

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591133

研究課題名（和文） 脊髄性筋萎縮症の治療における VPA と塩酸アマンタジンの効果の基礎的研究

研究課題名（英文） Treatment of sodium valproate and amantazine hydrochloride in spinal muscular atrophy

研究代表者

館 延忠 (Tachi Nobutada)

札幌医科大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：80136944

研究成果の概要（和文）：SMA(Spinal muscular atrophy)は、染色体 5q13 領域のテロメア側にある SMN1 遺伝子の欠失で脊髄の前角細胞にある運動神経の変性により全身の筋萎縮が特徴である。SMN1 と高い相同性を持つ SMN2 は、SMA の軽症型の SMAIII では3から4コピー存在し SMN1 の欠失を代償していると考えられている。最近、てんかんに使用される VPA(デパケン)が、SMN2 のコピー数、SMN 蛋白を増加させることが、また SMAII の症例にアマンタジンを使用し有効性が報告された。VPA およびアマンタジンの SMA に対する有効性の基礎的研究として、SMA の患者さんの培養皮膚線維芽細胞を確立し SMNmRNA と SMN 蛋白レベルで解析した。結果：VPA 投与の有効性とアマンタジンの無効性が明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：Spinal muscular atrophy (SMA) is characterized by degeneration of the motoric neurons of the anterior horn cells of the spinal cord, leading to muscle atrophy due to mutation of telomeric survival motor neuron (SMN1) located in chromosome on 5q13. SMN2, high homology of SMN1, is determined to disease severity. SMA II and III have 3 or 4 numbers of SMN2 gene. Recently, sodium valproate (VPA) treated with epilepsy, increased number of SMN2 gene in vitro. Increased muscle strength with Amantazine treatment has reported in SMA II patients. We studied effect of treatment with VPA and amantazine using ccultured skin fibroblasts derived from SMA patints based on SMN mRNA and protein levels. Results: VPA treatment was effective but Amantazine was no effeitve in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：小児神経学、分子遺伝

1. 研究開始当初の背景
脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy: S

MA)は、常染色体劣性遺伝形式をとり、脊髄前角細胞の変性のため全身の筋萎縮と進行性筋

力低下を特徴とする治療法のない遺伝性神経疾患である。発症年齢、臨床経過に基づき、I型、II型、III型に分類される。I型 (Werdnig - Hoffmann病)は乳児期早期より呼吸筋の萎縮により人工呼吸管理を要し予後不良である。II型は座位保持を獲得するが、起立・歩行は生涯獲得しない。軽症型のIII型は歩行可能であるが日常生活は制限される。SMAの原因遺伝子は、染色体5q13領域のテロメア側にあるSMN1で、この遺伝子のエクソン7を含む領域のホモ欠失によりSMN蛋白の欠損で脊髄前角細胞の α -ニューロンの変性により発症する。SMAIの95%、SMAIIの80%、SMAIIIの60%の症例にSMN1のホモ欠失が認められる。SMN1と同じ領域のセントロメア側に存在するSMN2遺伝子は、SMN1と高い相同性を持ち、これらの2つの遺伝子の違いはエクソン7にある1塩基であり同義置換である。SMAIではSMN2は1から2コピー存在し、SMAIIでは3コピー、SMAIIIでは3コピー以上持つ症例が多いことが示され、SMN2のコピー数が多いほど発症が遅く症状が軽いことから、SMN2の機能はSMN1欠失の代償とされている。SMAに対して、現在まで有効な治療法は存在していなかったが、最近、SMA症例からの培養皮膚線維芽細胞にvalproic acid(VPA)、butyrate、aclarubicinを投与する実験で、これらの薬剤でSMN蛋白増加を示された。SMAに対する薬物治療は、てんかんに使用されているVPA以外は臨床応用が難しく、VPAでもSMA患者に対する臨床効果は少ない。最近、SMAIIの2症例にインフルエンザ予防のためにアマンタジンを使用した処、数日後より筋力が大幅に増強しSMA患者におけるアマンタジンの有効性が報告された。アマンタジンはインフルエンザA、パーキンソンの治療として広く使用されている。VPAと同様にアマンタジンがSMAの臨床応用のために、アマンタジンがSMA治療の有効性を分子細胞学的に解析することを目的とした。

2. 研究の目的

脊髄性筋萎縮症(SMA)は、染色体5q13領域のテロメア側にあるSMN1遺伝子の欠失が原因である。SMN1と高い相同性を持つSMN2は、SMAの軽症型のIIおよびII型Iでは3から4コピー存在しSMN1の欠失を代償していると考えられている。最近、てんかんに使用されるVPAがSMN2のコピー数、SMN蛋白を増加させることが報告された。しかし、SMAIIおよびIII型の患者さんにVPAを使用するも一定の効果は認められていない。SMAIIの症例にVPAに加えてアマンタジンを使用し有用性が報告された。アマンタジンのSMAに対する有効性の基礎的研究としてSMAの患者さんからの培養皮膚線維芽細胞を確立しVPA単独、アマンタジン単独、VPAとアマンタジン併用と2剤の非投与培養皮膚線維芽細胞からtotal RNA、蛋白を抽出して、SMN転写産物、SMN蛋白を解析してアマンタジンの有効性の有無を目的とした。

3. 研究の方法

対象と方法:SMN遺伝子のホモ欠失(SMN1del/del)を持つSMAI患者さんおよび両親からインフォームドコンセントを得て、皮膚生検を行い培養皮膚線維芽細胞を確立した。培養皮膚線維芽細胞にVPAをてんかんの治療有効血中濃度である100ug/を維持するために培養液中の濃度を1uMに設定し24時間培養した。VPAを添加しない患者培養皮膚線維芽細胞を比較のためのコントロールとした。塩酸アマンタジンの治療域である血中濃度0.25-0.5ug/mlを維持するために培養液の濃度を0.005uMにして24時間培養した。塩酸アマンタジンを添加しない患者培養線維芽細胞を比較のためのコントロールとした。培養液中の濃度をVPA1uM、塩酸アマンタジン0.005uMとした患者線維芽細胞も24時間培養した。コントロールとして正常ヒト線維芽細胞(Lonza Normal Human Cells)を用いた。これらの培養細胞からSMN転写産物(SMN transcr

ript)の解析のためQuick Prep mRNA Purification Kitを用いてTotal RNAを抽出した。First-strand cDNA Synthesis Kit を用いてtotal RNAからcDNAを作製した。これらのcDNAをSMN exon 6-8(496bp)を増幅するprimerを用いてPCRで増幅してSMN transcript を解析した。内部標準としてGAPDHを用いた。VPA単独、塩酸アマンタジン単独、VPAと塩酸アマンタジンを加えたそれぞれの培養細胞、これらを添加しない培養線維芽細胞および正常ヒト線維芽細胞から蛋白を抽出し、SMN蛋白量を抗SMN抗体を用いてWestern blot法にて解析した。内部標準用として抗 β -tubulinを用いて β -tubulin量に対するSMN蛋白量を解析した。

4. 研究成果

SMN転写産物(SMN transcript)の解析(図1): 正常コントロール(図1のレーン1)では496bpのSMN1+SMN2のfull-length transcript (FL-SMN)と微量の441bpの SMN1+SMN2のexon 7の欠失したtranscript (Δ 7-SMN)を認めた。薬剤を加えないSMN1del/del症例(図1のレーン2)では、正常コントロールと異なり著明に減少したFL-SMNと著明に増加した Δ 7-SMNを認めた。VPAを添加したSMN1del/del症例(図1のレーン3)では、薬剤を加えないSMN1del/del症例に比べ、軽度増加しFL-SMNと著明に増加した Δ 7-SMNを認めた。アマンタジン添加したSMN1del/del症例(図1のレーン4)では、VPA単独の添加と同程度のFL-SMNと Δ 7-SMNを示した。また、VPAとアマンタジンを添加したSMN1del/del症例では、VPA単独添加と同様のFL-SMNと Δ 7-SMNの所見をしめした。

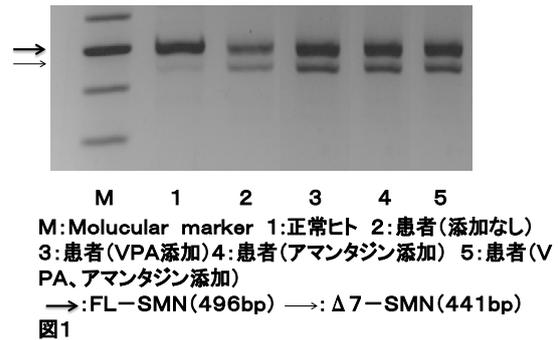
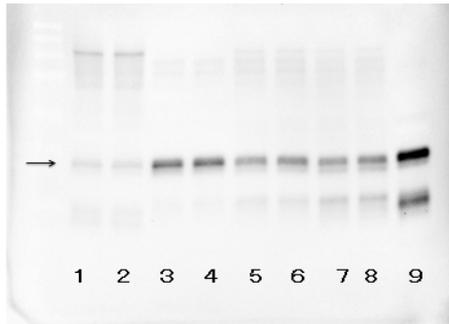


図1

SMN蛋白解析(図2)

SMN蛋白は正常ヒト線維芽細胞(図2のレーン9)に比べSMN1del/del症例(図2のレーン1および2)では著明に減少していた。VPAを添加したSMN1del/del症例(図2レーン3および4)は、薬剤を添加しないSMN1del/del症例に比べ優位にSMN蛋白は増加していた。塩酸アマンタジンを添加したSMN1del/del症例(図2のレーン5及び6)は、VPA添加に比べSMN蛋白の増加は少なかった。また、VPAとアマンタジンを添加したSMN1del/del症例(図2のレーン7および8)は、塩酸アマンタジン添加単独と同程度のSMN蛋白量を示した。これらのSMN transcript(図1)とSMN蛋白解析(図2)の結果は、SMN1del/del症例(SMAI)の培養線維芽細胞へのVPA添加はSMN transcriptの増加とSMN蛋白の増加を示したことは、VPA添加の有効性を示した。これは、過去の報告を支持した。SMN1del/del症例(SMAI)の培養線維芽細胞への塩酸アマンタジンの添加はSMN transcriptでは増加を示したが、SMN蛋白の増加はVPA程、優位に認めなく、塩酸アマンタジンの効果は否定的であった。今後、SMAに有効な日常診療に用いる薬剤の検討を予定している。



1, 2: 患者: 添加なし 3, 4: 患者(VPA添加)
5, 6: 患者(アマンタジン添加) 7, 8: 患者(VPA,
アマンタジン添加) 9: 正常ヒト → : SMN蛋白
図2

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Endo T, Baba T, Sugio A, Morishita M, Takahashi M, Akashi Y, Ishioka S, Tachi N. A myotonic dystrophy 1 patient complicated with placental adherence after miscarriage of one dichorionic diamniotic twin following her tenth in vitro fertilization and embryo transfer. Arch Gynecol Obstet 2012; 286: 1605-8. 査読 有
- 2) 二階堂弘輝, 舘 延忠 他. ラモトリギンの長期使用例の経験. 小児科臨床 2012; 65: 107-14. 査読 有
- 3) Tachi N, Takahashi S, Jo M, Shinoda M. A new mutation of GCH1 in triplets family with dopa-responsive dystonia. Eur J Neurol 2011;18:1191-3. 査読 有
- 4) Nikaido K, Tachi N, Ohya K, Wada T, Tsutsumi H. New mutation of CACNA1A gene in episodic ataxia type 2. Pediatr Int 2011 ;53:415-6 査読 有
- 5) 菊池真、小塚直樹、舘 延忠 他. 髄鞘形成期における初代培養ラット後根神経節細胞への組み換えアデノウイルスを用いた変異 MPZ cDNA の導入. 札幌医科大学保健医療学部紀要 2011;13:13-20. 査読 有
- 6) 堀本佳誉、菊池真、舘 延忠 他. Aprataxin 遺伝子変異(689insT)が培養ラット後根神経節の髄鞘形成に及ぼす影響について. 札幌医科大学保健医療学部紀要 2011;13:21-23. 査読 有
- 7) Kikuchi S, Ninomiya T, Kawamata T, Ogasawara N, Kojima T, Tachi N, et al. The acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) of ciliated cells in the developing rat nasal septum. Arch Histol Cytol 2010; 73:81-89. 査読 有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 舘 延忠. 脊髄性筋萎縮症の SMN 転写産物の検討. 第 21 回日本小児神経学会北海道地方会. 2013. 3. 23. 札幌.
- 2) 二階堂弘輝, 舘 延忠. 家族性片頭痛の 1 家系. 第 21 回日本小児神経学会北海道地方会. 2013. 3. 23. 札幌
- 3) 舘 延忠. 小児期発症のジストニア: Dopa-responsive dystonia (Segawa 病) を中心に. 第 20 回日本小児神経学会北海道地方会. 2012. 11. 17. 札幌.
- 4) 舘 延忠. 新しい GCH1 遺伝子を持つ Dopa-responsive dystonia の一卵性 3 つ子を含む一家系. 第 54 回日本小児神経学会. 2012. 5. 17-19. 札幌.
- 5) 二階堂弘輝, 舘 延忠. Marinesco-Sjogren 症候群の 22 歳女兒の 1 剖検例—心筋の微細構造を中心に—. 第 54 回日本小児神経学会. 2012. 5. 12.17-19. 札幌.
- 6) 舘 延忠. Myotubular myopathy の遺伝子診断. 第 53 回日本小児神経学会. 2011. 5. 22-24. 横浜.
- 7) 二階堂弘輝, 舘 延忠. 周期性失調症 2 型の 1 家系. 第 52 回日本小児神経学会. 2010. 5. 20-22. 福岡.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘 延忠 (TACHI NOBUTADA)
札幌医科大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：80136944

(2) 研究分担者

山下利春 (YAMASITA TOSIHARU)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50167706
菊池 真 (KIKUCHI SIN)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20404585
大屋一博 (OHYA KAZUHIRO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60438067

(3) 連携研究者

()

研究者番号：