

201231012A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 斎藤 加代子

平成 25（2013）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. 脊髄性筋萎縮症患者における新規SMN1 遺伝子変異の同定 -----	11
齋藤 加代子	
2. 脊髄性筋萎縮症患者由来細胞の <i>in vitro</i> 治療開発モデルの作製および 薬剤によるSMNタンパク質発現への影響について -----	15
齋藤 加代子	
3. 脊髄性筋萎縮症の日本における患者数調査 -----	18
齋藤 加代子	
4. 自験例の成人発症脊髄性筋萎縮症の臨床像と遺伝学的解析 (第2報) ー経過報告と剖検報告を交えてー -----	21
中野 今治	
5. 脊髄性筋萎縮症の病態解析に関する研究 -----	25
小牧 宏文	
6. 脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与 -----	27
齊藤 利雄	
7. SMAのサルブタモール療法 皮膚線維芽細胞におけるSMN2 遺伝子発現の調節 -----	31
西尾 久英	
8. SMN蛋白と細胞骨格 -----	34
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 -----	37
中島 孝	
10. SMN1mRNA導入ポリオウイルスベクターの開発研究 -----	42
野本 明男	
11. 脊髄性筋萎縮症患者由来疾患iPS細胞の樹立 -----	44
山本 俊至	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	55

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

平成 24 年度は 1) SMA の臨床病態解明、2) SMA の原因遺伝子解析、3) 治療効果評価法の確立と治療法開発、加えて SMA の根本治療の臨床研究・医師主導治験の実施に向けての基盤整備として患者登録システムを開始した。またバルプロ酸治療のパイロットスタディーも実施した。SMA の患者の多い医療施設が分り、治験導入に向けて、日本での拠点病院を設定していくための基礎資料が得られた。SMN 遺伝子解析には MLPA 法が有効である。*in vitro* 治療開発モデルとして、患者由来皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞、EB transform B 細胞が有用である。患者由来細胞において、ヒストン脱アセチル化阻害薬は、SMN タンパク質発現量を増加させる可能性があることが分った。SMA の iPS 細胞が樹立できたことから、神経系細胞に分化誘導させ、病態解析、治療研究に応用することができる。バルプロ酸投与のパイロットスタディーから、年少例（1-2 歳）において効果がある可能性が示された。平成 25 年度からの医師主導治験を本研究の次のステップとして実施していきたい。

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）

通山由美（姫路獨協大学薬学部医療薬学科生化学）

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）

荒川玲子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

浦野真理（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

青木亮子（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）

梅野愛子（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が特徴の下位運動ニューロン病である。発症年齢順に I 型、II

型、III型、成人発症はIV型に分類される。早期発症ほどSMN1遺伝子変異が原因で、IV型は複数の原因遺伝子が考えられる。本研究では1) SMAの臨床病態解明、2) SMAの原因遺伝子解析、3) 治療効果評価法の確立と治療法開発を目的とする。平成24年度は、これらの目的に加えて、SMAの根本治療の臨床研究・医師主導治験の実施に向けての基盤整備として、患者登録システムを開始した。またバルプロ酸治療のパイロットスタディーも実施した。

B. 研究方法

1) 患者数調査と患者登録：斎藤加らは、全国の大学病院、国公立病院・施設、及び、有床の地域拠点病院の小児科・内科（神経内科）・遺伝子診療科を対象に、郵送によるアンケート方式で、患者数調査を行った。

斎藤加らは、患者の臨床情報・遺伝子情報などを患者がダウンロードできるようにWeb上に掲載した。患者と主治医が記載した登録用紙を本研究班事務局に郵送するする方法で、患者登録システムを構築した。

2) 臨床病態の解明：中野らは、IV型と診断した症例において臨床の解析と共に、遺伝子解析、剖検を実施した。西尾らは、SMNの発現低下や機能破綻による細胞骨格の変化が、SMAの病態に関わるメカニズムを明らかにするため、SMA I、III型患者と健常人由来の線維芽細胞について、細胞骨格タンパク質の性状と機能の差異を検討した。

3) SMAの原因遺伝子解析：小牧らは臨床的にSMAを疑った患者にてMultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法による遺伝子解析を行った。斎藤加らは、臨床的にSMAであるが、PCR-RFLP法ではSMN遺伝子欠失を示さなかった2例において、MLPA法とシーケンスを行った。

4) SMAのin vitro治療開発研究：斎藤加らは、

皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞、EB transform B細胞を作製し、SMN mRNA発現量、SMN蛋白量を対照と比較した。さらに、バルプロ酸、フェニル酪酸の投与を行った。西尾らは、SMA患児の皮膚線維芽細胞を用いて、サルブタモール投与を行った。

5) SMAにおけるiPS細胞の作成：山本らは、患者皮膚線維芽細胞を得て、エピソーマルベクターを使った遺伝子導入法による患者由来iPS細胞樹立を行った。

6) SMN1遺伝子導入ポリオウイルスベクターの作製：野本らは、患者由来培養細胞に感染させ、SMN1の導入を証明した。

7) 患者の運動機能評価の検証と臨床評価基準の策定：日本人のSMAにおいて、Modified Hammersmith Scaleなど、運動機能評価スケールを検証し、臨床評価基準を策定した。中島らは、ロボットスーツHALの臨床治験における評価基準を検討した。

8) SMAにおけるVPAのパイロットスタディー：齋藤利らはSMA患者7例を対象としたバルプロ酸投与のパイロットスタディーを実施した。また斎藤加は、1歳3か月にて、バルプロ酸が有効であったI型女児例を報告した。

（倫理面への配慮）

研究分担者は各医療施設で適切に倫理委員会の審査を受け、遺伝子解析等は十分なインフォームドコンセント・文書による同意を得ている。研究代表者は以下の倫理審査にて承認を受けている。

1) 脊髄性筋萎縮症の疫学調査：

平成16年5月24日（承認番号506）

2) 脊髄性筋萎縮症(SMA)の遺伝子解析研究：

平成20年10月23日（承認番号145）

平成24年8月3日改定

3) 脊髄性筋萎縮症患者から樹立したiPS細胞の分化誘導による病態解析と治療研究：

平成21年12月15日（承認番号1777）

4) 脊髄性筋萎縮症の患者登録システム：
平成 24 年 8 月 1 日（承認番号 2551）

C. 研究結果

1) 患者数調査と患者登録：全国の 863 施設に郵送し、349 施設から回答を得た。回収率は 40.4%であった。患者数は全体で 431 人、臨床型別に分類すると、I 型 123 人（29%）、II 型 183 人（42%）、III 型 80 人（19%）、IV 型 45 人（10%）であった。都道府県別の患者数は、東京 98 人（23%）、大阪 34 人（8%）、北海道 24 人（6%）に多かった。

平成 24 年 10 月から本研究班 Web ページ <http://plaza.umin.ac.jp/~SMART/>、または「SMA（脊髄性筋萎縮症）家族の会」Web ページ <http://www.sma-kazoku.net/> を介して登録用紙（図 1）をダウンロードし、臨床情報と遺伝子情報を主治医が記入して、本研究班の事務局に郵送する患者登録システムを開始した。平成 25 年 2 月末現在 72 件である。

図 1 患者登録用紙

2) 臨床病態の解明：中野らは、IV 型と診断した症例に、ALS や遺伝性軸索型運動ニューロパチーの症例が含まれる可能性があることを証明し IV 型の病因はヘテロであることを示唆した。SMA 患者の線維芽細胞では、1) F-アクチンの配向とそれに伴う極性の異常、2) 細胞接着の上昇、さらに 3) α チュブリン脱アセチル化反応の下方向制御が認められた。

3) SMA の原因遺伝子解析：小牧らは SMA 疑い患者 17 名に MLPA 法を行い、SMN1 および SMN2 のコピー数と臨床との相関を述べた。斎藤加らは、PCR-RFLP 法では SMN 遺伝子欠失を示さなかった 2 例で、SMN 遺伝子の片アレルにおける欠失を考え、全 exon 領域のシーケンスにより、新規変異を同定した。

4) SMA の in vitro 治療開発研究：
斎藤加らは、皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞において、SMN 蛋白量が、EB transform B 細胞において SMN mRNA 発現量が対照より定値であることを示した。妊娠初期絨毛細胞では、VPA またはフェニル酪酸により SMN タンパク質の発現量が投与前より増加した。

5) SMA における iPS 細胞の作成：エレクトロポレーション法によりエピソーマルベクターを使った遺伝子導入が効率良く実施できて、SMA 患者由来 iPS 細胞を樹立することができた。

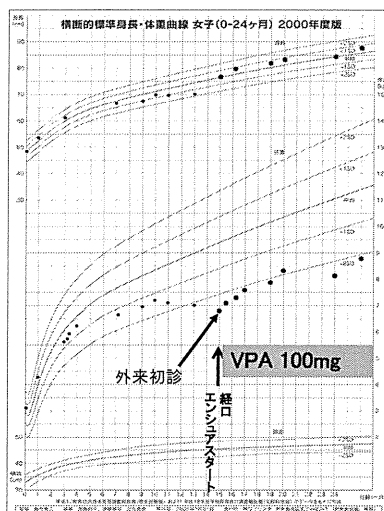
6) SMN1 遺伝子導入ポリオウイルスベクターの作製：野本らは、SMN1 mRNA 搭載ポリオウイルスベクターを開発し、in vitro で患者細胞への SMN1 の導入に成功した。

7) 患者の運動機能評価の検証と臨床評価基準の策定：日本人の SMA において、Modified Hammersmith Scale など、運動機能評価スケールを検証し、臨床評価基準を策定した。中島らは、ロボットスーツ HAL の臨床治験における評価基準を検討した。

8) 齊藤利らは SMA 患者 7 例を対象としたバルプロ酸投与のパイロットスタディーを実施した。SMN

転写、スプライシングへの効果を認めた例（2歳）
を報告し年少例で効果がある可能性がある。

図2 バルプロ酸投与により軽快したI型症例



斎藤加は、I型症例（1歳3か月）においてバルプロ酸（10mg/kg→20mg/kg）投与により、臨床効果を示し気管切開を免れ、いったん減少した体重が増加に転じた症例を報告した（図2）。その後、4歳5ヵ月時にも気管切開をせずに経過した。

D. 考察

SMAの患者の多い医療施設が分り、治験導入に向けて、日本での拠点病院を設定していくための基礎資料が得られた。SMAにおけるSMN遺伝子解析にはMLPA法が有効である。*in vitro*治療開発モデルとして、SMA患者由来皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞、EB transform B細胞が有用である。SMA患者由来細胞において、ヒストン脱アセチル化阻害薬は、SMNタンパク質発現量を増加させる可能性がある。

SMAのiPS細胞が樹立できたことから、神経系細胞に分化誘導させ、病態解析、治療研究に応用することができる。

SMA患者由来細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるバルプロ酸、フェニル酪酸を投与することによりSMNタンパク質が増加する傾向を得た。バルプロ酸投与のパイロットスタディーから、年少例（1-2歳）において効果がある

可能性が示された。平成25年度からの医師主導治験を本研究の次のステップとして実施していきたい。治療薬物の効果が個別に異なる可能性があるため、iPS細胞を個別に作成して、薬物の効果判定の予測を行うという個別化医療としての臨床研究が必要であると考えられる。米国においてSMAの小児例に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ISIS-SMNのphase 1 studyを開始している。その企業Biogen-Idec社から、国際グローバル治験への参加の申し入れがあり、平成24年10月に研究代表者の斎藤加が企業の国際共同治験実施に向けて、守秘義務契約を締結した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell Tissue Res.* 2012;348(1):189-197
- 2) 岡本健太郎、斎藤加代子、佐藤孝俊、石垣景子、舟塚真、大澤真木子、脊髄性筋萎縮症0型の1例、脳と発達、2012;44(5):31-34
- 3) 斎藤加代子、近藤恵里、青木亮子、筋疾患の診断における遺伝子検査の役割、小児内科、2012;44(9):1442-1448
- 4) 荒川玲子、松尾真理、斎藤加代子、脊髄性筋萎縮症の診断とケア、難病と在宅ケア、2012;18(9):40-43
- 5) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of *MYO1D*. *Brain Dev.*

2013;35:349-355

6) 伊藤万由里、斎藤加代子、大澤真木子. 日本における脊髄性筋萎縮症の臨床実態調査. 東女医大誌. 2013;83:52-57

7) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル. 2012. 金芳堂.

8) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症. 小児科診断・治療指針. 2012:764-766. 中山書店

9) 益子貴史, 森田光哉, 中野今治. 成人型脊髄性筋萎縮症 SMA の診断基準症例の臨床と遺伝学的背景. 難病と在宅ケア 18(4): 56 -58 2012

10) Yonekawa-T, Komaki-H, Saito-Y, Sugai-K, Sasaki-M. Peripheral nerve abnormalities in pediatric patients with spinal muscular atrophy. Brain & Development. In press.

11) 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. 2012;16(2):123-129.

12) 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. 2012;34(3):213-222.

13) Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and -independent pathway. S. Ohka, C. Nihei, M. Yamazaki, A. Nomoto Frontiers in Microbiology, 3: 1-5, 2012

2. 学会発表

1) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症の診療. 第20回阪神小児神経筋疾患研究会. 2012. 7. 21, 大阪

2) 斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症(SMA)診療と研究の最前線, SMA 家族の会関西支部第20回定例会, 2012. 8. 4, 京都

3) 斎藤加代子, 解析から応用へ、そして未来への飛躍, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 25, 東京

4) 久保祐二、相楽有規子、斎藤加代子, 小児期発症脊髄性筋萎縮症の家系におけるMLPA法を用いたSMN遺伝子解析, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 25, 東京

5) 荒川玲子、青木亮子、相楽有規子、浦野真理、松尾真理、斎藤加代子, 遺伝性神経筋疾患の治療を目指した妊娠初期絨毛の性質についての検討, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 26, 東京

6) 伊藤万由里、斎藤加代子、浦野真理、相楽有規子、大澤真木子, 日本における脊髄性筋萎縮症(SMA)の臨床・疫学調査, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 26, 東京

7) 秋澤叔香、菅野仁、川道弥生、松田義雄、太田博明、藤井寿一、松井英雄、斎藤加代子, ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞は遺伝子細胞治療のソースになりえるか 筋転写因子MYOD1を用いての検討, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 26, 東京

8) 久保祐二、相楽有規子、森田光哉、中野今治、斎藤加代子, 成人発症の脊髄性筋萎縮症におけるSMN遺伝子copy数の解析, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 27, 東京

9) 近藤恵里、斎藤加代子, 小児神経筋疾患の遺伝医学, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 27, 東京

10) 斎藤加代子, 遺伝医療に携わる小児科医の立場から, 公益財団法人日本産婦人科学会・公開シンポジウム「出生前診断-母体血を用いた出生前遺伝学的検査を考える」, 2012. 11. 13, 東京

11) 斎藤加代子, 遺伝医学から遺伝医療へ, 第3回グローバルCOE公開シンポジウム,

2012. 11. 22, 東京

12) 益子貴史、手塚修一、秋本千鶴、森田光哉、橋口昭大、高嶋博、相楽有規子、斎藤加代子、中野今治, 成人発症脊髄性筋萎縮症の臨床像の遺伝学的背景の解析, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012. 10. 25, 東京

13) 齊藤利雄, Dian K Nurputra, Imma Harahap, 森川 悟, 山本友人, 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与. 第 20 回阪神小児神経筋疾患研究会. 2012. 7. 21, 大阪

14) 齊藤利雄, Dian K Nurputra, Imma Harahap, 森川 悟, 山本友人, 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与. 日本人類遺伝学会第57回大会. 2012. 10. 26, 東京

15) 西尾 久英. 臨床的に脊髄性筋萎縮症と診断された患者の SMN 遺伝子解析. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012. 3. 24~26, 京都.

16) 寶田 徹, 近江 昇一, 竹内 敦子, Nurputra Dian Kesuma Pramudya, 森川 悟, 西尾 久英. 脊髄性筋萎縮症患者の SMN プロモーター領域における転写活性. 日本薬学会第 132 年会, 北海道.

17) SMN2 遺伝子量解析による予測よりも軽症の経過をとった脊髄性筋萎縮症患者に対するプロモーター解析. 森川悟, 中川卓, 富永康仁, 沖永剛志, 西村範行, 竹島泰弘, 松尾雅文, 西尾久英. 第 54 回日本小児神経学会学術集会. 2012. 5. 17~19, 北海道.

18) 脊髄性筋萎縮症の心機能異常. 齊藤利雄, 西尾久英, 松村剛. 第 54 回日本小児神経学会学術集会. 2012. 5. 17~19, 北海道.

19) 中島孝, SMA など神経筋疾患に対するロボットスーツ HAL の医療機器承認を目的とした治験準備研究, 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012. 5. 25, 東京

20) 野本明男, ポリオウイルス感染と生体分子, TCCI 第 2 回実験化学との交流シンポジウム, 2012. 11. 16, 京都

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

脊髄性筋萎縮症患者における新規 *SMN1* 遺伝子変異の同定

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 SMA と診断されたが、遺伝子診断の指標である *SMN1* 遺伝子の欠失を示さない症例に注目し、これらの症例について Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法と Direct sequencing 法を用いて *SMN1* 遺伝子解析を行った。MLPA 法の結果より 2 症例において片アレルの *SMN1* 遺伝子の欠失を示した。この 2 症例について *SMN1* 遺伝子の全 exon 領域のシーケンスを行ったところ、1 例では exon1 (c. 5C>T, p. A2V) に、もう 1 例では exon3 (c. 275G>C, p. W92S) に変異を検出した。これらの症例では *SMN1* 遺伝子の複合ヘテロ変異が SMA の原因であることがわかった。MLPA 法と Direct sequencing 法を併用することで、従来の Targeted mutation analysis 法 (PCR 法) では診断がつかなかった症例において対応が可能になった。

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）

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 neuron1 (*SMN1*) 遺伝子であり、*SMN1* 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 *SMN1* 遺伝子の欠失を示さない症例に注目し、これらの症例について Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法と Direct sequencing 法を用いて *SMN1* 遺伝子解析を行い、SMA を引き起こす新規遺伝子変異を同定する。

B. 研究方法

SMA 遺伝子診断の指標である *SMN1* 遺伝子の欠失を示さない症例に対し、MLPA 法を用いて *SMN* 遺伝子の copy 数を測定し、Direct sequencing 法を用いて *SMN1* 遺伝子の全 exon 領域のシー

ケンスを行った。*SMN1* 遺伝子の単離は *SMN2* 遺伝子と異なる exon7 上の 1 塩基の違いを利用し Long PCR により *SMN1* 遺伝子の特異的に増幅させた (図 1)。

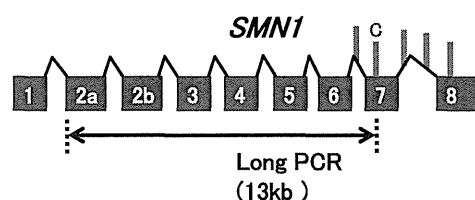


図 1 *SMN1* 遺伝子の単離 (Long PCR)

(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

1. *SMN* 遺伝子の copy 数解析

当センターではこれまでに健常者 (control) 70 例、サンプル (罹患者: SMA I ~IV 型、保因者、その他) 181 例について、MLPA 法を用いて *SMN* 遺伝子、その近傍の遺伝子の copy 数解析を行った。その結果によると、control となる健常者は通常 *SMN* (*SMN1*, *SMN2*) 遺伝子を 2copies ずつ持っているのに対し、SMA I 型では *SMN1* 遺

伝子は 0copy、*SMN2* 遺伝子は 2copies、SMA II 型 では *SMN1* 遺伝子 exon7 は 0copy、exon8 は (0 or) 1copy、*SMN2* 遺伝子は 2 (or 3) copies、SMA III 型 では *SMN1* 遺伝子 exon7 は 0copy、exon8 は (0 ~) 2copies、*SMN2* 遺伝子は (2or) 3copies を示した (図 2)。

また、SMA IV 型 においては、*SMN* 遺伝子の欠失例は 10%程度しか見られず、ほとんどの症例が健常者と同じ *SMN* 遺伝子を 2copies ずつ持っていたが、*SMN* 遺伝子の copy 数が増え (重複) している特殊な症例が存在した (図 3)。

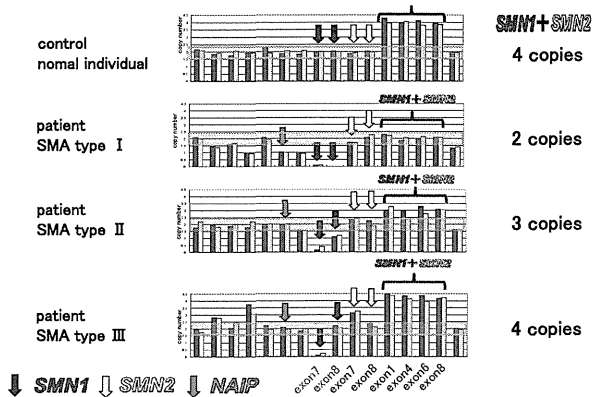


図 2 MLPA 法による SMA I ~ III 型患者における *SMN* 遺伝子 copy 数解析

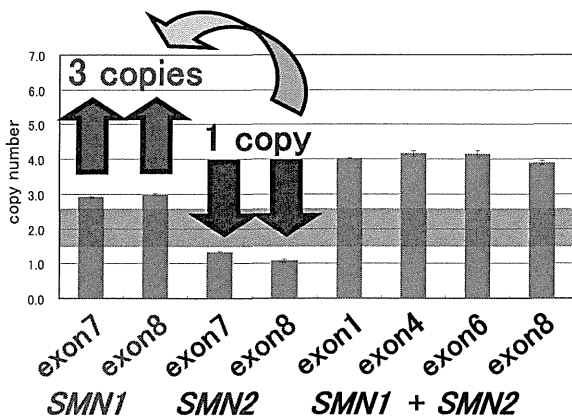


図 3 MLPA 法による SMA IV 型患者における *SMN* 遺伝子 copy 数解析

2. MLPA 法と Direct sequencing 法を用いた *SMN1* 遺伝子解析

【症例 1】SMA I 型

症例 1 は *SMN* 遺伝子の欠失解析を行ったが、欠失は認められなかった。MLPA 法による *SMN* 遺伝子の copy 数解析を行ったところ、*SMN1* 遺伝子が 1copy であることを確認した (図 4)。

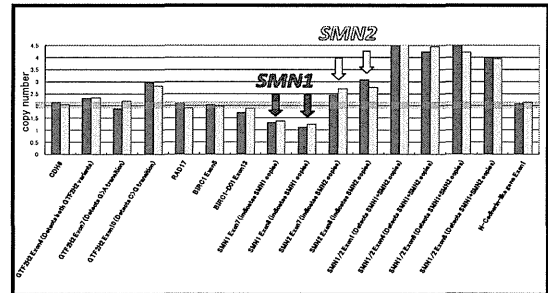
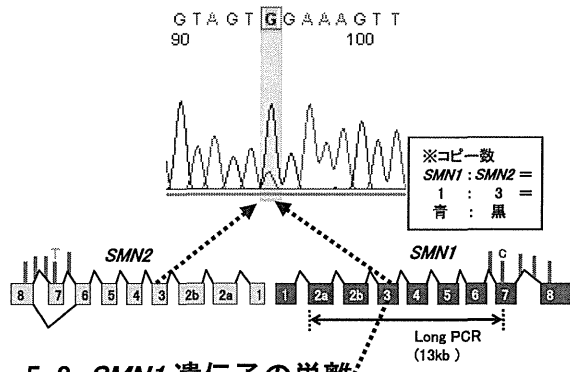


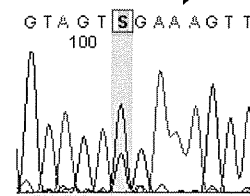
図 4 症例 1 の *SMN* 遺伝子の copy 数

次のステップとして *SMN* 遺伝子 (*SMN1*、*SMN2* 遺伝子) の全 exon 領域のシーケンスを行い (図 5-1)、また *SMN1* 遺伝子を単離し *SMN1* 遺伝子特異的な全 exon 領域のシーケンスを行った (図 5-2)。その結果、exon3 (c. 275G>C, p. W92S) に変異を検出した (図 5-2)。

5-1. *SMN1*、*SMN2* 遺伝子 (単離なし)



5-2. *SMN1* 遺伝子の単離



c. 275G>C、p. W92S

図 5 *SMN* 遺伝子の全 exon 領域シーケンス

【症例 2】SMAⅢ型

症例 2 は *SMN* 遺伝子の欠失は認められず、*SMN1* 遺伝子が 1copy であることを確認した (data not shown)。

発症者、家族（母親、弟）について *SMN* 遺伝子 (*SMN1*, *SMN2* 遺伝子) の全 exon 領域のシーケンスを行った。その結果、発症者において exon1 (c. 5C>T, p. A2V) に変異を検出し、家族には同様の変異が検出されなかった (図 6)。

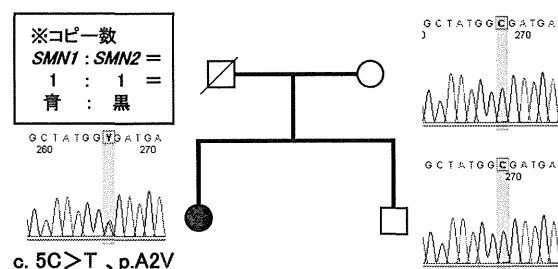


図 6 症例 2 家系についての *SMN* 遺伝子の全 exon 領域シーケンス

症例 2 の家系全構成員についてそれぞれ *SMN* 遺伝子の copy 数解析を行ったところ、母親は 1copy (野生型アレル)、発症者は 1copy (変異型アレル, c. 5C>T)、弟は 2copies (野生型アレル) を示した (図 7)。

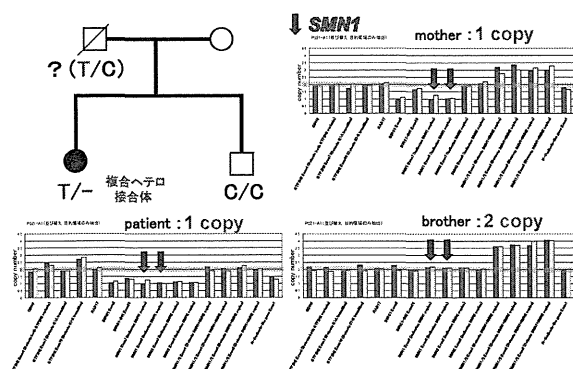


図 7 全構成員についての *SMN* 遺伝子の copy 数

D. 考察

1. *SMN* 遺伝子の copy 数解析

図 2 に示すように、遺伝子の欠失範囲が小さ

くなること、総 *SMN* 遺伝子数 (*SMN1* と *SMN2* の合計) が増加することが症状を和らげていることが考えられた。また、*SMN* 遺伝子の欠失を示さない IV 型では、*SMN* 遺伝子の重複がリスクになりうることを予想された (図 3)。

2. MLPA 法と Direct sequencing 法を用いた *SMN1* 遺伝子解析

SMN2 遺伝子と異なる exon7 上の 1 塩基の違いを利用し Long PCR することにより、*SMN1* 遺伝子 を特異的に増幅することに成功した (図 1、図 5-2)。

【症例 1】では図 5-1 のように *SMN1* 遺伝子を単離せずシーケンスした場合、275 番目の塩基に 2 つのピーク (メインピーク (黒): G、マイナーピーク (青): C) が得られた。*SMN1* 遺伝子が 1copy であり *SMN2* 遺伝子が 3copies であること考慮すると (図 4)、C のピークが *SMN1* 遺伝子であり G のピークが *SMN2* 遺伝子を表していることがわかる (図 5-1)。Copy 数がピークの大きさを反映していることが考えられた。それを裏付ける証拠として、*SMN1* 遺伝子を単離した場合は C のピークがメインピークとなった (図 5-2)。これらの結果より、【症例 1】は片アレルの *SMN1* 遺伝子の欠失を示し、もう一方のアレルには c. 275G>C (p. W92S) 変異が存在することにより、*SMN1* 遺伝子の複合ヘテロ変異が SMA の原因であることを示した。

【症例 2】では図 6、7 より、発症者は母親より *SMN* 遺伝子が欠失アレルを受け継ぎ、おそらく父親より変異型アレルを受け継いだもしくは突然変異の可能性が考えられた。これらの結果より、【症例 2】は片アレルの *SMN1* 遺伝子の欠失を示し、もう一方のアレルには c. 5C>T (p. A2V) 変異が存在することにより、*SMN1* 遺伝子の複合ヘテロ変異が SMA の原因であることを示した。

E. 結論

1. 臨床症状から SMA と診断された 2 症例において *SMN* 遺伝子の MLPA 解析を行い、片アレルの *SMN1* 遺伝子の欠失を同定した。
2. *SMN1* 遺伝子の全 exon 領域のシーケンスを行ったところ、1 例では exon3 (c. 275G>C、p.W92S) に、もう 1 例では exon1 (c. 5C>T、p.A2V) に変異を検出した。この 2 症例では、*SMN1* 遺伝子の複合ヘテロ変異が SMA の原因であることを示した。
3. 本研究のように、MLPA 法と Direct sequencing 法を併用することで、従来の Targeted mutation analysis 法 (PCR 法) では診断がつかなかった症例において対応が可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岡本健太郎、斎藤加代子、佐藤孝俊、石垣景子、舟塚真、大澤真木子、脊髄性筋萎縮症 0 型の 1 例、脳と発達、2012;44(5):31-34
- 2) 斎藤加代子、近藤恵里、青木亮子、筋疾患の診断における遺伝子検査の役割、小児内科、2012;44(9):1442-1448

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子、脊髄性筋萎縮症の診療。第 20 回阪神小児神経筋疾患研究会。2012. 7. 21, 大阪
- 2) 斎藤加代子、脊髄性筋萎縮症 (SMA) 診療と研究の最前線、SMA 家族の会関西支部第 20 回定例会、2012. 8. 4, 京都
- 3) 斎藤加代子、解析から応用へ、そして未来への飛躍、日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012. 10. 25, 東京
- 4) 久保祐二、相楽有規子、斎藤加代子、小児期発症脊髄性筋萎縮症の家系における MLPA 法を用

いた *SMN* 遺伝子解析、日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012. 10. 25, 東京

5) 久保祐二、相楽有規子、森田光哉、中野今治、斎藤加代子、成人発症の脊髄性筋萎縮症における *SMN* 遺伝子 copy 数の解析、日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012. 10. 27, 東京

6) 近藤恵里、斎藤加代子、小児神経筋疾患の遺伝医学、日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012. 10. 27, 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

脊髄性筋萎縮症患者由来細胞の *in vitro* 治療開発モデルの作製および 薬剤による SMN タンパク質発現への影響について

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) に対する薬物治療法の確立のため、*in vitro* 治療開発モデルとして皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞、EB transform B 細胞を作製した。SMA 患者由来細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるバルプロ酸、フェニル酪酸を投与することにより SMN タンパク質が増加する傾向を得た。

共同研究者

荒川玲子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

青木亮子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

A. 研究目的

根本治療法のない脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対する薬物治療法の確立のため、SMA 患者由来細胞の *in vitro* 治療開発モデルを作製し、小児期発症 SMA にて残存する内在性 *SMN2* 遺伝子の転写を変化させるヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による遺伝子発現への影響を検討する。

in vitro 治療開発モデルとして、皮膚線維芽細胞、出生前診断目的に採取される妊娠初期絨毛細胞、低侵襲で採取可能な血液から EB ウイルスによりトランスフォームを行ったリンパ芽球 (EB transform B 細胞) を作製し、様々な genotype をもつ患者由来細胞を樹立する。

樹立した患者由来細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるバルプロ酸 (VPA)、フェニル酪酸を投与し、SMN mRNA、SMN タンパク質発現について検討する。

B. 研究方法

【EB transform B 細胞】 SMA 患者から採取した血液からリンパ球を抽出し、EB ウイルスによるトランスフォームを行いリンパ芽球を樹立した。リンパ芽球に VPA 濃度 0, 1, 3, 5, 10mM とするよ

う調整した培養液で 16 時間培養後、リンパ芽球を回収、RNA を抽出・精製し、cDNA を合成した。定量 PCR 法により total SMN, 全長型 SMN, 短縮 SMN mRNA 量を測定した。

【線維芽細胞・妊娠初期絨毛細胞】 妊娠初期絨毛では SMA I 型患者細胞、対照としてその同胞の SMA 非罹患児由来細胞を用いた。線維芽細胞は、SMA I 型患者細胞、対照としてヒト正常線維芽細胞を用いた。これらの細胞を VPA 濃度 0, 0.1, 1, 10mM、フェニル酪酸濃度 0, 0.02, 0.2, 2mM に調整した培養液で 24 時間培養後、ELISA 法および Western blot 法で SMN タンパク質の定量解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京女子医科大学倫理委員会での承認を得て行われた。

C. 研究結果

【EB transform B 細胞】 SMA I 型 5 例、II 型 11 例、III 型 4 例の患者由来リンパ芽球を樹立した。対照としたヒト正常リンパ芽球と比較し、total SMN mRNA 発現量は、SMA I 型患者細胞で 0.5 倍、II 型患者細胞で 0.6 倍であった。全長型 SMN mRNA は I 型で 0.4 倍、II 型で 0.5 倍、短縮型 SMN mRNA は I 型で 0.7 倍、II 型で 0.9 倍であった。VPA 10mM の投与により、投与前と比較し、SMA I 型患者細胞では 1.1 倍の total SMN mRNA、1.3 倍の短縮型 SMN mRNA の発現を認めた。

【妊娠初期絨毛細胞】SMN タンパク質の発現量は、SMA I 型患者では同胞の非罹患児の 0.2 倍であった。SMA I 型患者細胞において VPA1mM もしくはフェニル酪酸 2mM の投与により SMN タンパク質の発現量が投与前の 1.7 倍に増加した。

【線維芽細胞】SMA I 型患者細胞では、ヒト正常線維芽細胞に比べ、SMN タンパク質の発現量は 0.5 倍であった。SMA I 型患者細胞では、VPA およびフェニル酪酸の投与により SMN タンパク質の発現量に変化は認められなかった。

D. 考察

SMA 患者由来 EB transform B 細胞、妊娠初期絨毛細胞、線維芽細胞を樹立することにより *in vitro* 治療開発モデルの作製を行った。樹立した SMA 患者由来細胞は正常対照と比較し、SMN mRNA、SMN タンパク質発現量は低値であった。

SMAI 型患者由来 EB transform B 細胞では VPA 投与により total および短縮型 SMN mRNA 発現量の増加傾向を認めたが、全長型 SMN mRNA 発現量の有意な変化は検出されなかった。SMAI 型患者由来妊娠初期絨毛細胞においては VPA、フェニル酪酸を投与することにより、SMN タンパク質発現量が増加した。これらの傾向を、より詳細に把握するために、さらに多くの患者細胞を用いて検討を施行中である。

SMA 患者は、SMN2 コピー数などにおいて genotype がそれぞれ異なるため、患者ごとに薬物に対する反応性が異なると推測される。今後は、genotype と薬物反応性との関連について詳細に検討を行っていく。

今回の結果から、同じ genotype を有していても、投与する細胞の種類（線維芽細胞と EB transform B 細胞など）により薬剤に対する反応性が異なることが示唆された。新規治療候補薬剤スクリーニングを行う際には、genotype のみならず、使用する細胞の種類によっても薬剤反応性が異なることを考慮し、検討を行っていく

必要がある。

E. 結論

in vitro 治療開発モデルとして、SMA 患者由来皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞、EB transform B 細胞の作製を行った。特に、低侵襲で採取可能な血液から、EB transform B 細胞を樹立することで、より多くの患者由来細胞を保存することが可能となった。

SMA 患者由来細胞において、ヒストン脱アセチル化阻害薬は、SMN タンパク質発現量を増加させることが分かった。

今後、genotype と薬物反応性との関連を検討していく上で有用なモデルとなる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell Tissue Res.* 2012;348(1):189-197
- 2) 岡本健太郎、斎藤加代子、佐藤孝俊、石垣景子、舟塚真、大澤真木子、脊髄性筋萎縮症 0 型の 1 例、脳と発達、2012;44(5):31-34
- 3) 斎藤加代子、近藤恵里、青木亮子、筋疾患の診断における遺伝子検査の役割、小児内科、2012;44(9):1442-1448
- 4) 荒川玲子、松尾真理、斎藤加代子。脊髄性筋萎縮症の診断とケア。難病と在宅ケア。2012;18(9):40-43
- 5) 斎藤加代子。脊髄性筋萎縮症診療マニュアル。2012。金芳堂。
- 6) 斎藤加代子。脊髄性筋萎縮症。小児科診断・治療指針。2012;764-766。中山書店

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症の診療. 第 20 回阪神小児神経筋疾患研究会. 2012. 7. 21, 大阪
- 2) 斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症(SMA)診療と研究の最前線, SMA 家族の会関西支部第 20 回定例会, 2012. 8. 4, 京都
- 3) 斎藤加代子, 解析から応用へ、そして未来への飛躍, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012. 10. 25, 東京
- 4) 荒川玲子、青木亮子、相楽有規子、浦野真理、松尾真理、斎藤加代子, 遺伝性神経筋疾患の治療を目指した妊娠初期絨毛の性質についての検討, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012. 10. 26, 東京
- 5) 近藤恵里、斎藤加代子, 小児神経筋疾患の遺伝医学, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012. 10. 27, 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

脊髄性筋萎縮症の日本における患者数調査

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

『脊髄性筋萎縮症診療マニュアル』作成に当たって、SMAの専門医療機関、及び患者数を調査した。患者数は全体で431人、臨床型別に分類すると、I型123人（29%）、II型183人（42%）、III型80人（19%）、IV型45人（10%）であった。都道府県別の患者数は、東京98人（23%）、大阪34人（8%）、北海道24人（6%）に集中していることが判明した。今回の調査で、治験導入に向けて、日本での拠点病院を設定していくための基礎資料を得た。今後は、多施設共同での治験を進めていけるよう、システム構築の検討を重ねていく予定である。

共同研究者

伊藤万由里¹⁾、梅野愛子¹⁾、荒川玲子¹⁾、
久保祐二^{1) 2)}、青木亮子¹⁾

- 1) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター
- 2) 東京女子医科大学大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野

（倫理面への配慮）

本研究では、患者数を調査しており、個人を特定することはできないため、患者本人に不利益を生じることはない。またSMAに関する疫学調査は、東京女子医科大学倫理委員会の承認を得ている。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy; SMA）の発症頻度は、欧米では約10,000出生に1人、保因者頻度は約50人に1人とされている。2012年、当研究班では、『脊髄性筋萎縮症診療マニュアル』を作成した。マニュアル作成に当たり、我々は、SMAの専門医療機関を調べるために、全国の医療施設を対象にアンケート調査を施行した。その際、現時点での日本におけるSMAの疫学の実態を分析する目的で、患者数を調査した。

B. 研究方法

全国の大学病院、国公立病院・施設、及び、有床の地域拠点病院の小児科・内科（神経内科）・遺伝子診療科を対象に、郵送によるアンケート方式で、患者の有無を調査した。質問項目には、患者の臨床病型、性別も含めた。返送された結果を、都道府県毎にまとめ、解析した。

C. 研究結果

アンケートによる質問票は、全国の863施設に郵送し、349施設から回答を得た。回収率は40.4%であった。患者数は全体で431人、臨床型別に分類すると、I型123人（29%）、II型183人（42%）、III型80人（19%）、IV型45人（10%）であった。性別で分類すると、男女比はI型1:0.82、II型1:1.27、III型1:0.89、IV型1:0.41であった。性別に関しては、未記入の返信も一部みられた。診療科別の患者割合は、小児科257人（62%）、神経内科80人（19%）、遺伝子診療科関連80人（19%）となった。都道府県別に分類したところ、図1に示す通り、東京98人（23%）、大阪34人（8%）、北海道24人（6%）となり、東京に集中していることが判明した。地方別の患者数を検討すると、関東、近畿圏の人数が圧倒的に多いことが判明した。地方別の患者数を図2に示す。

図1 都道府県別の患者数

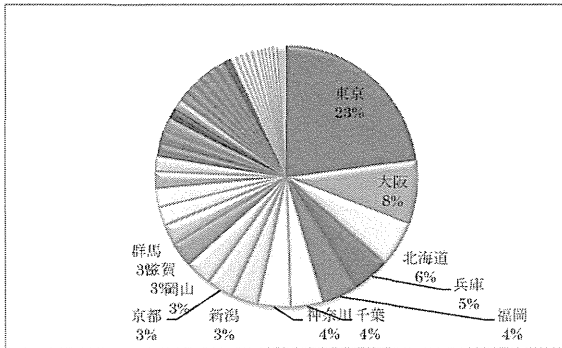


図2 地方別の患者数

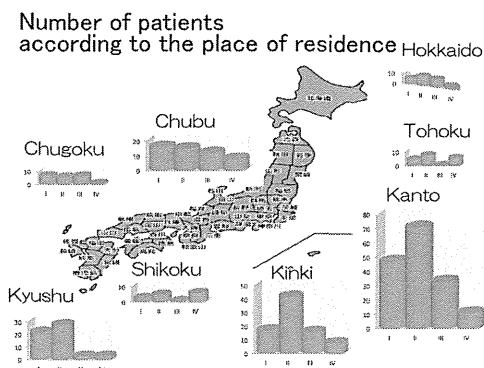
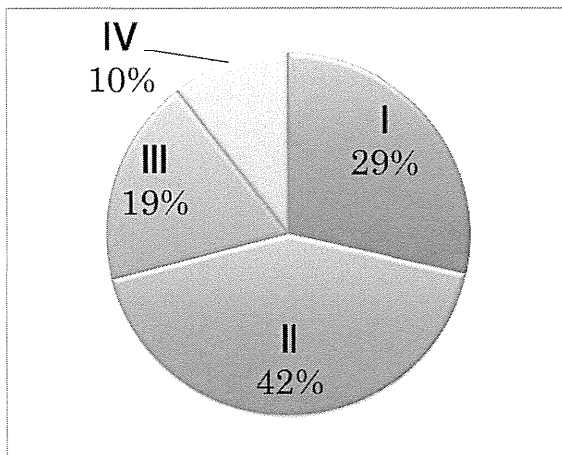


図3 臨床型別の患者数

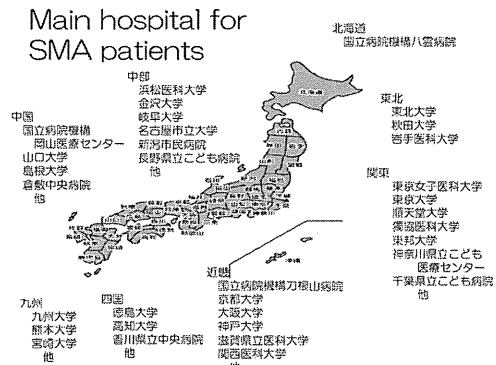


臨床型別にみると、図3に示す通り、I型123人(29%)、II型183人(42%)、III型80人(19%)、IV型45人(10%)となり、II型が多い傾向が認められた。

各地方での患者数の多い医療施設を図4に示す。国立病院機構八雲病院（北海道）、東北大学

病院（東北）、東京女子医科大学（関東）、浜松医科大学病院（中部）、国立病院機構刀根山病院（近畿）、国立病院機構岡山医療センター（中国）、徳島大学病院（四国）、九州大学病院（九州）などが、各地方で患者数の多い施設をして挙げられる。

図4 地方別の患者数の多い医療施設



D. 考察

日本における SMA の患者数調査は、今まで数回施行されてきた。今回の調査は、患者数のみならず、各地域の診療拠点となり得る医療施設の把握も目的としていた。調査で得られた結果は、2012年当時のものであり、今後、若干の変動はあると考えられる。

SMA の治療法確立のためには、エビデンスのある薬剤を適切なプロトコールで使用し、かつ、適切な効果判定のできる体制を作る必要がある。どの地域に居住していても、同様の治療を受ける機会を作れるようなシステムの構築を検討中である。

E. 結論

日本における SMA の患者数を調査した。2012年の時点で、患者数は全体で431人、臨床型別に分類すると、I型123人(29%)、II型183人(42%)、III型80人(19%)、IV型45人(10%)であった。今回の調査で、治験導入に向けて、日本での拠点病院を設定していくための基礎資

料を得た。今後は、多施設共同での治験を進めていけるよう、検討を重ねていく予定である。

5) 近藤恵里、斎藤加代子, 小児神経筋疾患の遺伝医学, 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012. 10. 27, 東京

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岡本健太郎、斎藤加代子、佐藤孝俊、石垣景子、舟塚真、大澤真木子, 脊髄性筋萎縮症 0 型の 1 例, 脳と発達, 2012;44(5):31-34
- 2) 斎藤加代子、近藤恵里、青木亮子, 筋疾患の診断における遺伝子検査の役割, 小児内科, 2012;44(9):1442-1448
- 3) 荒川玲子、松尾真理、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症の診断とケア. 難病と在宅ケア. 2012;18(9):40-43
- 4) 伊藤万由里、斎藤加代子、大澤真木子. 日本における脊髄性筋萎縮症の臨床実態調査. 東女医大誌. 2013;83:52-57
- 5) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル. 2012. 金芳堂.
- 6) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症. 小児科診断・治療指針. 2012;764-766. 中山書店

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症の診療. 第 20 回阪神小児神経筋疾患研究会. 2012. 7. 21, 大阪
- 2) 斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症(SMA)診療と研究の最前線, SMA 家族の会関西支部第 20 回定例会, 2012. 8. 4, 京都
- 3) 斎藤加代子, 解析から応用へ、そして未来への飛躍, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012. 10. 25, 東京
- 4) 伊藤万由里、斎藤加代子、浦野真理、相楽有規子、大澤真木子, 日本における脊髄性筋萎縮症(SMA)の臨床・疫学調査, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012. 10. 26, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし