

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2023
課題番号：19K08316
研究課題名（和文）脊髄性筋萎縮症の早期診断法の確立に関する研究

研究課題名（英文）Spinal muscular atrophy

研究代表者

水野 朋子（Mizuno, Tomoko）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：90765398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、脊髄性筋萎縮症（Spinal muscular atrophy：以下SMA）の早期発見・治療のため、SMAの新生児マススクリーニング法の確立を目指した。濾紙血を使用し、SMAの原因遺伝子であるSMN1遺伝子のコピー数を定量PCR法を用い測定した。原発性免疫不全症のスクリーニング検査であるTREC、KRECも同時測定した。まずSMA患者、保因者、健常者の検体を用いて、SMN1遺伝子を測定し、PCRキットの有用性を明らかにした。その後、SMA新生児マススクリーニングを導入する地域にPCRキットを提供し、パイロットスタディを行った。特に問題なく施行でき、陽性例も見つかっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄性筋萎縮症（SMA）は進行性に筋萎縮、筋力低下を呈する疾患で、I型は最も重症で頻度が高く、自然歴ではほぼ寝たきりで、人工呼吸管理が必要となる。近年SMAの治療薬が相次いで発売されたが、運動予後改善のためには早期治療が重要である。本研究では、PCR法を用いたSMAの新生児マススクリーニング法を開発し、SMAの早期発見・治療が実現可能となった。また原発性免疫不全症のスクリーニング検査も同時に行うことができる。現在、複数のPCR法が存在するが、SMAの新生児マススクリーニングは全国的に広がりを見せ、導入する自治体が増えている。

研究成果の概要（英文）：We aimed to establish a newborn screening method for spinal muscular atrophy (SMA) for early detection and treatment of SMA. Using dried blood spot, we measured the copy number of SMN1 gene, the causative gene of SMA, using quantitative real-time PCR assays. TREC and KREC, screening tests for primary immunodeficiency, were also measured simultaneously. First, the SMN1 gene was measured using samples from SMA patients, carriers, and healthy subjects to determine the usefulness of this PCR method. Subsequently, pilot studies were conducted using this PCR method in some areas. The study was conducted without any particular problems, and a positive case was found.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：小児神経学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 新生児スクリーニング SMN1 PCR法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy, 以下 SMA) は脊髄前角細胞の変性によって、進行性に筋萎縮、筋力低下を呈する疾患で、約 1-2 万人に 1 人の頻度である。発症時期と臨床経過から、I-IV 型に分類される。最重症型の I 型 (Werdnig-Hoffmann 病) は SMA 全体の 60% と最も頻度が高く、0-6 か月の間に筋緊張低下、筋力低下で発症する。自然歴では頸定や座位の獲得はなく、嚥下機能低下、呼吸不全を呈し、生命維持のためにほぼ全例で人工呼吸管理が必要となる。SMA の主要な責任遺伝子は *SMN1* であり、95% が *SMN1* の exon7 を含む両アレルの欠失により発症する常染色体潜性遺伝疾患である。

同領域に存在する *SMN2* は *SMN1* と 5 塩基しか相違点がないが、スプライシングの過程でほとんどの exon7 がスキップされ、産生される SMN 蛋白質の大部分が非機能性のもとなる。結果として SMA 患者における SMN 蛋白質は、*SMN2* から産生されるわずかな量のみとなり、SMA の重症度は *SMN2* コピー数に依存するとされる。

SMA は従来根本的な治療法のない疾患であったが、近年 3 つの治療薬が承認された (研究開始時点では、ヌシネルセンのみ承認)。ヌシネルセンは *SMN2* スプライシング修飾作用のある核酸医薬品、リスジプラムは *SMN2* スプライシング修飾作用のある低分子薬、オナセムノゲンアベパルボベクは遺伝子治療薬で、SMN 蛋白をコードする SMN 相補的 DNA を組み込んだ、血清 9 型アデノ随伴ウイルスベクター製品である。3 剤とも有効性は非常に高く、SMA の運動マイルストーンを有意に改善し、死亡または永続的人工呼吸管理のリスクを有意に低下させる。更なる予後改善のためには早期の治療開始が重要で、新生児期にマススクリーニングを行い早期発見、早期治療につなげることは患者の大きなメリットとなる。海外での先行研究では real time PCR 法を用い、*SMN1* のコピー数を測定することで新生児スクリーニングが行われているが、本邦ではこういった研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、1) 新生児マススクリーニング (newborn screening, 以下 NBS) に対応した SMA の早期診断法の確立、2) 早期診断法を用いた NBS の予備調査、3) 診断した後の治療経過・予後評価、を目的とする。

先行研究で、NBS 用の乾燥濾紙血 (DBS) を用い、Taqman 法によるマルチプレックス PCR 法にて TREC (T cell receptor excision circles)、KREC (kappa chain recombination excision circles) の測定を行うことで、重症複合免疫不全症や無ガンマグロブリン血症などの原発性免疫不全症 (primary immunodeficiency, 以下 PID) のスクリーニングが可能であることが報告されている。SMA の NBS は、*SMN1* のコピー数測定をこれらの測定と同時にを行う。

3. 研究の方法

コントロール (健常者あるいは他疾患)、SMA 患者、保因者から採取した血液で DBS を作成し、以下の PCR 法にて *SMN1* コピー数を測定する。早期診断法として有用と判断されれば、新生児を対象に測定を行う。現行の NBS では、出生後 4-6 日に DBS を採取するが、その DBS を用い *SMN1* コピー数を測定する。

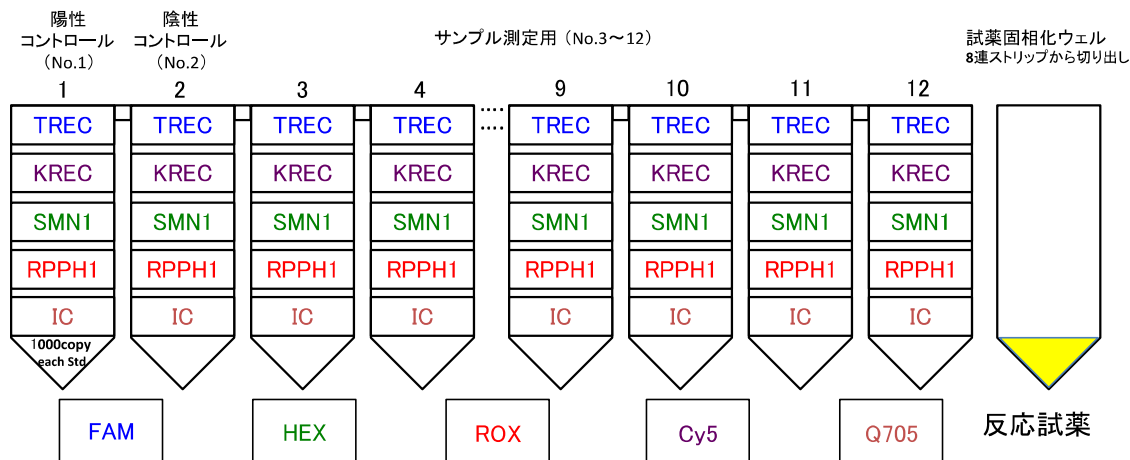
< SMN1 コピー数の測定 >

Magtration 法を用いて、DBS から DNA を自動的に抽出する。Taqman 法によるプライマープローブ固相化キットを用い、マルチプレックス定量 PCR 法により *SMN1*、TREC、KREC を定量する。キットには *SMN1*、TREC、KREC、RPPH1 (ribonuclease P RNA component H1) のプライマーとプローブ、インターナルコントロール (IC) のプローブ、陽性コントロール、陰性コントロールが固相化されている。このシステムでは 92 サンプルの同時定量が可能である (図 1)。

SMN1 は exon7 の c.840C をターゲットとして増幅し、増幅産物に対し *SMN1* 特異的プローブを結合させ測定する。*SMN2* は c.840T であり、増幅されない。

RPPH1 は 100 コピー/ml をカットオフとした。

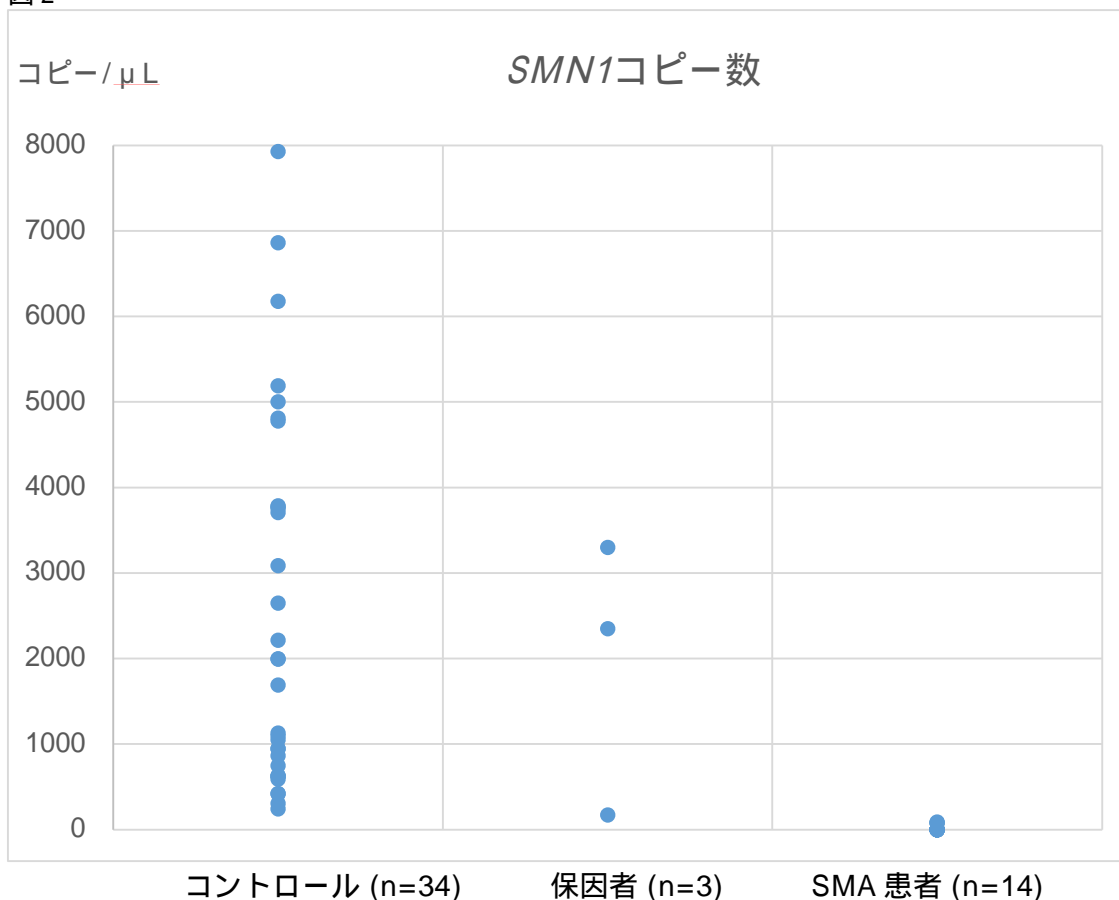
図 1



4. 研究成果

コントロール 34 例、SMA 患者 14 例、保因者 3 例の DBS を使用し *SMN1* の測定を行った。SMA 患者は 14 例中 11 例が 0 コピー/ μ L であった。結果を図 2 に示す。この結果より *SMN1* は 100 コピー/ μ L をカットオフとした。

図 2



次に予備調査として、当院や他地域で出生した新生児を対象に、DBS を用い *SMN1* を測定した (文献 1)。問題なく使用できることを確認し、現在 SMA を含む拡大 NBS の事業として、一部の自治体で使用されている。文献 2 では当キットを用い、69679 例で SMA と PID の NBS を行った。1 例で SMA-NBS 陽性となり、保険収載されている MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification) 法による *SMN1* コピー数を測定し、SMA と確定診断され、早期治療につながった。現在複数のキットが存在しているが、SMA-NBS は全国的に広がり、

多くの自治体で行われている。日本小児神経学会からは「脊髄性筋萎縮症に対する新生児マススクリーニングの手引き」が発表されている。

<参考文献>

1. Kimizu T, Ida S, Oki K, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy in Osaka -challenges in a Japanese pilot study. *Brain Dev.* 2023;45:363-371.

2. Kimizu T, Nozaki M, Okada Y, et al. Multiplex real-time PCR-based newborn screening for severe primary immunodeficiency and spinal muscular atrophy in Osaka, Japan: our results after 3 years. *Genes (Basel).* 2024;15:314.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 谷田けい、今井耕輔	4. 巻 282
2. 論文標題 新生児マススクリーニングによる原発性免疫不全症の診断と治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 378-384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Tomokazu Kimizu, Shinobu Ida, Keisuke Oki, Morimasa Shima, Shizuka Nishimoto, Ken Nakajima, Tae Ikeda, Yukiko Mogami, Keiko Yanagihara, Keiko Matsuda, Eriko Nishi, Yuiko Hasegawa, Masatoshi Nozaki, Hiroshi Fujita, Akemi Irie, Toru Katayama, Nobuhiko Okamoto, Kohsuke Imai, Hisahide Nishio, Yasuhiro Suzuki	4. 巻 45
2. 論文標題 Newborn screening for spinal muscular atrophy in Osaka -challenges in a Japanese pilot study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 363-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2023.03.004	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 -

1. 著者名 今井耕輔	4. 巻 51
2. 論文標題 【みんなで役立てよう 新生児スクリーニング検査】今後導入が予定・期待される新生児スクリーニング重症原発性免疫不全症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 264-270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Tomokazu Kimizu, Masatoshi Nozaki, Yousuke Okada, Akihisa Sawada, Misaki Morisaki, Hiroshi Fujita, Akemi Irie, Keiko Matsuda, Yuiko Hasegawa, Eriko Nishi, Nobuhiko Okamoto, Masanobu Kawai, Kohsuke Imai, Yasuhiro Suzuki, Kazuko Wada, Nobuaki Mitsuda, Shinobu Ida	4. 巻 15
2. 論文標題 Multiplex Real-Time PCR-Based Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency and Spinal Muscular Atrophy in Osaka, Japan: Our Results after 3 Years	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes15030314	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 Tomoko Mizuno, Tadashi Kanouchi, Yumie Tamura, Ko Hirata, Runa Emoto, Tomonori Suzuki, Kenichi Kashimada, Tomohiro Morio	4. 巻 23
2. 論文標題 Changes in electrophysiological findings of spinal muscular atrophy type I after the administration of nusinersen and onasemnogene abeparvovec: two case reports	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-023-03420-2	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水野朋子
2. 発表標題 オナセムノゲンアベパルボベクを投与した脊髄性筋萎縮症I型の3例
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井耕輔
2. 発表標題 どないすんねん！日本の新生児スクリーニングを考える「広がる！原発性免疫不全症スクリーニング」
3. 学会等名 第49回日本マススクリーニング学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原愛、今井耕輔ら .
2. 発表標題 宮城県における原発性免疫不全症および脊髄性筋萎縮症の新生児マススクリーニング検査実績報告
3. 学会等名 第49回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井耕輔
2. 発表標題 免疫不全症新生児スクリーニングとその治療について
3. 学会等名 第11回中四国免疫不全症セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井耕輔
2. 発表標題 新生児スクリーニング：タンデムマス法とDNA検査の融合「免疫不全症スクリーニングのインパクト」
3. 学会等名 第45回日本小児遺伝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井耕輔
2. 発表標題 今知っておきたい新生児マススクリーニングの進歩 原発性免疫不全症スクリーニングの現状と展望
3. 学会等名 日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野朋子
2. 発表標題 オナセムノゲンアベパルボベクの投与経験とカルタヘナ法について
3. 学会等名 沖縄・脊髄性筋萎縮症GRTセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野朋子
2. 発表標題 オナセムノゲンアベバルボベクを投与したSMA1型の3例
3. 学会等名 Gene Replacement Therapyシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野朋子
2. 発表標題 マスキューニングが変える脊髄性筋萎縮症の未来
3. 学会等名 都医学研都民講座（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野朋子
2. 発表標題 オナセムノゲンアベバルボベクを投与した脊髄性筋萎縮症I型の3例
3. 学会等名 日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田洋史
2. 発表標題 ろ紙血プロテオームを用いた原発性免疫不全症における新生児スクリーニングの可能性
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤明史
2. 発表標題 原発性免疫不全症新生児スクリーニングの医療経済学的評価
3. 学会等名 第 47 回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣木遼
2. 発表標題 TREC、KREC を用いた原発性免疫不全症新生児マススクリーニング法の開発：15,000 検体の解析結果
3. 学会等名 第 47 回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井耕輔
2. 発表標題 重症原発性免疫不全症新生児スクリーニングの実現に向けて
3. 学会等名 第227回大阪小児科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井耕輔
2. 発表標題 TRECとCRECを用いた重症原発性免疫不全症に対する新生児スクリーニングの実現に向けて
3. 学会等名 第46回日本マススクリーニング学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花井潤師
2. 発表標題 自動核酸抽出機・TREC/CREC同時測定キットによるPIDスクリーニングの基礎検討
3. 学会等名 第46回日本マススクリーニング学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>「脊髄性筋萎縮症に対する新生児マススクリーニングの手引き」作成 https://www.childneuro.jp/uploads/files/about/2023SMA/202307SMA_tebiki.pdf</p>

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
研究分担者	今井 耕輔 (Imai Kosuke) (90332626)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------