

表 ネマリンミオパチーの原因遺伝子による分類

	原因遺伝子	原因蛋白質	遺伝子局在	ネマリンミオパチーにおける頻度	臨床像	遺伝形式
NEM1	<i>TPM3</i>	tropomyosin α -3 chain	1q21.3	2~3%	重症先天型 中間先天型 小児期発症型	常染色体劣性
NEM2	<i>NEB</i>	nebuline	2q23.3	不明	典型先天型	常染色体優性
NEM3	<i>ACTA1</i>	α -actin-1	1q42.13	15~25%	重症先天型 小児期発症型	常染色体劣性 常染色体優性
NEM4	<i>TPM2</i>	tropomyosin-2	9p13.3	<1%	典型先天型	常染色体優性
NEM5	<i>TNNT1</i>	troponin T1	9q13.42	遺伝学的な 隔離集団のみ	アーミッシュの ネマリンミオパチー	常染色体劣性
NEM6	<i>KBTD13</i>	Kelch repeat and BTB/POZ domain-containing protein 13	15q32.31	不明	小児期発症型、動作の特 徴的な緩慢さを伴う緩徐 進行性の筋力低下	常染色体優性
NEM7	<i>CFL2</i>	cofilin-2	14q13.1	不明	典型先天型	常染色体劣性

た。一方で、筋生検を行い確定診断がなされても、その原因遺伝子は複数であり、一つずつ原因遺伝子の塩基配列を確認して診断することは時間的・経済的に大きな負担である。これを解決する方法として、次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子の一括した網羅的な解析をする遺伝子診断が有効であることを筆者らは経験している。ネマリンミオパチー (nemaline myopathy) と筋生検により診断された症例の次世代シーケンサー解析について述べる。

ネマリンミオパチーは、先天性ミオパチーの中で最も頻度が高く、病理組織的に Gomori-trichrome 変法染色で、筋線維内に紫色のネマリン小体 (rods) という構造物が認められることが特徴である。この微細構造は Z 帯と同様であり、生化学的にも Z 帯の主成分である α -アクチニン蛋白を示している。*NEM1* は染色体 1q21.3 に存在し、アクチンフィラメントに沿って結合する筋線維蛋白の一つであるトロポミオシン α_3 鎖をコードする遺伝子 (*TPM3*) の変異が認められている⁹⁾。一方、染色体 2q23.3 に存在するネブリン蛋白をコードする遺伝子 (*NEB*) の変異が見出され、*NEM2* と命名されている¹⁰⁾。表のように原因遺伝子が次々と同定され、現在、原因遺伝子によって 7 型までの分類となっている。常染色

体優性遺伝形式をとる型と、常染色体劣性遺伝形式をとる型が存在している。

われわれは、出生時より著明なフロッピーインファントで、身体所見から何らかの先天性ミオパチーが疑われていた 2 歳 1 か月の男児例を経験した¹¹⁾。病理所見にてネマリン小体があったため、ネマリンミオパチーの遺伝子変異があると想定して、原因遺伝子の可能性のある遺伝子をひとつずつシーケンサー解析していたが、変異は見出されなかった。われわれは次世代シーケンサーでターゲットリシーケンスを行い、リアノジン受容体 1 型 (*RYR1*) の exon 33 の c.4718C>T, p.1573P>L と exon 47 の c.7585G>A, p.2529D>N の複合ヘテロ接合を示していることが判明した。すでに、外眼筋麻痺を有する筋線維タイプ不均等症 (CFTD) の症例において *RYR1* 変異が見出されて報告されているが、その報告ではネマリン小体の証明はなく、CFTD と診断されている。外眼筋麻痺と筋線維タイプ不均等症を示すネマリンミオパチーとして、新たに *RYR1* が原因遺伝子であることを本症例において、日本人で初めて証明した。このように、臨床像が共通で、原因遺伝子が複数ある症例において、次世代シーケンサーによる網羅的解析は遺伝子診断として有用であると考えられる。

IV. 今後の展望

近年、筋疾患においても、多くの新たな原因遺伝子が同定され、病型と病態の概念が大きく変化した。筋疾患では、筋緊張低下、筋力低下、フロッピーインファントなど、疾患の間で共通の臨床症状を示すことが多いが、筋ジストロフィーや先天性ミオパチーの原因遺伝子は、数十個にわたる。筋疾患では、骨格筋の病理診断により、筋ジストロフィーや先天性ミオパチーの確定診断がなされてきているが、解析技術の進歩により、高速で網羅的な遺伝子解析が日常診療においても応用できるようになりつつある。

遺伝子検査の将来の展望としては、次世代シーケンサーを用いた既知の変異をハイスループットに同定する方法が、筋ジストロフィーや先天性ミオパチーの診断、病態の解明において多大な効力を発揮していくものと考えられる。さらに、変異が同定されていない筋疾患においても、全エクソン（エクソーム）解析により、原因遺伝子を発見する有力な方法となりつつある。

Key Points

- ① 筋疾患の診療の現場において、確定診断としての遺伝子検査がなされるようになった。
- ② 筋ジストロフィーや先天性ミオパチーの遺伝子検査には、PCR法、MLPA法、シーケンス法などが実施される。
- ③ 次世代シーケンサーによるハイスループットな方法は、臨床像が共通で複数の原因遺伝子がある症例の遺伝子診断に有用である。

文献

- 1) Schuster SC : Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* **5** : 16-18, 2008
- 2) Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM : Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51** : 919-928, 1987
- 3) Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, et al : Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Human Genetics* **117** : 92-98, 2005
- 4) Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, et al : Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* **72** : 4931-4939, 2003
- 5) Toda T, Segawa M, Nomura Y, et al : Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet* **5** : 283-286, 1993
- 6) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* **394** : 388-392, 1998
- 7) Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, et al : Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Molec Genet* **8** : 2303-2309, 1999
- 8) Saito K, Osawa M, Wang Z-P, et al : Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* **92** : 184-190, 2000
- 9) Ryan MM, Schnell C, Strickland CD, et al : Nema-line myopathy : a clinical study of 143 cases. *Ann Neurol* **50** : 312-320, 2001
- 10) Pelin K, Hilpela P, Donner K, et al : Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 2305-2310, 1999
- 11) Kondo E, Nishimura T, Kosho T, et al : Recessive RYR1 mutations in a patient with severe congenital nemaline myopathy with ophthalmoplegia identified through massively parallel sequencing. *Am J Med Genet A* **158A** : 772-778, 2012

* * *

24. ウィリアムス症候群

Williams syndrome, Williams-Beuren syndrome

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 斎藤加代子

診断の要点	<ul style="list-style-type: none"> ● 特徴的な顔貌、嗄声、心血管系病変、高 Ca 血症、発達遅滞、言語能力に比べて視空間認知の処理や構成の苦手さという認知の特徴などの臨床的特徴により診断をする。 ● 心血管系病変は 70~80% にみられ、大動脈弁上狭窄、末梢性肺動脈狭窄、腎動脈狭窄がみられる。 ● ELN 遺伝子を含む染色体 7q11.23 領域を FISH 検査、アレイ CGH により診断する。
治療の要点	<ul style="list-style-type: none"> ● 新生児期から乳児期に心エコーなど心血管系の精査を行い、必要なら外科手術を行う。 ● 成長と発達の評価、高 Ca 血症の検査、視聴覚検査、心疾患などの合併症の評価を継続する。 ● 理学療法、作業療法、音楽療法などを行い、入園入学に際して担任の先生に本人の能力の特徴を知らせ、理解と配慮を依頼する。

歴史と定義

Williams 症候群は、1961 年にニュージーランドの Williams らにより、大動脈弁上狭窄と共通する特徴的な顔貌と軽度知的障害を示す症候群として 4 症例が報告された。7,500~20,000 人に 1 人の有病率を示し、染色体 7q11.23 に責任遺伝子が存在する微小欠失症候群である。弾性線維の構成成分、エラスチン (ELN) の遺伝子の、主に欠失が原因である。小妖精様顔貌 (elfin face) と表現される特徴的な顔貌、循環器疾患 (大動脈弁上狭窄がもっとも多い)、発達遅滞、特徴的な認知プロフィール、特徴的な性格、高 Ca 血症などを示すが、必ずしもすべての症状を合併しているわけではない。

臨床の実際

1. 臨床症状

1) 顔貌の特徴：腫れぼったい眼瞼、低い鼻根、丸い鼻翼をもつ短い鼻、長い人中、幅広い口、厚い唇、軽度の小顎症、歯牙の低形成、歯の欠損な

どである。嗄声も特徴である。乳児期には平坦な顔面であるが、年長児や成人は顔の幅が狭く面長となり、長い首が特徴的になる。

2) 心血管系：Williams 症候群の 70~80% に心血管系病変がみられる。大動脈弁上狭窄は外科手術を必要とすることもある。幼児期には末梢性肺動脈狭窄もみられるが年齢とともに改善する。大動脈狭窄、腎動脈狭窄、高血圧を示すこともある。大動脈弁上狭窄の 30~50% に Williams 症候群を伴うとされている。

3) 高 Ca 血症：Williams 症候群の 1.5~15% に高 Ca 血症を認める。刺激過敏・嘔吐・便秘・筋痙攣などの合併症を引き起こす可能性がある。幼児期に治癒するケースが多いが、Ca とビタミン D の代謝異常が継続するケースもある。高 Ca 尿症もよくみられ、腎結石になりやすい。

4) 発達遅滞、認知の特徴：精神運動発達遅滞を認め、平均的な知能指数 (IQ) は 57 であり、75% が精神遅滞と診断される。成長すると言語や聴覚記憶が比較的優れている一方、視空間認識障害が

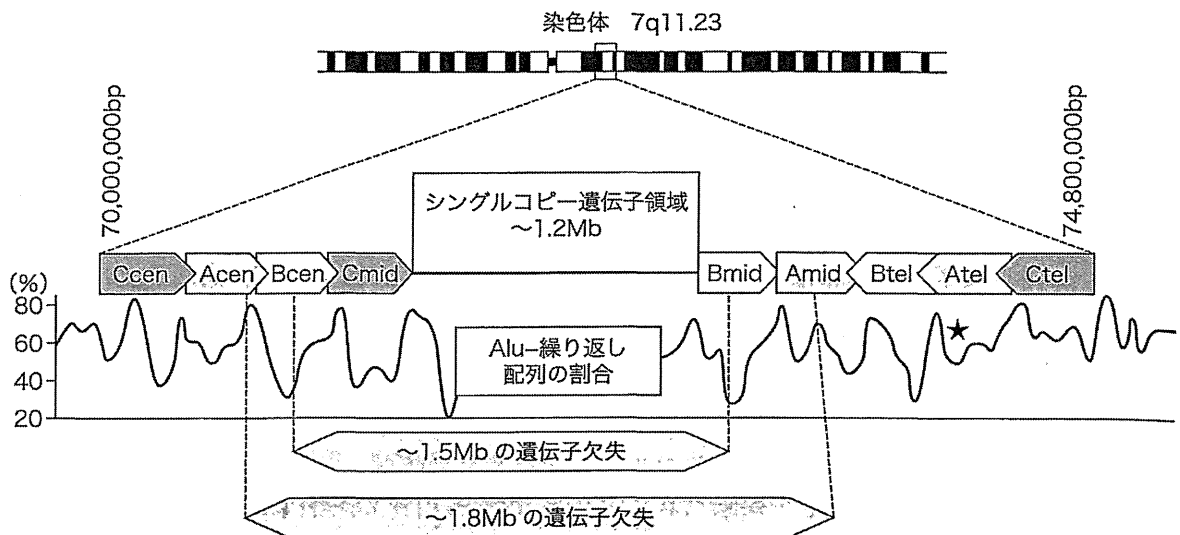


Fig. 1. 染色体 7q11.23 における Williams 症候群の責任遺伝子領域のゲノム構造

Low-copy-repeat (LCR) のブロック B (Bcen と Bmid) に挟まれた領域の 1.5Mb の欠失の例がもっとも多い。

[文献 1) より引用]

認められる。目と手の協調すなわち目から入る刺激を受けて、手の動きに伝えることが困難で、なぞり書きやハサミを使うことが苦手である。聴覚過敏を示し、発語の遅れはあっても言葉が出始めると語彙が増えて物の名前をよく覚えるようになる。睡眠障害、注意欠陥多動性障害 (ADHD) などがみられる。社会性が高く、多弁で人なつこく、また人の顔をよく覚えていることができる。さらに、音感が優れており音楽的な才能に富む人が多いことも特徴である。

2. 原因遺伝子と遺伝について

Williams 症候群の遺伝子領域を Fig. 1 に示す。Williams 症候群では、約 28 個の遺伝子を含む 1.5~1.8 Mb の欠失を示す。大動脈弁上狭窄のみを示す *ELN* 遺伝子のみ欠失例から、Williams 症候群としての全スペクトラムを示す 1.8 Mb の欠失例まで存在する¹⁾。 *de novo* 発症の孤発例が一般的であるが、まれに常染色体優性遺伝の報告、生殖細胞モザイクによる同胞発症の報告もある。*ELN* は弾性線維の主要な蛋白質で皮膚、肺、大血管、軟骨、項靭帯などの組織に多く分布している。大血管(動脈)の中膜に存在して、血管の弾性に関与している。本症における皮膚、嚔声、鼠径ヘルニア、膀胱や腸にみられる憩室への関与も考えられている。視空間認識障害を示す Williams 症候群

の解析で、*ELN* 遺伝子と隣接する *LIMK1* 遺伝子の欠失が確認され、*LIMK1* が視空間認識障害の因遺伝子と考えられている²⁾。

3. 診断

まず、臨床症状によって診断が行われる。Williams 症候群を疑ったら、FISH 検査 (fluorescence *in situ* hybridization) により、7q11.23 領域を調べる。確定診断は染色体検査と Williams 症候群領域をターゲットとした FISH 検査である。最近はいアレイ CGH 検査も行われるようになった。染色体の欠失している部位には構造蛋白質である *ELN* をコードする *ELN* 遺伝子が含まれているが、*LIMK1* 遺伝子など、隣接するいくつかの遺伝子が表現型と関連している³⁾。

4. 医療的介入

新生児から乳児期には、エコーなど心疾患の検査を行う。嘔吐しやすい場合は胃食道逆流症に注意する。高 Ca 血症・尿症がみられることあるので、検査が必要である。視聴覚精査も行う。幼児期は、心疾患などの合併症のフォローを行い成長と発達の評価を行う。う歯になりやすく、科検診が必要である。理学療法や作業療法を実施する。学童期には循環器系精査を継続し、高血圧に注意する。側彎にも注意。ADHD に該当する者が少なくない。視覚からの情報獲得がむずかしく

立体認知が苦手である。多弁で人なつこく、音楽療法の有効性を認めた報告がある。

5. サポート、フォローアップ

1) 医療社会福祉の情報またはソーシャルワーカーの紹介、療育などの本人への支援情報を提供する。定期的なフォローアップを受けること、連絡をとることを促し、継続して医療的な介入を受けることを勧める。

2) 小児循環器専門医による循環器系基礎検査と定期検査、定期的な高血圧のチェック。心疾患などの合併症のフォロー、成長と発達の評価、歯科検診、理学療法や作業療法を受ける。

3) ビタミン D が有害作用を及ぼす可能性が

ある。ビタミン D の体内生産を最小限に押さえるために強い日差しを避ける。

4) 視覚からの情報獲得がむずかしく、立体認知が苦手である。多弁で人なつこく、音楽療法の有効性を認めた報告がある。Williams 症候群の子どもがもっている人なつこさ、音楽の才能などの特徴を生かして、楽しい生活を送ることを勧める。

文 献

- 1) Schubert C : Cell Mol Life Sci 66 : 1178, 2009
- 2) Tassabehji M et al : Nat Genet 13 : 272, 1996
- 3) Tassabehji M : Hum Mol Genet 12 : R229, 2003

南江堂



■ テキストでは解決できない不整脈診療のトラブルに、すっきり・明快に答える実践書

不整脈診療のトラブルシューティング 65のシークレット

編集 山下武志/高橋 淳/栗田隆志 (近畿大学准教授)

■ B5判・230頁 2011.10. ISBN978-4-524-26461-2

定価 **4,935** 円 (本体 4,700 円+税 5%)

2012
internal medicine

脊髄性筋萎縮症の診断とケア

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 助教
同 講師
同 所長・教授

あらかわ 荒川 玲子
まつお 松尾 真理
さいとう 齋藤 加代子



~~~~~  
小児期発症の遺伝性神経筋疾患においては、日常診療、治療、リハビリテーションから、遺伝学的検査による診断、疾患の自然歴や最新の治療に関する情報提供、次子の再発率や出生前診断に関する遺伝カウンセリングなど、疾患と患者さんの状況に合わせたオーダーメイド医療が必要となります。当センターでは、臨床遺伝専門医、小児神経専門医、認定遺伝カウンセラー、臨床心理士、看護師が、診療、情報提供、遺伝カウンセリングの全てにおいてチームで対応しています。また、遺伝性神経筋疾患の病態解明、治療法開発を目指して、末梢血、胎盤由来の細胞、絨毛細胞などを用いた研究を患者さんとご家族の同意のもとで推進しています。今回は、当センターで遺伝子診断、遺伝カウンセリングを多く行っている脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy: SMA）の診断とケアについてまとめます。  
~~~~~

り下肢でより明らかに認められます。また体幹および四肢のいずれでも症状が認められるという特徴があります。脱神経の症状としては、舌の線維束性収縮や手指の細かい震えが特徴的です。知的発達は年齢相当もしくは高い方が多く、Ⅱ型のお子さんの中には、3歳頃から電動車椅子をハツラツと乗りこなす方もいます。

Ⅰ型（Werdnig-Hoffmann病：重症型）：

生後6か月ごろまでに発症し、全身性の筋力低下がみられ、支えなしに座位を保持することが困難で

1. SMAについて

SMAは、脊髄の前角細胞の病変によって起こる筋萎縮症であり、運動ニューロン病のひとつです（図1）。体幹、四肢の近位筋優位に筋力低下と筋萎縮を示します。発症年齢と重症度によってⅠ型からⅣ型に分類されます。生後すぐの新生児から高齢者まで、幅広い年齢層の患者さんがいます。最近の調査では、日本におけるSMAの患者さんは1,000人～2,000人と推定されています。本稿では、小児期に発症するⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型を中心に解説します。

2. 症状

脊髄前角細胞の消失により、骨格筋萎縮を伴う筋力低下と脱神経の症状を示します。症状は左右対称性で、遠位筋よりも近位筋でより明らかに、上肢よ

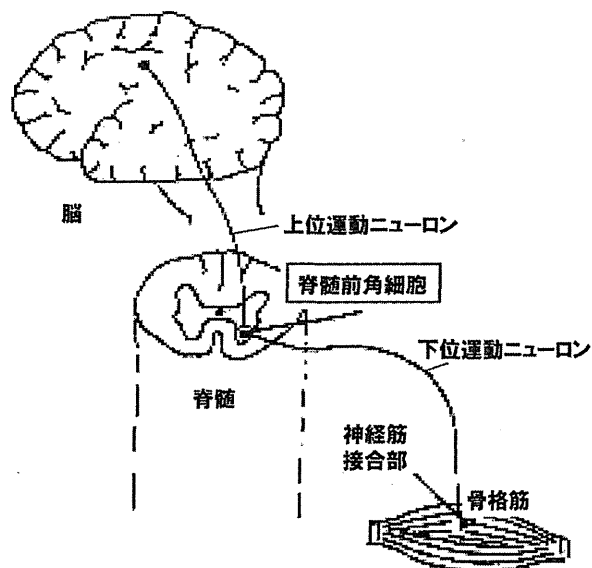


図1

す。発症後には運動発達がとまり、体幹を動かすことができません。哺乳困難、嚥下困難、誤嚥、呼吸不全を伴います。人工呼吸器を用いない場合の寿命は生後6～9か月とされ、95%は18か月までに亡くなるといわれています。したがって多くの場合では、生命を救うために気管内挿管または気管切開と、人工呼吸器管理が必要となります。

Ⅱ型 (Dubowitz病：中間型)：

生後1歳6か月までに発症し、支えなしに立ったり、歩いたりすることができません。成長とともに、関節拘縮と脊柱側弯が著明になります。上気道感染から肺炎や無気肺へと進展し、呼吸不全に陥ることがあります。

Ⅲ型 (Kugelberg-Welander病：軽症型)：

生後1歳6か月以降に発症し、立ったり歩いたりできていたのに転びやすくなる、歩けない、立てないという症状が見られます。次第に、上肢の挙上が困難になります。思春期以前に歩行不可能になった方では脊柱側弯が生じます。

Ⅳ型 (成人型)：

成人期に発症し、筋力低下が認められます。発症年齢が遅いほど、症状進行のスピードは緩やかとなります。下位運動ニューロンのみが障害されます。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では上位運動ニューロンも障害され、この点が異なります。脊柱側弯は見られません。

3. 診 断

筋萎縮を伴う筋力低下と脱神経の所見により、臨床的に本症と診断が可能です。また末梢神経伝導速度検査、針筋電図、骨格筋画像検査が、診断の一助となります。しかしこれらの検査は鎮静が必要となったり、苦痛を伴うものが含まれるため、近年ではこのような検査より優先して、適切な遺伝カウンセリング後の遺伝子検査で診断を確定する例が増えています。小児期発症のSMAは、ほとんどの場合SMN1 (survival motor neuron 1) 遺伝子の変異により発症します。SMN1遺伝子は、5番染色体長腕q13領域に存在し、SMNタンパク質をコードします。多くのSMA患者さんでは、二つあるSMN1遺伝

子の両方に欠失が認められます。また一部の方では、一方のSMN1遺伝子に欠失があり、他方のSMN1遺伝子に遺伝子内の微小な変異が認められます。

遺伝子解析では5～10mlの末梢血を採取し、血液に含まれるリンパ球からDNAを抽出して検査を実施します。SMN1遺伝子のエクソン7とエクソン8をそれぞれ独立にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅し、SMN1遺伝子欠失の有無を判定します。この方法で欠失が明らかにならない場合でも、臨床的にSMAが疑われる場合には、MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 法により、SMN1遺伝子の各エクソンを調べることも可能となってきています。しかしSMA患者さんの全ての方で、SMN1遺伝子変異が確認されるわけではなく、SMN1遺伝子以外の原因遺伝子が存在すると推測されます。現行の方法でSMN1遺伝子変異が検出されない患者さんにおいては、次世代シーケンサーを用いた解析によりSMN1遺伝子のみならず、さらに広い範囲での詳細な研究が開始されています。

4. 遺伝カウンセリング

SMAの原因として、乳児期発症のⅠ、Ⅱ型については95%以上、幼児期・小児期発症のⅢ型の40～50%にSMN1遺伝子欠失が認められます。SMN1遺伝子変異により発症するSMAは、常染色体劣性遺伝形式に従います。すなわち、父由来のSMN1遺伝子と母由来のSMN1遺伝子の両方に欠失がある場合に、SMAを発症します。父由来または母由来の遺伝子のどちらか1つだけに欠失がある場合には、この方は全く無症状であり「保因者」と呼びます。保因者は、生涯症状がありません。

両親がいずれも保因者の場合、お子さんがSMAになる確率は1/4 (25%)です。Ⅰ型の保因者の頻度は欧米では60～80人に1人、Ⅱ型、Ⅲ型は76～111人に1人ですが、日本では欧米よりその頻度が少ないといわれています。SMAの自然歴など疾患概要や遺伝のことをより詳しく知りたい場合には、遺伝カウンセリングを受けるという方法もあります。「病気について、治療を含めた今後のことを知りたい」、「次の子を希望しているので、検査が可能かどうか知りたい」など、来院された方の状況に応じて、遺伝カウンセリングが提供されます。日本では、2012年1月現在76の大学病院を含む91施設に、遺伝カウンセリングを受けられる外来があります。遺伝

カウンセリングを担当するのは、臨床遺伝専門医や認定遺伝カウンセラー、臨床心理士などで、遺伝性疾患について詳しい知識を持っています。

5. 治療

SMAでは根本治療はいまだ確立していませんが、小児神経科医、神経内科医、整形外科医、理学療法士などが連携をとり、チーム医療による継続的な医療管理を受けられる体制が望まれます。乳児期に発症するⅠ型やⅡ型の方では、哺乳や嚥下が困難なため経管栄養や胃瘻が必要となる場合があります。また、呼吸器感染症、無気肺を繰り返す方が多く、これらが予後を大きく左右します。鼻マスク人工換気法（非侵襲的陽圧換気法；non-invasive positive pressure ventilation: NIPPV）は有効ですが、乳児期には使用困難な場合が少なくありません。

また、筋力にあわせた運動訓練、関節拘縮の予防などのリハビリテーションが必要です。Ⅲ型の方では歩行可能な状態をなるべく長期に維持し関節拘縮を予防する目的で、リハビリテーションを行います。装具の使用が日常生活動作の向上や機能維持に有用な場合もあります。

SMAの治療法開発については、世界中で精力的に研究が行われています。5番染色体長腕q13には、SMN1遺伝子とSMN2遺伝子が存在します（図2）。SMN2遺伝子は、SMN1遺伝子とその配列がとてもよく似ていて、SMNタンパク質の遺伝情報をもっています。しかしSMN1遺伝子と5塩基のみ異なる部分があることにより、エクソン7が組み込まれな

い短縮型SMN2 mRNAが多く産生され、エクソン7が組み込まれている機能的な完全長SMN2 mRNAは少ししか作られません。エクソンがmRNAに組み込まれることを、スプライシングといいます。SMN2遺伝子の場合、エクソン7がうまくスプライシングされない状態にあると考えられます。

エクソン7が組み込まれない短縮型SMN2 mRNAからは、機能的なSMNタンパク質はできません。これまでの分子遺伝学的研究から、SMN1遺伝子の欠失があるSMA患者さんには必ずSMN2遺伝子が存在していることがわかっています。SMAモデルマウスの研究からはSMN2遺伝子のコピー数が多いほど、SMAの症状は軽くなるということが示唆されています。これらの知見から、「SMN2遺伝子から機能的なSMNタンパク質を十分産生させる」ための研究が進められています。この機序に基づいて、バルプロ酸ナトリウムなどヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた研究が行われています²⁾。

この他にもSMNタンパク質の産生増加を目指して、ウイルスベクターを用いてSMN1遺伝子を導入する研究が進められています³⁾。また運動ニューロン保護を目的とした治療として、神経保護作用が期待されるグルタミン酸遊離抑制剤のガバペンチン、リルゾール、神経栄養因子としてのTRH（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）などの検討がなされています⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

再生治療の分野では、2009年に米国でSMA患者由来皮膚細胞からヒトiPS細胞が作製されました⁷⁾。SMA患者由来iPS細胞においては、細胞移植治療へ

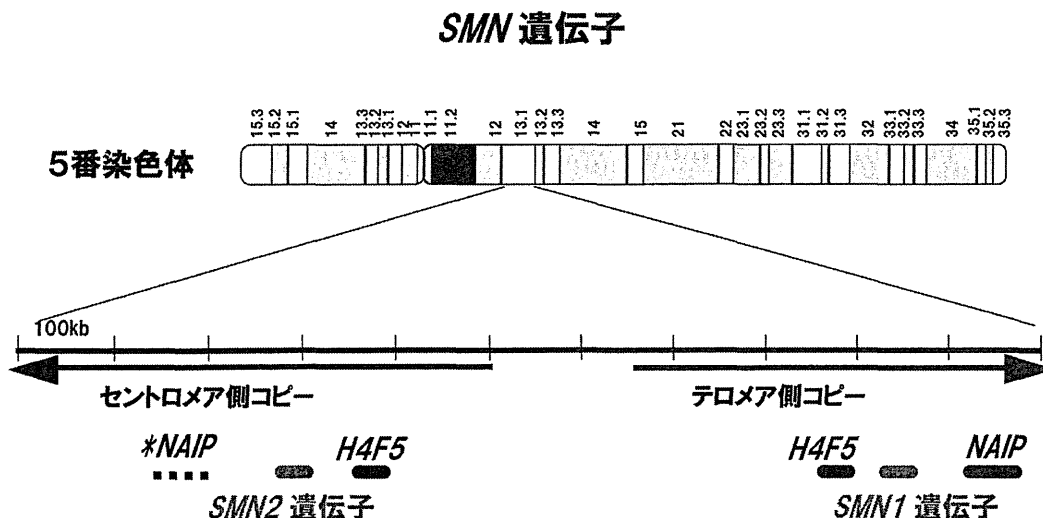


図2

の応用が期待されることに加え、SMAの病態を再現できるモデル作製につながる可能性が広がりました。疾患モデルの作製により、病態を解明する研究や薬物スクリーニングへの寄与が期待されています。

SMAにおけるロボットスーツHAL (hybrid assistive limb)の使用についての検討も進行中です。HALは装着者の運動意図を基にしてリアルタイムに四肢の運動機能を増強する機能を持つ装着型ロボットです。神経・筋難病患者さんが希少性神経・筋難病疾患に対して開発された下肢装着型ロボットであるHAL神経・筋難病下肢用モデルを定期的、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制されると考えられています⁹⁾。現在、医師主導治験の準備が進められています。

欧米では、神経保護剤のOlesoxime、RNAプロセシング酵素阻害剤のRG3039、アンチセンス・オリゴヌクレオチド製剤のISIS-SMNRx等の治験が公表されています。更に詳しい国際的な治験の情報については、アメリカ合衆国のThe U.S. National Institutes of healthが提供しているClinical Trials.gov (<http://clinicaltrials.gov/>)に掲載されています。

6. SMA (脊髄性筋萎縮症) 家族の会

SMAの患者さんを取りまく環境を快いものにして、共に支えあう場をもつために、1999年に、

「SMA (脊髄性筋萎縮症) 家族の会」 (<http://www.sma.gr.jp/>) が発足されました。現在、会員数は約300世帯にのぼり、全国レベルでの活動をしています。ホームページや機関誌の発行を通じて関連情報を発信し、定例会の開催やメーリングリストを通じて知識の共有などが行われています。

おわりに

臨床現場では患者さんの治療への熱意が高く、患者さんやご家族に説明の上、それぞれの医師の裁量でバルプロ酸ナトリウムやTRHなどの薬剤が投与されることがあります。しかし、これらの薬剤の健康保険の対象疾患としてSMAが認められているわけではありません。そして、薬剤の投与方法や評価基準が統一されていないために、薬剤の効果を正確に評価することは困難です。できるだけ早く、承認を受けたSMA治療薬を届けるためには、日本におい

ても治験を進めていく必要があります。

有効な治験を行うためにも、患者さんの臨床情報、遺伝子情報を合わせた調査研究を行うことは重要な課題となっています。これらの課題を解決する目的で、現在、「脊髄性筋萎縮症患者登録システム」の構築および、多施設間で統一した運動機能評価法の導入について、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」の研究者を中心に、検討を進めています

(<http://plaza.umin.ac.jp/~SMART/>)。今後、研究や治験への参加など、治療法開発の発展のために患者さんにご協力いただく機会が多くなってくこととします。

本年3月に、SMAの患者さんを診察する医療施設が、高い水準で診療できること、また根本治療を目指す研究の発展について、患者さん、ご家族、医療関係者が情報を共有することを目的として、「脊髄性筋萎縮症診療マニュアル」を発刊いたしました⁹⁾。疾患の基本知識から、ケア、治療研究などが網羅されたものとなっておりますので、是非、参考にして下さい。

謝辞 本原稿の一部の内容は、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」(研究代表者 斎藤加代子)および、文部科学省科グローバルCOEプログラム「再生医療本格化のための集学的教育研究拠点」の一環として実施したものです。

文献

- 1) Lefebvre S et al : Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80 : 155-165, 1995
- 2) Kissel JT et al : SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-Carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy. *PLoS One* 6 : e21296, 2011
- 3) Foust KD et al : Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 28 : 271-274, 2010
- 4) Merlini L et al : Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study. *J Child Neurol* 18 : 537-541, 2003
- 5) Russman BS et al : A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* 60 : 1601-1603, 2003
- 6) Takeuchi Y et al : Efficacy of thyrotropin-releasing hormone in the treatment of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 9 : 287-289, 1994
- 7) Ebert AD et al : Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457 : 277-280, 2009
- 8) 中島孝 : 神経・筋難病患者が装着するロボットスーツHALの医学応用に向けた進捗、期待される臨床効果. *保険医療科学* 60 : 130-137, 2011
- 9) SMA診療マニュアル編集委員会編: 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル. 金芳堂, 2012.5

Original article

Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of *MYOD1*

Yoshika Akizawa^{a,b}, Hitoshi Kanno^{a,c}, Yayoi Kawamichi^b, Yoshio Matsuda^b, Hiroaki Ohta^d, Hisaichi Fujii^c, Hideo Matsui^b, Kayoko Saito^{a,*}

^a Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

^b Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

^c Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

^d Sanno Medical Center, International University of Health and Welfare, Japan

Received 15 December 2011; received in revised form 12 May 2012; accepted 21 May 2012

Abstract

Objectives: Mesenchymal stem cells are expected to be an ideal cell source for cellular and gene therapy. We previously showed that cells derived from the human placenta can be induced to differentiate into myotubes *in vitro* and to express dystrophin in mdx/scid mice *in vivo*. In this study, we examined whether amnion-derived cells can be efficiently transduced and differentiated using lentiviral vectors carrying human *MYOD1*. **Methods:** The amnion-derived cells were isolated from human preterm placentas. They were transduced with the *MYOD1* vector, and mRNA levels for *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MYH2* and *DMD* were determined by quantitative-reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and also examined immunocytochemically. **Results:** Approximately 70% of amnion-derived cells were efficiently transduced by the lentiviral vectors. *MYOD1* activates *MYF5* and *MYOG*, *MYH2* and *DMD* after a 7-day culture. The concerted upregulations of these myogenic regulatory factors enhanced *MYH2* and *DMD* expressions. *PAX7* was below the detectable level. Both myosin heavy chain and dystrophin were demonstrated by immunocytochemistry. **Conclusions:** *MYOD1* activates *MYF5* and *MYOG*, the transcription factor genes essential for myogenic differentiation, and the concerted upregulation of these myogenic regulatory factors enhanced *MYH2* and *DMD* expressions. The amniotic membrane is an immune-privileged tissue, making *MYOD1*-transduced amnion-derived cells an ideal cell source for cellular and gene therapy for muscle disorders. This is the first report showing that amnion-derived cells can be modified by exogenous genes using lentiviral vectors. Furthermore, *MYOD1*-transduced amnion-derived cells are capable of the dystrophin expression necessary for myogenic differentiation.

© 2012 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; Mesenchymal stem cell; Cellular therapy; Gene therapy; Dystrophin; Placenta

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (OMIM# 310200) is an X-linked recessive inherited disorder that affects 1 in 3500 males. The onset of Duchenne muscular dystrophy usually before the age of 3 years, and patients die of respiratory failure around the age of 20 [1]. Duchenne muscular dystrophy caused by structural mutations in

* Corresponding author. Address: Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, 10-22 Kawada-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-0054, Japan. Tel.: +81 3 3353 8111; fax: +81 3 5269 7689.

E-mail address: saito@img.twmu.ac.jp (K. Saito).

the dystrophin gene (*DMD*), which encodes dystrophin, a large membrane-associated protein that plays an important role in linking intracellular cytoskeletal actin filaments to the sarcolemmal membrane [2]. Approximately 60% of *DMD* mutations are large deletions or insertions, whereas 40% are nonsense, missense, or small insertion-deletion mutations.

No curative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy currently exist. However, cell-based treatments in addition to gene therapy [3], exon skipping therapy [4], and read-through therapy with aminoglycosides [5] remain promising options.

Mesenchymal stem cells (MSC) are expected to be an ideal cell source for cellular and gene therapy because they can easily be obtained from bone marrow, adipose tissues, and the placenta, they are abundant and non-tumorigenic, and they have the useful characteristics of homing and chemokine secretion. MSC are already utilized for the treatment of graft versus host disease [6] and inflammatory bowel disease [7]. Several laboratories have shown that MSC can be obtained from amnion-derived cells and induced to differentiate into myocytes [8].

Although the myogenic differentiation of MSC can be induced by treating them with demethylating agents such as 5-azacythidine (5AZA), there is no marked enhancement of either *MYOD1*, the human myogenic differentiation factor 1 gene, or *MYH2* expression, nor does 5AZA treatment substantially increase the myogenic differentiation of MSC [9]. In addition, there have been several attempts to enhance the myogenesis by introducing *MYOD1* into cells [10]. It was recently shown that human adipose-derived cells displayed enhanced myogenic differentiation after being forced to express *MYOD1* [11], and another group showed that forced expression of *MYOD1* led to the trans-differentiation of human fibroblasts into myotubes [12].

In this study, we introduced human *MYOD1* into amnion-derived cells using a lentiviral vector and examined the precise gene expression levels of *MYF5*, *MYOG*, *MYH2* and *DMD*. We demonstrated significant upregulations of the genes for essential transcription factors involved in myogenesis. The potential applications of *MYOD1*-transduced amnion-derived cells are also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of human amnion-derived cells

Ethics approval for the tissue collection was granted by the Institutional Review Board of Tokyo Women's Medical University, Japan. Written informed consent was obtained prior to sample collection. Amnion tissue samples were obtained from normal full-term pregnancies at the time of caesarean section before the onset

of labor. None of these pregnancies were complicated by premature membrane rupture or chorioamnionitis. The placentas were processed within 24 h of collection; i.e., they were thoroughly washed with phosphate-buffered saline (a solution containing sodium chloride, sodium phosphate, potassium chloride and potassium phosphate), and, after separation from the placentas, the amnions were minced into 5 mm sections using knives on a clean bench. The amnion tissue was placed in collagen I coated dishes (Iwaki, Japan), and after 20 min, Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM, Lonza, USA) was carefully poured onto the attached cells, which were then maintained at 37 °C in 5% CO₂. After 48 h, the non-adherent cells were removed, and the medium was changed twice a week. After about one week, a few colonies were found in the dishes. At 70–80% confluence, the amnion-derived cells were harvested with 0.5% Trypsin–EDTA (Life Sciences, USA) and plated onto new dishes. Cells were processed from 24 placentas, and primary cultures from 8 placentas were used for this study.

2.2. Flowcytometric analysis

The amnion-derived cells were used for fluorescent activated cell sorting (FACS) analysis employing the EPICS ALTRA XL-MCL analyzer (Beckman Coulter, USA), and the data were analyzed with EXPO™32 ADC software (Beckman Coulter). Antibodies against human CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD105, CD166, HLA-ABC, and HLA-DR were obtained from Beckman Coulter and BD Biosciences Pharmingen (USA), AbD Serotec (UK) and Cytognos (Spain).

2.3. Production of lentiviral vectors and *MYOD1* transduction of human amnion-derived cells

A full-length human *MYOD1* cDNA clone (Genome Network Project Clone, WW01A62C23) was provided by the RIKEN Bioresource Center (Ibaraki, Japan) through the National Bio-Resource Project of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) of Japan [13–16]. A lentiviral vector carrying the *MYOD1* cDNA, pLenti6/human*MYOD1*, was constructed using the pLenti6/Ubc/V5-DEST Gateway Vector kit and the ViraPower Lentiviral Expression System (Life Technologies, USA). A GFP expression vector, pRRL.PPT.SF.IRES-GFP, was kindly provided by Taiju Utsugisawa.

Three micrograms of the purified pLenti6/Ubc/V5-DEST – human*MYOD1* cDNA and pRRL.PPT.SF.IRES-GFP were used for the transfection of 4×10^6 293FT cells together with Lipofectamine 2000 (provided with the kit) reagent and ViraPower packaging Mix (provided with the kit). After 48 h, the supernatant

was collected. Eight milliliters of viral supernatant were added to $6\text{--}8 \times 10^5$ amnion-derived cells. To examine the transfection efficiency of our procedure, the GFP expression of the cells was analyzed by FACS.

2.4. *In vitro* myogenesis

The amnion-derived cells were transduced with the pLenti6/UbC/V5-DEST – human *MYOD1* supernatant and seeded onto collagen I coated cell culture dishes (IWAKI) at a density of 1×10^4 per ml in growth medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 20% fetal bovine serum) for 24 h. The cell cultures were then washed twice with phosphate-buffered saline (–), and maintained in differentiation medium (DMEM supplemented with 2% horse serum (Iwaki, Japan)). The medium was changed twice a week until completion of the experiment.

2.5. Quantitative-reverse transcriptase-polymerase chain reaction using *MYOD1*-transduced amnion-derived cells

Total RNA was purified from the *MYOD1*-transduced amnion-derived cells using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany) at 7 and 14 days after transduction. Two micrograms of total RNA were subjected to reverse-transcription using Expand Reverse Transcriptase (Roche, USA). The gene expression levels of *MYOD1*, *MYF5*, *PAX7*, *MYOG*, *MYH2*, and *DMD* were analyzed using the quantitative-reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Q-RT-PCR), the primers listed in Supplementary Table 1, and Mx3000™ (Stratagene, USA). The non-transduced amnion-derived cells were designated the day 0 cells. Q-RT-PCR was performed at 95 °C for 10 min for 45 cycles, with each cycle consisting of 95 °C for 15 s, followed by treatment at 60 °C for 60seconds after completion of the last cycle. Relative gene expression levels were calculated using RNA extracted from normal human skeletal muscle myoblast cells (Lonza), which had been cultured for

4–5 days using the SkGM-2 BulletKit (Lonza) or for 7 days in total DMEM supplemented with 2% horse serum as a myoblast control [17].

2.6. Immunocytochemical analysis

The cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with either a mouse anti-human dystrophin IgG1 monoclonal antibody (NCL-DYS2, Novocastra, UK) or a mouse anti-myosin heavy chain IgG2 monoclonal antibody (MF-20, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA). The cells were visualized with appropriate AlexaFluor488 goat anti-mouse IgG secondary antibodies (Invitrogen, USA). Total cell nuclei were stained with Hoechst solution (Sigma Aldrich, UK).

3. Results

3.1. Morphology of the amnion-derived cells

We isolated amnion-derived cells from placentas, and a large number of primary cells were successfully obtained. These cells consisted of small fibroblast-like and cobblestone-like cells (Fig. 1a), and after 3 passages, they had formed a homogeneous population of the fibroblast-like cells (Fig. 1b). The yield was approximately 2×10^7 cells per gram of amnion tissue after three weeks.

3.2. Surface markers of amnion-derived cells

The surface marker expressions of amnion-derived cells were evaluated by flowcytometric analysis (Fig. 2). After 3 passages, the amnion-derived cells were positive for CD29, CD44, CD73, CD105, CD166, and HLA-ABC. However, they did not express any hematopoietic lineage markers such as CD34, CD14, CD45 or HLA-DR.

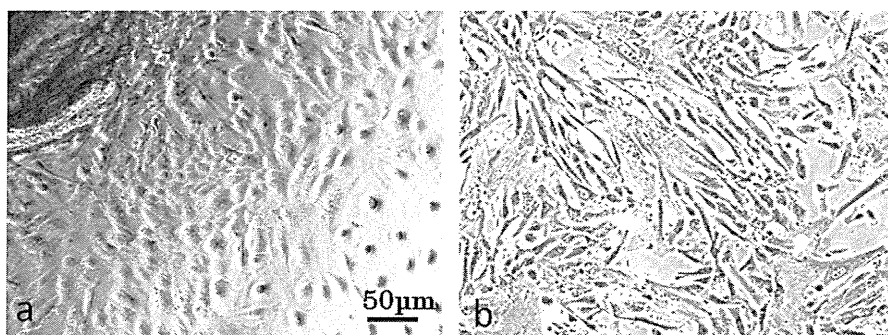


Fig. 1. Photomicrographs of amnion-derived cells in primary cultures in which two cell types, cobblestone- and fibroblast-like cells, can be seen (a). After three passages, the cells had formed a homogeneous population of fibroblast-like cells (b). Scale bar: 50 μm .

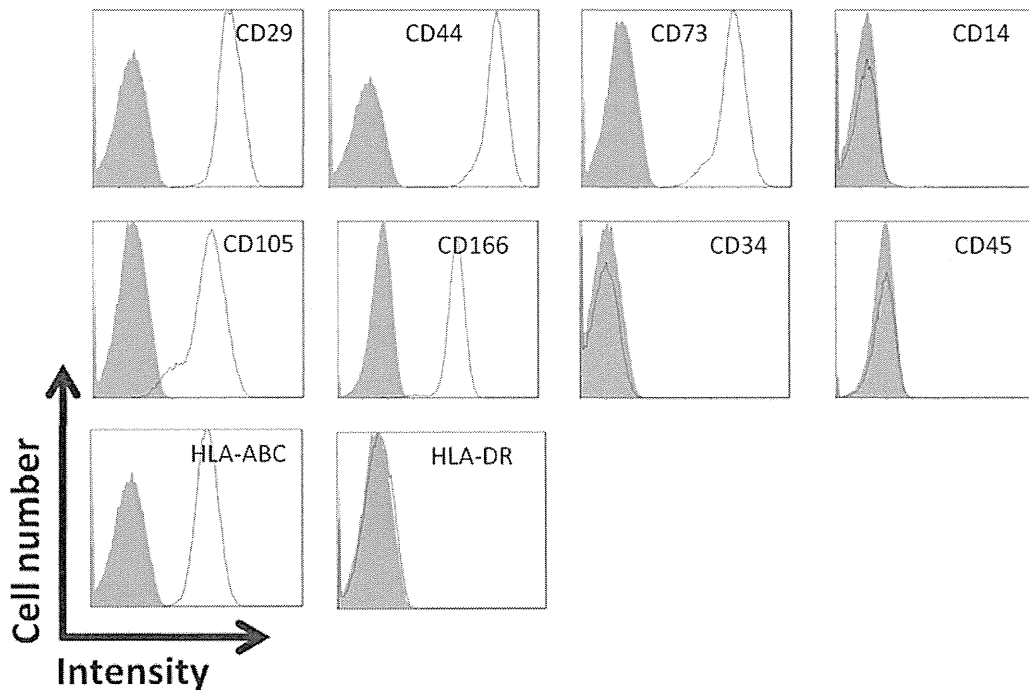


Fig. 2. Surface marker expressions of amnion-derived cells were evaluated by flowcytometric analysis after 3 passages. They expressed the following MSC markers: CD29, CD44, CD73, CD105 CD166, and HLA-ABC. However, they did not express any hematopoietic lineage markers such as CD34, CD14, CD45, or HLA-DR.

3.3. Transduction of amnion-derived cells with a GFP vector

The amnion-derived cells were transduced with a GFP vector, and the transduction efficiency of our procedure was evaluated by flowcytometric analysis after 72 h. In each experiment, approximately 70–80% of amnion-derived cells were positive for GFP (data not shown).

3.4. Q-RT-PCR of *MYOD1* transduced amnion-derived cells

The mRNA levels of *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *PAX7*, *MYH2*, and *DMD* in the *MYOD1*-transduced amnion-derived cells were determined by Q-RT-PCR. Forced expression of human *MYOD1* in amnion-derived cells markedly enhanced their *MYF5* and *MYOG* gene expression levels after 7 days of culture (Fig. 3). On day 7, the *MYOD1* mRNA level of these cells was increased 50-fold as compared to that observed on day 0. The mRNA level corresponded to 4.8% of that in the control myoblasts. On day 14, the *MYOD1* mRNA level had decreased to 1.1% of that in the controls, suggesting that the enhanced *MYOD1* mRNA expression was transient.

It should be noted that *MYF5* gene expression was highly upregulated in the *MYOD1*-transduced amnion-

derived cells. On day 7, it was increased by over 500-fold, and the relative mRNA level had reached 5.6% of that in control myoblasts. However, on day 14, the *MYF5* expression of these cells had been almost completely abrogated.

The *MYOG* mRNA level in the amnion-derived cells was extremely low (0.02%) on day 0. On day 7, it had reached 0.125% of that in the control myoblasts, but was undetectable by day 14.

On days 7 and 14 the mRNA levels of *MYH2* were 0.11% and 0.33% and those of *DMD* were 20% and 28%, respectively, of corresponding levels in the control cells. These results suggest that genes encoding skeletal muscle proteins were activated following the concerted activation of myogenic regulatory factors such as *MYOD1*, *MYF5*, and *MYOG*. On the other hand, the level of *PAX7* was not measurable in either the non-transduced or transduced amnion-derived cells (data not shown).

3.5. Immunocytochemistry of myogenic differentiated cells

The *MYOD1*-transduced amnion-derived cells were subjected to immunocytochemical analysis after a 28-day culture in differentiation medium. Both myosin heavy chain 2 and dystrophin were immunologically detected in their cytosol and nuclei, suggesting these cells to be capable of differentiating into myotubes (Fig. 4).

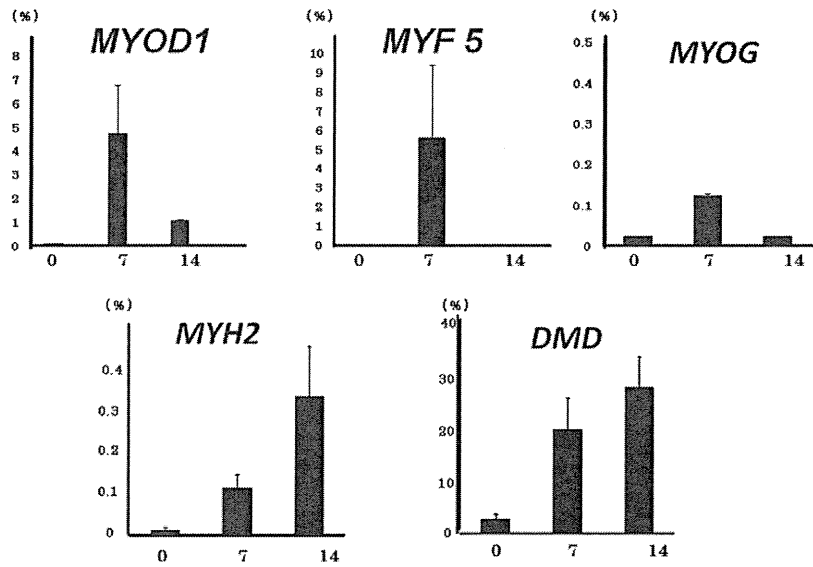


Fig. 3. The mRNA levels of *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *PAX7*, *MYH2*, and *DMD* in the *MYOD1* transduced amnion-derived cells were determined by Q-RT-PCR using the Universal Probe Library system (Roche). Relative gene expression levels were calculated using normal human skeletal muscle myoblast cells (Lonza) as a control. Day 0 represents the mRNA level of the amnion-derived cells on the day of transduction. Days 7 and 14 represent the mRNA levels of the *MYOD1*-transduced amnion-derived cells. The mRNA levels of the cells were as follows: *MYOD1*, $0.10 \pm 0.05\%$, $4.8 \pm 2.0\%$, and $1.09 \pm 0.07\%$; *MYF5*, $0.013 \pm 0.001\%$, $5.6 \pm 3.8\%$, and $< 0.0025\%$; *MYOG*, $\leq 0.00\%$, $0.13 \pm 0.01\%$, and $< 0.0025\%$; *MYH2*, $0.01 \pm 0.001\%$, $0.11 \pm 0.03\%$, and $0.33 \pm 0.12\%$; and *DMD*, $2.8 \pm 1.0\%$, $20 \pm 6.0\%$, and $28 \pm 6.0\%$. The mRNA levels of the *MYOD1*-transduced amnion-derived cells were markedly upregulated, as shown in the figure; however, *PAX7* was not detected in either the untreated or the transduced amnion-derived cells.

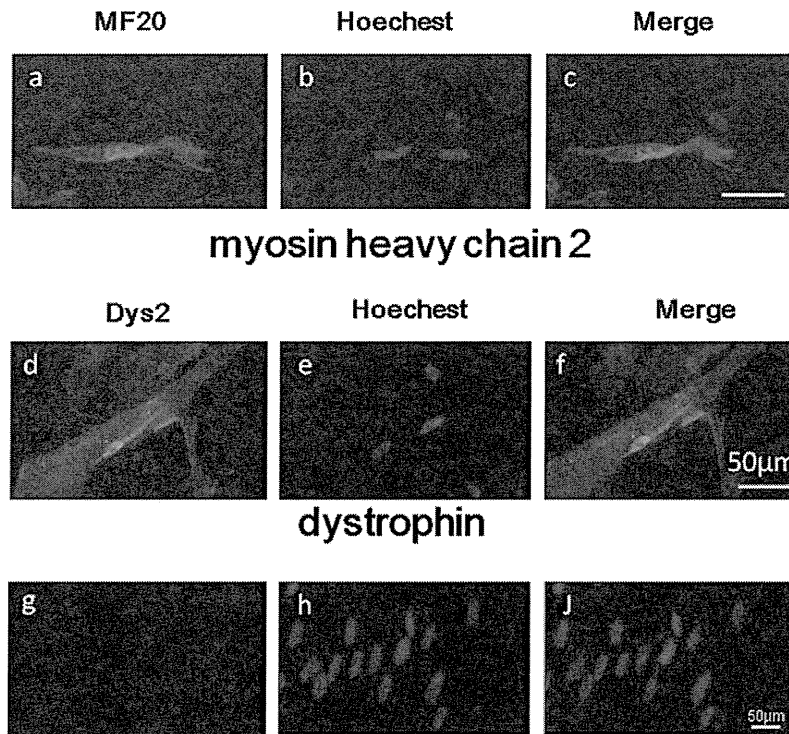


Fig. 4. Expressions of muscle specific genes during the differentiation of amnion-derived cells. *MYOD1*-transduced amnion-derived cells were cultured in differentiation medium for 28 days and stained using immunohistochemical methods. (a) Myosin heavy chain molecule (green, MF20); (b) nuclei (blue, Hoechst); (c) merged image of a and b; (d) dystrophin molecule (green, Dys2); (e) nuclei (blue, Hoechst); (f), merged image of d and e; The untreated amnion-derived cells expressed neither myosin heavy chain (g–h) nor dystrophin (data not shown). Scale bars: 50 μm .

4. Discussion

Myogenesis is classified into two modes, skeletal myogenic differentiation during development and regeneration mediated through satellite cells after injury. Previous studies have revealed that several transcription factors are essential for regulating embryonic and adult muscle formation. Among these factors, MyoD, Myf5, and myogenin are considered to be master transcription factors that are essential for myogenesis and are known as myogenic regulatory factors [18]. During myogenesis, *MYOD1* and *MYF5* are able to functionally substitute for one another [19]. In contrast, MyoD and Myf5 have distinct functions in the processes involved in recovery from muscle injury: MyoD is indispensable for the commitment of satellite cells to become myogenic precursor cells, and Myf5 plays an important role in myoblast proliferation [20]. On the other hand, myogenin is important for terminal muscle differentiation and lineage maintenance [21]. In this study, we clearly showed *MYOD1* transduction to activate both *MYF5* and *MYOG*, leading to myogenic differentiation resembling the developmental stages between myogenic progenitors and myoblasts. It is still unclear whether the concerted activation of *MYF5* and *MYOG* is due to direct transactivation by MyoD. Nonetheless, sequential activation of myogenic differentiation factors subsequently increased the gene expression levels of *MYH2* and *DMD*. As a result, the myosin heavy chain2 and dystrophin were immunocytochemically detected, as shown in Fig. 4. However, we were unable to demonstrate the protein expression of *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, or *PAX7*, since examining the expressions of transcription factors by Western blotting or other immunological procedures is quite difficult.

Satellite cells, which are generated around myofibers during fetal development, express another transcription factor, Pax7. They are mitotically quiescent, but are activated in response to the stress induced by muscle injury [22]. Although the *MYOD1*-transduced amnion-derived cells did not display *PAX7* expression, the biological significance of this transcription factor remains obscure.

We previously demonstrated that human MSC transplanted into skeletal muscles of mdx mice successfully differentiated and fused with murine muscles, suggesting cellular therapy to be a promising strategy for Duchenne muscular dystrophy [23]. A previous report showed that dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins are co-localized to the nuclei of muscle cells. This result implies that allogenic *MYOD1*-transduced amnion-derived cells would be a useful tool for cellular therapy [24].

The amniotic membrane is an immuno-privileged tissue and has been used as a biological membrane for treating burns, injuries, and skin ulcers as well as for

corneal transplantation [25–27], and the transplantation of amniotic membrane-derived cells has been experimentally applied to the treatment of lung fibrosis [28]. Recently, a preclinical study reported their use for regenerative therapy targeting central nervous system tissues [29]. It is also known that the amniotic epithelium produces anti-inflammatory and growth factors that are beneficial for the treatment of inflammatory corneal diseases [30]. Taken together, these observations explain the increasing attention that the human amniotic membrane has received due to its anti-scarring, anti-inflammatory, and wound-healing properties, as well as its multipotent differentiation ability and immunomodulatory features [31].

In conclusion, the placenta has several advantages as the cellular source for devising novel cellular and gene therapies, especially for muscle disorders. The placenta can be obtained non-invasively, the amniotic membrane has been shown to be an immune-privileged tissue and *MYOD1*-transduced amnion-derived cells are capable of the dystrophin expression needed for myogenic differentiation.

Acknowledgements

We thank Ms. Takako Aoki for her excellent technical assistance. This work was supported by a Research Grant (20B-13-03) for Nervous and Mental Disorders from the Ministry of Health, Labor, and Welfare and Grants-in-Aid from the Research Committee of Spinal Muscular Atrophy (SMA) and the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. We would like to express our sincere thanks to Prof. Sumio Sugano of the University of Tokyo, Dr. Yoshihide Hayashizaki of RIKEN Omics Science Center, and the Research Association for Biotechnology for providing the *MYOD1* cDNA clone.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.012>.

References

- [1] Nowak K, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 2004;5:872–6.
- [2] Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 1993;3:283–91.
- [3] Wang B, Li J, Qiao C, Chen C, Hu P, Zhu X, et al. A canine minidystrophin is functional and therapeutic in mdx mice. *Gene Ther* 2008;15:1099–106.
- [4] Matsuo M, Masumura T, Nishio H, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, et al. Exon skipping during splicing of dystrophin

- mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. *J Clin Invest* 1991;87:2127–31.
- [5] Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999;104:375–81.
- [6] Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:804–11.
- [7] Ko IK, Kim BG, Awadallah A, Mikulan J, Lin P, Letterio JJ, et al. Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease. *Mol Ther* 2010;18:1365–72.
- [8] Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:664–73.
- [9] Drost AC, Weng S, Feil G, Schäfer J, Baumann S, Kanz L, et al. In vitro myogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for urethral sphincter muscle repair. *Ann NY Acad Sci* 2009;1176:135–43.
- [10] Lattanzi L, Salvatori G, Coletta M, Sonnino C, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *J Clin Invest* 1998;101:2119–28.
- [11] Goudenege S, Pisani DF, Wdziekonski B, Di Santo JP, Bagnis C, Dani C, et al. Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol Ther* 2009;17:1064–72.
- [12] Cooper ST, Kizana E, Yates JD, Lo HP, Yang N, Wu ZH, et al. Dystrophinopathy carrier determination and detection of protein deficiencies in muscular dystrophy using lentiviral MyoD-forced myogenesis. *Neuromuscul Disord* 2007;17:276–84.
- [13] Itoh M, Yasunishi A, Imamura K, Kanamori-Katayama M, Suzuki H, Suzuki M, et al. Constructing ORFeome resources with removable termination codons. *Biotechniques* 2006;41:44,46,48.
- [14] Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 2006;16:55–65.
- [15] Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004;36:40–5.
- [16] Otsuki T, Ota T, Nishikawa T, Hayashi K, Suzuki Y, Yamamoto J, et al. Signal sequence and keyword trap in silico for selection of full-length human cDNAs encoding secretion or membrane proteins from oligo-capped cDNA libraries. *DNA Res* 2005;12:117–26.
- [17] Godmann M, May E, Kimmins S. Epigenetic mechanisms regulate stem cell expressed genes Pou5f1 and Gfra1 in a male germ cell line. *PLoS One* 2010;5:e12727.
- [18] Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 1993;364:532–5.
- [19] Rudnicki MA, Schlegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993;75:1351–9.
- [20] Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 2003;4:497–507.
- [21] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, Kuang S. The molecular regulation of muscle stem cell function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008;73:323–31.
- [22] Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209–38.
- [23] Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, et al. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol* 2010;223:695–702.
- [24] González-Ramírez R, Morales-Lázaro SL, Tapia-Ramírez V, Mornet D, Cisneros B. Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *J Cell Biochem* 2008;105:735–45.
- [25] Bujang-Safawi E, Halim AS, Khoo TL, Dorai AA. Dried irradiated human amniotic membrane as a biological dressing for facial burns – a 7-year case series. *Burns* 2010;36:876–82.
- [26] Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2010;28:597–610.
- [27] Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2007;15:459–64.
- [28] Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, et al. Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 2009;18:405–22.
- [29] Chen Z, Tortella FC, Dave JR, Marshall VS, Clarke DL, Sing G, et al. Human amnion-derived multipotent progenitor cell treatment alleviates traumatic brain injury-induced axonal degeneration. *J Neurotrauma* 2009;26:1987–97.
- [30] Dekaris I, Gabrić N. Preparation and preservation of amniotic membrane. *Dev Ophthalmol* 2009;43:97–104.
- [31] Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci* 2007;105:215–28.

日本における脊髄性筋萎縮症の臨床実態調査

¹東京女子医科大学医学部小児科学（主任：大澤眞木子教授）²東京女子医科大学附属遺伝子医療センターイトウマ ユリ^{1,2}・ サイトウ カヨコ²・ オオサワ マキコ¹
伊藤万由里^{1,2}・ 斎藤加代子²・ 大澤眞木子¹

（受理 平成24年12月20日）

Clinical Epidemiological Investigation of Spinal Muscular Atrophy in Japan

Mayuri ITO^{1,2}, Kayoko SAITO² and Makiko OSAWA¹¹Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University School of Medicine²Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University

No clinical epidemiological investigations of spinal muscular atrophy (SMA) have been carried out in Japan. We performed a population-based study of SMA to survey the number of patients visiting the departments of pediatrics and internal medicine and to clarify clinical features. Simultaneously, we studied the clinical features and laboratory findings of 110 individuals from whom informed consent had been obtained. The number of patients visiting the hospital was estimated to be 0.5-1 per 100,000 people. The male to female ratio was 1 to 1.14. As to the maximum motor functional level, severity varied among SMA subtypes. Eighty-seven percent of patients with type I demonstrated poor head control. More than half of type II patients could sit unsupported at the same point. All patients with type III were able to walk. Patients with all types of SMA showed the same pattern of muscle weakness, with proximal and upper limb dominance. However, there were some patients showing atypical symptoms. Although most SMA patients have homozygous deletion of *SMN1*, the range of clinical severities is broad. We will continue with additional study to elucidate the disease mechanisms in both typical SMA patients and atypical individuals.

Key Words: spinal muscular atrophy (SMA), clinical investigation, maximum motor functional level, muscle weakness, epidemiology

緒 言

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) は、脊髄前角細胞、脳神経核の変性・脱落により、進行性の神経原性筋萎縮を示す常染色体劣性遺伝性疾患である。1891年に Werdnig により最初の臨床例が報告されて以来、現在に至るまで病態解明のために様々な基礎研究が重ねられている。根本的な治療法はいまだに確立されていないが、各国で臨床研究が進められている。

SMA の臨床症状は多様であり、近年まで定義が統一されていなかった¹⁾²⁾。1992年、International SMA Consortium により、診断基準と分類が確立された³⁾。I型 (Werdnig-Hoffmann 病) は、生下時から

6ヵ月までの発症で坐位保持は不可能、人工呼吸管理をしなければ2歳までにほとんどが亡くなる重症型である。II型は、1歳6ヵ月頃までに発症し、起立または歩行が不可能であるが、2歳以降も生存可能な中間型とされている。III型は、小児期から成人期に発症し、歩行が可能な軽症型である。臨床的重症度は、それぞれの病型のなかでも多様性が認められ²⁾、III型は発症年齢により、IIIa型、IIIb型に分類されることもある⁴⁾。神経内科では、診断基準を満たす SMA のみならず、下位運動ニューロンが障害される病態を広く SMA として認識していることが多く、診断が曖昧であることもあった。成人発症で、進行は緩徐であり、呼吸障害や嚥下障害をほとんど

認めない例は脊髄性進行性筋萎縮症と診断していたが、国際的な分類に合わせて2009年より脊髄性筋萎縮症IV型とされた。わが国では、2009年に、厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）神経変性疾患に関する調査研究班において、SMAの認定基準が作成された⁵⁾。同年、特定疾患治療研究事業の対象疾患に指定されたことにより、SMAにおいて医療社会福祉的な環境は改善されつつある。

SMAは、ほぼ全身の臓器に存在する蛋白質であるsurvival motor neuron (SMN)蛋白質の欠損あるいは機能障害によって生じる。SMN蛋白質は*survival motor neuron (SMN) 遺伝子 (SMN1)*によりコードされており、主にSMN1の欠失によりSMAが発症する。SMN遺伝子(SMN1)は5番染色体長腕5q13にあり、向反性に重複したコピー遺伝子(SMN2)も存在する⁶⁾。また、SMN遺伝子の近傍には、*neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) 遺伝子*も存在し、重症度に関与するといわれている。SMAの遺伝子診断は、SMN1とSMN2のexon7とexon8の領域における塩基配列の5塩基の相違を利用して行われる⁷⁾。

欧米では、その発症頻度は約10,000出生に1人とされ、保因者頻度は約50人に1人といわれている。わが国においては、1978年に福山、大澤らが81家系101例について臨床遺伝学的研究を行ったが⁸⁾、それ以降、本格的な臨床調査は実施されることがなかった。我々は、SMAの特定疾患治療研究事業の対象疾患への認定を目標として、2003年に臨床調査を施行した。今回は、その結果に基づき、患者数、病型別の臨床症状、などについて分析したので報告する。

対象および方法

1. 推定患者数調査

東京女子医科大学倫理委員会の承認のもと、2003年に郵送によるアンケート方式で疫学調査を施行した。対象は、全国の国公立（当時）病院・療養所、大学病院、療育施設および無作為に抽出した全国の主要病院の小児科、内科または神経内科などで、総施設数は2,620であった。病床規模別にみた施設数は、500床以上は720、200~499床は1,455、199床以下は283、無床は162であった。一次調査として、まず、各施設における患者の有無を尋ねた。一次調査で返信のなかった医療機関へは、一次追加調査として同内容のアンケートを送付した。その結果を、橋本らの「難病の全国疫学調査に基づく患者数の区間推定」⁹⁾の方法に基づいて解析し、その時点でのわが

国における通院中の患者数を推定した。

2. 臨床症状調査

一次調査、または一次追加調査で「患者あり」と返信のあった施設（科）に対して、二次調査としてアンケート方式の質問票を郵送した。質問票には、臨床病型、診断方法、最高到達運動機能（生涯で獲得し得た最高の運動能力）、筋力低下の状態、筋線維束性収縮の有無、中枢神経障害の有無、遺伝子検査所見などの質問項目を設けた。遺伝子検査に関しては、SMN遺伝子およびNAIP遺伝子の欠失について調査した。最高到達運動機能は、大川らの「Werdnig-Hoffmann病における運動機能レベル」¹⁰⁾を用いて、0（定額不可能）、1（定額可能）、2（坐位保持可能）、3（坐位保持可能かつ、その場まわり可能）、4（坐位での移動可能）、5（立位保持可能）、6（介助ありで歩行可能）、7（介助なしで歩行可能）、8（介助なしで階段昇降可能）と評価した。さらに、国際SMA協会による診断基準³⁾では、筋力低下の特徴を左右対称・近位筋優位・下肢優位・体幹筋罹患としていることから、筋力低下の評価についてはこれらを質問項目に入れた。

結 果

1. 推定患者数調査

質問票の発送総数は2,620、返信数は888であり、無効（廃院、統合などにより返却）の数を除いて計算すると、回答率は34%となった。各施設から報告された患者総数は455例で、診療科別には、小児科365例、内科81例、整形外科5例、不明が4例であった。橋本らの「難病の全国疫学調査に基づく患者数の区間推定」の方法により、患者実数をもとにして、その時点での患者総数を求めた。対象の医療機関を病床数で分類して検討すると、2003年当時、通院中の国内の推定患者数は741~1,391人となった。総務省によると、2003年のわが国の総人口は127,619,000人であることから、SMAの患者数は100,000人当たり0.5~1人と概算できる。

2. 臨床症状調査

二次調査で報告された患者総数455例のうち、臨床調査の項目別アンケートの返信があった110例について検討した。病型別で分類すると、I型は39例、II型は46例、III型は21例、不明は4例であった。男女比は全体では1:1.14で、各臨床病型別ではI型が1:1.43、II型が1:1.14、III型が1:0.75であった。SMAの発症に男女差はないとされているが、今回の調査でも有意な差異は認めなかった。

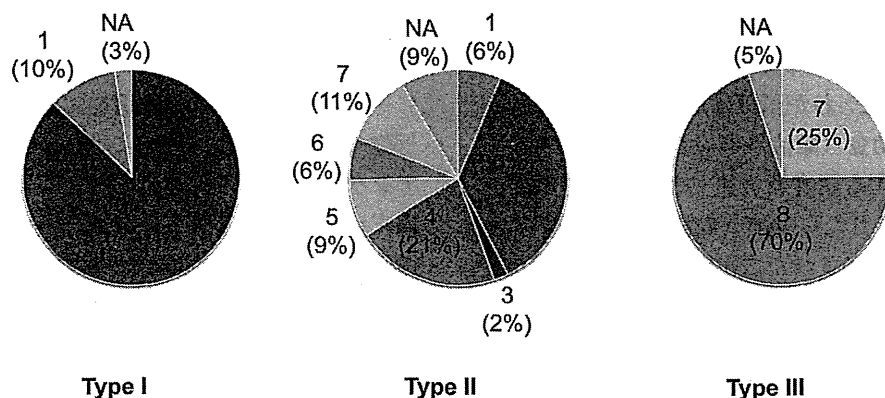


Figure Analysis of maximum motor functional level

The maximum motor functional level represents the patient's peak motor functional abilities. Motor functional level 0: designated as no head control, 1: head control feasible, 2: being able to sit, 3: being able to sit and turn on buttocks, 4: being able to shuffle on buttocks in sitting position, 5: standing with support, 6: walking with support, 7: walking unaided, 8: climbing up stairs without support. NA: (information) not available.

診断方法としては、遺伝子診断が64例(58%)、筋生検による病理診断が33例(30%)、電気生理学的診断が4例(4%)、臨床診断のみが2例(2%)、記載なしが6例であった。遺伝子診断は、72例(65%)において施行され、病型別では、I型は31例(74%)、II型は29例(63%)、III型は11例(52%)であり、診療科別では小児科においての実施が多かった。SMN遺伝子はI型の27例(遺伝子検査を施行したI型例の90%)、II型の24例(同II型例の86%)、III型の6例(同III型例の75%)に欠失を認めた。SMN遺伝子欠失例のうち、exon7,8欠失はI型で80%、II型で71%、また、exon7のみ欠失はI型で10%、II型で14%であった。NAIP遺伝子はI型の11例(37%)、II型の2例(7%)に欠失を認め、III型での欠失例はなかった。NAIP遺伝子欠失例は全例SMN遺伝子欠失を伴っていた。

最高到達運動機能についての結果をFigureに示す。I型では、定頸不可能例は34例(87%)、定頸可能例は4例(10%)であった。II型では、坐位保持可能まで到達した例が16例(36%)と最も多く、介助なしで歩行まで可能であった例は5例(11%)であった。III型では、介助なしで階段昇降まで可能であった例が15例(70%)と多数であり、歩行は全例で可能であった。

筋力低下の状態については、左右の対称性・遠近の優位性・上下肢の優位性・体幹筋罹患の有無を調査した。筋力低下が左右対称であるのは、I型で34例(87%)、II型で37例(80%)、III型で18例(86%)

に認めた。筋力低下が左右非対称であるのは、I型で4例(10%)、II型で9例(20%)、III型で3例(14%)に認めた。筋力低下が左右非対称で、かつ、SMN遺伝子欠失のある例は、I型で3例(8%)、II型で5例(11%)、III型で2例(10%)存在した。近位筋優位の筋力低下はI型では23例(59%)、II型では26例(57%)、III型では15例(71%)に認め、遠位筋優位の筋力低下はI型で2例(5%)、II型で5例(11%)、III型で4例(19%)存在した。I型、II型では遠近の優位性が不明瞭な例はともに30%程度認めた。遠位筋優位の筋力低下を認め、かつ、SMN遺伝子欠失のある例は、I型で2例(5%)存在した。II,III型で遠位筋優位の筋力低下を認めた例では、筋生検による病理診断で確定診断されていた。筋力低下が下肢優位か否かについても検討したところ、I型は17例(44%)、II型は23例(50%)、III型は13例(62%)と大多数が下肢優位であり、上肢優位の症例もI型で1例(3%)、II型で5例(11%)、III型で1例(5%)存在した。上肢優位の筋力低下を認め、かつ、SMN遺伝子欠失のある例は、I型で1例(3%)認めた。体幹筋罹患は、I型で37例(95%)、II型で42例(91%)、III型で12例(57%)に認めた。また、顔面筋の罹患は、I型で17例(44%)、II型で2例(4%)にみられた。顔面筋罹患のある例は、I型では全例、II型では1例が人工呼吸管理を受けていた。舌の筋線維束性収縮は、I型で28例(72%)、II型で25例(54%)、III型で2例(10%)に認められた。中枢神経系障害は、I型では8例(21%)に認

められ、低酸素性脳症1例、顔面神経麻痺1例、球麻痺1例、詳細不明が5例であった。II型では中枢神経系障害を1例(2%)に認めたが詳細は不明であり、III型では認められなかった。

考 察

SMAの発症頻度は、欧米では約10,000出生に1人とされ、保因者頻度は約50人に1人とされている¹¹⁾。2003年当時の総人口を基にして検討すると、わが国の推定患者数は100,000人当たり0.5~1人となった。今回の調査方法では、発症頻度や保因者頻度を算出するのは困難であったため、この結果は概算値にとどまる。諸外国から、発症率あるいは患者数が報告されているが^{12)~18)}、調査方法や対象は統一されておらず、数値にも若干の違いがある。民族による発症率の差はないとされてきたが、近年では、その差異を示唆する報告例も散見される。今後、新しい認定基準を踏まえた上で、再度、わが国における患者数調査を施行することは意義のあることと考える。

SMAの診断方法としては、今回の調査では遺伝子診断が58%、筋生検による病理診断が30%、電気生理学的診断が3.6%、臨床診断のみが1.8%という結果となり、遺伝子診断が多かった。これは、2003年当時の結果であり、2008年にSMN遺伝子検査が保険収載されたことを考慮すると、現在では遺伝子診断の比率はさらに増加しているものと考えられる。遺伝子検査は、確定診断をする上では必須であるが、臨床遺伝専門医による遺伝カウンセリングを行うことが望ましい。

診断基準を満たすSMAは、SMN遺伝子の欠失を認めることが多い。わが国では、I型の98%、II型の95%、IIIa型の52%、IIIb型の42%、IV型の15%にSMN遺伝子欠失を認めている¹⁹⁾。本調査では、I型の90%、II型の86%、III型の75%にSMN遺伝子の欠失を認めた。前述のSMN遺伝子欠失率より、I、II型の欠失率が低いのは、各施設におけるSMAの診断そのものが若干曖昧であった可能性も示唆される。NAIP遺伝子はI型の37%、II型の7%に欠失を認め、III型での欠失例はなかった。NAIP遺伝子欠失例は全例SMN遺伝子欠失を伴っていた。一般に、SMN遺伝子とその近傍遺伝子(NAIP遺伝子など)の欠失範囲が広いほど、重症であることも明らかになっている²⁰⁾。また、本調査において、SMN遺伝子exon7のみの欠失を認めた例は、I型では10%、II型では14%存在した。SMN遺伝子(SMN1)

exon7のみの欠失を認める例の中には、SMN1からコピー遺伝子であるSMN2への遺伝子変換を示す例も含まれる可能性もある。SMN1からSMN2への遺伝子変換を示す例では、臨床症状が軽症になる傾向もあることが示唆されている²¹⁾ことから、今回は未施行であるが、今後、このようなSMN遺伝子exon7のみの欠失を認めた例において更なる臨床像の分析を進めていくことは有意義である。

SMAの運動機能の評価法として、2003年の調査時は、大川らの「Werdnig-Hoffmann病における運動機能レベル」¹⁰⁾を用いた。このレベル0からレベル8までの分類により、病型別の大まかな臨床像をみることは可能である。今回の調査でも、各病型の最高到達運動機能を分析し、I型は坐位保持不可能、II型は起立または歩行が不可能、III型は歩行が可能、という診断基準にほぼ合致する結果を得た。現在では、評価者(医師や理学療法士など)による判定の相違を少なくするために、「Hammersmith運動機能評価スケール(Modified Hammersmith Functional Motor Scale)」²²⁾を用いてSMAの運動機能の評価することが試みられている。

SMAはその臨床病型の範囲が幅広く、前述のI型からIV型のほかに、胎児期発症の最重症例を0型とすることもある。SMN遺伝子欠失があっても非典型的な症状を示す例や、SMN遺伝子欠失(あるいは同定困難なSMN遺伝子変異)がなくてもほぼ典型的な症状を示す例も存在する²⁰⁾²²⁾。今回の調査において、筋力低下という臨床症状に限って検討しただけでも、SMN遺伝子欠失があり、かつ、上肢優位、あるいは、遠位筋優位の筋力低下を示す非典型例の存在も明らかとなった。これらの非典型例の存在からも、SMAの病態の複雑さが示唆される。

遺伝子検査では診断できず、臨床診断により確定する例は成人発症例に多い²³⁾。特定疾患治療研究事業の対象疾患としての認定を受けるためにも、臨床診断は非常に重要といえる。呼吸や嚥下機能障害、側弯症などの合併症へ早期に対応するためにも、早期診断は重要である。現在、SMAの治療法開発に向けて治験の開始準備も進められている。その一環として、希望者が罹患者リストに登録するシステムも構築されつつある。SMAおよびその周縁疾患の臨床像を分析することは非常に重要であり、今後も継続していく予定である。

結 論

2003年当時のわが国におけるSMAの推計通院