

#2 High-Resolution Melting 解析を用いた SMA の遺伝子診断の検討

A. 研究目的

High-Resolution Melting 解析(HRMA)は飽和型 DNA 結合蛍光色素を用いることにより高解像度の melting curve が得られ、1塩基変異でも検出が可能である、PCR 後に特殊な処置を必要としない、約 1 時間 30 分という短時間で多検体を同時に解析可能であるという利点を有する。本検討では、非標識プローブを用いない通常の HRMA を用い、*SMN1* 遺伝子の欠失診断、HRMA による点突然変異スクリーニングを試みた。

B. 研究方法

SMA 患者 43 例と対照 67 例を対象とした。遺伝子は DNA 抽出キット「SepaGene」（三光純薬）を用い抽出した。HRMA には Roche diagnostic 社 LightCycler® 480 System II 及び Roche diagnostic 社 LightCycler® 480 Gene Scanning Software を使用した。

①HRMA による *SMN1* 遺伝子の欠失診断：SMA 患者 41 例と対照 50 例を対象とした。PCR-RFLP 法では、SMA 患者 41 例に *SMN1* 遺伝子の欠失を、対照 50 例中 3 例に *SMN2* 遺伝子の欠失を認め、他 47 例には *SMN1*・2 遺伝子に欠失を認めなかった。続いて SMN 遺伝子エクソン 7 に関する HRMA を行った。

②HRMA を用いた微小変異のスクリーニング：*SMN1* 遺伝子エクソン 3 の Tudor domain に変異(275G>C)を有する SMA1 型 2 例と対照 7 例を対象とし、HRMA によるエクソン 3 における既知の微小変異のスクリーニングを行った。また、*SMN1* 遺伝子の片側アレルの欠失を有する 1 例と対照 10 例に対し、*SMN* 遺伝子の全エクソンに関するスクリーニングを行った。その後変異の同定のためダイレクトシーケンスを行った。(倫理面への配慮)本研究施行には、神戸大学医学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

①HRMA では 3 種類のパターンの melting curve を認め、LightCycler®480 Gene Scanning Software による解析では、*SMN1*・*SMN2* 遺伝子とも有する群、*SMN2* 遺伝子の欠失を認める群、*SMN1* 遺伝子欠失を認める SMA 患者群に分類可能であった。PCR-RFLP 法との比較では感度・特異度ともに 100%であった。

②HRMA によるエクソン 3 における既知の微小変異のスクリーニングでは、エクソン 3 に変異を有する 1 型患者 2 例と対照 7 例は分類可能であった。*SMN1* 遺伝子の片側アレルの欠失を有する 1 例に対する、全エクソンの HRMA による解析では、エクソン 6 で正常対照とは異なる HRMA のパターンを取ることが判明した。ダイレクトシーケンスでは Exon6 の Y-G box 内に位置する c.830 A>G 変異が判明した(新規変異)。

D. 考察

HRMA は短時間で非常に高精度の *SMN1* 遺伝子の欠失診断が可能であることが判明した。また、HRMA での微小変異のスクリーニングでは *SMN1* 遺伝子の変異を検出することも可能であった。HRMA は同時かつ短時間で多検体を解析することが可能であり (Roche 社 LightCycler®480 では 1 時間 30 分で最高 384 検体を同時に解析可能)、新生児スクリーニングにも利用可能な検査法である。以上より、HRMA は SMA の遺伝子診断に有用であると考えられる。

E. 結論

HRMA は *SMN1* 遺伝子の欠失診断、微小変異のスクリーニングに有用である。

#3 SMA による側弯に対する脊椎外科治療アンケート調査

A. 研究目的

神経筋疾患側弯の国内外科治療状況を調査し、

今後の側弯治療方針決定の一助とする。

B. 研究方法

日本側弯症学会学会員施設に、2005 年以降の神経筋疾患側弯手術経験、症例情報、外科治療適応症例に関する意見などアンケートした。（倫理面への配慮）本研究施行には、刀根山病院臨床研究審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

日本側弯症学会掲載施設 248 施設中、88 施設から回答を得た（回収率 38%）。内訳は 28 大学病院、15 公立総合病院、5 国立病院機構施設などであった。手術施行は 14 施設で、9 大学病院、2 公立総合病院、2 国立病院機構施設、1 医療法人施設であった。70 例の症例報告の内訳は、SMA14 例、筋ジストロフィー 22 例、脳性麻痺 16 例などであった。症例数、疾患内訳は施設により大きく異なった。手術時間は 4~16.7 時間、術後合併症は 12 件数の報告があり、呼吸不全が最も多かった。SMA14 例の内訳は、男 6 例、女 8 例、11~23 歳（平均 13.6 歳）で、心不全+NPPV 例 1 例、酸素投与 1 例が含まれていた。術前側弯は 55~143 度（平均 106.7 度）で、矯正は 17~83 度（平均 43.6 度）であった。DMD19 例の内訳は、12~22 歳（平均 13.9 歳）で、心不全+気管切開例 1 例、心不全 1 例が含まれていた。術前側弯は 35.7~115 度（平均 65.3 度）で、矯正は 5~50 度（平均 23.7 度）であった。SMA 術後の感想では、多くの例で座位保持良好が挙げられる一方、介助しにくくなったとの感想もあった。神経筋疾患側弯の手術療法の適応年齢幅を問うた設問では、下限 3~15 歳（n=34）、上限 10~75 歳未満（n=23）と回答範囲は幅広く、適応症例の脊椎変形の程度を問うた設問でも、下限 25~90 度（n=45）、上限 60~150 度（n=21）と幅広かった。手術の積極的適応を自由記述の内訳は、変形、合併症状、現症・術後の状態などに分類されたが、座位バランス不良・座位保持困難を挙げた回答が最も多かった。

D. 考察

国外では神経筋疾患側弯に対する脊椎外科治療は治療選択肢の一つとして広く行われているが、国内では一般的とは言い難い。本検討結果でも、手術施行施設は限られ、特定の施設に症例が集中していることが明らかになった。通常、神経筋疾患を診察している医師は、神経内科や小児科といった内科系の医師が中心である。しかしながら、脊柱外科に関する情報を得る機会は決して多くなく、これまで情報がないために、手術適応時期を逸した症例が数多くあったと推定される。神経筋疾患の側弯治療での、小児科・神経内科医師、整形外科医師の間のいっそうの連携を期待したい。

E. 結論

脊椎外科治療国が治療選択肢の一つとして考慮できるような情報蓄積・発信が必要と考えられる。

#4 筋ジストロフィー病棟長期入院 SMA 患者の検討

A. 研究目的

厚労省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー研究班では、1999 年から 1 年に一回全国 27 筋ジストロフィー専門施設入院患者データベースを作成している。本検討では、SMA 症例の入院状況を解析することを目的とした。

B. 研究方法

SMA 患者入院例数、年齢、人工呼吸器装着状況、栄養管理状況、死亡例数・原因などを解析した。

C. 研究結果

1999 年から 2009 年までの筋ジストロフィー病棟入院患者数は、2,066 人から 2,193 人の間で推移した。SMA 患者数は 55 人から 73 人の間で推移し、ゆるやかに減少した。1999 年の SMA 入院例数は 73 例で、内訳は 1 型 23 例、2 型 8 例、3 型 30 例、病

型未記載 12 例,2009 年は 57 例で,1 型 14 例,2 型 12 例,3 型 17 例,病型未記載 14 例であった。年齢層は,1999 年では 1 型 8.7~72.5 歳,2 型 15.9~43.0 歳,3 型 12.6~76.5 歳,平均 35.7 歳で,2009 年では 1 型 1.9~56.7 歳,2 型 9.9~55.6 歳,3 型 19.3~82.5 歳,平均 42.4 歳であった。呼吸状態は,1999 年では 1 型 自発呼吸 14 例,NPPV2 例,気管切開下人工呼吸(TIV)7 例,2 型 自発 5 例,NPPV3 例,3 型 自発 24 例,TIV6 例であった。2009 年では,1 型 自発 3 例,NPPV1 例,TIV10 例,2 型 自発 4 例,NPPV7 例,TIV1 例,3 型 自発 11 例,NPPV2 例,TIV4 例であった。栄養管理は,1999 年では多くで経口摂取が可能で経管栄養は 3 例であったが,2009 年では経口摂取 31 例,経管栄養 11 例,中心静脈栄養 1 例であった。2000 年~2008 年の死亡報告例は 16 例で,原因の約半数は,呼吸不全や呼吸器感染症など呼吸器関連死が占めた。

D. 考察

SMA 入院患者も,筋ジス病棟全体の傾向である入院患者の高年齢化,人工呼吸器使用例の増加,経管栄養例の増加といった重症化が顕著である。本データベースは,開始から 12 年が経過し,診断基準など一部で見直しが必要な項目もある。本検討での SMA1~3 病型分類には再考の余地があり,病型分類の再確認,病型別の経過把握・検討が必要である。

E. 結論

筋ジス病棟入院 SMA 患者の平均年齢は上昇,呼吸管理状態,栄養管理状態は重症化していた。

#5 神経筋疾患の血管新生マーカーに関する検討

A. 研究目的

神経筋疾患の病態には組織血流障害が影響する可能性がある。神経筋疾患患者の血管新生関連マーカーと病態との関連を考察する。

B. 研究方法

対象を,DMD 延べ 32 例(3.7~47.7 歳(平均 17.0 歳),自発呼吸 17 例,NPPV 10 例,TIV5 例),SMA 14 例(8.1~58.3 歳(28.3),男性 6 例,女性 8 例,自発 1 例,NPPV12 例,TIV1 例),健常対照 8 例(6.9~48.7 歳(30.1),男性 5 例,女性 3 例)とし,血清クレアチンキナーゼ(CK),末梢血中 CD34 陽性細胞数,年齢との関係を検討した。(倫理面への配慮)本研究施行には,刀根山病院臨床研究審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

血清 CK は,DMD 49~20,935 IU/l(平均 4,883),SMA 11~86 IU/l(38),健常対照 92~187 IU/l(140)であった。末梢血中 CD34 陽性細胞数は,DMD 0.45~4.54 cells/ μ l(1.99),SMA 0.54~4.78 cells/ μ l(1.65),対照 0.79~3.82 cells/ μ l(1.53)であった。1 例を除く対照 7 例の CD34 陽性細胞数は 2 cells/ μ l 未満であった。DMD の CD34 陽性細胞数 2 cells/ μ l 以上例は,20 歳未満の自発呼吸例に多かった。SMA の CD34 陽性細胞数 2 cells/ μ l 以上は 3 例で,2 例は NPPV コンプレアランス不良例,1 例は自発呼吸例であった。いずれも,血清 CK と CD34 陽性細胞数の相関は明らかではなかった。

D. 考察

CD34 は,血管内皮前駆細胞の表面マーカーの一つで,血管恒常性,機能維持,新生に関わり,血管新生マーカーとして注目されている。DMD,SMA とも nNOS 発現不良による血管内皮・平滑筋の障害が指摘されており,DMD 若年齢での CD34 陽性細胞高値は筋崩壊と組織血流障害の関連を疑わせる。一方,OSAS でも血管平滑筋障害が指摘されており,SMA の CD34 高値は,低酸素を惹起する呼吸状態との関連も疑わせる。

E. 結論

DMD では筋崩壊が,SMA では呼吸不全が,CD34 陽性細胞数に関連する可能性が最も考えやすい.いずれも組織血流障害・低酸素を惹起する状態である.

#6 SMA の心機能異常に関する検討

A. 研究目的

SMA 患者の心機能異常を調査・把握することを目的とする.

B. 研究方法

対象を SMA17 例とし,12 誘導心電図,ホルター心電図,心臓超音波検査(UCG),心房性あるいは脳性ナトリウム利尿ペプチド(ANP,BNP)の検査結果を,後方視的に情報収集・検討した.対象の性別は男性 9 例,女性 8 例,年齢は検討最終年齢 8.7~58.8 歳,病型は 1 型 2 例,2 型 14 例,3 型 1 例,呼吸状態は TIV3 例,NPPV12 例,自発 2 例であった.情報収集期間は最長約 20 年であった.

C. 研究結果

PR 時間は年齢とともに延長し,うち 3 例で年齢との相関は有意であったが,その変動範囲は基準値範囲内であった.QRS 幅も年齢とともに延長し,うち 7 例で年齢と有意な相関を示し,一部の例では基準値を超えて延長していた.また,QTc 時間は,5 例で年齢と有意な相関を示して延長し,一部の例では基準値を超えていた.ホルター心電図では 平均心拍数は 80-100/min と頻脈傾向で,年齢とともに低下したが,心拍数変動に劇的な変化はなかった.UCG では,駆出率の最低値が一時的に 40%台に低下している例もあったが,概ね 50%以上を保って推移した.ANP,BNP は,一時的に基準値を逸脱する例もあったが,ほぼ正常範囲内での変動を保って推移した.

D. 考察

SMA では,経年的に心電図変化が起こることが示された. SMA モデルマウスでは,心筋線維化や交感神経系の機能異常が報告されているが,SMA 患者での心電図変化が,モデルマウスと同様の心筋障害や自律神経異常を反映したのか,また病的意義を持つか検討が必要である.自律神経機能の検討も必要である.

E. 結論

脊髄性筋萎縮症患者でも,モデルマウスと同様心機能異常が存在する可能性がある.

#7 SMA に対する VPA 投与のパイロットスタディ

A. 研究目的

SMA 患者に VPA 投与を行い,その有効性を評価する.

B. 研究方法

SMA2 型 6 例(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,カルニチン 100~200mg/日併用の上,至適血中濃度域到達を目安に,VPA を 6 月間投与した.投与前,開始 1,3,6 月に,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.対象全例 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,B,E 以外夜間中心に NPPV 施行中.(倫理面への配慮)本研究施行には,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.

C. 研究結果

A は,VPA 漸増中眠気・気分不良で 1 月未満で脱落.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が増悪し投与中断.VPA は

25~200mg/日で投与開始C,Dは6月でVPA至適血中濃度域にあったが,他例は至適域未満であった.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.FL-SMN転写産物量はVPA投与に伴い増加する傾向を示し, Δ 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.VPA血中濃度が至適域にある例に呼吸機能改善項目が多かったが,VPA血中濃度とFL-SMN転写産物量の変化には関係はなく,自覚的に病状に変化を認めなかった.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.また,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は成長発達が影響している可能性がある.今後の課題として,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,新規治療マーカーの開発などが挙げられる.今後の研究をすすめる上では他施設共同研究を検討すべきであろう.

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

- #3 Journal of Spine Research (in press).
- #4 "Muscular Dystrophy", book edited by

Madhuri Hegde and Arunkanth Ankala, ISBN 978-953-51-0603-6, Published: May 9, 2012 under CC BY 3.0 license. InTech - Open Access Publisher. Neuromuscul Disord 2010; 20: 670. (Abstract)

2. 学会発表

- #1 第49回日本小児神経学会近畿地方会.2011年2月19日,奈良.
- #3 第53回日本小児神経学会総会.2011年5月26-28日,横浜.
- #4 第64回国立病院総合医学会.2010年11月27日,福岡.15th World Muscle Society. 2010年9月12~16日, Kumamoto. 12th International Child Neurology Congress & 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2012年5月27日~6月1日, Brisbane, Australia.
- #5 The 11th Annual Asian and Oceanian Myology Center Scientific Meeting. June 7-8, 2012, Kyoto.第53回日本神経学会学術大会.2012年5月25日,東京.
- #6 第54回日本小児神経学会総会.2012年5月17-19日,札幌.
- #7 日本人類遺伝学会第57回大会.2012年10月26日,東京.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

SMA の病態解明、診断、治療に関する研究

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

我々は、(1) 多数検体迅速診断法の開発、(2) SMN2 遺伝子プロモーター領域の解析、(3) サルブタモールによる SMA 治療、(4) 病態解析：SMN 蛋白と細胞骨格について研究をおこなった。(1) では、High-Resolution Melting 解析 (HRMA) が SMA スクリーニングに応用可能であることを示した。(2) では、SMN2 遺伝子プロモーター内に GCC 挿入／欠失多型性が存在することを示した。しかし、この多型性はプロモーター活性に影響を与えるものではなかったことより、重症度規定因子ではないと判断するに至った。(3) では、サルブタモールが SMA 皮膚線維芽細胞の SMN 蛋白量を増加させることを明らかにし、本薬剤が SMA 治療薬候補であることを示唆した。(4) では、SMA 患者由来の繊維芽細胞において細胞骨格蛋白の機能異常の存在を明らかにし、細胞骨格の機能改善に着目した分子標的治療を提唱した。

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）

通山 由美（姫路獨協大学薬学部）

(1) 多数検体迅速診断法の開発

A. 研究目的

High-Resolution Melting 解析 (HRMA) は、リアルタイム PCR 技術を応用した、簡便な操作で迅速にかつ感度良く、遺伝子変異を検出する方法である。本法は多数検体を同時に扱えることから、スクリーニングに適用できる。今回、我々は、SMA のスクリーニングの必要性を念頭に置き、多検体迅速診断法 HRMA を用いた *SMN1* 遺伝子欠失診断法の開発に着手した。

B. 研究方法

あらかじめ PCR-RFLP 法にて *SMN1* 遺伝子の欠失診断を行い、*SMN1* 遺伝子の欠失を認めた SMA 患者 41 例と、対照 50 例 (*SMN2* 遺伝子の欠失：3 例、欠失なし：47 例) を対象とし、*SMN* 遺伝子エクソン 7 に関する HRMA を行った。

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

我々が設計したプライマー・セットを使用すれば、3 種類のパターンの melting curve を認め、*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子を有しているグループ（健常対照）、*SMN2* 遺伝子の欠失を認めるグループ（健常対照）、*SMN1* 遺伝子の欠失を認めるグループ（SMA 患者）に分類することが可能であった。PCR-RFLP 法との比較では、HRMA 法と PCR-RFLP 法で結果が完全に一致し、感度・特異度ともに 100%であった。

D. 考察

HRMA によれば、300 以上の検体であっても、短時間（約 1 時間 30 分）で、非常に正確な *SMN1* 遺伝子の欠失診断を行うことが可能になる。以上のことから、HRMA は非常に優れた多数検体迅速診断法であり、SMA のスクリーニングに応用可能であると考えられた。

E. 結論

HRMA は、SMA のスクリーニングに応用できる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

（G. 研究発表およびH. 知的財産権の出願・登録状況については、最後に一括して示す。）

（2）SMN2 遺伝子プロモーター領域の解析

A. 研究目的

SMN2 遺伝子コピー数が少なければ重症化することが報告されてきたが、SMN2 遺伝子コピー数が少ない軽症例も存在する。今回、我々は、SMN 2 遺伝子コピー数以外の症状修飾因子を明らかにする目的で、SMN2 遺伝子コピー数による予測よりも軽症の経過をとった症例について、プロモーター領域の解析を行った。

B. 研究方法

症例：2歳男児。1歳6か月時には伝い歩きが可能であった。遺伝子解析の結果、SMN1 遺伝子は欠失し、SMN2 遺伝子は2コピー存在していた。そこで本症例はSMA type 2/3 (type3に近いtype2)と診断した。

サブクロニング・シークエンス：SMN2 遺伝子プロモーター領域の変異解析を行った。

ルシフェラーゼ・アッセイ：ルシフェラーゼ・レポーター・ベクターに、GCC 挿入多型を有するSMNプロモーター、GCC欠失多型を有するSMNプロモーターをそれぞれ挿入し、SMNプロモーターを挿入しないものと併せて、3種類のベクターを構築した。次に薬剤を添加してルシフェラーゼ活性を測定した。薬剤反応性は、薬剤の添加を行わなかった群、cAMP産生を増加させるフォルスコリンを投与した群、ジブチルcAMPを投与した群、フォルスコリンとジブチルcAMPの両方を投与した群で比較した。

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

サブクロニング・シークエンス：本症例が有する2つのSMN2 遺伝子のプロモーター領

域には相異なる多型（GCC 挿入／欠失多型）が存在することが明らかとなった。

ルシフェラーゼ・アッセイ：GCC 挿入多型プロモーターとGCC欠失多型プロモーターの間の比較では、薬剤を添加しなかった群、薬剤を添加した群ともにルシフェラーゼの発現に著しい差を認めなかった。

D. 考察

ルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター活性の測定では、GCC 挿入／欠失多型はプロモーター活性に影響を与えない事が明らかとなり、本症例のGCC 挿入多型は重症度規定因子（症状修飾因子）ではなく、他の因子が重症度を規定しているものと考えられた。

E. 結論

SMN2 遺伝子プロモーター内のGCC 挿入／欠失多型性は、SMAの重症度規定因子ではない。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

（G. 研究発表およびH. 知的財産権の出願・登録状況については、最後に一括して示す。）

（3）サルブタモールによるSMA治療

A. 研究目的

2008年、Paneらは、サルブタモールがSMA患者の運動機能を改善したと報告した。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。

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0.05μMとなるようにサルブタモールを

加え、経時的に SMN2 遺伝子転写産物量と SMN 蛋白を定量した。SMN2 遺伝子転写産物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 (Δ 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 遺伝のスプライシングの変化をみるために、FL-SMN と Δ 7-SMN の比 (FL/ Δ 7-SMN) を計算した。SMN 蛋白の定量はイムノブロットングを用いた。

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

Total SMN、FL-SMN、 Δ 7-SMN は、いずれも、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 遺伝のスプライシングの指標となる FL/ Δ 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。

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

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。

D. 考察

SMN2 遺伝子の転写産物量は投与後 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、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 (SMN 蛋白の保護作用等) も関与している可能性が考えられた。

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. 研究発表および H. 知的財産権の出願・登録状況については、最後に一括して示す。)

(4) 病態解析: SMN 蛋白と細胞骨格

A. 研究目的

SMN 蛋白が、細胞骨格蛋白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、細胞骨格蛋白質の機能を比較検討する。

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、微小管構成蛋白質 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。

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

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とま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) Ca²⁺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。

D. 考察

SMA 患者繊維芽細胞では、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ていた。これらの所見は繊維芽細胞以外の細胞においても認められるものと予想され、細胞骨格ダイナミクスの異常が SMA の病態に関与しているものと考えられた。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。

E. 結論

SMA 患者由来の繊維芽細胞において、細胞骨格蛋白質の機能に異常が認められた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morikawa S, et al. Diagnosis of spinal muscular atrophy via high-resolution melting analysis symmetric polymerase chain reaction without probe: a screening evaluation for SMN1 deletions and intragenic mutations. *Genet*

Test Mol Biomarkers. 2011 Oct;15(10):677-84.

2) Katayama M, et al. Long-term stabilization of respiratory conditions in patients with spinal muscular atrophy type 2 by continuous positive airway pressure: a report of two cases. *Kobe J. Med. Sci*. 2011;57(3):E98-105.

3) 西尾久英・他. 小児医学最近の進歩 脊髄性筋萎縮症と SMN 蛋白と低分子量リボ核蛋白合成. *小児科*. 2011; 52(11) : 1535-1542.

4) 栗野宏之・他. 非侵襲的陽圧換気療法と器械による咳介助を活用し、気管内挿管から離脱した脊髄性筋萎縮症 I 型. *日本小児科学会雑誌*. 2011; 115(9) : 1451-1455.

5) Harahap NI, et al. 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.

6) Harahap IS, et al. 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.

7) Tanaka C, et al. 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) 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・他. 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・他. 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・他. 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

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

希少性難病である脊髄性筋萎縮症（SMA）など筋萎縮を来す疾患群は進行性・難治性であり、根本的治療法は成功しておらず、多専門職種ケア（multidisciplinary team）による QOL の向上が試みられているのみである。いかなる治療によっても、上記疾患による骨格筋の筋力低下・萎縮の悪化速度を抑制することができず、緊急に解決すべき課題である。HAL（Hybrid assistive limb）は分担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、この疾患に使用可能な 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。本研究の目的は、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り、3年間の分担研究の結果、SMA などに対する希少性疾患用医療機器として薬事承認を得る為の医師主導治験が可能と考えられた。

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

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、この様な疾患群に対して、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。

B. 研究方法

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。患者エント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。サイバーデザ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。

医師主導治験の治験調整医師は研究代表者が担当し、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とした。

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ことである。治験調整医師を研究代表者として、それに基づき 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 2013 年 2 月上旬から治験が開始できることとなっ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）。

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。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、サイバーデザ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を 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としておこなった。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。

D. 考察

装着型ロボット HAL 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った。

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)を開発してきた。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。

本研究は世界に先駆けてこれらの神経・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することにある。

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として妥当と思われる。

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。このよう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、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、保健医療科学 60(2),130-137, 2010
2. 中島孝、医療における QOL と緩和についての誤解を解くために、医薬ジャーナル、47:1167-1174,2011
3. T.Nakajima, Neuroethics and QOL perspectives of Cybernetics technology, enhancement or palliation, towards clinical trial, Cybernetics Technical Reports, Special issue on roboethics, p15-22, University of Tsukuba, 2011.
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 中島孝, 大災害時の神経疾患治療としての問題点 8 ヶ月後の今 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

10. 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. T.Nakajima, Issues in Testing Care Robotic Devices in the Field: Using HAL in a Japanese Hospital, Care Robotics in the Aging Society: Integrating Users, Developers and Technology, Deutsches Institut für Japanstudien (ドイツ日本研究所ワークショップ) 11.Nov.2011.Tokyo. http://www.dijtokyo.org/events/care_robotics_in_the_aging_society
2. 中島孝、神経・筋疾患に対する装着型ロボット HAL を用いた研究、2011 年 5 月 18 日、第 52 回日本神経学会学術大会、名古屋国際会議場。
3. 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
4. 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 「ロボットスーツ HAL の医療への応用および治験の話：シャルコー・マリー・トゥース病の患者会の皆様へ」（横浜 2012年9月16日）
8. 末尾の別紙資料参照-日本経済新聞 朝刊 2012年6月19日 国立病院機構新潟病院での HAL 治験の報道が行われた。
9. 市民患者向け、説明会 神経筋難病に対する生体電位駆動型ロボットの臨床応用について、2012年12月2日、東京国際フォーラム 当研究班と厚生労働科学研究 難治性疾患等克服研究事業「患者および患者支援団体等による研究支援体制の構築に関わる研究班」（橋本操研究代表者）との共催

G. 知的所有権の取得状況

今回の研究年ではあらたな取得はなかった。

ベクターとしてのポリオウイルスに関する研究

野本明男 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所・所長

研究要旨

運動神経向性を有するポリオウイルス (PV) RNA ゲノム内の構造蛋白質をコードする領域 (P1) を欠失させ、同部位に、Green fluorescent protein(GFP)をタグとして結合した Survival of motor neuron 1(SMN1)mRNA を導入した PV ベクターを構築し、この PV ベクターを用いて GFP-SMN1 mRNA 搭載 PV 粒子を作製した。この粒子を脊髄性筋萎縮症 (SMA) 患者由来細胞に導入したところ GFP-SMN 融合蛋白質が発現し、機能を有することを明らかにした。PV ゲノム内に SMN1 mRNA を導入した PV ベクターを用いて SMA 患者由来細胞に機能を有する SMN 蛋白質の発現に成功したのはこの研究が最初である。

共同研究者

荒川正行（公益財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究所）

滝沢直己（公益財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究所）

藤原俊伸（公益財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究所）

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

ポリオウイルス (PV) はプラス鎖 RNA ウイルスであり、ヒトに感染後、脊髄前角の運動神経細胞で増殖・複製する。さらに、PV には自己複製能を持たず 1 回限りの感染が成立する欠陥干渉粒子 (DI 粒子) が存在する。これらの特徴から PV ゲノム内の構造領域内に外来遺伝子を導入する PV ベクターの研究が行われてきた。一方、脊髄性筋萎縮症 (SMA) は脊髄前角運動神経細胞の変性疾患であり、原因遺伝子の一つは Survival of motor neuron 1(SMN1) 遺伝子である。現在まで SMA の根本治療法は確立されていない。本研究では、運動神経細胞を標的とする PV の特長に着目し、PV ゲノム内に外来遺伝子として SMN1 mRNA を導入し、治療法の無い SMA の新規治療法を目的とした運動神経特異的に SMN 蛋白質を発現する PV ベクターを開発する。

B. 研究方法

PV ゲノムの構造蛋白質コード領域を、GFP をタグとして結合した human SMN1 cDNA に置換し、この領域を PV の internal ribosome entry site(IRES)で発現させるように設計したプラスミド (pPV-GFP-SMN1) を構築し、このプラスミドから合成 RNA を作製した。この RNA と PV 構造蛋白質領域の発現プラスミド (pKS435-EGFP-PV) をリポフェクション法により 293T 細胞に導入し、パッケージされた PV-GFP-SMN1 DI 粒子を作製した。(平成 23 年度研究分担報告書)。作製した PV 粒子を用いて HeLa 細胞、正常ヒト胎児由来線維芽細胞及び SMAI 型患者由来線維芽細胞に GFP-SMN1 mRNA を導入し、発現した GFP-SMN 融合蛋白質について生化学的、細胞生物学的手法を用いて以下の項目について解析した。(一部平成 24 年度研究分担報告書)。

1. SMN 蛋白質の発現：蛍光顕微鏡観察、ウエスタンブロット法
2. SMN 蛋白質複合体形成能：免疫沈降法
3. 細胞内局在：免疫組織化学染色法
(倫理面への配慮)

本研究における組換え生物実験及び微生物化学研究所の指針に基づき行った。また、東京女子医科大学より分与された患者サンプルについては、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントに基づき行った。

C. 研究結果

PV ゲノム内の構造蛋白質をコードする領域を欠失し、同部位に GFP-tagged ヒト SMN1 mRNA を導入し、PV の IRES により GFP-SMN 融合蛋白質が発現できる PV-GFP-SMN1 粒子の作製に成功した。この粒子を用いて HeLa 細胞、正常ヒト胎児由来線維芽細胞及び SMAI 型患者由来線維芽細胞に GFP-SMN1 mRNA を導入後 4-6 時間で GFP-SMN 融合蛋白質を発現し、その細胞内局在は核及び細胞質であった。また、発現した GFP-SMN 融合蛋白質の SMN 蛋白質複合体形成能を抗 GFP 抗体による免疫沈降法により調べた結果、SMN 蛋白質結合蛋白質である *gemin2* 及び *gemin3* と共沈した。次に、細胞内局在について免疫組織化学染色法を用いて調べた結果、GFP-SMN 融合蛋白質は核内で *gemin2* と一部共局在した。さらに、SMAI 型患者由来線維芽細胞では、GFP-SMN1 mRNA の導入後、8 時間で内在の SMN2 mRNA 由来 SMN 蛋白質の発現増加を示した。

D. 考察

SMA 患者において主に欠失している SMN1 mRNA を PV ゲノムの構造領域の欠失部位に導入し、PV の IRES により GFP-SMN 融合蛋白質が発現できる PV ベクターを構築し、PV-GFP-SMN1 粒子の作製に成功した。この粒子を用いて HeLa 細胞、正常ヒト胎児由来線維芽細胞及び SMA 患者由来線維芽細胞に GFP-SMN1 mRNA を導入したところ、GFP-SMN 融合蛋白質が発現し、細胞質及び核内に局在した。次に、SMN 蛋白質複合体形成能を調べたところ、GFP-SMN 融合蛋白質は *gemin2* 及び *gemin3* と共沈することが明らかとなり、免疫組織化学染色法により核内で一部共染色された結果から SMN 蛋白質複合体の形成能を有することを明らかにした。さらに、SMA 患者由来線維芽細胞では、GFP-SMN 融合蛋白質の発現により内在の SMN2 mRNA 由来の SMN 蛋白質の発現増加を示した。その結果、導入した SMN 蛋白質は内在の SMN2

pre-mRNA のスプライシングや翻訳機能に影響を及ぼすことが示唆された。一般に SMN 蛋白質は細胞質及び核内に局在し、*gems* と呼ばれる SMN 蛋白質複合体を形成し、スプライシングや翻訳メカニズムに影響を及ぼしていると報告されている。本研究において、PV ベクターを用いて導入した SMN 蛋白質は、SMA 患者の不足した SMN 蛋白質を補うだけでなく、SMN 蛋白質の機能を有し、適切な細胞内局在することが示唆された。

E. 結論

ポリオウイルスをベクターとして、脊髄性筋萎縮症で主に欠失している SMN1 mRNA を導入した発現ベクターを作製し、このベクターを用いて PVDI 粒子を作製することに成功した。さらに、この PV ベクターを用いて、脊髄性筋萎縮症患者由来細胞に SMN1 mRNA を導入し、機能的な SMN 蛋白質を発現させることにも成功した。今後、より安全性を高めるためのベクターの改変や動物実験による治療効果の検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. H. Igarashi, Y. Yoshino, M. Miyazawa, H. Horie, S. Ohka, A. Nomoto. J. Virol., 84(12): 5947-5957, 2010
- 2) Poliomyelitis. Satoshi Koike, & Akio Nomoto. The Picornaviruses, Chapter 21: 339-351, 2010
- 3) Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and -independent pathway. S. Ohka, C. Nihei, M. Yamazaki, A. Nomoto. Frontiers in Microbiology, 3: 1-5, 2012

2. 学会発表

1) Molecular mechanisms of poliovirus dissemination pathways. Akio Nomoto. BIT' s 1st World Congress of Virus and Infections-2010, July 31-August 3, Busan, South Korea

2) ポリオウイルスの血液脳関門透過機構。二瓶浩一、野本明男。第 58 回日本ウイルス学会。2010 年 11 月 7 - 9 日、徳島

3) 運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染。大岡静衣、金田祥平、藤井輝夫、五十嵐博子、野本明男。第 58 回日本ウイルス学会。2010 年 11 月 7 - 9 日、徳島

4) ポリオウイルスの体内伝播機構

野本明男

第 15 回日本神経ウイルス研究会特別講演

2011 年 5 月 19 日（金沢）

5) Dissemination mechanisms of poliovirus

Akio Nomoto

Symposium “Viruses Forever” May 27, New York

6) Characterization of a receptor for poliovirus BBB-permeation C. Nihei, M Yamasaki, A Nomoto International Union of Microbiological Societies, 2011 Congress (IUMS) September 13, Sapporo

7) ポリオウイルス感染と生体分子

野本明男

TCCI 第 2 回実験化学との交流シンポジウム

2012 年 11 月 16 日（京都）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症患者由来疾患 iPS 細胞の樹立
山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所 准教授

研究要旨

脊髄性筋萎縮症の病態解析と治療研究に用いるツールとして利用するために、脊髄性筋萎縮症患者由来 iPS 細胞樹立を行った。当初はレトロウイルスによる山中 4 因子の導入方法を使用した。その後、染色体への遺伝子の integration が問題となることから、当たらにエピソードベクターによる遺伝子導入方法で樹立を行った。エピソードベクターによる遺伝子導入方法は、ウイルスを使わないため簡便であるだけでなく、染色体へのインテグレーションがなく、phenotype への影響が少ないため、病態解析に適している。今回、条件の良い細胞株を複数樹立することができたため、神経系細胞に分化誘導させ、病態解析、治療研究に応用できるものとする。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症の病態解析・治療研究に用いるツールとして疾患患者由来 iPS 細胞を樹立し、今後の研究に利用することを目的として本研究を行った。

2006 年に山中らが初めて報告した iPS 細胞の樹立方法でレトロウイルスによるいわゆる山中 4 因子の導入方法であった。我々も当初レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いていたが、レトロウイルスベクターの特徴として、染色体内に integration することが細胞の癌化や形質異常に繋がるとされ、アデノウイルスやセンダイウイルスなど、様々な方法による遺伝子導入法が検討されてきた。そこで最終的に、より簡便なエピソードベクターをエレクトロポレーション法で細胞内に導入する手法を用いて iPS 細胞の樹立を試みた。

B. 研究方法

レトロウイルスによる遺伝子導入

マウス細胞にのみ感染する同種指向性ウイルスレセプターSlc7a1 をあらかじめ脊髄性筋萎縮症患者由来皮膚線維芽細胞に導入した。そのために 293FT 細胞に Virapower packaging mix を用いて遺伝子導入し、レンチウイルスを産生さ

せた。得られた培養上清を皮膚線維芽細胞の培養液と置き換えて感染させた。感染効率は同時に行った GFP の導入効率と比較して勘案した。次に Slc7a1 が発現している皮膚線維芽細胞にいわゆる山中 4 因子(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) をレトロウイルストランスフェクションすることにより iPS 細胞に形質転換させた。このために、山中 4 因子を含む pMX ベクタープラスミドを PLAT-E 細胞に導入し、レトロウイルスを産生させた。レトロウイルスを含む PLAT-E 細胞培養上清を 4 種類均等にして、Slc7a1 が発現している皮膚線維芽細胞の培養液と置き換えた。山中 4 因子を感染させた皮膚線維芽細胞は、1 週間後に SNL フィーダー細胞上にまき直し、以後は ES 細胞用培地で培養した。約 3 週間後に現れるコロニーを最低 50 個収穫し、別々に培養した。以後、約 6 週間培養を続け、DNA/RNA を回収し、評価した。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入

pCXLE-hOct3/4-shp53-F 、 pCXLE-hSK 、 pCXLE-hUL の計 3 種類のエピソードベクターを Neon transfectionsystem (Life Technologies) を用いて患者皮膚線維芽細胞に導入した。そして、1 週間後に SNL フィーダー細胞上にまき直し、以後は ES 細胞用培地で培養し

た。約3週間後に現れたコロニーを最低50個収穫し、別々に培養した。以後、約6週間培養を続け、DNA/RNAを回収し、評価した。

iPS細胞の評価

解析に使用できるiPS細胞が得られたかどうかを検証するために、導入した山中4因子のsilencingを確認と内在性多能性因子の発現亢進をRT-PCR法で確認した。エピソーマルベクターを使用したiPS細胞においては、得られたコロニー細胞のDNA中にベクターDNA残存していないかどうかPCR法で検証した。結果により解析に堪え得る細胞を取捨選別し、解析に使用することとした。

（倫理面への配慮）

本研究は学内倫理委員会の承認を得ている。研究計画書に則り書面による説明を家族に対して行い、書面への署名による同意を得て行った。

C. 研究結果

レトロトランスフェクション法、エレクトロポレーション法、いずれにおいても実験に供することができるiPS細胞を樹立することができたが、得られた細胞株はエレクトロポレーション法の方が多かった。

得られたiPS細胞中、プラスミドが残存するものや染色体再構成が認められるものは無かった。

D. 考察

iPS細胞の樹立では、適切なクローンを得ることがその後の分化誘導実験にとって重要となるが、今回エレクトロポレーション法で遺伝子導入することにより、より効率的に条件の良いiPS細胞を得ることができた。今後は病態解析や治療研究に応用する予定である。

E. 結論

エレクトロポレーション法により効率良く脊

髄性筋萎縮症患者由来iPS細胞を樹立することができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi J, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria, and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathol* (in press).
- 2) Yamamoto T, Shimojima K. Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom* (in press).
- 3) Shichiji M, Ito Y, Shimojima K, Nakamu H, Oguni H, Osawa M, Yamamoto T. A cryptic microdeletion including MBD5 occurring within the breakpoint of a reciprocal translocation between chromosomes 2 and 5 in a patient with developmental delay and obesity. *Am J Med genet* (in press)
- 4) Okumura A, Shimojima K, Kubota T, Abe S, Yamashita S, Imai K, Okanishi T, Enoki H, Fukasawa T, Tanabe T, Dibbens LM, Shimizu T, Yamamoto T. PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy. *Brain Dev* (in press)
- 5) Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev* (in press)