

II. 分担研究報告

脊髄性筋萎縮症における臨床的検討

臨床調査個人票の分析、患者登録システムの開始、運動機能評価スケールの導入

斎藤加代子 東京女子医科大学付属遺伝子医療センター 所長・教授

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（SMA）の臨床実態を明らかにするために、4都道府県の臨床調査個人票のデータベース化とその解析を行った。発症年齢はI型 6か月以内、II型 1歳6か月以内、III型 1歳6か月～20歳、IV型 20歳以上であった。医師主導治験・国際共同治験の開始を目指して、患者登録システムおよび運動機能評価スケールの導入を開始した。

共同研究者

荒川玲子、伊藤万由里、松尾真理、浦野真理
（東京女子医科大学付属遺伝子医療センター）

A. 研究目的

本研究班は、脊髄性筋萎縮症(SMA)の臨床実態、病態、発生機序の解明、そして根本治療法開発の基盤の確立を目標としている。臨床実態を明らかにするために、臨床調査個人票の分析を行い、医師主導治験・国際共同治験の開始を目指して、患者登録システムおよび運動機能評価スケールの導入を開始した。

B. 研究方法

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

2) 患者登録システムの開始：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。

3) 運動機能評価スケールの導入：2011年10月から2012年12月の間に東京女子医科大学付属遺伝子医療センターを受診したSMA患者延べ25人（II型13人、III型12人）にModified

Hammersmith Functional Motor Scale(MHfMS) score (表1)を用いて運動機能評価をおこなった。評価項目は、坐位から始まり、臥位と寝返り、立位、歩行の領域に分類し、全20項目をスコア0(全くできない)からスコア1、スコア2の40点満点で採点した。

	スコア2	スコア1	スコア0	スコア
1	床か椅子に坐位保持可、手の支持なし	片手の支持を要する	両手の支持が必要 / 坐位保持不可	
2	足を伸ばして坐位可能、手の支持なし	片手の支持を要する	両手の支持が必要 / 坐位保持不可	
3	坐位で片手を耳の高さに挙上(左右共)	頭を手の方に曲げる	不可能	
4	坐位で両手を耳の高さに挙げる	頭を手の方に曲げる	不可能	
5	坐位から臥位になる(安全に偶然でなく)		不可能	
6	仰臥位で頭をあげる	首が側屈してから頭部を挙上	不可能	
7	仰臥位から側臥位まで寝返り(左右共)	右か左のいずれかのみ可能	不可能	
8	右下にして腹臥位から仰臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
9	左下にして腹臥位から仰臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
10	右下にして仰臥位から腹臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
11	左下にして仰臥位から腹臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
12	腹臥位で頭を挙げる(両腕は膝に下げ)		不可能	
13	腹臥位で前腕を床につけて頭を挙げる	その姿勢にすれば保持	不可能	
14	腹臥位で腕を伸ばして頭を挙げる	その姿勢にすれば保持	不可能	
15	四つ這い姿勢をとる	その姿勢にすれば保持	不可能	
16	四つ這い移動をする	頭をあげれば四つ這い可能	不可能	
17	仰臥位から横向きになって坐位になる	腹臥位を寝れば可能	不可能	
18	片手の支持で立位可能	最小限の力で網を支えれば可能	膝や腰の支持が必要 / 不可能	
19	支持なしに立位保持可能(>3秒)	支持なしに立位保持可能(3秒間)	一瞬のみ立位保持可 / 不可能	
20	支持なく歩行(>4歩)	支持なしに2～4歩歩く	不可能	
			合計	点

(倫理面への配慮)

本研究の研究項目に関する倫理審査委員会の承認年月日

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：

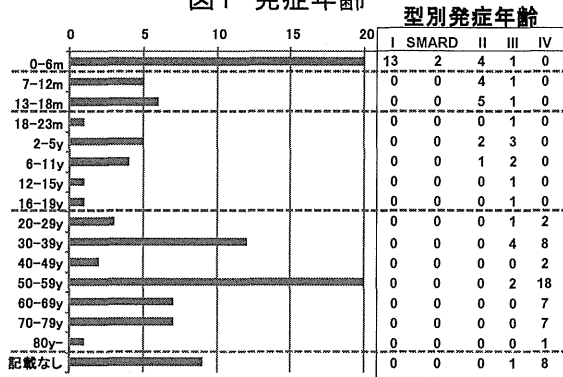
平成24年8月1日（承認番号2551）

C. 研究結果

1) 臨床調査個人票の分析：I型13例、II型16例、III型19例、IV型53例、その他(SMARD: SMA

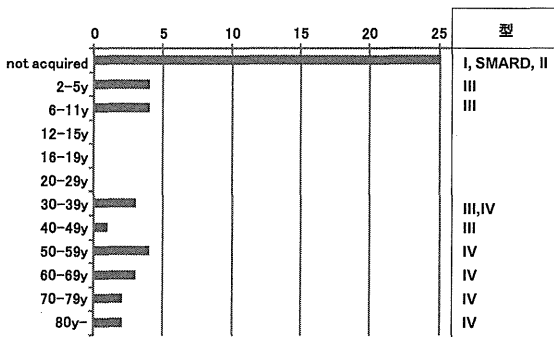
with respiratory distress 2例、遠位型1例)であった。

図1 発症年齢



年齢分布は0～9歳18例、10～19歳8例、20歳以上が78例であった。発症年齢はI型 生後6か月以内、II型 1歳6か月以内、III型 1歳6か月～20歳、IV型 20歳以上であった(図1)。歩行不可能になった年齢はIII型 2～49歳、IV型 50歳以上であった。経過は92%で進行性、うち75%は緩徐または極めて緩徐であった(図2)。

図2 歩行不可能になった年齢



初発症状は下肢筋力低下が70例、上肢筋力低下が61例に認められた。舌の線維束性収縮は29例に認められ、内訳はI、II型に各9例、III型2例、IV型6例であった。手指の振戦は50%にみられ、IV型に31例と多かった。呼吸不全は挿管・気管切開・人工呼吸管理は21例で実施され、I型13例全例、II型1例、III型1例、IV型4例、SMARD2例であった。運動機能分離では、起立位の保持が不可能なレベル6、7は各24、37例と半数以上を占めていた。

2) 患者登録システムの開始：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。事務局から研究の進捗等の情報を研究班 Web ページのみならず、登録者へニュースレターとして配信を開始する。

3) 運動機能評価スケールの導入：

MHFMS score は、SMARD II型では平均14.1点、III型では平均31.1点であった。期間中、2回の評価を行ったのは、II型は1人で、2歳7か月時に13点であり、5か月後の3歳2か月時点では18点であった。運動機能としては、足を伸ばしての坐位保持が、両手の支持が必要であった状況から、手の支持が不要になるなどの機能獲得を認めた。III型では2人に対して、2回の評価を行い、38点(4歳9か月)→40点(5歳3か月)、22点(12歳3か月)→21点(12歳10か月)であった。前者では支持なし歩行が不可能であった状態から、6か月後には5歩以上の歩行が可能となり、40点満点となった。後者では、仰臥位から腹臥位への寝返りが出来なくなった。

D. 考察

臨床調査個人票の抽出対象として、4都道府県とした。これら4都道府県の占める人口は2005年の人口調査によると日本の26.5%を占めている。従って、今回のパイロット調査は全国の約1/4の状態を表していると解釈できる。SMA患者104例について分析し、発症年齢はI型 生後6か月以内、II型 1歳6か月以内、III型 1歳6か月～20歳、IV型 20歳以上と結論できた。年齢分布は20歳未満が25%であった。起立位の保持が不可能な例が61例(59%)であり、挿管・気管切開・人工呼吸管理は21例(20%)で、その

うち 13 例が I 型であった。

平成 24 年 5 月に「脊髄性筋萎縮症診療マニュアル」を出版し、稀少性疾患である SMA の診療レベルの均霑化と向上をめざしている。また、患者主導で臨床情報と遺伝子情報を登録する患者登録システムを構築したことにより、患者と医療との繋がりが強化され、遺伝子変異型別の治療研究・臨床研究が推進される。

運動障害に対する経時的な経過の観察および治療効果判定に使用する方法は、反応性という側面を確保するために、機能レベルに合わせて選択する必要がある。MHFMS は歩行が困難となり、独坐が可能な SMAII 型、III 型の患者に対して、運動機能を評価するのに適している。

小児期の SMA 患者は、成長、発達に伴う運動機能の獲得と、病勢による筋力低下、運動機能喪失が同時に進行するため、運動機能評価の際には、本来の発達により期待される機能獲得について考慮する必要がある。そのためにも、多くの SMA 患者の運動機能の推移について自然歴を数値化しておくことは、今後、治療介入による効果を判定するために必要である。また、経時的に適正な評価を行うことは、適切な治療介入による生活の質の向上に寄与し、治療法開発の礎にもなると考えられる。

E. 結論

- 1) 4 都道府県の SMA 104 例について臨床調査個人票のデータベース化とその解析を行った。
- 2) 患者登録システムが開設でき、患者が自発的に登録をするシステムとして、家族会との連携の下に、今後の SMA の臨床実態の把握のための基盤ができた。
- 3) MHFMS を用いて SMA 患者について運動機能の数値化を行った。MHFMS は歩行が困難となり、独坐が可能な SMAII 型、III 型の患者に対して、運動機能を評価するのに適している。引き続き、自然歴についての検討を重ねていくことにより、

治療介入による運動機能への影響について、評価する際の指標になりえると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 斎藤加代子、伊藤万由里、荒川玲子. 脊髄性筋萎縮症. J Clin Rehabil. 2010;19(6):601-606
- 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) 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、荒川玲子. ウェルドニッヒ・ホフマン病. 症候群ハンドブック 2011;72-73. 中山書店
- 6) 斎藤加代子他. 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル. 2012. 金芳堂
- 7) 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) 岡本健太郎、斎藤加代子、佐藤孝俊、石垣景子、舟塚真. 脊髄性筋萎縮症 0 型の 1 例. 第 52 回日本小児神経学会総会 2010.5-20-22. 福岡
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

5) 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

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

(資料)

Modified Hammersmith functional motor scale for children with SMA, 2012

OPD No. _____

氏名 _____

生年月日 _____

評価者氏名 _____

評価日: _____

	スコア 2	スコア 1	スコア 0	スコア
1	床か椅子に坐位保持可、手の支持なし	片手の支持を要する	両手の支持が必要 / 坐位保持不可	
2	足を伸ばして坐位可能、手の支持なし	片手の支持を要する	両手の支持が必要 / 坐位保持不可	
3	坐位で片手を耳の高さに挙上(左右共)	頭を手の方に曲げる	不可能	
4	坐位で両手を耳の高さに挙げる	頭を手の方に曲げる	不可能	
5	坐位から臥位になる(安全に偶然でなく)		不可能	
6	仰臥位で頭をあげる	首が側屈をしてから頭部を挙上	不可能	
7	仰臥位から側臥位まで寝返り(左右共)	右か左のいずれかのみ可能	不可能	
8	右下にして仰臥位から腹臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
9	左下にして仰臥位から腹臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
10	腹臥位で頭を挙げる(両腕は脇に下げ)		不可能	
11	腹臥位で前腕を床につけ頭を挙げる	その姿勢にすれば保持	不可能	
12	腹臥位で腕を伸ばして頭を挙げる	その姿勢にすれば保持	不可能	
13	四つ這い姿勢をとる	その姿勢にすれば保持	不可能	
14	四つ這い移動をする	頭をあげれば四つ這い可能	不可能	
15	右下にして腹臥位から仰臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
16	左下にして腹臥位から仰臥位に寝返り	腕の力を利用すれば可能	不可能	
17	仰臥位から横向きになって坐位になる	腹臥位を経れば可能	不可能	
18	片手の支持で立位可能	最小限の力で胴を支えれば可能	膝や腰の支持が必要 / 不可能	
19	支持なしに立位保持可能 (>3秒)	支持なしに立位保持可能 (3秒間)	一瞬のみ立位保持可 / 不可能	
20	支持なく歩行 (>4歩)	支持なしに2~4歩歩く	不可能	

計 点

脊髄性筋萎縮症の分子遺伝学的検討および *in vitro* 治療開発モデルの作製 齋藤加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長・教授

研究要旨

脊髄性筋萎縮症 (SMA) の診断、病態解明、治療法確立に向け、従来の方法では遺伝子診断のつかない SMA 症例についての遺伝子解析および、SMA 患者由来細胞を用いた *in vitro* 治療開発モデルの作製を行った。

臨床症状から SMA と診断されたが survival motor neuron1 (*SMN1*) 遺伝子欠失を認めない症例について、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法と Direct sequencing 法を用いて *SMN1* 遺伝子解析を行い、従来の Targeted mutation analysis 法 (PCR 法) では欠失が同定できない症例においても遺伝子診断が可能となった。*SMN1* 遺伝子の変異を示さない症例に対しては、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い新規原因遺伝子検索を施行中である。

SMA 患者由来細胞 *in vitro* 治療開発モデルは、薬物治療法の確立を目的とし、患者由来皮膚線維芽細胞、妊娠初期絨毛細胞、EB transform B 細胞を作製した。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。さらに正常妊娠初期絨毛細胞、早産胎盤由来細胞は、成熟筋管細胞に分化する幹細胞を含むことを明らかにし、SMA における萎縮筋への細胞治療の可能性を示唆した。

共同研究者

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

近藤恵里（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

秋澤叔香（東京女子医科大学産婦人科学講座、同 附属遺伝子医療センター）

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）

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、*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。また、上記検証を行っても診断が確定しない場合には、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMA を引き起こす新規原因遺伝子を同定することを目的とした (図

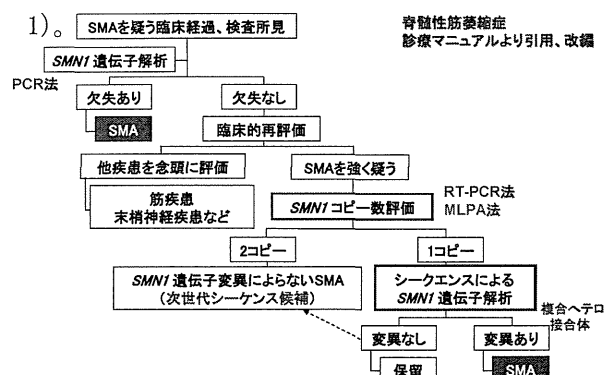


図1 診断の流れ

また根本治療のない 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、出生前の遺伝子診断目的に採取される妊娠初期絨毛細胞、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。さらに細胞移植治療を指向した基礎研究として妊娠初期絨毛細胞、早産胎盤由来細胞の特性評価および骨格筋分化能を検討する。

B. 研究方法

1. *SMN1* 遺伝子解析

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 *SMN1* 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。

2. 次世代シーケンスによる新規原因遺伝子の探索

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 (I~III型 17 例、IV型 3 例) に対し、次世代シーケンサー SOLiD4 システム (ABI 社) による全エクソーム解析を施行した。ゲノム DNA からのエクソンのキャプチャには、Agilent SureSelect Human All Exon Kit (Agilent 社) を使用した。得られた解析結果に対し、これらの症例で共通の新規遺伝子変異が存

在するかを調査した。

3. *in vitro* 治療開発モデルの作製

【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 とな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。出生前診断目的に妊娠 9~11 週の母体から採取した *SMN1* 遺伝子欠失のない妊娠初期絨毛を対象として、間葉系幹細胞マーカー、多能性幹細胞特異的転写因子群 (*nanog*, *sox2*, *oct3/4*) の発現について検討した。骨格筋分化誘導では、妊娠初期絨毛細胞に 5-azacytidine を添加後、DMEM+2%ウマ血清培地 (2%HS) で 21 日間培養を行った。筋分化マーカー遺伝子 (*MyoD*, *myogenin*, *desmin*) および骨 (*RUNX2*)、軟骨 (*sox9*)、脂肪 (*PPAR γ*)、神経 (*nestin*)、平滑筋 (*ACTA2*)、心筋 (*GATA4*) 分化マーカー遺伝子の発現について定量 PCR 法にて、成熟筋管細胞に発現する dystrophin については定量 PCR 法、蛍光免疫染色法、Western Blot 法にて検討した。早産胎盤細胞では *MyoD* 導入による筋分化能を調べた。

(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

1-1. SMN遺伝子の copy 数解析

control (健常者) 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。

1-1-1. control

control では SMN1 遺伝子の copy 数は、70 例中 1 例 (1.4%) が 1copy、66 例 (94.3%) が 2copies、3 例 (4.3%) が 3copies を示した (図 2)。

1-1-2. SMA I 型、II 型、III 型

SMN1 遺伝子の欠失が見られた 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)。

1-1-3. SMAIV 型

SMN1 遺伝子の欠失が見られない SMAIV 型では、82 例中 74 例 (90.2%) が 2copies、6 例 (7.3%) が 3copies、2 例 (2.4%) が 4copies を示した (図 3)。

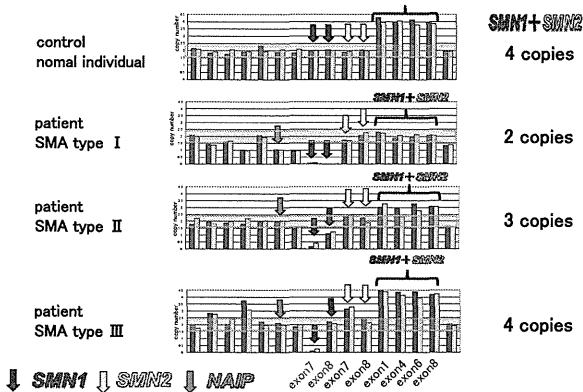


図 2 MLPA 法による SMA I ~ III 型患者における SMN 遺伝子 copy 数解析

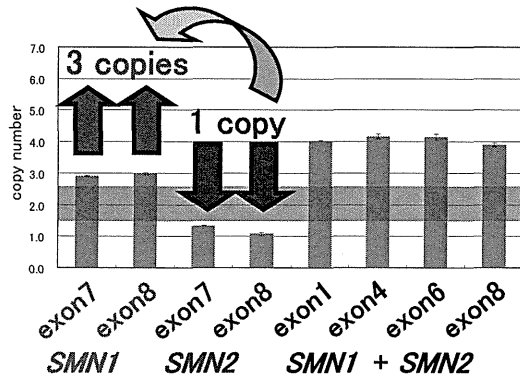


図 3 MLPA 法による SMAIV 型患者における SMN 遺伝子 copy 数解析

1-2. MLPA 法と Direct sequencing 法を用いた SMN1 遺伝子解析

【症例】SMA III 型

本症例は 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 4)。

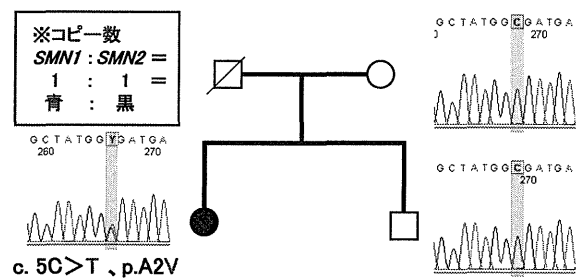


図 4 症例 2 家系についての SMN 遺伝子の全 exon 領域シーケンス

本症例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 5)。

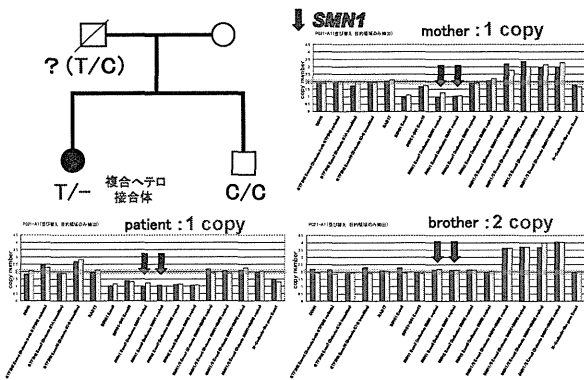


図5 全構成員についての SMN2 遺伝子の copy 数

2. 次世代シーケンスによる新規原因遺伝子の探索

次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を施行した結果、20 症例において検出された Variant 数は 147,243 個であった。その中に SMN2 遺伝子の SNP は検出されなかった。これらの検出された SNP について「SMA 機能関連遺伝子の解析」を用いて候補遺伝子の絞込みを行った。

SMN2 遺伝子に似た機能をもつ遺伝子や脊髄で発現する遺伝子に注目し、I～III型については劣性遺伝と仮定して、homo の変異を探索した。

II型の1症例において、splicing factor や histone deacetylase など16個の遺伝子にホモの変異が検出された。この遺伝子についてキャピラリーシーケンスを行い、新規 SNP の有無を確認した。また、この症例の母親、兄についても同様にこの SNP の有無を確認した（表1）。

表1 同定された候補遺伝子と
リシーケンス結果

gene	other name	chr	re-sequene		
			mother	patient	brother
1 PRPF40A	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)	2	C/C	C/C	-
2 HDAC11	histone deacetylase 11	3	-	C/C	-
3 SREK1	splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	5	A/A	A/A	-
4 POU2F3	POU class 2 homeobox 3	11	T/T	T/T	-
5 H3F3C	H3 histone, family 3C	12	A/A	A/A	-
6 DRP2	dystrophin related protein 2	X	G/A	A	A

一部抜粋

リシーケンスの結果、検出された16個のSNPのうち15個のSNPは確認できなかった。唯一 DRP2 (dystrophin related protein 2) 遺伝子のみ SNP (A) が確認できた（表1）。DRP2 遺伝子については、追加解析として健常な母と兄について同じ SNP (A) があるかを調べ、母は G/A、兄は A の遺伝子型であることがわかった。

3. in vitro 治療開発モデルの作製

【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、SMAI 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、SMAI 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。

【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。

【妊娠初期絨毛細胞、早産胎盤細胞】SMN タンパク質の発現量は、SMA I 型患者では同胞の非罹患者の 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。

正常妊娠初期絨毛細胞は、CD29, 44, 73, 105 の発現を認め、さらに妊娠 9 週に採取した妊娠初期絨毛細胞は nanog, sox2 の発現を認めた。単核細胞が優位である妊娠初期絨毛細胞は、分化誘導後に細胞が融合し筋管細胞様の多核細胞が出現した。定量的 PCR 法で MyoD, myogenin, desmin の発現を認めた。dystrophin 発現は経時

的に増加し、21日目に dystrophin タンパク質の発現も認めた。*RUNX2*、*sox9*、*PPAR γ* 、*nestin*、*ACTA2*、*GATA4*は有意な増加を示さなかった。さらに、*MyoD*導入により筋分化能が増強することを証明した。

D. 考察

1-1. *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型患者では、control と比較し *SMN1* 遺伝子 exon7 の copy 数が増え(重複し)ている症例が存在した。*SMN1* 遺伝子 exon7 領域の copy 数の増加傾向は確認できたが control との有意な差ではなかった (Cochran-Armitage 傾向検定 $P=0.087$)。 *SMN1* 遺伝子の重複は gene conversion (*SMN2* exon7 \Rightarrow *SMN1* exon7) が起こった、もしくは不均衡な組み換えが起こったためと考えられた。(図3)。

1-2. MLPA 法と Direct sequencing 法を用いた *SMN1* 遺伝子解析

本症例では図4、5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、本症例は片アレルの *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。

2. 次世代シーケンスによる新規原因遺伝子の探索

次世代シーケンサーにより検出された *DRP2* 遺伝子は Xq22.1 に存在し、脳・脊髄に発現する蛋白質で、疾患原因遺伝子となりうる機能を有していたが、健常な兄においても同様の SNP が検

出されたことにより、この SNP は疾患の原因ではないことが示された。

今回、次世代シーケンサーで検出された16個の SNP のうち15個の SNP が擬陽性であった。次世代シーケンサーを用いた実験では特に De novo の SNP の場合、擬陽性が検出されることがあるとの報告があるが、今回のケースはその頻度が高かった。その原因としていくつか考えられるが、特に「今回使用した試薬(ロット)が悪かった」、「ウェット系の実験操作に問題があった」、「解析(マッピング)に問題があった」などがあげられた。

3. *in vitro* 治療開発モデルの作製

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。

胎児の出生前遺伝子診断に用いられている妊娠初期絨毛細胞は、間葉系幹細胞を多く含み、また *nanog*、*sox2* 発現が認められることから多能性を有する細胞群を含んでいることが示唆された。また脱メチル化剤である 5-azacytidine 添加後に 2%HS で培養することにより、筋分化マーカーが他組織の分化マーカーに比して高発現を示したことから、妊娠初期絨毛は骨格筋への分化能力を備えていることが判明した。今後は、細胞移植治療を指向した基礎研究として、神経分化誘導についての検討を行っていく。

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。*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) に変異を検出した。この症例では、*SMN1* 遺伝子の複合ヘテロ変異が SMA の原因であることを示した。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。

2. *SMN* 遺伝子の欠失を示さない 20 症例に対し次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を実施しているが、現在のところ原因遺伝子の同定には至っていない。今回、次世代シーケンサーで検出された 16 個の SNP のうち 15 個の SNP が擬陽性であり、原因遺伝子探索の障害要因となった。

3. *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。これらの知見をもとに、SMA の病態解明、治療法開発研究を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子診断法. 難病と在宅ケア 2010; 16(6):13-15
- 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) 斎藤加代子, 遺伝学的検査 表 176 遺伝学的検査情報 脊髄性筋萎縮症, 臨床検査データベース 2011-2012, 2011:675, 医学書院
- 5) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル. 2012. 金芳堂.

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子, 小児神経疾患と遺伝子診断, 大阪小児科学会, 2010. 9. 26, 大阪
- 2) 近藤恵里、西村貴文、稲葉雄二、古庄知己、西野一三、埜中征哉、古川徹、斎藤加代子, 先天性ミオパチー原因遺伝子の包括的スクリーニング解析にて診断し得た RYR1 遺伝子変異による乳児重症型ネマリンミオパチーの 1 例, 日本人類遺伝学会第 56 回大会・第 11 回東アジア人類遺伝学会, 2011. 11. 11, 千葉
- 3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

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

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

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 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

運動ニューロン疾患と診断された自験症例のうち5年以上の間、下位運動ニューロン症候のみで緩徐に経過した症例を成人発症脊髄性筋萎縮症（SMA-IV）として抽出し、その臨床像と遺伝学的解析、さらには病理学的検討を加えてSMA-IVの位置付けを検討した。当院で過去15年にALSまたは運動ニューロン疾患を疑われた302例について、後方視的に調査・検討し、初診時上位運動ニューロン症候を認めず下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は108例（36%）あった。その中で5年以上下位運動ニューロン症候のみで上位運動ニューロン症候を呈することなく経過し、急激な症状の増悪も示さずSMA-IVと診断した症例は11例（10%）であった。この11例のうち遺伝子解析の同意が得られた9例について小児発症SMAの大多数で認められるSMNおよびNAIP変異について検索を行ったが、何れの遺伝子にも変異を認めなかった。既報ではSMN変異を有するSMA-IV報告例の大多数は家族歴を有し下肢近位筋対称性の筋力低下で発症しているが、遺伝子解析を行った自験9例では2例で家族歴を有していたが7例は孤発例で、症候学的にも1例が下肢近位筋対称性の筋力低下、8例が一側上肢または下肢の遠位筋優位の筋力低下で発症していた。さらにこの9例の内同意を得た6例で遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子の網羅的解析を行うと1例で遺伝性軸索型運動ニューロパチーの原因遺伝子であるMFN2にP456L変異を認めた。また9例の内1例で剖検が行われたが、ALSの病理像を呈していた。今回抽出したSMA-IVと考えられた症例群は遺伝学的、症候学的にもヘテロな集団であり、ALSや遺伝性運動ニューロパチーも包含する可能性が示された。

共同研究者

益子貴史，手塚修一，秋本千鶴，森田光哉

（自治医科大学内科学講座 神経内科学部門）

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緩徐で予後が良好な疾患とされる。当科で経験したSMA-IVと考えられる症例の臨床像と遺伝学的背景の解析および剖検例の検討を通して運動ニューロン疾患における位置付けを考察する。

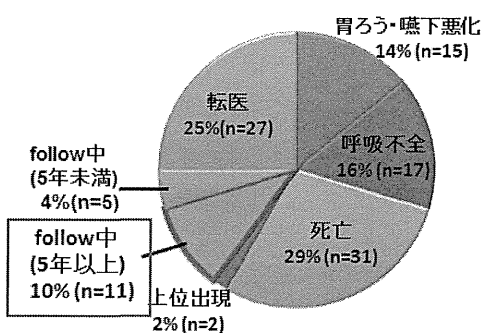
B. 研究方法（倫理面への配慮も含む）

当院において過去15年の間に運動ニューロン疾患と診断された302例の中で、下位運動ニューロン症候のみを呈し、5年以上の間、極軽微な進行で推移した11例を抽出した。そのうち遺伝子解析の同意が得られた9例について、臨床像をまとめ、小児SMAの大多数で原因遺伝子とされるSMNおよびNAIP遺伝子の解析を行った。さらにその中で同意の得られた6例については遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子（PMP22, MPZ, SIMPLE, EGR2, NEFL, SOX10, GDAP1, MTMR2, SBF2/MTMR13, KIAA1985, NDRG1, PRX, GJBI, MFN2, RAB7, GARS, HSPB1, HSPB8, LMNA, GAN1, KCC3, APTX, SETX, TDPI, DNM2, DHH, YARS）について網羅的に解析を行った。また、急逝した1例（SMN, NAIP解析済み）で剖検を行った。

C. 研究結果

初診時、下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は 302 例中 108 例（36%）であった。この 108 例のその後の転帰について図 1 に示す。嚥下機能が増悪し胃瘻造設を余儀なくされた 15 例、呼吸筋麻痺を認めた 17 例、死亡に至った 31 例、上位運動ニューロン症候が出現した 2 例の合計 65 例（61%）は臨床的に ALS と診断し得る症例であった。追跡が可能で下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は 16 例（14%）であり、その中で 5 年以上の間、極軽微な進行で推移した 11 例（10%）を SMA-IV と臨床診断した。そのうち遺伝子解析の同意が得られた 9 例について臨床像をまとめた。

図 1 下位運動ニューロン症候のみ例の転帰 (n=108)



9 例の臨床像は男性 2 例、女性 7 例、家族歴を有したのは 2 症例 2 家系（両家系とも常染色体優性遺伝形式）であった。発症年齢は平均 54.3 歳（38-72 歳）で 30-49 歳が 3 例、50-69 歳が 4 例、70 歳以上が 2 例であった。初発症状では 1 例が両側対称性下肢近位筋優位の筋力低下、5 例が 1 側上肢遠位筋優位の筋力低下、3 例が一側下肢遠位筋優位の筋力低下を呈した。罹病期間は 5-10 年が 3 例、11-15 年が 3 例、16-20 年が 1 例、21 年以上経過した例が 2 例であった。現在の ADL については 4 例が自立生活、5 例が部分介助生活で、2 例で軽度の嚥下障害を認めた。寝たきりの症例はなかった。

以上のような自験例 9 例について *SMN* および

NAIP 遺伝子の解析を行ったが、何れの遺伝子にも変異を認めなかった。

この内、家族歴のない 53 歳女性が脳出血のため急逝した。発症年齢は 38 歳、左下肢遠位筋優位の筋力低下で発症、徐々に両側下肢の筋力低下が進行した。41 歳頃より自力での起立困難、上肢の筋力低下も出現した。44 歳初診時の所見は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った。腱反射は四肢で減弱～消失した。歩行は平地ならば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。針筋電図検査では右上腕二頭筋、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判断した。53 歳時右被殻出血のため急逝した。死亡直前の ADL は数歩のつかまり歩きが可能で、顔面筋の筋力低下や嚥下障害・構音障害・呼吸筋麻痺は認めていなかったが舌の筋萎縮および線維束性収縮を認めた。

剖検では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。免疫染色は未施行である。

今回の研究で自験 SMA-IV 症例 11 例の中での同意のとれた 6 例で遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子の網羅的検索を行ったところ 1 例で *MFN2* に P456L 変異を認めた。症例の臨床像を以下に記す。56 歳の女性で発症年齢は 50 歳で右上肢手関節の背屈困難で発症した。51 歳初診時所見は、顔面・球部および頸部には筋力低下がなく、徒手筋力検査で三角筋 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および腕橈骨筋で消失し, 同筋で筋萎縮も認めた. 感覚障害および自律神経障害はなかった. 上肢の筋力低下は徐々に進行し, 52歳時には初診時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

今回の検討で, 当初下位運動ニューロン症候のみを呈していた症例もその後の経過で, その多くが呼吸不全や嚥下障害等の症状の悪化を伴い, あるいは上位運動ニューロン症候を呈し, ALSと診断し得る症例であった. 当初の症候のみで診断していくことは困難で, ALSとの鑑別のためには経過を追う必要があるといえる. 一方, 少数ながら下位運動ニューロン症候のみで長期間経過し予後の良いSMA-IVと診断し得る症例も存在した. 但し, この自験のSMA-IVの症例では遺伝学的にも小児発症のSMA-I, II, IIIとは異なっていた. またSMNやNAIP変異を伴うSMA-IVの報告例では家族歴を有し, 両側対称性下肢近位筋優位の筋力低下で発症する症例が大半であり, 自験SMA-IVとは症候学的にも異質な集団であることがわかった.

さらには下位運動ニューロン症候のみで長期間経過した症例でもALSの病理像を呈していたことから, 既存の臨床診断技術からは上位運動ニューロン症候を検出できない症例が存在することを示している. しかしながら通常のALSの病理所見で認めるBunina小体は認めなかったこ

とは, 通常のALSとの異同についても検討の余地を残した. また, 病因学的意義についてはさらなる検討が必要ではあるが遺伝性運動ニューロパチーの遺伝子異常を有するSMA-IV症例が存在することは運動ニューロパチーの症例も混じえた症候群であることを示している.

E. 結論

SMA-IVとして臨床診断し得る症例群は遺伝学的にも症候学的にも遺伝性運動ニューロパチーやALSを含むヘテロな症候群である.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

手塚修一, 秋本千鶴, 森田光哉, 中野今治. 当科において脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の検討. 第52回日本神経学会学術大会. 平成24年5月19日. 名古屋

益子貴史, 手塚修一, 秋本千鶴, 森田光哉, 相楽有規子, 斎藤加代子, 中野今治. 成人型脊髄性筋萎縮症と考えられる当科症例の臨床像と遺伝学的背景の解析. 第53回日本神経学会学術大会. 平成24年5月25日. 東京

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

2. 実用新案登録

3. その他

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、いくつかの臨床研究を行った。SMA の骨格筋 MRI は疾患特異的な所見を示し、診断的な所見を得ることが可能であることを見いだした。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。SMA の末梢神経障害に関する検討では SMA I 型では、発症時すでに上下肢の運動単位が減少しているのに対し、II 型では下肢で目立つ。I 型では、主として大径有髄の感覚神経線維の軸索変性が起こる可能性があるが、II 型では感覚神経の異常は示唆されなかった。

共同研究者

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 遺伝子検査診断室）

A. 研究目的

1. 脊髄性筋萎縮症（SMA）の骨格筋画像所見 SMA に対して、診断目的に施行した骨格筋 MRI を検討し、診断的な意義を見いだすことができるかどうかを検討する。

2. 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。

3. SMA の末梢神経障害に関する検討

SMA は脊髄前角運動神経細胞の変性・消失を特徴とし、末梢神経は通常保たれるが重症例では障害されることがある。今回神経伝導検査（NCS）から SMA の末梢神経障害、とくに感覚神経

障害について検討した。

B. 研究方法

1. SMA の骨格筋画像所見

SMA と確定診断されている 9 例を対象とした。軸位断 T1 強調像、STIR 像の下肢帯～大腿～下腿面のスライスに関して検討を行った。

2. MLPA 法を用いた SMA の遺伝子診断

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。

3. SMA の末梢神経障害に関する検討

2001 年 9 月～2010 年 9 月に当科に入院した SMA 15 例（男：女 9：6）を対象とした。I 型 5 例、II 型 10 例で、全例 *SMN1* 遺伝子 exon7 を欠失、14 例で exon8 を欠失していた。診断時の NCSのうち、運動・感覚神経伝導速度（MCV・SCV）、複合筋・感覚神経活動電位（CMAP・SNAP）、F 波出現頻度（F0）を年齢別コントロールと比較した。

（倫理面への配慮）

研究 1、3 に関しては通常の診療で得られた臨床情報を利用するものであり倫理委員会への

申請は行わなかった。研究2についても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

1. SMAの骨格筋画像所見

SMA I型とSMA II型において著明な高信号を呈することを見いだした。この所見の成因については不明であるが、本所見は診断的な価値があると同時に、今後始まるであろう治験における効果判定にも有用となる可能性がある。

2. MLPA法を用いたSMAの遺伝子診断

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。

3. SMAの末梢神経障害に関する検討

MCV低下はI型3例（60%）にみられ、CMAPの著明な低下は全例で観察された。II型ではMCV低下はなく、CMAPはUlnar ($p < 0.01$)、Tibial nerve ($p < 0.01$)で統計学的に優位に低下していた。SCV低下やSNAP低下は3例（60%）にみられたが、II型ではいずれも観察されなかった。FOはI型では上下肢ともに減少していたが、II型ではUlnar ($p = 0.039$)、Tibial nerve ($p =$

0.031)で統計学的に優位な減少がみられた。

D. 考察

1. 脊髄性筋萎縮症の骨格筋画像所見

2. MLPA法を用いた脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断

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。

3. SMAの末梢神経障害に関する検討

SMA I型における上下肢CMAPやFOの減少は、脊髄運動神経細胞の変性・消失がびまん性であることを示すのに対し、II型では運動神経細胞の減少が下肢で目立つ。I型におけるSCVやSNAP低下は、主として大径有髄の感覚神経線維の軸索変性を示唆するが、II型ではNCSで検出可能なレベルの感覚神経障害はない。

E. 結論

1. SMAの骨格筋画像所見

SMAの骨格筋MRIは診断的な所見を得ることが可能である。

2. MLPA法を用いたSMAの遺伝子診断

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。

3. SMAの末梢神経障害に関する検討

SMA I型では、発症時すでに上下肢の運動単位が減少しているのに対し、II型では下肢が目立つ。I型では、主として大径有髄の感覚神経線維の軸索変性が起こる可能性があるが、II型では感覚神経の異常はない。

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

小牧宏文、佐久間啓、斎藤義朗、中川栄二、須貝
研司、佐々木征行. 脊髄性筋萎縮症の骨格筋画像
所見 MRI での疾患特異的所見 第 113 回日本小
児科学会学術集会. 盛岡. 2010. 4. 24

Komaki H, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai
K, Sasaki M. Muscle MRI of spinal muscular
atrophy. The 15th World Muscle Society.
Kumamoto, 2010. 10. 13.

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

脊髄性筋萎縮症の臨床実態の分析, 治療効果判定法の検討,
バルプロ酸治療のパイロットスタディに関する研究
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

平成 22 年度は,脳波異常を伴う脊髄性筋萎縮症(SMA)患児 1 症例に対するバルプロ酸 (VPA)投与の検討, High-Resolution Melting 解析を用いた SMA の遺伝子診断の検討,SMA による側弯に対する脊椎外科治療アンケート調査,筋ジストロフィー病棟長期入院の SMA 患者の検討を報告した.平成 23 年度は,神経筋疾患の血管新生マーカーに関する検討,SMA の心機能異常に関する検討を報告した.平成 24 年度は,SMA に対する VPA 投与のパイロットスタディを報告した.SMA の診断方法,内科・外科治療,病態解析など多方面にわたる検討を行った.

共同研究者

西尾久英, Indra Sari Kusuma Harahap, Dian K Nurputra, Imma Harahap, 森川 悟, 山本友人(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)
松村 剛, 猪山昭徳, 木村紀久, 藤村晴俊, 佐古田 三郎, 神野 進(国立病院機構刀根山病院 神経内科)
畠田羅勝義(国立病院機構徳島病院 小児科)
田浦映恵, 相馬俊裕(兵庫医科大学 血液内科)
山本ひろし, 宗重絵美, 西園博章(国立病院機構刀根山病院 リハビリテーション科)

#1 脳波異常を伴う脊髄性筋萎縮症(SMA)患児1症例に対するバルプロ酸(VPA)投与の検討

A. 研究目的

脳波(EEG)異常治療に VPA 投与を行った SMA 患児の SMA 病状・検査所見,SMN 転写を評価する.

B. 研究方法

症例は6歳女児.SMN1 遺伝子欠失,SMN2 遺伝子存在し,SMN2 は 3 コピー.知能正常,起立歩行不能で,夜間 NPPV 施行.EEG で右側頭~頭頂部に spike など異常脳波頻発.(倫理面への配慮)SMN 解析に関し,神戸大学倫理委員会の承認

を得た.

C. 研究結果

VPA25mg/日で投与開始,10 月で 225mg/日とした.カルニチン 100mg/日も併用した.VPA 投与後,EEG 異常は改善したが,modified Hammersmith 式機能的運動能力尺度(MHFMS)開始前 1/40,10 月 1/40 と不変,明らかな呼吸機能の改善なし.末梢血白血球を用いた RT-PCR 法による評価では, *Full length SMN(FL-SMN)*転写は投与前に比し若干増加, $\Delta 7$ -SMN は低下, *Total-SMN*は増加した. ASF/SF2,hnRNPA1 転写も増加傾向であった.

D. 考察

SMN,ASF/SF2,hnRNPA1 転写は,VPA 投与による影響を受けたと考えられるが,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の検討,臨床症状評価法の検討,新規治療マーカーの開発などが課題である.

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.