

2014/5030A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 斎藤 加代子

平成 27 (2015) 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. 血液検体を用いた SMN タンパク質定量解析法 -----	11
斎藤 加代子	
2. 脊髄性筋萎縮症の分子遺伝学的研究成果報告： SMN 遺伝子のコピー数解析、変異解析を中心に -----	14
斎藤 加代子	
3. SMA 運動機能評価スケール Expanded Hammersmith Functional Motor Scale (:HFMSE) と CHOP INTEND について -9 例に施行して- -----	19
斎藤 加代子	
4. 脊髄性筋萎縮症スクリーニング法の開発研究 -----	21
西尾 久英	
5. 脊髄性筋萎縮症とケトン体に関する研究 -----	25
齊藤 利雄	
6. 脊髄性筋萎縮症患者の肺活量と咳のピークフローの経年的変化 -----	27
齊藤利雄	
7. Motion Capture を用いた上肢機能定量評価法 -----	30
加藤 善一郎	
8. SMA 及び神経・筋疾患に対するロボットスーツ HAL 医療用の開発戦略と 進捗について -----	34
中島 孝	
9. SMN 蛋白質の新規測定法の開発研究 -----	37
荒川 正行、野本 明男	
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 -----	45

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

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

小児期発症の難治性疾患である脊髄性筋萎縮症（SMA）の病態修飾治療を目的として、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害効果によるSMN蛋白質増加を期待したバルプロ酸ナトリウム（VPA）を用いる多施設共同医師主導治験準備研究（ステップ1）を実施した。また、治験の成功のためにSMAの診断法、バイオマーカーの開発、運動機能評価法の確認、随伴症状の分析も実施した。二施設で治験を施行し、SMN蛋白質増加傾向、運動機能改善結果を得た。二重盲検対照試験 phase II b 検証的治験を実施する根拠を得た。2018年の薬事承認を目指し、小児希少難病治療の時代へ展開する。

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）

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）

加藤善一郎（岐阜大学大学院連合創薬医療情報
研究科）

中島孝（国立病院機構新潟病院）

荒川正行、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）

荒川玲子、久保祐二、梅野愛子（東京女子医科
大学附属遺伝子医療センター）

目指して、下記の検討を行った。

- 1) 診断法の開発
- 2) バイオマーカーの開発
- 3) 運動機能評価法の検討
- 4) SMAにおける随伴症状の分析
- 5) ロボットスーツ HAL 小児モデル（HAL For Child: HAL-FC）の開発研究
- 6) 2施設における医師主導治験（コホート1）
の実施
（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」、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」、文部科学省・厚生労働省「人を対象とする医学系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」、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」を遵守する。治験として企業との関わりの適正な対応のため、「厚生労働科学研究における利益相反（Conflict of Interest: COI）の管理に関する指針」、日本医学会「医学研究のCOIマネジメントに関するガイドライン」を遵守する。本研究において、研究代表者、研究分担者、研究協力者ともに、関連する企業との利益相反はない。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

A. 研究目的

小児期発症の難治性疾患である脊髄性筋萎縮症（SMA）の病態修飾治療を目的として、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害効果によるSMN蛋白質増加を期待したバルプロ酸ナトリウム（VPA）を用いる多施設共同医師主導治験準備研究（ステップ1）を実施した。また、治験の成功のためにSMAの診断法、バイオマーカーの開発、運動機能評価法の確認、随伴症状の分析も実施した。

B. 研究方法

本研究班では多施設共同医師主導治験の実施を

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）は、申請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。

C. 研究結果

1) SMA の診断法の開発

SMA の診療において、より正確で簡単な診断法の開発が必要である。西尾久英は「脊髄性筋萎縮症スクリーニング法の開発研究」において、SMA 患者に有効な治療を行うためには、本疾患の早期診断が重要であり、乾燥濾紙血と PCR を用いた簡便なスクリーニング方法を確立した。斎藤加代子・久保祐二は「脊髄性筋萎縮症の分子遺伝学的研究成果報告：SMN 遺伝子のコピー数解析、変異解析を中心に」において、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法や Long-range PCR 法に sequence 法を加えた SMN1 遺伝子解析を行い、SMN1 遺伝子エクソン 1 に新規ミスセンス変異 (c. 5C>T) を同定し、SMN1 遺伝子エクソン 7 に欠失を示した SMAIII 型 8 症例において hybrid SMN 遺伝子を示す遺伝子変異を同定し、これまで検出できなかった SMN1 遺伝子の微細な変化を捉えられるようになった。

2) バイオマーカーの開発

治験においては、有効性評価のために SMA のバイオマーカーの開発は重要である。荒川正行・野本明男は「SMN 蛋白質の新規測定法の開発研究」において、従来の SMN 蛋白質の定量法を見直し、イメージングフローサイトメトリー法を用いて、新規 SMN 蛋白質測定法を開発した。VPA 投与量依存的に、SMN 蛋白質の発現を有意に亢進し、その細胞内局在を定量化した結果、統計学的に有意に核内に蓄積したことを明らかにした²⁾。斎藤加代子・荒川玲子は「血液検体を用いた SMN タンパク質定量解析法」において、イメージングフローサイトメトリー法を用いて、採血管のまま輸送可能で、全ての有核細胞を対象とした鋭敏な SMN タンパク質測定法を開発した。これらによって、特許

出願中をおこなった（特願 2014-076985）。

3) 運動機能評価法の検討

治験の有効性評価項目として運動機能評価は必須である。今回の治験では、コホート 1 としてバイオマーカー測定を主要評価項目としたが、コホート 2 の二重盲検試験においては、運動機能評価を主要評価項目とする計画である。斎藤加代子・長谷川三希子は「SMA 運動機能評価スケール Expanded Hammersmith Functional Motor Scale (HFMS) と CHOP INTEND について—9 例に施行して」において、座位保持が出来ない症例の場合、粗大運動機能の評価表である HFMS では評価可能な項目が少なく、十分に変化を捉えることができないことが明らかになった。CHOP INTEND は自動運動を評価する為、運動能力に関わらず全ての項目が遂行でき、non-sitter においては CHOP INTEND による評価が適切であることを示した。加藤善一郎は、「Motion Capture を用いた上肢機能定量評価法」において、健常成人の前方拳上運動の繰り返し運動を対象として、負荷の有無で運動軌跡の変化を比較検討した。評価指標として Spatial Deviation と Direction Variance を計算し、それぞれの指標について有意な変化がみられた（共に $p < 0.000$ 、両側 Wilcoxon test による）。

4) SMA における随伴症状の分析

齊藤利雄は、「脊髄性筋萎縮症患者の肺活量と咳のピークフローの経年的変化」において、肺活量 (vital capacity; VC) のピークは 10 歳前後で、その後は徐々に低下し、SMA は咳嗽力低下に起因する気道クリアランス障害を呈すること、さらに軽微な気道感染でも肺炎などの重篤な状態に陥ることを示した。気道感染時はもちろん、日常から呼吸理学療法をおこない、肺合併症を予防することが重要であると考察した。

また、齊藤利雄は、「脊髄性筋萎縮症とケトン体に関する研究」において、全測定数 26 件中総ケトン体値は $33.2 \sim 2260.0 \mu\text{mol/l}$ で、基準値を超えていた 12 件では血糖は 100mg/dl 未満であつ

た。ケトン体によるエネルギー産生が SMN 転写、病状、予後に影響するか検討が必要であったとした。
 5) ロボットスーツ HAL 小児モデル (HAL For Child: HAL-FC) の開発研究

中島孝は「SMA 及び神経・筋疾患に対するロボットスーツ HAL 医療用の開発戦略と進捗について」検討を行い、ロボットスーツ HAL 小児モデル (HAL For Child: HAL-FC) により歩行プログラムを行い、歩行パラメータを測定した。SMA2 型小児の HAL-FC による歩行プログラムによる効果は有望であり、開発研究を進める価値が非常に高いと考えた。

6) 二施設における医師主導治験 (コホート 1) の実施
 東京女子医科大学病院にて 9 例、国立病院機構刀根山病院にて 4 例を治験登録、2014 年 6 月 3 日に治験届提出、7 月 23 日に症例登録開始、2015 年 1 月 21 日まで非盲検治験を実施した。2015 年 1 月 23 日にデータ固定、3 月に解析報告、6 月に総括報告完了予定である。現時点の結果では、SMN 蛋白質定量により、VPA による SMN 蛋白質増加傾向 ($p=0.0574$) をみた。VPA 投与前後の運動機能評価では、I-III 型の HFMSE ($p=0.0430$)、II 型の CHOP-INTEND ($p=0.0141$) と、有意な上昇であった。VPA は 25mg/kg/日が安全で有効な投与量であった。

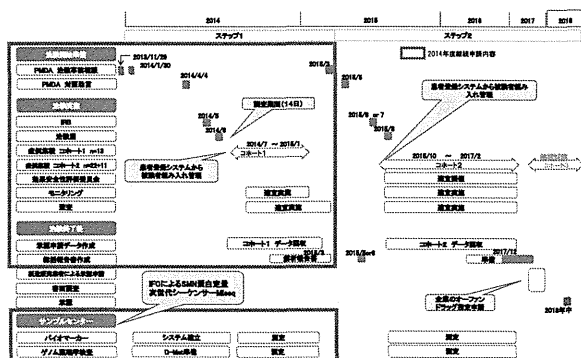


図 1 医師主導治験ロードマップ

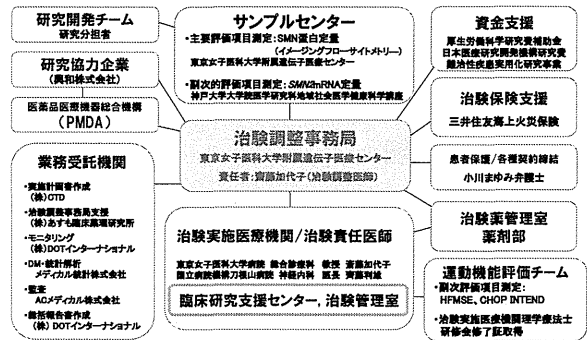


図 2 治験実施体制

D. 考察

SMA の病態修飾治療を目的として、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害効果による SMN 蛋白質増加を期待したバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用いる多施設共同医師主導治験準備研究を実施した。SMA の診断法の開発、バイオマーカーの開発、運動機能評価法の検討、随伴症状の分析を実施した。

二施設における医師主導治験 (コホート 1) において、SMN 蛋白質増加傾向、運動機能改善結果により、運動機能評価を主要評価項目として二重盲検対照試験 phase II b 検証的治験を実施する根拠を得た。2018 年の薬事承認を目指す。患者の便益を考慮し、さらなる多施設共同治験とする。臨床評価均霑化のための研修会、サンプルセンターにてバイオマーカー-SMN 定量、有効性評価項目 outcome measure の検討、有効例・無効例別の次世代シーケンサーによる PGx 検査、根本治療法開発と、さらなる治験体制整備を行う。SMA 治療ガイドラインを作成し、小児希少難病治療の時代へ展開する。

E. 結論

SMA に対して、VPA を用いる多施設共同医師主導治験準備研究を実施し、二施設で治験を施行した。SMN 蛋白質増加傾向、運動機能改善結果により、施設、症例を増やし、二重盲検対照試験 phase II b 検証的治験を実施する根拠を得た。

2018年の薬事承認を目指し、小児希少難病治療の時代へ展開する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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; 36(10):914-920.
- 2) Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 453(3):368-374.
- 3) Saito T, Nurputra DK, Harahap NI, Indra S.K. Harahap, Yamamoto H, Muneshige E, Nishizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S, Saito K, Nishio H. A study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience.* 2014:1-9.
- 4) Kato N, Sa'adah N, Rochmah MA, Harahap NI, Nurputra DK, Sato H, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H, Takeuchi A. SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper : Application of COP-PCR to the SMN1 Deletion Test. *Kobe J Med Sci.* 2014; in press.
- 5) Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa'adah N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. *Brain Dev.* 2014; in press.
- 6) Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *J Hum Genet.* 2015; in press.
- 7) Furukawa Y, Ogawa G, Hokkoku K, Hatanaka Y, Aoki R, Saito K, Sonoo M. Diagnostic use of surface EMG in a patient with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2015; in press.
- 8) Yamada H, Nishida Y, Maihara T, Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Nishimura N, Satio T, Kubo Y, Saito K, Nishio H. Two Japanese patients with SMA type 1 suggest that axonal-SMN may not modify the disease severity. *Pediatr Neurol.* 2015 in press.
- 9) 斎藤加代子. パーソナルゲノム解析の医療応用と遺伝カウンセリングの実践. *医薬ジャーナル*, 2014; 50(3):77-957-961.
- 10) 斎藤加代子. 遺伝子検査施行時の倫理的対応. *周産期医学*. 2014; 44(2):153-156.
- 11) 浦野真理、斎藤加代子. 出生前診断の遺伝カウンセリング. *小児科臨床*. 2014;67(10):1631-1635.
- 12) 久保祐二、伊藤万由理、青木亮子、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症における SMN 遺伝子のコピー数解析と遺伝カウンセリングへの応用.

日本遺伝カウンセリング学会誌. 2014;
10;35(3):99-104.

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子. 遺伝医療：遺伝学的検査と遺伝カウンセリング. 第33回愛媛県小児神経研究会. 2014. 7. 5. 愛媛
- 2) 久保祐二、青木亮子、近藤恵理、斎藤加代子. 次世代シーケンサーを用いた *SMN1* 遺伝子欠失を認めない脊髄性筋萎縮症のゲノム解析. 日本人類遺伝学会第59回大会. 2014. 11. 20. 東京
- 3) 斎藤加代子. 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. 平成26年度厚生労働科学特別研究事業進捗管理班（難治性疾患実用化研究・腎疾患実用化研究・慢性の痛み解明研究）成果報告会. 2015. 3. 13. 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

特許出願中（特願2014-076985）

（発明の名称）

SMN タンパク質の発現を検出する方法

（特許出願日）平成26年4月3日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

血液検体を用いた SMN タンパク質定量解析法

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

治療のない脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対する薬物療法の確立に向けて、血中の SMN タンパク質発現量を鋭敏に測定できる手法の開発が必要である。本研究では、採血管のままでも輸送可能で、全ての有核細胞を対象とした鋭敏な SMN タンパク質測定法を開発した。

共同研究者

荒川玲子、金子芳、大月典子、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 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）

体を反応させた後に、核染色を行い、イメージングフローサイトメトリー (FlowSight、メルク株式会社) で血液細胞における SMN の蛍光強度およびイメージデータを取得、解析ソフト IDEAS を用いて SMN タンパク質発現量の定量解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究の基礎データ集積においては、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

Survival of motor neuron 1 (SMN1) 遺伝子変異による脊髄性筋萎縮症 (SMA) における多施設共同治験のバイオマーカーとして SMN タンパク質を定量解析する手法を開発することを目的とする。

SMA などの希少難病においては、一施設における患者数が少ないため、多施設共同治験として、患者検体を各医療施設から治験サンプルセンターに集約し、一定の技術管理のもとで SMN タンパク質を測定する体制を整える必要がある。そのためには、鋭敏な SMN タンパク質の定量法に加え、日本全国の施設で採取が可能な検体であり、採取後に処理を加えずに検体の移送が可能という条件を満たさなければならない。我々は上記の条件を満たす方法として、いずれの医療機関においても採取が可能な血液を検体として、採血管のまま移送後に SMN タンパク質を鋭敏に定量できる一連の手法を開発した。

B. 研究方法

血液 2ml をヘパリン管で採取し、常温でサンプルセンターへ移送し、赤血球を溶血後に固定する。細胞を洗浄後に細胞膜透過処理を行い、蛍光 (FITC) 標識された抗 SMN モノクローナル抗

C. 研究結果

血液細胞の形状を保ったまま可視化し、解析に適した生細胞のみを抽出し、さらに細胞を大きさと同側方散乱光によりクラスターに分け、SMN タンパク質を定量する手法を開発した（特願 2014-076985）。本手法により、血液検体を採血管のままでも他施設から移送し、治験サンプルセンターで一定の技術管理のもと、鋭敏に SMN タンパク質定量を行うことが可能となった。

D. 考察

これまで血液細胞を用いた SMN タンパク質定量法の報告は、ELISA 法が主体であった。薬剤投与前後で比較をするために、ELISA 法を用いた実験系では、比重で分離した単核球に、凍結保存、融解の操作を加える必要がある。そのため、比重の大きい顆粒球などが解析に含まれず、さらに凍結融解によりタンパク質の抽出効率に影響を与える。本手法では、採血管のまま移送可能なため採血機関での細胞処理手技を必要とせず、

さらに有核細胞全てを対象とした SMN タンパク質の定量が可能となった。

E. 結論

血液検体での鋭敏な SMN タンパク質定量法は、SMA に対する治療効果を判定するバイオマーカーとして重要である。多施設共同医師主導治験において本手法を適用している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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; 36(10):914-920.
- 2) Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 453(3):368-374.
- 3) Saito T, Nurputra DK, Harahap NI, Indra S.K. Harahap, Yamamoto H, Muneshige E, Nishizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S, Saito K, Nishio H. A study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience.* 2014:1-9.
- 4) Kato N, Sa'adah N, Rochmah MA, Harahap NI, Nurputra DK, Sato H, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H, Takeuchi A. SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper : Application of COP-PCR to the SMN1 Deletion Test. *Kobe J Med Sci.* 2014; in press.
- 5) Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa'adah N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. *Brain Dev.* 2014; in press.
- 6) Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *J Hum Genet.* 2015; in press.
- 7) Furukawa Y, Ogawa G, Hokkoku K, Hatanaka Y, Aoki R, Saito K, Sonoo M. Diagnostic use of surface EMG in a patient with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2015; in press.
- 8) Yamada H, Nishida Y, Maihara T, Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Nishimura N, Satio T, Kubo Y, Saito K, Nishio H. Two Japanese patients with SMA type 1 suggest that axonal-SMN may not modify the disease severity. *Pediatr Neurol.* 2015 in press.
- 9) 斎藤加代子. パーソナルゲノム解析の医療応用と遺伝カウンセリングの実践. *医薬ジャーナル*, 2014; 50(3):77-957-961.
- 10) 斎藤加代子. 遺伝子検査施行時の倫理的対応. *周産期医学.* 2014; 44(2):153-156.

- 11) 浦野真理、斎藤加代子. 出生前診断の遺伝カウンセリング. 小児科臨床. 2014; 67(10):1631-1635.
- 12) 久保祐二、伊藤万由理、青木亮子、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症における *SMN* 遺伝子のコピー数解析と遺伝カウンセリングへの応用. 日本遺伝カウンセリング学会誌. 2014; 10;35(3):99-104.

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子. 遺伝医療：遺伝学的検査と遺伝カウンセリング. 第33回愛媛県小児神経研究会. 2014. 7. 5. 愛媛
- 2) 久保祐二、青木亮子、近藤恵理、斎藤加代子. 次世代シーケンサーを用いた *SMN1* 遺伝子欠失を認めない脊髄性筋萎縮症のゲノム解析. 日本人類遺伝学会第59回大会. 2014. 11. 20. 東京
- 3) 斎藤加代子. 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. 平成26年度厚生労働科学特別研究事業進捗管理班（難治性疾患実用化研究・腎疾患実用化研究・慢性の痛み解明研究）成果報告会. 2015. 3. 13. 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

特許出願中（特願2014-076985）

（発明の名称）

SMN タンパク質の発現を検出する方法

（特許出願日）平成26年4月3日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症の分子遺伝学的研究成果報告：
SMN1 遺伝子のコピー数解析、変異解析を中心に

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

臨床症状から脊髄性筋萎縮症（SMA）と診断され、遺伝子診断の指標である survival motor neuron (*SMN*) 遺伝子の欠失を示す症例、示さない症例の両者について Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法や Long-range PCR 法 + sequencing 法を用いて *SMN1* 遺伝子解析を行った。MLPA 法を用いた解析により、*SMN1* 遺伝子の欠失範囲と *SMN2* 遺伝子のコピー数が重症度の差を生む要因であることを示した。また、片アレルの *SMN1* 遺伝子欠失を示した SMAIII型症例において、エクソン 1 に新規ミスセンス変異 (c.5C>T) を同定し、*SMN1* 遺伝子エクソン 7 に欠失を示した SMAIII型 8 症例において、hybrid *SMN* 遺伝子を示す遺伝子変異を同定した。本研究により、これまで検出できなかった *SMN1* 遺伝子の微細な変化を捉えることが可能になり、疾患発症の原因となる様々な遺伝子の変化が明らかになった。

共同研究者

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）

伊藤万由里（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）

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 neuron (*SMN*) 遺伝子であり、*SMN* 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、遺伝子診断の指標である *SMN* 遺伝子の欠失を示す症例、示さない症例の両者について Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法や Long-range PCR 法 + sequencing 法を用いて *SMN1* 遺伝子解析を行い、SMA を引き起こす様々な遺伝子の変化を同定したので報告する。

B. 研究方法

1) *SMN* 遺伝子のコピー数解析研究

対象：患者，SMA I～IV型患者 33例（I型 15例（0～6ヶ月）、II型 7例（7～18ヶ月）、III型 9例（19ヶ月～20歳未満）、IV型 2例（20歳以上））。コントロール，70例（20歳以上）。

MLPA 法を用いたコピー数解析：MLPA 法を用いて *SMN* 遺伝子と近傍の遺伝子のコピー数を測定した。

MLPA：MRC-Holland 社製造の Salsa® MLPA® kit を使用。

2) 新規 *SMN1* 遺伝子解析法による遺伝子変異の同定

対象：患者，互いに血縁関係のない SMA 患者 20例（I型 1例、III型 18例、IV型 1例）を対象とした。コントロール，血縁関係のない 10例。

New Long-Range PCR (nLR-PCR)を用いた *SMN1* 遺伝子解析：*SMN1* 遺伝子の単離は、*SMN2* 遺伝子と異なるエクソン 8 上の 1塩基の違いを利用し、エクソン 1 の 654 bp 上流領域からの LR-PCR 法により *SMN1* 遺伝子領域（28.2 kb）を特異的に増幅し、*SMN1* 遺伝子の全エクソン領域のシーケンスを行った。

（インフォームドコンセント）

20歳以上の対象者についてはインフォームドコンセントにて同意を取得し、20歳未満の対象者についてはインフォームドアセントを得て、同意能力を欠く場合には代諾者から同意を得た。

（倫理面への配慮）

本研究の脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析について、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) *SMN* 遺伝子のコピー数解析研究

SMA 症例 33 症例について、MLPA 法により *SMN* 遺伝子、*NAIP* 遺伝子のコピー数を解析した（図 1）。

1-1) SMA I 型

全症例（15 例）で *SMN1* 遺伝子エクソン 7、エクソン 8 の欠失（0 コピー）を確認した。13.3%（2/15）は *SMN2* 遺伝子エクソン 7 が 3 コピーであった。53.3%（8/15）は *NAIP* 遺伝子エクソン 5 が欠失していた。

1-2) SMA II 型

全症例（7 例）で *SMN1* 遺伝子エクソン 7 の欠失が確認され、28.6%（2/7）は *SMN1* 遺伝子エクソン 8 が 1 コピーであった。42.9%（3/7）は *SMN2* 遺伝子エクソン 7 が 3 コピーであった。14.3%（1/7）だけが *NAIP* 遺伝子エクソン 5 の欠失を示した。

1-3) SMA III 型

全症例（9 例）で *SMN1* 遺伝子エクソン 7 の欠失が確認され、44.4%（4/9）は *SMN1* 遺伝子エクソン 8 が 2 コピーであった。全症例（9 例）で *SMN2* 遺伝子エクソン 7 が 3 コピーを示した。どの症例にも *NAIP* 遺伝子エクソン 5 の欠失は認められなかった。

1-4) SMA IV 型

全症例（2 例）で *SMN1* 遺伝子エクソン 7、エクソン 8 の欠失が確認された。全症例で *SMN2* 遺

伝子エクソン 7 が 3 コピーを示した。どの症例にも *NAIP* 遺伝子エクソン 5、エクソン 13 の欠失は認められなかった。

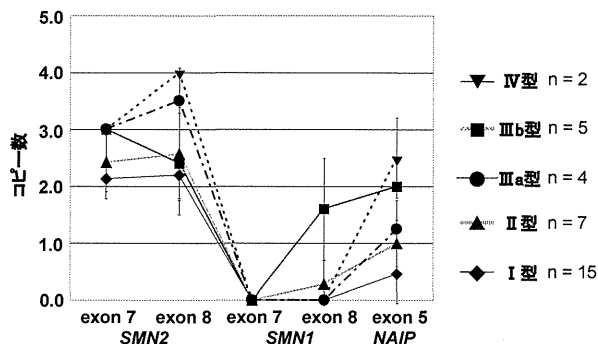


図 1 コピー数解析結果

型別にコピー数の平均値を算出し、グラフ化した。

2) 新規 *SMN1* 遺伝子解析法による遺伝子変異の同定

MLPA 法により片アレルの *SMN1* 遺伝子欠失を示した SMA III 型 3 症例において、nLR-PCR 法を用いて *SMN1* 遺伝子の全エクソン領域シーケンスをしたところ、3 例に共通したエクソン 1 ミスセンス変異 (c.5C>T) を同定した（図 2）。

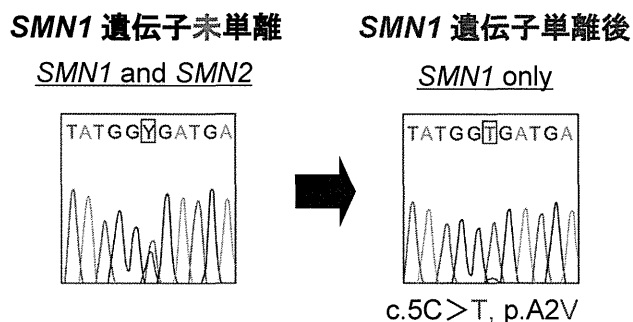


図 2 SMA III 型における新規 *SMN1* 遺伝子変異

SMN1 遺伝子エクソン 7 のみ欠失を示す患者 DNA（9 例）について、nLR-PCR により *SMN1* 遺伝子を単離し、シーケンスを行ったところ、図 3 に示すような 3 つのタイプの Hybrid *SMN* 遺伝子を検出した。

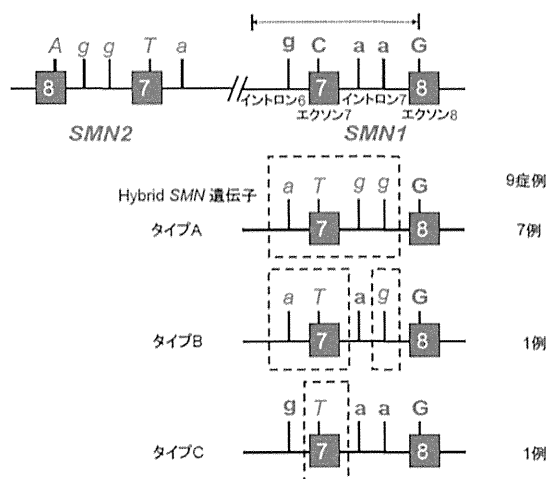


図3 Hybrid SMN 遺伝子の検出

D. 考察

1) SMN 遺伝子のコピー数解析研究

MLPA 法解析により、SMN2 遺伝子のコピー数の変化を確認した（図1）。型別にコピー数の平均値を算出したところ、主に症状が軽くなるに従い、SMN2 遺伝子のコピー数が増加する傾向にあり（図4）、既報告と同様な傾向を示していた。コピー数の増加は遺伝子変換が起こったためと考えられた。

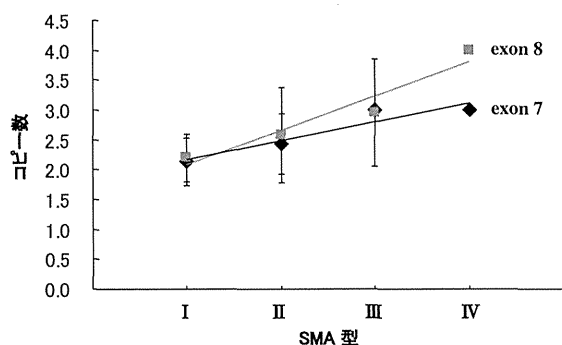


図4 SMAの型と SMN2 遺伝子コピー数の関係

SMAは主に SMN1 遺伝子を失うことで発症するが、SMN1 遺伝子が完全に欠失するか、もしくは上述したような SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子間での遺伝子変換によるものと考えられる。SMN1 遺

伝子を完全に欠失した症例よりも遺伝子変換により SMN1 遺伝子が SMN2 遺伝子に変換した症例のほうが、症状が軽症化する傾向にあった。SMN2 遺伝子は少ないながらも機能的な SMN タンパク質を産生する。SMN2 遺伝子のコピー数が増加することで機能的な SMN タンパク質量が増え、症状の軽症化に繋がるのが考えられた。

2) 新規 SMN1 遺伝子解析法による遺伝子変異の同定

本研究で同定された SMN1 遺伝子変異 (c.5C>T) は *in silico* 解析の結果より有害であると評価された。この変異を有すると比較的軽症型の SMA 症状を呈することが確認された。また、この変異は dbSNP、1000 Genome Project databases、Human Genetic Variation Database には登録されていない新規変異であった。

SMN1 遺伝子エクソン 7 の欠失を示す患者 DNA でも SMN1 遺伝子エクソン 8 を保持していれば、nLR-PCR 解析ができることを示した。このような症例を解析したところ、図3に示すような Hybrid SMN 遺伝子が検出された。つまり、SMN1 遺伝子エクソン 7 は見かけ上欠失しているように見えただけで、実際には SMN1 遺伝子 - SMN2 遺伝子間で遺伝子変換 (gene conversion) が起こっていたことが明らかになった。また、タイプ A のような遺伝子変換が多く検出されたが、まれにタイプ B のような複雑な遺伝子変換やタイプ C のような小規模な遺伝子変換も存在することが示された。

E. 結論

MLPA 法、Long-range PCR 法 + sequencing 法を用いることで、これまで検出できなかった SMN1 遺伝子の微細な変化を捉えることが可能になり、疾患発症の原因となる様々な遺伝子の変化が明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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; 36(10):914-920.
- 2) Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 453(3):368-374.
- 3) Saito T, Nurputra DK, Harahap NI, Indra S.K. Harahap, Yamamoto H, Muneshige E, Nishizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S, Saito K, Nishio H. A study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience.* 2014:1-9.
- 4) Kato N, Sa'adah N, Rochmah MA, Harahap NI, Nurputra DK, Sato H, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H, Takeuchi A. SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper : Application of COP-PCR to the SMN1 Deletion Test. *Kobe J Med Sci.* 2014; in press.
- 5) Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa'adah N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. *Brain Dev.* 2014; in press.
- 6) Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *J Hum Genet.* 2015; in press.
- 7) Furukawa Y, Ogawa G, Hokkoku K, Hatanaka Y, Aoki R, Saito K, Sonoo M. Diagnostic use of surface EMG in a patient with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2015; in press.
- 8) Yamada H, Nishida Y, Maihara T, Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Nishimura N, Satio T, Kubo Y, Saito K, Nishio H. Two Japanese patients with SMA type 1 suggest that axonal-SMN may not modify the disease severity. *Pediatr Neurol.* 2015 in press.
- 9) 斎藤加代子. パーソナルゲノム解析の医療応用と遺伝カウンセリングの実践. *医薬ジャーナル*, 2014; 50(3):77-957-961.
- 10) 斎藤加代子. 遺伝子検査施行時の倫理的対応. *周産期医学*. 2014; 44(2):153-156.
- 11) 浦野真理、斎藤加代子. 出生前診断の遺伝カウンセリング. *小児科臨床*. 2014;67(10):1631-1635.
- 12) 久保祐二、伊藤万由理、青木亮子、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症における SMN2 遺伝子のコピー数解析と遺伝カウンセリングへの応用. *日本遺伝カウンセリング学会誌*. 2014; 10;35(3):99-104.

2. 学会発表

- 1) 斎藤加代子. 遺伝医療：遺伝学的検査と遺伝カウンセリング. 第33回愛媛県小児神経研究会. 2014. 7. 5. 愛媛
- 2) 久保祐二、青木亮子、近藤恵理、斎藤加代子. 次世代シーケンサーを用いた *SMN1* 遺伝子欠失を認めない脊髄性筋萎縮症のゲノム解析. 日本人類遺伝学会第59回大会. 2014. 11. 20. 東京
- 3) 斎藤加代子. 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. 平成26年度厚生労働科学特別研究事業進捗管理班（難治性疾患実用化研究・腎疾患実用化研究・慢性の痛み解明研究）成果報告会. 2015. 3. 13. 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

SMA 運動機能評価スケール Expanded Hammersmith Functional Motor Scale (:HF MSE) と CHOP INTEND について —9 例に施行して—

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

要旨

「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」において、運動機能評価スケール HF MSE と CHOP INTEND を用い、9 例評価を行った。座位保持が出来ない症例の場合、粗大運動機能の評価表である HF MSE では評価可能な項目が少なく、十分に変化を捉えることができないことが考えられる。それに比べ、CHOP INTEND は自動運動を評価する為、運動能力に関わらず全ての項目が遂行できた。

共同研究者

長谷川三希子、鈴木隼人、後藤圭介、秋月三奈
(東京女子医科大学リハビリテーション部 PT)

猪飼哲夫

(東京女子医科大学リハビリテーション部 MD)

A. 目的

「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」において、運動機能評価スケール HF MSE と CHOP INTEND を用い、9 例評価を行った。SMA の運動機能的変化をよりの確に捉える為に、この 2 つの評価スケールの課題についてまとめた。

B. 方法

1. 評価スケールの紹介

<HF MSE> 歩行不能な SMA 患者の能力を適切に評価することを目的とした HMFS (Hammersmith Functional Motor Scale) 20 項目に、13 項目を追加した計 33 項目から構成されている。HMFS は座位、座位での上肢運動、起居動作、寝返り、前腕支持、手支持、四つ這い、立位、歩行の粗大運動 20 項目から構成され、それに仰臥位での下肢屈曲運動、膝立ち、立ち上がり、立位から座位への姿勢変換、ジャンプ、階段昇降の 13 項目が追加されている。

対象は II 型もしくは III 型の SMA で年齢は 2 歳以上としている。

評価は余分な説明を加えずに、最も自然に課題を遂行する方法で採点し、各項目とも 3 回の施行が可能である。採点は 0、1、2 点の 3 段階で、自ら開始肢位を取り遂行できた場合 2 点、開始肢位を取る際介助を要しても、肢位を保持できた場合は 1 点となる。実施手順の詳細な手引きには、各項目における課題に関する指示も記載されている。

<CHOP INTEND>

神経筋疾患乳児の為に作成され、2 歳以下を対象としている。頭部、頸部、体幹、四肢の粗大な筋力について自発的または誘発にて評価し、採点は 0 から 4 点で重力に抗する動きを段階的に判断する。又各項目、プラゼルトン行動評価法で評定した行動状態 (State) を記載する。

全ての項目が自発運動または能動運動に基づいて採点が可能であり、言葉や玩具を用いて最大の運動能力を引き出すよう試みる。State 6 (泣く) や State 1-2 (睡眠) 等により施行が困難だった場合は 0 点ではなく、CNT (can not test) と記載する。他にもテスト環境の条件が示されている。

2. 評価スケールについて以下の点を検討した。

検討課題① 遂行可能な評価項目について

検討課題② 評価遂行上の障害因子について

検討課題③

最大運動機能を引き出す上での配慮について

C. 結果

<対象>

内訳は年齢が1～6歳、タイプがI-II型1名、II型7名、III型1名であった。

HFMSEを9例全例、CHOP INTENDを4例に施行した。

<検討課題>

①遂行可能な評価項目について

<HFMSE>

33項目全てを施行できたのはIII型1名のみ。

II型では、最も評価項目が多い症例であっても33項目中17項目で、全例に対し評価が可能であったのは、座位の可否、側臥位迄の寝返り、仰臥位での下肢屈曲運動の5項目のみであった。

<CHOP INTEND>

対象者全例が16項目全ての評価が可能であった。

②障害因子

<HFMSE>

項目②長座位；膝関節屈曲拘縮

項目⑩前腕支持；股関節屈曲拘縮

→LBC(Limited by contractures)と記載

<その他>

前腕回外制限を多く認め、MMTの評価へ影響した。

③最大運動機能を引き出す上での配慮について
SMAの子どもたちは知的に高く、自己能力を理解している。評価者に求められることは、能力を見極め、的確な修正と介助を行うこと、励ましや達成感を提供できるように関わること、また年少(3歳以下)の場合、意欲や興味の引き出しのために、各自に合った玩具等を用いる等が挙げられる。

D. 考察

①SMA II型の運動機能は幅広い。座位保持が出来ない症例の場合、粗大運動機能の評価表である

HFMSEでは評価可能な項目が少なく、十分に変化を捉えることができないことが考えられる。それに比べ、CHOP INTENDは自動運動を評価する為、運動能力に関わらず全ての項目が遂行できる。

②膝、股関節の関節拘縮が課題遂行の障害因子となり、得点へ影響を与える場合もあった。

③対象者の能力を最大限に引き出す上では、評価者の関わりが重要であり、評価の実施手順においても、SMA患者の扱いに慣れた者が行うこと、評価者はトレーニングを受けることが推奨されている。

E. 結論

実際に9例の評価を担当した経験より、効果判定における運動機能の変化を的確に捉える為に配慮すべき点をまとめた。

脊髄性筋萎縮症スクリーニング法の開発研究

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）の治療法が開発が進められる一方、治療が有効な期間に限られていることも明らかにされつつある。このことは、SMA 患者に有効な治療を行うためには、本疾患の早期診断が重要であることを示している。今回、研究者らは、SMA の早期診断を可能にするためのスクリーニング方法の開発に取り組み、乾燥濾紙血と PCR を用いた簡便なスクリーニング方法を確立した。

共同研究者

ディアン・ケスマプラムディア・ヌルプトラ
(Dian Kesumapramudya Nurputra)

ヌル・インマ・ファティマ・ハラハップ
(Nur Imma Fatimah Harahap)

マワダ・アル・ロホマ
(Mawaddah Ar Rochmah)

（この3人の所属は神戸大学大学院医学研究科
地域社会医学・健康科学講座疫学分野）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）の治療法が開発が進められる一方、モデルマウスを使った研究で、治療が有効な期間に限られていることも明らかにされつつある。治療が有効な期間は“window of opportunity for treating children at risk of developing SMA”と呼ばれているが、この期間が乳児期早期に限られているかどうかについてはさらなる研究が必要である。いずれにせよ、SMA 患者に有効な治療を行うためには、本疾患の早期診断が重要であることは確かである。今回、我々は、SMA の早期診断を可能にするスクリーニング方法の開発に取り組み、乾燥濾紙血と PCR を用いた、2種類の簡便なスクリーニング方法（COP-PCR 法、PCR-HRMA 法）を確立した。

B. 研究方法

（1）乾燥濾紙血と DNA 抽出

神戸大学大学院医学研究科疫学分野に送付されてきた SMA が疑われた患者血液の一部を濾紙

に滴下し、室温で暗所に保存した。濾紙は、FTA® Elute Cards を用いた。乾燥濾紙血検体の保存期間は、1年から8年に及んだ。DNA 抽出は煮沸法によった。すなわち、乾燥濾紙血検体を Tris-EDTA Buffer, pH 8.0（TE buffer）に浸漬し、95° C、30 分熱した。以後の実験では、DNA 溶出 TE buffer を DNA 検体として用いた。

（2）COP-PCR

SMA 患者 28 例および対照者 22 例を分析した。全例について、新鮮血から採取した DNA を用いた PCR-RFLP 法での分析は既に終了している。*SMN1* と *SMN2* から特異的にエクソン 7 を増幅する COP-PCR を行った。共通 forward primer (R111)、*SMN1* 特異的または *SMN2* 特異的 reverse primer (*SMN1*-COP または *SMN2*-COP) を含む反応溶液を PCR 反応に供した。COP-PCR 産物はアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロミドで可視化した。

（3）PCR-HRMA

SMA 患者 42 例および対照者 28 例を分析した。全例について、新鮮血から採取した DNA を用いた PCR-RFLP 法での分析は既に終了している。*SMN1* と *SMN2* から同時にエクソン 7 を増幅する PCR を行った。共通 forward primer (R111)、共通 reverse primer (541C770) を含む反応溶液を PCR 反応に供した。PCR 産物は LightCycler®480 System II で高分解融解曲線解析 (HRMA) を行った。