

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）

—経過報告と剖検報告を交えて—

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

臨床的に成人発症脊髄性筋萎縮症（SMA-IV）と診断した自験症例の中で剖検となった1例（症例1）および *MFN2* 遺伝子に異常が確認された症例（症例2）を通して SMA-IV の臨床および病理における疾患の位置づけを考察した。症例1は死亡時53歳の女性。38歳の時に左下肢遠位筋優位の筋力低下で発症した孤発例。経過中下位運動ニューロン症候のみ緩徐に進行し、四肢および舌に筋力低下・筋萎縮を認めた。上位運動ニューロン症候は認めなかった。53歳時右被殻出血のため急逝した。剖検所見では頸髄・腰髄を中心とした高度の前角細胞脱落と舌下神経核の神経細胞脱落を認めた。Bunina 小体はみられなかったが、延髄錐体で大径軸索の脱落がみられ、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病理像を呈した。通常の ALS との異同については今後の検討すべき課題である。症例2は56歳女性で *MFN2* の変異を認めたが、家族歴はなかった。50歳時に右手関節の背屈困難で発症し、両側上肢を中心に筋力低下が進行したが、下肢には筋力低下を認めなかった。感覚障害もなかった。*MFN2* は遺伝性軸索型運動ニューロパチーの原因遺伝子とされており、今回認められた P456L 変異の病因学的意義については今後解析が必要である。SMA-IV と診断した症例にも 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に留意する必要がある。

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）

橋口昭大，高嶋博

（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学）

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、経過が極めて緩徐で予後が良好な疾患とされる。自験例で SMA-IV と臨床診断した症例は、臨床的にも遺伝学的にも異質な疾患群を包括した症候群であることを昨年までの研究で報告してきた。今回は、前回対象とした症例のうち剖検となった1例（症例1）および *MFN2* 遺伝子に異常が確認

された症例（症例2）を通して SMA-IV の臨床および病理における疾患の位置づけを考察する。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

過去15年間に於いて運動ニューロン疾患と診断した自験302例を母集団とした。上位運動ニューロン症候を認めることなく下位運動ニューロン症候のみで5年以上極めて緩徐な進行性の経過を示した11例を SMA-IV と診断し抽出した。この内9例については書面による同意を得て小児の SMA の原因遺伝子とされる *SMN1* および *NAIP* の変異について解析した。結果は9例全例で遺伝子変異を認めなかった。今回、この内の1例（症例1）が急逝し、剖検となった。その臨床的特徴・経過および H. E., K. B., Bodian 染色での結果を示す。

さらに、前記9例の内書面で同意を得た6例については遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子

(*PMP22, MPZ, SIMPLE, EGR2, NEFL, SOX10, GDAPI, MTMR2, SBF2/MTMR13, KIAA1985, NDRG1, PRX, GJB1, MFN2, RAB7, GARS, HSPB1, HSPB8, LMNA, GAN1, KCC3, APTX, SETX, TDP1, DNM2, DHH, YARS*) の網羅的解析を行った。1例で *MFN2* に P456L 変異を認めた（症例2）。この症例についても臨床的特徴を報告する。

C. 研究結果

<症例1> 53歳女性。

<家族歴> なし。

<初診時現病歴>

38歳時より歩行時に繰り返す左足関節を内反し、くじくようになった。徐々に両側下肢の筋力低下が進行した。41歳頃より起立困難、上肢の筋力低下も出現した。43歳頃より箸もうまく使えなくなった。44歳時当科初診した。

<初診時所見>

徒手筋力検査で頸部筋力は4、上肢近位筋は3、上肢遠位筋は4、下肢近位筋は3-4、遠位伸筋は0-1、遠位屈筋は4であった。筋力低下筋では全体に筋萎縮があり、特に両上肢帯、第一背側骨間筋、母指球・小指球の筋萎縮が目立った。他覚的には線維束性収縮は認めなかった。腱反射は四肢で減弱～消失。歩行については段差のないところで膝をロックしながら数m歩行できた。球症状および感覚障害はなかった。血液検査では血清CK値は約400-1000 mU/mlと高値を認めた。針筋電図検査では右上腕二頭筋と右大腿直筋で陽性鋭波および線維自発電位を認め、活動性神経原性変化と考えられた。

<経過>

多巣性運動ニューロパチーなどの免疫介在性運動ニューロパチーを考え、免疫グロブリン大量静注療法を繰り返したが反応はなかった。53歳時に右被殻出血のため急逝した。

死亡直前の状況は数歩のつかまり歩きが可能なADLで、舌の筋萎縮および線維束性収縮を認

めた。顔面筋の筋力低下はなく、嚥下障害、構音障害、呼吸筋麻痺は認めなかった。

<剖検結果>

腰髄および頸髄については弱拡大で両側前角の淡明化を認め、強拡大で前角細胞の高度の脱落を認めた。一部残存する前角細胞ではBunina小体は認められなかった。延髄では舌下神経核にも高度の細胞脱落を認めた。延髄錐体では大径軸索の密度が減少しており、強拡大でマクロファージが散見された。橋の顔面神経核は神経細胞が保たれていた。中心前回のBetz細胞の脱落は明らかでなかった。

<症例2> 56歳女性。

<家族歴> なし。

<既往歴> Sjögren症候群

<初診時現病歴>

50歳時に右手関節の背屈困難を自覚。51歳の時、右肘屈筋の筋力低下も出現し、当科初診した。

<初診時所見>

顔面・球部および頸部に筋力低下はなかった。徒手筋力検査では三角筋4/4、上腕二頭筋2/2、上腕三頭筋5/5、腕橈骨筋2/2、手関節の背屈0/0、橈側手根屈筋5/5、総指伸筋1/1、浅指屈筋5/5、小指外転筋5/5、下肢筋力低下はなかった。腱反射は上腕二頭筋腱および腕橈骨筋腱反射は消失し、上腕三頭筋腱・膝蓋腱およびアキレス腱反射の亢進減弱はなかった。上腕二頭筋と腕橈骨筋の筋萎縮を認めた。感覚障害および自律神経障害はなかった。末梢神経伝導検査では両側の橈骨神経のCMAPが得られなかった。SNAPについては遅延や振幅低下はなかった。

<経過>

免疫介在性運動ニューロパチーを鑑別にステロイド治療（パルスおよび経口内服）や免疫グロブリン大量静注療法を行った。治療反応はな

かった。52歳時には筋力低下のなかった右上腕三頭筋で線維束性収縮を認めた。針筋電図検査では三角筋、上腕二頭筋、上腕三頭筋、尺側手根屈筋、総指伸筋および長母指屈筋で神経再支配の完成された神経原性変化を認めた。一方、胸鎖乳突筋や大腿四頭筋は正常所見であった。現在も球症状や呼吸筋症状はなく、自立歩行可能である。

D. 考察

自験成人発症 SMA の 1 剖検例の結果は、臨床的に下位運動ニューロン症候のみで極めて緩徐進行性に経過した症例であっても、錐体路変性が認められ、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病理像を呈し得ることを示した。今までにも数件の下位運動ニューロン症候のみで10年以上緩徐に経過した症例の剖検 ALS 症例の報告がある。一方熱田ら (2009) や Leung ら (1999) の検討では、連続剖検 ALS 症例を解析するとその内 9.2%～14.7%は臨床的には下位運動ニューロン症候のみ呈し、上位運動ニューロン症候を呈していなかったと報告している。但しこれらの検討では経過は考慮されておらず、ALS とは臨床的に区別し得る緩徐な進行を示す下位運動ニューロン症候のみの症例がどれだけ含まれているかは不明である。以上より、緩徐な臨床経過や臨床的に上位運動ニューロン症候を認めない場合でも ALS は除外できないといえよう。下位運動ニューロン症候の障害の程度に比べ上位運動ニューロン障害の程度が軽度であることが、臨床的には上位運動ニューロン症候が出現しない理由であるとするより感度の高い検索技術の検討が必要となる。また熱田らの報告でもあるように、下位運動ニューロン症候のみを呈した症例の病理像は均一でなく、今回の自験例と同様 Bunina 小体を認めなかった症例も存在し、通常の ALS との異同については今後の課題である。

遺伝性軸索型運動ニューロパチー (CMT2A) の

原因遺伝子とされる *MFN2* 変異については渉獵する限り 20 種類近くの変異が同定されている。大きく以下の 2 つの表現型が報告されている。5歳以前に下肢遠位筋筋力低下で発症し、四肢筋力低下に加えて側弯症や視神経萎縮を合併する若年重症型と 10-40 歳代で軽度の下肢遠位筋筋力低下あるいは pes cavus のみで発症する軽～中等症型である。また近年 *MFN2* 変異と若年性の散在性もしくはびまん性に大脳白質病変を呈する表現型との関連が示唆されており、ニューロパチーを伴わない例での報告もある。自験例で認めた P456L 変異については K. W. Chung (2008) によって報告された父・娘の症例のみである。それらの症例では共にニューロパチーを伴わず、若年性脳梗塞を発症した症例として報告された。自験例では脳卒中のエピソードはなく、MRI など頭蓋内の検索はしていないが、今後注意深い経過観察が必要と考える。また *MFN2* の P456L 変異の病因学的意義について今後さらに検討していく必要がある。

E. 結論

臨床的に SMA と診断される成人症例は小児例とは異なり、ALS や遺伝性運動ニューロパチーを含むヘテロな集団である。これらの症例に対する遺伝学および病理学的解析を進め、臨床診断基準へ反映するようにすることが今後の病態解析、治療介入のために必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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と
遺伝学的背景の解析．日本人類遺伝学会第57回
大会．平成24年10月25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

脊髄性筋萎縮症の病態解析に関する研究

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

脊髄性筋萎縮症（SMA）に対し、MLPA法を用いたSMAの遺伝子診断は、*SMN1*、*SMN2*、*NAIP* 遺伝子のコピー数を簡便に解析でき、SMAの遺伝子診断法として優れた方法ある。

共同研究者

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 遺伝子検査診断室）

A. 研究目的

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いたSMAの遺伝子診断。SMAの遺伝子診断では、*SMN1* 遺伝子の欠失の検索がまず必須であり、さらに欠失と点変異の複合ヘテロ接合の可能性を考えると遺伝子コピー数の解析が必要となる。また、重症度との相関を知る目的では、*SMN2* 遺伝子や *NAIP* 遺伝子のコピー数解析が重要である。MLPA法は原理的にそれらの条件を満たしており、実際に遺伝子検査に使用した経験を報告する。

B. 研究方法

MRC-Holland社のSMA用MLPA解析キット（P021, P060）を使用し、MLPA反応をおこなった。ABI社3130xl Genetic AnalyzerでMLPA産物のフラグメント解析をおこない、自作の表計算テンプレートを用いてコピー数解析とグラフ化をおこなった。標準サンプルについては、疾患対照12例を解析して最も頻度の多いコピー数を持つサンプルを用いた。

（倫理面への配慮）

通常の診療で遺伝子診断を行っているが、その際には所属施設指定の手続きにより、文書による同意を得たうえで遺伝子診断を行っている。

C. 研究結果

メーカーの説明書に沿っておこなえば、基本的に良好な結果が得られた。個々のプローブが示す値は整数値から多少のばらつきが見られたが、*SMN1*、*SMN2* 遺伝子特異的プローブ、*SMN1*、*SMN2* 遺伝子共通プローブ、の結果を総合的に勘案することにより、コピー数判定が十分に可能であった。

これまでにSMA疑い患者17名について遺伝子診断をおこない、9名で*SMN1* 遺伝子=0コピーとなり、PCR-RFLP法による欠失判定とも全例で一致し、SMAと診断した。そのSMA患者9名の*SMN2* 遺伝子コピー数は、6名が3コピー、3名が4コピーであり、病型は前者がII型ないし発症年令の早いIII型、後者はIII型と、コピー数が多いほど軽症になる傾向が見られた。なお、ある症例では、*SMN1* 遺伝子のエクソン7から*SMN2* 遺伝子のエクソン7への部分的な遺伝子変換が示唆された。

D. 考察

MLPA法は、*SMN1*、*SMN2*、*NAIP* 遺伝子のコピー数を簡便に解析でき、脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断法として優れた方法ある。

E. 結論

MLPA法は、*SMN1*、*SMN2*、*NAIP* 遺伝子のコピー数を簡便に解析でき、脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断法として優れた方法ある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与
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

目的：脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するバルプロ酸(VPA)投与の効果を評価する。

対象と方法：SMA2型6例(case A:男性34歳, B:女33歳, C:男23歳, D:女30歳, E:女2歳10月, G:女15歳), 3型1例(F:男42歳)を対象とし, VPAを6月間投与した。投与前, 開始1, 3, 6月に, modified Hammersmith式機能的運動能力尺度(MHFMS), 肺活量(VC), 最大強制吸気量(MIC), 咳の最大流量・最大呼気流速(CPF), 末梢白血球を用いたRT-PCR法によるSMN転写産物量を測定した。

結果：AはVPA開始1月未滿で脱落, B-E, Gは完遂, Fは投与3月評価後以前から罹患の胆嚢炎増悪し中断中である。VPA投与前後で, MHFMS, VC, MIC, CPFは, GでMICの増悪を認めた以外, 改善あるいは不変であった。Full length SMN(FL-SMN)転写産物量はVPA投与に伴い増加する傾向を示し, $\Delta 7$ -SMN転写産物量は, F以外で減少傾向あるいは有意な変化を示さなかった。

結論：VPA投与前後で, 一部の症例でMHFMSや呼吸機能に改善傾向がみられ, FL-SMN転写産物量も増加傾向を示したが, 自覚的には病状に変化を認めず, VPA投与の適応症例や有効性判定方法の検討が必要である。

共同研究者

Dian K Nurputra, Imma Harahap, 森川 悟, 山本友人, 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)

山本ひろし, 宗重絵美, 西菌博章(国立病院機構刀根山病院 リハビリテーション科)

A. 研究目的

抗てんかん薬のバルプロ酸(VPA)は, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC 阻害剤)としても注目され, 脊髄性筋萎縮症(SMA)の治療薬としての効果が期待される。われわれは, SMA患者にVPA投与を行い, その有効性を評価した。

B. 研究方法

対象：SMA患者7例を対象とした。2型6例(case A:男性34歳, B:女33歳, C:男23歳, D:女30歳, E:女2歳10月, G:女15歳), 3型1例(F:男42歳)。全例SMN1遺伝子欠失が確認され, SMN2コピー数はいずれも3コピーであった。B, E以外は夜間中心に

NPPVを施行している。対象の一覧を表1に示す。

方法：カルニチン100~200mg/日併用の上, VPAを, 至適血中濃度域到達を目安に6月間投与した。投与前, 開始1, 3, 6月に, modified Hammersmith式機能的運動能力尺度(MHFMS), 呼吸機能, 末梢白血球を用いたRT-PCR法によるSMN転写産物量を測定した。呼吸機能評価項目として, 肺活量(VC), 最大強制吸気量(MIC), 咳の最大流量・最大呼気流速(CPF)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究施行にあたり, 国立病院機構刀根山病院臨床研究審査委員会, 神戸大学倫理委員会の承認を得た。本研究に参加した患者, および患児保護者には書面による了解を得た。

C. 研究結果

MHFMSと呼吸機能

結果の一覧を表2に示す。

Aは, VPA漸増過程で眠気・気分不良が出現し開始1月未滿で脱落した。B-E, Gは6月投与終了。Fは

投与3月評価後、以前から罹患の胆嚢炎が増悪し投与を中断中（投与との関連なし）。

VPAは25~200mg/日で投与開始した。B, C, D, Gの最終投与量は400mg, Eは100mg, Fの3月時投与量は400mgであった。Cは3月, Dは6月でVPA血中濃度は至適血中濃度域に達した。B, Gは、いったん至適血中濃度域に達したが、6月時点では至適血中濃度未満であった。E, Fは、投与期間中至適血中濃度未満であった。

C, D, GのMHFMSは投与期間中変化なく(C・D: 0点, G:1点), Bは、投与前4点, 6月5点と1点増加, Fは、投与前10点, 3月9点と1点減少した。Eは、投与前11点, 6月18点と増加し、寝返りが出来るようになった。

VC, CPFは測定ごとに変動した。MICは、B, C, Dで増加したが、Gでは減少した。

SMN転写

結果の一覧を表2に示す。

GAPDH転写産物量を internal reference とした Full length SMN(FL-SMN)転写産物量は、VPA投与に伴い増加する傾向を示し、Dの6月(VPA血中濃度70 μ g/ml), Fの1月(VPA血中濃度18 μ g/ml)の増加は、投与前に比し有意であった。しかしながら、Eでは、1月(VPA血中濃度13 μ g/ml)で、投与前に比し有意に増加していたが、6月(VPA血中濃度34 μ g/ml)では、有意に減少していた。

Δ 7-SMN転写産物量は、Dの1月(VPA血中濃度35 μ g/ml)では、VPA投与前に比し有意な増加であったが、B~E, Gでは減少傾向を示すかあるいは有意な変化を示さなかった。一方、Fの1月(VPA血中濃度18 μ g/ml)では、投与前に比し有意に増加していた。FL-SMN/ Δ 7-SMNは増加傾向を示したが、Fは減少傾向, Gは不変で、Total SMNは一定の傾向を示さなかった。

各症例のVPA血中濃度, MHFMS, 呼吸機能とFL-SMN転写

投与前と投与6月時点(Fは3月)で、MHFMSの変化が ± 3 以内を不変, +4以上を改善, -4以下を増悪, VC, MIC, CPFの変化が $\pm 10\%$ 以内を不変, +10%を越す

場合を改善, -10%を下回る場合を増悪と定義し、6月時点でのVPA血中濃度域, FL-SMN転写産物量のVPA投与前からの変化と合わせ表3にまとめた。VPA血中濃度が至適域にある例のほうが、呼吸機能改善項目が多かった。VPA血中濃度とFL-SMN転写産物量の変化には関係はなかった。

B: 6月時点のVPA血中濃度は至適域より低かったが、MICの増加を認め、FL-SMN転写産物量も増加傾向を示した。

C: VPA血中濃度は至適域にあり、VC, MIC, CPFの増加を認めたが、FL-SMN転写産物量に有意な変化はなかった。

D: VPA血中濃度は至適域にあり、MIC, CPFの増加を認め、FL-SMN転写産物量の増加も有意であった。

E: MHFMSが改善したにもかかわらず、6月時点でのVPA血中濃度は至適域より低く、FL-SMN転写産物量は有意に減少していた。

F: VPA血中濃度は至適域より低く、MHFMS, 呼吸機能にも変化はなかったが、FL-SMN転写産物量は増加していた。

G: VPA血中濃度は至適域より低く、MICは減少したが、FL-SMN転写産物量に有意な変化はなかった。

自覚的訴え, および副作用

A: 倦怠感, 眠気, 前胸部違和感

B: 病状不変, 眠気

C: 病状不変, 前胸部違和感

D: 疲れにくくなった。

体重増加, 前胸部違和感

E: (両親) ふるえが減った(と思う)

F: 病状不変

G: 病状不変, 眠気

と、多くの例では、自覚的な病状変化を認めなかった。脱落1例(A)を含む3例で眠気の訴えがあった。また、同様に脱落1例(A)を含む3例で前胸部違和感があり、「げっぷが出る(おくびが出る)」との訴えがあったが、カルニチン投与の影響と考えられた。

肝機能異常は認めず、カルニチン分画も正常であった。

D. 考察

VPA 投与前後で、1 例で MIC の増悪を認めたが、MHFMS、呼吸機能 は、不変あるいはいくつかの項目で改善した。VPA 血中濃度が至適域にある例のほうが、未満域にある例よりも呼吸機能改善項目が多かった一方、VPA 血中濃度と *FL-SMN* 転写産物量の変化には関係はなかった。また、MHFMS が改善した例の VPA 血中濃度は至適域未満であった。評価項目の改善は必ずしも VPA 血中濃度、*FL-SMN* 転写産物量と関連していなかった。

VPA の SMN に対する作用として、*SMN2* 遺伝子プロモーターの活性化による *SMN2* 遺伝子転写の促進（全長型 *SMN2* mRNA 及び $\Delta 7$ -*SMN2* mRNA の産生量増加）、スプライシング関連蛋白をコードする遺伝子活性化による *SMN2* 遺伝子エクソン 7 のスプライシングの進行、これら 2 つの機序が組み合わせの 3 つの可能性が考えられ、VPA-投与により *FL*-および $\Delta 7$ -*SMN* 転写産物量の増加が予想される。さらに、VPA は multifunctional な薬剤であり、SMN に対する作用以外にも、neuroprotective な効果が期待され、必ずしも、VPA 血中濃度、*FL-SMN* 転写産物量と、評価項目の改善が一致するわけではないと推定される。

しかしながら、本検討は、対象となる症例数が少なく、対照の設定が困難であった。VPA 投与前後での評価項目の変化は、VPA 単独による効果とは言い切れず、特に、E での MHFMS は成長発達が臨床症状評価に影響している可能性がある。また、VPA 投与前後での SMN 転写産物量の変化は、測定系の fluctuation の影響なども考えられる。

さらに、本検討は、平成 22 年度報告した症例と同様に、末梢血白血球での SMN 蛋白の増加が脊髄前角細胞レベルでの SMN 蛋白の増加を反映するか否か不明であること、病状変化が軽微であった場合、本検討での評価法では検出出来ない可能性があることといった問題点も挙げられる。

今後の課題として、脊髄前角細胞レベルでの SMN 蛋白の増加が、臨床症状改善に直接的に関連するか否か明らかではないが、VPA 投与による、末梢血白

血球と脊髄前角細胞レベルでの SMN 蛋白の差異の検討、臨床症状の軽微な変化を評価出来る評価方法の開発、簡便に評価できる新規マーカーの開発、などが挙げられる。また、単施設での検討では症例数に限界があり、他施設共同研究も今後の研究をすすめる上での選択肢であろう。

E. 結論

VPA は SMA 治療薬としての効果を期待できるが、評価方法の検討が必要である。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

（準備中）

2. 学会発表

- 1) 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年10月26日, 東京
- 2) 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年7月21日, 大阪

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

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）
研究分担報告書

表 1

症例	性	VPA投与開始年齢	病型	SMN1 exon7	SMN1 exon8	SMN2 copy number	NAIP	呼吸状態	側彎	運動機能
A	男	34歳	2型	欠失	欠失	3	(+)	夜間NPPV	(+++)	臥床、支持座位
B	女	33歳	2型	欠失	欠失	3	(+)	自発呼吸	(+)	支持座位
C	男	23歳	2型	欠失	欠失	3	(+)	夜間NPPV	(+++)	臥床、支持座位
D	女	30歳	2型	欠失	欠失	3	(+)	夜間NPPV+HOT	(+++)	臥床、支持座位
E	女	2歳10月	2型	欠失	欠失	3	(+)	自発呼吸	(+)	支持座位
F	男	42歳	3型	欠失	欠失	3	(+)	夜間NPPV	(+/-)	座位
G	女	15歳	2型	欠失	欠失	3	(+)	夜間NPPV	(+)脊柱固定術後	支持座位

表 2

	時期	VPA投与量 (mg)	VPA血中濃度 (μg/ml)	MHFMS	VC (ml)	MIC (ml)	CPF (L/min)	FL-SMN	Δ7-SMN	FL/Δ7-SMN	Total -SMN
A	pre			0	965		115	0.51 (± 0.06)	1.77 (± 0.13)	0.28 (± 0.02)	1.19 (± 0.37)
B	pre		0	4	840	960	140	0.56 (± 0.02)	1.12 (± 0.18)	0.50 (± 0.06)	1.02 (± 0.04)
	1月	400	50	4	1000	810	95	0.79 (± 0.07)	0.68 (± 0.03)	1.16 (± 0.05) #	5.47 (± 2.10)
	3月	400	45	5	850	1000	165	0.86 (± 0.49)	0.93 (± 0.39)	0.90 (± 0.16)	3.27 (± 1.32)
	6月	400	42	5	810	1060	130	1.08 (± 0.18)	0.58 (± 0.26)	1.33 (± 0.13)	1.61 (± 1.33)
C	pre		0	0	380	630	85	0.39 (± 0.03)	1.12 (± 0.18)	0.20 (± 0.03)	2.82 (± 0.67)
	1月	200	39	0	400	600	90	0.49 (± 0.08)	0.68 (± 0.03)	0.35 (± 0.004)	4.78 (± 0.09)
	3月	400	62	0	430	580	95	0.51 (± 0.16)	0.93 (± 0.39)	0.61 (± 0.54)	2.96 (± 0.37)
	6月	400	75	0	500	710	100	0.45 (± 0.28)	0.58 (± 0.26)	0.39 (± 0.30)	3.10 (± 0.15)
D	pre		0	0	380	440	75	0.60 (± 0.17)	0.83 (± 0.13)	0.73 (± 0.16)	3.61 (± 0.19)
	1月	200	35	0	350	550	80	0.67 (± 0.24)	1.13 (± 0.13) #	0.61 (± 0.29)	2.96 (± 1.27)
	3月	200	34	0	350	610	85	0.61 (± 0.004)	1.14 (± 0.75)	0.69 (± 0.45)	2.51 (± 0.10)
	6月	400	70	0	370	750	90	1.07 (± 0.035) #	1.09 (± 0.17)	0.97 (± 0.17) #	2.24 (± 0.11)
E	pre		0	11	410			0.83 (± 0.01)	1.25 (± 0.05)	0.66 (± 0.03)	2.59 (± 0.21)
	1月	25	13	11	400			1.04 (± 0.004) #	1.12 (± 0.17)	0.94 (± 0.14)	3.18 (± 0.18) #
	3月	75	25	11	250			1.16 (+0.081)	1.30 (± 0.05)	0.89 (± 0.03)	4.27 (± 1.00)
	6月	100	34	18	410		50	0.57 (+0.13) #	0.99 (+0.06)	0.76 (± 0.59)	0.81 (+ 0.37) #
F	pre		0	10	3950		400	0.31 (± 0.06)	0.25 (± 0.08)	1.29 (± 0.18)	1.01 (± 0.04)
	1月	200	18	10	4200		400	1.02 (± 0.071) #	1.18 (± 0.21)	0.87 (± 0.09) #	1.372 (± 0.89)
	3月	400	26	9	4290		420	2.53 (± 0.45)	1.37 (± 0.57)	0.65 (± 0.44)	1.29 (± 0.78)
G	pre		0	1	400	1570	95	0.59 (± 0.09)	1.13 (± 0.16)	0.53 (± 0.00)	1.11 (+ 0.16)
	1月	200	47	1	410	1440	95	0.66 (± 0.15)	1.09 (± 0.18)	0.59 (± 0.01)	1.35 (+ 0.44)
	3月	400	50	1	410	1350	105	0.56 (± 0.13)	1.43 (± 0.12)	0.53 (± 0.15)	0.73 (+ 0.01)
	6月	400	43	1	420	1200	95	0.76 (± 0.01)	1.65 (± 0.79)	0.52 (± 0.26)	1.77 (+ 0.05) #

p<0.05 (pre vs. post)

表 3

	VPA有効血中濃度域	MHFMS	VC	MIC	CPF	FL-SMN
B	未満	→	→	↗	→	増加傾向
C	至適	→	↗	↗	↗	有意な変化なし
D	至適	→	→	↗	↗	有意に増加
E	未満	↗	→	—	—	有意に減少
F	未満	→	→	—	→	増加傾向
G	未満	→	→	↘	→	有意な変化なし

→: 不変, ↗: 改善, ↘: 増悪, —: 評価せず

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

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

研究要旨

現在様々な薬剤が SMA 治療薬候補として考えられている。サルブタモールは喘息治療薬としてよく知られているが、2008 年に Pane らが SMA 患者にサルブタモールを投与したところ、運動機能の改善を認めたと報告している。今回我々は、SMA 患児の皮膚線維芽細胞を用いて、サルブタモールによる *SMN2* 遺伝子の発現及び SMN 蛋白の産生への影響を検討した。*SMN2* 遺伝子の転写量はサルブタモール投与後 30 分でピークとなり、その後速やかに投与前のレベルまで低下した、投与後 1 時間後には投与前のレベルまで低下した。一方、SMN 蛋白は、サルブタモール投与後 48 時間後の時点でも増加傾向を認めた。このことから、サルブタモールの治療効果には *SMN2* 遺伝子転写調節以外のメカニズムも関与している可能性が考えられる。

共同研究者

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）

A. 研究目的

現在様々な薬剤が SMA 治療薬候補として考えられている。サルブタモールは喘息治療薬としてよく知られているが、2008 年に Pane らが SMA 患者にサルブタモールを投与したところ、運動機能の改善を認めたと報告している。今回我々は、SMA 患児の皮膚線維芽細胞を用いて、サルブタモールによる *SMN2* 遺伝子の発現及び SMN 蛋白の産生への影響を明らかにしたので報告する。

B. 研究方法

SMA3 型患児の皮膚線維芽細胞を用いた。本児の *SMN1* 遺伝子は 0 コピー、*SMN2* 遺伝子は 3 コピーであった。細胞培養の液体培地に最終濃度が $0.05 \mu\text{M}$ となるようにサルブタモールを加え、投与前、投与後 15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間における *SMN2* 遺伝子転写量の測定と SMN 蛋白の定量を行った。*SMN2* 遺伝子転写量の測定にはリアルタイム PCR 法を用い、全 *SMN* 転写産物 (Total SMN)、

全長型 *SMN* 転写産物 (FL-SMN)、エクソン 7 がスキップされた短縮型 *SMN* 転写産物 ($\Delta 7$ -SMN) について検討した。検体間との cDNA 差を補正するため GAPDH との比をとり、比較検討を行った。また、*SMN2* 遺伝子のスプライシングの変化をみるために、FL-SMN と $\Delta 7$ -SMN の比 (FL/ $\Delta 7$ -SMN) を計算した。SMN 蛋白の定量にはウェスタンブロッティングを用いた。

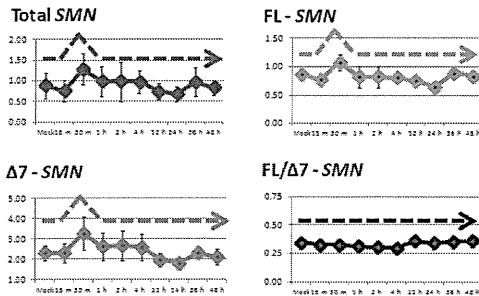
(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学医学倫理委員会による承認を得て行われた。

C. 研究結果

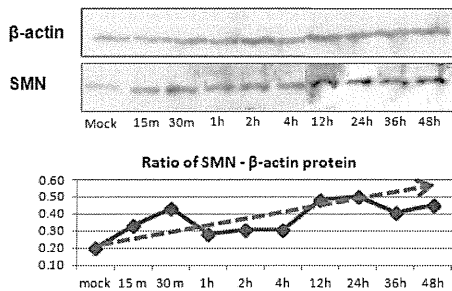
サルブタモール投与後の *SMN2* 遺伝子の転写量の推移を図 1 に示す。Total *SMN*、FL-SMN、 $\Delta 7$ -SMN の全てにおいてサルブタモール投与後 30 分でピークとなった。その後速やかに *SMN2* 遺伝子の転写量は減少し、サルブタモール投与後 1 時間で投与前のレベルまで低下した。*SMN2* 遺伝子のスプライシングの指標となる FL/ $\Delta 7$ -SMN は、サルブタモール投与後も全く変化を認めなかった。

図1 SMN転写産物の測定（GAPDH転写産物との比）



一方、SMN 蛋白はサルブタモール投与後 48 時間まで増加傾向を認めた（図 2 上）。次に、検体間の差を補正する目的で、リファレンスとして β -actin を使用し、SMN 蛋白との比を求めた（図 2 下）。 β -actin による補正後も、SMN 蛋白はサルブタモール投与後 48 時間の時点でも増加傾向を認めており、サルブタモールによる SMN 蛋白増加作用は少なくとも 48 時間は持続することが明らかとなった。

図2 SMN タンパク測定（ β -actin との比）



SMN2 遺伝子の転写量は投与後 1 時間後には投与前のレベルまで低下しているにもかかわらず蛋白は増加し続けていることから、サルブタモールの治療効果には *SMN2* 遺伝子転写調節以外のメカニズムも関与している可能性が考えられる。

D. 考察

SMA の治療薬としては現在様々な薬剤が治療薬候補として考えられており、いくつかの薬剤は現在海外で治験が始まっている。本邦でもバ

ルプロ酸 (VPA) などの薬剤がオフラベルで使用されているが、現在のところ、SMA の治療薬として有用であると臨床的に証明されている薬剤は存在しない。

そこで今回我々は、喘息発作や慢性閉塞性肺疾患で主に用いられるサルブタモールに注目した。サルブタモールは $\beta 2$ アドレナリン受容体刺激薬であり、気管支拡張作用を有する。その一方で、サルブタモールが $\beta 2$ アドレナリン受容体に結合するとアデニレートサイクレースの活性が上昇し、ATP から cAMP が作られる。この cAMP が *SMN2* 遺伝子プロモーターの中の cAMP response element (CRE) に結合することによって *SMN2* 遺伝子転写が促進される。2008 年に Pane らは、彼らが行ったコホートスタディーで、SMA type II の患者にサルブタモールを投与し、重篤な副作用無く安全に使用でき、治療前に比べ、治療開始後 6 ヶ月後、12 ヶ月後における運動機能の改善を認めたと報告した。また、同年 Angelozzi らは SMA 患者の線維芽細胞にサルブタモールを投与し、サルブタモールが *SMN2* 遺伝子転写量総量を増加させ、*SMN2* 遺伝子の alternative splicing も修正する事、SMN タンパクの発現も増加するという事を報告した。

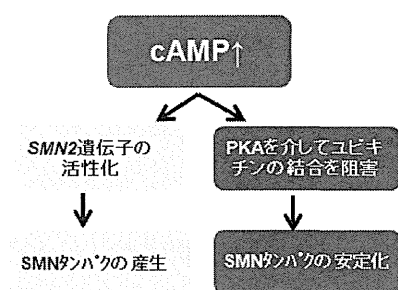
そこで、我々は SMA2 型患者の皮膚線維芽細胞を用い、サルブタモールによる *SMN2* 遺伝子の発現及び SMN 蛋白の産生への影響を調べた。*SMN2* 遺伝子の転写量は、Total *SMN*、FL-*SMN*、 $\Delta 7$ -*SMN* 全てにおいてサルブタモール投与後 30 分でピークとなり、その後速やかに投与前のレベルまで低下した。一方で、異常スプライシングがどれだけ生じたかの指標となる FL/ $\Delta 7$ -*SMN* は、サルブタモール投与に関わらず一定であった。このことから、サルブタモールは、転写の調節というよりは、転写量総量を増やす事によって薬効を発揮すると考えられた。

一方、SMN 蛋白はサルブタモール投与後 48 時間までゆっくと増加し続けることがわかった。

SMN2 遺伝子の転写量は投与後 1 時間後には投与前のレベルまで低下しているにも関わらず、SMN 蛋白はその後も増加し続けていることから、サルブタモールの作用機序として、SMN 遺伝子転写促進のみでは説明が困難である。

過去に Protein Kinase A (PKA) が SMN 蛋白をリン酸化することによって SMN 蛋白へのユビキチンの結合が阻害阻害され、プロテアーゼによる SMN 蛋白の分解が阻害されることが報告されている。サルブタモール投与によって上昇した cAMP が PKA を活性化し、SMN タンパクが安定化し、結果的に SMN タンパクの総量が増加した可能性がある (図 3)。

図 3 サルブタモールの作用機序 (仮説)



E. 結論

サルブタモールは SMA 皮膚線維芽細胞の SMN 蛋白量を増加させた。サルブタモールは SMA 治療薬の候補となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 Feb;16(2):123-9.

2) 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 Mar;34(3):213-22.

2. 学会発表

1) 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. 西尾 久英. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012 年 3 月 24 日～26 日、京都.

2) 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. 寶田 徹, 近江 昇一, 竹内 敦子, Nurputra Dian Kesuma Pramudya, 森川 悟, 西尾 久英. 日本薬学会第 132 年会、北海道.

3) 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 年 5 月 17 日～19 日、北海道.

4) 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 年 5 月 17 日～19 日、北海道.

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

SMN 蛋白と細胞骨格

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

研究要旨

SMA 原因遺伝子産物 SMN が、細胞骨格タンパク質の機能に関与する可能性が指摘されている。そこで、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 患者 (Type1&3) と健常人由来の繊維芽細胞について、細胞骨格タンパク質の性状と機能の差異を検討した。その結果、SMA 患者由来の繊維芽細胞では、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制御が認められた。細胞骨格の機能改善に着目した分子標的治療も視野に含めて更なる分子メカニズムの解明が必要である。

共同研究者

通山由美 (姫路獨協大学薬学部)

(倫理面への配慮)

当該研究については、神戸大学大学院医学研究科等医学倫理委員会および採取施設倫理委員会における承認を得ておこなっており、細胞採取に関しては事前にインフォームドコンセントを得ている。

A. 研究目的

SMA 原因遺伝子産物 SMN が、細胞骨格タンパク質の機能に関与する可能性が指摘されている。そこで 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、まず、SMA 患者 (Type1&3) と健常人由来の繊維芽細胞について、細胞骨格タンパク質の機能を比較検討する。

C. 研究結果

SMA 患者由来の繊維芽細胞では、1) F-アクチンによるストレスファイバーの不規則な配向とそれにもなう細胞の多極性が認められた。また、患者由来細胞では、2) Ca^{2+} イオン除去後の脱着が遅延しており、接着力の増強が示唆された。さらに、SMA 患者由来細胞では、3) TSA (過剰なアセチル化を誘導) 除去 3 時間経過後の回復 (脱アセチル化) が抑制されていた。

B. 研究方法

SMA 患者および健常人由来の繊維芽細胞を *in vitro* で培養し、1) 蛍光免疫染色法により、F-アクチンおよび微小管構造の差異と、細胞形態や細胞極性に与える影響について観察した。さらに、細胞骨格の機能について検討するため、2) 細胞接着に必須の Ca^{2+} イオン除去後の脱着速度を比較した。また、3) 微小管による小胞輸送に重要な、微小管構成タンパク質 α チュブリンのアセチル化 (K40) の程度と脱アセチル化速度を比較するため、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤トリコスタチン (TSA) 処理前後のアセチル化の変化をイムノブロットング法により解析した。

D. 考察

細胞骨格タンパク質に着目して解析することにより、SMA 患者繊維芽細胞では、1) F-アクチンの配向とそれにもなう極性の異常、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制御が認められた。SMN の発現低下または機能の破綻により、細胞骨格のダイナミクスに異常が生じ、SMA の病態に関与していると考えられる。

E. 結論

SMA 患者由来の繊維芽細胞において、細胞骨格タンパク質の機能に異常が認められた。細胞骨格の機能改善に着目した分子標的治療も視野に含め更なる分子メカニズムの解明が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsujioka T, Yokoi A, Kishimoto M, Kuyama A, Suemori S, Tohyama Y, Tohyama K: Effects of DNA methyltransferase inhibitors (DNMTIs) on MDS-derived cell lines. *Exp Hematol.* in press (2012)

2. Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Murata E, Ueda K, Abe M, Miyamoto K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M: Oligopeptides derived from autophosphorylation sites of EGF receptor suppress EGF-stimulated responses in human lung carcinoma A549 cells. *Eur J Pharmacol.* in press (2012)

3. Tsujioka T, Matsuoka A, Tohyama Y, Tohyama K. Approach to New Therapeutics: Investigation by the Use of MDS-derived Cell Lines. *Curr Pharm Des.* 18(22):3204-14 2012 Review

4. Tanaka C, Kaji H, He J, Hazama R, Yokoyama K, Kinoshita E, Tsujioka T, Tohyama K, Yamamura H, Nishio H, Tohyama Y. Rab27b regulates c-kit expression by controlling the secretion of stem cell factor. *Biochem Biophys. Res Commun.* 419(2):368-73 2012

2. 学会発表

1. 第 85 回日本生化学会大会（福岡，2012. 12. 14-16）
森田寛之，川上辰三，加地弘明，通山由美

好中球における Rab27A の機能の検討 “ミエロペルオキシダーゼ（MPO）の動態制御を介した補体依存性の貪食と Nets 形成における必須の機能”

2. 第 85 回日本生化学会大会（福岡，2012. 12. 14-16）

菊田香苗，通山由美，松川聡子，松田覚，赤桐里美，植野洋志

ヒト白血球とその培養細胞におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼに関する研究

3. 第 41 回日本免疫学会学術集会（神戸，2012. 12. 5-12. 7）

通山由美，加地弘明，通山薫，
Rab27a promotes phagosome maturation and neutrophil extracellular traps (NETs) formation

4. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会（京都，2012. 11. 29-12. 2）

加地弘明，通山薫，通山由美
マクロファージに貪食されたカンジダ菌の殺菌機構におけるチロシンキナーゼ Syk の機能

5. 第 62 回日本薬学会近畿支部大会（武庫川女子大学薬学部，2012. 10. 20）

川上辰三，森田寛之，加地弘明，通山由美
好中球の NETosis における低分子量 G タンパク質 Rab27A の機能解析

6. 第 62 回日本薬学会近畿支部大会（武庫川女子大学薬学部，2012. 10. 20）

大口千穂，川上辰三，波多野亜紀，森田寛之，加地弘明，通山 由美

補体を介した食作用におけるチロシンキナーゼ Syk の機能—好中球様に分化した白血病細胞株 HL60 による検討—ポスター賞！

7. 第 64 回日本ビタミン学会大会（岐阜，2012. 6. 22-23）

菊田香苗，松川聡子，通山由美，松田 覚，赤桐里美，植野洋志

ヒト白血球培養細胞におけるグルタミン酸デカ

ルボキシラーゼの発現様式の解析

8. 第 59 回日本生化学会近畿支部例会（京都
大，2011. 5. 19）

川上辰三，大口千穂，波多野重紀，加地弘明，
通山由美

好中球の Netosis における Syk の機能の検討

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

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

中島孝 国立病院機構新潟病院 副院長

研究要旨

HAL (Hybrid assistive limb) は共同研究者である筑波大学の山海により開発された装着型ロボットで、人の表面筋電位などの生体電位に加速度、関節角度、床反力センサなどの情報を組み合わせ、リアルタイムに骨格筋の随意運動を増強するために開発された。この技術を基にして、脊髄性筋萎縮症など神経筋疾患で使用可能な HAL-神経・筋難病型下肢用モデル (HAL-HN01) が開発された。これは他の HAL モデルとは異なり、病的筋の微小な電位をも検出し罹患筋をアシストできるものである。この治療効果により脊髄性筋萎縮症など希少性神経筋難病性疾患に対する新規医療機器としての薬事法承認を目指す治験を実施するための研究をおこなった。

共同研究者

林知広¹⁾、新宮正広¹⁾、山海嘉之²⁾、遠藤寿子³⁾

1) サイバーダイナミクス株式会社、2) 筑波大学、3) 国立病院機構新潟病院

制されるというという仮説を検討する。それに必要な開発研究と薬事法に基づく治験（無作為化クロスオーバー短期試験など）の準備を SMA の研究の中でおこなった。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症 (SMA)、シャルコー・マリー・トゥース (CMT)、筋萎縮性側索硬化症、遠位型ミオパチーなどを含む進行性の神経・筋疾患は難治性な上、障害が高度となり根本的な治療法の開発が望まれているが、現時点では成功しておらず、多専門職種ケアによる生活の質 (QOL) の向上がおこなわれているだけである。本研究では、このような疾患群に対して、疾患群専用開発された装着型ロボット HAL (hybrid assistive limb) を治療的に一定時間間欠的に使用することで、病気の自然経過を変容させることができるかどうか検証することを主要な目標とする。神経・筋難病患者が希少性神経・筋難病疾患に対して開発された下肢装着型ロボット、HAL 神経・筋難病下肢用モデル (以下 HAL-HN01) を定期的、間欠的に治療的に装着し、適切に筋収縮を助けられることで、筋萎縮と筋力低下の疾患の進行が抑

B. 研究方法

2011 年までの取り組みとして、山海は 1991 年から装着型ロボット HAL-1、-2、-3、-4 を人の運動機能増強目的に開発してきた。ロボットスーツ HAL 福祉用が商用化された。しかし、希少性神経・筋疾患患者では動作できない問題があり、先行研究により 2010 年に神経・筋難病患者の微弱な生体電位で駆動できる希少性神経・筋難病モデルである HAL-神経・筋難病型下肢モデルを作成した。申請者は 2011 年「神経・筋難病疾患の進行抑制治療効果を得るための新規医療機器、生体電位等で随意コントロールされた下肢装着型補助ロボットに関する治験準備研究」を行い HAL-神経・筋難病型下肢モデルの完成版である HAL-HN01 の治験プロトコルを作成し、PMDA で薬事戦略相談、開発前相談を行い、外部委託機関とも折衝を行い、治験準備をおこなった。患者エンタリーの促進のため患者団体に広報し交流

会を患者団体と共催した。サイバーダイン株式会社は希少性疾患医療機器として申請準備を開始した。

HAL-HN01 に関する医師主導治験について PMDA との開発前相談を 2012 年 2 月、治験相談を 6 月に行い 10 月の相談記録に基づき 12 月に治験届けを提出した。治験課題名は「希少性神経・筋難病疾患の進行抑制治療効果を得るための医療機器、生体電位等で随意コントロールされた下肢装着型補助ロボット (HAL-HN01) に関する医師主導治験—短期効果としての歩行改善効果に対する無作為化比較対照クロスオーバー治験(NCY-3001 試験)」である。医師主導治験の治験調整医師は研究代表者が担当する。目標症例数は 30 症例で治験デザインは無作為化クロスオーバー比較対象試験である。

本研究は平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）「希少性難治性疾患—神経・筋難病疾患の進行抑制治療効果を得るための新たな医療機器、生体電位等で随意コントロールされた下肢装着型補助ロボット (HAL-HN01) に関する医師主導治験の実施研究」と共同してとりくんだ。（倫理的配慮：本研究では、ヘルシンキ宣言、薬事法、臨床研究倫理指針を遵守するだけでなく、患者団体からの情報を得ながら、十分な倫理的配慮をおこない研究した。）

C. 研究結果

治験名「希少性神経・筋難病疾患の進行抑制治療効果を得るための医療機器、生体電位等で随意コントロールされた下肢装着型補助ロボット (HAL-HN01) に関する医師主導治験—短期効果としての歩行改善効果に対する無作為化比較対照クロスオーバー治験 (NCY-3001 試験)」に関して、2012 年 6 月 27 日に PMDA から治験相談対面助言を受け、10 月に相談記録を得た（アップロードファイル資料 1 PMDA 治験相談申請および相談記録（2012 年 6 月 27 日）—

式を参照）て、その治験相談において、研究班で作成した治験実施プロトコルが審査され、基本的な治験実施にむけて進めてよいと評価され、さらに助言に基づき修正し、2013 年 1 月 4 日に厚生労働省に対して治験届けを出した。研究代表者の治験実施説の治験審査委員会で承認を得た（2012 年 10 月 17 日承認および 12 月 19 日変更承認）。研究代表者を治験調整医師として 2013 年 1 月 4 日に医師主導治験の治験届けを治験調整医師施設の分を提出した。現時点で治験届けに対する PMDA からの照会事項の問い合わせを待っている。これにより早くて 2013 年 2 月上旬から治験が開始できることとなった。

HAL の臨床試験における主要評価項目および副次評価項目における臨床評価方法、安全性評価方法、統計学的な対照試験に関する方法を確定したこと。治験実施プロトコルを精緻化して、GCP 省令や我が国の慣例、ICH-GCP を遵守し、治験における ICH-GCP E9 における基本的な統計解析方法にしたがい治験実施計画を精緻化した。

治験責任・分担医師、モニタ、治験コーディネータ、理学療法士の研修とプロトコル調整のためキックオフミーティングを 2012 年 12 月 2 日に東京にておこなった。多施設共同治験としての中央実施体制を整えた。研究代表者が治験調整医師、サイバーダイン株式会社が被験機器提供者、疾患別の医学専門家を分担研究者のそれぞれの専門家、視覚的歩行評価中央判定委員会、安全性評価委員会、医学統計アドバイザー、症例登録センター、割り付け責任者、モニタリング責任者、データ管理責任者、解析責任者、監査責任者の体制とした。治験実施体制としてモニタリング、監査、無作為化、データマネジメント、監査は外部委託機関二社に分割し契約した。

患者団体への説明：組み入れ基準および治験プロトコルに関して患者団体、患者会、家族会に赴き意見を聴取した。2012 年 9 月 1 日京都にて遠位型

ミオパチー患者会に対して、9月15日はSMA家族会にて、9月16日はCMT病患者会にて説明し、筋ジストロフィー関連のニュースレターであるRemudy通信に情報を提供した。

海外治験との安全性情報の共有の討議として2012年8月に、本治験プロトコルが日本のGCPだけでなくICH-GCPを満たすためにボーフム市のBergmannsheil 大学病院にてHAL臨床試験に関する研究会をおこなった。ボン大学にてEUの医療機器許認可の実際を調査し、ドイツおよびスウェーデンでCE marking 取得にむけた治験が実施される予定となっており。重篤な有害事象を共有する必要がある。

D. 考察

HAL の様な装着型ロボットは日本で世界に先駆けて開発されており、世界では臨床試験や治験の実績がない。このため、今回の医師主導治験にむけた研究として、先行研究を参照することはほとんどできなかつた。分担研究者山海は人の表面筋電図等に加速度、関節角度、床反力などのセンサ情報を組み合わせ、随意運動を増強する装着型ロボット HAL (Hybrid assistive limb) を先行研究で開発した。申請者の中島は山海と H17 年～H19 年「特定疾患患者の生活の質の向上に関する研究」、H17 年～H19 年 NEDO「人間支援型ロボット実用化基盤技術開発/自立動作支援ロボット及び実用化技術の開発」、H17 年～H19 年厚生労働省 身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業「人間・機械・情報系の融合複合新技術サイバニクスを駆使したロボットスーツ HAL の開発」において、希少性神経・筋疾患の微弱な生体電位で動作する HAL-神経・筋難病用下肢モデル(HAL-HN01)を開発した。これは希少性で治療法の無い脊髄性筋萎縮症、シャルコー・マリー・トゥース病、筋萎縮性側索硬化症などの病的

筋が出す微弱な電位を検出し病的筋をアシスト可能である本研究は、これらの神経・筋難病患者が定期的、間欠的にこれを装着し、適切に筋収縮を助けられることで、筋萎縮と筋力低下の進行が抑制されるという治療効果に関する仮説を検証するために、薬事法に基づく医師主導治験をおこなう事である。神経・筋疾患で適切に筋をアシストすることで筋機能の悪化を抑制できるという治療効果は、呼吸筋群において証明されている。(Carratu, P et. al、2009)。本研究は骨格筋群において同様の効果を HAL-HN01 の間欠的使用による歩行機能の治療効果と安全性を証明し、有用性により希少性難病に対する新規医療機器として薬事承認を得ることを目的とする

HAL-HN01 は海外の Lokomat および LOPES のようなトレッドミル装置に固定した単なる歩行リハビリテーション機器ではなく希少性神経・筋難病患者に対して使用可能で、随意制御技術とアシスト技術を組み合わせ生体電位を使う新たな独創的医療機器であり、希少性疾患用医療機器の申請予定である。

申請者は PMDA の専門委員の経歴があり、医薬などの承認過程に精通している。この様な医師主導治験を我が国で率先して実施する価値がきわめて高いと考えられた。

E. 結論

SMA など神経・筋疾患用の HAL、HAL-神経・筋難病下肢用モデルの開発に成功し、HAL を使った神経・筋疾患に対する薬事法に基づく治験をおこなう方法が確立できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 中島孝, 新 ALS ケアブック, 第 7 章心理ケア, 川島書店, 2012 年, 印刷中

2. 中島孝, 「小脳と運動失調小脳はなにをしているのか」(編集・西澤正豊)第5章「BMI とロボット工学の臨床応用」, 中山書店, 2012年, 印刷中
 3. 中島孝, 12章-2 ロボットスーツ HAL 開発の進歩, p.119-125, 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル, SMA 診療マニュアル編集委員会, 金芳堂, 2012
 4. 中島孝, 尊厳死論を超える一緩和ケア難病ケアの視座, 現代思想 40(7):116-125, 2012
 5. 中島孝, 患者もスタッフもいきいきとするケアを行なうために 治らない病気とともに生きる患者の QOL を考える, 看護管理, 22:563-568, 2012
 6. 中島孝, 大災害時の神経疾患治療としての問題点 8ヵ月後の今 神経難病患者の災害時の対応 二回の地震と東日本大震災への支援経験から, 神経治療学, 29:207-211, 2012
 7. Shimizu T, Nagaoka U, Nakayama Y, Kawata A, Kugimoto C, Kuroiwa Y, Kawai M, Shimohata T, Nishizawa M, Mihara B, Arahata H, Fujii N, Namba R, Ito H, Imai T, Nobukuni K, Kondo K, Ogino M, Nakajima T, Komori T., Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: a multicenter study in Japan. Amyotroph Lateral Scler. 13(4):363-6, 2012
2. 学会発表
 1. 第53回日本神経学会学術大会(2012年5月25日東京国際フォーラム) 発表、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
 2. 第6回日本緩和医療薬学会 (2012年10月7日神戸国際会議場)、ワークショップ・シンポジウム: 患者主導型臨床研究 (Patient Reported Outcome: PRO) と臨床試験におけるこれからの緩和的なかわりにおいて、「緩和ケアと難病ケア-その課題治らない病気に対する治療の開発-緩和医療における新たな治療開発モデル (HAL) 」
 3. その他の発表
 1. 東京女子医科大学医学部、医学生むけ、医学教養セミナー、「ロボットスーツ HAL の医療への応用」(2012年6月27日)
 2. 先端医療振興財団 臨床研究情報センター (TRI) セミナー「HAL を用いた希少性難治性疾患に対する医師主導治験について (HAL-HN01 に対する NCY3001 試験)」(2012年12月17日)
 3. Clinical trial seminar for HAL in Germany, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum - Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH, Germany, "Development of robot suit HAL medical application in Japan and the first clinical trial for neuromuscular disease patients" 22 August 2012
 4. 市民公開講座、希少性難治性疾患患者に対するロボットスーツの実用化-香川県丸亀市保健福祉センター「希少性難治性疾患-神経筋難病性疾患に対する HAL の治験について」(2012年11月25日)
 5. 患者会対象説明講演会、遠位型ミオパチー患者会、「ロボットスーツ HAL の医療への応用および治験の話: 遠位型ミオパチー患者会の皆様へ」(京都2012年9月1日)
 6. 患者会対象説明講演会、SMA 家族会「ロボットスーツ HAL の医療への応用および治験の話: 脊髄性筋萎縮症患者・ご家族の皆様へ」(京都2012年9月15日)
 7. 患者会対象説明講演会、CMT 病患者会 「ロボ