

Review

【分科会特集 〈小児肺循環研究会〉】

肺高血圧症における基礎研究の最近の話題： 分子遺伝学的背景を中心に

永井 礼子^{1, 2)}¹⁾ 北海道大学小児科²⁾ 東京女子医科大学循環器小児科

Updates in Basic Research on Molecular Genetic Background of Pulmonary Hypertension

Ayako Nagai^{1, 2)}¹⁾ Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Hokkaido, Japan²⁾ Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

With dramatic advances in the field of molecular genetics, the investigation of the genetic background in pulmonary hypertension has also remarkably improved. In 2018, the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension (6th WSPH) identified 17 genes as causative factors for pulmonary arterial hypertension (PAH). In this review, the author discusses the candidate causative genes of PAH that have been identified consecutively after the 6th WSPH. Furthermore, interesting reports on new modifier and susceptibility genes for PAH and the methods of interpreting these genes are discussed. This review also presents other noteworthy basic studies.

Keywords: pulmonary hypertension, pulmonary arterial hypertension, pathogenic variant

分子遺伝学分野の飛躍的な発展に伴い、肺高血圧（pulmonary hypertension: PH）における遺伝学的背景の検討も目覚ましい進歩を遂げている。2018年の6th World Symposium on Pulmonary Hypertension (6th WSPH)においては肺動脈性肺高血圧症（pulmonary arterial hypertension: PAH）の原因遺伝子として17遺伝子が挙げられることとなった。この総説では、6th WSPHの後も次々と同定されているPAHの原因遺伝子候補について、筆者らの検討も含めて解説する。さらにPAHの新たな修飾遺伝子・感受性遺伝子に関する興味深い報告について述べ、その解釈の方法について考察する。最後に、他の注目すべき基礎研究について紹介する。

肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子

肺高血圧症（pulmonary hypertension: PH）の遺伝学的背景を考える上で、まずは2018年に開催された6th World Symposium on Pulmonary Hypertension (WSPH)で定められた、肺動脈性肺高血圧症（pulmonary arterial hypertension: PAH）の原因遺伝子を押さえておく必要がある。6th WSPHにおいては、それぞれのエビデンスレベルに基づき、BMPR2

をはじめとした17遺伝子が疾患原因遺伝子として挙げられた（Table 1）¹⁾。このうちSMAD9（SMAD8）、BMPR1Bの2遺伝子は、東京女子医科大学において世界で初めて同定されたものである^{2, 3)}。17遺伝子のうちのひとつ、SOX17についてはその希少なバリエントが、先天性心疾患に伴うPAH（congenital heart disease-associated PAH）の約3%で検出されたとの報告が2018年になされており、二次性PAHの原因を考える上で非常に興味深い⁴⁾。

Table 1 Classification of pulmonary arterial hypertension genes according to level of evidence that they play a causal role in the disease [Adapted from Ref. 1)]

Higher level of evidence	Lower level of evidence
<i>BMPR2; EIF2AK4; TBX4; ATP13A3; GDF2; SOX17; AQP1; ACVRL1; SMAD9; ENG; KCNK3; CAV1</i>	<i>SMAD4; SMAD1; KLF2; BMPR1B; KCNA5</i>

Evidence includes de novo mutation, cosegregation studies, association with replication and functional studies.

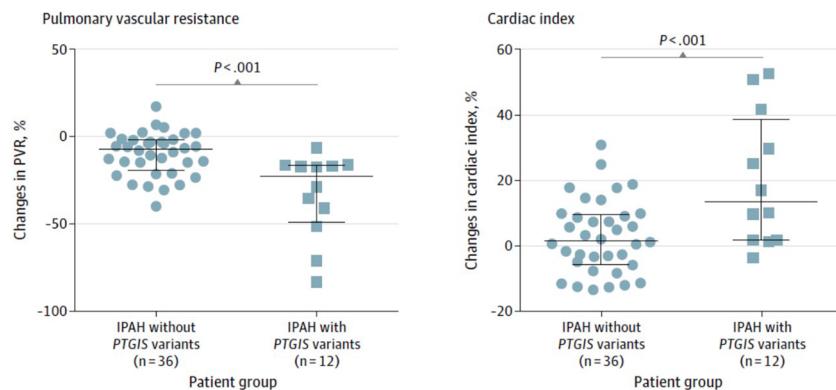


Fig. 1 Comparison of acute hemodynamic responses to aerosolized iloprost in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) with or without prostacyclin synthase (PTGIS) gene variants [Adapted from Ref. 7)]

Iloprost inhalation induced more significant decrease of pulmonary vascular resistance (PVR) and increase of cardiac index in patients with variants in PTGIS. The data were analyzed by the linear regression model.

さらにその後も、新たな疾患原因遺伝子候補についての報告が相次いでいる。前回の総説⁵⁾でも紹介したが、2018年にはATP依存性カリウムチャネルであり、高インスリン血症の原因遺伝子としても知られているABCC8遺伝子の病的バリエントが12名のPAH患者で同定されている⁶⁾。そして、高インスリン血症の治療薬であるジアゾキサイドがこの変異カリウムチャネルの機能を改善させたと報告されている。

また、2020年には、特発性PAH (idiopathic PAH: IPAH) 230名において全ゲノム解析を行い、14名において計3種類のPTGIS遺伝子の希少なバリエントを同定したとの報告が中華人民共和国からなされている⁷⁾。このPTGIS遺伝子はプロスタサイクリン合成酵素をコードしている。PTGIS希少なバリエントを有していた患者は、これを持たない患者と比較して、イロプロスト吸入後に肺血管抵抗がより有意に低下し、心係数も有意に上昇したことが報告されている (Fig. 1)。

筆者らも、2名のPAH患者が存在する家系において全エクソーム解析を行った結果、BRAP遺伝子の病的バリエント (NM_006768.4, c.1661 G>T p.R554L) を同定して2019年に報告している。ヒト肺動脈平

滑筋細胞を用いた機能解析を元に、このp.R554Lによってp53伝達経路の活性低下が惹起され、これによりヒト肺動脈平滑筋細胞が異常増殖し、その結果肺動脈肥厚が生じてPAHが発症する可能性を示した (Fig. 2)⁸⁾。

PAHとp53伝達経路の関係については、これまでにも検討がなされてきた。Nutlin-3a (MDM2 [p53分解を促進する制御因子] アンタゴニスト) によるp53の活性化は、ヒト肺動脈平滑筋における細胞増殖の抑制、さらには低酸素誘発性肺高血圧モデルマウスおよびSU5416/低酸素症肺高血圧モデルマウスにおける肺高血圧の予防・改善をもたらすとの報告がある⁹⁾。さらに2019年には、PAHモデル動物の肺動脈平滑筋細胞においてp53が減少していること、それが低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor-1α: HIF-1α) の増加と関連していると報告された¹⁰⁾。

BRAP (BRCA1 associated protein) は近年、その発現が大腸癌患者の予後と関連していることや¹¹⁾、食道扁平上皮癌の浸潤性と関連していることが注目されている¹²⁾。また、BRAPの一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism: SNP) が冠動脈疾患、心筋梗塞、高血圧、メタボリックシンドロームなどの遺伝

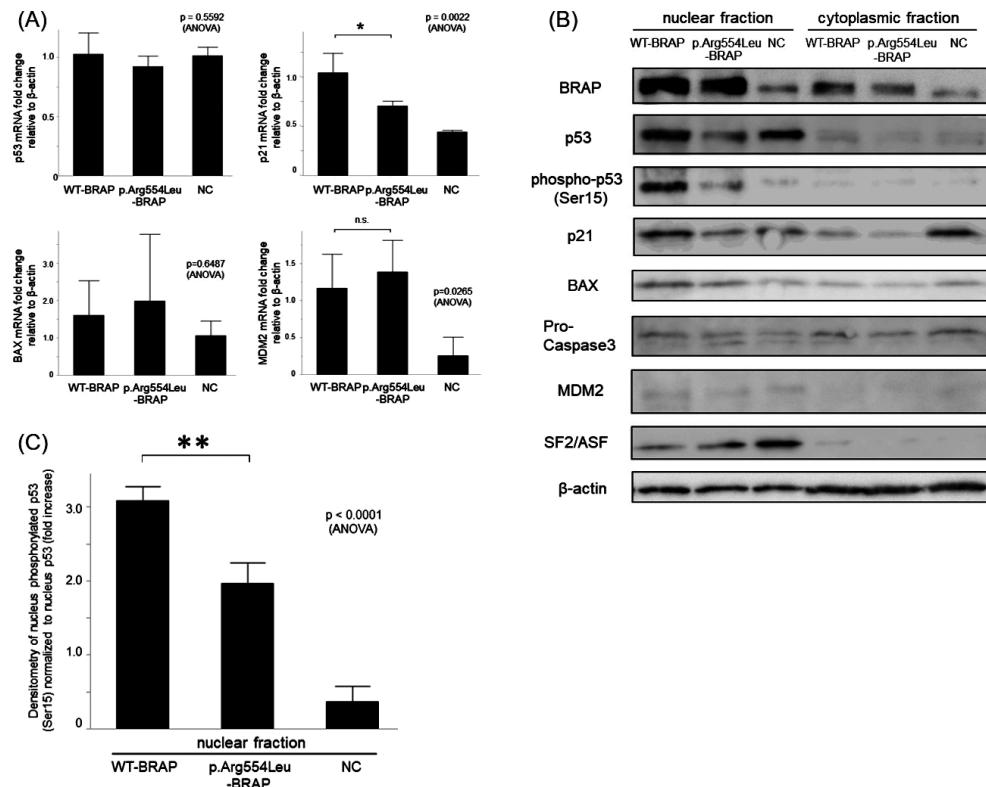


Fig. 2 p.Arg554Leu *BRAP* variant in hPASMCs decreasing p53, p21, and phosphorylated p53 expression in nucleus [Adapted from Ref. 8)]

(A) The expression of p53, p21, BAX, and MDM2 in hPASMCs was assessed using quantitative PCR. Expression was normalized to NC and represented as a fold change relative to β actin. * $p<0.05$. n.s.,not significant. (B) Effect of BRAP plasmid transfection on p53, phosphorylated p53, p21, BAX, pro-Caspase3, and MDM2 protein levels in hPASMCs by western blotting. (C) The mean of the ratio of phosphorylated p53 to p53 densitometry was expressed. ** $p<0.01$. NC, negative control; WT BRAP, wild type BRAP

的危険因子であることがいくつかの研究で明らかになっている¹³⁻¹⁷⁾.

筆者らの研究で同定した *BRAP* p.R554L は、既報の SNP とは全く異なる部位に位置している。その病的意義についてはさらなる検討が必要だが、*BRAP* が複数の悪性腫瘍の重症度との関連がある遺伝子であることは、PAH を肺動脈平滑筋細胞が異常増殖する腫瘍様疾患とみなす立場からも^{18, 19)} エキサイティングな話題と言えるだろう。PAH の新たな治療戦略としての p53 伝達経路に、今後も注目していきたい。

肺動脈性肺高血圧症の修飾遺伝子・感受性遺伝子

修飾遺伝子に関する検討も進んでいる。PAH の原因遺伝子として最多である *BMPR2* 遺伝子の病的バリエントを有していたとしても、実際に PAH を発症する確率（浸透率）は平均で約 20% と低い。この浸透率は男性で 14%，女性で 42% であることから、性差

が関連していることは確実であるが²⁰⁾、まだ発症メカニズムには不明な点が多い。そのなかで Prosseda らが、siRNA ハイスループットスクリーニングを用いて、*BMPR2* の修飾遺伝子として *FHIT* (fragile histidine triad) 遺伝子を同定し、2019 年に報告した。Prosseda らはさらに、プロテインキナーゼ C β 選択的阻害薬であるエンザスタウリンが PAH モデルラットにおいて *FHIT* の発現量を回復させ、さらには右室収縮期圧や非筋性肺小動脈の筋性化を改善させることを報告している²¹⁾。

本邦からは、Morikawa らが転写因子 ATOH8 と PAH の関係について報告している。このグループは ATOH8 ノックアウトマウスが PAH 同様の右室圧および肺動脈圧の上昇をきたすこと、PAH 患者の肺組織では ATOH8 タンパク発現量が低下していることを示し、BMP シグナル伝達経路の標的のひとつである ATOH8 が PAH の発症メカニズムに関与している可能性を示唆した (Fig. 3)²²⁾。

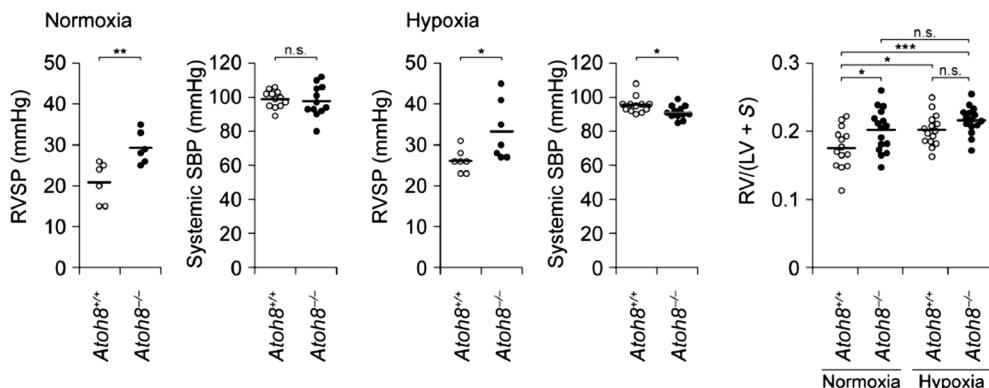


Fig. 3 Atoh8-deficient mice exhibit a phenotype resembling human pulmonary arterial hypertension [Adapted from Ref. 22]

* $p<0.05$, ** $p<0.01$. LV, left ventricle; RV, right ventricle; RVSP, right ventricular systolic pressure; S, ventricular septum; SBP, systemic systolic blood pressure.

なお、BMPR2 遺伝子病的バリアントの浸透率の低さの理由として、肺高血圧症患者における epigenetics にも関心は集まっている。Liu らは BMPR2 変異を有する遺伝性 PAH 患者と、その家系内の変異キャリア（非発症者）の末梢血単核細胞を用いて BMPR2 プロモーターの DNA メチル化を解析し、患者群ではそのメチル化が亢進していることを示した²³⁾。これにより、環境要因によって BMPR2 の野生型対立遺伝子のメチル化が促進され、機能喪失型突然変異の浸透率が変化する可能性が示唆された。ただし、他の症例対照研究では、PAH 患者と対照群の間で DNA メチル化についての有意な差は認められていない^{24, 25)}。まだまだ追加検討が必要な領域と考えられる。

2019 年、Rhodes らはヨーロッパ系の健常者と PAH 患者を対象とした 4 つの国際的な症例対象研究を用いてメタアナリシスを行い、前述の 17 遺伝子のひとつである SOX17 の他、HLA-DPA1/DPB1 (NC_000006.11: g.33041734 T>C rs2856830) を PAH 関連遺伝子として同定したと報告した²⁶⁾。驚くべきことに、この部位で C/C アレルを有する PAH 患者群における診断からの生存期間中央値は 13.5 年であり、T/T アレルを有する群の生存期間中央値（6.97 年）の約 2 倍であった (Fig. 4)。この rs2856830 は Rhodes らの検討では健常ヨーロッパ人の 12~13% に検出され、Japanese Multi Omics Reference Panel (jMorp: ToMMo 4.7KJPN) によると健常日本人の 30% 弱で検出される。今後、その意義についてより詳細な解析が待たれる。

本邦からの報告では、もやもや病の感受性遺伝子（原因遺伝子ではないことに注意）として知られている RNF213 遺伝子²⁷⁾に関するものも非常に興味深い。Fukushima らが肺高血圧症とももやもや病の併発

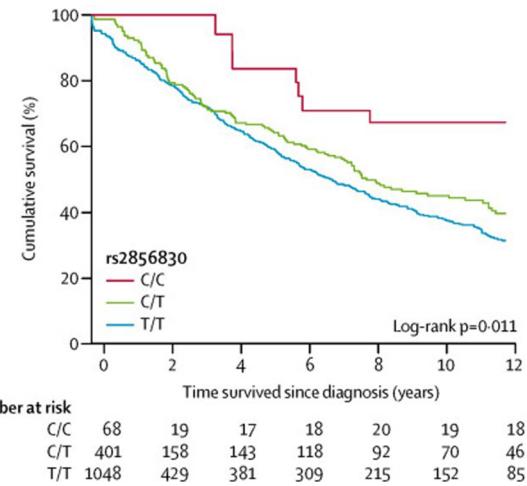


Fig. 4 Clinical impact of HLA-DPA1/HLA-DPB1 rs2856830 [Adapted from Ref. 26]

Kaplan-Meier survival plot in patients with pulmonary arterial hypertension divided into groups on the basis of the genotype of HLA-DPA1/HLA-DPB1 single-nucleotide polymorphism (SNP) rs2856830 in all cohorts.

例 2 症例において、そのホモ接合バリアントを検出したと 2016 年に報告した²⁸⁾。その後、Kobayashi らが血管内皮細胞に特異的に RNF213 変異体を発現させたトランジェニックマウスを低酸素環境下で飼育すると、有意な右室圧上昇がみられることを 2018 年に報告している²⁹⁾。また、Suzuki らは高齢の健常者群では、PAH の原因となりうる病的バリアントは検出されないのでとの仮説を元に検討し、同じく RNF213 をその候補として見いだした。RNF213 希少なバリアント (NM_001256071.3: c.14429G>A p.R4810K [rs112735431]) は日本人健常者の 0.77% で検出され

るのに対して、PAH 患者群では 9.2% でこの heterogenous variant が検出されたとのことであった³⁰⁾。さらに同じグループの Hiraide は、*RNF213 c.14429G>A p. R4810K* を有する PAH 患者群が、*BMPR2* 遺伝子変異を有する PAH 患者群よりも有意に予後が不良とする報告を行っている³¹⁾。

もやもや病の中でもこの *RNF213 c.14429G>A p.R4810K* が非常に特異的なバリアントとされており、日本人のもやもや病発症者の約 70%において、このバリアントが検出されることが判明している³²⁾（注：この論文中の *RNF213 c.14576 G>A p.R4859K* [NM_020914.4] と、NM_001256071.3: c.14429G>A p.R4810K は同一バリアントである）。健常者集団においては、1000 Genomes Project (phase3 release V3+) によると、東アジア人で 0.2%，南アジア人で 0.4% 検出され、アフリカ人、ヨーロッパ人、アメリカ人では検出されなかったとのことであり、人種特異性があるバリアントと考えられる。Human Genetic Variation Database (version 2.3) によると、日本人一般集団の約 1% がこのバリアントを有している。そのほとんどはもやもや病を発症しないことから、このバリアントを発症原因と断定することはできない。一方で、前述の Miyawaki らはこの *RNF213 c.14429G>A p.R4810K* は頭蓋内主幹動脈狭窄患者の 23% で検出されたとも報告している³²⁾。さらに、前述の Fukushima の報告のうち 1 例は、腎動脈狭窄を合併している²⁸⁾。そして遺伝学的検討はなされていないものの、もやもや病患者の 7.9% で腎動脈狭窄が発見されたとの報告もある³³⁾。さらに Chang らは、末梢性肺動脈狭窄症の 5 名について検討し、うち 4 名が *RNF213 c.14429G>A p.R4810K* ホモ接合性を有し、かつそのうち 2 名はもやもや病を有していなかったことを確認した³⁴⁾。このように、*RNF213 c.14429 G>A p.R4810K* は頭蓋内動脈病変全般のみならず、全身の動脈病変に影響しうる素因バリアントであると考えられる。前述の PAH 原因 17 遺伝子のひとつとしても挙げられている CAV1 (Caveolin-1。細胞膜上で陥凹構造を示し、さまざまな受容体が集積しているカベオラ膜の主成分) の血中濃度が、もやもや病患者では低下しているとの報告も、PAH ともやもや病の関連を考える上で大変興味深い³⁵⁾。この“*RNF213 血管障害*”研究の、さらなる進展が望まれる。

肺動脈性肺高血圧症の臨床における 遺伝学的研究のインパクト

原因遺伝子や修飾遺伝子の候補が次々と同定されるのは喜ばしいことなのだが、問題はこれらの遺伝子のバリアントが PAH の臨床像とどう関わるのか、そして PAH 診療に寄与するのかどうかである。上記の *ABCC8* バリアント、*PTGIS* バリアント、*FHT* バリアントを保有している PAH 症例に対するジアゾキサイド、イロプロスト、エンザスタウリンの効果のさらなる解明と臨床応用には大いに期待したい。しかし、遺伝学的研究の結果を臨床の場で有効に活用するには、もうしばらく時間を要すると考えられる。前回の総説⁵⁾で、PAH における遺伝子変異と予後との関係については、筆者らの検討³⁶⁾、英国で実施されたメタアナリシス³⁷⁾も含めていくつか紹介したが、その後は目ぼしい検討はなされていない。原因遺伝子の数が増えたものの、各々の患者数が少なく、臨床的特徴が曖昧であるためであろう。

小児 PAH において、原因遺伝子の内訳はどうなっているのか。2018 年に米国から、小児 PAH 患者では成人発症 PAH 患者と比較して *TBX4* 変異を持つものが有意に多いとの報告がなされた³⁸⁾。この報告を受けて、筆者らも東京女子医科大学において遺伝学的検査を実施した PAH 症例について予備検討を行った。*BMPR2* バリアントが原因遺伝子として最も多く検出されるというのは他の検討と同様である。しかし、*TBX4* バリアントが小児で多いということではなく、むしろ *ACVRL1* バリアントが小児で多く検出されている（未発表）。小児 PAH の原因遺伝子の分布は人種や地域で異なるのか、果たしてそれは小児 PAH の予後に影響するのか。筆者らは国内のみでの検討には限界があり、国際的な検証が必要と考えている。前述の予備検討結果を踏まえて、現在検証準備を進めている段階にある。

PAH 基礎研究における、その他の最近の話題

最後に、個人的に最近強く興味を惹かれている、PAH 基礎研究の論文を 2 報紹介する。ひとつめは PAH 患者の肺動脈における解糖系の亢進に注目した、2019 年の Cao らの報告である³⁹⁾。解糖調節因子である 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases (PFKFB3) を阻害する 3PO を投与すると、SU5416/低酸素 PH モデルラットにおいて肺高血圧の発症がほぼ完全に抑制されることが明らかになった。さらに内皮

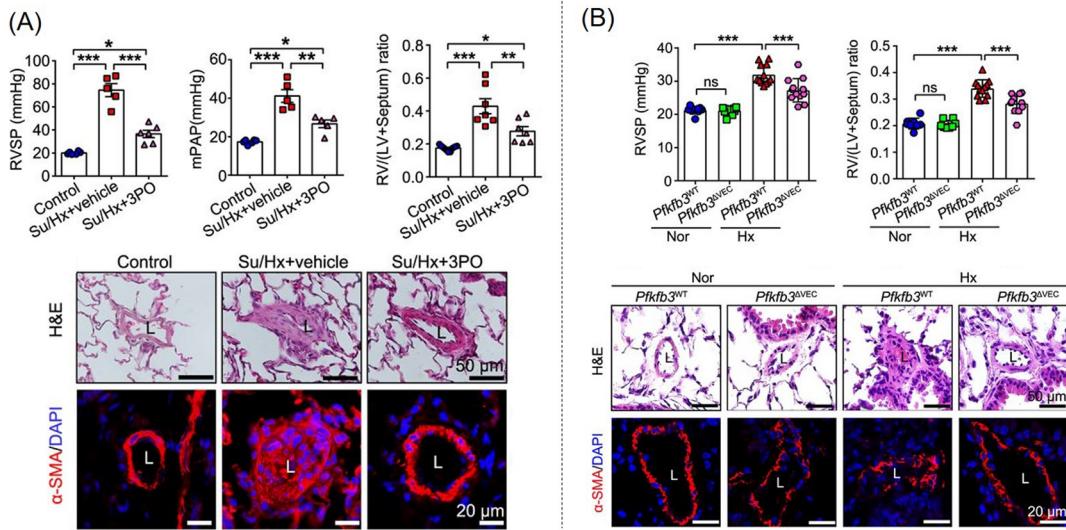


Fig. 5 PFKFB3-mediated endothelial glycolysis promotes pulmonary hypertension [Adapted Ref. 39)]

(A) PFKFB3 inhibitor 3PO reduces Sugen 5416/hypoxia (Su/Hx)-induced pulmonary hypertension in rats. (B) Endothelial-specific *Pfkfb3* deficiency in mice ameliorates the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. mPAP, mean pulmonary arterial pressure; L, lumen; LV, left ventricle; RV, right ventricle; RVSP, right ventricular systemic pressure. * p <0.05 was considered significant, ** p <0.01, *** p <0.001. ns, no significance.

細胞特異的 *Pfkfb3* ノックアウトマウスを作製し、これを用いて低酸素誘発性 PH モデルを作製しようとしたところ、野生型マウスと比較して PH の進行が遅いこと、もしくは PH を発症できること、さらには肺動脈平滑筋細胞の増殖能が低下していることが判明した。また、低酸素状態のヒト肺動脈内皮細胞に *siPFKFB3* を transfection すると、HIF-1 α および HIF-2 α の発現量が有意に低下することも明らかとなった (Fig. 5)。もう 1 報は 2018 年の Dai らの検討である。この報告では HIF-2 α 阻害剤コンパウンド 76 による HIF-2 α の薬理学的阻害が複数の PAH モデル動物において収縮期右室圧と右室肥大を改善させ、右心不全や右室の線維化、ならびに閉塞性肺血管リモデリングを抑制することが示された⁴⁰⁾。さらに、モノクロタリン暴露 PAH モデルラットに対して、モノクロタリン投与の 2 週間後にコンパウンド 76 を投与したところ、右室収縮期血圧、右室肥大、肺血管リモデリングが逆転して右心不全の発症が防止され、生存率が向上したという。

HIF-2 α はその下流に BMPR2, IL-6, CXCL12, CAV1 等が関連する、既に PAH 発症への関与が報告されている複数のシグナル伝達経路を標的としている。これまで PAH の発症メカニズムに関与しうるシグナル伝達経路がいくつも報告されてきたが、HIF-2 α 阻害剤はこれらの複数のシグナル伝達経路を介して PAH を改善する可能性を秘めている（ちなみに前述の Morikawa らの報告では²²⁾、ATOH8 は低酸素状態に反応

して HIF-2 α の誘導を減少させることも明らかとなっている）。さまざまな原因遺伝子候補や発症機序についての学説が飛び交い、混沌としたこの研究分野の中で、これらの 2 報は PAH の病態解明のパズルを完成させるのに不可欠なピースになると、筆者としては考えている。プロスタサイクリン経路、エンドセリン経路、一酸化窒素経路の 3 系統からのアプローチでは十分な治療が困難である重症 PAH 症例に対して、このように多系統から一挙に斬りこむことが可能な薬剤の開発が今後は期待される。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、ご協力を賜りました北海道大学小児科 武田充人先生に深謝いたします。

利益相反

日本小児循環器学会の定める、利益相反に関する開示項目はありません。

引用文献

- 1) Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, et al: Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. Eur Respir J 2019; **53**: 1801899
- 2) Shintani M, Yagi H, Nakayama T, et al: A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. J Med Genet 2009; **46**: 331–337

- 3) Chida A, Shintani M, Nakayama T, et al: Missense mutations of the BMPR1B (ALK6) gene in childhood idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 2012; **76**: 1501–1508
- 4) Zhu N, Welch CL, Wang J, et al: Rare variants in SOX17 are associated with pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Genome Med* 2018; **10**: 56
- 5) 永井礼子：小児循環器領域における肺高血圧症—臨床と基礎のフロントライン—。日小児循環器会誌 2019; **35**: 136–152
- 6) Bohnen MS, Ma L, Zhu N, et al: Loss-of-function ABCC8 mutations in pulmonary arterial hypertension. *Circ Genom Precis Med* 2018; **11**: e002087
- 7) Wang XJ, Xu XQ, Sun K, et al: Association of rare PTGIS variants with susceptibility and pulmonary vascular response in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *JAMA Cardiol* 2020; **5**: 1–8
- 8) Chida-Nagai A, Shintani M, Sato H, et al: Role of BRCA1-associated protein (BRAP) variant in childhood pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 2019; **14**: e0211450
- 9) Mouraret N, Marcos E, Abid S, et al: Activation of lung p53 by Nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension. *Circulation* 2013; **127**: 1664–1676
- 10) Wang Z, Yang K, Zheng Q, et al: Divergent changes of p53 in pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells involved in the development of pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019; **316**: L216–L228
- 11) Tang J, Xi S, Wang G, et al: Prognostic significance of BRCA1-associated protein 1 in colorectal cancer. *Med Oncol* 2013; **30**: 541
- 12) Zhao Y, Wei L, Shao M, et al: BRCA1-associated protein increases invasiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 2017; **153**: 1304–1319.e1305
- 13) Hinohara K, Ohtani H, Nakajima T, et al: Validation of eight genetic risk factors in East Asian populations replicated the association of BRAP with coronary artery disease. *J Hum Genet* 2009; **54**: 642–646
- 14) Ozaki K, Sato H, Inoue K, et al: SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. *Nat Genet* 2009; **41**: 329–333
- 15) Yamada Y, Sakuma J, Takeuchi I, et al: Identification of polymorphisms in 12q24.1, ACAD10, and BRAP as novel genetic determinants of blood pressure in Japanese by exome-wide association studies. *Oncotarget* 2017; **8**: 43068–43079
- 16) Avery CL, He Q, North KE, et al: A phenomics-based strategy identifies loci on APOC1, BRAP, and PLCG1 associated with metabolic syndrome phenotype domains. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1002322
- 17) Zhang F, Liu C, Xu Y, et al: A two-stage association study suggests BRAP as a susceptibility gene for schizophrenia. *PLoS One* 2014; **9**: e86037
- 18) Spiekerkoetter E, Goncharova EA, Guignabert C, et al: Hot topics in the mechanisms of pulmonary arterial hypertension disease: Cancer-like pathobiology, the role of the adventitia, systemic involvement, and right ventricular failure. *Pulm Circ* 2019; **9**: 2045894019889775
- 19) Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, et al: Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2018; **114**: 551–564
- 20) Larkin EK, Newman JH, Austin ED, et al: Longitudinal analysis casts doubt on the presence of genetic anticipation in heritable pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; **186**: 892–896
- 21) Dannewitz Grosseda S, Tian X, Kuramoto K, et al: FHIT, a novel modifier gene in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; **199**: 83–98
- 22) Morikawa M, Mitani Y, Holmboe K, et al: The ALK-1/ SMAD/ATOH8 axis attenuates hypoxic responses and protects against the development of pulmonary arterial hypertension. *Sci Signal* 2019; **12**: eaay4430
- 23) Liu D, Yan Y, Chen JW, et al: Hypermethylation of BMPR2 promoter occurs in patients with heritable pulmonary arterial hypertension and inhibits BMPR2 expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; **196**: 925–928
- 24) Viales RR, Eichstaedt CA, Ehlken N, et al: Mutation in BMPR2 promoter: A 'second hit' for manifestation of pulmonary arterial hypertension? *PLoS One* 2015; **10**: e0133042
- 25) Pousada G, Baloira A, Valverde D: Methylation analysis of the BMPR2 gene promoter region in patients with pulmonary arterial hypertension. *Arch Bronconeumol* 2016; **52**: 293–298
- 26) Rhodes CJ, Batai K, Bleda M, et al: UK NIHR BioResource Rare Diseases Consortium; UK PAH Cohort Study Consortium; US PAH Biobank Consortium: Genetic determinants of risk in pulmonary arterial hypertension: International genome-wide association studies and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2019; **7**: 227–238
- 27) Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al: A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2011; **56**: 34–40
- 28) Fukushima H, Takenouchi T, Kosaki K: Homozygosity for moyamoya disease risk allele leads to moyamoya disease with extracranial systemic and pulmonary vasculopathy. *Am J Med Genet A* 2016; **170**: 2453–2456
- 29) Kobayashi H, Kabata R, Kinoshita H, et al: Rare variants in RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease, are found in patients with pulmonary hypertension and aggravate hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Pulm Circ* 2018; **8**: 2045894018778155
- 30) Suzuki H, Kataoka M, Hiraide T, et al: Genomic comparison with supercentenarians identifies RNF213 as a risk gene for pulmonary arterial hypertension. *Circ Genom Precis Med* 2018; **11**: e002317
- 31) Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, et al: Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension. *J Heart and Lung Transplantation* 2020; **39**: 103–112
- 32) Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, et al: Genetic variant RNF213 c.14576G>A in various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke* 2013; **44**: 2894–2897
- 33) Baek JW, Jo KI, Park JJ, et al: Prevalence and clinical implications of renal artery stenosis in pediatric moyamoya disease. *Eur J Paediatr Neurol* 2016; **20**: 20–24
- 34) Chang SA, Song JS, Park TK, et al: Nonsyndromic peripheral pulmonary artery stenosis is associated with homozygosity of RNF213 p.Arg4810Lys regardless of co-occurrence of moyamoya disease. *Chest* 2018; **153**: 404–413
- 35) Chung JW, Kim DH, Oh MJ, et al: Cav-1 (Caveolin-1) and

- arterial remodeling in adult moyamoya disease. *Stroke* 2018; **49**: 2597–2604
- 36) Chida A, Shintani M, Yagi H, et al: Outcomes of childhood pulmonary arterial hypertension in BMPR2 and ALK1 mutation carriers. *Am J Cardiol* 2012; **110**: 586–593
- 37) Evans JD, Girerd B, Montani D, et al: BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: An individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2016; **4**: 129–137
- 38) Zhu N, Gonzaga-Jauregui C, Welch CL, et al: Exome sequencing in children with pulmonary arterial hypertension demonstrates differences compared with adults. *Circ Genom Precis Med* 2018; **11**: e001887
- 39) Cao Y, Zhang X, Wang L, et al: PFKFB3-mediated endothelial glycolysis promotes pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; **116**: 13394–13403
- 40) Dai Z, Zhu MM, Peng Y, et al: Therapeutic targeting of vascular remodeling and right heart failure in pulmonary arterial hypertension with a HIF-2 α inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; **198**: 1423–1434