素療法や、肺高血圧や心不全に対する薬物治療がなされる。

## ■治療成績

新生時期、乳児期の周術期の重症感染症による死亡が多い。フォンタン手術に至った症例の中期予後は比較的良好であるが、遠隔期成績はいまだ不明である。フォンタン手術後の小児期、成人期には、房室弁の閉鎖不全や心室修復不全による心不全が発生することがある。術後 20 年で約 30% の症例が心不全や血栓症、蛋白漏出性胃腸症を合併する。突然死も 3% に発生する。

上室性頻拍の発生をみることも多く、不整脈に対してカテーテル治療を施行したり、抗不整脈薬を服薬する必要がでてきたりする。フォンタン手術の遠隔期、術後 20 年で 50% の症例が上室性頻拍や心房細動を発症する。

多脾症では洞機能不全が合併することがある。徐脈に対してペースメーカー植え込みが

必要になることもある。

無脾症で、総肺静脈還流異常を合併している場合には、予後は悪い。まず総肺静脈還流異常を手術し、ついでグレン手術、フォンタン手術が施行される。手術の早期および長期成績は不良である。

### ■重症感染症

無脾症 4935 人年、多脾症 4200 人年の観察では、重症感染症の年間罹患率（患者 1 万人対）は、無脾症で 265、多脾症で 88 であった。無脾症患者における重症感染症の罹患率は、内臓錯位症候群を伴わない先天性心疾患患者に比べて、有意 ( $p<0.05$ ) に高率であった（図 1）。特に、肺炎球菌感染症が、無脾症の重症感染症患者の 24% を占めた（図 2）。

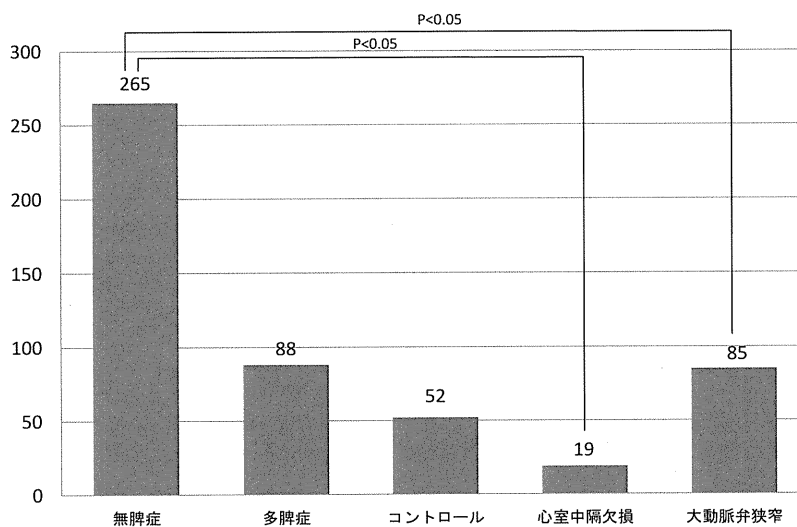


図 1. 重症感染症罹患率(患者一万人対)

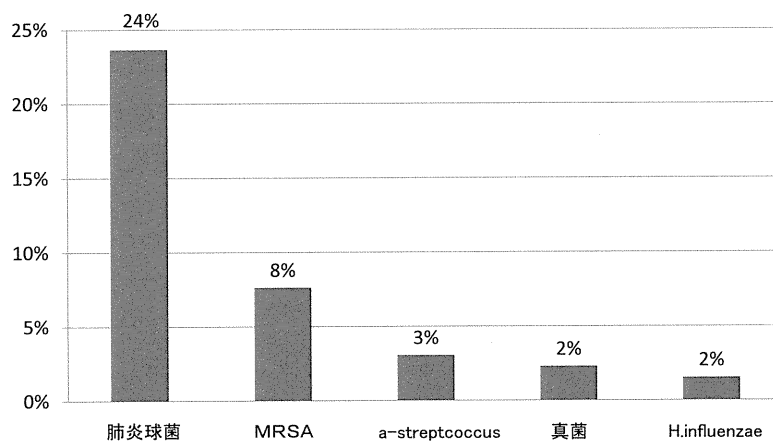


図 2. 無脾症の重症感染症(n=131)における起炎菌

## ■重症感染症の治療指針

### 1) 心内膜炎の予防

感染性心内膜炎の予防が推奨される大動脈弁狭窄症よりも、無脾症では感染症が多い。このことは、無脾症、多脾症患者においては、抜歯や手術時における感染性心内膜炎の予防を強く勧めるべきである。高リスク群における感染性心内膜炎予防のガイドラインの勧告にしたがう。

### 2) ワクチン投与

無脾症においては、肺炎双球菌ワクチン接種が細菌感染症を減少させるので、積極的な予防が推奨される。無脾症、多脾症ともに生後6週以降できるだけ早期の肺炎双球菌ワクチン（プレベナー）接種開始が推奨される。インフルエンザ菌ワクチン（Hib ワクチン）接種の効果は未だ不明であるが、ワクチン接種が望ましい。2歳以降の肺炎双球菌ワクチン投与は、23価肺炎双球菌ワクチン（ニューモバックス）でもかまわない。

### 3) 毎日の予防的抗生物質内服

無脾症では、毎日の予防的抗菌薬内服投与が細菌感染症を減少させるので、ワクチン接種の有無にかかわらず、予防内服が推奨される。最適な抗菌薬の種類、量はいまだ不明であるが、AMPC 10mg/kg/日の3分服などが推奨される。いつまで内服するかについても、データはないが、一生の服用を推奨するガイドライン(1)、5歳までの服用を推奨するガイドライン(2)などがある。

## 文献

(1) Guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. Working Party of the British Committee for Standards in Haematology Clinical Haematology Task Force. *BMJ* 1996; 312: 430-434.

(2) Infectious Disease and Immunization Committee, Canadian Paediatric Society. Prevention and therapy of bacterial infections for children with asplenia or hyposplenia. *Paediatric Child Health* 1999; 4: 417-421.

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
潟山亮平、 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 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	シュプリンガー・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	シュプリンガー・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 atrial 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 nicolandil.	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>Takeshima 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 Hiroshi Takeshima	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>	-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状動脈瘤を考える「急性期—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介入治療	小児科	51	403-410	2010



## IV 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

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

### 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.<sup>3</sup>

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

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

Other studies of the TGF- $\beta$  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](mailto:cj@j-circ.or.jp)

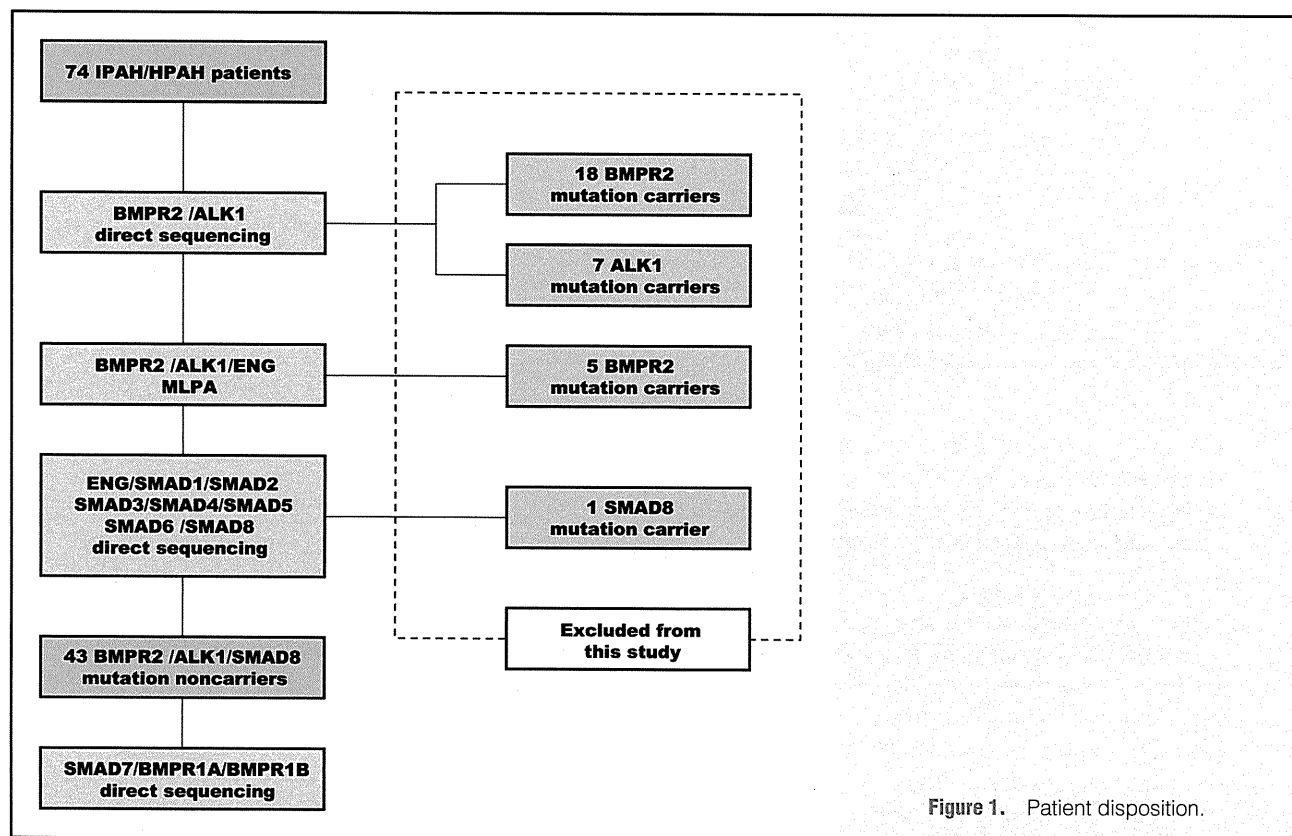


Figure 1. Patient disposition.

rhagic telangiectasia (HHT) in association with PAH in 2001.<sup>7</sup> Furthermore, Harrison et al demonstrated a *ALK1* mutation in 1 IPAH patient without a family history of HHT in 2005.<sup>8</sup> In addition, we reported 5 *ALK1* mutations in children with IPAH/HPAH.<sup>9</sup> More rarely, mutations in *endoglin* (*ENG*) have been identified in patients with PAH, predominantly with coexistent HHT.<sup>10–13</sup>

In 2009, we reported the first nonsense mutation of *SMAD8* in an IPAH patient who had no mutations in *BMPR2* or *ALK1*.<sup>14</sup> 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.<sup>15</sup>

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- $\beta$  superfamily or other signal pathways (BMP/MAP kinase p38 pathway, Toll-like pathway, Rho-kinase pathway, and so on),<sup>16,17</sup> 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 (*BMPR1A*) and BMP receptor type 1B (*BMPR1B*), involved in the TGF- $\beta$ /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 study<sup>9</sup> and 21 patients from the second cohort of another study.<sup>14</sup> 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.<sup>18</sup> 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.<sup>19</sup> 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

al<sup>6</sup>).<sup>20</sup> 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.<sup>9,14</sup>

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.<sup>14</sup> 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.<sup>14</sup> After the above mutation screening, we also screened *SMAD7*, *BMPR1A* and *BMPR1B* 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), *BMPR1A* (GenBank NM\_009009) and *BMPR1B* (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.<sup>21</sup> We previously utilized the 3GC-Lux reporter gene for functional analysis of the SMAD8 mutant in PAH patients.<sup>14</sup> In other reports, 3GC2-Lux has also been used to assess the interaction of genes belonging to the BMP signal pathway.<sup>22-24</sup> 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-