

201024068A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

脊髄性筋萎縮症の臨床実態の分析、遺伝子解析、治療法開発の研究

課題番号 H22-難治-一般-012

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 斎藤 加代子

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総括研究報告 | |
| 脊髄性筋萎縮症の臨床実態の分析、遺伝子解析、治療法開発の研究 ----- | 3 |
| 齋藤 加代子 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 脊髄性筋萎縮症における臨床情報のデータベース化と遺伝子変異の検討 ---- | 9 |
| 齋藤 加代子 | |
| 2. 脊髄性筋萎縮症における治療法開発の研究 ----- | 12 |
| 齋藤 加代子 | |
| 3. 当科において脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の検討 ----- | 14 |
| 中野 今治 | |
| 4. 脊髄性筋萎縮症の骨格筋MRI ----- | 17 |
| 小牧 宏文 | |
| 5. 筋ジストロフィー病棟長期入院の脊髄性筋萎縮症の検討 ----- | 19 |
| 齊藤 利雄 | |
| 6. 脊髄性筋萎縮症による側弯に対する脊椎外科治療アンケート調査 ----- | 22 |
| 齊藤 利雄 | |
| 7. 脳波異常を伴う脊髄性筋萎縮症患者に対するバルプロ酸投与 ----- | 26 |
| 齊藤 利雄 | |
| 8. High-Resolution Melting解析を用いた脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断 ----- | 29 |
| 西尾 久英 | |
| 9. 神経・筋疾患患者に対する装着型ロボットの臨床研究・開発に関する研究 -- | 32 |
| 中島 孝 | |
| 10. ベクターとしてのポリオウイルスに関する研究 ----- | 34 |
| 野本 明男 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 39 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 43 |

I. 総括研究報告

脊髄性筋萎縮症の臨床実態の分析、遺伝子解析、治療法開発の研究

研究代表者 斎藤加代子

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長・教授

研究要旨

脊髄性筋萎縮症(SMA)の臨床実態、病態、疾患の発生機序を明らかにして治療法の開発の基盤を確立することを目的として、臨床調査個人票 104 例の臨床実態を分析した。長期入院 130 例の検討から平均年齢の上昇、呼吸・栄養管理の重症化を見出した。骨格筋 MRI 解析が I, II 型の病態解析に有用である事を見出した。SMA の診断基準を満たす症例の 12% が下位運動ニューロン症候のみを示す SMA として IV 型の病因解析の対象となり得る事が明らかになった。脊椎外科手術の評価、装着ロボットの臨床研究など患者の QOL を高める医療を進めて行くと共に、ドラッグデリバリーとしてのポリオウイルスベクターの検討、萎縮筋に対する細胞移植の可能性を検討した。SMA の根本治療法の開発への展開を目指している。

研究分担者

中野今治（自治医科大学神経内科）

小牧宏文（独立行政法人国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科）

齊藤利雄（国立病院機構刀根山病院神経内科）

菅野仁（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター、同 輸血・細胞プロセッシング科）

近藤恵里（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

伊藤万由里（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

松尾真理（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

研究協力者

西尾 久英（神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座疫学分野）

中島 孝（独立行政法人国立病院機構新潟病院）

野本 明男（財団法人微生物化学研究会）

山本 俊至（東京女子医科大学統合医科学研究所）

秋澤 叔香（東京女子医科大学産婦人科）

荒川 玲子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする疾患であり、小児期発症は I 型、II 型、III 型に、成人発症は IV 型に分類される下位運動ニューロン病である。2006 年の全国調査により SMA は約 1,000 人の患者数が推定される。I 型は 2 歳以降の生存のためには人工呼吸器管理を要し、II 型も生涯起立・歩行の獲得が不可能であり、病因解明と治療法開発は社会的にも望まれている。小児期発症の SMA は、ほぼ単一の病因で、原因遺伝子は survival motor neuron (SMN) 遺伝子である。SMN は脊髄細胞の核に存在し、RNA の代謝に関連する蛋白である。成人発症の IV 型は、臨床的にも遺伝子的にも heterogeneous であると考えられる。本研究班では、SMA の臨床実態、病態、疾患の発生機序を明らかにして治療法の開発の基盤を確立することを目的とする。脊椎外科手術の評価、装着ロボットの臨床研究など患者の QOL を高める医療、ドラッグデリバリーとしてのポリオウイルスベクターの開発、根本治療への展開を目的とする。

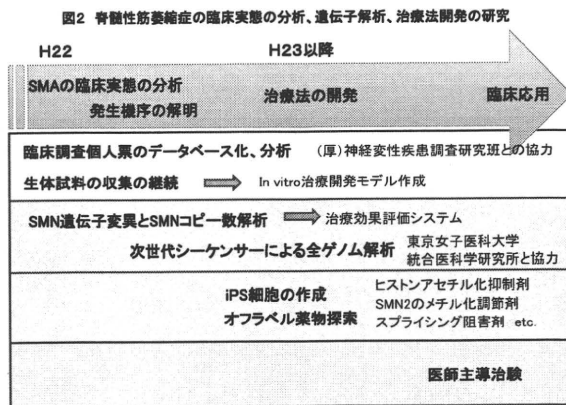
B. 研究方法

本研究班では研究分担者、研究協力者が、以下のようなテーマのもとに平成22年度から研究を開始した（図1）。

図1 研究テーマ

| | |
|---|-------|
| 中野 今治 成人発症の脊髄性筋萎縮症(SMA type IV)の遺伝子バンク構築 | (敬称略) |
| 小牧 宏文 脊髄性筋萎縮症のデータベース作成、治療に向けた評価法の検討 | |
| 齊藤 利雄 SMA臨床実態の分析に関する研究 | |
| 近藤 恵里、菅野 仁、齋藤 加代子 SMN遺伝子欠失を認めない症例に対する次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異・病態解析 | |
| 伊藤 万由里、松尾 真理、齋藤 加代子 脊髄性筋萎縮症の臨床実態の分析と神経芽細胞、リンパ球などの生体試料収集 | |
| 荒川 弥子、菅野 仁、齋藤 加代子 SMA治療薬物の探索 | |
| 秋澤 叔香、菅野 仁、齋藤 加代子 脊髄性筋萎縮症における治療法開発の研究 | |

研究の流れとアウトカムを以下に示す（図2）。



（倫理面への配慮）

主任研究者、研究分担者、研究協力者ともにそれぞれが所属する機関の倫理審査委員会において認められた研究である。

C. 研究結果

本研究班は平成22年7月29日に打ち合わせ会とキックオフミーティング（於：東京女子医科大学）を行った。

図3 脊髄性筋萎縮症の臨床実態の分析、遺伝子解析、治療法開発の研究 打ち合わせ会



国立病院機構新潟病院中島孝副院長の講演「神経・筋疾患、難病における HAL の導入に向けて—エンハンスメントからリハビリテーションへ」と今後の研究班の流れを確認した。

(1) SMA の臨床実態分析：齋藤加代子班員はデータベースを構築し、4 都道府県の臨床調査個人票 104 件を集計した。発症年齢を I 型 6 カ月以内、II 型 1 歳 6 か月以内、III 型 20 歳以内、IV 型 20 歳以上と明らかにできた。92%は進行性、うち 75%が緩徐進行性であった。遺伝子検査は 33 例(31%)で実施されていた。

齊藤利雄班員は平成 13-21 年の長期入院 130 例の検討により、平均年齢の上昇、呼吸・栄養管理の重症化を見出した。86 施設における 14 例の側弯の脊椎外科治療アンケート調査により適応の検討をした。小牧宏文班員は骨格筋 MRI 解析により I, II 型にて著明な高信号を見出し、急激な脱神経による特異的変化と考察し診断的な価値、治験における効果判定に有用とした。中野今治班員・手塚修一研究協力者は、ALS または NMD302 例のうち SMA の診断基準を満たす 94 例を検討し、64 例は臨床的に ALS と診断、11 例(12%)が緩徐進行性で下位運動ニューロン症候のみを示す SMA として遺伝子解析を含む今後の解析対象とした。

(2) 患者の遺伝子解析：齋藤加代子班員は MLPA 法で SMN 変異とコピー数解析を行い、患者、保因者の診断法を確立した。SMN コピー数の減少は複合ヘテロ接合を示唆した。齊藤利雄班員・森川悟研究協力者は High-Resolution Melting 解析 (HRMA) により、欠失、微小変異の同定法を確立した。

(3) 装着型ロボット (HAL) の臨床応用：中島孝研究協力者は III 型男性に対して、HAL 装着、表面筋電図測定により、臨床効果を評価するシステムを開発した。

(4) SMA の根本治療法の開発：齊藤利雄班員はバルプロ酸投与により SMN 転写、スプライシング

への効果を認めたが、臨床効果の評価法の必要性を確認した。野本明男研究協力者はポリオウイルスをベクターとして開発し SMA 遺伝子治療の研究を開始した。斎藤加代子班員・秋澤叔香研究協力者は胎盤羊膜細胞が筋分化し、萎縮筋線維の再生医療のソースとなり得るかを検討し、*MYOD1* 導入により筋分化が増強する事を明らかにした。

D. 考察

本研究班の成果を発展させ、(1)臨床調査個人票の解析の拡大、(2)SMN など遺伝性運動ニューロン疾患の既知原因遺伝子解析、(3)次世代シーケンサーによる全ゲノム解析とリシーケンス、(4) High -Resolution Melting 解析による遺伝子変異解析、(5) iPS 細胞の作製、(6) 脊椎外科治療の予後調査、(7) 装着ロボットの臨床研究、(8) ポリオウイルスベクターによる治療基礎研究を推進することが重要である。

E. 結論

SMA の臨床実態、病態、疾患の発生機序を明らかにして治療法の開発の基盤を確立するために、本年度は SMA の臨床実態分析、患者の遺伝子解析、装着型ロボット(HAL)の臨床応用、SMA の根本治療法の開発としてのバルプロ酸投与例の検討、ドラッグデリバリーとしてのポリオウイルスをベクターの開発、胎盤羊膜細胞を用いた萎縮筋線維の再生治療への展開の可能性の検討などを行い成果を挙げた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito Y, Shibata N, Saito K, Kobayashi M, Osawa M. New insights into the pathogenesis of

spinal muscular atrophy. *Brain Dev.* 2011;33:321-331

2) Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 2010;223(3):695-702

3) 斎藤加代子、伊藤万由里、荒川玲子. 脊髄性筋萎縮症. *J Clinical Rehabilitation* 2010;19(6):601-606

4) 斎藤加代子. 日常診療に必要な臨床遺伝学と遺伝カウンセリング. *日本医師会雑誌.* 2010;139(3):573-576

5) 斎藤加代子. 保因者診断と遺伝カウンセリング. *日本臨床.* 2010;68:183-188

6) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子診断法. *難病と在宅ケア.* 2010; 16(6): 13-15

7) Hashimoto R, Tanaka Y, Nakano I. Heading Disorientation : A new tesu and a possible underlying mechanism. *Eur Neurol.* 2010;63:87-93

8) Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for parkinson' s disease. *Molecular Therapy.* 2010; 18(9): 1731-1735

9) Doi Y, Yokoyama T, Tango T, Takahashi K, Fujimoto K, Nakano I. Temporal trends and geographic clusters of mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Japan, 1995-2004. *J Neurol Sci.* 2010; 298: 78-84

10) Ishihara K, Ichikawa H, Suzuki Y, Shiota J, Nakano I, Kawamura M. Is lesion of Exner' s area linked to progressive agraphia in

amyotrophic lateral sclerosis with dementia?
An autopsy case report. Behav Neurol. 2010;
23:153-158

11) 中野今治. パーキンソン病の遺伝子治療-実
用化に向けて. 日本医事新報 2010; 4482: 73-80

12) 中野今治. 古典型 ALS の神経病理-下位運動
ニューロンにみられるもの. 医学のあゆみ
2010;235:220-226

13) Yuki N, Watanabe H, Nakajima T, Späth PJ.
IVIg blocks complement deposition mediated by
anti-GM1 antibodies in multifocal motor
neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry.
2011;82:87-91

14) Yuki N, Takahashi Y, Ihara T, Ito S,
Nakajima T, Funakoshi K, Furukawa K, Kobayashi
K, Odaka M. Lack of antibody response to
Guillain-Barre syndrome-related gangliosides
in mice and men after novel flu vaccination.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010 Nov 7.
[Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) 秋澤叔香、菅野仁、川道弥生、荒川玲子、濱田貴子、松
田義雄、松井英雄、太田博明、藤井寿一、斎藤加代子. 早
期胎盤由来間葉系幹細胞の骨格筋分化に関する基礎研究—
筋ジストロフィーの細胞治療に向けて—. 第 17 回日本遺
伝子診療学会大会. 平成22年8月7日. 三重

2) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症 spinal muscular
atrophy (SMA). SMA 家族の会 2010 年度関東定例会. 平
成22年9月18日. 東京

3) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Hamada T, Matsuda
Y, Ohta H, Matsui H, Fujii H, Saito K.
MYOD1-transduced placental MSCs: The feasible
therapy of neuromuscular disorders. 18th
European Society of Gene and Cell therapy
HUMAN GENE THERAPY 21:1470-1471 (October 2010)

4) 荒川玲子、青木亮子、秋澤叔香、川道弥生、斎藤加代
子. 妊娠初期臍毛由来細胞を用いた筋ジストロフィー再

生治療の可能性 第10回日本再生医療学会総会. 平成23
年3月2日. 東京

5) 小牧宏文、佐久間啓、斎藤義朗、中川栄二、
須貝研司、佐々木征行. 脊髄性筋萎縮症の骨格筋
画像所見: MRI での疾患特異的所見 第 113 回日
本小児科学会学術集会 平成 22 年 4 月 24 日岩手

6) Komaki H, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E,
Sugai K, Sasaki M. Muscle MRI of spinal
muscular atrophy. 15th World Muscle Society 15
Sep 2010, Kumamoto

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

脊髄性筋萎縮症における臨床情報のデータベース化と遺伝子変異の検討 齋藤加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長・教授

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（SMA）の臨床実態を明らかにするために、本年度は4都道府県の臨床調査個人票のデータベース化とその解析を行った。また、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法により SMA の遺伝子解析を行った。発症年齢はI型 6か月以内、II型 1歳6か月以内、III型 1歳6か月～20歳、IV型 20歳以上であった。遺伝子検査は33例(31%)で実施され、24例(73%)でSMN遺伝子変異(22例)、IGHMBP2遺伝子変異(2例)を示した。MLPA法はSMAの保因者診断、複合ヘテロ接合例の同定に有用であった。

共同研究者

伊藤万由里、松尾真理、相楽有規子、近藤恵里、
浦野真理

（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

荒川玲子

（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター、
同大学院先端生命医科学系遺伝子医学分野）

A. 研究目的

本研究班において、脊髄性筋萎縮症(SMA)の臨床実態、病態、発生機序の解明、SMAをもつ人々のQOLの向上、治療法開発の基盤の確立を目標としている。臨床実態を明らかにするために、本年度は臨床調査個人票のデータベース化を開始した。また、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法によってSMAの遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1) 特定疾患治療研究事業対象疾患としての臨床調査個人票を元にSMA患者データベースを構築し、平成21年8月31日までの北海道、東京、埼玉、大阪における新規申請分、合計104件(性別:男/女=70/34、年齢:0~83歳)を入力し分析した。

2) SMAと臨床診断された症例およびその両親について、MLPA法により遺伝子解析を行った。

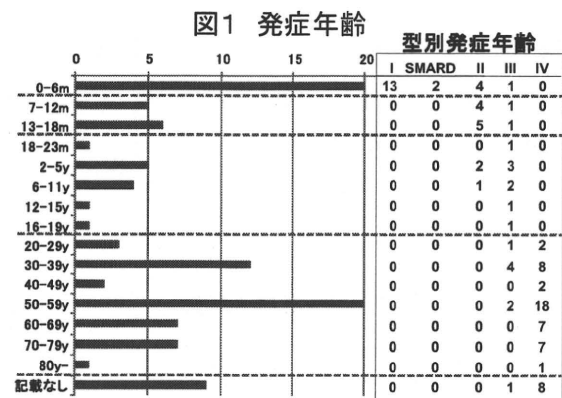
(倫理面への配慮)

本研究の臨床情報の収集および脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析について、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

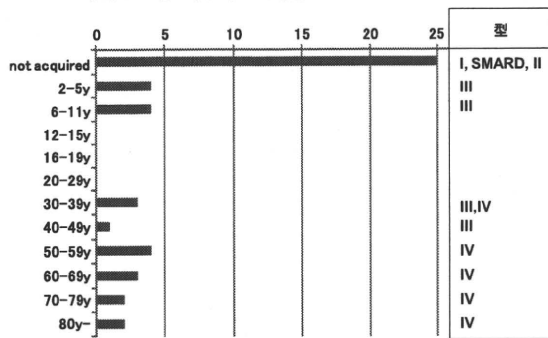
1) I型13例、II型16例、III型19例、IV型53例、その他(SMARD: SMA with respiratory distress 2例、遠位型1例)であった。年齢分布は0~9歳18例、10~19歳8例、20歳以上が78例であった。

発症年齢は図1に示すように、I型生後6か月以内、II型1歳6か月以内、III型1歳6か月~20歳、IV型20歳以上であった。



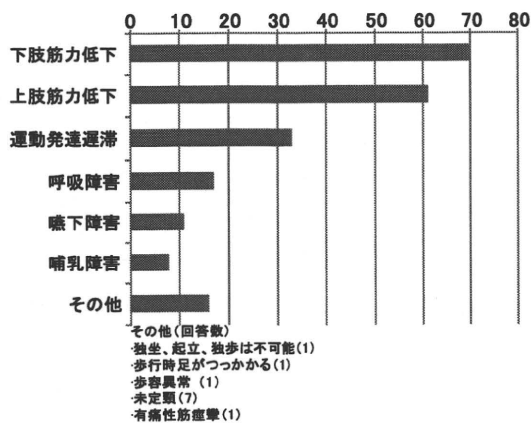
歩行不可能になった年齢はIII型2~49歳、IV型50歳以上であった(図2)。経過は92%で進行性、うち75%は緩徐または極めて緩徐であった。

図2 歩行不可能になった年齢



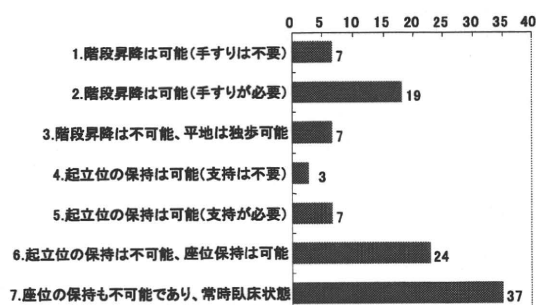
初発症状は下肢筋力低下が70例、上肢筋力低下が61例に認められた（図3）。

図3 初発症状



舌の線維束性収縮は29例に認められ、内訳はI、II型に各9例、III型2例、IV型6例であった。手指の振戦は50%にみられ、IV型に31例と多かった。呼吸不全は挿管・気管切開・人工呼吸管理は21例で実施され、I型13例全例、II型1例、III型1例、IV型4例、SMARD2例であった。運動機能分離では、起立位の保持が不可能なレベル6、7は各24、37例と半数以上を占めていた（図4）。

図4 運動機能分類

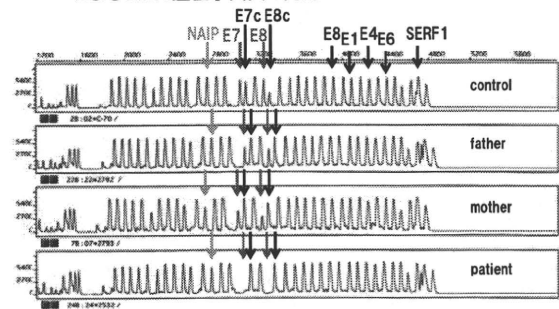


家族歴では優性遺伝（親および叔父）が1例みられた。

遺伝子検査は33例(31%)で実施され、うち24例(73%)にSMN遺伝子変異(22例)、IGHMBP2遺伝子変異(2例)が同定された。遺伝子検査の未実施は64例(62%)であった。

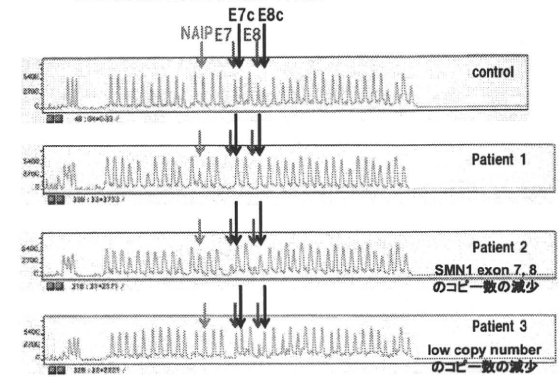
2) SMA患児と両親のDNAをMLPA法により解析し、患児でSMN1のexon7,8の欠失、両親でSMN1のexon7,8のcopy数の半減を証明した(図5)。

図5 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) によるSMN1遺伝子欠失の同定



PCR法でSMN1欠失が認められなかった症例でSMN1のexon7,8のcopy数の半減がみられ、複合ヘテロ接合の可能性が示唆された（図6）。

図6 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) によるSMN1遺伝子変異の同定



D. 考察

今年度は臨床調査個人票の抽出対象として、4都道府県とした。これら4都道府県の占める人口は2005年の人口調査によると日本の26.5%を占めている。従って、今回のパイロット調査は全国の約1/4の状態を表していると解釈できる。SMA患者104例について分析し、発症年齢は

I型 生後6か月以内、II型 1歳6か月以内、III型 1歳6か月～20歳、IV型 20歳以上と結論できた。年齢分布は20歳未満が25%であった。起立位の保持が不可能な例が61例(59%)であり、挿管・気管切開・人工呼吸管理は21例(20%)で、そのうち13例がI型であった。

遺伝子検査は33例(31%)で実施され、うち24例(73%)でSMN遺伝子変異(22例)、IGHMBP2遺伝子変異(2例)であった。

MLPA法によって、コピー数を明らかなのいすることでき、保因者診断やコピー数の減少により複合ヘテロ接合例の同定が可能となった。

E. 結論

1) 4都道府県のSMA 104例について臨床調査個人票のデータベース化とその解析を行った。

2) MLPA法はSMAの保因者診断、複合ヘテロ接合例の同定に有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito Y, Shibata N, Saito K, Kobayashi M, Osawa M. New insights into the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Brain & Development* 2011;33: 321-331.

2) Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 2010;223(3):695-702

3) 斎藤加代子, 伊藤万由里, 荒川玲子. 脊髄性筋萎縮症. *JOURNAL OF CLINICAL REHABILITATION.* 2010; 19(6):601-606.

4) 斎藤加代子. 日常診療に必要な臨床遺伝学と遺伝カウンセリング. *日本医師会雑誌* 2010; 139(3):573-576.

5) 斎藤加代子. 保因者診断と遺伝カウンセリング. *日本臨牀 遺伝子診療学 第2版* 2010; 68(増刊号8):183-188

6) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症(SMA)の遺伝子診断法. *難病と在宅ケア* 9月号 2010; 16(6):13-15

2. 学会発表

1) 秋澤叔香, 菅野仁, 川道弥生, 荒川玲子, 濱田貴子, 松田義雄, 松井英雄, 太田博明, 藤井寿一, 斎藤加代子. 早期胎盤由来間葉系幹細胞の骨格筋分化に関する基礎研究—筋ジストロフィーの細胞治療に向けて—. 第17回日本遺伝子診療学会大会. 平成22年8月7日. 三重

2) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症 spinal muscular atrophy (SMA). SMA家族の会2010年度関東定例会. 平成22年9月18日. 東京

3) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Hamada T, Matsuda Y, Ohta H, Matsui H, Fujii H, Saito K. MYOD1-transduced placental MSCs: The feasible therapy of neuromuscular disorders. 18th European Society of Gene and Cell therapy HUMAN GENE THERAPY 21:1470-1471 (October 2010)

4) 荒川玲子, 青木亮子, 秋澤叔香, 川道弥生, 斎藤加代子. 妊娠初期絨毛由来細胞を用いた筋ジストロフィー再生治療の可能性. 第10回日本再生医療学会総会. 平成23年3月2日. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症における治療法開発の研究

齋藤加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長・教授

研究要旨

ヒト胎盤羊膜由来細胞が、脊髄性筋萎縮症（SMA）の再生筋細胞の資源として、筋萎縮に対する再生医療としてのツールとなりえるか、筋分化初期における転写因子 *MYOD1* を遺伝子導入し、骨格筋再生について *in vitro* で検討を行う。

共同研究者

秋澤叔香（東京女子医科大学産婦人科学講座、
同 附属遺伝子医療センター）

菅野仁（東京女子医科大学附属遺伝子医療セン
ター、同 輸血・細胞プロセッシング科）

A. 研究目的

ヒト羊膜には骨格筋への分化能を有する間葉系幹細胞（MSC）が含まれており、近年、細胞治療のソースとして注目されている。我々は SMA の治療法としての遺伝子細胞治療開発を目的に、羊膜由来 MSC の有用性について検討した。

B. 研究方法

本学の倫理委員会にて承認の下に以下の研究を実施した。

- ①インフォームドコンセントの上、胎盤から羊膜由来細胞（amniotic-derived cells: ADC）を分離培養した。
- ②フローサイトメトリー（FCM）により、初代培養 ADC の表面抗原マーカーを検討した。
- ③GFP を導入したレンチウイルスベクターを作成し、ADC に遺伝子導入した後、遺伝子導入効率を FCM で検討した。
- ④ヒト *MYOD1*cDNA を導入したレンチウイルスベクターを作成し、ADC に遺伝子導入した後、骨格筋分化培地にて培養し、7 日目に筋分化制御転写因子（MRF）4 種および骨格筋蛋白 2 種の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR（Q-RT-PCR）法にて測定した。
- ⑤ *MYOD1* 導入 ADC における骨格筋蛋白の発現を蛍光抗体法にて観察した。

⑥ *MYOD1* 導入 ADC を Duchenne 型筋ジストロフィー患者筋細胞と共培養し、免疫染色にてヒト dystrophin の発現を評価した。

C. 研究結果

- ①培養 1 週間で線維芽細胞様と上皮細胞様の 2 種類の細胞が得られたが、継代後は線維芽細胞様の均一な形態を呈した。
- ②この ADC は、細胞表面抗原マーカー CD29、44、73、105、166、HLA-ABC が陽性、CD34、45 は陰性であり、MSC に特徴的なパターンを示した。
- ③ADC はレンチウイルスベクターにより 70-80% の割合で遺伝子導入された。
- ④ Q-RT-PCR では *MYOD1* 導入により、ADC は 7 日目に *MYF5*、*MYOG* の発現が対照に比して 500 倍以上に上昇した。*MYH2*、*DMD* も対照と比し 7 日目の発現が増加した。また、*MYOD1* 導入後 28 日目に蛍光抗体法により myosin heavy chain、dystrophin の発現を確認した。
- ⑤ *MYOD1* 導入 ADC と Duchenne 型筋ジストロフィー患者筋細胞との共培養では、蛍光抗体法により 14 日目にヒト dystrophin の発現が確認された。

D. 考察

ADC は MSC の細胞特性を有しており、*MYOD1* を遺伝子導入することで、他の MRF である *MYF5*、*MYOG* および骨格筋蛋白である *MYH2*、*DMD* を強く発現した。また ADC は単独での培養より、患者筋細胞との共培養によって早期に骨格筋へ分化することが証明された。

E. 結論

ADCの筋分化能はMYOD1遺伝子導入で増強すること、骨格筋の他のMRFであるMYF5、MYOG遺伝子が一過性にトランス活性化し骨格筋蛋白であるMYH2、DMDを強く発現することが明らかとなった。またADCは単独での培養より、患者筋細胞との共培養によって早期に骨格筋へ分化することが証明された。

羊膜は異種に対する免疫学的優位性を有しており、熱傷、潰瘍、角膜などの他家移植に既に臨床応用されている。また胎盤は生体資源として豊富であり、採取に際しても侵襲を伴わず、倫理的問題も少ない。以上のことから、遺伝子改変したADCはDuchenne型筋ジストロフィーのような先天性筋疾患に対する根治療法や、SMAのような神経原性筋疾患における筋肉量増加を目指す補助療法など、筋変性疾患全般に対する再生治療のツールとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

18th European Society of Gene and Cell therapy
HUMAN GENE THERAPY 21:1470-1471 (October 2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

当科において脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の検討
中野今治 自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)または運動ニューロン疾患と診断された症例において、脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の臨床像を検討した。当院において、過去15年に筋萎縮性側索硬化症(ALS)または運動ニューロン疾患を疑われた302例について、retrospectiveに調査・検討し、当初、上位運動ニューロン症候は認めず、下位運動ニューロン症候のみが認められ、ALSまたは、運動ニューロン疾患と診断された症例は108例(36%)であった。しかし、その後の経過にて呼吸不全・嚥下障害等の症状の悪化、または上位運動ニューロン症候が出現し、脊髄性筋萎縮症が否定的となった症例は108例中65例(61%)であった。また一方、5年間以上下位運動ニューロン症候のみを呈し、急激な症状の悪化を呈さない症例も11例(10%)認められた。当初、下位運動ニューロン症候のみが認められ、脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の多くは、その後の経過にてALSと診断できるものであった。

共同研究者

手塚修一、秋本千鶴、森田光哉

(自治医科大学 内科学講座神経内科学部門)

上位の運動ニューロン徴候のみの症例は6例で2%だった(図1)。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)または運動ニューロン疾患と診断された症例において、脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の臨床像を検討する。

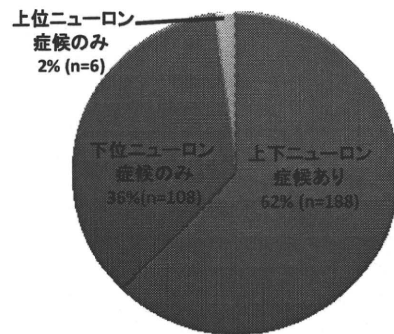
B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

当院において、過去15年に筋萎縮性側索硬化症(ALS)または運動ニューロン疾患を疑われた302例について、retrospectiveに調査・検討した。男性は、143名で、平均発症年齢が62.0歳。女性は、159名、平均発症年齢は61.9歳だった。

C. 研究結果

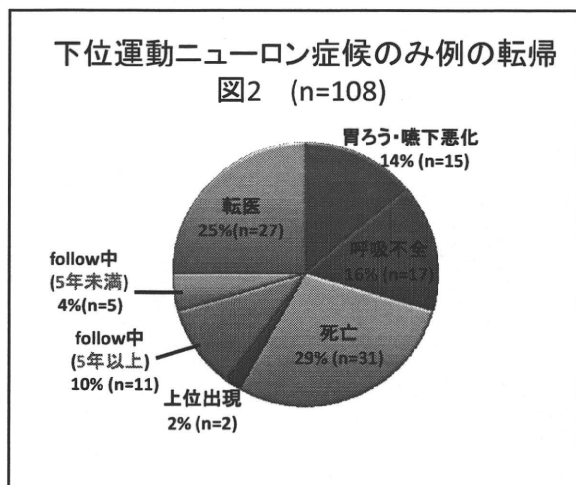
当院入院時の最初から、上下の運動ニューロン徴候が認められ、ALSと診断された症例は302例中188名で、全体の62%を占めていた。下位の運動ニューロン徴候のみで、ALSと確定診断できなかった症例は、108名で36%認められた。また、

図1 初診時の臨床所見(n=302)



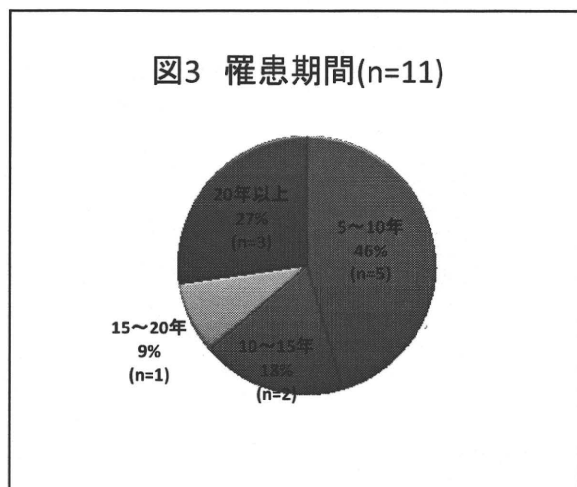
当科入院精査時に、下位の運動ニューロン徴候のみで、ALSと確定診断できなかった108例の症例のその後の転帰について図2に示す。胃ろうや嚥下障害の悪化をきたした症例は14%、15例。人工呼吸などの呼吸不全をきたした症例は16%、17例。死亡した症例は29%、31例。途中上位の運動ニューロン徴候が出現した症例は2%、2例だった。これら合わせて65例、61%は、その後の経過にてALSとの診断に至った症例であった。また、現在もfollow中の症例で下位の運動

ニューロン徴候のみで5年以上経過している症例が、11例の10%認められた。その他、まだ5年未満が5名。転医してしまいその後の経過が不明な症例が、27例の25%含まれていた。



5年以上経過した下位運動ニューロン症候のみの11例の症例についての内訳は、男性4名、女性7名。発症年齢は、男性57.2歳、女性50.4歳。初発症状は、一側上肢筋力低下が7例、一側下肢筋力低下が3例、両側下肢筋力低下が1例であった。

5年以上経過した下位運動ニューロン徴候のみの症例の現在の罹患期間を図3に示す。5～10年が5例、10～15年が2例、15～20年が1例、20年以上経過している症例が3例認められた。多くの症例において、長期間にわたり下位の運動ニューロン徴候のみの症状にて、経過していた。



11例の症例のADLについては、歩行可能な症例が7例、歩行不可能な症例が4例。日常生活が自立している症例が4例、介助が必要な症例が6例、嚥下障害もともなっている症例が1例認められた。(症例の提示)

症例 1(下位運動ニューロン徴候のみで5年以上経過している症例) ; 52歳, 女性

<初発症状> 38歳, 左下肢筋力低下

<経過> 44歳時, 当院入院。四肢の筋力低下(MMT delt 3/3, wrist 5/5, ilio 3/3, TA 1/1), 四肢のDTR低下を認めた。筋電図にて上下肢筋にactive neurogenic changeを認める。その後緩徐に筋力低下が進行。

<現在> MMT delt 1/1, wrist 4/4, ilio 1/1, TA 0/0で, 歩行困難。14年経過しているが, 上位運動ニューロン症状は出現していない。

症例 2(下位運動ニューロン徴候のみで5年以上経過している症例) ; 65歳, 女性

<初発症状> 41歳, 両下肢筋力低下

<経過> 家族歴(姉・弟・従兄に類症あり)

61歳, 四肢筋力低下(MMT delt 4/4, wrist 3/4, ilio 3/3, TA 4/4), 四肢DTR消失を認める。筋電図にて, 四肢筋にてinactive neurogenic changeを認めた。その後緩徐に筋力低下も進行。

<現在> MMT delt 3/3, wrist 3/3, ilio 3/3, TA 4/4と, 4年経過しても, ごく軽度の症状の進行を認めるのみである。また, 発症後24年経過しても支持にて歩行は可能。

症例 3(当初下位運動ニューロン徴候のみ呈していたが, その後経過にてALSと診断された症例) ; 73歳, 女性

<初発症状> 69歳, 上肢筋力低下

<経過> 両側上肢の筋力低下は進行。72歳より下肢の筋力低下も出現し, 当院入院。四肢筋力低下(MMT delt 1/1, wrist 3/3, ilio 3/3, TA 3/3), 四肢DTR消失を認める。筋電図にて, 四肢筋にてinactive neurogenic changeを認めた。

73歳より, 嚥下障害・呼吸不全をきたすように

なり当科再入院。上位運動ニューロン症状は認められなかった。Ⅱ型呼吸不全にて、永眠される（罹患期間約4年6ヵ月）。

D. 考察

基本的に下位運動ニューロン症候のみを呈する運動ニューロン疾患の成人例であるならば、脊髄性筋萎縮症と現時点においては診断できる。また、ALSの診断基準においては、上位運動ニューロン症候が一つでも認められないと、ALSと診断することはできない。成人発症の脊髄性筋萎縮症のⅣ型においては、多くは孤発性で成人から老年にかけて発症し、緩徐進行性であり、生命的な予後は良好であるとされている。以前より、独立した疾患であるか、ALSの亜型であるかとの議論がある。また、運動ニューロパチーとの鑑別も難しい。

今回我々の調査によって、運動ニューロン疾患と診断された302症例において、当初上位運動ニューロン症候は認めず、下位運動ニューロン症候のみが認められた症例は108例(36%)も認められた。しかし、その後の経過にて、呼吸不全・嚥下障害等の症状の悪化、または上位運動ニューロン症候が出現し、脊髄性筋萎縮症が否定的となりALSと診断できうる症例は108例中65例(61%)であった。

これらのことより、運動ニューロン疾患の診断に関しては、当初の徴候のみにて診断することは難しく、経過を観察していくことが重要であると考えられた。また、当初下位運動ニューロン徴候のみしか呈さないALSも高頻度に存在していることが明らかとなった。

しかし、少数ではあるが、下位運動ニューロン徴候のみで長期間経過している症例も存在していることが明らかとなり、成人発症の脊髄性筋萎縮症のⅣ型との鑑別が重要となってくると考えられた。今後これらの症例については、遺伝学的な背景も調べる予定である。

E. 結論

当初、下位運動ニューロン症候のみが認められ、脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の多くは、その後の経過にてALSと診断できるものであった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

第52回 日本神経学会総会にて発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

脊髄性筋萎縮症の骨格筋 MRI

小牧宏文 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科

研究要旨

SMN 遺伝子変異を有する脊髄性筋萎縮症 (SMA) 9 例に対し骨格筋 MRI を施行した。STIR 像では SMA I 型、II 型ともに著明な高信号を呈しており、それらの高信号はびまん性に認めていた。III 型の STIR 像は I、II 型よりも軽度であったものの軽度～中等度に高信号を呈していた。これらの所見は疾患特異的所見であり、脱神経による所見であると推測した。骨格筋 MRI は診断的な価値があると同時に、今後始まるであろう治験における効果判定にも有用となる可能性がある。

共同研究者

佐々木征行 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター病院小児神経診療部長
須貝研司 同 小児神経科主任医長
中川栄二 同 小児神経科医長
佐久間啓 同 小児神経科医師
斎藤義朗 同 小児神経科医長
埜中征哉 同 名誉院長

ている 9 例。SMA I 型（重症型）2 例、II 型（中間型）4 例、III 型（軽症型）3 例を対象とした。

（方法）

主に診断時に診断のための評価の一環として下肢骨格筋 MRI を施行した。軸位断 T1 強調、脂肪抑制 (STIR) 像を撮影した。必要に応じて鎮静薬を投与のうえ MRI 撮影を行った。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮、筋力低下などを特徴とする、神経・筋疾患の代表的疾患である。その遺伝学的病因の大半は、Survival motor neuron (SMN) 遺伝子変異によることが明らかにされている。従来 SMA の診断は臨床症状に加えて電気生理学的検査によって評価が行われているが小児患者に対して適切に電気生理学的検査を行うことのできる施設は非常に限定されているのが現状である。本研究では、SMA の診断において新しいツールを見出すため、骨格筋 MRI が鑑別診断の一助になるかどうかを明らかにする。

B. 研究方法

（対象）

2005 年から 2009 年までに当院を受診し臨床的に SMA を疑い評価を行った例で、評価の結果、SMN 遺伝子変異を有し、SMA と確定診断され

C. 研究結果

SMA I 型は 2 例ともに著明な筋萎縮を認め、皮下脂肪が非常に厚くなっていた。SMA II 型も著明な筋萎縮を認めたが、症例によっては大内転筋、薄筋、縫工筋、ハムストリングが比較的保たれていた。III 型はより明瞭な選択性を示し、大内転筋、薄筋などは比較的保たれていた、下肢ではひらめ筋優位の筋萎縮を認めた。

STIR 像では SMA I 型、II 型ともに著明な高信号を呈しており、それらの高信号はびまん性に認める特徴を有していた。III 型の STIR 像は I、II 型よりも軽度であったものの軽度～中等度に高信号を呈していた。

D. 考察

筋萎縮の分布、選択性の所見は従来 CT や MRI を用いた検討で報告されている所見とほぼ一致していたが、STIR 像にて特に SMA I 型と SMA II 型において著明な高信号を呈することを見いだした。STIR 像での骨格筋の高信号所見は筋炎の他

に筋ジストロフィーやニューロパチーで報告されているが、SMA での高信号は非常に高度であり、かつびまん性に認めることを特徴としており、この所見は知りうる限り存在せず疾患特異的所見と考えた。この所見の成因については不明であるが、ラットを用いた脱神経モデル、ヒトでの外傷による脱神経筋で認められる所見と一致し、SMA では特に SMAI 型と SMAII 型において脱神経が活発に生じていることより、SMA における STIR 像での高信号は脱神経による所見であると推測している。

従来 SMA の診断は運動機能退行、筋力低下、筋緊張低下、奇異呼吸など呼吸障害などの臨床的特徴と末梢神経伝導検査における CMAP 振幅の低下、F 波出現率低下、針筋電図における慢性神経原性変化といった臨床検査により病巣診断を行い、SMN 遺伝子変異解析にて確定診断を行うことが通常のフローチャートとして考えられてきたが、われわれが見出した、骨格筋画像診断は疾患特異的であり、SMA の診断に非常に有用であると考えた。小児の末梢神経電動検査、針筋電図などの電気生理的検査を施行できる施設は限られるが、MRI は比較的汎用性が高く、苦痛を与えることが少ないなど低侵襲性であることも有利な点である。このように骨格筋 MRI は診断的な価値があると同時に、今後始まるであろう治験における効果判定にも有用となる可能性があり、今後はその点についても検討していくことを考えている。

E. 結論

SMA の疾患特異的 MRI 所見を見出し報告した。従来は臨床所見と電気生理的所見をあわせて SMA の診断を行ってきたが、小児の電気生理的検査を正確に施行できる施設が限られるという問題点があり、今回の所見は標準的な MRI を用いることで撮像が可能であり、MRI は多くの病院で導入されている機器であるため、汎用性、特異

性の面から SMA の診断に非常に有効である。

(参考文献)

Bendszus M, Koltzenburg M, Wessig C, Solymosi L. Sequential MR imaging of denervated muscle: experimental study. AJNR Am J Neuroradiol. 2002 ;23:1427-1431.

Fleckenstein JL, Watumull D, Conner KE, Ezaki M, Greenlee RG Jr, Bryan WW, Chason DP, Parkey RW, Peshock RM, Purdy PD. Denervated human skeletal muscle: MR imaging evaluation. Radiology. 1993 ;187:213-218.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小牧宏文、佐久間啓、斎藤義朗、中川栄二、須貝研司、佐々木征行 脊髄性筋萎縮症の骨格筋画像所見：MRIでの疾患特異的所見 第113回日本小児科学会学術集会 平成22年4月24日
岩手

Komaki H, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M. Muscle MRI of spinal muscular atrophy. 15th World Muscle Society 15 Sep 2010, Kumamoto

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

筋ジストロフィー病棟長期入院の脊髄性筋萎縮症の検討
齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

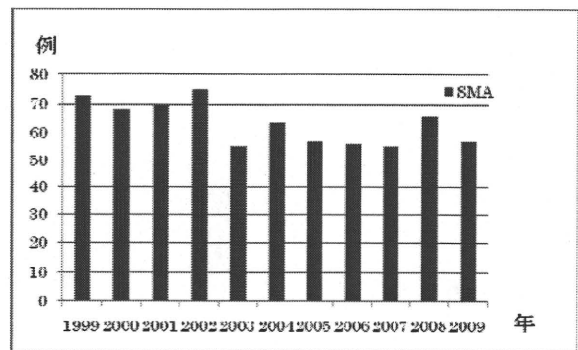
1999年から厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー研究班で収集している全国27筋ジストロフィー専門施設の入院患者情報のうち脊髄性筋萎縮症(SMA)症例の入院状況を解析した。年毎のSMA入院患者数は55人から73人の間で推移し、ゆるやかに減少傾向していた。筋ジストロフィー病棟全体の傾向として認められる、平均年齢の上昇、人工呼吸器管理数の増加や経管栄養による栄養管理法の変化などはSMAでも明らかであった。SMA死亡例16例の死亡原因の約半数は、呼吸不全や呼吸器感染症など呼吸器関連死が占めた。

共同研究者

多田羅勝義（国立病院機構徳島病院 小児科）
神野 進（国立病院機構刀根山病院 神経内科）

SMA1型14例、2型12例、3型17例、病型未記載14例であった。SMA入院患者総数は130例で、多くは長期入院例であった。

図1 SMA入院例数の推移



A. 研究目的

厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（平成22年度から開発費）筋ジストロフィー研究班では、1999年から1年に一回全国27筋ジストロフィー専門施設の入院患者情報を収集し、データベースを作成している。本検討は、このデータベースに記録された脊髄性筋萎縮症(SMA)症例の入院状況を解析することを目的とした。

B. 研究方法

対象を1999年から収集された筋ジストロフィー病棟データベースとし、SMAの入院例数、年齢、人工呼吸器装着状況、栄養管理状況、死亡例数・原因などを解析した。

C. 研究結果

1999年から2009年までの筋ジストロフィー病棟入院患者総数は2,066人から2,193人の間で推移した。1999年のSMA入院例数は73例、内訳はSMA1型23例、2型8例、3型30例、病型未記載12例であった。SMA患者入院患者数は55人から73人の間で推移し、ゆるやかな減少傾向が認められた。2009年のSMA入院例数57例の内訳は

1999年のSMA例の年齢層はSMA1型8.7~72.5歳(平均25.1歳)、2型15.9~43.0歳(27.5歳)、3型12.6~76.5歳(45.0歳)で、全体の平均年齢は35.7歳であった(図2)。一方、2009年はSMA1型1.9~56.7歳(平均26.0歳)、2型9.9~55.6歳(32.9歳)、3型19.3~82.5歳(60.0歳)で、全体の平均年齢は42.4歳であった(図3)。

図2 1999年のSMA例の年齢層

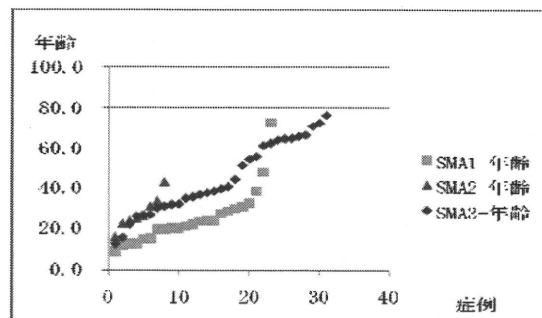
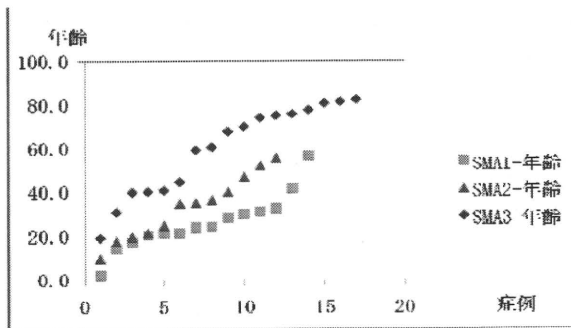


図3 2009年のSMA例の年齢層



1999年のSMA例の呼吸状態は、SMA1型で、自発呼吸14例、NPPV2例、気管切開下人工呼吸7例、2型で、自発呼吸5例、NPPV3例、3型で、自発呼吸24例、気管切開下人工呼吸6例であった(図4)。2009年では、SMA1型で、自発呼吸3例、NPPV1例、気管切開下人工呼吸10例、2型で、自発呼吸4例、NPPV7例、気管切開下人工呼吸1例、3型で、自発呼吸11例、NPPV2例、気管切開下人工呼吸4例であった(図5)。

図4 1999年のSMA例の呼吸状態

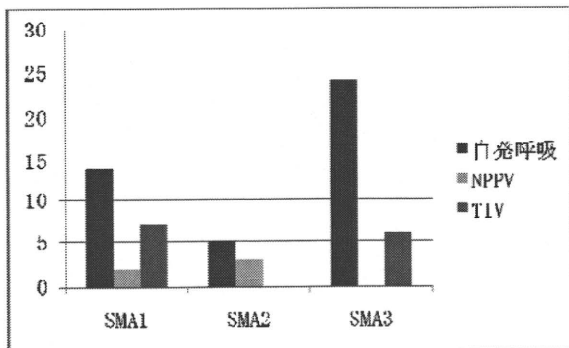
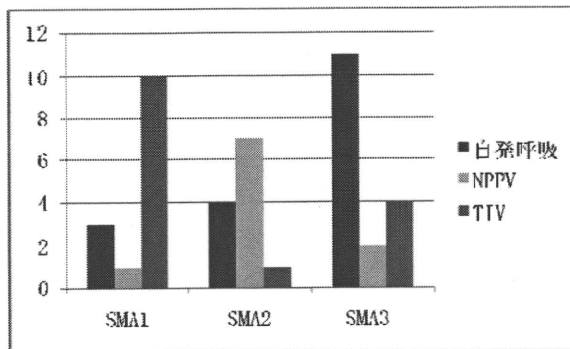


図5 2009年のSMA例の呼吸状態



1999年のSMA例の栄養管理では、多くの例で経口摂取が可能であり、経管栄養例は3例であった(図6)。2009年では、SMA1型で経口摂取7例、

経管栄養7例、2型で経口摂取9例、経管栄養3例、3型で経口摂取15例、経管栄養1例、中心静脈栄養1例であった(図7)。

図6 1999年のSMA例の栄養管理

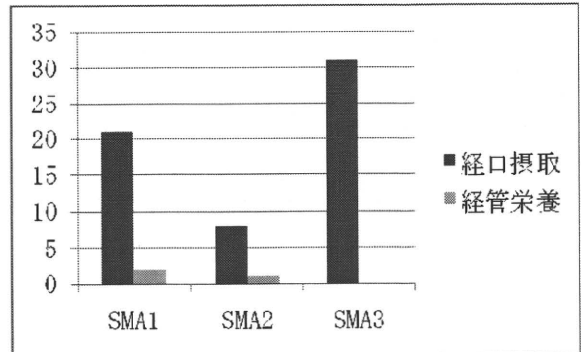
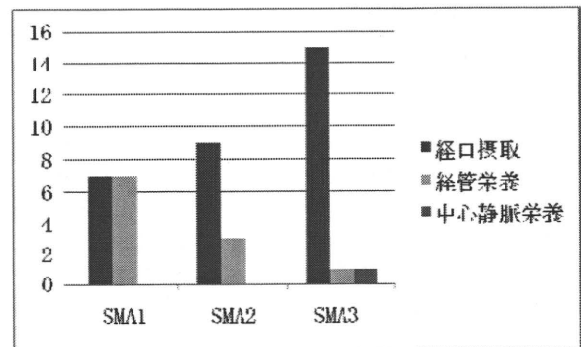


図7 2009年のSMA例の栄養管理



2000年から2008年まで報告されたSMA死亡例は16例であった。SMA1型の死因は、心不全2例、呼吸器感染症1例、ARDS1例、イレウス1例で、死亡時平均年齢13.6歳(7.0~30.6歳)、SMA3型は、呼吸器感染症3例、呼吸不全2例、敗血症1例、骨髄異形成症候群1例で、死亡時平均年齢は60.6歳(31.8~77.1歳)、1-3型の病型未記載例では、呼吸不全2例、イレウス1例、多臓器不全1例で、死亡時平均年齢は59.0歳(26.8~72.1歳)であった。

D. 考察

1964年から筋萎縮症児の就学と医療のために、全国27箇所の国立療養所に筋萎縮症病棟(筋ジストロフィー病棟)が整備されたが、筋萎縮症児の普通校や特別支援学校での就学機会の一般化、医療的介入の進歩、在宅療養の拡大などで、