

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
（総合）研究報告書
神経変性疾患領域における調査研究班
（分担）研究報告書

脊髄性筋萎縮症における治療バイオマーカーの開発

研究分担者 齋藤加代子 東京女子医科大学臨床ゲノムセンター所長・特任教授

研究要旨（10～12 ポイント程度）400 字程度

脊髄性筋萎縮症（SMA）は SMN 蛋白質（SMN）の欠乏により脊髄前角細胞の変性をきたし、四肢や体幹の進行性筋萎縮をもたらす遺伝性神経筋疾患である。2017 年に保険収載されたアンチセンス核酸医薬品をはじめ、遺伝子治療薬、低分子医薬品等が検討されており、新生児スクリーニングによる発症前治療の必要性も認識されつつある。一方で、未だ治療効果の客観的指標が十分ではないのが現状である。治療有効性と進行度の評価のために臨床の各段階に応じた適切なバイオマーカーの樹立は急務であり、その目的の元に末梢血を用いた新規バイオマーカーを開発し SMA モニタリング法として提案した。

研究協力者

大月典子¹⁾、荒川玲子^{1) 2)}

1) 東京女子医科大学遺伝子医療センターゲノム診療科

2) 国立国際医療研究センターメディカルゲノムセンター

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症(SMA)の根本治療薬として 2017 年に保険収載されたアンチセンス核酸医薬品をはじめ、現在 SMN 蛋白質（SMN）依存的な数々の治療法が検討されている。しかしながら未だ治療効果の客観的指標が十分ではない。治療有効性と進行度の評価のために臨床の各段階に応じた適切なバイオマーカーの樹立は急務であり、その目的の元に末梢血を用いた新規バイオマーカーを開発し SMA モニタリング法を提案した。

B. 研究方法

試料：SMA 群として東京女子医科大学病院附属遺伝子医療センターを受診した 25 例（小児 21 例、成人 4 例）、対照群として運動機能低下を示さない非 SMA として 14 例（小児 8 例、成人 6 例）の血液検体を用いた。

細胞染色：1.5 mL のヘパリン採血をした血液で、CD3、CD19、CD33 抗体を添加にて細胞分画、溶血および細胞膜の固定、細胞膜透過処理とブロッキング、AF488 標識抗ヒト SMN 抗体（2B1）にて染色、ヘキスト 33342 にて核染色した。

解析：イメージングフローサイトメトリー（IFC; ImageStream[®] MKII, Merck 社）にて解析。

SMN 遺伝子コピー数：Salsa MLPA[®] kit（MRC-Holland 社）により SMN1 および SMN2 遺伝子の Exon7 および Exon 8 のコピー数を解析した。

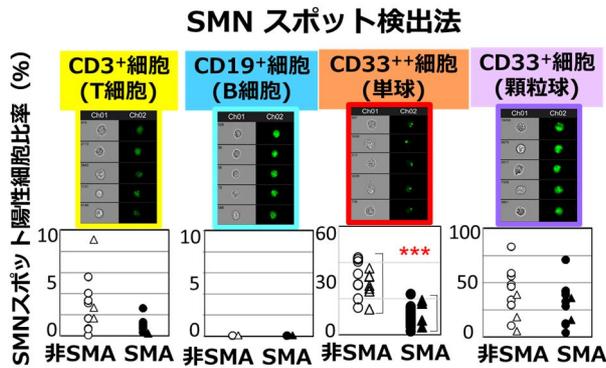
運動機能評価：Hammersmith Functional Motor Scale (HFMS)、Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular disorders (CHOP INTEND)を用いた。

C. 研究結果

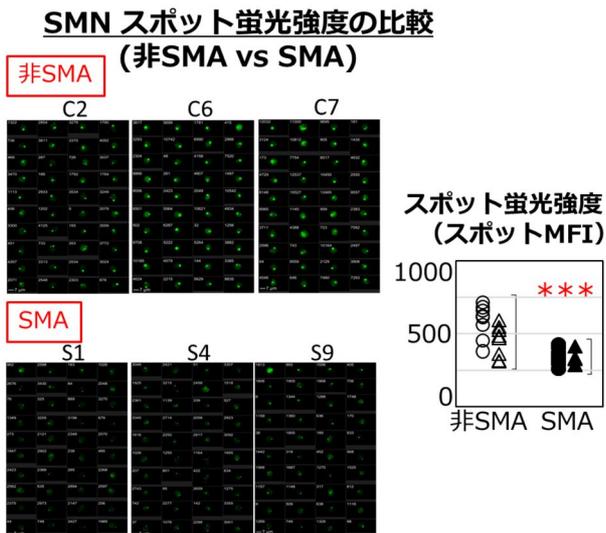
細胞画分間の SMN 発現比較：末梢血単核球 (PBMC) の CD3⁺細胞 (T 細胞)、CD19⁺細胞 (B 細胞)、CD33⁺細胞 (顆粒球)、CD33⁺⁺細胞 (単球) 4 画分における細胞内 SMN 発現を比較した。T 細胞、B 細胞、単球を主とする 3 画分の細胞内および核内における SMN 発現は非 SMA 群に比して SMA 群で有意な低

下が示された($p < 0.001$)。

SMN スポット解析：各細胞画分の染色像を比較したところ、単球画分でスポット状の SMN 染色像が確認された。4 画分それぞれの SMN スポット陽性細胞比率(%)を求めた結果、単球を主とする画分で非 SMA 群に比して SMA 群で有意な低下が示された($p < 0.001$)。

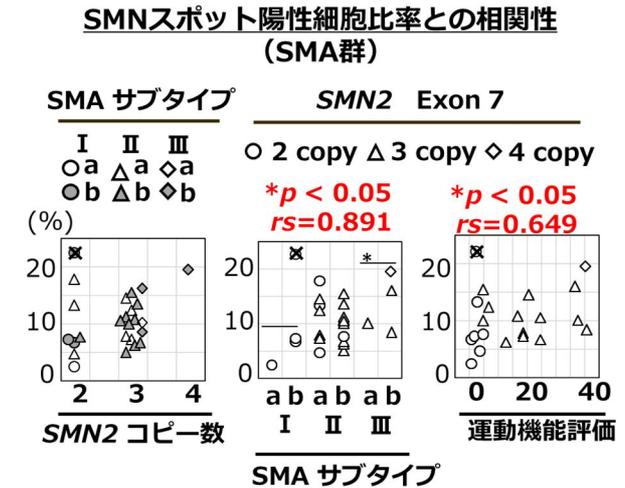


スポット蛍光強度の比較：SMN スポットと定義されたピクセルに局限した蛍光強度を SMN スポット蛍光強度として比較した。非 SMA 群に比して SMA 群で有意な低下が示された($p < 0.001$)。



スポット解析法による SMA 群内の比較：SMA 群 25 例の臨床情報 3 項目 (SMN2 コピー数、SMA サブタイプ、運動機能評価スケール) とスポット解析値 2 項目 (SMN スポット陽性細胞率、SMN スポット蛍光強度) との相関関係を検討した。いずれも相関性は得られなかった。しかしながら、異型リンパ球が検出され伝染性単核症罹患の

SMA 1 例が明らかになり、当該患者を除外して 24 例で再解析を行なった。SMN スポット陽性細胞比率と、SMA タイピング 運動機能スコア間に正の相関性が示唆された ($rs = 0.891, 0.649$)。



機能分子との共染色解析：検出された SMN スポットが機能的複合体である可能性を検討した。複合体のサブユニットであるスミスコア蛋白質との共染色を行なった結果、SMN スポットがスミスコア蛋白質と共染色で検出された。



D. 考察

我々は、多種の細胞より構成される PBMC の中からモニタリングし得る画分を CD33++細胞群 (CD33 強陽性細胞群) として同定し、SMN 凝集を検出する SMN スポット解析法を樹立した。従来までの SMN 定量法とは異なり、本解析法は核内で機能蛋白と共局在している「機能的 SMN」を検出し得る可能性が示唆された。SMA 群間の臨

床情報と SMN スポット解析値の相関では、一部 SMA 重篤度および運動機能との相関性が認められたが、さらなる検出精度の向上が必須である。CD33 強陽性細胞群は 90%以上が CD14 陽性であることからほぼ単球画分であることが想定される。単球独特の heterogeneity が末梢 SMN の挙動を反映している可能性を考えている。本研究で得られた視点より、SMN モニタリングを可能とする末梢-中枢神経間 SMN 情報伝達システムについて現在検討中である。

E. 結論

我々は IFC を用いて末梢血 CD33 強陽性細胞より機能的 SMN を検出する SMN スポット解析法を樹立した。対照群に比して SMA 群ではスポット陽性細胞比率、スポット蛍光強度が有意に低下した。SMN スポット陽性細胞の割合(%)は SMA の重篤度・運動機能と相関性を示した。このことから新規 SMA バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Otuski N, Arakawa R, Kaneko K, Aoki R, Arakawa M, Saito K. A new biomarker candidate for spinal muscular atrophy: Identification of a peripheral blood cell population capable of monitoring the level of survival motor neuron protein. PLoS One, 2018, 13 (8) e0201764

2. 学会発表

1) 大月典子. 脊髄性筋萎縮症(SMA)の新規バイオマーカー：イメージングフローサイトメトリーを用いた SMN 蛋白質新規解析法の提案. <https://www.youtube.com/watch?v=x0ncudPWI> GI, ルミネックスウェブセミナー,2020.1.25

2) 前川貴則 大月典子 今久保桃子 山本毅 山田和宏 荒川玲子 荒川正行 齋藤加代子 イメージング FCM を用いた脊髄性筋萎縮症に対する新規バイオマーカーの開発 第 139 回日本薬学会 2019.3.21 千葉

3) 前川貴則 大月典子 今久保桃子 山本毅 山田和宏 荒川玲子 荒川正行 齋藤加代子 イメージングフローサイトメーターを用いた脊髄性筋萎縮症に対する新規バイオマーカーの開発 第 3 回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会セミナー 2018.12.14 東京

4) 大月典子, 前川貴則, 荒川玲子, 山田和宏, 齋藤加代子. 脊髄性筋萎縮症(SMA)のバイオマーカー：末梢血を用いた SMN 蛋白質新規解析法の改善. 日本人類遺伝学会, 第 63 回日本人類遺伝学会 2018.10.13 横浜

5) 大月典子, 荒川玲子, 金子芳, 青木亮子, 荒川正行, 齋藤加代子. 脊髄性筋萎縮症(SMA)のバイオマーカー：末梢血を用いた SMN 蛋白質新規解析法の提案. 第 25 回日本遺伝子診療学会 2018.7.14 三重

G. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

発明の名称：「SMN タンパク質の発現を検出する方法」

出願日：2014 年 4 月 3 日(優先日)

発明者：齋藤加代子、荒川玲子、荒川正行、野本明男

出願人：学校法人東京女子医科大学、公益財団法人微生物化学研究会

出願番号：国内基礎出願(特願 2014-076985), PCT 国際出願(PCT/JP2015/060662), 国内移行(日本：特願 2016-511649, 米国：15/300456, 欧州：15773282.7, 中国：201580022715.X)

権利化国：日本(特許第 9470572 号、2017 年 3 月 31 日)、中国(ZL201580022715.X、2018 年 6 月 8 日)

発明の名称：「SMN タンパク質の核内構造体の発現解析方法」

出願日：2016 年 5 月 24 日(優先日)

発明者：齋藤加代子、荒川玲子、荒川正行

出願人：学校法人東京女子医科大学、公益財団法人微生物化学研究会

出願番号: 国内基礎出願(特願 2016-103482), PCT
国際出願 (PCT/JP2017/019165)