

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16281

研究課題名(和文) 脊髄性筋萎縮症患者細胞におけるSMNタンパク質複合体形成能の解析

研究課題名(英文) Analysis of SMN protein complex in spinal muscular atrophy patients-derived cells.

研究代表者

荒川 玲子(Arakawa, Reiko)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40623111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は、SMN1遺伝子の欠失や変異により筋萎縮を生じる。本研究ではSMA患者由来の線維芽細胞、リンパ芽球の細胞株を樹立し、イメージングフローサイトメトリー法を用いてSMNタンパク質を解析した。患者由来細胞では有意にSMNタンパク質発現量が低く、リンパ芽球では重症度とSMN発現量に有意な相関がみられた。さらに末梢血を試料としたアルゴリズムを確立し、1.5mlの血液を細胞表面抗原マーカーで染色、溶血、固定、細胞透過処理後に、細胞内SMNタンパク質を抗SMN抗体で染色、解析した。SMN発現量およびSMN凝集能は患者由来血液で有意に低く、重症度とSMN凝集能に有意な相関が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性の筋萎縮を生じる遺伝性疾患である脊髄性筋萎縮症に対しては、アンチセンスオリゴヌクレオチド製剤や、SMN1遺伝子の機能欠損を補う遺伝子治療ベクター製品が承認されている。本研究で構築した、1.5mlの血液で解析可能なSMNタンパク質定量手法は、これらの治療の効果を客観的に評価するバイオマーカーの基礎研究となり、将来的に治療の適正化に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by mutations in the survival motor neuron 1 (SMN1) gene. These mutations result in reduced expression of survival motor neuron (SMN) protein and SMN complex. Here, we report a method that allows the evaluation of SMN protein in <1.5 ml of peripheral blood using imaging flow cytometry. This technique successfully identified different expression patterns and subcellular localization of SMN protein in healthy human and SMA patient-derived cells.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 SMNタンパク質 イメージングフローサイトメトリー

## 1. 研究開始当初の背景

survival motor neuron1 (*SMN1*) 遺伝子の変異もしくは欠失により生じる脊髄性筋萎縮症 (SMA) では、下位運動ニューロンの変性により、全身の筋萎縮を生じる。SMA 患者においては、*SMN2* 遺伝子が SMN タンパク質発現を担っており、SMN タンパク質の発現量が低値である。

SMA 患者では *SMN2* 遺伝子由来の SMN タンパク質が生命維持に重要な役割を果たしており、SMN タンパク質発現量が低いほど、重症度が高いとされている。SMA に対しては、*SMN2* 遺伝子をターゲットとして、SMN タンパク質発現増強を目的とした薬剤など、様々な開発がなされている。これらの薬剤の効果を客観的に評価するために、SMN タンパク質を対象としたバイオマーカーが切望されていた。

## 2. 研究の目的

SMN タンパク質をターゲットとしたバイオマーカーを開発するための基礎研究として、SMA 患者由来細胞における SMN タンパク質発現解析法を確立する。

確立した手法を用いて、SMA 患者から採取した皮膚、血液細胞における、SMN タンパク質発現解析を行い、患者の臨床的な重症度と、SMN タンパク質発現量の相関について検討する。

## 3. 研究の方法

(SMA 患者由来細胞株の作製)

SMA 患者もしくは代諾者、および健常者へのインフォームドコンセントによる文書同意の上、皮膚細胞、血液細胞を採取した。皮膚細胞採取には、過度な侵襲を生じないように、胃瘻造設術、気管切開術、側彎手術などの機会があった際に、同意を得て採取した。皮膚細胞を採取後、20% 胎児ウシ血清-DMEM 培地で培養、増殖させた。血液細胞は、採血後、末梢血由来リンパ球の分離を行い、Ebstein-Barr ウイルスを感染させることで不死化し、リンパ芽球セルラインを樹立した。

(SMN 遺伝子型の解析)

遺伝子型と表現型の関連を検討するために、SMA 患者の細胞から DNA を抽出し、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法にて、*SMN2* 遺伝子のコピー数解析を実施した。

(イメージングフローサイトメトリー法を用いた SMN タンパク質発現解析)

SMA 患者由来線維芽細胞および健常人由来線維芽細胞を培養後、細胞をトリプシン処理、洗浄、固定し、SMN および核に対する各蛍光標識抗体で細胞内染色を行った。染色後、イメージングフローサイトメトリー法にて、細胞内 SMN タンパク質発現量および SMN タンパク質凝集能の定量を行った。また、SMA 患者および健常人由来のリンパ芽球セルラインを培養、増殖させた後に固定、洗浄した。そして SMN および核に対する各蛍光標識抗体で細胞内染色を行った。上記の染色後に、イメージングフローサイトメトリー法にて細胞内 SMN タンパク質発現量および SMN タンパク質凝集能の定量を行った。

末梢血の解析では、リンパ球、単球、顆粒球において、それぞれ SMN タンパク質の発現に差異がみられることが明らかとなったため、細胞表面抗原マーカーをもとに、新鮮末梢血由来単核細胞を分画した上で解析するアルゴリズムとした。ヘパリン管に採取した 1.5ml の血液を試料とし、細胞表面抗原マーカーで染色し、溶血、固定処理を実施、細胞透過処理後に、細胞内 SMN タンパク質を抗 SMN 抗体で染色、イメージングフローサイトメトリーにて、SMN 発現および SMN 凝集能を解析した。

本研究は、東京女子医科大学倫理委員会の承認のもとで実施した。

## 4. 研究成果

皮膚由来線維芽細胞、リンパ芽球セルラインにおける SMN タンパク質発現量の解析を行うために、イメージングフローサイトメトリーによる解析手法の確立を行った。さらに、より低侵襲、低コストで採取可能な末梢血を対象とした SMN タンパク質解析のアルゴリズム構築を行った。

SMA 患者由来線維芽細胞およびリンパ芽球セルラインにおいては、健常コントロールと比較して、有意に SMN タンパク質発現量が低く、リンパ芽球においては、SMA の疾患重症度と SMN タンパク質発現量に有意な相関がみられた。

新鮮末梢血由来単核細胞を分画した上で解析するアルゴリズムにおいては、ヘパリン管に採取した 1.5ml の血液にて SMN タンパク質解析が可能となった。新鮮末梢血由来単核細胞にお

る SMN 発現量および SMN 凝集能は、健常コントロールと比較して SMA 患者由来細胞で有意に低下しており、さらに SMA の疾患重症度と SMN タンパク質凝集能には有意な相関が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuki N, Arakawa R, Kaneko K, Aoki R, Arakawa M, Saito K	4. 巻 13
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0201764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko K, Arakawa R, Urano M, Aoki R, Saito K	4. 巻 39
2. 論文標題 Relationships between long-term observations of motor milestones and genotype analysis results in childhood-onset Japanese spinal muscular atrophy patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Dev.	6. 最初と最後の頁 763-773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2017.04.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Arakawa R, Ostuki N, Kaneko K, Arakawa M, Saito K
2. 発表標題 Evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker for spinal muscular atrophy patient based on imaging flow cytometry
3. 学会等名 Advances in skeletal muscle biology in health and disease conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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、斎藤加代子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大月典子、前川貴則、荒川玲子、山田和宏、斎藤加代子
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症のバイオマーカー：末梢血を用いたSMN蛋白質新規解析法の提案および精度向上に向けての改良
3. 学会等名 日本人類遺学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大月典子、荒川玲子、金子芳、青木亮子、荒川正行、斎藤加代子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第25回日本遺伝子診療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arakawa R, Arakawa M, Otsuki N, Kaneko K, Aoki R, Saito K
2. 発表標題 Method of evaluating survival motor neuron protein as an outcome measure of SMA-modifying therapy
3. 学会等名 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arakawa R, Arakawa M, Saito K
2. 発表標題 Imaging flow cytometry for identifying differences in SMN protein expression between spinal muscular atrophy patients and normal subjects
3. 学会等名 6th International Conference on Neurology and Neuromuscular diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arakawa M, Arakawa R, Saito K
2. 発表標題 A novel approach to SMN protein-based evaluation as biomarker in spinal muscular atrophy
3. 学会等名 6th International Conference on Neurology and Neuromuscular diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒川玲子、金子芳、荒川正行、浦野真理、青木亮子、斎藤加代子
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症 型患者由来リンパ芽球におけるSMN蛋白発現量の解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒川玲子、久保祐二、金子芳、浦野真理、青木亮子、伊藤万由里、斎藤加代子
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症におけるSMN1遺伝子の遺伝学的検査と遺伝カウンセリング
3. 学会等名 第41回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----