

260/280 was 1.62. The DNA of this sample was sufficiently deteriorated to prevent amplification with 45 cycle PCR using 50 ng of DNA. However, this was an exceptional case. Other samples, including three 8-year-old DBS samples, were successfully used for PCR-HRMA.

PCR-HRMA data

The melting curves were normalized after subtraction of the post-melting area fluorescence at 81.3–82.5°C from the pre-melting area fluorescence at 69.8–70.8°C. Normalized melting curves of SMA patients with *SMN1* deletion and *SMN2* retention [*SMN1*(-)/*SMN2* (+) curves] were located near the curves of controls with *SMN1* retention and *SMN2* deletion [*SMN1*(+)/*SMN2*(-) curves], but far from the curves of controls with *SMN1* and *SMN2* retention [*SMN1*(+)/*SMN2*(+) curves] (Figure 3). It should be noted in this study that the *SMN1*(-)/*SMN2*(+), *SMN1*(+)/*SMN2*(-) and *SMN1*(+)/*SMN2*(+) curves formed their own groups, but the curves in each group did not converge into one line. In addition, the melting curves of samples with the same genotype did not converge into one line.

Comparison with PCR-RFLP data

The PCR-HRMA data were completely consistent with the data obtained by conventional PCR-RFLP methods (sensitivity = 1.0, specificity = 1.0) (Table 1). However, we failed to determine the relationship between the difference plots and the copy number of the *SMN1* and *SMN2* genes in the control samples. We also failed to determine the relationship between the difference plots and the copy number of the *SMN2* gene in SMA patient samples.

Discussion

We have developed a rapid, accurate and simple method for SMA screening, which consists of DNA extraction from DBSs on filter paper and PCR-HRMA. We previously reported a PCR-RFLP method of detecting SMA using DNA extracted from DBSs [15]. However, when DNA extracted from DBSs is used for PCR-HRMA, the problem of DNA quality/quantity must be confronted. To overcome this problem, others have performed nested PCR before HRMA [10]. Our strategy to overcome the DNA quality/quantity problem was to simply increase the number of PCR cycles. We increased the PCR cycle number by 50%, obtaining successful results. Our method to overcome the quality/quantity problem looks very easy, once it has been done.

The other problem in HRMA is generating allele-specific melting curves. The melting curves of SMA patients with *SMN1* deletion can be distinguished from those of controls with *SMN2* deletion by conducting PCR with a special probe [11], or by adding driver DNA (*SMN1/SMN2*=0:3) to the sample DNA prior to PCR [13]. Also used is a method incorporating calibrated short-amplicon melt profiling with an oligonucleotide forming a hairpin structure, which increases the resolution between the curve profiles because of the tightened clustering of curves [14]. However, our method does not require probes, drivers or calibrated short-amplicon melt profiling. Our study showed that the primer set designed by Lefebvre et al (R111 and 541C770) [2] enabled sufficient differentiation of the melting curves in PCR-HRMA. The primer set was firstly reported in the article of cloning *SMN1* in 1995 [2], but has not been used in PCR-HRMA in all laboratories except ours [12].

The primary outcome measure of our screening method was to determine the accuracy of the PCR-HRMA with DBS-DNA. The accuracy of PCR-HRMA with DBS-DNA was evaluated by the rate of concordance between PCR-HRMA with DBS-DNA and PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood. Our study demonstrated that the results of PCR-HRMA with DBS-DNA were completely concordant with those of PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood (Table 1). The secondary outcome of our study was to determine the length of time a DBS on filter paper will last without deteriorating. PCR amplification cannot be performed using DNA from

deteriorated DBS. In our study, we found only one deteriorated DBS sample among the 70 samples with storage period of 1-8 years. Thus, we concluded that even if stored more than 8 years, the DBS samples can be used for PCR.

We should mention here some limitations of PCR-HRMA using DBS-DNA for SMA screening. First, PCR-HRMA with DBS-DNA cannot determine the copy number of alleles, because the melting curves of samples with the same genotype did not always converge into one line. This limitation may be partly due to the variable deterioration of DNA extracted from DBSs that have been stored for extended periods (years). Second, PCR-HRMA can detect only *SMN1* deletion, and cannot detect any intragenic mutations in *SMN1*.

In conclusion, we demonstrated the strength of our PCR-HRMA method: the rapidity, the accuracy and the simplicity. As to the required time from the start of PCR to the end of HRMA, our method takes only 1.5 hours, while PCR-RFLP takes more than 8 hours. The machine in our study, LightCycler®480 System II, can handle as many as 384 samples, according to the manufacturer's instruction. As to the accuracy, our results of PCR-HRMA with DBS-DNA were completely concordant with those of PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood. In addition, our method does not need the second PCR procedures. Our method needs neither special probes nor drivers. Our method needs only "a single PCR with a primer set". Thus, our "PCR-HRMA with DBS-DNA" may be a useful screening method to detect *SMN1* deletion. It should also be noted that DNA from 8-year-old DBSs can be used as template for PCR-HRMA. All of these findings suggest that our method is practicable for a large population study and/or for a long period study.

References

1. Nurputra DK, Lai PS, Harahap NIF, et al. Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials. *Annals of Human Genetics* 2013;77:435-463.
2. Lefebvre S, Bürgien L, Reboullier S, et al. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell* 1995;80(13):155-165.

3. Lefebvre S, Bulet P, Liu Q, et al. Correlation between severity and *SMN* protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics* 1997;16: 265-269.
4. van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *The Lancet* 1995; 345:985-6.
5. McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, et al. Identification of Proximal Spinal Muscular Atrophy Carriers and Patients by Analysis of *SMN^T* and *SMN^C* Gene Copy Number. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;60: 1411-1422.
6. Sutomo R, Akutsu T, Takeshima Y, et al. Rapid SMN1 Deletion Test Using DHPLC to Screen Patients With Spinal Muscular Atrophy. *Am. J. Med. Genet* 2002; 113: 225-226.
7. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. 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.
8. Arkblad EL, Darin N, Berg K, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders* 2006;16: 830-838.
9. Baris I, Edik O, Koksall V, Arican-Baris ST. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using tetra-primer ARMS PCR assay: Simultaneous detection of SMN1 and SMN2 detection. *Mol. Cell. Probes* 2010;24: 138-141.
10. Chen Y, Li L, Sun L, Yang T, Wu H. Newborn dried blood-spot screening of the p.V371 variant of *GJB2* by high-resolution melting analysis. *Int J Pediatr Otorphi* 2014;78:1080-3.
11. Chen WJ, Dong WJ, Lin XZ, et al. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using High-Resolution Melting Analysis. *BMC Medical Genetics* 2009;10(45):1-4.
12. Morikawa S, Harahap ISK, Kaszynski RH, et al. Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Via High-Resolution Melting Analysis Symmetric Polymerase Chain Reaction Without Probe: A Screening Evaluation for SMN1 Deletions and Intragenic Mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15(10):677-84.

13. Er TK, Kan TM, Su YF, et al. High-resolution melting (HRM) analysis as a feasible method for detecting spinal muscular atrophy via dried blood spots. *Clin. Chim. Acta* 2012; 413: 1781-5.
14. Dobrowolski SF, Pham HT, Pouch-Downes F, Prior TW, Naylor EW, Swoboda KJ. Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy by Calibrated Short-Amplicon Melt Profiling. *Clinical Chemistry* 2012; 53(6): 1-7.
15. Harahap NIF, Harahap ISK, Kaszynski RH, et al. Spinal Muscular Atrophy Patient Detection and Carrier Screening Using Dried Blood Spots on Filter Paper. *Genet Test Mol Bioma* 2012;16(2): 123-9.

Table and Figure legends

Table 1 HRMA with DBS-DNA vs PCR-RFLP with DNA freshly collected blood.

Figure 1 PCR primers. (A) Positions and directions of the oligonucleotide primers. G and A in intron 6, and C and T in exon 7 indicate nucleotide differences between *SMN1* and *SMN2*. (B) Primer sequences. The expected size of the PCR product is 202 bp.

Figure 2 Amplification curves and melting curves of PCR products. (A) Amplification curves of PCR products. (B) Melting curves of PCR products. DBS-DNA was used as template DNA. Blue-colored curves represent amplified products, and orange-colored curves (or lines) represent non-amplified ones. The non-amplified curves were obtained from one DBS-DNA sample (*) and a negative control without DNA (**).

Figure 3 HRMA data of three genotypes. (A) Normalized and shifted melting curves. (B) Normalized and temperature-shifted difference plot. HRMA clearly distinguished three genotypes: *SMN1*(+)/*SMN2*(+) (*SMN1* and *SMN2* retention; normal control individuals), *SMN1*(+)/*SMN2*(-) (*SMN1* retention and *SMN2* deletion; normal control individuals), and *SMN1*(-)/*SMN2*(+) (*SMN1* deletion and *SMN2* retention; SMA patients).

Table 1 HRMA with DBS-DNA vs PCR-RFLP with DNA freshly collected blood.

(A)

		PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood		Total
		<i>SMN1</i> (+)	<i>SMN1</i> (-)	
HRMA with DBS-DNA	<i>SMN1</i> (+)	29	0	29
	<i>SMN1</i> (-)	0	40	40
Total		29	40	69

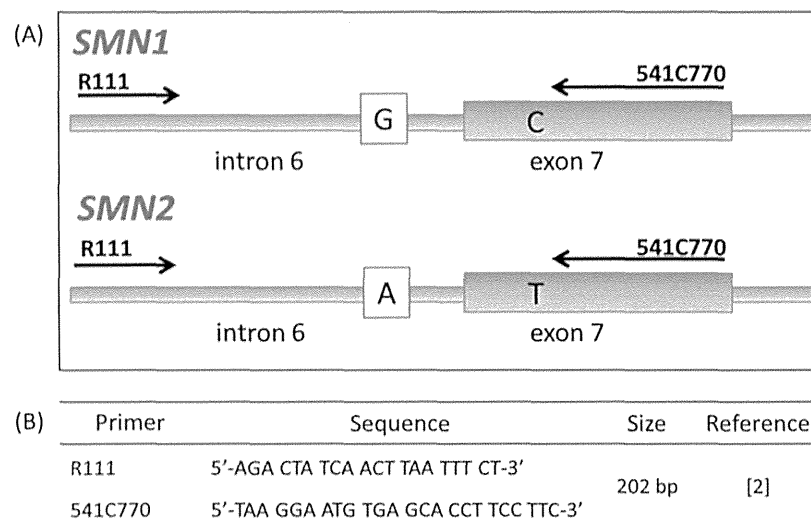
sensitivity 1.0, specificity 1.0

(B)

		PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood		Total
		<i>SMN2</i> (+)	<i>SMN2</i> (-)	
HRMA with DBS-DNA	<i>SMN2</i> (+)	66	0	66
	<i>SMN2</i> (-)	0	3	3
Total		66	3	69

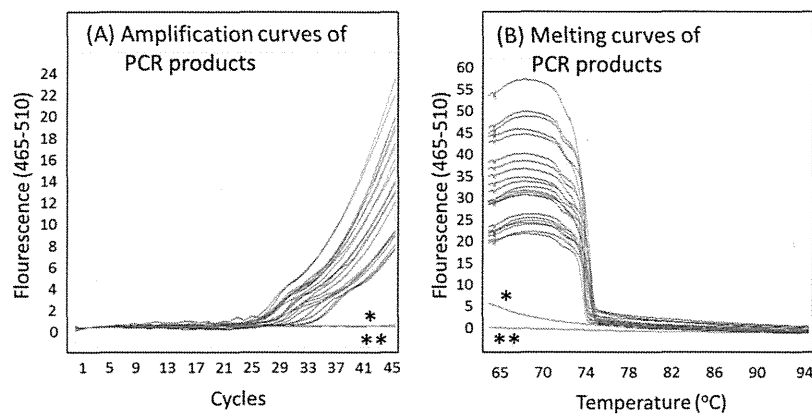
sensitivity 1.0, specificity 1.0

Figure 1 PCR primers.



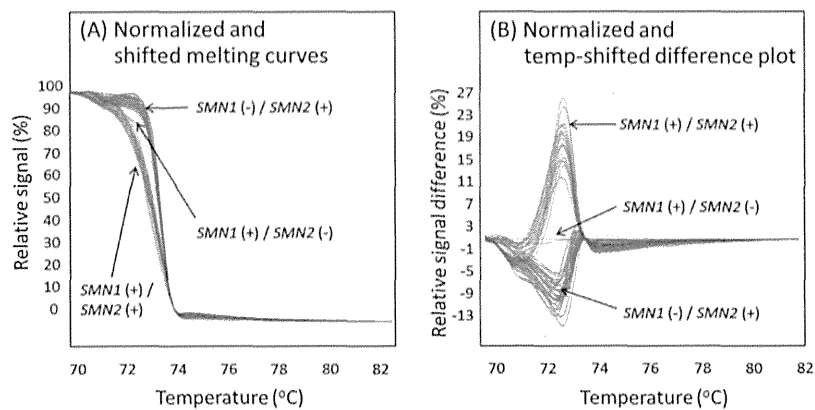
(A) Positions and directions of the oligonucleotide primers. G and A in intron 6, and C and T in exon 7 indicate nucleotide differences between *SMN1* and *SMN2*. (B) Primer sequences. The expected size of the PCR product is 202 bp.

Figure 2 Amplification curves and melting curves of PCR products.



(A) Amplification curves of PCR products. (B) Melting curves of PCR products. DBS-DNA was used as template DNA. Blue-colored curves represent amplified products, and orange-colored curves (or lines) represent non-amplified ones. The non-amplified curves were obtained from one DBS-DNA sample (*) and a negative control without DNA (**).

Figure 3 HRMA data of three genotypes.



(A) Normalized and shifted melting curves. (B) Normalized and temperature-shifted difference plot. HRMA clearly distinguished three genotypes: *SMN1*(+)*SMN2*(+) (*SMN1* and *SMN2* retention; normal control individuals), *SMN1*(+)*SMN2*(-) (*SMN1* retention and *SMN2* deletion; normal control individuals), and *SMN1*(-)*SMN2*(+) (*SMN1* deletion and *SMN2* retention; SMA patients).

日本小児神経学会推薦総説

脊髄性筋萎縮症 遺伝子診断から治療戦略まで

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

西尾久英

要 旨

脊髄性筋萎縮症 (SMA : spinal muscular atrophy) は、体幹・四肢近位部優位に筋萎縮・筋力低下を示す遺伝性下位運動ニューロン疾患である。本項では、常染色体劣性遺伝形式をとる、5番染色体 q13 領域関連 SMA を扱う。1995年、疾患遺伝子として SMN1 遺伝子が同定された。以降、遺伝子解析が可能になり、95% の患者は SMN1 遺伝子欠失のホモ接合体であることが判明している。また、SMN1 遺伝子と相同な SMN2 遺伝子のコピー数が多いければ、SMA が軽症化する傾向にあることも明らかになった。両遺伝子の産物である SMN 蛋白は、他の蛋白に結合して SMN 複合体を形成し、多岐にわたる細胞活動に関わっている。現在のところ、有効な根本的治療法は確立していないが、SMN2 遺伝子の転写促進戦略、あるいは SMN2 遺伝子のスプライシング修正戦略に基づく治療法が考案され、それらの有効性について検討が進められている。

キーワード：脊髄性筋萎縮症、遺伝子診断、SMN1 遺伝子、SMN2 遺伝子、SMN 蛋白、治療戦略

疾患と遺伝子の概要

(1) 脊髄性筋萎縮症の概要

〔定義〕脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy ; SMA) は、脊髄前角細胞の変性・脱落を伴い、体幹・四肢近位部優位の筋萎縮・筋力低下を示す遺伝性下位運動ニューロン疾患である。本項では、5番染色体 q13 領域に関連した SMA を扱う。この5番染色体 q13 領域に関連した SMA は、常染色体劣性遺伝形式をとる、代表的小児期筋疾患の一つであり、筋力低下を疑う小児患者を診るときにはかならず鑑別すべき疾患である。

〔身体所見〕SMA の特徴的な身体所見は、左右対称性の筋トヌス低下、筋力低下、線維束性収縮、手指震戦、腱反射減弱・消失である。新生児期・乳児期における筋力低下は、哺乳力の低下、泣き声の弱々しさ、蛙肢位 (frog-leg posture)、運動発達遅延という所見で気づかれることが多い。また、この時期の線維束性収縮は、舌の表面の波打つような動きとして認められることが多い。

〔生化学的検査、電気生理学的検査、筋病理学的検査〕

Munsat らの診断ガイドラインによれば¹⁾、血清 CK 値は、正常上限値の10倍以上に増加することはない。また、安静時筋電図所見では陽性鋭波、線維自発電位、線維束攣縮が認められ、随意収縮時筋電図所見では、運動単位電位 (MUP) が高電位、持続時間延長を示し、最大収縮でも干渉波に移行しない。運動神経伝導速度は、正常下限値の70%以下である。知覚神経活動電位の異常を認めることもある。生検筋による病理学的検討では、萎縮線維が大きなグループを形成し、肥大線維 (おもにタイプ1線維) が散在するという像が得られる。

従来、確定診断を得るために筋生検が行われてきたが、昨今は遺伝子検査で診断を確定することが多くなった。

〔臨床分類〕SMA は、従来、発症時期と運動能力の達成度により3つの病型に分類されてきた¹⁾。

1型 (Werdnig-Hoffmann 病) は生後6か月までに発症する最重症型である。自力で座位を保持する能力を獲得することなく、2歳までに人工呼吸管理あるいは死亡の転帰をとることが多い。1型患者では、嚥下障害と呼吸器合併症が問題になる。

2型 (中間型) は生後18か月までに発症する中等症

連絡先住所：〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1
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 西尾 久英

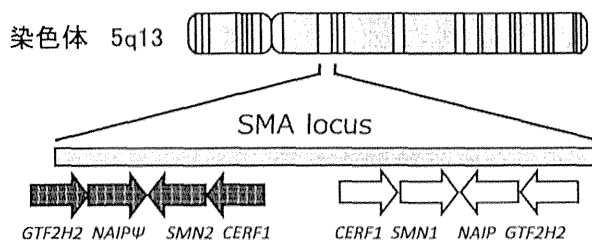


図1 SMAの責任遺伝子座。

5番染色体q13領域のテロメア側にSMN1, NAIP遺伝子が存在し、セントロメア側にSMN2, NAIPψ遺伝子が存在する。遺伝子の矢印の向きは転写の方向を示す。

型である。自力で座位保持は可能であるが、自力で起立し、歩行する能力を獲得するには至らない。2型患者では、嚥下障害や排痰障害のほか、脊柱変形（側弯など）が問題になる。

3型(Kugelberg-Welander病)は18か月以降に発症する軽症型である。自力で起立し、歩行することが可能である。この自力歩行は、幼児期に限られる例もあれば、青年期以降も可能な例もある。最近では、20歳以降に発症した軽症例を4型とすることが多くなった²⁾。4型は、ほぼ生涯を通じて歩行可能であることが多いようである。

(2) SMN1 遺伝子と NAIP 遺伝子

[疾患遺伝子候補] 1990年にSMAの疾患座位が5番染色体長腕(5q13)にマップされ^{3)~5)}、1995年に同領域からクローニングされた2つの遺伝子がSMAの疾患遺伝子候補として報告された(図1)。Survival Motor Neuron 1 (SMN1) 遺伝子と Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP) 遺伝子である⁶⁾⁷⁾。

このうち、SMN1 遺伝子欠失(欠失変異のホモ接合体)はSMA患者の95%以上に認められること、またSMN1 遺伝子内の微小変異を有するSMA患者も存在することが明らかになった⁶⁾。これらのことから、SMN1 遺伝子が疾患遺伝子であると考えられるようになった。一方、NAIP 遺伝子欠失(欠失変異のホモ接合体)はSMA1型患者の半数以上に認められたことより⁷⁾、NAIP 遺伝子欠失がSMAの重症度と関連していると考えられている。

[5q染色体13領域]ところで、5q13領域には大規模な重複が生じていて、テロメア側とセントロメア側に相同な遺伝子がいくつも並んでいる(図1)⁶⁾⁷⁾。

SMN1 遺伝子はテロメア側に存在する遺伝子である。そして、SMN1 遺伝子に対応するセントロメア側の相同遺伝子が、SMN2 遺伝子である(図1)⁶⁾。SMN1 遺伝子とSMN2 遺伝子はほとんど同一の塩基配列を有する。エクソン領域の違いといえば、両遺伝子のエクソン7の一塩基の違い(c.873C>T:CがSMN1遺

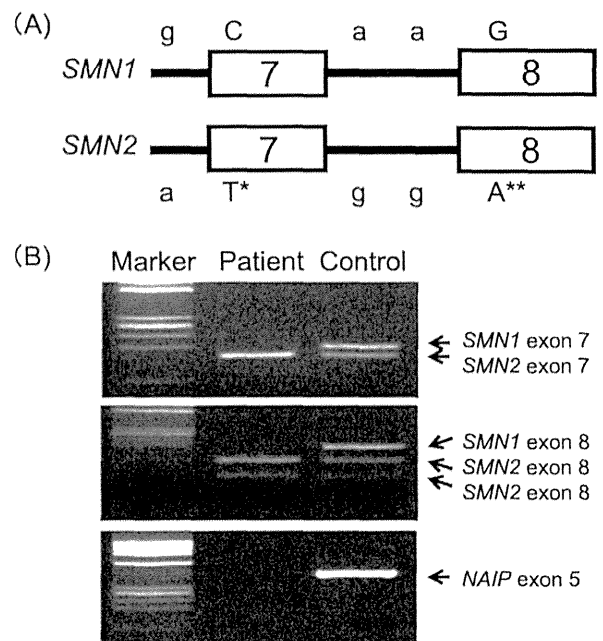


図2 PCR制限酵素法によるSMN1遺伝子とSMN2遺伝子の区別。

(A) SMN1 遺伝子とSMN2 遺伝子の塩基の違い。

(B) PCR-制限酵素法によるSMN1 遺伝子検査、PCR増幅法によるNAIP 遺伝子検査の結果。図の見方については、本文で説明する。

伝子特異的塩基、TがSMN2 遺伝子特異的塩基)と、エクソン8の一塩基の違い(c.1155G>A:GがSMN1 遺伝子特異的塩基、AがSMN2 遺伝子特異的塩基)だけである。コーディング領域の違いといえば、エクソン7の一塩基の違いだけである(図2)⁸⁾⁹⁾。

しかも、SMN2 遺伝子のエクソン7の一塩基の違い(c.873C>T)はアミノ酸置換を引き起こさないため、このSMN2 遺伝子からもSMN1 mRNAと同じ長さのSMN2 mRNA (FL-SMN2 mRNAあるいは完全長型SMN2 mRNA)が産生され、機能的な蛋白質(FL-SMN2 蛋白質あるいは完全長型SMN2 蛋白質)も産生されるはずである。

しかし、SMN1 遺伝子とSMN2 遺伝子ではスプライシング・パターンが異なっている。SMN2 遺伝子から産生されるSMN2 mRNAの大部分はエクソン7を欠き(Δ7-SMN2 mRNAあるいは短縮型SMN2 mRNA)(図3)⁸⁾⁹⁾、SMN2 遺伝子から産生されるSMN2 蛋白質の大部分はエクソン7に由来する機能ドメインを持たないのである(Δ7-SMN 蛋白質あるいは短縮型SMN 蛋白質)。

また、NAIP 遺伝子は、SMN1 遺伝子と隣り合って、テロメア側に存在する(図1)。NAIP 遺伝子に対応するセントロメア側の相同遺伝子が、NAIPψ 遺伝子である(図1)⁷⁾。NAIP 遺伝子とNAIPψ 遺伝子とは、エクソン

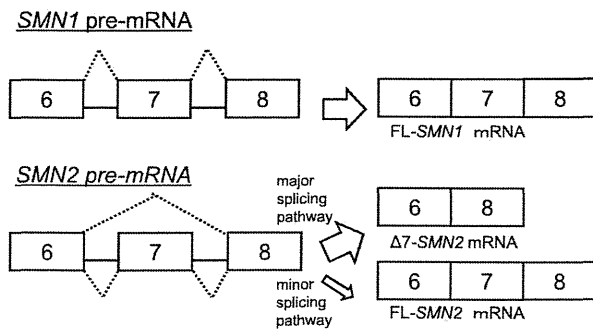


図3 SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子のスプライシングの違い。

SMN1 遺伝子からは、FL-SMN1 mRNA (あるいは完全長型 SMN1 mRNA) が産生され、機能的な FL-SMN1 蛋白 (あるいは完全長型 SMN1 蛋白) が産生される。しかし、SMN2 遺伝子から産生される SMN2 mRNA の大部分はエクソン7を欠く $\Delta 7$ -SMN2 mRNA (あるいは短縮型 SMN2 mRNA) であり、ここから合成される蛋白質の大部分はエクソン7に由来する機能ドメインを持たない $\Delta 7$ -SMN2 蛋白 (あるいは短縮型 SMN2 蛋白) である。

ンの数が異なる。NAIP 遺伝子エクソン5の塩基配列は NAIP ψ 遺伝子には存在しないのである⁷⁾。

[SMN 蛋白の機能] SMN1 遺伝子は、従来報告されてきた遺伝子と類似していなかったことから、機能の類推が困難であった。しかし、SMN 蛋白はさまざまな蛋白と結合して複合体を形成していることが明らかになり、さまざまな細胞内で行われる代謝活動に関与していると考えられるようになった。これまでに、SMN 蛋白が低分子量リボ核蛋白合成¹⁰⁾やアポトーシス¹¹⁾に関与していることが証明されている。しかし、これらの SMN 蛋白の機能は全身の細胞に共通するユビキタスなものであり、SMA の病態の中心である運動ニューロンの変性脱落との関係が明らかではなかった。しかし、最近になって、SMN 蛋白が、運動ニューロンの細胞骨格ダイナミクスを制御し、軸索輸送や神経筋接合部の機能に重要な役割を果たしていることも次第に明らかになってきた¹²⁾。

[NAIP 蛋白の機能] NAIP 遺伝子は、アポトーシス阻害遺伝子ファミリー (the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family) に属している。その遺伝子産物である NAIP 蛋白は、カスパーゼの働きを阻害し、細胞アポトーシスを抑制する機能を有する¹³⁾。NAIP 遺伝子と関連する病気は、SMA 以外に、脳傷害が挙げられる。脳における虚血後細胞死は、NAIP 蛋白によって抑制されることが報告されている¹⁴⁾。最近、マウスの NAIP 5 蛋白 (ヒト NAIP 遺伝子と同じ先祖遺伝子を有し、マウス *Naip* 遺伝子重複の過程で生じた活性偽遺伝子の産物) によって NLRC4 関連インフラマソーム (Inflam-

masome) が活性化されることが明らかになった¹⁵⁾。このことは、マウスでは NAIP5 蛋白が細菌感染に対する自然免疫機構と関わっていることを示している。しかし、NAIP 蛋白欠失がどのようにして下位運動ニューロンの機能不全、脱落に関わっているのかについては、全く分かっていない。

遺伝子診断と重症度を決める因子

(1) SMN1 遺伝子欠失診断, NAIP 遺伝子欠失と重症度

[遺伝子欠失診断] 現在、SMA の臨床診断は、主に、患者白血球から抽出したゲノム DNA を用いた SMN1 遺伝子欠失診断によって確定されている。もし SMN1 遺伝子欠失が認められなければ、SMN1 遺伝子内変異を検索することになる。また、NAIP 遺伝子検査は、重症度の予測に用いられる。

SMN1 遺伝子とほとんど同じ塩基配列をもつ相同遺伝子 (SMN2 遺伝子) の存在が、SMN1 遺伝子の欠失の有無の判断を困難にする。通常の PCR 法のみで、SMN1 遺伝子の欠失を見出すのは不可能である。通常の PCR 法では、SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子の両方を増幅してしまうからである。

そこで、エクソン7の一塩基の違い (c.873C>T : C が SMN1 遺伝子特異的塩基, T が SMN2 遺伝子特異的塩基)、エクソン8の一塩基の違い (c.1155G>A : G が SMN1 遺伝子特異的塩基, A が SMN2 遺伝子特異的塩基) を利用して、SMN1 遺伝子エクソン7と SMN2 遺伝子エクソン7を区別し、SMN1 遺伝子エクソン8と SMN2 遺伝子エクソン8を区別して検出することが必要になる (図2)。

この目的のために、SSCP 法⁶⁾、PCR-制限酵素法¹⁶⁾、MLPA 解析法 (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification : マルチプレックス・ライゲーション依存性プローブ増幅法)¹⁷⁾が用いられる。

NAIP 遺伝子の欠失の有無については、NAIP 遺伝子エクソン5の塩基配列が NAIP ψ 遺伝子に存在していないことを利用すれば、NAIP 遺伝子の選択的 PCR 増幅が可能である。PCR で NAIP 遺伝子エクソン5の塩基配列が増幅されないときに、NAIP 遺伝子欠失と判定される。

[自験例] 図2に、私たちが実施した SMN1, NAIP 遺伝子検査結果の1例を示す。この患者では、SMN1 遺伝子エクソン7, エクソン8, NAIP 遺伝子エクソン5が欠失していた (いずれも欠失変異のホモ接合体であった)。図2 (A) に、エクソン7, 8の塩基の違いを示す。図2 (B) に、PCR-制限酵素法¹⁶⁾による SMN1 遺伝子検査, PCR 増幅法による NAIP 遺伝子検査の結

表1 SMN1 および NAIP 遺伝子欠失試験 (1996年1月～2014年4月, 神戸大学)

SMN1		NAIP	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Total
Exon 7	Exon 8	Exon 5					
del	del	del	38	5	1	1	45
del	del	non-del	27	33	20	4	84
del	non-del	non-del	3	5	4	0	12
non-del	non-del	non-del	3	2	2	0	7
	Total		71	45	27	5	148

果を示す。

私たちが用いた PCR-制限酵素法¹⁹⁾では, 制限酵素 *Dra*I が SMN2 遺伝子エクソン7の T* で示した塩基を認識し, PCR 産物を切断する。また, 制限酵素 *Dde*I が SMN2 遺伝子エクソン8の A** で示した塩基を認識し, PCR 産物を切断する。しかし, SMN1 遺伝子エクソン7の PCR 産物は制限酵素 *Dra*I で切断されず, SMN1 遺伝子エクソン8も制限酵素 *Dde*I で切断されない。対照者では制限酵素で切断されない PCR 産物が存在するが, 患者では制限酵素で切断されない PCR 産物が存在していない。

表1に, 私たちが1996年1月から2014年4月までに経験した SMA 患者の SMN1, NAIP 遺伝子検査結果の結果を示す。SMN1 遺伝子エクソン7の欠失(欠失変異のホモ接合体)は, 148例中141例の患者(95%)において認められた。このことから, SMA のスクリーニングは, SMN1 遺伝子エクソン7欠失を調べれば良いことがわかる。

また, NAIP 遺伝子エクソン5の欠失(欠失変異のホモ接合体)は, SMA1型患者71例中38例(53%)に認められた。私たちの臨床経験では, NAIP 遺伝子エクソン5欠失を認める患者の方が, NAIP 遺伝子エクソン5欠失を認めない患者よりも発症が早く, より重篤な病態を示していた。前述したように, NAIP 蛋白欠失がどのようにして下位運動ニューロンの機能不全, 脱落に関わっているのかについては, 全く分かっていない。しかし, NAIP 遺伝子の欠失(欠失変異のホモ接合体)が SMA の重症度に関わっていることは確実なようである。

(2) SMN2 遺伝子コピー数と重症度

[SMN1 遺伝子から SMN2 遺伝子への遺伝子変換] SMA 患者では, SMN1 遺伝子アリルが欠失する(SMN1 遺伝子のコピー数が減少する)一方で, SMN2 遺伝子アリルが増加する(SMN2 遺伝子のコピー数が増加する)例が非常に多い。現在では, この現象は次のように説明されている¹⁸⁾。すなわち, 「SMN1 遺伝子が欠失している」という場合, <実際に SMN1 遺伝子

配列が無くなっている場合>と, <SMN1 遺伝子配列が SMN2 遺伝子配列に完全に変換したために見かけ上 SMN1 遺伝子配列がなくなっている場合>がある。そして, 後者の場合には, <SMN1 遺伝子のコピー数が減少し, SMN2 遺伝子のコピー数が増加することになる>わけである。

[SMN2 遺伝子コピー数と重症度] SMN1 遺伝子が欠失している患者(欠失変異のホモ接合体)では, SMN2 遺伝子コピー数も重症度を決定する因子の一つである¹⁸⁾。私たちも, 「SMN2 遺伝子コピー数が少ないほど重症化し, SMN2 遺伝子コピー数が多いほど軽症化する傾向がある」ことを報告してきた^{19)~21)}。この現象は, 患者の重症度は, SMN2 遺伝子から産生される機能的な SMN 蛋白の量を反映していることを示唆している。

[遺伝子コピー数の測定法] 私たちは, 蛍光 PCR-自動シーケンサー法¹⁹⁾, リアルタイム PCR 法²⁰⁾, MLPA 法を用いて SMN2 遺伝子コピー数を測定してきた。現在のところ, 私たちは, 簡便性とコストの点から, リアルタイム PCR 法を好んで用いている。ただし, MLPA 法は, 5q 染色体の欠失範囲を明らかにしたいとき, 威力を発揮する。

[自験例] 表2に, 私たちが経験した SMA 患者(SMN1 遺伝子欠失例)の病型とその SMN2 遺伝子コピー数を示す。私たちの患者においても, 重症度と SMN2 遺伝子コピー数の間には, 統計学的に有意な関連がある。しかし, SMN2 遺伝子のコピー数だけで, 個々の患者について, その予後を確実に予測できないことを知っておく必要がある。表2に示すように, SMN2 遺伝子を3コピー持っている患者66人のうち, 11人は1型, 41人は2型, 13人は3型, 1人は4型であった。すなわち, SMN2 遺伝子を3コピー持っても1型という例も決して少なくないのである。

(3) SMN1 遺伝子内変異と重症度

[SMN1 遺伝子欠失がない患者] 臨床症状から SMA を疑う場合, まず SMN1 遺伝子エクソン7, エクソン8の欠失の有無を調べることになる。もし SMN1 遺伝子

表2 SMN1 欠失患者における病型と SMN2 コピー数の関連 (1996年1月～2014年4月, 神戸大学)

	1 copy	2 copies	3 copies	4 copies	Mean	(SD)
Type 1	1	46	11	0	2.17	(0.42)
Type 2	0	1	41	0	2.98	(0.15)
Type 3	0	1	13	6	3.23	(0.60)
Type 4	0	0	1	4	3.80	(0.40)
Total	1	48	66	10		

が完全に欠失しているのであれば (SMN1 遺伝子欠失のホモ接合体), その患者は SMA と確定診断できる。

SMN1 遺伝子が存在するときは, 次にどうすれば良いのか. このときは, SMN1 遺伝子のコピー数を調べる必要がある. SMN1 遺伝子が1コピー残っていれば, その残っている SMN1 遺伝子内に変異が存在しているかも知れない. すなわち, SMN1 遺伝子欠失と SMN1 遺伝子内変異 (微小変異) の複合ヘテロ接合体の可能性を考えるのである. 私たちの経験によれば, このような症例は SMA 患者の5%内外に認められる。

しかし, SMA 類似の症状があり, SMN1 遺伝子が1コピー残っていても, SMN1 遺伝子内変異がないときは, SMA 以外の病気を考える必要がある. SMN1 遺伝子が1コピー残っていれば, それが十分に働いて, SMN 蛋白減少に基づく症状は示さないはずである (実際, SMA の保因者は, 通常, 無症候性である). SMA 類似の症状があり, SMN1 遺伝子が1コピー残っていて, SMN1 遺伝子内変異がない患者は, 他の遺伝子の異常に基づく神経疾患あるいは筋疾患に罹患していると考えべきであろう。

SMA 類似の症状があり, SMN1 遺伝子が2コピー存在するときは, SMN1 遺伝子内変異のホモ接合体か複合ヘテロ接合体, あるいは, 他遺伝子の異常を考えなければならない. ただし, このような例は非常に稀であると思われる。

[SMN1 遺伝子内変異の同定] 上に述べたように, SMA 類似の症状があり, SMN1 遺伝子が1コピー残っている患者を見つけたとき, 私たちは, その残っている SMN1 遺伝子の内部に微小変異の存在を疑う. そして, 患者白血球のゲノム DNA を用いて, 各エクソンの直接シーケンス法で塩基配列の解析を行うことにしている。

どこかのエクソンに変異を見つけることが出来れば, 次に, その変異が SMN1 遺伝子内にあるものか, SMN2 遺伝子内にあるものかを決める. この時に, 私たちは, 患者白血球の RNA を用いて逆転写 PCR (RT-PCR) を行うことが多い. 得られた RT-PCR 産物を SMN1 遺伝子 mRNA 産物と SMN2 遺伝子 mRNA 産

物に分離し, 変異がどちらの mRNA 産物に含まれているのかを確認している²¹⁾.

[自験例] 表3に, 私たちが経験した SMN1 遺伝子内変異例の病型とその SMN2 遺伝子コピー数を示す²¹⁾. SMN1 遺伝子内変異例においては, 重症度と SMN2 遺伝子コピー数の間に有意な関連を認めない. どのようなタイプの遺伝子内変異が, SMN1 遺伝子のどの部位に存在していたかということが, 重症度を規定しているようである²¹⁾.

治療戦略

(1) SMN2 遺伝子を標的とする治療戦略

[SMN2 遺伝子による臨床症状の修飾] SMA に対する有効な根本的治療法は確立していないが, 近年「残存している SMN2 遺伝子から機能的な FL-SMN 蛋白を十分に産生させる」という治療戦略が考えられるようになった. 多数の SMA 患者の遺伝子解析の結果から, SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子をともに欠失している SMA 患者は存在しないと考えられている. また, SMN2 遺伝子のコピー数が多いほど, SMA の症状は軽くなることも明らかになっている. モデルマウス作成実験でも, ヒト SMN2 遺伝子を多数コピー導入した個体は軽症化傾向にある. このような知見の集積から, 残存 SMN2 遺伝子を利用する治療戦略が生まれた. 研究者たちは, 残存している SMN2 遺伝子から機能的な FL-SMN 蛋白が十分に産生できれば, 症状軽減が期待できると考えたのである。

[SMN2 遺伝子を標的とする2種類の治療戦略] SMN2 遺伝子から機能的な FL-SMN 蛋白を十分に産生させるための治療戦略は, 次の2種類に分けることができる. すなわち, (1) 遺伝子プロモーターに働きかけ, SMN2 遺伝子の転写を促進し, FL-SMN2 mRNA を増加させ, 最終的に FL-SMN 蛋白の増加を目指すアプローチ (転写促進戦略) と, (2) SMN2 遺伝子エクソン7のスプライシング異常を修正し, FL-SMN2 mRNA を増加させ, 最終的に FL-SMN 蛋白の増加を目指すアプローチ (スプライシング修正戦略) である。

表3 SMN1 遺伝子内変異を有する患者 (1996年1月～2014年4月, 神戸大学)²¹⁾

	Sex	Onset	Type	SMN2 copy no.	Nucleotide Change (exon)	Amino acid change	Domain
Patient 1	F	5m	1	3	c.275 G>C (exon 3)	p.Trp92Ser	Tudor
Patient 2	M	6m	1	3	c.275 G>C (exon 3)	p.Trp92Ser	Tudor
Patient 3	M	0m	1	2	c.819_820 insT (exon 6)	p.Thr274Tyr fsX32	C-terminal
Patient 4	F	12m	2	1	c.830 A>G (exon 6)	p.Tyr277Cys	C-terminal
Patient 5	M	11y	3	1	c.5 C>T (exon 1)	p.Ala2Val	N-terminal
Patient 6	F	13y	3	1	c.5 C>T (exon 1)	p.Ala2Val	N-terminal

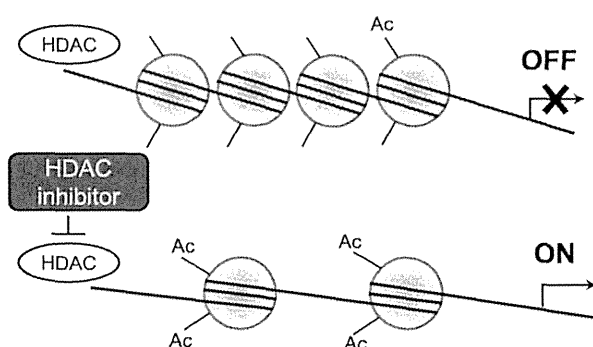


図4 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による遺伝子プロモーター活性化.

図中のHDACはヒストン脱アセチル化酵素, HDAC inhibitorはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤, Acはヒストン蛋白のアセチル基を示す. クロマチンを構成する蛋白であるヒストンは, そのN末端のヒストンテールのアセチル化を介して, クロマチン構造を変化させる. クロマチン構造の変化は, 転写関連蛋白のプロモーターへの結合に影響を与え, 転写効率をも左右する. より具体的には, (1) アセチル化によってヒストンテールは電荷的に中和され, (2) ヒストンとDNAの結合は緩くなるため, (3) 転写関連蛋白はDNAに結合しやすくなり, (4) その結果, 遺伝子プロモーターが活性化された状態になり, その遺伝子の転写が促進される.

[転写促進戦略: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による治療] 2001年以降, 短鎖脂肪酸類 (酪酸ナトリウム, バルプロ酸, フェニル酪酸), ヒドロキサム酸類 (TSA, SAHA), ベンズアミド化合物 (M344) 等のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が, SMA患者由来の細胞におけるSMN蛋白量を増加させるという報告が次々と発表された (図4)²³⁾. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がSMN蛋白量を増加させる機序としては, (1) SMN2遺伝子プロモーターが活性化され, SMN2

遺伝子の転写が促進し, FL-SMN2 mRNAの産生量が増加する, (2) スプライシング関連蛋白をコードする遺伝子プロモーターが活性化されて, これらのスプライシング関連蛋白が過剰発現し, その結果SMN2遺伝子エクソン7のスプライシングが修正される (スキッピングが阻止される), (3) 上記2つの機序が組み合わされている, の3つの可能性が考えられる.

バルプロ酸は, 抗てんかん薬として世界中で用いられている薬剤であるが, 最近, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としての機能が注目されるようになった. 2003年, BrichtaらのグループとSumnerらのグループが「SMA患者由来の線維芽細胞において, バルプロ酸がFL-SMN蛋白を増加させる」ことを報告した^{24,25)}. 彼らは, 論文の中で, 「バルプロ酸がSMN2遺伝子の転写を促進し, かつSMN2遺伝子エクソン7のスプライシングも促進した」ことを明らかにした.

2006年, Brichtaらは, バルプロ酸の臨床応用に着手し, 「20人のSMA患者にバルプロ酸を経口投与したところ, 7人の患者の末梢血細胞においてSMN蛋白の増加を認めた」ことを発表した²⁶⁾. 同年, Wehlらも, 「7人の3~4型SMA患者にバルプロ酸を平均8か月間投与し, 筋力の増強を認めた」ことを報告した²⁷⁾. 2009年, Swobodaらは, 「27人の2型SMA患者にバルプロ酸を12か月間投与し, Hammersmith式機能的運動能力尺度の改善を認めた」ことを報告した²⁸⁾. 彼らは, 論文の中で, 「運動能力の改善は主に5歳以下の小児に認められた」と述べている. これらの報告は, バルプロ酸投与によって症状が明らかに改善するSMA患者がいることを示している.

[スプライシング修正戦略: アンチセンスによる治療] 2006年ころから, アンチセンス・オリゴヌクレオチドでSMN2遺伝子エクソン7周辺のスプライシング抑制配列 (hnRNPA1/A2結合部位) をマスクすれ

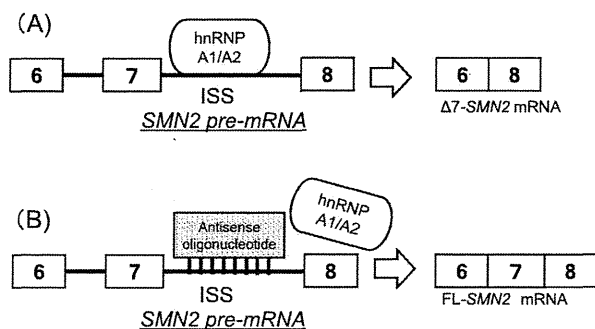


図5 アンチセンス・オリゴヌクレオチドによるスプライシング修正。

(A) 通常の場合、SMN2 遺伝子 pre-mRNA のイントロン7にある intronic splicing suppressor (ISS) 配列には、hnRNP A1/A2 というスプライシング抑制蛋白が結合し、エクソン7は mRNA に組み込まれなくなる (スキップする)。(B) アンチセンス・オリゴヌクレオチドが存在すると、hnRNP A1/A2 は ISS に結合できなくなり、エクソン7は mRNA に組み込まれることになる (スプライシングが修正される)。

ば、エクソン7のスキッピングが阻止されることが報告された²⁹⁾³⁰⁾(図5)。この知見に基づいて、モデルマウスにアンチセンス・オリゴヌクレオチドが導入され (脳室内投与)、症状の改善が得られた³¹⁾。現在、米 Isis Pharmaceuticals 社が、髄腔内注射製剤としての核酸医薬 (ISIS-SMN Rx) を製造し、米国で臨床治験を開始した³²⁾。

(2) SMN2 遺伝子を標的とししない治療戦略

[運動ニューロン保護] 神経栄養因子である甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone, TRH) を用いた SMA 治療の試みは、わが国の研究者が世界に先駆けて報告したものである。1994年、Takeuchi らは、TRH 静脈内注射で、「SMA1 型患者にはほとんど効果がなかったが、SMA2 型、SMA3 型患者において運動機能の改善を認めた」ことを報告した³³⁾。2000年、Tzeng らは、「TRH 治療を受けた SMA 患者群で筋力増強を認めた。しかし、TRH 治療を受けなかった SMA 患者群では筋力増強は認めなかった」と報告した³⁴⁾。2009年、Kato らは、「TRH を経口投与したところ、筋力の増強、運動機能の改善を認めた」SMA3 型患者症例を報告した³⁵⁾。

現時点では、運動ニューロン保護を目指す治療戦略は、SMA 特異的治療というよりは、運動ニューロン病全般に対する非特異的治療のような印象を与える。しかし、運動ニューロンにおける SMN 蛋白の役割や、SMN 蛋白と相互作用する蛋白が解明されるにつれて、運動ニューロン保護を目指す治療戦略は、SMA 特異的治療戦略として成長していく可能性を秘めてい

る。

[遺伝子導入・幹細胞移植] 外来性 SMN1 遺伝子を導入する遺伝子治療³⁶⁾³⁷⁾や、外来性神経幹細胞を脊髄前角に生着させる神経幹細胞移植³⁸⁾は、「SMN1 遺伝子を導入する」という治療戦略に属する。近年、神経組織を対象とする遺伝子治療に応用できるベクターが開発され、神経幹細胞の単離・培養技術が発展し、このような治療戦略がにわかに現実味を帯びてきた。また、わが国の山中伸弥先生によって開発された iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) 技術により、ヒト神経幹細胞を大量に生産できる時代が来ることも予想されている。遺伝子導入・幹細胞移植は、現在は動物実験段階の治療法でしかないが、将来は SMA 治療の一選択肢として認知されるものと思われる。

[新規治療法の開発] Oprea らは、重症度の異なる同胞がいる SMA 家族6組について検討した³⁹⁾。これらの家族には、罹患兄弟と同じ SMN 遺伝子型を示しているにも関わらず、全く無症状の女性が8人いた。そして、これらの女性のリンパ芽球では、PLS3 遺伝子 mRNA が過剰に発現していた。

PLS3 遺伝子の産物である Plastin 3 (PL3) 蛋白はアクチン動態を制御していることが知られている。そこで、Oprea らは SMA モデル動物に PLS3 蛋白を過剰発現させたところ、予想通り、運動ニューロン軸索の伸長障害が改善した³⁹⁾。

この Oprea らの研究以後、SMA における細胞骨格ダイナミクスの異常が議論されるようになった⁴⁰⁾。今後は、「細胞骨格ダイナミクスの制御」という治療戦略に基づく治療法も発展すると思われる⁴¹⁾。

最後に、研究の歴史を振り返ってみたときに、SMA の臨床症状を修飾する因子 (あるいは SMA の重症度を規定する因子) を同定し、病態を明らかにする研究が、そのまま新規治療法の開発につながっていたことを指摘しておきたい。この事実は、「有効な SMA 治療法を確立するためには、bed side-to-bench, bench-to-bed side という双方向性の研究が不可欠であり、臨床医学、基礎医学の協力が重要である」ことを強く示唆している。

謝辞 この研究は、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」(研究代表者 斎藤加代子先生) の助成によっておこなわれました。深く感謝申し上げます。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Munsat L, Davies KE. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 1992 ; 2 : 423—428.
- 2) Kaplan JC. The 2009 version of the gene table of neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 2009 ; 19 : 77—98.
- 3) Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 1990 ; 344 : 540—541.
- 4) Melki J, Abdelhak S, Sheth P, et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990 ; 344 : 767—768.
- 5) Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990 ; 345 : 823—825.
- 6) Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995 ; 80 : 155—165.
- 7) 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.
- 8) Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Hum Mol Genet* 1999 ; 8 : 1177—1183.
- 9) Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, et al. A single nucleotide in the *SMN* gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 6307—6311.
- 10) Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 2007 ; 8 : 340—345.
- 11) Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, et al. Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* 1997 ; 390 : 413—417.
- 12) Torres-Benito L, Neher MF, Cano R, et al. SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS one* 2011 ; 6 : e26164.
- 13) Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996 ; 379 : 349—353.
- 14) Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, et al. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 1997 ; 3 : 997—1004.
- 15) Zhao y, Yang J, Shi J, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 2011 ; 477 : 596—600.
- 16) van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995 ; 345 : 985—986.
- 17) Arkblad EL, Darin N, Berg K, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2006 ; 16 : 830—838.
- 18) Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, et al. Correlation of *SMNt* and *SMNc* gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Human Genet* 1998 ; 6 : 467—474.
- 19) Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, et al. Correlation between *SMN2* copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy : three *SMN2* copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* 2002 ; 249 : 1211—1219.
- 20) Tran VK, Sasongko TH, Hong DD, et al. *SMN2* and *NAIP* gene dosages in Vietnamese patients with spinal muscular atrophy. *Pediatr Int* 2008 ; 50 : 346—351.
- 21) 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* (in press).
- 22) 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.
- 23) Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, et al. Spinal muscular atrophy : from gene discovery to clinical trials. *Ann Hum Genet* 2013 ; 9 : 435—463.
- 24) Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, et al. Valproic acid increases the *SMN2* protein level : a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 2481—2489.
- 25) Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, et al. Valproic Acid Increases SMN Levels in Spinal Muscular Atrophy Patient Cells. *Ann Neurol* 2003 ; 54 : 647—654.
- 26) Brichta L, Holker I, Haug K, et al. In Vivo Activation of *SMN* in Spinal Muscular Atrophy Carriers and Patients Treated with Valproate. *Ann Neurol* 2006 ; 59 : 970—975.
- 27) Wehl CC, Connolly AM, Pestronk A. Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology* 2006 ; 67 : 500—501.
- 28) Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, et al. Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS ONE* 2009 ; 4 : e5268.
- 29) Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, et al. Splicing of a critical exon of human *Survival Motor Neuron* is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 : 1333—1346.
- 30) Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, et al. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing si-

- lencer corrects *SMN2* splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 2008 ; 82 : 834—848.
- 31) Passini MA, Bu J, Richards AM, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2011 ; 3 : 72ra18.
 - 32) Rigo F, Hua Y, Krainer AR, et al. Antisense-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 2012 ; 199 : 21—25.
 - 33) Takeuchi Y, Miyanomae Y, Komatsu H, et al. Efficacy of thyrotropin-releasing hormone in the treatment of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 1994 ; 9 : 287—289.
 - 34) Tzeng AC, Cheng J, Fryczynski H, et al. A study of thyrotropin-releasing hormone for the treatment of spinal muscular atrophy : a preliminary report. *Am J Phys Med Rehabil* 2000 ; 79 : 435—440.
 - 35) Kato Z, Okuda M, Okumura Y, et al. Oral administration of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogue, taltireline hydrate, in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 2009 ; 24 : 1010—1012.
 - 36) Azzouz M, Le T, Ralph GS, et al. Lentivector-mediated *SMN* replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 1726—1731.
 - 37) Foust KD, Wang X, McGovern VL, et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of *SMN*. *Nat Biotechnol* 2010 ; 28 : 271—276.
 - 38) Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 3316—3330.
 - 39) Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, et al. *Plastin 3* is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 2008 ; 320 : 524—527.
 - 40) Bowerman M, Anderson CL, Beauvais A, et al. *SMN*, *profilin IIa* and *plastin 3* : a link between the deregulation of actin dynamics and *SMA* pathogenesis. *Mol Cell Neurosci* 2009 ; 42 : 66—74.
 - 41) Bowerman M, Murray LM, Boyer JG, et al. *Fasudil* improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy. *BMC Med* 2012 ; 10 : 24.
-

ORIGINAL ARTICLE

A Study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy

Toshio Saito,¹ Dian K Nurputra,^{2,3} Nur Imma F Harahap,^{2,3} Indra Sari K Harahap,^{2,3} Hiroshi Yamamoto,⁴ Emi Muneshige,⁴ Hiroaki Nishizono,⁴ Tsuyoshi Matsumura,⁵ Harutoshi Fujimura,⁵ Saburo Sakoda,⁵ Kayoko Saito⁶ and Hisahide Nishio²

¹Division of Child Neurology, Department of Neurology, Toneyama National Hospital, Toyonaka, Osaka, ²Department of Community Medicine and Social Healthcare Science, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan, ³Department of Neurology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia, ⁴Departments of Rehabilitation, ⁵Neurology, Toneyama National Hospital, Toyonaka, Osaka, and ⁶Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Key words

Modified Hammersmith Functional Motor Scale for SMA, respiratory function, *SMN*, spinal muscular atrophy, valproic acid.

Accepted for publication 4 October 2014.

Correspondence

Toshio Saito
Division of Child Neurology, Department of Neurology, National Hospital Organization Toneyama National Hospital, 5-1-1 Toneyama, Toyonaka, Osaka, 560-8552 Japan. Email: saiotot@toneyama.go.jp

Abstract

Background: Valproic acid (VPA) is expected to become an effective therapeutic agent for spinal muscular atrophy (SMA) because of its histone deacetylase inhibitor effect.

Aim: To evaluate the effectiveness of VPA for SMA.

Methods: Seven consecutive Japanese SMA patients (three males, four females) were recruited. Of those, six were type 2 (cases A–E, G) and one was type 3 (case F). One female patient (case E) was aged 2 years and 10 months, whereas the others ranged in age from 15 to 42 years. VPA was administered for 6 months with L-carnitine. We carried out *SMN* transcript analysis of peripheral white blood cells, and evaluated using the Modified Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (MHFMS), vital capacity (VC), maximum insufflation capacity (MIC), and cough peak flow (CPF) before and at 1, 3 and 6 months after starting treatment.

Results: Cases B–E and G completed the study. The final VPA dosage in cases B–D and G was 400 mg/day, whereas that in case E was 100 mg/day. The quantity of the FL-*SMN* transcription product showed a tendency to increase. Case E showed a remarkable improvement in MHFMS, and gained motor function to turn from side to side during the study period. Although no significant changes were observed in MHFMS in the older cases, VC, MIC and CPF were improved in those.

Conclusion: Our findings suggest that VPA treatment is effective for improving MHFMS and respiratory function in some SMA patients. A placebo-controlled randomized trial is warranted to confirm the efficacy of VPA for SMA.

Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord, resulting in progressive muscular atrophy, and weakness of the limbs and trunk, with the incidence reported to be approximately one in 6000–10 000 live births.¹ SMA is classified into five groups; type 1 (Werdnig–Hoffman disease; severe form), type 2 (Dubowitz disease; intermediate form), type 3 (Kugelberg–Welander disease; mild form), type 4 (adult form) and type 0 (prenatal).^{1–3}

The gene responsible for SMA is the survival motor neuron (*SMN*), which exists as two highly homologous copies within the SMA gene region on chromosome 5q11.2–13.3,

namely *SMN1* and *SMN2*.⁴ The disease is caused by loss of *SMN1*, with more than 95% of SMA patients showing a homozygous deletion or interruption in *SMN1*, resulting in a deficiency of the SMN protein.^{4–6} *SMN1* and *SMN2* are nearly identical, with the only difference being a single nucleotide change in the coding region, which shows that nucleotide +6 of exon 7 in *SMN1* is C and that of *SMN2* is T.

Although *SMN1* and *SMN2* encode the same protein because of a synonymous nucleotide change, *SMN2* does not fully compensate for the loss or dysfunction of *SMN1*. As the C to T change in *SMN2* at nucleotide position +6 in exon 7 induces exon skipping, *SMN1* and *SMN2* show different splicing patterns.^{7,8} All *SMN1*-derived transcripts contain exon 7 and produce full-length *SMN* (FL-*SMN*),