

臨床情報・生体試料の収集と解析：脊髄性筋萎縮症（SMA）

報告者 斎藤加代子^{1),2)}

報告者 久保祐二^{1),2)}、荒川玲子¹⁾、金子芳^{1),2)}、梅野愛子¹⁾、青木亮子¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

²⁾ 東京女子医科大学先端生命医科学専攻遺伝子医学分野

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（SMA）は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。患者自身が主体性を有する SMA 患者登録を 2012 年 10 月より開始している。2014 年 10 月現在、登録者総数 145 名、内訳は I 型 56 名、II 型 62 名、III 型 20 名、IV 型 6 名、SMA 疑い 1 名である。2014 年には SMA に対してバルプロ酸ナトリウムを用いた医師主導治験を開始した。また、SMA における正確で簡便な遺伝子診断法を確立することを目的とした研究を行った。SMA の原因遺伝子は survival motor neuron 1 (*SMN1*) 遺伝子であり、*SMN1* 遺伝子と 5 塩基のみの違いの *SMN2* 遺伝子も存在する。Long-Range PCR を利用することで *SMN1* 遺伝子のみをシークエンスすることを可能にし、SMA III 型 3 症例において複合ヘテロ変異、SMA III 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。本解析法により、これまでの検査方法では検出することが出来なかった遺伝子変異や hybrid *SMN* 遺伝子を検出することが可能になった。

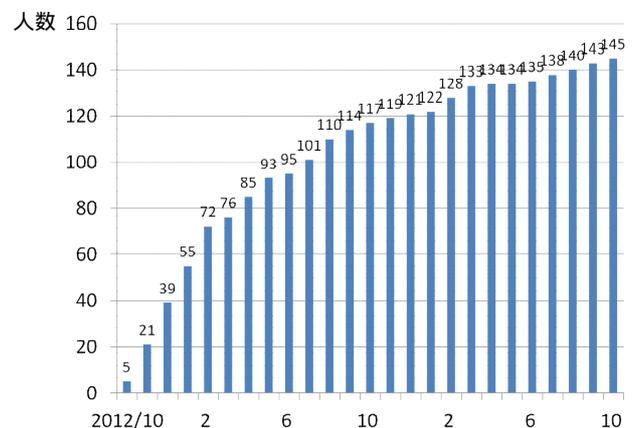
A. 研究背景・目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。現在、SMA の根本治療法はないが、治療に向けた取り組みが始まっている。

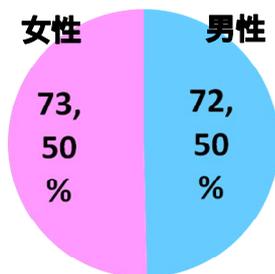
当施設では、SMA の治療において SMN 蛋白質を増やす機序を持つヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害効果を有するバルプロ酸ナトリウム（VPA）投与による有効性（病態改善効果）と安全性を調べる目的で、厚労科研補助金難治性疾患等実用化研究事業「小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸ナトリウム多施設共同医師主導治験準備研究」（研究代表者：斎藤加代子）がスタートし、医師主導治験を開始している。さらに、米国企業発信にて、*SMN2*mRNA におけるエクソン 7 のスプライシングを抑えるアンチセンスオリゴヌクレオチド製剤の髄腔内投与のグロ

ーバル多施設共同治験が PMDA 対面助言を終え、2015 年よりスタートする。このような SMA の臨床試験の進歩の中で、患者自身が主体性を有する患者登録を 2012 年 10 月より開始した。2014 年 10 月現在、登録者総数 145 名、内訳は I 型 56 名、II 型 62 名、III 型 20 名、IV 型 6 名、SMA 疑い 1 名である（図 1）。

a. 登録人数



b. 性別



臨床型

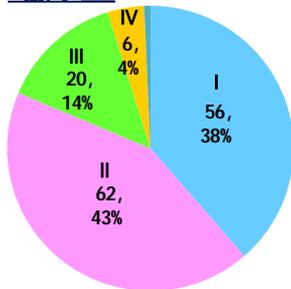


図1 SMA患者登録状況

我々は、SMAの診断において、正確で簡便な遺伝子診断法を確立することを目的とした研究を行った。SMAの原因遺伝子は survival motor neuron 1 (*SMN1*) 遺伝子であり、第5染色体長腕 5q13 に存在し、同領域に向反性に重複した配列の *SMN2* 遺伝子も存在する。*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子には5塩基の違いしかいないため *SMN1* 遺伝子のみを解析することは難しい。従来、実施してきた *SMN1* 遺伝子を単離し、シーケンスする方法の問題点を克服する診断法を確立した。主に昨年度の報告からアップデートした内容についてここでは報告する。

B. 研究方法

対象：患者、互いに血縁関係のない SMA 患者 20 例（型 I 1 例、型 II 18 例、型 III 1 例）を対象とした。SMA 型 I 1 例は先行研究で 1 コピーの *SMN1* 遺伝子を示し、その *SMN1* 遺伝子上に点変異 (c. 275G>C、p.W92S) が同定された症例であり (Nishio et al. 2007) 本研究で開発した方法を評価するためのサンプルとした。**コントロール**、血縁関係のない 10 例。

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。

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。

(倫理面への配慮)

本研究の「脊髄性筋萎縮症の患者登録」および「脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析」は、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. New Long-Range PCR (nLR-PCR)を用いた *SMN1* 遺伝子解析法の評価

1-1. コントロールと *SMN1* 遺伝子エクソン 7,8 の欠失を示す患者 DNA の解析

コントロールは *SMN1* 遺伝子領域を特異的に増幅できるかの確認のために、患者 DNA は非特異的な増幅が起こらないことを確認するために用いた。コントロールは全例 (8 例) 28.2 kb の PCR 産物を確認した。患者 DNA (8 例) ではほとんど PCR 産物は確認できなかった (PCR 産物はコントロールと比較して有意に少なかった, $P<0.05$) (図 2)。

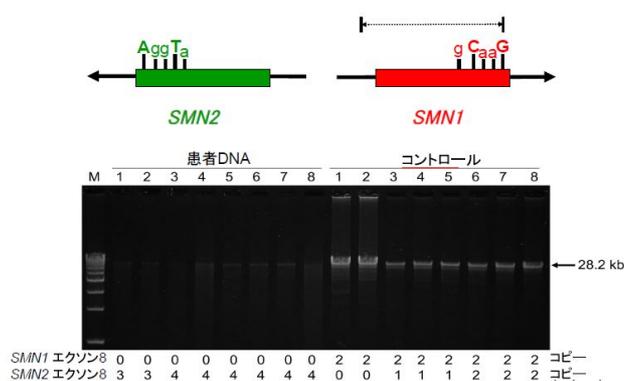


図2 コントロールと患者 DNA の nLR-PCR による *SMN1* 遺伝子増幅

得られたコントロールの PCR 産物をシーケンスしたところ、全例において *SMN1* 遺伝子固有の配列を示した (図 3)。

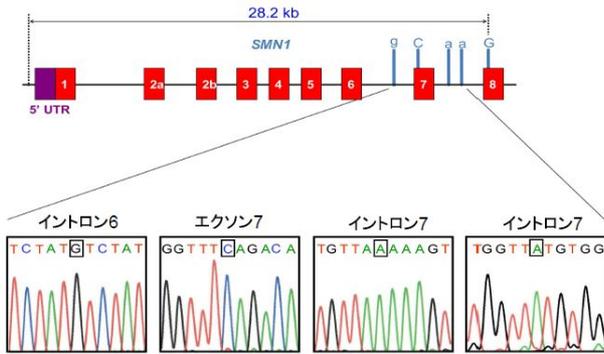


図3 コントロールの PCR 産物のシーケンス

1-2. *SMN1* 遺伝子上に点変異 (c. 275G > C) を示す患者 DNA の解析

SMN 遺伝子 (*SMN1*、*SMN2* 遺伝子) の全エクソン領域のシーケンスを行ったところ、エクソン 3 に G と C を示す 2 つのシグナルを検出した (図 4a)。メイン (強度の高い) シグナルは G を示すシグナルであった。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、C を示すシグナルのみを検出した (図 4b)。

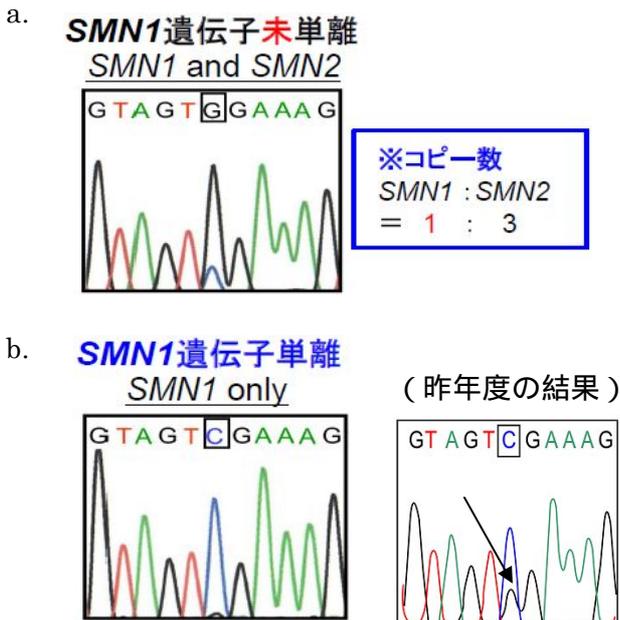


図4 *SMN1* 遺伝子上に点変異 (c. 275G > C) を示す患者 DNA の nLR-PCR 解析

2. nLR-PCR の新しい活用例

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 5 に示すような 3 つのタイプの Hybrid *SMN* 遺伝子を検出した。

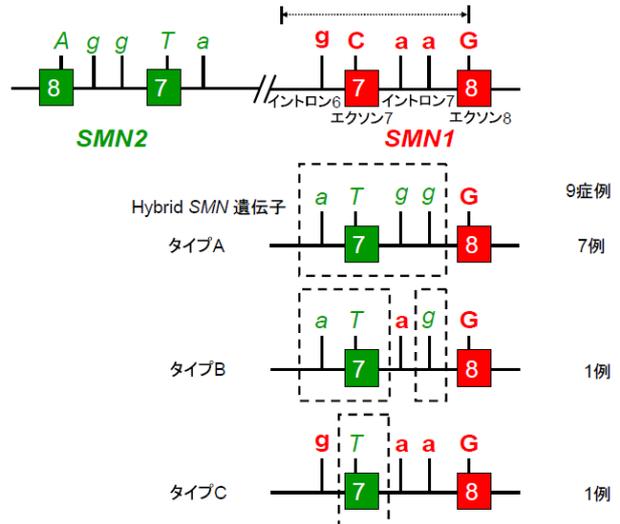


図5 Hybrid *SMN* 遺伝子の検出

D. 考察

1. nLR-PCR を用いた *SMN1* 遺伝子解析法の評価

コントロールと *SMN1* 遺伝子エクソン 7, 8 の欠失を示す患者 DNA の解析により、nLR-PCR を用いることで *SMN1* 遺伝子のみを単離することができた (図 2、3)。図 4 に示すように *SMN1* 遺伝子が 1 コピー、*SMN2* 遺伝子が 3 コピー存在するような *SMN1* 遺伝子コピー数が少ないような症例でもシーケンスでは *SMN1* 遺伝子のみのシグナルを検出することができた。プライマーや PCR 反応条件の最適化をしたことで、昨年度の方法よりもさらに特異性が向上した (図 4b)。

2. nLR-PCR の新しい活用例

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 5 に示すような Hybrid *SMN* 遺伝子を検出された。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。

3. nLR-PCR 解析による *SMN1* 遺伝子変異検出

nLR-PCR 解析により、図 6 に示すような *SMN1* 遺伝子変異を検出することができた(図 6 赤字)

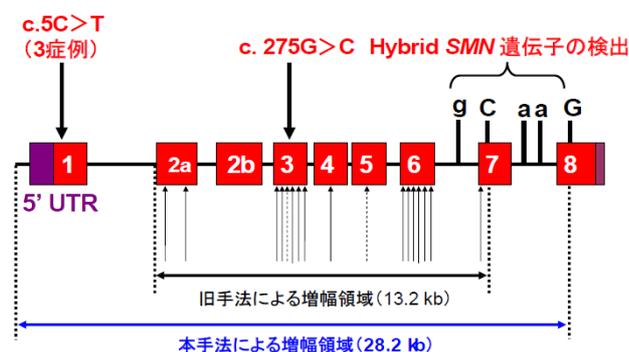


図 6 nLR-PCR 解析により検出された *SMN1* 遺伝子変異

E. 結論

本解析法により、これまでの検査方法では検出することが出来なかった遺伝子変異や hybrid *SMN* 遺伝子を検出することが可能になった。

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; Epub ahead of print.
- 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; Epub ahead of print.
- 6) 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.
- 7) 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.

- 8) 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.
- 9) 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

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他
特になし