

201128021A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 齋藤 加代子

平成24(2012)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
斎藤 加代子	
II. 分担研究報告	
1. 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 -----	11
斎藤 加代子	
2. 脊髄性筋萎縮症 (SMA) の出生前診断の検討 -----	14
斎藤 加代子	
3. 成人発症脊髄性筋萎縮症の臨床像と遺伝学的背景の解析 -----	16
中野 今治	
4. 脊髄性筋萎縮症の末梢神経障害に関する研究 -----	19
小牧 宏文	
5. MLPA法を用いた脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断 -----	22
小牧 宏文	
6. 脊髄性筋萎縮症の心機能異常 -----	24
齊藤 利雄	
7. 神経筋疾患の血管新生マーカー -----	27
齊藤 利雄	
8. SMN2 遺伝子量解析による予測より軽症の経過をとった脊髄性筋萎縮症の 2歳男児に対するプロモーター解析 -----	30
西尾 久英	
9. SMAなど神経筋疾患に対するロボットスーツHALの治験準備研究 -----	34
中島 孝	
10. SMN1 mRNA導入ポリオウイルスベクターの開発研究 -----	37
野本 明男	
11. 脊髄性筋萎縮症患者由来疾患iPS細胞の樹立 -----	39
山本 俊至	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	51

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 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）において、臨床病態、疾患の発生病序を明らかにして、治療法の開発の基盤を確立することを目的としている。本年度研究により、SMA では神経伝導検査（NCS）が有効であること、心電図の経年変化が見られること、IV は遺伝学的、症候学的に異質な疾患群を包括していること、*SMN2* 遺伝子のコピー数が多いほど軽症な傾向、修飾因子の複数存在が明らかになった。次世代シーケンサーによる全エクソン分析により新規遺伝子が同定されている。患者線維芽細胞より iPS 細胞が樹立されたが、改良が必要である。

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と共に、薬物による根本治療への展開とその評価法の確率が必要である。

研究分担者

中野今治（自治医科大学内科学講座神経内科部門）

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）

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（公益財団法人微生物化学研究会、微生物化学研究所）

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）

山本俊至（東京女子医科大学統合医科学研究所）

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

米川貴博（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）

南 成祐（独立行政法人国立精神・神経医療研究

センター病院 DNA 診断・治療室）

森川 悟（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）

荒川正行（公益財団法人微生物化学研究会、微生物化学研究所ウイルス研究部）

浦野真理（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

相楽有規子（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）

久保祐二（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

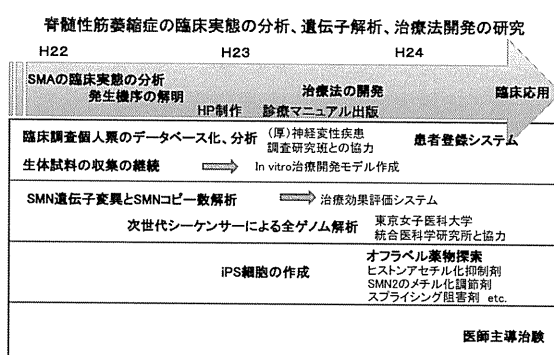
A. 研究目的

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。平成 22 年度の本研究に引き続き、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。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

本研究班の研究の流れとアウトカムを示す。



研究者のテーマを下に示す。

齋藤加代子
研究統括
近藤恵里、（久保祐二、荒川玲子、相楽有規子） 齋藤加代子
臨床実態の分析、次世代シーケンサーによるゲノム解析
伊藤万由里、松尾真理、齋藤加代子
患者登録データベース作成準備、ホームページ作成
中野 今治、（森田光哉）
SMA IV型の臨床像と遺伝学的背景
小牧宏文、（南 成祐、米川貴博 ）
診断法の精度向上
齋藤利雄
臨床実態分析、治療効果判定法の検討
西尾 久英、（森川 悟）
遺伝子解析研究
中島 孝
SMAの装着ロボットに関する研究
野本 明男、（荒川正行）
ポリオウイルスベクターの構築と作製
山本俊至
生体試料収集：iPS細胞の作製とEBウイルスによる芽球化
（ ）は研究協力者

（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於いて認められた研究である。

C. 研究結果

平成 22 年度に引き続き研究を行った。

第 1 回班会議

平成 23 年 9 月 19 日（月）（於：東京女子医科大学）開催。研究方針として治療法開発に向かうことを確認し、医師主導治験に関する討議を兼ねて実施した。



第 2 回班会議

平成 23 年 11 月 25 日（金）（於：東京女子医科大学）に開催された。医師主導治験について、森豊隆志先生（医薬品医療機器総合機構）の特別講演の下に、SMA 治験へのアドバイスを頂いた。

本年度の研究成果

(1) 臨床実態の分析：小牧宏文班員は、SMA の神経伝導検査 (NCS) から末梢神経障害、とくに感覚神経障害について検討し、SMA I 型における上下肢の複合筋活動電位 (CMAP) や F 波出現頻度 (FO) の減少は、脊髄運動神経細胞の変性・消失がびまん性であることを示すのに対し、II 型では運動神経細胞の減少が下肢が目立つ。III 型は II 型に比し運動単位の減少が軽度である。I 型における感覚神経伝導速度 (SCV) や感覚神経活動電位 (SNAP) 低下は、主として大径有髄の感覚神経線維の軸索変性を示唆するが、II、III 型には NCS で検出可能な感覚神経障害は見られなかった。齋藤利雄班員は、1 型 2 例、2 型 14 例、3 型 1 例、計 17 例で、12 誘導心電図、ホルター心電図、心臓超音波検査、心房性あるいは脳性ナトリウム利尿ペプチドの検査結果を後方視的に情報収集・検討し、SMA では、経年的に心電図変化が起こることが示された。中野今治班員は、ALS または運動ニ

ニューロン疾患と診断された症例 302 例を調査・検討し、SMA-IV は 11 例であった。遺伝子解析を行った 9 例の臨床像は、男性 2 例、女性 7 例で平均年齢は 54.3 歳。家族歴は 2 症例 2 家系に認めた。初発症状は 1 例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下、他の 8 例が一側上肢または一側下肢の遠位筋優位の筋力低下であった。*SMN*、*NAIP* 変異は認めなかった。*SMN* 変異を有する SMA-IV 報告例の大多数は下肢近位筋対称性の発症であり、SMA-IV と考えられた症例群は遺伝学的、症候学的にも異質な疾患群を包括していると考えた。

(2) 診断法の精度向上：小牧宏文班員は、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA 法) を SMA の遺伝子診断に使用した。MRC-Holland 社のキットを使用し、*SMN1* 遺伝子、*SMN2* 遺伝子、*NAIP* 遺伝子コピー数判定が可能であった。*SMN1* 遺伝子が 0 コピーであることにより 9 名を SMA と診断した。*SMN2* 遺伝子のコピー数が多いほど軽症な傾向も確認された。西尾久英班員は、*SMN1* 遺伝子のホモ接合性欠失を認め、*SMN2* 遺伝子を 2 コピー有する II/III 型の症例において、症状の修飾因子としては、*SMN2* 遺伝子コピー数、*SMN2* 遺伝子プロモーター内の GCC 挿入/欠失多型性以外の要因であると考えた。斎藤加代子班員・浦野真理研究協力者は本症の出生前診断の検討を行った。14 年間に双胎 2 組を含み、診断総数は 104 例、66 家系で実施した。罹患者は理論値 25%と一致した。

(3) 遺伝子解析研究：斎藤加代子班員・久保祐二研究協力者は、臨床症状から SMA と診断されたが、*SMN* 遺伝子変異を示さない症例に注目し、これらの患者の DNA について、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMA を引き起こす新規原因遺伝子の探索を行った。II 型の症例において dystrophin related protein 2 (*DRP2*) 遺伝子の変異が確認できた。*DRP2* は Xq22.1 に存在し、脳・脊髄に発現する蛋白質で、*DRP2* と複合体を形成する periaxin 欠損マウスにおいて脱髄

性ニューロパチーを生じることが報告されているがヒトにおける報告はなく、新たな SMA 原因遺伝子の可能性を示唆した。

(4) iPS 細胞の作製：山本俊至班員は、SMA-I 型の患者由来培養線維芽細胞から山中 4 因子の導入により iPS 細胞を作製した。細胞の染色体への integration が起こっているため、今後はより簡便で効率の良い方法としてエピゾーマルベクターを用いた導入方法を試みる必要がある。

(5) 装着ロボット HAL による SMA の治療：中島孝班員は、成人の SMA-III 型で、関節運動意図を示す有効な表面筋電図をスクリーニングする方法を検討し、微弱な表面筋電図であっても HAL が駆動し関節運動を行った。Hoist を利用して体重を免荷すると同時に、転倒しないような安全管理をおこない、HAL を用いた歩行に成功した。

(6) SMA 遺伝子導入のためのポリオウイルス (PV) ベクターの開発：野本明男班員・荒川正行研究協力者は、PV 構造領域を GFPtag ヒト *SMN1* cDNA に置換した pPV-GFP-SMN1 プラスミドを作製した。このプラスミド由来ウイルス粒子が運動神経特異的に感染し、ヒト *SMN1* をタンパクレベルで発現できる系を構築する。

(7) 絨毛細胞由来の間葉系幹細胞を用いた遺伝性神経筋疾患の治療

斎藤加代子班員、荒川玲子研究協力者は妊娠 9 週の絨毛細胞において、iPS 細胞と類似の多能性を示すことを発見し、筋ジストロフィーのみならず脊髄性筋萎縮症においても萎縮筋への細胞治療の資源としての可能性を述べた。

本研究班のホームページの作成

平成 23 年 10 月、本研究班の進捗と成果を公表するためにホームページを立ち上げた。

<http://plaza.umin.ac.jp/~SMART/>

脊髄性筋萎縮症の診療マニュアルの作成

脊髄性筋萎縮症の診療を均霑化して、新治験に対応できる体制を作る目的で、医師（神経内科医、小児科医、整形外科医ほか他科の医師）、OT、

PT（リハビリテーション関係者）、看護師ほか医療関係者、SMA患者とその家族を対象として、本研究班の研究分担者、研究協力、SMA患者の診療に携わるメンバーにより「脊髄性筋萎縮症の診療マニュアル」を作成した。金芳堂より刊行する予定である。

D. 考察

本研究班 2 年目において、SMA-I, II, III, IV 型の臨床実態の分析を進め、NCS 特に SCV、SNAP が I 型で低下していること、心電図の経年的な変化が明らかになった。また、MLPA 法により、*SMN2* 遺伝子のコピー数の測定に有用であった。これらの指標は、SMA の治療研究において、効果判定の指標として扱うことができる。SMA-IV 型の臨床実態も明らかになってきており、複数の原因遺伝子の存在が考えられるが、その解析は次世代シーケンサーによることが有効である。

治療薬の発見と開発において必要な iPS 細胞が樹立されたが、その臨床への応用には改良が必要である。HAL はリハビリ的な効果が予測され、根本治療との併用として有効であろう。脊髄前角細胞に *SMN1* 遺伝子を運ぶためには、ポリオウイルスベクターが理論的には望ましい。実用への改良を続けている。

SMA の治験は海外では以下のようなものがなされている。

SMAの薬物治療の可能性	
valproic acid	翻訳を促進するhistone deacetylase inhibitors (HDACis) として働き、 → <i>SMN2</i> 由来の全長 <i>SMN</i> mRNAのレベルを増加
phenylbutyrate	<i>SMN2</i> 遺伝子 exon 7 のスプライシングパターンを変えて、 → <i>SMN2</i> 由来の全長産物のレベルを増加
hydroxyurea	<i>SMN2</i> 遺伝子の発現を増強させて → <i>SMN2</i> 由来の全長産物のレベルを増加
RG3039 (Repligen)	RNAプロセシング酵素の阻害剤 → <i>SMN2</i> 由来の全長産物のレベルを増加
ヒストンアセチル化抑制剤	
<i>SMN2</i> のメチル化調節剤	
スプライシング阻害剤 etc.	

本研究班 3 年目においては、患者由来培養細胞における in vitro 治療を行う一方、臨床効果の評価基準を作成する。さらに、臨床治験をパイロスタディーとして計画したい。

E. 結論

(1) 臨床病態の分析

- SMA I 型の神経伝導検査(NCS)は有効である。
- SMA では心電図の経年変化が見られる。
- 運動ニューロン疾患 302 例中、SMA-IV は 11 例で、遺伝学的、症候学的に異質な疾患群を包括していた。

(2) 診断法の精度向上

- *SMN2* 遺伝子のコピー数が多いほど軽症な傾向
- 症状の修飾因子は、*SMN2* 遺伝子コピー数、*SMN2* プロモーター内のGCC挿入/欠失多型性以外に存在する。

(3) 遺伝子解析研究：次世代シーケンサーによる全エクソーム解析にて SMA を引き起こす新規原因遺伝子の探索を開始し候補遺伝子を同定した。

(4) iPS 細胞の作製：SMA-I 型の患者由来培養線維芽細胞から樹立に成功

(5) 最終年度は、SMA の根本治療法の開発を目指して、臨床効果の評価基準を作成する。患者由来培養細胞にて *SMN2* 遺伝子の発現を増加させる薬物検索を行う。さらに、臨床治験をパイロスタディーとして計画する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 斎藤加代子、荒川玲子、ウエルドニッヒ・ホフマン病. 総編集: 井村裕夫, 編集: 福井次矢・辻省次. 症候群ハンドブック. 中山書店. 東京. p72-73, 2011
- 2) 山本俊至. 臨床遺伝に関わる人のためのマイクロアレイ染色体検査. 診断と治療社. 東京, 2012
- 3) Kondo E, Nishimura T, Kosho T, Inaba Y, Mitsuhashi S, Ishida T, Baba A, Koike K, Nishio I, Nonaka I, Furukawa T, Saito K. Recessive RYR1 Mutations in a Patient With Severe Congenital Nemaline Myopathy With

- Ophthalmoplegia Identified Through Massively Parallel Sequencing. American Journal of Medical Genetics (in press)
- 4) Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. Cell and Tissue Research (in press)
- 5) 斎藤加代子、荒川玲子. 遺伝カウンセリング. 総合臨床 2011;60(4):599-600
- 6) 斎藤加代子、松尾真理、菅野仁、浦野真理、相楽有規子. 小児科領域における研究と治療の進歩 遺伝子医療. 東京女子医科大学雑誌 2011;81(5):349-355
- 7) Harahap IS, Saito T, San LP, Sasaki N, Gunadi, Nurputra DK, Yusoff S, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Lee MJ, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Valproic acid increases SMN2 expression and modulates SF2/ASF and hnRNPA1 expression in SMA fibroblast cell lines. Brain Dev. 2011 (in Press).
- 8) Morikawa S, Harahap IS, Kaszynski RH, Yamamoto T, Pramudya DK, Van Pham HT, Hartomo TB, Lee MJ, Morioka I, Nishimura N, Yokoyama N, Ueno Y, Matsuo M, Nishio H. Diagnosis of spinal muscular atrophy via high-resolution melting analysis symmetric polymerase chain reaction without probe: a screening evaluation for SMN1 deletions and intragenic mutations. Genet Test Mol Biomarkers. 2011;15(10):677-84
- 9) Katayama M, Naritomi H, Nishio H, Watanabe T, Teramoto S, Kanda F, Hazama A. Long-term stabilization of respiratory conditions in patients with spinal muscular atrophy type 2 by continuous positive airway pressure: a report of two cases. Kobe J. Med. Sci. 2011;57(3):E98-105.
- 10) Harahap NI, Harahap IS, Kaszynski RH, Nurputra DK, Hartomo TB, Pham HT, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Rusdi I, Widiastuti R, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy Patient Detection and Carrier Screening Using Dried Blood Spots on Filter Paper. Genet Test Mol Biomarkers. 2011 (in press)
- 11) 西尾久英, 斉藤利雄, 森川悟, 山本友人, Dian Kesumapramudya Nurputra, 寶田徹, 竹内敦子, 西村範行, 竹島泰弘, 松尾雅文. 小児医学最近の進歩 脊髄性筋萎縮症と SMN 蛋白と低分子量リボ核蛋白合成. 小児科. 2011;52(11):1535-1542
- 12) 栗野宏之, 李知子, 八木麻理子, 竹島泰弘, 西尾久英, 松尾雅文. 非侵襲的陽圧換気療法と器械による咳介助を活用し、気管内挿管から離脱した脊髄性筋萎縮症 I 型. 日本小児科学会雑誌. 2011; 115(9):1451-1455
- 13) 中島孝. 医療における QOL と緩和についての誤解を解くために. 医薬ジャーナル. 2011;47: 1167-1174
- 14) Nakajima T. Neuroethics and QOL perspectives of cybernics technology, enhancement or palliation, towards clinical trial, Cybernics Technical Reports. Special issue on roboethics, University of Tsukuba. 2011:15-22
- 15) Hirose M, Haginoya K, Yokoyama H, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Munakata M, Uematsu M, Iinuma K, Kato M, Yamamoto T, Tsuchiya S. Progressive atrophy of the cerebrum in 2 Japanese sisters with microcephaly with simplified gyri and enlarged extra axial space. Neuropediatrics. 2011;42: 163-166
- 16) 山本俊至. 次世代シーケンサーによる遺伝子解析. 小児科 2011;52(12):1591-1597
- 17) 下島圭子, 山本俊至. iPS 細胞の小児神経疾患の病態解析への応用. 脳 21. 2011;14:218-223
- ## 2. 学会発表
- 1) 荒川玲子、斎藤加代子. 妊娠初期絨毛を用いた筋ジストロフィー再生治療の可能性. 第 53 回日

本小児神経学会総会 2011. 平成 23 年 5 月 26 日.
横浜

2) 浦野真理、相楽有規子、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症（SMA）の出生前診断の検討. 遺伝医学合同学術集会 2011. 平成23年6月17日. 京都

3) 近藤恵里、西村貴文、稲葉雄二、古庄知己、西野一三、埜中征哉、古川徹、斎藤加代子. 先天性ミオパチー原因遺伝子の包括的スクリーニング解析にて診断し得た RYR1 遺伝子変異による乳児重症型ネマリンミオパチーの 1 例. 日本人類遺伝学会第 56 回大会・第 11 回東アジア人類遺伝学会. 平成 23 年 11 月 11 日. 千葉

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

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

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

臨床症状から脊髄性筋萎縮症 (SMA) と診断されたが、遺伝子診断の指標である survival motor neuron (*SMN*) 遺伝子の欠失を示さない症例に注目し、これらの患者の遺伝子について、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMA を引き起こす新規原因遺伝子の探索を行った。II 型の症例において dystrophin related protein 2 (*DRP2*) 遺伝子のホモ接合性変異が確認できた。*DRP2* は Xq22.1 に存在し、脳・脊髄に発現する蛋白質で、*DRP2* と複合体を形成する periaxin 欠損マウスにおいて脱髄性ニューロパチーを生じることが報告されている。今後、本例と同様の症例において、*DRP2* 変異の有無を調べ、SMA に対してどのような影響を与えるかを検証する。

共同研究者

久保祐二（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専攻遺伝子医学分野）

近藤恵里（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

古川徹（東京女子医科大学統合医科学研究所）

A. 研究目的

小児期発症の脊髄性筋萎縮症 (SMA I 型、II 型、III 型) はほぼ単一の病因で、原因遺伝子は第 5 染色体長腕 5q13 に存在している survival motor neuron (*SMN*) 遺伝子であり、*SMN* 遺伝子に欠失または突然変異が見られるホモ接合体において発症する。本研究では、臨床症状から SMA と診断されたが、遺伝子診断の指標である *SMN* 遺伝子の欠失を示さない症例に注目し、これらの患者の遺伝子について、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMA を引き起こす新規原因遺伝子を同定する。

B. 研究方法

SMA 遺伝子診断の指標である *SMN* 遺伝子の欠失を示さない症例 (I~III 型 17 例、IV 型 3 例) に対し、次世代シーケンサー SOLiD4 システム

(ABI 社) による全エクソーム解析を施行した。ゲノム DNA からのエクソンのキャプチャには、Agilent SureSelect Human All Exon Kit (Agilent 社) を使用した。得られた解析結果に対し、これらの症例で共通の新規遺伝子変異が存在するかを調査した。

(倫理面への配慮)

本研究の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

次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を施行した結果、20 症例において検出された Variant 数は 147,243 個であった。しかしながら、その中に *SMN* 遺伝子の SNP は検出されなかった (図 1)。これらの検出された SNP より、「共通 SNP 解析」、「SMA 機能関連遺伝子の解析」の 2 つのアプローチを用いて候補遺伝子の絞込みを行った。

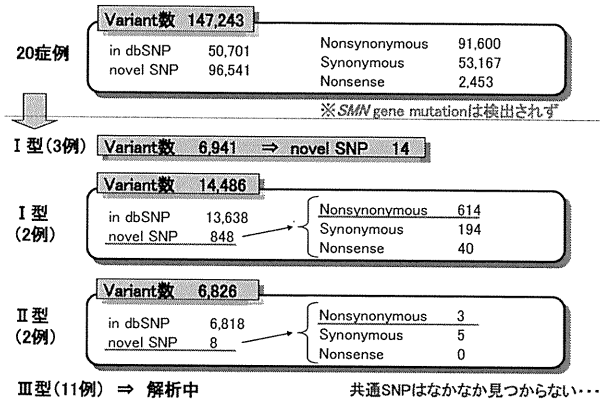
1. 共通 SNP 解析

SMA の型ごとに解析を行い、どのような共通する SNP が存在するかを調査した。

I 型 3 例に着目すると、共通する SNP の Variant 数は 6,941 個あり、そのうちデータベー

登録の無い新規 SNP は 14 個であった。次に I 型 2 例に着目すると、共通する SNP の Variant 数は 14,486 個あり、そのうちデータベース登録の無い新規 SNP は 848 個（内訳：nonsynonymous SNP は 614 個、synonymous SNP は 194 個、nonsense SNP は 40 個）であった（図 1）。

図 1 全エクソーム解析結果



II 型 2 例に着目すると、共通する SNP の Variant 数は 6,826 個あり、そのうちデータベース登録の無い新規 SNP は 8 個（内訳：nonsynonymous SNP は 3 個、synonymous SNP は 5 個、nonsense SNP は 0 個）であった（図 1）。共通する SNP の中から候補となる遺伝子の探索を行っているが、現在のところ候補となる遺伝子は見つかっていない。

2. SMA 機能関連遺伝子の解析

SMN 遺伝子は脊髄の神経細胞の核内・細胞質で RNA の代謝に関与する遺伝子である。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤との関わりについての報告もある。そこで SMN 遺伝子に似た機能をもつ 遺伝子や脊髄で発現する遺伝子 に注目して候補遺伝子の絞り込みを行った。I、II 型については劣性遺伝と仮定して、ホモの変異を探索した。

I 型の 1 症例では、SMN 複合体と相互作用する U6 snRNA-associated Sm-like protein (*LSM7*) 遺伝子のホモの 5 塩基 deletion を同定した（図 2）。また、III 型の 1 症例においても、RNA の代謝に関わる transcripton termination factor (*TTF1*) 遺伝子などの変異が同定された。

II 型の 1 症例では、pre-mRNA processing factor (*PRPF40A*) 遺伝子、histone deacetylase (*HDAC11*) 遺伝子、splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1 (*SREK1*) 遺伝子、POU class 2 homeobox 3 (*POU2F3*) 遺伝子、H3 histone, family 3C (*H3F3C*) 遺伝子、dystrophin related protein 2 (*DRP2*) 遺伝子にホモの変異が同定された（図 2）。

図 2 SMA 機能関連遺伝子の解析結果

※以下の結果は novel SNP、home mutation、nonsynonymous である。

gene	other name	codon	chr
<i>LSM7</i>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7	deletion(-5), frame shift TGCCGTCCTG/TGCTG	19

gene	other name	codon	chr
<i>PRPF40A</i>	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	P(GCT)→S(TCT)	2
<i>HDAC11</i>	histone deacetylase 11	A(GCT)→V(GTT)	3
<i>SREK1</i>	splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	S(AGT)→G(GGT)	5
<i>POU2F3</i>	POU class 2 homeobox 3	I(ATC)→N(AAC)	11
<i>H3F3C</i>	H3 histone, family 3C	K(AAG)→R(AGG)	12
<i>DRP2</i>	dystrophin related protein 2	V(GTG)→(M/+)(ATG)	X

この II 型 1 症例において同定された 6 個の遺伝子についてキャピラリーシーケンサーにより、リシーケンスして新規 SNP の有無を確認した。また、この症例の母親についても同様にこの SNP の有無を確認した。さらに、遺伝子変異の有害度を予測するプログラム Sift Score、Polyphen Score を利用し、今回同定された SNP の有害度を予測した（表 1）。

表 1 リシーケンス、その他解析結果

gene	coverage	Sift Score	Polyphen Score	sequence	
				mother	patient
1 <i>PRPF40A</i>	481	0.02	NA	C/C	C/C
2 <i>HDAC11</i>	173	0	0.97	確認中	
3 <i>SREK1</i>	991	0.01	0.41	A/A	A/A
4 <i>POU2F3</i>	58	0	1	T/T	T/T
5 <i>H3F3C</i>	110	0.01	0.011	A/A	A/A
6 <i>DRP2</i>	26	0.07	0.016	G/A	A/A

Threshold : < 0.05 1に近いとより有害

Sift Score、Polyphen Score によると、すべての SNP について有害の可能性がある結果が得られた。また、リシーケンスの結果、*PRPF40A*、*SREK1*、*POU2F3*、*H3F3C* 遺伝子については SNP が

確認できなかった。*DRP2* 遺伝子のみ SNP が確認できた（表 1）。*HDAC11* については現在確認中である。

D. 考察

共通SNP解析では、現在のところ候補遺伝子は見つかっていない。本年度の活動では、例えば I 型 2 例の場合、共通新規SNP 848 個のうち nonsynonymous SNP 614 個、nonsense SNP 40 個 から候補遺伝子の探索を行った。SMA機能関連遺伝子に注目するだけでなく、今後は幅広い可能性を考えて様々な機能の遺伝子に着目していく必要がある。特にnonsense SNPは詳細に調べていきたい。また、似た症例の解析結果を重ねていき共通遺伝子の絞込みを行うことや、両親など他の家族構成員についても解析を進めていくことが必要だと考えている。

SMA 機能関連遺伝子の解析より、II 型 1 症例において *DRP2* 遺伝子を候補遺伝子にあげることができた。*DRP2* は periaxin、dystroglycan と複合体を形成し myelination において重要な役割を担っていると考えられている。periaxin はシャルコー・マリー・トゥース病 4 型 (CMT4F) の原因遺伝子として知られている。また、periaxin 欠損マウスにおいて脱髄性ニューロパチーを生じることが報告されている。もし *DRP2* に異常が起きた場合、CMT に似た症状が現れることが予測できるが現在のところそのような報告はされていない。今回この患者の臨床症状を詳細に調査したところ、近年末梢神経障害と思われる症状が現れていることが確認できた。今後は本ケースと似た症例において、同様に *DRP2* 遺伝子に変異がないかを調べていく予定である。

E. 結論

1. 次世代シーケンサーで全エクソーム解析を実施した結果、I 型、II 型患者において、疾患発症の原因となるような共通の SNP を見つける

ことは出来なかった。

2. SMN 蛋白質と関連する蛋白質、もしくは神経筋疾患に関わる新規 SNP (*DRP2* 遺伝子) を同定し、候補遺伝子とした。

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

なし

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（SMA）の出生前診断の検討

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

東京女子医科大学では、1996年から脊髄性筋萎縮症（SMA）I型、II型に関する出生前診断が倫理委員会で承認されている。今回、承認後から2010年までに当院を受診し、出生前診断を実施した症例について検討し、遺伝カウンセリングの一助となる情報を得ることを目的とした。

共同研究者

浦野真理（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

相楽有規子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

A. 研究目的

東京女子医科大学におけるSMAの出生前診断の現状を報告し、遺伝カウンセリングの一助となる情報を提供する。

B. 研究方法

1996年から2010年までに当院を受診し、SMA I型およびII型の出生前診断を実施した症例について検討する。出生前診断はSMN遺伝子、MAP2遺伝子の欠失解析と、両親・患児・次子のマイクロサテライトDNA多型解析により診断した。

（倫理面への配慮）

遺伝カウンセリングを全例に実施し、本研究の遺伝子解析および脊髄性筋萎縮症の出生前診断については、本学の倫理審査にて承認されている。

C. 研究結果

14年間の症例は102例、双胎2組を含み診断総数は104例、66家系であった。受診者は関東近郊が最も多く、次いで中京地方、九州地方となっていた。66家系の内訳は、I型が44家系、II型が22家系であった。

出生前診断に用いられた検査は、絨毛検査が93例（86.1%）、羊水検査が15例（13.9%）でそ

のうち2例は絨毛検査における母体混入例であった。検査の結果は、28例（26.9%）が罹患であり、76例（73.1%）が非罹患であった。

出生前診断を希望する家族には、様々な考えがあった。健康な子どもが欲しい、という家族だけでなく、出生時の体制準備のために診断を希望する家族や、SMAの子どもが欲しいと希望する家族もあり、家族の決定は多様であった。

D. 考察

当院でのSMAの出生前診断には8割以上がより早期に結果がわかる絨毛検査を選択していた。遺伝子検査の結果、罹患、非罹患の率は、常染色体劣性遺伝性疾患の再発率25%と概ね一致していた。

E. 結論

常染色体劣性遺伝性疾患の出生前診断においては、再発率が25%と高く、より早期に行える絨毛検査が選択される。

その背景となる家族の考えは多様で、健康な児を希望するために診断を受ける家族は多いが、中には出産を前提とし、体制を考えるために診断を受ける者もいた。結果により分娩施設の産婦人科医との連携が必要になることもあり、家族の考えを遺伝カウンセリングの中で十分に傾聴し、話し合うことが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

本年度なし

2. 学会発表

1) 浦野真理、相楽有規子、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症（SMA）の出生前診断の検討. 遺伝医学合同学術集会 2011. 平成23年6月17日. 京都
日本遺伝カウンセリング学会誌第32巻2号2011年5月

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

成人発症脊髄性筋萎縮症の臨床像と遺伝学的背景の解析

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ついて、5年以上の間、下位運動ニューロン症候のみで極軽微な進行で推移した症例を成人発症脊髄性筋萎縮症（SMA-IV）として抽出し、その臨床像及び遺伝学的背景について検討した。当院にて過去15年の間にALSまたは運動ニューロン疾患と診断された症例302例について後方視的に調査・検討したところ、SMA-IVと考えられたのは11例であった。遺伝子解析の同意が得られた9例の臨床像は、男性2例、女性7例で平均年齢は54.3歳。家族歴は2症例2家系に認めた。初発症状は1例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下、他の8例が一側上肢または一側下肢の遠位筋優位の筋力低下であった。小児SMAの大多数で認められるSMN及びNAIP変異について検索を行ったが、何れの遺伝子にも変異を認めなかった。SMN変異を有するSMA-IV報告例の大多数は下肢近位筋対称性の発症であり、SMA-IVと考えられた症例群は遺伝学的、症候学的にも異質な疾患群を包括している可能性が示された。

共同研究者

益子貴史、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）

相楽有規子、斎藤加代子

（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

A. 研究目的

成人発症脊髄性筋萎縮症（SMA-IV）は臨床的に下位運動ニューロン症候のみを呈し経過が緩徐で予後が良好な疾患とされる。当科で経験したSMA-IVと考えられる症例の臨床像と遺伝学的背景を解析しその疾患相同性について検討する。

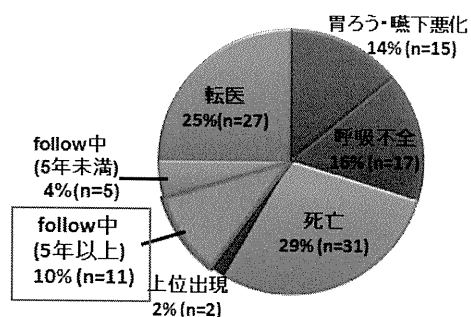
B. 研究方法（倫理面への配慮も含む）

当院において、過去15年の間に運動ニューロン疾患と診断された302例の中で、下位運動ニューロン症候のみを呈し、かつ5年以上の極軽微な進行で推移した11例を抽出した。そのうち遺伝子解析の同意が得られた9例について、臨床像をまとめ、小児SMAの大多数で原因遺伝子とされるSMN及びNAIP遺伝子の解析を行った。

C. 研究結果

当院入院時より、下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は302例中108例（36%）であっ

図1 下位運動ニューロン症候のみ例の転帰 (n=108)



た。この108例についてその後の転帰を図1に示す。108例の中で、嚥下機能が増悪し胃瘻造設を余儀なくされた15例、呼吸筋麻痺を認めた17例、死亡に至った31例、上位運動ニューロン症候が出現した2例の合計65例（61%）は臨床的にALSと診断し得る症例と判断した。

追跡が可能で下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は16例（14%）であり、その中で5年以上の間、極軽微な進行で推移した11例をSMA-IVと臨床診断した。そのうち遺伝子解析の同意が得られた9例の臨床像をまとめた。

9例の臨床像は男性2例、女性7例、家族歴を有したのは2症例2家系（両家系とも常染色体優性遺伝形式）であった。発症年齢は平均54.3

歳（38-72歳）で30-49歳が3例、50-69歳が4例、70歳-が2例であった。初発症状では1例が対称性両側下肢近位筋優位の筋力低下、5例が一側上肢遠位筋優位の筋力低下、3例が一側下肢遠位筋優位筋力低下を呈した。罹病期間は5-10年が3例、11-15年が3例、16-20年が1例、21年以上経過した例が2例であった。現在のADLについては6例が歩行可能、3例が不可能であった。また4例が自立生活、5例が部分介助生活であり、2例で軽度の嚥下障害を認めた。寝たきりの症例はなかった。

以上のような自験例9例についてSMNおよびNAIP遺伝子の解析を行ったが、何れの遺伝子にも変異を認めなかった。

D. 考察

筋力低下や筋萎縮、腱反射の減弱・消失といった下位運動ニューロン症候のみで発症した症例でも比較的急性の経過をとり、ALSと臨床診断される症例も多い。今回の後方視的検討でも下位運動ニューロン症候のみで発症した症例の内61%はALSと臨床的に診断できる症例であった。一方、2~5年で呼吸筋麻痺を来して死亡するALSと比べると、進行が非常に緩徐で生命予後の良好な症例群が存在し、これらの症例は従来、脊髄性進行性筋萎縮症（SPMA）や進行性筋萎縮症（PMA）などと呼ばれてきたが、ALSとの相同性やその他の遺伝性運動ニューロパチーとの鑑別は常に議論されてきたところである。

我々は今回、成人発症で下位運動ニューロン症候のみを呈したまま、5年以上経過しても極めて進行が緩徐な症例をSMA-IVと定義した。この暫定的な定義の基で自験例より抽出した症例群の特徴を明確にするため、小児SMA症例の大多数で認められるとされる原因遺伝子SMNおよびNAIPの変異をまず検索したが何れの遺伝子にも異常は認められなかった。そこでSMN変異を認める過去のSMA-IV報告例21例と自験例の臨床

像を比較した。

文献上検索できた報告例は男性13例、女性8例であり、家族歴は9例と半数で認められた。その発症年齢は平均31.5歳で20-64歳であるが、18例が35歳以下で自験例と比べると若年発症の傾向があった（図2）。しかし64歳と高齢発症も1例あり、SMAの診断には高齢発症であっても遺伝子検索が望まれる。初発症状は報告例21例中19例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下および筋萎縮を示し、2例が非対称性遠位筋優位の筋力低下であるものの、症候学的には比較的均質な症例群といえる。自験例では1例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下で、その他の症例が遠位筋優位の発症と様々な分布で発症していたことは、症候学的な多様性を示している。罹病期間の分布では両群で差は見られなかった。21例中14例でADLについて記載があり、6例が自立歩行生活可能、6例が平地歩行のみ可能、2例が歩行不可能で、自験例と類似していた。

前述したようにSMA-IVはその障害部位の解剖学的要因から臨床所見、電気生理学的に軸索型運動ニューロパチーとの鑑別は困難である（図3）。そこで、今回9例中6例で遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子についても網羅的に解析を行っている。

図2 自験例とSMN遺伝子変異を有するSMA-IV報告例との対比

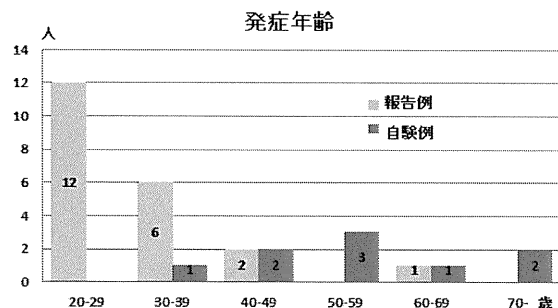
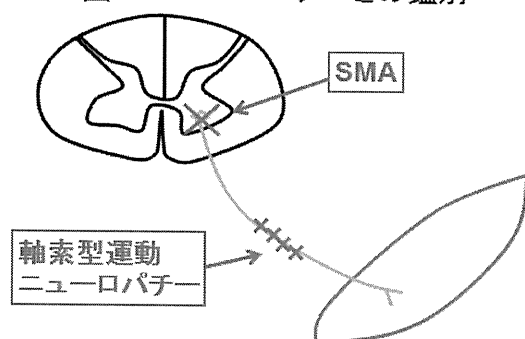


図3 ニューロパチーとの鑑別



解析は途中であるが、50歳時に一側上肢遠位筋優位の筋力低下で発症した家族歴のない56歳女性の1例において、軸索型Charcot-Marie-Tooth病（CMT2）の原因遺伝子の一つである *MFN2* の P456L 変異を認める症例があった。P456L 変異の報告はまだなく、その病因としての意義について現在検討しているところである。

E. 結論

成人発症脊髄性筋萎縮症として自験例より抽出した9例は多様な臨床像を呈し、また遺伝学的にも、*SMA* 変異を認める均一な疾患群とは異なることがわかった。また、遺伝性運動ニューロパチーと考えられる症例も含まれた多様な疾患群である可能性が示された。

謝辞；遺伝性ニューロパチーの遺伝子解析を行っていただいている鹿児島大学医学部第3内科高嶋博先生、橋口昭大先生に深謝いたします。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

第53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

脊髄性筋萎縮症の末梢神経障害に関する研究

小牧宏文（独）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

脊髄性筋萎縮症(SMA)の重症例では末梢神経も障害される。SMAの神経伝導検査(NCS)から末梢神経障害、とくに感覚神経障害について検討した。2001年9月-2011年8月に当科に入院したSMA 18例(男:女12:6)を対象とした。I型5, II型10, III型3例で、全例 *SMN1* 遺伝子 exon7 を欠失, 17例で exon8 を欠失していた。診断時のNCSのうち、運動・感覚神経伝導速度(MCV・SCV)、複合筋・感覚神経活動電位(CMAP・SNAP)、F波出現頻度(FO)を年齢別コントロールと比較した。MCV低下はI型3例(60%)にみられ、CMAPの著明な低下が全例で観察された。II型ではMCV低下はなく、CMAPはUlnar ($p < 0.01$), Tibial nerve ($p < 0.01$)で有意に低下していた。SCV低下やSNAP低下は、I型では3例(60%)にみられたが、II型ではいずれもみられなかった。III型でもMCV低下はなく、CMAPはtibialで低値をとることがわかった。SCVには明らかな差はなく、正中神経、尺骨神経SNAPは1-3歳SMA例でコントロールより低い傾向があった。腓腹神経SNAPには、明らかな差はなかった。FOは、I型では上下肢ともに減少していたが、II型ではUlnar ($p = 0.039$), Tibial nerve ($p = 0.031$)で有意な減少がみられた。III型FOはコントロールと差はなかったが、F-wave MLは、SMA例で長い傾向があった。SMA I型における上下肢CMAPやFOの減少は、脊髄運動神経細胞の変性・消失がびまん性であることを示すのに対し、II型では運動神経細胞の減少が下肢で目立つ。III型はII型に比し運動単位の減少が軽度である。I型におけるSCVやSNAP低下は、主として大径有髄の感覚神経線維の軸索変性を示唆するが、II, III型にはNCSで検出可能な感覚神経障害はない。

共同研究者

米川貴博（独）国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科レジデント
佐々木征行 同 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
斎藤義朗 同 小児神経科医長

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症(SMA)は脊髄前角細胞の変性・消失によって発症し、一般に明らかな感覚神経障害のある例は診断から除外される。しかしながら、剖検や筋生検時の筋内神経で検討された病理報告から、I型の運動神経や感覚神経にワラー変性や後根神経節細胞変性が起こっていることが知られている。

過去にSMAのNCSに関する先行研究は散見されるが、評価対象の神経が少ないこと、症例数が少ないこと、或いは評価時の年齢が高いことなどの問題点が挙げられる。

SMN1 遺伝子検査が実施可能な現在では、神経生理検査に関するデータはない。当センターでは、末梢神経疾患の除外のためにNCSや針筋電図を行っており、これまでに多数例のデータの蓄積がある。今回末梢神経障害の有無を明らかにし、重症度による末梢神経障害の程度の差異やその特徴を明らかにすることを目的として、SMA診断時のNCSを解析した。

B. 研究方法

2001年9月-2011年8月に当科に入院したSMA 18例(男:女12:6)を対象とした。I型5

例（年齢 0.2–1.1，中央値 0.3 歳），II 型 10 例（年齢 1.0–2.8，中央値 1.9 歳），III 型 3 例（1 歳 11 ヶ月，2 歳 7 ヶ月，6 歳 7 ヶ月）で，全例 *SMVI* 遺伝子 exon7 を欠失，17 例で exon8 を欠失していた。

診断時の NCS のうち，運動・感覚神経伝導速度 (MCV・SCV)，複合筋・感覚神経活動電位 (CMAP・SNAP)，F 波最短潜時・出現頻度 (F-wave ML・FO) を年齢別コントロールと比較した。CMAP，F 波について，正中・尺骨神経は手首，後脛骨神経は内果後下部で記録した。感覚神経伝導検査は順行法で実施し，SCV，SNAP について，正中・尺骨神経は手首で記録した。腓腹神経の SCV は遠位で記録し，SNAP は刺激－記録電極間の距離が一定でなく，刺激－記録電極間に対する SNAP を SMA 群，コントロール群で評価した。コントロールは，当科で実施した過去 4 年分の 0–1 歳，1–3 歳，4–7 歳児の NCS をもとに，明らかな末梢神経障害のない例から作成した。

SMAII 型群と 1–3 歳コントロール群の MCV，SCV，CMAP，SNAP，F-wave ML の比較には two sample *t*-test，FO の比較には Mann-Whitney U test を用い， $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

C. 研究結果

(1) SMAI 型

3 例 (60%) に MCV 低下がみられ，全例で CMAP の著明な低下が観察された。SCV 低下や SNAP 低下も 3 例 (60%) にみられた。腓腹神経 SNAP は 0–1 歳コントロールに比し低い傾向があることが明らかとなった。F-wave ML 延長がみられる例が存在し，FO は全例で上下肢とも低下していた。

(2) SMAII 型

MCV 低下は認められず，CMAP は尺骨神経 ($p < 0.01$)，後脛骨神経 ($p < 0.01$) で統計学的に有意に低下しており，正中神経では SMA 群で低い傾向がみられたものの有意差はなかった ($p = 0.107$)。SCV 低下や SNAP 低下はみられなかった。

腓腹神経 SNAP には 1–3 歳コントロールと比較して明らかな違いは認められなかった。F-wave ML は，尺骨神経で有意な延長がみられ，FO は尺骨神経 ($p = 0.039$)，後脛骨神経 ($p = 0.031$) で有意に減少していた。

(3) SMAIII 型

MCV には差はなかったが，CMAP は後脛骨神経で 1–3 歳，4–7 歳コントロールに比し低値をとることが明らかとなった。SCV には明らかな差はなく，正中神経，尺骨神経 SNAP は 1–3 歳 SMA 例でコントロールより低い傾向があった。腓腹神経の SNAP には，明らかな分布の差はなかった。F-wave ML は，SMA 例で長い傾向があったが，FO に明らかな差はみられなかった。

(4) まとめ

I 型では，MCV 低下例があり，CMAP は全例で上下肢とも著明に低下する。FO は全例で上下肢とも低下する。腓腹神経 SNAP が低下する例が存在する。II 型では，上下肢 CMAP 低下がみられるが，下肢で著明である。FO 低下も下肢で目立つ。感覚神経の異常所見はみられない。III 型では，CMAP に 2 型と同様の傾向があったが，II 型 SMA 例よりも 1 歳 11 ヶ月，2 歳 7 ヶ月児の CMAP は高値であった。

D. 考察

I 型では，診断時すでに MCV，CMAP 低下，FO が上下肢で低下しており，1) 脊髄前角細胞の変性・消失が重度で広範囲であること，2) ワーラー変性が大径有髄線維に顕著であるという病理報告に対応する所見と考えた。CMAP 低下は神経再支配に至らずに運動単位が著減していることを示していた。腓腹神経の SNAP 低下は，感覚神経のワーラー変性をみている可能性があり，病理報告に対応する所見と考えた。

II 型では，前角細胞の変性・消失の程度は I 型に比し軽く，診断時にワーラー変性や運動単位の減少が上肢より下肢で顕著に観察されるの