

ALS 診断における SMN 遺伝子検索の有用性に関する研究

小野寺 理¹⁾,

石原 智彦²⁾, 小山 哲秀³⁾, 他田 真理⁴⁾, 柿田 明美⁴⁾, 熱田 直樹^{5) 6)}, 祖父江 元^{5) 6)}

1) 新潟大学脳研究所神経内科, 2) 同分子神経疾患資源解析学科, 3) 同 システム脳病態学分野, 4) 同 病理学分野, 5) 名古屋大学 6) JaCALS 事務局

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は代表的な成人発症の運動神経疾患であり, 上位下位運動神経が障害される。一部の ALS は, 下位運動神経徴候が先行し, 成人型脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy: SMA) との鑑別が問題になる。SMA の確定診断は, 原因遺伝子 *Survival motor neuron: SMN1* および *SMN2* の copy number status (CNS) 変異の証明による。本研究では ALS 鑑別診断における, *SMN* 遺伝子 CNS 検索の有用性について検討した。本邦の ALS 遺伝子データベース JaCALS および, 当施設保有の遺伝子検体を用いて, ALS 診断群 503 例, コントロール 399 例にて *SMN* 遺伝子 CNS 検索の解析を行った。その結果, ALS 群において SMA 患者は見出されず, 臨床的に鑑別がされていると考えられた。一方で ALS 群では対照群と比して, *SMN2* 遺伝子コピー数の減少が有意に多く認められ, 発症のリスクファクターであることが示唆された。今後は *SMN* CNS が ALS の進行に与える影響についても検証する予定である。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は代表的な成人発症の運動神経疾患で, 上位下位運動神経が障害される。一部の ALS は, 下位運動ニューロン徴候が先行, 顕在化し, 下位運動ニューロン疾患: Lower motor neuron disease (LMND) との鑑別が問題となる。代表的な LMND に脊髄性筋萎縮症: Spinal muscular atrophy (SMA) がある。SMA は発症年齢から 4 型に分類され, ALS との鑑別には成人型の SMA type4 が問題となる。SMA の臨床像は, 原因遺伝子 *Survival motor neuron: SMN* の copy 数多型: copy number status (CNS) により規定される。*SMN* 遺伝子には相同遺伝子, *SMN1*, *SMN2* が存在し, *SMN1* の欠損が SMA の原因となり, *SMN2* の copy 数が発症年齢, 重症度を規定する。本研究は ALS 診断における *SMN*

遺伝子 CNS 検索の有用性について検討する。

B. 研究方法

Droplet digital PCR (ddPCR) を用いて, *SMN1,2* 遺伝子の CNS を測定した。本邦の ALS データバンク JaCALS および当施設保有遺伝子検体から ALS 503 例, コントロール 399 例の解析を行った。1) ALS 診断群における, SMA 症例 (*SMN1* 欠損例) の有無。2) 両群間での *SMN* CNS の差異について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) ALS 診断群 503 例における, *SMN1* CNS は 0 copy 0 例 (0%), 1 copy 6 例 (1.2%), 2 copy 470 例 (93.4%), 3 copy 24 例 (4.8%), 4 copy 3 例 (0.6%)

であった．*SMN1* を欠損する遺伝学的な SMA 症例は存在しなかった（表 1）．

表 1 : *SMN1* copy 数

SMN1 copies	Control % (n)	ALS % (n)	Odds Ratio (95% CI)	p
0	0	0		
1	1.3 (5)	1.2 (6)	0.95 (0.29-3.14)	0.93
2	91.2 (364)	93.4 (470)	1.36 (0.83-2.24)	0.21
3	7.0 (28)	4.8 (24)	0.66 (0.38-1.16)	0.15
4	0.5 (2)	0.6 (3)	1.19 (0.20-7.16)	0.84
Total	399	503		

2) 一方で *SMN2* CNS の検討では，ALS 群とコントロール群に統計学的に有意な差異を認めた．*SMN2* 遺伝子を 1 copy のみ有する例は，ALS 診断群で 191/503 例（38.0%），コントロール群では 123/399 例（30.8%）であり，ALS 群で有意に多く認められた（オッズ比 1.37:1.04-1.81 $p=0.03$ ）（表 2）．

表 2 : *SMN1* copy 数

SMN2 copies	Control % (n)	ALS % (n)	Odds Ratio (95% CI)	p
0	4.8 (19)	7.0 (35)	1.50 (0.84-2.65)	0.16
1	30.8 (123)	38.0 (191)	1.37 (1.04-1.81)	0.03
2	62.9 (251)	53.3 (268)	0.67 (0.51-0.88)	0.003
3	1.5 (6)	1.8 (9)	1.19 (0.42-3.38)	0.73
4	0 (0)	0 (0)		
Total	399	503		

D. 考察

今回の検討では ALS 診断群には，*SMN1* 欠損例，すなわち SMA 症例は存在しなかった．一般に ALS は 50 代以降の発症が大半であることに對し，SMA は小児期に発症する．例外的に SMA type4 は成人期に発症するが，20 歳代までの発症が大多数とされる．今回の結果からは，高齢発症の SMA type4 が存在し ALS と診断されることは極めてまれと考えられた．

一方で ALS 群では対照群と比して，*SMN2* 遺伝子コピー数の減少が有意に多く認められ，発症のリスクファクターであることが示唆された．*SMN2* 遺伝子コピー数の減少は，SMN 蛋白質の発現量に影響する．今回の検討例で，*SMN* 遺伝子

CNS を基にして SMN 蛋白質発現量を計算し（Veldink, Neurology, 2005），ALS 群，コントロール群で比較すると，SMN 蛋白低下群は ALS 診断群で 207/503 例（41.2%），コントロール群では 122/399 例（30.6%）であり，ALS 群で有意に多く認められた（オッズ比 1.58 : 1.20-2.09 $p=0.001$ ）（表 3）．

表 3 : SMN 蛋白量

SMN protein level	Control % (n)	ALS % (n)	Odds Ratio (95% CI)	p
< 2.4	30.6 (122)	41.2 (207)	1.58 (1.20-2.09)	0.001
= 2.4	60.7 (242)	52.1 (262)	0.71 (0.54-0.92)	0.01
> 2.4	8.8 (35)	6.8 (34)	0.75 (0.46-1.23)	0.26
Total	399	503		

SMN protein level
 Decrease (< 2.4)
 Normal (= 2.4)
 Increase (> 2.4)

SMN protein level =
*(SMN1 CNS) + (0.2 * SMN2 CNS)*
 (Veldink H. Neurology 2005)

SMN 蛋白量の減少と ALS 発症のメカニズムについて考察する．我々は ALS 罹患組織で SMN 蛋白陽性核内小体 GEM が減少し，その結果，選択的なスプライシング異常が生じる事を見出している（Ishihara, Hum Mol Genet, 2013）．また SMN 蛋白量が運動神経細胞の生存に影響することが報告されている（Natalia, Cell Rep, 2017）．

SMN CNS と ALS 発症については，海外において複数の報告があるが，controversial な結果となっている（Wang, J Neurol Sci, 2015）．これは，*SMN* CNS に地域差が存在することも一因と考えられる（Sangare, Ann Neurol, 2014）．本邦においても，*SMN* CNS が ALS 発症に影響することが示された点は重要である．

また *SMN2* CNS と ALS 進行速度との関連が報告されている（Veldink, Neurology, 2005）．我々の検討した症例群においても，*SMN* CNS と ALS 進行速度との関連について検討を進めていく予定である．

E. 結論

本研究の結果，ALS の鑑別において，SMA type4 の重要性は低いことが示された．一方で本邦においても *SMN2* CNS と ALS の発症に関

連がある事が示された。今後は、SMN CNS と ALS 進行速度との関連について検討を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeuchi R, Tada M, Shiga A, Toyoshima Y, Konno T, Sato T, Nozaki H, Kato T, Horie M, Shimizu H, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for clinico-pathologic subtypes. *Acta Neuropathol Commun.* 23;4(1) 61 2016

Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res.* 8;44(12)5820-36. 2016

2. 学会発表

第 57 回 日本神経学会学術大会

Ishihara T, Toyoda S, Koyama A, et al. The SMN gene copy number states in Japanese ALS patients.

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。