

We should mention several limitations of the present study. First, we could not show a-SMN expression in Patient1, not only in the fetal period but also in the postnatal period. The a-SMN expression is down-regulated after birth.⁶ According to our experience, it is impossible to detect a-SMN expression in the peripheral blood cells of human infants and children. Second, we examined only a set of SMA patients with the same genotypic background except axonal-SMN. To formulate general concepts about axonal-SMN, we need more sets of SMA patients with the same genotypic background except axonal-SMN. At last, we did test only two genes modifying the SMA phenotype, *SMN2* and *NAIP*. These genes have already been proved to modify the SMA phenotype. However, it has not been clarified until now what genes are critically involved in modifying mechanism of the SMA phenotype.

In conclusion, in Patient 1, the C-terminal domain of FL-SMN1 determined the severity, rather than the a-SMN, one copy of which could be present and intact, although its generalization may be premature. Our study suggested that SMA disease severity may be determined by C-terminal defects of FL-SMN1, irrespective of presence or absence of a-SMN expression. However, it should be noted that this study focused on disease progress, including respiratory dysfunction, and it is necessary to further study the role of a-SMN in axonal growth of motor neurons, as a-SMN may have roles in fine tuning of neural circuit formation.

Acknowledgments

This study was supported in part by Grants-in-Aid provided from the Research Committee of Spinal Muscular Atrophy, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

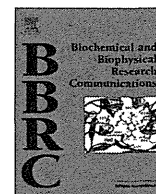
References

1. Munsat L, Davies KE. International SMA Consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord.* 1992; 2: 423-428.
2. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; 80: 155-165.
3. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80: 167-178.
4. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000; 15: 228-237.
5. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R., et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on Real-Time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of Spinal Muscular Atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 358-368.
6. Setola V, Terao M, Locatelli D, et al. Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1959-1964.
7. Locatelli D, d'Errico P, Capra S, et al. Spinal muscular atrophy pathogenic mutations impair the axonogenic properties of axonal-survival of motor neuron. *J Neurochem.* 2012; 121: 465-474.
8. Yamamoto T, Sato H, Lai PS, et al. 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: 914-920.
9. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet.* 1998; 19: 63-66.
10. Zhang HL, Pan F, Hong D, et al. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci.* 2003; 23: 6627-6637.
11. Kotani T, Sutomo R, Sasongko TH, et al. A novel mutation at the N-terminal of SMN Tudor domain inhibits its interaction with target proteins. *J Neurol.* 2007; 254: 624-630.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry

Masayuki Arakawa^{a,*}, Reiko Arakawa^{b,1}, Shinichi Tatsumi^c, Ryoko Aoki^b, Kayoko Saito^b, Akio Nomoto^a^a Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN), Tokyo, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan^b Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, 10-22 Kawadacho, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-0054, Japan^c Merck Millipore Merck Ltd., Arco Tower 5F, 1-8-1 Shimomoguro, Meguro-ku, Tokyo 153-8927, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2014

Available online 27 September 2014

Keywords:

Spinal muscular atrophy
Survival motor protein
Biomarker
Imaging flow cytometry
Valproic acid

ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by mutations within the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene. These mutations result in the reduction of survival motor neuron (SMN) protein expression and SMN complex in spinal motor neurons and other tissues. SMN protein has been used as a therapeutic biomarker in recent SMA clinical studies using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Here, we investigated whether imaging flow cytometry can be a viable source of quantitative information on the SMN protein. Using a FlowSight imaging flow cytometer (Merck-Millipore, Germany), we demonstrated that imaging flow cytometry could successfully identify different expression patterns and subcellular localization of SMN protein in healthy human fibroblasts and SMA patient-derived fibroblasts. In addition, we could also evaluate the therapeutic effects of SMN protein expression by valproic acid treatment of SMA patient-derived cells *in vitro*. Therefore, we suggest that imaging flow cytometry technology has the potential for identifying SMN protein expression level and pattern as an evaluation tool of clinical studies.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder caused by mutations of the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene, leading to progressive limb and trunk muscle weakness associated with muscle atrophy [1,2]. SMN protein is ubiquitously expressed in mammalian tissues; it plays a critical role in RNA metabolism, participating in small ribonucleoproteins (sRNPs) biogenesis and in pre-mRNA splicing [2]. Two *SMN* genes translate SMN proteins: a telomeric copy (*SMN1*) and an inverted centromeric copy (*SMN2*). The *SMN2* gene is present in all patients, but is not able to compensate for *SMN1* gene defects completely, resulting in low levels of the full-length SMN protein in order to have a single point mutation in exon7 of the *SMN2* gene [3,4]. In SMA clinical specimens, reduction of SMN has been assessed by several methods. Typically, immunocytochemistry and Western blotting have been used on primary dermal fibroblasts and leukocyte cell lines, leading to a correlation between healthy human controls and SMA patients in preclinical studies [5,6]. However,

this method is not sufficiently reliable for clinical and diagnostic use. Recently, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has also been used in preclinical and clinical studies of SMA [7–10]; nevertheless, SMN protein levels in human peripheral-blood mononuclear cells (PBMC) were not correlated between healthy controls, carriers, and SMA phenotypic severity in clinical trials [9,10]. These methods should be optimized to allow detection of SMN protein in human cells for SMA clinical studies.

In this study, we focus on the imaging flow cytometry technique as a new assay method of SMN protein evaluation. Usually, standard flow cytometry cannot be used to assess the localization of molecules within specific cellular compartments. However, imaging flow cytometry can evaluate intact proteins, using a digital microscope system, and immunological technologies [11,12]. SMN proteins are localized intracellularly throughout the cytoplasm and nucleus, as a multi-protein complex. Specifically, SMN proteins form SMN complexes in the nucleus, where they accumulate in structures called Gemini of Cajal bodies (Gems) that play an essential role in the assembly of spliceosomal sRNPs and biogenesis during mRNA processing [13,14]. The predicted outcome of decreased sRNPs assembly is an alteration in gene splicing, containing minor introns due to reduced sRNPs levels [2,15]. In SMA-derived cells, gems formation is clearly decreased compared to that of healthy controls [16].

* Corresponding author at: Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN), Tokyo, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan. Fax: +81 3 3441 7589.

E-mail address: arakawam@bikaken.or.jp (M. Arakawa).

¹ These authors contributed equally to this work.

At present, there is no effective treatment for SMA. Some therapeutic approaches are recently under investigation; therapies aim at increasing the amount of full-length SMN protein levels produced by *SMN2* promoter activation, while reducing *SMN2* exon7 alternative splicing, using small molecules, and antisense oligonucleotides [6,17–20]. Therefore, a new method to accurately measure SMN protein levels is needed, to assess disease severity and response to treatment.

The aim of this study was to evaluate SMN protein expression and to qualitatively assess its cellular localization using imaging flow cytometry. We therefore explored the applicability of this new technology for evaluating SMN protein as a biomarker in SMA clinical trials.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Human fetal dermal fibroblasts (from healthy controls) were obtained from Cell Applications, Inc., SMA patient-derived dermal fibroblasts were obtained from skin biopsies of SMA patients. The patient having SMA type I was a 7-month-old female who had not acquired head control with *SMN1* deletion and two copies of *SMN2*, as assessed by molecular diagnoses. Ethical approval for tissue collection was granted by the Institutional Review Board of Tokyo Women's Medical University, Japan. For immunocytochemical analyses, we used a mouse monoclonal FITC-conjugated anti-SMN, (clone 2B1, Merck Millipore, Germany), and a mouse monoclonal anti-SMN antibody (BD Transduction Laboratories, San Diego, USA).

2.2. Cell culture and valproic acid treatment

Human dermal fibroblasts (from healthy controls) and type I SMA patient-derived dermal fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) including 1.0 g/L glucose and supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) without antibiotics. These fibroblasts were cultured in six-well plates for 24 h and then treated with the histone deacetylase inhibitor, valproic acid (VPA: 0, 0.1, 1, 10 mM) diluted in PBS for 24 h at 37 °C with 5% CO₂.

2.3. Immunocytochemical staining

After cells were cultured for 48 h, 1.5×10^6 cells were rinsed twice with cold PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, and then rinsed three times for 5 min with PBS. The cells were then treated with 0.2% TritonX-100 in PBS for 10 min at room temperature. The cells were incubated in blocking buffer (10% normal goat serum in PBS) for 60 min at room temperature. Following blocking, the cells were incubated with a mouse monoclonal anti-SMN antibody (1:100, BD) at room temperature for 60 min and then cells were then visualized using an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (1:400, Molecular Probes) for 60 min at room temperature. The cells were treated with Hoechst 33342 (0.5 µg/mL) to stain the cell nuclei for 5 min at room temperature. Image photographs were taken using a Leica fluorescent microscope system.

2.4. Quantitative RT-PCR analysis

Cells were cultured for 24 h after VPA treatment, and total RNA was isolated using the RNeasy kit (QIAGEN Sciences, USA) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription reactions, 500 ng of total RNA was used with PrimeScripts RT

Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of cDNA were mixed with SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) each containing 400 nM primers. Quantitative PCR was performed on Thermal Cycler Dice Real Time Systems (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). Primers used in this paper were as follows: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*): 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' for forward and 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3' for reverse; *SMN2*, 5'-AACCTGTGTTGGTTTACACTGGA-3' for forward and 5'-CAGATTTGGCTTGATGTTATCTGA-3' for reverse. All samples were assayed in duplicate.

2.5. Western blotting

Cells were cultured for 24 h VPA untreated or treatment and then washed twice with PBS. Cells were homogenized on ice in protein lysis buffer (ER4, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). After incubation on ice for 15 min, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. Sample protein concentrations were determined by the BCA method (Pierce, Rockford, IL). The amount of total protein was adjusted to equal levels between samples with SDS sample buffer, and the samples (10 µg of protein) were subjected to electrophoresis on 10% SDS polyacrylamide gels. Proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore Corp., Billerica, MA) and treated with blocking buffer (5% skim milk in 0.1% Tween20 in TBS) for 1 h at room temperature. After blocking, the membrane was treated with monoclonal anti-SMN antibody (1:2000, BD) diluted in blocking buffer for 1 h at room temperature and then incubated with an HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:2000, DAKO) for 1 h at room temperature. The membrane was treated with a substrate (ECL plus substrate kit). To test for equal amounts of loaded protein, membranes were stripped and incubated with monoclonal anti- α -tubulin antibody (1:5000, Sigma) as described above. Proteins were visualized using a luminescent image analyzer ImageQuant LAS-1000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). All samples were assayed in duplicate.

2.6. ELISA

Cells were cultured for 24 h after VPA treatment, and then washed twice with PBS. Cells were homogenized in protein lysis buffer on ice as described above. Aliquots of protein extracts were diluted with lysis buffer. SMN ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) was carried out according to the manufacturer's instructions. All samples were assayed in duplicate.

2.7. Immunostaining for the imaging flow cytometry

SMA patient-derived fibroblasts were rinsed twice with PBS and trypsinized. Cells were then washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min on ice. After they were washed three times with PBS, we permeabilized the cells using chilled BD Phosflow Perm buffer II for 30 min on ice. Cells were washed with Stain buffer (BD) and counted; 10 µl FITC-conjugated human SMN antibody (Millipore) or normal mouse Ig (Sigma) was added in 1×10^6 cells/90 µl and incubated at room temperature for 45–60 min. After incubation, and a single wash with PBS, the cells were treated with Hoechst 33342 (5 µg/mL) in PBS for 5 min at room temperature.

2.8. Imaging flow cytometry analysis

Samples were analyzed on a FlowSight imaging flow cytometer (Merck-Millipore, German). Data from a minimum of 10,000 cells (counts) were acquired, utilizing the 405, 488, and 785-nm lasers to calculate cell granularity, at a 20× magnification, using INSPIRE

software. Compensation was performed using single-color staining for all channels. Single cells were first identified based on a scatter plot of bright field area versus the aspect ratio. A gate was drawn around the population containing putative single cells based on the criteria of the area being large enough to exclude debris, and the aspect ratio being greater than ~ 0.6 , which eliminates debris and clusters. Focused-Single cells were plotted on the SMN-FITC and Hoechst dye intensity. Both double positive population was gated and confirmed by image gallery to determine correct gate. Cellular localization of SMN protein was analyzed using the Bright Detail Intensity (BDI) feature algorithm. Acquired data were analyzed using the IDEAS analysis software.

2.9. Statistical methods

Analysis of statistical significant between SMN levels between the VPA-treated groups was done by Student's *t*-test. Values are presented as mean \pm standard deviation value (SD). Statistically significant differences were defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Detection of SMN protein levels in healthy human fibroblasts, and type I SMA patient-derived fibroblasts by immunocytochemistry and Western blotting

In control fibroblasts from healthy individuals, endogenous SMN protein is expressed in the cytosol and nucleus, and accumulates in discrete nuclear foci known as gems. In this study, we checked SMN protein expression in human controls by immunocytochemistry and Western blotting using a specific antibody (Fig. 1A and B). On the other hand, type I SMA patient-derived fibroblasts showed decreased SMN protein levels resulting from *SMN1* gene loss, compared to healthy controls (Fig. 1A and B).

3.2. Effects of valproic acid treatment on type I SMA patient-derived fibroblasts

In our preclinical studies, we investigated the effects of VPA (concentrations used were 0, 1, and 10 mM) on cell morphology, full-length *SMN2* mRNA transcription levels and changes in SMN protein levels in SMA patient-derived fibroblasts (VPA; 0, 0.1, 1, 10 mM) at 24 h after treatment.

Our results showed that 24 h VPA treatment did not cause any changes in cell morphology or any toxicity (Fig. 2A). Moreover, these treatments were dose-dependent. Thus, a 10 mM dosage of VPA significantly increased full-length *SMN2* mRNA transcription levels, detected by quantitative RT-PCR method, compared to non-treated SMA cells ($p < 0.05$, Fig. 2B). Quantification of full-length *SMN2* mRNA transcription levels was determined with respect to a standard curve constructed using serial dilutions of cDNA. We used mRNA transcription levels of a housekeeping gene, *GAPDH* as internal control. On the other hand, SMN protein levels were also increased when examined by two independent methods, Western blotting (Fig. 2C), and ELISA ($p < 0.05$, Fig. 2D), after VPA treatments.

3.3. Detection of SMN protein expression and cellular localization by imaging flow cytometry

In this study, we report for the first time the use of imaging flow cytometry to assess the intracellular expression and localization of SMN protein in fibroblasts from healthy controls and SMA patients. Cells were labeled with the same mouse monoclonal FITC-conjugated anti-SMN antibody (2B1), and Hoechst 33342 nucleic staining, as described in materials and methods. There were significant differences in fluorescence intensity in the number of FITC-labeled SMN-positive cells between SMA cells and healthy controls (Fig. 3A). Moreover, the expression of SMN protein in SMA cells was clearly lower, compared to healthy controls. Nonetheless, at least 20–30% of cells were strongly positive for SMN as identified by a plotted histogram of FITC-SMN-positive cells (Fig. 3A). Furthermore, in order to investigate the accumulation area of SMN protein in healthy control and SMA cells, we used the BDI modulation to measure the distribution of SMN protein. The BDI features compute the intensity of localized bright spots within a masked area in the image where the background has been removed around the spots. SMN proteins are generally known to localize both within the cytoplasm and within nucleus, especially in nuclei foci called gems, where the SMN complex is composed. Our results from immunocytochemical analysis showed that the SMN protein accumulated in the nucleus and cytoplasm, and appeared as cellular dots in healthy controls (Fig. 1A). However, we could not detect SMN complex like gems or accumulation in our SMA cells under the fluorescent microscopic observation (Fig. 1A). On the other hand, using imaging flow cytometry, we also

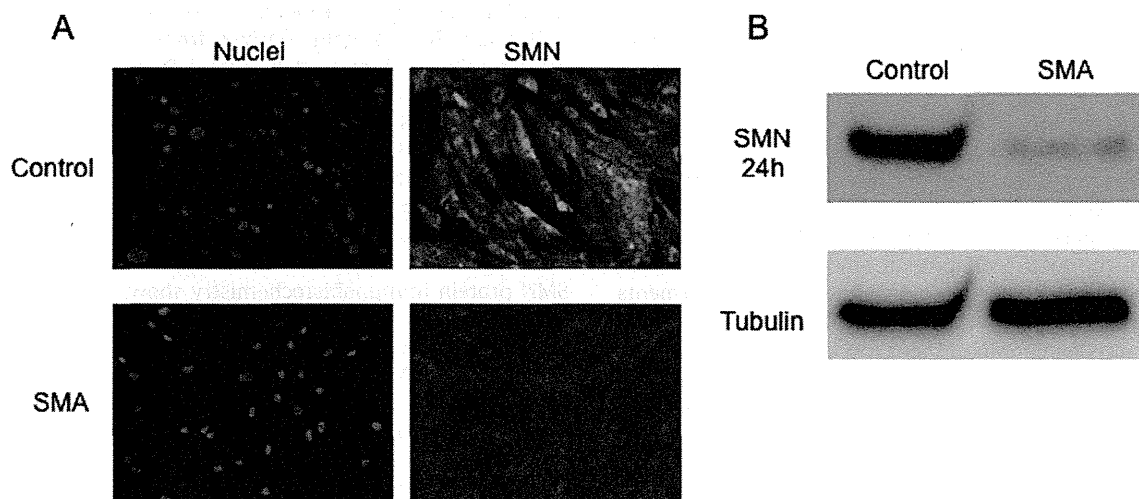


Fig. 1. Detection of SMN protein in human fibroblasts from healthy controls and type I SMA patient-derived fibroblasts. (A) Micrographs showing SMN protein immunocytochemistry. Cells were cultured for 24 h and then stained for SMN using a monoclonal anti-SMN antibody. SMN expression is reduced in SMA patient-derived fibroblasts when compared to healthy controls. (B) Detection of SMN protein by Western blotting analysis, using the same antibody as described above, shows reduced SMN expression in SMA patients.

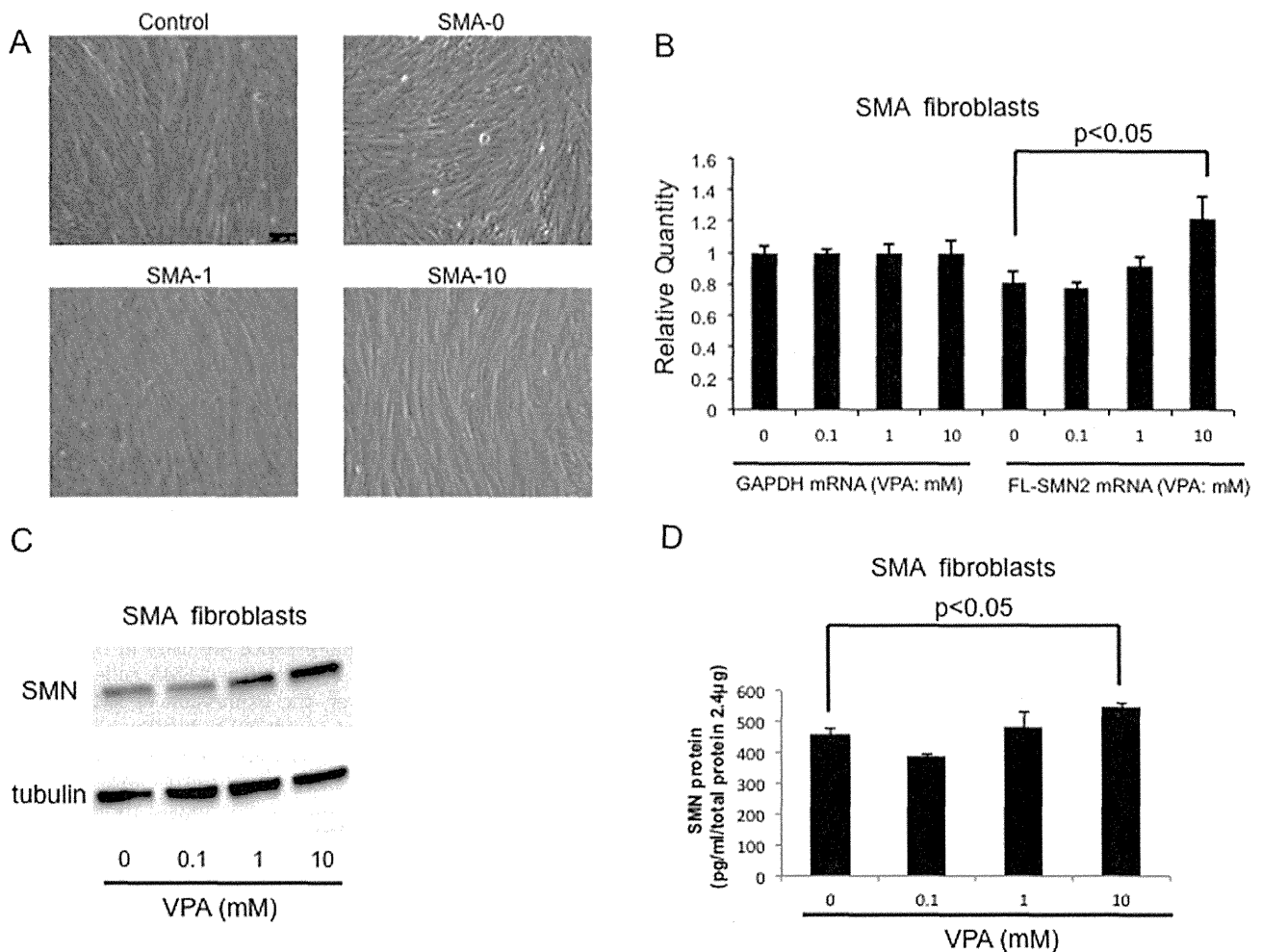


Fig. 2. Effects of VPA treatment on SMA patient-derived fibroblasts. (A) Effects on cellular morphology. Cells were treated with 0, 1, 10 mM VPA for 24 h. All treatments did not cause any morphological changes and any toxicity. (B) Real-time PCR analysis of *SMN2* mRNA expression after VPA treatment in SMA-derived fibroblasts. Cells were treated with 0, 0.1, 1, 10 mM VPA for 24 h, and then total RNA was extracted and subjected to real-time PCR. *GAPDH* was used as internal control gene. (C) Western blotting analysis of SMN protein expression after VPA treatment in SMA-derived fibroblasts. Cells were treated with 0, 0.1, 1, 10 mM VPA for 24 h and then total protein levels were analyzed by Western blotting. (D) ELISA data showing SMN protein expression in SMA-derived fibroblasts treated with VPA. Cells were treated with 0, 0.1, 1, 10 mM VPA for 24 h and then total protein was analyzed using an ELISA kit (Enzo Life Sciences). Error bars represent the mean \pm S.D. obtained from three independent samples.

observed that the accumulation of SMN protein was significantly decreased in SMA cells (Fig. 4A and B).

3.4. Evaluation of SMN protein expression and cellular localization in VPA-treated SMA patient fibroblasts using imaging flow cytometry

To investigate the change of SMN protein expression and cellular localization in SMA patient-derived fibroblasts treated with VPA, we used imaging flow cytometry technology to detect SMN protein-positive cells by a specific anti-SMN antibody as described above. In this technology, data from SMA cells exhibited a significant increase in the total SMN protein amount, translated from each *SMN2* locus, under dose-dependent VPA-treatments (Fig. 3B–D). In addition, BDI analysis showed that VPA treated-cells were not only increasing SMN protein levels, but also SMN was accumulating in the nucleus and cytoplasm (Fig. 4C–E). Using imaging flow cytometry, we could first detect significant increases in SMN protein accumulation in discrete nuclear foci after VPA treatment (Fig. 4C–E).

4. Discussion

In this study, we developed a new method of SMN protein evaluation using imaging flow cytometry. This method can be easily

and clearly detect SMN protein levels in healthy human fibroblasts and type I SMA patient-derived fibroblasts. In our preclinical studies 24 h after VPA treatment, the endogenous full-length *SMN2* mRNA and SMN proteins derived from full-length *SMN2* mRNA were significantly increased in type I SMA patient-derived fibroblasts. VPA treatment may stimulate the transcriptional system of *SMN2*. The SMN protein expression, therefore, increased in VPA-treated SMA cells. These results indicate that VPA may serve as a promising therapeutic candidate for SMA.

Using imaging flow cytometry analysis, we found that SMA patient fibroblasts clearly expressed SMN protein at least at 20–30% of normal levels. In mammalian neural cells and tissues, SMN protein immunohistochemistry shows heterogeneous staining [21]. Therefore, the imaging flow cytometry analysis can be used to examine the population of SMN protein-positive cells acquired from SMA patients. Moreover, we first demonstrated that VPA-dependent SMN protein expression was also significantly increased, resulting in the accumulation of SMN to the cell nucleus as shown by BDI analysis. Our results suggest that the imaging flow cytometry system can play a role as a novel evaluation tool of SMN protein analysis for clinical studies in SMA.

The SMN protein is considered as the most suitable and sensitive molecular biomarker for SMA by many researchers. So far, several techniques have been used for SMN protein quantification.

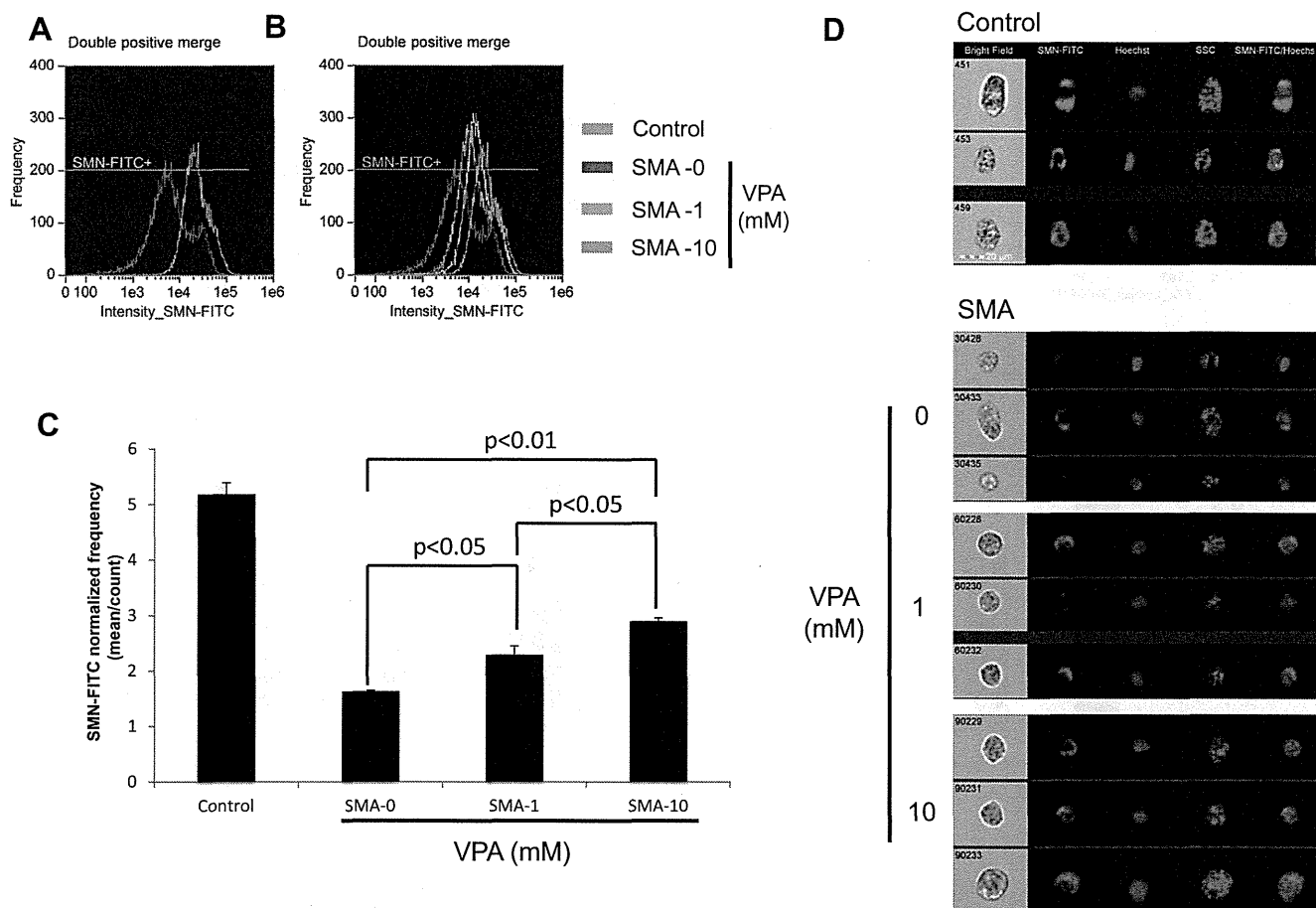


Fig. 3. SMN protein analysis by imaging flow cytometry. (A) Cells were cultured for 48 h, and then trypsinized and stained for SMN protein using a monoclonal FITC-conjugated anti-SMN antibody. Histogram represents the mean FITC intensity versus frequency (count). (B) Detection of SMN protein expression by imaging flow cytometry analysis after treatment with VPA (0, 1, 10 mM) for 24 h. The SMN protein was increasing in a dose-dependent manner. (C) Evaluation of SMN protein expression after VPA treatment. Values are represented as FITC-SMN normalized frequency (mean/count). (D) Cellular localization of SMN protein by imaging flow cytometry. FITC-SMN (green), Hoechst 33342 (blue), side scatter (red) and bright-field digital images are shown for human healthy controls and SMA-derived fibroblasts untreated or treated with VPA. SMN staining is clearly visible in the cytoplasm and nucleus. Error bars represent mean \pm S.D. obtained from three independent samples.

Western blot analysis, which was used in *in vitro* and *in vivo* studies, mainly aimed at evaluating possible variations of SMN protein levels related to pharmacological treatments [6]. However, this assay has several limitations, related to its semi-quantitative nature, thus requiring normalization versus housekeeping proteins, whose levels are subject to wide variations.

Kolb et al. developed an immunoassay suitable for total SMN protein quantification in PBMC, through which they could demonstrate a correlation with the number of *SMN2* copies [22]. However, they found a reduction in SMN levels only in PBMC of type I SMA patients, and they could not find any correlation between protein levels and phenotypic severity [22]. These findings clearly question the meaning of quantifying SMN protein levels in clinical trials. Generally, ELISA is considered more sensitive and adequate for protein quantification since it does not require normalization to other proteins, given that SMN levels are quantified with respect to a standard curve constructed with serial dilutions of purified protein. To date, these assays have been developed and validated [7–10]. These authors showed that their assay is sufficiently sensitive to measure SMN variations, related to a candidate drug treatment, and found that SMN protein levels in PBMC of SMA patients show a tendency to be reduced, compared to healthy controls [7–10]. Although these results are promising, the small number of samples analyzed, the absence of age-matched controls, of a placebo arm, and of clinical-molecular correlations, do not allow firm

conclusions to be drawn on the validity of SMN protein dosage in clinical trials. SMA is a phenotypically heterogeneous disorder with variable disease onset and severity, which creates a series of issues in the design of clinical trials. Sensitive and accurate biomarkers are, therefore, needed that can be used as predictive, prognostic, and surrogate endpoint measures.

SMN protein, as a biomarker or surrogate outcome measure, presents some technical issues that need to be taken under consideration in the context of clinical trials. For example, the acquisition of SMA patient fibroblasts is an invasive procedure. On the other hand, obtaining peripheral whole blood cells and PBMC is a less invasive process, and more suitable samples for imaging flow cytometry, although peripheral blood draws are often hard to obtain from very young patients.

Moreover, with the imaging flow cytometry analysis, quantification of SMN accumulation could be considerably evaluated in intact cells, by using an algorithm of bright detail intensity. Generally, increases in gem numbers related to SMN complexes, were counted as gems per 100 cell nuclei [16]. In fact, our analysis may not only be reliable and beneficial for the evaluation of SMN protein expression, but also for the quantification of gems without counting cell nuclei. Therefore, our results suggest that imaging flow cytometry analysis can play a role as a novel tool for the evaluation of intact protein expression and localization of biologically active molecules, like the SMN protein.

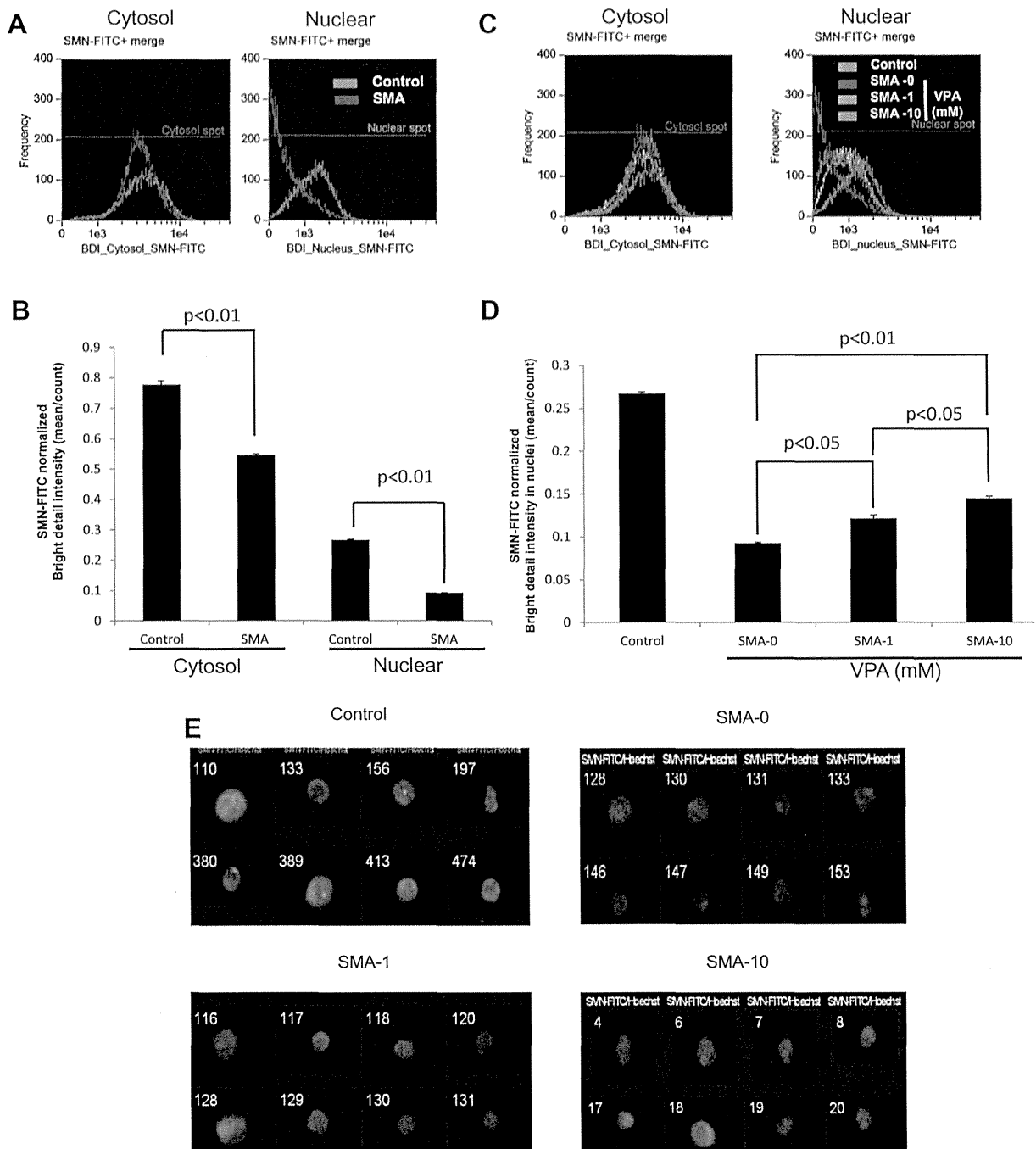


Fig. 4. Cytosolic and nuclear localization of SMN protein evaluated by imaging flow cytometry. (A) Comparison of bright detail intensity in the cytosol or nucleus of human healthy controls (green) and SMA patient-derived fibroblasts (red). Cells were cultured for 48 h and then subjected to imaging flow cytometry analysis. (B) Results show a significant decrease in SMN protein both in the cytosol and in nucleus in SMA patient-derived fibroblasts. (C) Effects of the SMN protein localization and accumulation on VPA-treated SMA patient-derived fibroblasts. Cells were treated with VPA (0, 1, 10 mM) for 24 h and then subjected to imaging flow cytometry analysis. Histogram represents cytosol spots or nuclear spots. (D) Accumulation of SMN protein in the nucleus of VPA-treated SMA patient-derived fibroblasts. Values are represented as FITC-SMN normalized bright detail intensity (mean/count). (E) Fluorescent micrographs showing localization of SMN protein by imaging flow cytometry. FITC-SMN (green) and Hoechst 33342 (blue) merged digital images are exhibited in human healthy control and SMA-derived fibroblasts treated with VPA (0, 1, 10 mM) respectively. Error bars represent mean \pm S.D. obtained from three independent samples.

The imaging flow cytometry technique is a novel approach to qualitative and quantitative assessment of SMN protein expression in healthy human controls and SMA patient fibroblasts. The addition of digital images to standard quantitative and statistical measurements makes this the most sensitive flow cytometry method available for the assessment of cellular SMN accumulation and localization. We believe that imaging flow cytometry has a place

as a first-line technique to assess the molecular genetic phenotype of cells acquired from SMA patients for clinical trials.

Acknowledgments

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Nos. 23659530, 26461555. This work was also supported by Grants-

in-Aid from the Research Committee of spinal muscular atrophy (SMA), the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- [1] T. Frugier, S. Nicole, C. Cifuentes-Diaz, et al., The molecular bases of spinal muscular atrophy, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002) 294–298.
- [2] A.H. Burghes, C.E. Beattie, Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neuron sick?, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2009) 597–609.
- [3] S. Lefebvre, L. Bürglen, S. Reboullet, et al., Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene, *Cell* 80 (1995) 155–165.
- [4] C.L. Lorson, E. Hahnen, E.J. Androphy, et al., A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 6307–6311.
- [5] C.J. Sumner, S.J. Kolb, G.G. Harmison, et al., SMN mRNA and protein levels in peripheral blood biomarkers for SMA clinical trials, *Neurology* 66 (2006) 1–7.
- [6] L. Brichta, Y. Hofmann, E. Hahnen, et al., Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 2481–2489.
- [7] Nguyen thi Man, E. Humphrey, L.T. Lam, et al., A two-site ELISA can quantify upregulation of SMN protein by drugs for spinal muscular atrophy, *Neurology* 71 (2008) 1757–1763.
- [8] S. Piepers, J.M. Cobben, P. Soodaar, et al., Quantification of SMN protein in leucocytes from spinal muscular atrophy patients: effects of treatment with valproic acid, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 82 (2011) 850–852.
- [9] D.T. Kobayashi, R.J. Olson, L. Sly, et al., Utility of survival motor neuron ELISA for spinal muscular atrophy clinical and preclinical analyses, *PLoS ONE* 6 (2011) e24269.
- [10] T.O. Crawford, S.V. Paushkin, D.T. Kobayashi, et al., Pilot Study of Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy Trial Group. Evaluation SMN protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study, *PLoS ONE* 7 (2012) e33572.
- [11] L. Grimwade, E. Gudgin, D. Bloxham, et al., Detection of cytoplasmic nucleophosmin expression by imaging flow cytometry, *Cytometry A* 81 (2012) 896–900.
- [12] L. Grimwade, E. Gudgin, D. Bloxham, et al., PML protein analysis using imaging flow cytometry, *J. Clin. Pathol.* 64 (2011) 447–450.
- [13] Q. Liu, G. Dreyfuss, A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein, *EMBO J.* 15 (1996) 3555–3565.
- [14] U. Fischer, Q. Liu, G. Dreyfuss, The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis, *Cell* 90 (1997) 1023–1029.
- [15] F. Lotti, W.L. Imlach, L. Saieva, et al., An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function, *Cell* 151 (2012) 440–454.
- [16] J.J. Cherry, E.Y. Osman, M.C. Evans, et al., Enhancement of SMN protein levels in a mouse model of spinal muscular atrophy using novel drug-like compounds, *EMBO. Mol. Med.* 5 (2013) 1035–1050.
- [17] J. Thurmond, M.E. Butchbach, M. Palomo, et al., Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 449–469.
- [18] M.L. Hastings, J. Berniac, Y.H. Liu, et al., Tetracyclines that promote SMN2 exon 7 splicing as therapeutics for spinal muscular atrophy, *Sci. Transl. Med.* 1 (2009) 5ra12.
- [19] Y. Hua, K. Sahashi, G. Hung, et al., Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model, *Genes Dev.* 24 (2010) 1574–1579.
- [20] M.A. Passini, J. Bu, A.M. Richards, et al., Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 72ra18.
- [21] J.W. Francis, A.W. Sandrock, P.G. Bhide, et al., Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural and tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 6492–6497.
- [22] S.J. Kolb, A.K. Gubitz, R.F. Olszewski, et al., A novel cell immunoassay to measure survival of motor neurons protein in blood cells, *BMC Neurol.* 6 (2006) 6.

特集 パーソナルゲノム時代における倫理的課題

5. 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

齋藤 加代子*

ゲノム研究の進歩を背景に、大量の DNA (deoxyribonucleic acid) 断片の並列シーケンスによる革新的な遺伝子解析技術である次世代シーケンサーの開発によりパーソナルゲノム解析が格段にハイスループット化され、臨床応用される時代となりつつある¹⁾。従来の臨床検査、さらに遺伝子検査でも診断が困難であった症例において、次世代シーケンサーにより確定診断がつく可能性が高くなってきている。そのような臨床現場で、発症リスクを有する人々において精度の高い発症前診断、保因者診断、出生前診断が可能な時代となった。さらに、被験者には予期せぬ結果や偶発的な所見が明らかになることさえ生じ得るようになった。パーソナルゲノム解析の医療応用においては、遺伝カウンセリング実施体制の構築が重要である。また、わが国の医療事情や倫理的問題に対処でき、オーダーメイド医療にも対応できる人材の育成も求められる。

1. はじめに

少量の検体で、迅速に、そして高い精度で遺伝子検査がなされる時代であるが故に、遺伝情報の特性をよく理解して、対応することが求められる。遺伝情報の特性とは²⁾、生涯変化しないこと、血縁者間で一部共有されていること、血縁関係にある親族の遺伝型や表現型が比較的正確な確率で予測できること、保因者診断ができる場合があること、発症する前に将来の発症をほぼ確実に予測することができる場合があること、出生前診断に利用できる場合があること、不適切に扱われた場合には、被検者および被検者の血縁者に社会的不利益がもたらされる可能性があること、などである。端的に言うと、倫理的法的社会的問題 (ethical legal social issues) への配慮の必要性である。

2. パーソナルゲノム解析の対象

1) 単一遺伝子病

一種類の遺伝子変異を原因とする疾患、単一遺伝子病には、染色体上の遺伝子変異により発症するメンデル遺伝病と、ミトコンドリアにおける遺伝子変異により発症する疾患が含まれる。単一遺伝子変異のすべてが疾患になるわけではないが、何らかの遺伝形質発現の原因になり得る。生まれてくる子どもの1~2%に何らかの先天性の異常を認めることが分かっており、現在、2万を超える遺伝形質が知られている。

遺伝子検査は単一遺伝子病における確定診断の方法として発展してきた。例えば家族性腫瘍であれば、DNA (deoxyribonucleic acid) 配列における変異が明らかになることにより、腫瘍の早期発見・治療がなされ、家族における遺伝に関する問

*東京女子医科大学 附属遺伝子医療センター・所長 / 同 大学院 先端生命医科学系専攻 遺伝子医学分野・教授
(さいとう・かよこ)

—■特集・パーソナルゲノム時代における倫理的課題

題を明らかにすることが可能となる。腫瘍摘出による早期治療に結びつくこともある一方で、患者・家族にとって、自身や子どもにも同様の疾患が出るのか、他の親族への影響はどうか、など具体的な検査動機となる。確定診断につながる遺伝子検査であれば、有効な治療法が確立されていなくても、自然歴情報を入手することで医療管理方針決定が可能となり、その他の無駄な検査を回避できるなどメリットがあるため、被検者が未成年であっても検査の適応となる場合が多い。

一方で、発症前診断、保因者診断の場合には、症状がない個人が検査の対象となるため被検者の「知る権利」と「知らないでいる権利」を守るために、発症時に有効な治療法が確立されている疾患の場合を除いては、未成年者の検査は回避されるべきである。さらに成人であっても、本人の自発的意思に基づいているか、時期や状況が妥当か、フォローアップ体制が整っているかなど、万全の体制で臨む必要がある。

着床前診断を含む出生前診断の場合には、検査を希望し同意する親と被検者である胎児の立場が異なるため、検査の実施にあたっては疾患ごとの議論と、症例ごとの慎重な対応が必要不可欠である。

2) 多因子遺伝病

複数の遺伝子変異と環境要因が相互に影響して惹起される疾患、多因子遺伝病には、先天奇形、糖尿病、高血圧、脂質異常症(高脂血症)、肥満、癌などが含まれる。浸透率あるいは個々の遺伝子の表現型に及ぼす効果が、それほど高くはないという特徴がある。罹患者の頻度が高く、かつ環境因子の調整による発症予防、早期発見、早期治療が可能となることから、ゲノムワイドな研究が進み、予測的遺伝学的検査としての易罹患者性検査の開発が求められている。これら多因子遺伝病の発症予測に用いられる遺伝学的検査、特に体質遺伝子検査においては、検査の分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性、環境因子の分析を含むコホート研究と確率的解析による科学的根拠を明確にする必要がある。

「肥満遺伝子検査」や「子どもの能力判定遺伝子

検査」など、頬粘膜でDNAを採取できる手軽さから、分析的妥当性に欠ける遺伝子検査を実施する健診クリニックや検体を直接に検査会社へ送って分析結果を得るようなDirect-to-Consumer(DTC)遺伝子検査を実施する検査企業が現れてきている。営利目的の検査のみが先行している場合や、妥当性・有用性が不明瞭な場合など、問題点が少なくない。体質遺伝子検査と呼ばれる遺伝学的検査の多くは、個人の体質を確実に表すもの、あるいはある疾患を発症するかどうかについて明確な答えを与えるものではなく、体質あるいは発症のリスクについて、その確率を示しているに過ぎない。また、その検査の有用性が科学的に証明されているものは極めて少ないのが現状である³⁾。将来的には多因子遺伝性疾患におけるパーソナルゲノム解析の適切な運用により、個別化健康増進が可能となると考えられる。

3) ゲノム薬理学(pharmacogenomics:PGx)

薬物代謝や薬物動態に関連する酵素やトランスポーターは遺伝子、DNAによりコードされている。これらの遺伝子は生殖細胞系列である。すなわち、すべての個人はそれぞれの遺伝子を2コピー(2アレル)分、有しており、ひとつは母親から、ひとつは父親から受けている。薬を飲んだ時の、薬物輸送トランスポーター、受容体やイオンチャネル、薬物代謝酵素におけるDNA配列の違い、すなわち遺伝子多型により、薬の効果の有無、副作用の出現の有無が決まると考えられる。

薬の効果が高いかどうか、副作用を起しやすいかどうかをあらかじめ遺伝子多型で調べる。効果が高い薬剤や、副作用が出ない最善の薬剤を選択し、薬剤の適正な量を用いることより、安全で有効な治療が期待できる。このようなオーダーメイド医療の実現が薬理遺伝学のゴールである。

3. 遺伝性疾患に対する対応

遺伝医学関連学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン(2003)」⁴⁾は、遺伝学的検査が医療全域にわたって広く有効に利用される時代に対応して、2011年に日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」²⁾として改

5. 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

訂がなされた。この改訂では、既に発症している患者の診断目的として行われる遺伝学的検査において、各診療科の医師自身が遺伝に関する十分な理解と知識および経験を持つことが重要であり、検査の意義や目的の説明とともに、結果が得られた後の状況や検査結果が血縁者に影響を与える可能性があることなどについて十分に説明し、被験者が理解して自己決定できるように支援する体制を整えることを述べている。医療機関は、遺伝医学の基本的事項および個人の遺伝情報の取り扱いに関する啓発や教育を行い、適切な遺伝医療を実施できる体制を整備することが望まれる。また、必要に応じて専門家による遺伝カウンセリングや意思決定のための支援を受けられるように配慮することを述べ、保因者診断、発症前診断、出生前診断を目的に行われる遺伝学的検査においても、遺伝カウンセリングの専門職による支援を述べている。

遺伝カウンセリングは、疾患の遺伝学的関与について、その医学的影響、心理学的影響および家族への影響を人々が理解し、それに適応していくことを助けるプロセスである。このプロセスには、

- ① 疾患の発症および再発の可能性を評価するための家族歴および病歴の解釈、
- ② 遺伝現象、検査、マネージメント、予防、資源および研究についての教育、
- ③ インフォームド・チョイス（十分な情報を得た上での自律的選択）、およびリスクや状況への適応を促進するためのカウンセリング、などが含まれる。

4. 遺伝子医療に携わる人材育成

自分が発症するか（発症前診断）、自分は発症しないが保因者であるか（保因者診断）、妊娠中の胎児がある疾患に罹患しているか（出生前診断）などに関する遺伝カウンセリングにおいて、また、パーソナルゲノム時代における個の医療、オーダーメイド医療を診療の場に導入すべき状況を迎えるにあたって、臨床遺伝学の専門的教育と、遺伝カウンセリング教育が必要である。

医師においては、被検者の心理状態を常に把握しながら遺伝子医療、遺伝カウンセリングを実施する資格として、臨床遺伝専門医（日本人類遺伝学会と日本遺伝カウンセリング学会の共同認定）の養成が行われている。非医師の職種としては、上記二学会の共同認定の認定遺伝カウンセラー養成が大学院教育としてなされている。そこでは、遺伝医療、遺伝教育、さらに企業において活躍する認定遺伝カウンセラーとしての人材育成を実施している。患者・家族と遺伝カウンセリング担当者との良好な信頼関係に基づき、さまざまなコミュニケーションが行われ、この過程で医療的・心理的・精神的援助がなされる。一方的な医学情報提供だけではないことに留意すべきである。

5. 予期せぬ結果や偶発的な所見について

パーソナルゲノム解析の医療応用、すなわち次世代シーケンサーの臨床応用、クリニカルシーケンスによって網羅的に全ゲノム、全エクソンの解析が行われると、目的とする遺伝子解析の結果だけではなく、ゲノム上のすべての遺伝子の遺伝子変異の情報が得られる。その中には家族性腫瘍遺伝子や遺伝性変性疾患の遺伝子が含まれるかもしれない。家族性腫瘍の場合には、発症リスクが予測できることにより適切な対応をとることができ、被験者の健康にとって大きなメリットもあろう。現時点では治療法のない神経変性疾患の場合には、被験者は予期せぬ結果を発症前に知らされることになる。

このような情報は、偶発的所見 incidental findings として議論されるようになってきている。偶発的所見について、American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) が被験者に報告することを推奨している遺伝子として 56 遺伝子を呈示している。(表 1)⁹⁾。これに対して、現在、多くの論議がなされている。ACMG は、「浸透率および臨床的有用性において（この 56 遺伝子についても）不十分なデータがあることを認識している。さらなるデータの集積とともに、これらの提言を少なくとも毎年更新する過程を作るこ

■特集・パーソナルゲノム時代における倫理的課題

表1 ACMG56

臨床シーケンスにおいて、偶発的所見を被験者に返すことを推奨する表現型とその原因遺伝子を示す。

表現型	遺伝子
遺伝性乳がん卵巣がん症候群	<i>BRCA1, BRCA2</i>
Li-Fraumeni 症候群	<i>TP53</i>
Peutz-Jeghers 症候群	<i>STK11</i>
Lynch 症候群	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>
家族性大腸腺腫性ポリポーシス	<i>APC</i>
<i>MYH</i> 関連ポリポーシス； 多発性大腸腺がん, <i>FAP</i> type 2； 毛包性腫瘍を伴う常染色体劣性の大腸腺腫性ポリポーシス	<i>MUTYH</i>
Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>
多発性内分泌腫瘍症 I 型	<i>MEN1</i>
多発性内分泌腫瘍症 II 型	<i>RET</i>
家族性甲状腺髄様がん	<i>RET</i>
<i>PTEN</i> 過誤腫症候群	<i>PTEN</i>
網膜芽細胞腫	<i>RBI</i>
遺伝性パラガングリオーマ・褐色細胞腫症候群	<i>SDHD, SDHAF2, SDHC, SDHB</i>
結節性硬化症	<i>TSC1, TSC2</i>
<i>WT1</i> - 関連 Wilms 腫瘍	<i>WT1</i>
神経線維腫症 II 型	<i>NF2</i>
Ehlers-Danlos 症候群, 血管型	<i>COL3A1</i>
Marfan 症候群, Loeys-Dietz 症候群, 家族性胸部大動脈瘤 と解離	<i>FBNI, TGFBR1, TGFBR2, SMAD3, ACTA2, MYLK, MYH11</i>
肥大型心筋症, 拡張型心筋症	<i>MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, TPM1, MYL3, ACTC1, PRKAG2, GLA, MYL2, LMNA</i>
カテコラミン誘発性多型性心室性頻脈	<i>RYR2</i>
不整脈原性右室心筋症	<i>PKP2, DSP, DSC2, TMEM43, DSG2</i>
Romano-Ward QT 延長症候群 I 型, II 型, III 型, Brugada 症候群	<i>KCNQ1, KCNH2, SCN5A</i>
家族性高コレステロール血症	<i>LDLR, APOB, PCSK9</i>
悪性高熱症易罹患性	<i>RYR1, CACNA1S</i>

ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics

(文献5より)

とを強く勧める」と述べている。一方、米国では、2013年12月に Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues から Incidental findings についての勧告が出された。ここでは、検査担当者は検査実施の前にあらかじめ被験者に

何が起こり得るか予測して知らせておくことを勧めている⁶⁾。

6. おわりに

ゲノム解析研究が実を結び、現在、我々は多く

5. 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■

の疾患の正確な診断と根本治療へのプロセスを歩んでいる。高度医療の臨床応用の過程において大切なことは、遺伝子医学というハード面と、その医療を受ける患者、家族への情報提供、支援というソフト面である。患者、家族の人権および、生命の尊厳への慎重な配慮が求められる。

遺伝子診療が実地医療の一部となりつつある現在、遺伝カウンセリングの必要性は増しており、生命倫理、医療倫理、社会倫理に関する十分な教育と人材育成がなされることが重要である。

文 献

- 1) Schuster SC : Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5 : 16-18, 2008.
- 2) 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 (2011). <http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis.pdf>
- 3) 日本人類遺伝学会 : 「DTC 遺伝学的検査に関する見解」2008年10月2日. <http://jshg.jp/dtc/index.html>
- 4) 遺伝医学関連学会 : 遺伝学的検査に関するガイドライン (2003). <http://jshg.jp/resources/data/10academies.pdf>
- 5) Green RC, Berg JS, Grody WW, et al : ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 15 : 565-574, 2013.
- 6) Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues. Anticipate and communicate. Ethical management of incidental and secondary findings in the clinical, research and direct-to-consumer contexts. Washington, D.C. December 2013. <http://www.bioethics.gov>

遺伝子検査施行時の倫理的対応

斎藤 加代子

はじめに

ゲノム研究の進歩により、診療の現場において確定診断としての遺伝子検査がなされるようになった。大量のDNA断片の並列シーケンスによる革新的な遺伝子解析技術である次世代シーケンサーの開発により個人ゲノム解析が格段にハイスループット化され、臨床応用される時代となりつつある¹⁾。従来の臨床検査、さらに遺伝子検査でも診断が困難であった症例で確定診断がつく可能性が高くなってきている。そのような背景において、発症リスクを有する人々における発症前診断、保因者診断、そして出生前診断も可能な時代となった。少量の検体で、迅速に、そして高い精度で遺伝子検査がなされる時代であるが故に、遺伝情報の特性をよく理解して、対応することが求められる。遺伝情報の特性とは²⁾、生涯変化しないこと、血縁者間で一部共有されていること、血縁関係にある親族の遺伝型や表現型が比較的正確な確率で予測できること、保因者診断ができる場合があること、発症する前に将来の発症をほぼ確実に予測することができる場合があること、出生前診断に利用できる場合があること、不適切に扱われた場合には、被検者および被検者の血縁者に社会的不利益がもたらされる可能性があることなどである。したがって、倫理的法的社会的問題 (ethical legal social issues) への配慮が必要である。診療における遺伝子検査実施においては、遺伝カウンセリング実施体制の構築と遺伝子情報の

管理が重要である。また、我が国の医療事情や倫理的問題に対処でき、オーダーメイド医療にも対応できる人材の育成が求められている。

遺伝子検査の対象

1. 単一遺伝子病

一種類の遺伝子変異を原因とする疾患を単一遺伝子病という。染色体上の遺伝子変異により発症するメンデル遺伝病と、ミトコンドリアにおける遺伝子変異により発症する疾患が含まれる。単一遺伝子変異のすべてが疾患になるわけではないが、何らかの遺伝形質発現の原因になり得る。生まれてくる子どもの1~2%に何らかの先天性の異常を認めることがわかっており、現在、2万を超える遺伝形質が知られている。

遺伝子検査は単一遺伝子病における確定診断の方法として発展してきた。例えば家族性腫瘍であれば、DNA配列における変異が明らかになることにより、腫瘍の早期発見・治療がなされ、家族における遺伝に関する問題を明らかにすることが可能となる。腫瘍摘出による早期治療に結びつくこともある一方で、患者・家族にとって、自身や子どもにも同様の疾患が出るのか、ほかの親族への影響はどうか、など具体的な検査動機となる。確定診断につながる遺伝子検査であれば有効な治療法が確立されていなくても、自然歴情報を入手することで医療管理方針決定が可能となり、そのほかの無駄な検査を回避できるなどメリットがあるため、被検者が未成年であっても検査の適応となる場合が多い。一方で、発症前診断、保因者診断の場合には、症状がない個人が検査の対象となるため被検者の「知る権利」と「知らないでいる権利」

さいとう かよこ

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

〒162-0054 東京都新宿区河田町10-22

E-mail address : saito.kayoko@twmu.ac.jp

を守るために、発症時に有効な治療法が確立されている疾患の場合を除いては、未成年者の検査は回避されるべきである。さらに成人であっても、本人の自発的意思に基づいているか、時期や状況が妥当か、フォローアップ体制が整っているかなど、万全の体制で臨む必要がある。着床前診断を含む出生前診断の場合には、検査を希望し同意する親と被検者である胎児の立場が異なるため、検査の実施にあたっては疾患ごとの議論と症例ごとの慎重な対応が必要不可欠である。

2. 多因子遺伝病

複数の遺伝子変異と環境要因が相互に影響して惹起される疾患を多因子遺伝病という。先天奇形、糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満、癌などが含まれる。浸透率あるいは個々の遺伝子の表現型に及ぼす効果がそれほど高くはないという特徴がある。罹患者の頻度が高く、かつ環境因子の調整による発症予防、早期発見、早期治療が可能となることから、ゲノムワイドな研究が進み、予測的遺伝学的検査としての易罹患性検査の開発が求められている。ただし、これら多因子遺伝病の発症予測に用いられる遺伝学的検査、特に体質遺伝子検査においては、検査の分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性、環境因子の分析を含むコホート研究と確率的解析による科学的根拠を明確にする必要がある。「肥満遺伝子検査」や「子どもの能力判定遺伝子検査」など、頬粘膜でDNAを採取できる手軽さから、分析的妥当性に欠ける遺伝子検査を実施する健診クリニックや検体を直接に検査会社に送って分析結果を得るようなDirect-to-Consumer (DTC) 遺伝子検査を実施する検査企業が現れてきている³⁾。体質遺伝子検査と呼ばれる遺伝学的検査の多くは、個人の体質を確実に表すもの、あるいはある疾患を発症するかどうかについて明確な答えを与えるものではなく、体質あるいは発症のリスクについて、その確率を示しているにすぎない。またその検査の有用性が科学的に証明されているものは極めて少ないのが現状である⁴⁾。将来的には適切な運用により個別化健康増進が可能となると考えられるが、一方で営利目的の検査のみが先行している場合や、妥当性・有用性が不明

瞭な場合など問題点が少なくない。

遺伝性疾患に対する対応

「遺伝医学関連学会による遺伝学的検査に関するガイドライン(2003)」⁵⁾は、遺伝学的検査が医療全域にわたって広く有効に利用される時代に対応して、2011年に日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」²⁾として改訂がなされた。この改訂では、すでに発症している患者の診断目的として行われる遺伝学的検査において、各診療科の医師自身が遺伝に関する十分な理解と知識および経験をもつことが重要であり、検査の意義や目的の説明とともに、結果が得られた後の状況や検査結果が血縁者に影響を与える可能性があることなどについて十分に説明し、被検者が理解して自己決定できるように支援する体制を整えることを述べている。医療機関は、遺伝医学の基本的事項および個人の遺伝情報の取り扱いに関する啓発や教育を行い、適切な遺伝医療を実施できる体制を整備することが望まれる。

遺伝カウンセリングの実施

遺伝子検査施行時の倫理的対応を考えると、遺伝カウンセリングは必至のことである。すでに発症している患者における遺伝子検査においては主治医が遺伝子検査の際に実施する。遺伝学的検査実施時に考慮される説明事項の例を表に示した²⁾。保因者診断、発症前診断、出生前診断において、臨床遺伝の専門的知識を有する臨床遺伝専門医と認定遺伝カウンセラーが遺伝カウンセリングを行う。遺伝カウンセリングに関しては、別稿にて述べられているので参照されたい。

薬理遺伝学(PGx)検査における対応

薬剤の効果や副作用の予測としてのPGx検査にかかわる遺伝子診療⁶⁾は、これからの重要なゲノム医療のフィールドである。薬に対する反応などの体質の違いを遺伝子多型から予測し、遺伝子の情報をもとに個人個人にあった治療をすることである。薬の効果がどうか、副作用を起こしやすいかどうかをあらかじめ遺伝子多型で調べる。効果が高い薬剤や、副作用がでない薬剤を選

表 遺伝学的検査実施時に考慮される説明事項の例(日本医学会, 2011)²⁾

- 1) 疾患名：遺伝学的検査の目的となる疾患名・病態名
- 2) 疫学的事項：有病率，罹患率，性比，人種差など
- 3) 病態生理：既知もしくは推測される分子遺伝学的発症機序，不明であればその旨の説明
- 4) 疾患説明：症状，発症年齢，合併症，生命予後などの正確な自然歴
- 5) 治療法：治療法・予防法・早期診断治療法(サーベイランス法)の有無，効果，限界，副作用など
- 6) 遺伝学的事項：
 - ・ 遺伝形式：確定もしくは推定される遺伝形式
 - ・ 浸透率，新規突然変異率，性腺モザイク等により生じる確率
 - ・ 再発(確)率：同胞ならびに子の再発(確)率(理論的確率と経験的確率)
 - ・ 遺伝学的影響：血縁者が罹患する可能性，もしくは非発症保因者である可能性の有無
- 7) 遺伝学的検査：
 - ・ 遺伝学的検査の目的(発症者における遺伝学検査の意義)，検査の対象となる遺伝子の名称や性質など
 - ・ 遺伝学的検査の方法：検体の採取法，遺伝子解析技術など
 - ・ 遺伝学的検査により診断が確定する確率：検査精度や検査法による検出率の差など
 - ・ 遺伝学的検査によりさらに詳しくわかること：遺伝型と表現型の関係
 - ・ 遺伝学的検査結果の開示法：結果開示の方法やその対象者
 - ・ 発症者の遺伝学検査の情報に基づいた，血縁者の非発症保因者診断，発症前診断，出生前診断の可能性，その概要と意義
- 8) 社会資源に関する情報：医療費補助制度，社会福祉制度，患者支援団体情報など
- 9) 遺伝カウンセリングの提供について
- 10) 遺伝情報の特性：
 - ・ 遺伝学的情報が血縁者間で一部共有されていること。
 - ・ 発症者の確定診断の目的で行われる遺伝学的検査においても，得られた個人の遺伝学的情報が血縁者のために有用である可能性があるときは，積極的に血縁者への開示を考慮すべきであること
- 11) 被検者の権利：
 - ・ 検査を受けること，受けないこと，あるいは検査の中断を申し出ることについては自由であり，結果の開示を拒否することも可能であること
 - ・ 検査拒否，中断の申し出，結果の開示拒否を行っても，以後の医療に不利益を受けないこと
 - ・ 検査前後に被検者が取りうる選択肢が提示され，選択肢ごとのメリット・デメリットが平易に説明されること(注：ここに掲げた事項は，これらすべてを遺伝学的検査実施前に説明しなければならないということではなく，被検者の理解や疾患の特性に応じた説明を行う際の参考として例示したものである。)

択することにより，安全で有効な治療が期待できる。例えば，てんかんに対して抗痙攣薬を用いたり⁷⁾，癌に抗癌薬を使う場合⁸⁾においても，遺伝子情報をもとに，抗痙攣薬や抗癌薬について，個人個人への効果や副作用の起こしやすさを事前に予測し，薬剤を適正に使用することができれば，副作用を避けられる可能性がある。

ひとつの薬でも吸収，分布，代謝，排泄のプロセスにおいて，複数のトランスポーター，受容体，イオンチャネル，代謝酵素などが関わっている。したがって，ある遺伝子多型であれば必ず副作用が出るとか必ず効果が強い，などと確定的なことはいいがたい。現在のところ，薬理遺伝学は100%の予測ではない。しかし，診療に応用するメリットは高い。もしPGx検査により副作用出現のリスクが高いと考えられても，ほかの選択肢はなく，その薬を使わざるを得ない場合がある。その場合には，副作用出現のための細やかなチェックをしつつ，副作用出現を未然に防ぐことが必要となる。臨床研究の積み重ねによって薬理遺伝学の診療は発展をする。現在，PGx検査においては研究の要素を含みながら診療に応用していくプロセスにある。そこには患者本人と家族に対して，十分な理解を得られるような説明が必要である。生殖細胞系列のゲノムの多型を見る検査が含まれることを認識し，メンデル遺伝を示す疾患の原因遺伝子が薬理遺伝学の対象となり得ることも知っておく必要がある。オーダーメイド医療の対象者への説明と，状況によっては遺伝カウンセリングが必要となる。

予期せぬ結果や偶発的な所見について

遺伝子検査において，次世代シーケンサーの臨床応用，クリニカルシーケンスによって網羅的に全ゲノム，全エクソンの解析が行われると，目的とする遺伝子解析の結果だけでなく，ゲノム上のすべての遺伝子の遺伝子変異の情報が得られる。その中には家族性腫瘍遺伝子や遺伝性変性疾患の遺伝子が含まれるかもしれない。家族性腫瘍の場合には，癌の発症リスクが予測できることによって適切な対応をとることができ，被検者の健康にとって大きなメリットもあろう。現時点では治療

法のない神経変性疾患の場合には、被検者は予期せぬ結果を発症前に知らされることになる。このような情報は、偶発的所見(incidental findings)として、議論されるようになってきている。Incidental findingsについて、American College of Medical Genetics (ACMG)が報告に含めるべき対象遺伝子の一覧を提示している。また、米国では、2013年12月にPresidential Commission for the Study of Bioethical IssuesからIncidental findingsについての勧告が出された。ここでは、検査担当者は検査実施の前にあらかじめ被検者に何が起り得るか予測して知らせておくことを勧めている。

遺伝子情報の取り扱い

UNESCOの「ヒト遺伝情報に関する国際宣言(2003)」⁹⁾第14条では、「プライバシー及び機密性」として、「個人を特定できるヒト遺伝情報、ヒトのプロテオーム情報及び生物学的試料は(中略)第三者、特に雇用主、保険会社、教育機関及び家族に対して開示、若しくは入手可能とすべきではない。ヒト遺伝情報、ヒトのプロテオーム情報及び生物学的試料を使用する研究に参加する個人のプライバシーは保護され、これらの情報は機密情報として取扱われるべきである」と述べられている。厚生労働省「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン(2004)」¹⁰⁾にも「これが漏えいした場合には、本人及び血縁者が被る被害及び苦痛は大きなものとなるおそれがある。したがって、検査結果及び血液等の試料の取扱いについては、UNESCO国際宣言、医学研究分野の関連指針及び関連団体等が定めるガイドラインを参考とし、特に留意する必要がある」とされている。一方で、PGx検査の臨床現場における普及により、薬剤の副作用の出現予測や薬剤必要量の予測が可能となった。被検者の薬物治療において、遺伝子情報であるPGx検査結果を医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師などが共有することで、副作用の出現を防ぎ、適量を投与するオーダーメイド医療がなされる。遺伝子情報ならば何もかも厳重なセキュリティーのもとに置かなければならないとすると、むしろ弊害が出現することになる。遺伝子情報の内容に合わ

せた適切なレベルの取り扱いが求められる。

おわりに

ゲノム解析研究が実を結び、多くの疾患の正確な診断と根本治療へのプロセスを現在、我々は歩んでいる。高度医療の臨床応用の過程において大切なことは、遺伝子医学というハード面と、その医療を受ける患者、家族への情報提供、支援というソフト面である。患者、家族の人権および、生命の尊厳への慎重な配慮が求められる。遺伝子検査が実地医療の一部となりつつある現在、その円滑、正確な実施が求められ、生命倫理、医療倫理、社会倫理に関する十分な教育と人材育成がなされることが重要である。

文献

- 1) Schuster SC: Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* **5**: 16-18, 2008
- 2) 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(2011) (<http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis.pdf>)
- 3) Human Genetics Commission. More Genes Direct: A report on developments in the availability, marketing and regulation of genetic tests supplied directly to the public, 2007 (<http://www.hgc.gov.uk/UploadDocs/DocPub/Document/More%20Genes%20Direct%20-%20final.pdf>)
- 4) 日本人類遺伝学会: DTC 遺伝学的検査に関する見解, 2008年10月2日 (<http://jshg.jp/dtc/index.html>)
- 5) 遺伝医学関連学会: 遺伝学的検査に関するガイドライン, 2003 (<http://jshg.jp/resources/data/10academies.pdf>)
- 6) Guidance for Industry E15 Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories by FDA, 2008
- 7) Chen P, Lin JJ, Lu CS, et al: Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. *N Engl J Med.* **364**: 1126-1133, 2011
- 8) Minami H, Sai K, Saeki M, et al: Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and *UGT1A1**6 and *28. *Pharmacogenet Genomics* **17**: 497-504, 2007
- 9) UNESCO: ヒト遺伝情報に関する国際宣言, 2003 (http://portal.unesco.org/en/ev.php-URL_ID=17720&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html)
- 10) 厚生労働省: 医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン, 2004 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/12/h1227-6.html>)

6. 出生前診断の遺伝カウンセリング

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 浦野真理, さいとうかよこ 齋藤加代子



KEY WORDS 遺伝カウンセリング

単一遺伝性疾患
出生前診断の適応
結果開示
心理的葛藤



Mari Urano

はじめに

周産期医療における医療機器の向上や遺伝学的検査の進歩などにより、胎児の情報がより早期に判明し、また多くの情報が得られるようになった。妊娠中の夫婦、特に女性にとっては、情報が得られる利点もあるが、児に何らかの異常があると伝えられた場合には、衝撃も大きく、その後の検査の選択肢についてはさまざまな苦悩が増えているように思われる。そのため、出生前診断に際しての患者（クライアント）の自己選択を支える遺伝カウンセリングは重要であり、正確な情報提供を得て、夫婦が熟慮する機会が必要であると考える。本稿では出生前診断の遺伝カウンセリング、特に単一性遺伝性疾患を中心に述べる。

I. 遺伝カウンセリングとは

遺伝カウンセリングとは、以下のように National Society of Genetic Counselors (2006) によって定義されている¹⁾。「遺伝カウンセリングは疾患の医学的、心理的、家族的影響を理解し、それに適応できるように援助するプロセスである。このプロセスは以下の3つの事項を統合したものである。

- ①疾患の発生もしくは再発の可能性を評価するための家族歴と病歴の解釈
- ②遺伝、検査、治療・健康管理、予防、資源および研究についての教育
- ③自律的決定、リスクや疾患への適応を促進するカウンセリング」

遺伝カウンセリングでは、ある遺伝性疾患に関して、どのくらいの発症リスクがあるか、または再発のリスクがあるか等についての情報を求めるクライアントが心の負担や重荷を感じることなく、さまざまな情報を得て、自己決定できるようにすることが重要と考えられている。

その過程では、クライアントには臨床遺伝専門医や遺伝カウンセラー、看護師、心理士などの臨床遺伝専門職が心理的、社会的な支援を通して、クライアントへの援助を行うことを求められている。

例えば、再発のリスクの受け止め方は人によって異なる。受け止める背景には、その人の教育や文化的背景、数学的確率の理解度、不安になりやすさなどの性格傾向によって影響を受ける。ある染色体疾患の児をもつ母親の1人は、再発率は一般人のリスク（3～5%）より数倍くらい高くなると伝えられた際に、「そんなにリスクが高くては、とても次の子は望めません。」と答えたが、別の母親は「一般人ともそんなに違わないので安心しました。」と話した。このようにリスクの捉え方、解釈の仕方は人それぞれで、それゆえに遺伝カウンセリングの展開は家族ごとに違ってくる。そこで、さまざまな職種がチームで関わることによって、多様なクライアントの価値観、解釈にきめ細やかな対応が可能になると考えられる。

II. 出生前診断について

出生前診断は、胎児の状態を知る目的で行われる。現在実施されている出生前診断には、超音波による画像診断、母体血清マーカー、羊水検査、絨毛検査、NIPT（Noninvasive prenatal genetic testing：無侵襲的出生前遺伝学的検査）とさまざまな方法がある。母体や胎児への負担の大きさで考えると、超音波診断や母体血清マーカー、あるいは

NIPTは非侵襲的な方法と捉えられ、羊水検査や絨毛検査は流産のリスクを伴うため、侵襲的と考えられている。それぞれの検査で判明する点、限界についてもよく理解した上で選択することが必要である。

この出生前診断の適応に関しては、遺伝関連10学会（日本遺伝カウンセリング学会、日本遺伝子診療学会、日本産科婦人科学会、日本小児遺伝学会、日本人類遺伝学会、日本先天異常学会、日本先天代謝異常学会、日本マスキング学会、日本臨床検査医学会、家族性腫瘍研究会）が、遺伝医療の健全な将来のために2003年にガイドラインを制定し²⁾、出生前診断に関わる項目を作成している（表1）。

出生前診断の適応は単一遺伝性疾患においては「新生児期もしくは小児期発症の重篤な遺伝性疾患」に限られる。臨床遺伝専門医を含む複数の医師やスタッフ、倫理委員会での討議を行う必要があり、倫理的・社会的問題が含まれていることを十分に理解する必要がある。そのような状況をふまえ、遺伝カウンセリングが行われた上で、夫婦の意思決定がなされなければならない。

III. 単一遺伝性疾患の出生前診断に関する遺伝カウンセリング

東京女子医科大学では、1995年から高度先進医療として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーと福山型筋ジストロフィーの遺伝子診断の申請が出生前診断を含み、認められた。また、1996年に脊髄性筋萎縮症I型～II型についても倫理委員会の承認を受けて実施可能となった。これらの3つの神経筋疾患の出生前診断の相談を希望される夫婦に対して、遺伝カウンセリングは表2のような流れで行われることが多い。

初回の遺伝カウンセリングではクライアントが来院した目的を把握するのが重要であ