

201324138A

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）

小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸ナトリウム

多施設共同医師主導治験準備研究

課題番号 H25-難治等(難)-一般-022

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 齋藤 加代子

平成 26（2014）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸ナトリウム 多施設共同医師主導治験準備研究 -----	3
斎藤 加代子	
II. 分担研究報告	
1. 脊髄性筋萎縮症患者からの生体試料収集に関する研究 -----	11
斎藤 加代子	
2. 脊髄性筋萎縮症患者におけるバルプロ酸投与時の <i>SMN2</i> 遺伝子の反応性 に関する研究 -----	13
西尾 久英	
3. 脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与の臨床評価に関する研究 -----	17
齊藤 利雄	
4. 小児脊髄性筋萎縮症における TRH 療法と治療評価解析に関する研究 -----	20
加藤 善一郎	
5. バイオマーカーとしてのSMN蛋白質測定法に関する研究 -----	23
野本 明男	
6. PCR-RFLP法を用いた <i>SMN1</i> 遺伝子欠失スクリーニングに関する研究 -----	25
中野 今治	
7. 小児の医師主導治験に関する治験デザインと説明と同意に関する研究 -----	28
中島 孝	
8. 「医薬品の医師主導治験の計画及び実施等に係る対応」に関する研究 -----	33
武田 伸一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	43

I. 総括研究報告

小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸ナトリウム 多施設共同医師主導治験準備研究

研究代表者 齋藤 加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

研究要旨

SMN 蛋白質増加機序を持つヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害効果を有するバルプロ酸ナトリウム（VPA）の日本人小児の脊髄性筋萎縮症（SMA）における有効性、安全性の評価を行った。医師主導治験の計画と実施のシステム構築、有効性評価の基準設定、サンプルセンターにおけるバイオマーカーの検討を実施し、治験調整事務局が稼働した。治験実施計画書を作成し、4月の対面助言を受けて、次年度夏より医師主導治験を開始する計画である。

共同研究者

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）

齋藤 利雄（独立行政法人国立病院機構刀根山病院神経内科）

加藤 善一郎（岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学）

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）

中島 孝（独立行政法人国立病院機構新潟病院）

中野 今治（都立神経病院）

武田 伸一（独立行政法人国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナルメディカルセンター）

A. 研究目的

SMN 蛋白質増加機序を持つヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害効果を有するバルプロ酸ナトリウム（VPA）の日本人小児の脊髄性筋萎縮症（SMA）における有効性、安全性の評価を行う。また、治験責任医師、治験分担医師および本治験に参加者における知識の共有を目的として、また本治験の試験デザイン、評価項目を検討するため、会議、研修会、セミナーを開催した。さらに、ホームページを開設し、ニュースレターを発行した。

B. 研究方法

1) 日本人小児の脊髄性筋萎縮症（SMA）における有効性、安全性の評価

2) 会議および研修会の開催
（倫理面への配慮）

人を対象とした臨床研究であり、「ヘルシンキ宣言」、「薬事法」、「GCP省令」、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」、厚生労働省「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」を遵守した。患者の臨床情報の収集に当たっては、文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。本研究では、「脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析研究」（承認番号145）および「遺伝性神経筋疾患患者由来細胞の分子遺伝学・分子生物学的研究」（承認番号2466）、「脊髄性筋萎縮症から樹立したiPS細胞の分化誘導による病態解析と治療研究」（承認番号1777）は、主任研究者の所属施設 東京女子医科大学倫理委員会の承認を得ている。東京女子医科大学附属遺伝子医療センターにおいて、臨床遺伝専門医、臨床心理士、認定遺伝カウンセラーによる遺伝カウンセリング、インフォームドコンセントの体制が整っており、患者への十分な説明とサポート体制をとって本研究を実施した。利益相反はない。

C. 研究結果

1) 日本人小児の脊髄性筋萎縮症（SMA）における有効性、安全性の評価

下記の3つのプロジェクトを進めた。

(1) 医師主導治験の計画と実施のシステム構築

斎藤（加）：治験調整事務局を開設し、PMDA 薬事戦略相談、事前面談を2回受け、平成26年4月4日に対面助言を受ける予定である。

武田：国立精神・神経医療研究センタートランスレーショナル・メディカルセンターにおける医師主導治験の計画・実施等に関するポイントを抽出した。

中島：小児に対する医師主導治験における治験デザイン、説明と同意のあり方を検討した。

(2) 有効性評価の基準設定

中野：SMA の診断の確定が本治験の条件となる。PCR-RFLP 法を *SMN1* 遺伝子欠失スクリーニングとして I 型 65.4%、II 型 93.8%、III 型 23.8%、IV 型 0%に欠失を認めた。

斎藤（利）：SMA に対する VPA 投与の先行研究8件をレビューした。小児においては運動発達の影響を考慮する必要性、運動機能評価の開発、バイオマーカーの開発の必要性を論じた。

加藤：TRH 療法を実施した小児 SMA 2例において、3次元運動解析を行い、姿勢の安定、歩行速度改善を確認した。

(3) サンプルセンターにおけるバイオマーカーの検討

斎藤（加）：VPA の有効性評価の指標としてバイオマーカーの開発のため、生体試料の収集を行った。SMA I 型患者由来線維芽細胞で VPA 投与による SMN 蛋白質の有意な上昇を観察した。

野本：SMN 蛋白質の検出法として抗 SMN 抗体による免疫組織化学染色法を確立した。

西尾：白血球の SMN2 転写産物量を指標として VPA に対する反応性を調べ、full length SMN 転写産物の増加と $\Delta 7$ SMN 転写産物の減少を認めた。VPA の有効性規程因子としての CD36 も検討した。

2) 会議、研修会、セミナーの開催

(1)2013年11月2日（土）於：ステーションコンファレンス東京 605 会議室「小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸ナトリウム多施設共同医師主導治験第1回班会議・キックオフミーティング」

- ・患者登録について（斎藤加代子）
 - ・脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与：臨床評価オーバービュー（齊藤利雄）
 - ・脊髄性筋萎縮症におけるTRH療法と3次元運動解析（加藤善一郎）
 - ・脊髄性筋萎縮症のバイオマーカー（西尾久英）
 - ・SMA患者由来皮膚細胞を使用したバルプロ酸ナトリウムの効果判定（野本明男）
 - ・医薬品の医師主導治験について（福田昂一）
 - ・医師主導治験とは何か（進め方とポイント）
- 希少性神経筋難病に対する医療機器治験の経験から（中島孝）



(2) 2013年12月15日（日）於：東京女子医科大学附属遺伝子医療センター「SMAセミナー 伸ばそう、SMAの可能性」

- ・SMAという疾患の特性をどのように活かすか？（浦野真理）
- ・知的能力についての分析研究への参加協力をお願い（荒川玲子）
- ・SMAの治験について（斎藤加代子）

SMA患者登録システムへの登録者および脊髄性筋萎縮症（SMA）家族の会を対象として、セミナーを開催した。



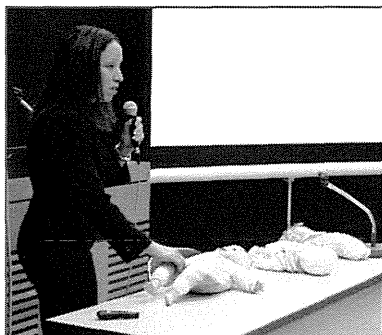
(3)2014年1月18日（土）於：東京国際フォーラム
ガラス棟G602「SMAの運動機能評価に関する研修
会」

【講演】SMAにおける評価基準：疾患による負担
と治療による利益を評価する

【実習】Hammersmith運動機能評価スケール拡大
版(HFMSE)、SMA II型、III型の評価

【実習】Philadelphia小児病院の神経筋疾患乳児
版テスト

臨床評価の均霑化を目的として、コロンビア大学
の理学療法士であるJacqueline Montes, PT, EdD,
NCS を招聘した。本研修会を受講し、修了証を受
けた理学療法士がHFMSEおよびCHOP INTENDの評
価を行う体制とすることとなった。



(4)2014年2月26日（水）於：国立病院機構刀根山
病院「小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルブ
ロ酸ナトリウム多施設共同医師主導治験拠点会
議」

スケジュール、組み入れ基準、評価項目について、
検討を行った。

(5)2014年3月2日（日）於：東京女子医科大学
附属遺伝子医療センター「小児期発症脊髄性筋萎
縮症に対するバルプロ酸ナトリウム多施設共同
医師主導治験サンプルセンター会議」

・小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸

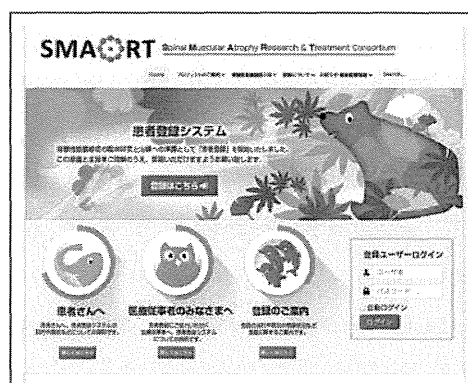
ナトリウム多施設共同医師主導治験準備研究に
おけるサンプルセンター（斎藤加代子）

・バルプロ酸治療時の *SMN2*mRNA 測定について（西
尾久英）

・多施設共同医師主導治験における SMN タンパク
質測定について（荒川玲子）

採血量、測定方法や検体処理方法について、検
討を行った。

2) ホームページの開設とニュースレターの発行
患者への情報提供と目的として、ホームページ
を開設した。<http://www.sma-rt.org/>



患者登録システム登録者へニュースレターを発
行した。

D. 考察

医師主導治験の計画と実施のシステム構築、有
効性評価の基準設定、サンプルセンターにおける
バイオマーカーの検討を実施し、治験調整事務局
が稼働した。治験実施計画書を作成し、4月の対
面助言を受けて、次年度夏より医師主導治験を開
始する計画である。

E. 結論

日本人小児脊髄性筋萎縮症(SMA)におけるVPA
の有効性、安全性の評価の準備が整った。バイ
オマーカーの確立が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤万由里、斎藤加代子、大澤眞木子, 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 (臨時増刊):E52-E57.
- 2) 浦野真理、斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症の遺伝カウンセリング, 東女医大誌 2013;83 (臨時増刊):E651-E655.
- 3) 斎藤加代子、浦野真理, 神経筋疾患における小児医療から成人医療への移行: 遺伝子診断および遺伝カウンセリングを通じた介入, 診断と治療 2013;101(12):1887-1890.
- 4) 斎藤加代子、久保祐二, III変性疾患 運動ニューロン疾患 脊髄性筋萎縮症 5 番染色体性劣性遺伝性脊髄性筋萎縮症 脊髄性筋萎縮症 0 型, 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ NO.27, 2014:530-532.
- 5) Toyota K, Ogino D, Hayashi M, Taki M, Saito K, Abe A, Hashimoto T, Umetsu K, Tsukaguchi H, Hayasaka K. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease complicated with focal segmental glomerulosclerosis. J Peripher Nerv Syst 2013;18:97-98.
- 6) Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, Kubo Y, Takeuchi A, Saito T, Takeshima Y, Tohyama Y, Tay SK, Low PS, Saito K, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy: From gene discovery to clinical trials. Ann Hum Genet 2013;77(5):435-463.
- 7) Sato Y, Yamauchi A, Urano M, Kondo E, Saito K. Corticosteroid therapy for duchenne muscular dystrophy: improvement of psychomotor function. Pediatr Neurol 2014;50:31-37.
- 8) Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H.

Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. Brain Dev 2014; in press.

- 9) 斎藤加代子, 遺伝カウンセリング, 小児神経学の進歩, 2013:13-21, 診断と治療社, 東京.
- 10) 斎藤加代子、久保祐二, 脊髄性筋萎縮症, すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患, 2013: 116-124, 中山書店, 東京.
- 11) 斎藤加代子, 第23章神経筋疾患, 標準小児科学第8版(内山聖監、原寿郎・高橋孝雄・細井創編), 2013:671-689, 医学書院, 東京.

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子, 神経筋疾患を抱える子ども達の思春期の課題, 日本小児科学会, 2013. 4. 20, 広島
- 2) 久保祐二、伊藤万由里、青木亮子、斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症におけるSMN遺伝子のcopy数の解析と遺伝カウンセリング学会への応用, 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013. 6. 21, 川崎
- 3) 浦野真理、斎藤加代子, 出生前診断に関わる遺伝カウンセリング—当センターの経験から—, 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013. 6. 22, 川崎
- 4) 斎藤加代子, 遺伝医療の将来と未来, 第4回遺伝カウンセリング研修会, 2013. 7. 13, 京都
- 5) 久保祐二、山本友人、森川悟、西尾久英、中島秀樹、大下智彦、倉重毅志、斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症者における新たなSMN1遺伝子単離法による新規遺伝子変異の同定, 第20回日本遺伝子診療学会, 2013. 7. 20, 浜松
- 6) 荒川玲子、久保祐二、青木亮子、斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症のSMN2遺伝子コピー数がシムプロ酸投与時のSMNタンパク質発現量に与える影響, 日本人類遺伝学会第58回大会, 2013. 11. 22, 仙台
- 7) 浦野真理、斎藤加代子, 神経筋疾患をもつ子どもたちの思春期の課題, 日本人類遺伝学会第58回大会, 2013. 11. 22, 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

申請中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

脊髄性筋萎縮症患者からの生体試料収集に関する研究

研究代表者 斎藤加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長・教授

研究要旨

バルプロ酸ナトリウムの効果判定におけるバイオマーカーの確立および *in vitro* 治療効果予測モデル作成のため、脊髄性筋萎縮症(SMA)患者からの生体試料収集を進めている。樹立した SMA I 型患者由来線維芽細胞において、バルプロ酸ナトリウム投与による SMN タンパク質の有意な上昇が認められた。さらに樹立した患者由来リンパ芽球、末梢血単核細胞において、免疫染色法による SMN タンパク質の検出が可能となった。

共同研究者

荒川玲子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

青木亮子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

浦野真理（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）

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）

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）

樹立した細胞において、*SMN2* 遺伝子コピー数を MLPA 法で解析した。

線維芽細胞においては、正常線維芽細胞および、I 型患者由来線維芽細胞に VPA を 0.1mM、1mM、10mM の濃度で 24 時間投与し、投与前後の SMN タンパク質量を ELISA 法、ウエスタンブロット法で定量解析した。

リンパ芽球および PBMC においては、抗 SMN 抗体(mouse monoclonal anti-SMN antibody 2B1, BD)を用いた免疫染色法を用いて、SMN タンパク質の発現解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京女子医科大学倫理委員会の承認のもと、本人もしくは代諾者の同意を得た上で行った。

A. 研究目的

バルプロ酸ナトリウム(VPA)効果判定におけるバイオマーカーの確立および *in vitro* 治療効果予測モデル作成のため、脊髄性筋萎縮症(SMA)患者からの生体試料収集を行っている。収集した試料を用いて患者由来細胞における、VPA への反応性の差異と、信頼性の高い SMN タンパク質検出法の確立を目的とする。

B. 研究方法

SMA 患者皮膚細胞から線維芽細胞を樹立した。SMA 患者および保因者のリンパ球からは EB ウイルスを用いた不死化培養細胞株を樹立した。さらに SMA 患者および保因者の血液から末梢血単核細胞(PBMC)を分離した。

C. 研究結果

SMA I 型 2 名の皮膚細胞から線維芽細胞を樹立した。樹立した線維芽細胞は、MLPA 法により、*SMN1* 遺伝子欠失・*SMN2* 遺伝子 3 コピーの細胞(3 コピー細胞)と *SMN1* 遺伝子欠失・*SMN2* 遺伝子 2 コピーの細胞(2 コピー細胞)であることが判明した。線維芽細胞における VPA 投与前の SMN タンパク質発現量は、ELISA 法での正常線維芽細胞での発現量を 1 とすると、3 コピー細胞では 0.8、2 コピー細胞では 0.4 であった。VPA10mM 投与により 3 コピー細胞および 2 コピー細胞は共に SMN タンパク質の有意($p < 0.05$)な上昇を認めた。

さらに、ウエスタンブロット法においても同様の SMN タンパク質発現上昇の結果を得た。

SMA 患者の血液サンプルからリンパ球を採取し、EB ウイルスにより、I 型 4 例 II 型 17 例, III 型 9 例の不死化培養細胞株を樹立した。また、SMA I 型 1 名、II 型 1 名、III 型 1 名および保因者（それぞれの両親）、正常コントロール 1 名から血液サンプルを採取し、それぞれ PBMC を分離した。SMA 患者、保因者およびコントロールリンパ芽球、SMA 患者、保因者およびコントロール PBMC を用いて、免疫染色法による SMN タンパク質の検出が可能となった。

D. 考察

線維芽細胞、リンパ芽球および、PBMC における SMN タンパク質の検出が可能となった。現在、リンパ芽球および、PBMC における SMN タンパク質定量解析の手法について、検討を進めている。さらに、*in vitro* における治療効果予測モデルとして、リンパ芽球にバルプロ酸ナトリウムを投与し、SMN タンパク質の発現変化を症例ごとに検討していく。

E. 結論

SMA 患者由来リンパ芽球、線維芽細胞を樹立し、血液由来 PBMC の採取法を確立した。I 型患者由来線維芽細胞では、VPA 投与により SMN タンパク質の発現増加が認められた。さらにリンパ芽球および PBMC における SMN タンパク質発現解析が可能となった。

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

荒川玲子、久保祐二、青木亮子、斎藤加代子、脊髓性筋萎縮症患者の SMN2 遺伝子コピー数がバルプロ酸投与時の SMN タンパク質発現量に与える影響, 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013. 11. 20-23, 仙台

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におけるバルプロ酸投与時の *SMN2* 遺伝子の反応性に関する研究 研究分担者 西尾久英 神戸大学大学院医学研究科疫学分野

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（SMA）患者に対してバルプロ酸（VPA）治療が行われるようになった。しかし、SMA 患者の VPA に対する反応性はさまざまである。今回、研究者らは、白血球の *SMN2* 転写産物量を指標にして、VPA に対する反応性を調べた。また、細胞表面の膜蛋白質である CD36 と VPA 反応性と関連性についても検討した。

共同研究者

齊藤利雄（国立病院機構 刀根山病院）

藤井達哉（滋賀県立小児保健医療センター）

A. 研究目的

近年、脊髄性筋萎縮症（SMA）に対して、抗てんかん薬として知られるバルプロ酸（VPA）の投与が行われるようになった。これは、VPA がヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤として遺伝子プロモーターを活性化することを利用し、SMA 患者に残存する *SMN2* 遺伝子のプロモーターを活性化し、その転写を促進させる戦略に基づく治療法である。しかし、SMA 患者の VPA に対する反応性はさまざまである。今回、私たちは、白血球の *SMN2* 転写産物量を指標にして、VPA に対する反応性を調べた。また、細胞表面の膜蛋白質である CD36 と VPA 反応性と関連性についても検討した。

B. 研究方法

（1）対象

患者 1 は 15 歳女児。1 型 SMA と診断されている。寝たきり、気管切開・24 時間人工呼吸器管理。*SMN1* 遺伝子欠失、*NAIP* 遺伝子欠失。*SMN2* 遺伝子 2 コピー。VPA は 8 mg/kg/day を投与。VPA 投与後筋力増強の印象あり。

患者 2 は 6 歳女児。2 型 SMA と診断されている。座位保持可能。*SMN1* 遺伝子欠失、*NAIP* 遺伝子残存、*SMN2* 遺伝子 3 コピー。VPA は 20 mg/kg/day を投与。VPA 投与後運動機能改善。

（2）検体採取、RNA 抽出、cDNA 合成

検体の採取、輸送には RNA 検査用の容器（PAXgene Blood RNA Tube: PreAnalytiX）を用いた。RNA 抽出には Total RNA 抽出用試薬（Sepasol-RNA: ナカライテスク）、cDNA 合成には cDNA 合成キット（Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit: Roche）を用いた。

（3）転写産物の定量

リアルタイム PCR 法で定量した。ここでは、内在性の GAPDH 転写産物をキャリブレーターとし、PCR 効率を考慮しない相対定量法を用いた。測定は 3 回繰り返し、その平均値を採用した。

Total-*SMN* 転写産物（エクソン 1-2 b）測定に用いたプライマーは、GCTATGGCGATGAGCAGCGGC および GTTGTAAAGGAAGCTGCAGTA である。

FL-*SMN* 転写産物（エクソン 7-8）測定に用いたプライマーは、GAAGTGCTCACATTCCTTAAAT および ATCAAGAAGAGTTACCCATTCCA である。

Δ7-*SMN* 転写産物（エクソン 5-6/8）測定に用いたプライマーは、CCACCACCCCACTTACTATCA および GCTCTATGCCAGCATTTCCATA である。

CD36 転写産物（エクソン 6-7）測定に用いたプライマーは、ATCCATATCTATCAAAATC および TCGATTATGGCAACTTTAC である。

GAPDH 転写産物（エクソン 2-4）測定に用いたプライマーは、GAGTCAACGGATTTGGTCGT および GACAAGCTTCCCGTTCTCAG である。

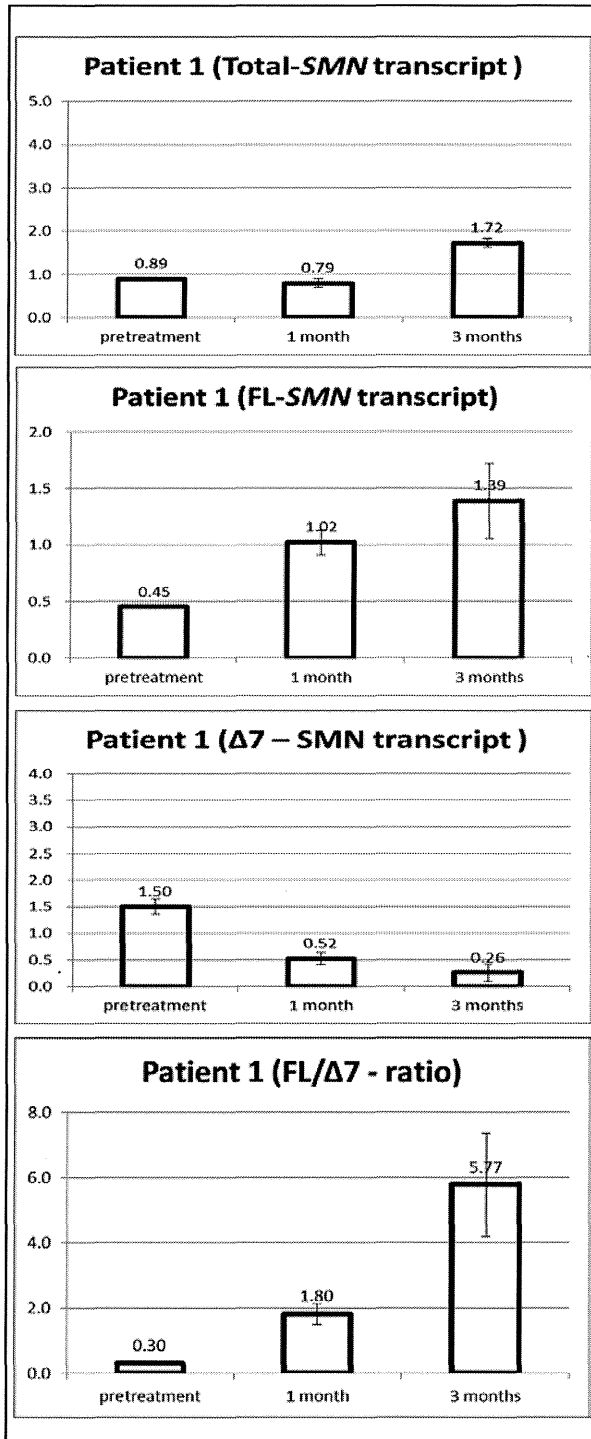
（倫理面への配慮）本研究は神戸大学医学倫理委員会による承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) 患者 1

1-1) VPA 投与前の CD36 は 5.3 単位であった。
投与開始 1 か月後と 3 か月後の VPA 血中濃度は、
それぞれ 33.4 と 44.4 ($\mu\text{g/ml}$) であった。

1-2) SMN 転写産物量の変化を図 1 に示した。

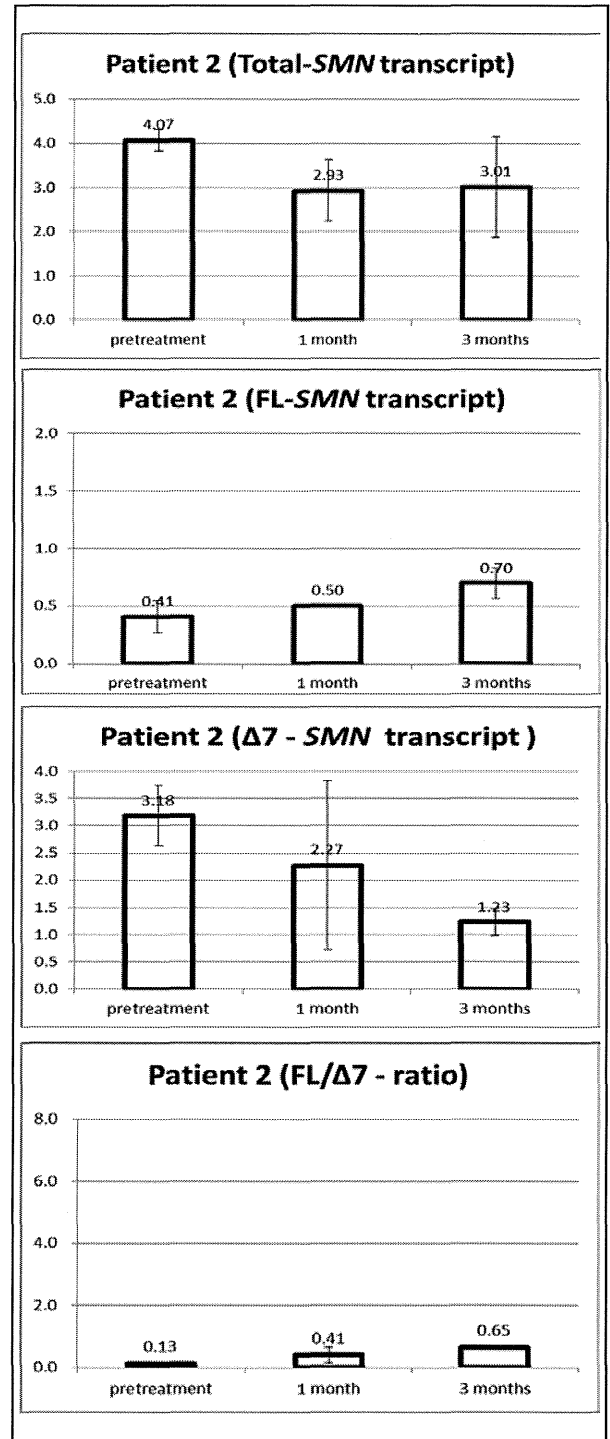


(図 1) 患者 1 の SMN 転写産物

(2) 患者 2

2-1) VPA 投与前の CD36 は 1.6 単位であった。
投与開始 1 か月後と 3 月後の VPA 血中濃度は、
それぞれ 94.3 と 87.2 ($\mu\text{g/ml}$) であった。

2-2) SMN 転写産物量の変化を図 2 に示した。



(図 2) 患者 2 の SMN 転写産物

D. 考察

(1) バイオマーカーとしての SMN2 転写産物量

私たちは、白血球の SMN2 転写産物量を指標にして、VPA に対する反応性を調べた。今回の対象となった患者 2 名は、いずれも、FL-SMN 転写産物量の増加傾向と Δ 7-SMN 転写産物量の減少傾向を認めた。また、患者のケアをしている人たちからの報告では、それぞれの患者の筋力は増強し、運動量が増加したことも事実のようである。これらのことより、ある患者には、VPA が有効であることは確かである。

しかし、今回の研究で、白血球の SMN2 転写産物量を指標にした時に留意すべき点も明らかになった。それは、① 白血球の SMN2 転写産物量は、個人によってかなりばらつく（不規則に分布する）こと、② 患者 2 のように、VPA によって Total-SMN 転写産物量が増加せず、むしろ減少する例もあること、③ VPA は SMN2 遺伝子のスプライシング修正にも働くことも期待できること等の点である。

そもそも、VPA 治療は、SMA 患者に残存する SMN2 遺伝子のプロモーターを活性化し、その転写を促進させる戦略に基づくものであった。しかし、上記の②のような現象もあり、VPA は SMN2 遺伝子の転写活性を常に促進するとは限らないようである。

上記の③については、Brichta らも「VPA が SMN2 遺伝子のスプライシング修正にも働く」と示している (Human Molecular Genetics, 2003)。このことは、VPA がスプライシングに関連する蛋白をコードする遺伝子にも働いていることを示唆している。私たちも、以前の研究で、VPA 投与によってスプライシング関連蛋白の発現が変化していることを示してきた (Harahap et al. Brain and Development, 2011)

以上、VPA の効果は SMN2 遺伝子の転写活性を常に促進するとは限らないことを考慮すると、VPA の効果を評価する目的で SMN2 転写産物量を

バイオマーカーとして用いる際には、FL-SMN 転写産物量の増加と Δ 7-SMN 転写産物量の減少を指標にするのが良いだろうと思われる。

(2) CD36 と VPA 反応性について

Garbes らは、CD36 が VPA に対する反応性を規定する因子であることを報告している (Human Molecular Genetics, 2012)。彼らは、CD36 が多く発現している SMA 患者では、VPA に対する反応性が乏しいことを示した。しかし、今回の私たちの観察によれば、患者 1 の CD36 発現は多く、患者 2 の CD36 発現は少なかった。二人の患者はともに VPA に対する反応があったことを考えると、CD36 発現の多寡のみが VPA 反応性を規定するのではなさそうである。

また、CD36 が栄養代謝に関わる膜蛋白であることや、CD36 発現の多かった患者 1 が胃腸栄養であったことも考え合わせると、CD36 の評価においては注意しなければならない点が多い。したがって、CD36 発現と VPA に対する反応性の関連については、今後の多数例について、栄養状態も含めた検討が不可欠であろう。

E. 結論

多数例の検討が出来ていないものの、今回の患者については、FL-SMN 転写産物量の増加と Δ 7-SMN 転写産物量の減少が認められ、臨床症状についても改善があった。これらのことは、VPA 治療を推進する根拠となり得るものである。

また、CD36 発現と VPA に対する反応性の関連は明らかでなかった。今後、多数例について、栄養状態も含めた検討が不可欠であろう。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nishio H. PLS3 expression and SMA phenotype: a commentary on correlation of PLS3 expression with disease severity in children with spinal muscular atrophy.

Journal of Human Genetics, 2013 in press

(2) Yamamoto T, Sato Hideyuki, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. Brain & Development, 2013 in press

(3) Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, Kubo Y, Takeuchi A, Saito T, Takeshima Y, Tohyama Y, Tay SK, Low PS, Saito K, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials. Ann Hum Genet, 2013, 77(5):435-463.

2. 学会発表

(1) Dian Kesumapramudya Nurputral, Hiroyuki Morita, Hisahide Nishio, Yumi Tohyama. Abnormal acetylation status of α -tubulin in fibroblasts derived from SMA patients (第60回 日本生化学会近畿支部例会 日時: 2013年5月18日(土)、会場: 大阪大学 吹田キャンパス、要旨集 p73)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与の臨床評価に関する研究

研究分担者 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

脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するバルプロ酸(VPA)投与の既報告の分析を行った。既報告の殆どはオープンラベルで行われ、遺伝子発現、運動機能、呼吸機能などが評価項目としてあげられていたが、SMAに対するVPA投与の効果は一定していなかった。SMAに対するVPA投与の医師主導治験にあたっては、運動機能評価を中心とした臨床評価法の開発、バイオマーカー開発が望まれる。

共同研究者

宗重絵美, 山本洋史, 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)

土江宜子, 松井仁美 (国立病院機構刀根山病院 治験管理室)

A. 研究目的

本研究班で施行する、脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するバルプロ酸(VPA)投与の医師主導治験でのプロトコル作成に資するために、既報告の分析を行う。

B. 研究方法

SMAに対しVPA投与を行った8報告を対象とし、Phase, 対象病型, 年齢, VPA投与量, 投与期間, 評価法, 結果などをsummarizeした。

(倫理面への配慮)

既報告の検討であり、倫理的問題は生じない。

C. 研究結果

対象病型のほとんどは2, 3型であった。年齢は小児から成人と幅広く1.5~45歳であった。

VPAの投与量は、抗てんかん薬での投与量、血中濃度を参考に決められていた。5つの報告では、カルニチンが併用されていた。二重盲検試験は1報告で、他報告はオープンラベルであった。薬剤投与期間は4週~1年であった。

6つの報告で、SMN転写あるいは蛋白レベルの評価がされていた。VPA投与で、SMN mRNA 増加

の報告が2例、蛋白量の増加の報告が1例あったが、他報告では変化はなかった。

運動機能は、Hammersmith Functional Motor Scale (HFMS)あるいはModified Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (MHFMS)が5つの報告で用いられ、筋力評価も4つの報告で用いられていた。Weihlは3, 4型患者での運動機能改善を報告したが、Darbarは、3型でのHFMSでの変化はなかったとしていた。一方、Swobodaは、2型の評価でMHFMSの改善は、5歳以下の小児に限るとし、さらに他報告で2-3歳のみに限られるとした。また、Saitoは、2歳症例でのMHFMS改善を報告した。

呼吸機能の改善を報告した報告は2報告であったが、うち1報告は、成長発達の影響も否定できない症例であった。

D. 考察

小児・成人両者を含む既報告の概観では、SMAに対するVPA投与の効果は一定していなかったが、(自験例Saitoでの印象も手伝い、)小児例に対しては有効性の評価を行う必要があると考えられる。しかしながら、SMAは稀少疾患であり、治験に当たってはコントロール設定に配慮が必要であること、小児対象であるので、投与期間、評価期間は、運動発達の影響も考慮し決定する必要があることなど、解決すべき課題がある。さらに、既存の評価法では検出できない程度の運動機能変化が検出できるような運動機能評価

を中心とした臨床評価法の開発，バイオマーカー開発などが望まれる。

E. 結論

SMA に対する VPA 投与の医師主導治験にあたっては，臨床評価法の開発，バイオマーカー評価法開発が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

齊藤利雄. 神経筋疾患による脊柱変形に対す

る脊椎外科治療アンケート調査. Journal of Spine research. 5 (1): 2014.

2. 学会発表

12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology (Riyadh, Saudi Arabia)

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

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等研究事業（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

Author	Clinical trial phase	VPA	Carnitin	SMA type	N	Age	Evaluation					Results	Conclusion	year
							Duration	Motor function	PFT	SMN	others			
Weihl et al.	open	administration 500-1000mg/day mean serum level 87 µg/ml	-	3,4	7	17-45 years old (mean 17 years old)	1-15 months (mean 8 months)	muscle strength	-	-	-	Improvement of motor strength and subjective benefit	Valproate treatment is efficacious in adult SMA III/IV patients	2006
Brichta, et al.	open	administration 1200-1800 mg/day serum level 70-100 mg/l.	-	carrier	10		>5 weeks	-	-	-	SMN protein analysis SMN2 messenger RNA (Blood)	Seven of 10 carriers demonstrated increased SMN messenger RNA and protein levels. SMN2 messenger RNA levels were elevated in 7 patients	Long-term clinical trials in SMA patients that correlate SMN expression in blood with individual motor function tests are required.	2006
		control		10	32.3 ± 6.2 years old	> 4weeks	SMN2 messenger RNA (blood)							
		1		5	1.6±0.9 years old									
		2		11	10.3±7.1 years old									
		serum level 38-99 mg/l.		3	4	20.8±6.9 years old								
		serum level 47.9-98.3mg/l												
		serum level 58.5-99.0mg/l												
Swoboda, et al.	open	serum level 50-100 mg/dl	50mg/kg/day	1	2	2-3 years old	6months	MHFMS	FVC, FEV1, MEP, MIP	quantitative blood SMN mRNA levels	CMAP, DEXA, DEXA	Significant improvement was almost entirely restricted to participants under 5 years of age. Full length SMN levels were unchanged	Weight gain and carnitine depletion are likely to be significant confounding factors	2009
				2	29	2-14 years old								
				3	11	2-31 years old								
Piepers, et al.	open	serum level 70-100mg/ml	-	2,3	6	1.5-16.5 years old	4 months	-	-	SMN protein concentration	SMN protein levels increased significantly in five of six	SMN protein quantification by ELISA is a useful tool	2010	
Swoboda, et al.	double blind	serum level 50-100 mg/dl	50mg/kg/day (maximum of 1000mg)	2,3	30	1.8-8.7 years old (mean 4.3 years old)	6+6months	MHFMS, Myometry	FVC, FEV1, MEP, MIP	quantitative assessment of SMN mRNA;	CMAP, DEXA, PedsQL	Children ages 2-3 years that received 12 months treatment had significantly improved MHFMS scores. However, no change of QOL, CMAP, myometry measurements, and SMN. PFT not associate with VPA. Excessive weight gain adverse event.	No benefit of treatment with VPA and L-carnitine in young nonambulatory SMA. Weight gain, age and	2010
		(placebo)	(placebo)		31	2.1-7.9 years old (mean 4.4 years old)	placebo 6 months + VPA 6months							
Kissel, et al.	open	serum level 50-100 mg/dl	50mg/kg/day (1000 mg)	2,3 standers and walkers	33	2.8-16.3 years old (median 6.9 years old)	12months	Primary outcomes: MHFMS-Extend, TTF, FMM, Myometry	FVC, FEV1, MEP, MIP	quantitative assessment of SMN mRNA;	CMAP, DEXA, PedsQL	Weight gain of 20% above body weight occurred in 17%. No significant change in any primary outcome. No significant change of PedsQL and SMN transcript level. FVC, FEV1 showed improvement at one year as expected with normal growth	VPA is not effective in improving strength or function in SMA children.	2011
Darbar IA, et al.	open	administration 20mg/kg/day	100mg/kg/day	2,3	22	2-18 years old (mean 5.5 years old)	1 year	MRC method, HFMS	-	-	Barthel index	Gained no muscle strength. SMA type 2 significant gain of HFMS, not type 3. Improvement of Barthel index.	VPA may be a potential alternative to ameliorate the prgression of SMA	2011
Saito, et al.	open	serum level 50-100 mg/dl	100mg~200mg/day	2,3	7	2 year and 10 month-42 years old	6 months	MHFMS	VC, MIC, CPF	quantitative assessment of transcription amount of SMN.	-	Quantity of FL-SMN transcription product showed a tendency to increase with valproate. Improvement tendency of MHFMS especially in younger-age patient. There was a greater number of respiratory function improvement items in cases with optimal VPA blood level.	The examination of an adaptation case of the valproate administration and the effective judging method is necessary.	2012-2013

CMAP, maximum ulnar compound muscle action potential; DEXA, dual-energy X-ray absorptiometry; FEV1, forced expiratory volume in 1 second; FMM, fine motor modules; FVC, forced vital capacity; HFMS, Hammersmith Functional Motor Scale; MEP and MIP, maximum expiratory and inspiratory pressures, respectively; MHFMS-Extend, Modified Hammersmith Functional Motor Scale-Extend; MRC method, Medical Research Council method; PedsQL, Pediatric Quality of Life Inventory; PFT, pulmonary function testing; TTF, timed tests of function;

小児脊髄性筋萎縮症における TRH 療法と治療評価解析に関する研究

研究分担者 加藤善一郎 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 臨床教授

研究要旨

脊髄性筋萎縮症における有効な治療法は確立されておらず、いくつかの薬剤トライアルが行われてきている。また、運動スケールなど含む評価法(outcome measure)において、それぞれの方法が本質的に抱える多くの問題点（汎用性、再現性、タスク多様性・冗長性、結果の非線形性、共有性、人的コストなど）が存在し、十分に標準化されていない。治験などにおける評価に資する outcome measure としての可能性を検討することを目的とし、小児脊髄性筋萎縮症患者について TRH 療法前後の motion capture を用いた 3次元運動解析を行った。結果として、姿勢の安定、歩行速度改善など客観的な指標により改善が確認された。今後、自然歴の評価・治療評価などを含め、多施設共同研究などにおいても、重要な役割を果たすことが期待される。

共同研究者

秋山治彦（岐阜大学大学院医学系研究科整形外科学）

宮本敬（岐阜大学大学院医学系研究科脊椎骨関節再建外科学）

青木隆明（岐阜大学大学院医学系研究科整形外科学）

加藤忠幸（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

服部良（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

清水紀仁（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

四井康喬（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

大西秀典（岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学）

船戸道徳（長良医療センター臨床研究部神経筋治療研究室）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症における有効な治療法は確立されておらず、いくつかの薬剤トライアルが行われてきている。また、運動スケールなど含む評価法（outcome measure）において、それぞれの方法が本質的に抱える多くの問題点（汎用性、再現性、タスク多様性・冗長性、結果の非線形性、共有性、人的コ

ストなど）が存在し、十分に標準化されていない。治療評価法のひとつとして、モーションキャプチャーによる 3次元運動解析について、治験などにおける評価への応用可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

小児脊髄性筋萎縮症患者における TRH 療法

対象：SMA 同胞患者 2 名（症例 1 III 型 4 歳女児 症例 2：II 型 3 歳男児、）

治療方法：

TRH 療法 点滴静注

入院の上、各種検査・運動解析等を行い、その後、投与量は、初日 0.2mg、2 日目 0.4mg、3 日目 0.6mg を行い、その後、体重あたり 0.1mg/kg/回を連日 5 日間投与し、2 日間休薬し、計 4 週間（20 回）の投与を行った。具体的には、ヒルトニン注射液を生理食塩水 50ml に溶解して、30 分で点滴投与し、開始前から開始後 2 時間まで、医師または看護師による立ち会いのもと、心拍、血圧、酸素飽和度などをモニタリングし、副作用が発現した場合に備えた。

治療効果判定

4 週間の治療を終了したのち、治療前後での治療効果

を判定した。

筋力測定：筋力の測定については、上下肢の屈筋・伸筋について徒手筋力テストを行い、その際、ハンドヘルドダイナモメーター（PowerTrack II）を用いて、筋力を定量した。各筋力について、3回の測定を行い、その平均値・%CVを計算した。%CVが10%を超えるばあいは再度測定を行った。

3次元運動解析：赤外線カメラと特殊マーカーを用いた3次元運動解析を、VICONシステムを用いて行った。

（倫理面への配慮）

岐阜大学医学部倫理委員会にて研究プロトコールについて審査を行い承認されている。本医療行為施行に先立って、担当医は、患者本人と代諾者へ別添した説明文および同意文書を用いて、本医療行為の目的・方法・利益・不利益について直接説明し、同意書にて同意を得る。

C. 研究結果

副作用：脊髄性筋萎縮症におけるTRH投与に関連してみられた副作用として、ヒルトニン点滴静注に伴う一過性の嘔気・腹部違和感などがあるが、経過観察にて改善しており、他の重大な副作用を認めていない。検査値変動としては、ヒルトニン投与期間中におけるTSH低値等がみられたが、終了後速やかに改善している。

治療効果判定

1) 日常動作による変化：家族などからの日常動作における印象では、症例1（III型）においては、歩行時倒れなくなった、投与10日ぐらいから、歩行がとても速くなったと感じた、歩行時、膝を伸ばしたままぎこちなく着地していたのが軽く屈曲してスムーズになったなどの印象が得られた。症例2については、ベッドの柵につかまり、膝立ちにて保持できるようになった、手の上がりがよくなった、中空での腕の保持が容易になったなどの印象が聞かれた。

2) 筋力測定：筋力低下を伴う患者の姿勢同様などを考慮して改善した測定姿勢により行ったが、年少児であることなどから、再現性を得ることが困難であり、

一定した結果を得られず、測定を中断せざるを得なかった。

3) 3次元運動解析：III型患者に関しては、通常の歩行モーションをキャプチャーし、運動指標について治療前後の比較を行った。II型患者に関しては、上肢を側方に上げる動作を10回ずつ行うタスク中のモーションをキャプチャーし、運動の安定性指標などについて治療前後の比較を行った。

モーションキャプチャーを用いた3次元運動解析では、症例1において、歩行姿勢が安定し、歩行速度の著明な改善がみられた。歩行速度の改善は、歩幅が73cmから83cmと10cm広がったことに加え、1分間当たりの歩数が112.9から136.9と大幅に増えたことによる。

症例2においては、上肢をあげる際に身体をねじりながらあげることが非常に目立っていたが、治療後は身体のねじりは明らかに減少し、明らかに腕の軌跡のぶれが減少していた。

D. 考察

脊髄性筋萎縮症は、脊髄前角の運動神経障害を主体とする先天性・進行性の神経疾患であるが、いまだ根本的な治療開発については十分でない現状が続いている。TRHは甲状腺刺激ホルモンの分泌を促すとともに各種細胞の代謝機能を活性化する機能を有し、意識障害をはじめとする中枢神経異常や、脊髄小脳変性症などにおいてその有用性が確立されてきている。

脊髄筋萎縮症におけるTRH製剤の有用性についての症例報告があり（Takeuchi et al 1994）その後、6例について効果が報告されており、可能性が示唆された（Tzeng et al. 2000）。我々も、2001年よりSMAにおけるTRH療法を試行してきているが、静注薬（ヒルトニン）を用いた同治療について実施し、その効果及び安全性について確認し、（山岸ら、2004）。また、その後、TRHアナログ経口薬剤（セレジスト）を用いた治療においても、安全に施行できており、同様の効果が認められたことを報告している（Kato et al. 2009）。今回の研究でも同様の効果・安全性が確認されたことから、TRH静注療法のみならず、