

臨床情報・生体試料の収集と解析：脊髄性筋萎縮症（SMA）  
 小児期発症の脊髄性筋萎縮症の自然歴調査

報告者 齋藤加代子<sup>1),2)</sup>

報告者 久保祐二<sup>1),2)</sup>、荒川玲子<sup>1)</sup>、金子芳<sup>1),2)</sup>、梅野愛子<sup>1)</sup>、青木亮子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

<sup>2)</sup> 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 塩基のみ異なる SMN2 遺伝子も存在する。Long-Range PCR を利用することで SMN1 遺伝子のみをシーケ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。本症では遺伝子をターゲットとした治験が国内外で開始されているが、治療研究における有効性評価には自然歴や臨床実態の把握は不可欠である。本研究で、I 型における侵襲的陽圧換気を必要とするまでの時期および、II 型における座位保持が不可能になるまでの時期は、臨床経過と統計学的に有意に関連がある事が明らかになった。

A. 研究背景・目的

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy : 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。発症年齢、最高到達運動機能、経過により I ~ III 型に分類される（表 1）。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：齋藤加代子）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、SMN2mRNA 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開始されている。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。2016 年 12 月現在、登録者総数 215 名（図 1）であった。本研究では 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うと共に、小児期発症の SMA における運動機能の自然歴を把握し、臨床実態を明らかにする事で治療研究における有効性評価に寄与することを目的とした。

病型	病名	発症経過	最高運動機能	遺伝形式
	Werdnig-Hoffmann病 急性乳児型	発症<6ヶ月 死亡<2歳(95%)	Never sit	常染色体劣性
	Dubowitz病 慢性乳児型	発症<1歳半 経過>10歳	Never stand	常染色体劣性
	Kugelberg-Welander病 若年型	経過:緩徐 寿命:短くない	Stand & walk alone	常染色体劣性 まれに優性
	成人型	発症>20歳 重症度:多彩	Normal	多くは孤発 常染色体優性が劣性

表1) SMAの病型と分類

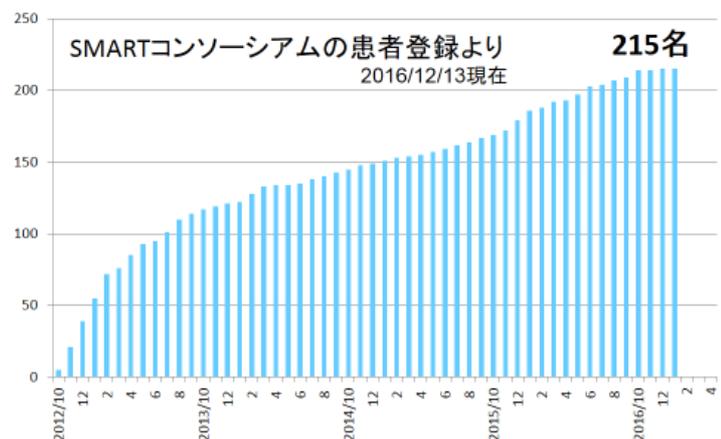


図1 SMA患者登録状況

## 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 1 例、 型 18 例、 型 1 例)を対象とした。SMA 型 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。

## B. 研究方法

本研究の「脊髄性筋萎縮症の患者登録」、「脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析」および「脊髄性筋萎縮症の自然歴調査」は女子医大倫理委員会の承認を得ている。

遺伝子診断法として互いに血縁関係のない SMA 患者 20 例 ( 型 1 例、 型 18 例、 型 1 例)を対象とした。SMA 型 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。コントロールは血縁関係のない 10 例とした。コピー数解析に MLPA 法 (MRC-Holland 社製造の Salsa® MLPA® kit) を用いた。*SMN1* 遺伝子解析において、*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。

Long-Range PCR を利用することで *SMN1* 遺伝子のみをシーケンスすることを可能にし、複合ヘテロ変異および hybrid *SMN* 遺伝子を示す遺伝子変異を同定した。自然歴調査では SMA 患者登録システムの登録者と東京女子医科大学附属遺伝子医療センター通院患者計 151 例に、本人または代諾者に文書による同意を得て、質問紙方式にて調査。112 例を解析した (表 2)。

Type	Maximal motor function*	Subtypes	Number of subjects			Age at entry: median (range)
			M	F	Total	
I	Never sits independently	I a Head control (-)	19	19	38	56.0m (0y7m-16y9m)
		I b Head control (+)	4	5	9	32.0m (1y7m-35y7m)
		total	23	24	47	
II	Never stand independently	II a Acquired sitting independently > 8mo	6	4	10	71.0m (2y5m-39y10m)
		II b Acquired sitting independently ≤ 8mo	14	18	32	89.0m (1y9m-44y)
		total	20	22	42	
III	Stand & walk independently	III a Climbing up stairs (-)	6	4	10	198.5m (5y2m-52y11m)
		III b Climbing up stairs (+)	8	5	13	185.0m (4y9m-57y6m)
		total	14	9	23	

\*Neuromuscular Disorders 25 (2015) 593-602

表2) 対象112例の詳細と本研究における重症分類

## 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)。

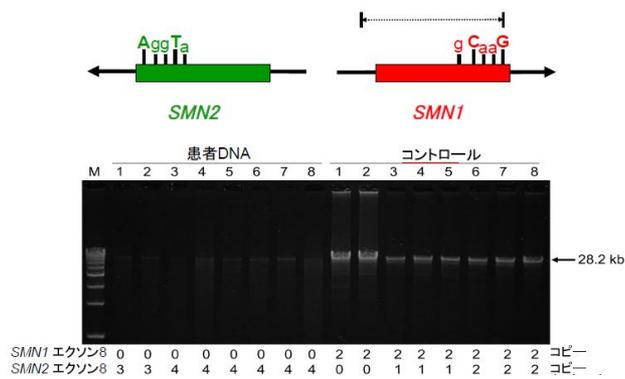


図 2 コントロールと患者 DNA の nLR-PCR による *SMN1* 遺伝子増幅

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)。

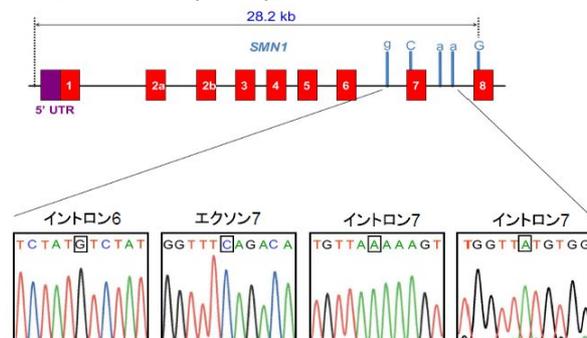


図 3 コントロールの PCR 産物のシーケンス

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)。

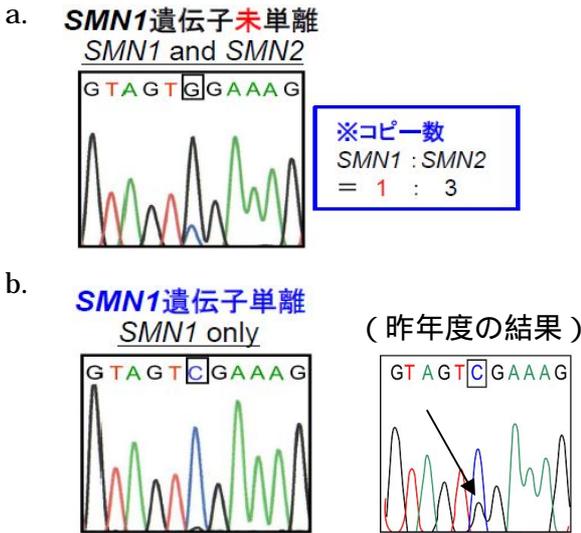


図 4 *SMN1* 遺伝子上に点変異 (c. 275G>C) を示す患者 DNA の nLR-PCR 解析

## 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。

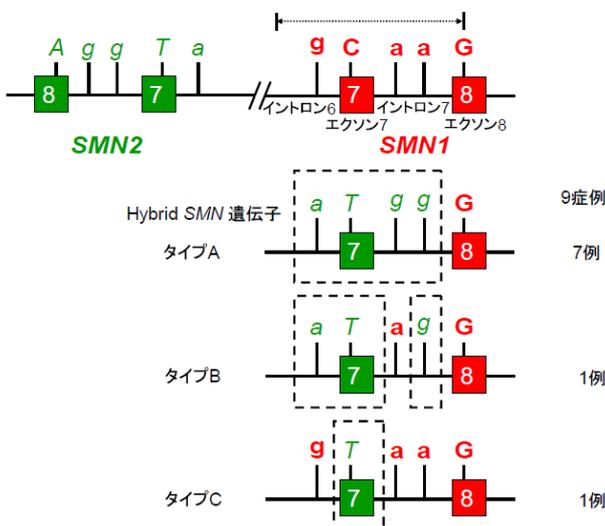


図 5 Hybrid *SMN* 遺伝子の検出

## 3. 小児期発症の SMA の自然歴

自然歴調査では対象 112 例のうち 109 例; 97.3% (型 44/47; 93.6%、型 42/42; 100%、型 22/23; 95.6%) において *SMN1* 遺伝子 exon 7 のホモ接合性欠失を認めた。3 例は *SMN1* 遺伝子が 1 コピーの欠失変異とミスセンス変異の複合ヘテロ接合であった。

型において侵襲的陽圧換気を必要とするまでの時期を定額の有無にて亜型に分け検討したところ有意差があった ( $p < 0.0001$ )。型において座位保持が不可能 (運動機能で 型) になるまでの時期を座位保持獲得時期が正常範囲内・範囲外にて亜型に分け検討したところ有意差が認められた ( $p = 0.02$ )。また、型において独歩が不可能になるまでの時期を、最高運動機能が平地歩行までだった群と階段昇降まで可能であった群とで亜型に分けて検討したところ有意差が認められた ( $p = 0.02$ )。

## 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* 遺伝子だけ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)。

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. *Brain Dev.*2014; 36(10):914-920.
- 2) Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun.*2014; 453(3):368-374.
- 3) Saito T, Nurputra DK, Harahap NI, Indra S.K.Harahap, Yamamoto H, Muneshige E, Nishizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S, Saito K, Nishio H. A study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience.*2014:1-9.
- 4) Kato N, Sa'adah N, Rochmah MA, Harahap NI, Nurputra DK, Sato H, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H, Takeuchi A. SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper : Application of COP-PCR to the SMN1 Deletion Test. *Kobe J Med Sci.*2014; in press.
- 5) Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa'adah N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. *Brain Dev* 2015;37:669-676.
- 6) Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *J Hum Genet* 2015;60:233-239.
- 7) Furukawa Y, Ogawa G, Hokkoku K, Hatanaka Y, Aoki R, Saito K, Sonoo M. Diagnostic use of surface EMG in a patient with spinal muscular atrophy. *Muscle & Nerve* 2015;7:153-154.
- 8) Yamada H, Nishida Y, Maihara T, Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Nishimura N, Saito T, Kubo Y, Saito K, Nishio H. Two Japanese patients with SMA

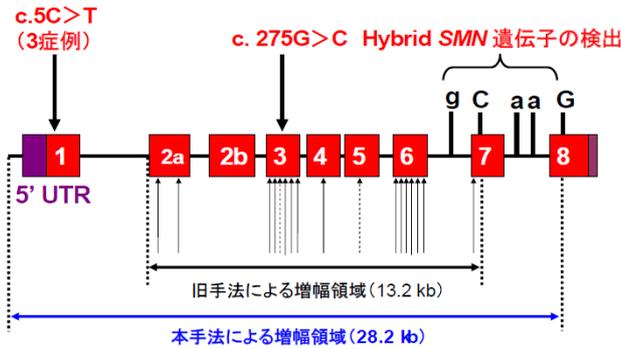


図6 nLR-PCR 解析により検出された SMN1 遺伝子変異

#### 4. 小児期発症の SMA の自然歴

日本における小児期発症の SMA 患者 112 名の自然歴を検討した。運動機能の進展過程を解析し、各病型間に連続性がある事が示唆された (図 1)。

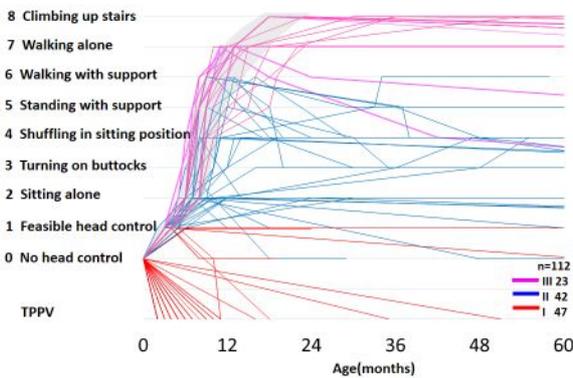


図1) SMA能動機能の進展過程

定額の有無は TPPV 導入の時期に、座位獲得の時期は座位保持喪失のまでの期間にそれぞれ有意に関係し ( $p<0.0001$ ,  $p=0.02$ )、臨床経過の予測に有用と考えた。、および型の亜型間で、機能喪失の有意差がある事から、現在進行している治験および、将来の臨床試験の有効性評価に有用である事が示された。

### E. 結論

本研究での解析法により、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。また、日本における小児期発症の SMA に対し初めての自然歴研究であり、治験の有効性評価に寄与し得る。遺伝学的検査で確定診断された SMA において、運動機能のスペクトラムが広い事が改めて明らかになった。

### F. 健康危険情報

type 1 suggest that axonal-SMN may not modify the disease severity. *Pediatric Neurology* 2015;52:638-641.

- 9) Sa'adah N, Imma Fatimah Harahap, Nurputra DK, Rochmah MA, Morikawa S, Nishimura N, Ahmad Hamim Sadewa, Indwiani Astuti, Sofia Mubarika Haryana, Saito S, Saito K, Nishio H. A rapid accurate and simple screening method for spinal muscular atrophy: high-resolution melting analysis using dried blood spots on filter paper. *Clin Lab* 2015;62:575-580.
- 10) Arakawa R, Arakawa M, Kaneko K, Otsuki N, Aoki R, Saito K. Imaging flow cytometry analysis to identify differences of survival motor neuron protein expression in patients with spinal muscular atrophy. *Pediatric Neurology*. 2016;61:70-75.
- 11) Kitamura Y, Kondo E, Urano M, Aoki R, Saito K. Target resequencing of neuromuscular disease-related genes using next-generation sequencing for patients with undiagnosed early-onset neuromuscular disorders. *J Hum Genet*. 2016;61:931-942.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 斎藤加代子、久保祐二. 脊髄性筋萎縮症 0 型. 2014:530-532. 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ no.27 神経症候群 (第 2 版)
- 17) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症. こどもの病気 遺伝について聞かれたら. 2015:126-127. 松原洋一, 呉繁夫, 左合治彦編. 診断と治療社. 東京.
- 18) 斎藤加代子. 運動神経の変性疾患 脊髄性筋萎縮症. 2015:307-309. 永井良三編. 診断と治療社. 東京.

## 2.学会発表

- 1) 斎藤加代子. 遺伝医療：遺伝学的検査と遺伝カウンセリング. 第 33 回愛媛県小児神経研究会. 2014.7.5. 愛媛
- 2) 久保祐二、青木亮子、近藤恵理、斎藤加代子. 次世代シーケンサーを用いた *SMN1* 遺伝子欠失を認めない脊髄性筋萎縮症のゲノム解析. 日本人類遺伝学会第 59 回大会. 2014.11.20. 東京
- 3) Arakawa M, Arakawa R, Saito K. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy. Bit's 8th Annual world protein & peptide conference, 2015.4.27, Nanjing, China.
- 4) 斎藤加代子, 荒川玲子, 齋藤利雄, 西尾久英. 小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルブプロ酸ナトリウム多施設共同医師主導治験. 第 57 回日本小児神経学会学術集会, 2015.5.29, 大阪.
- 5) Arakawa M, Arakawa R, Aoki R, Nomoto A, Saito K, Shibasaki M. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy. 20th International Congress of the World Muscle Society, 2015.10.4, Brighton, UK.
- 6) 荒川玲子, 大月典子, 金子芳, 青木亮子, 荒川正行, 斎藤加代子. イメージングフローサイトメトリー法を用いた新規 *SMN* タンパク質解析法. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015.10.16, 東京.
- 7) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症(SMA)について. メディアセミナー“フロッピーインファント”(からだのやわらかい赤ちゃん)の病気 脊髄性筋萎縮症(SMA)の医療の進歩と患者の声, 2015.10.28, 東京.
- 8) 斎藤加代子. From bench to bedside: Diagnosis and treatment of the intractable disease. 第 4 回織田記念国際シンポジウム, 2015.11.20, 東京.

## H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得  
なし
- 2.実用新案登録  
なし
- 3.その他  
特になし