

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：14501 研究種目：若手研究 B 研究期間：2011 ～ 2012 課題番号：23791175 研究課題名（和文）スプライシング可視化神経芽腫細胞を用いた脊髄性筋萎縮症治療法の開発 研究課題名（英文）Establishment of treatment for spinal muscular atrophy via splicing-visualized neuroblastoma cell line. 研究代表者 森川 悟（SATORU MORIKAWA） 神戸大学・大学院医学研究科・助教 研究者番号：50457074
--

研究成果の概要（和文）：

脊髄性筋萎縮症（SMA）患者の95%以上にSMN1遺伝子の欠失を認めている。SMN1遺伝子には相同性の高いSMN2遺伝子が存在するが、SMN2遺伝子ではスプライシング異常が起こり、機能的な全長型SMN蛋白をほとんど作れない。そこでスプライシング修正治療薬を探索するためにSMN2遺伝子のスプライシングを正しく評価する方法が必要である。今回未分化神経芽腫細胞株を用いたスプライシング評価システムの開発は困難であったが、それに代わる手法として、キャピラリー電気泳動装置によるフラグメント解析を用いて全長型とエクソン7欠失型のSMN2 mRNAを定量する事により、SMN遺伝子スプライシングを評価する方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

The survival motor neuron (SMN) gene is the disease-causing gene of SMA, and it exists as two nearly identical copies, SMN1 and SMN2. SMN1 is the critical gene involved in Spinal Muscular Atrophy (SMA), as more than 95% of SMA patients have SMN1 exon 7 homozygous deletions. SMN2 almost produces alternatively spliced transcripts that lack exon 7. To search candidate drugs correcting alternative splicing of SMN2, we have to establish the system which can accurately assess SMN2 splicing. We could establish the evaluation system of SMN splicing through a fragment analysis to determine the quantity of full-length SMN2 transcripts and a shorter isoform resulting from exon 7 skipping.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症(Spinal muscular atrophy: SMA)は脊髄前核細胞の変性に起因した神経筋疾患で、常染色体劣性遺伝形式をとる最も頻度の高い致死性の運動ニューロン病である。原因遺伝子として SMN 蛋白をコードする SMN1 遺伝子が同定されており、SMA 患

者の 95%以上に SMN1 遺伝子の欠失を認めている。SMN1 遺伝子の存在する 5q13.1 領域には同じ蛋白をコードする SMN2 遺伝子が存在する。しかし、SMN2 遺伝子はエクソン 7 に 1 塩基の違いを認め、これによりエクソン内スプライシング促進因子が阻害され、スプライシング異常が起こり、SMN2 遺伝子

は機能的な全長型 SMN 蛋白をほとんど作れない。

現在、SMA に対する根本的な治療薬は存在しないものの、治療戦略として SMN2 遺伝子エクソン7のスプライシング異常を修正し、全長型 SMN2 mRNA を増加させ、最終的に SMN 全長型 SMN 蛋白の増加を目指す試みが現在盛んに行われている。

2. 研究の目的

SMA の主病態は脊髄前核細胞の変性であり、SMA 治療薬が効果を発揮するには、神経幹細胞が運動ニューロンへと分化することによって神経ネットワークを修復する必要がある。治療薬の探索にあたっては、治療薬の投与による運動ニューロンの分化を評価することが重要である。

本研究では、ルシフェラーゼ遺伝子を含む SMN2 遺伝子のミニ遺伝子を導入した未分化神経芽腫細胞に候補薬剤を投与し、蛍光によってスプライシング効率を評価する一方、分化の程度の変化を分子マーカー標識法で評価する。

SMN2 遺伝子のスプライシングと運動ニューロンの分化を同時に評価するシステムは未だかつて報告されていない。本研究で投薬の有効性に関して包括的な評価を行えるシステムを確立することが、効率的な SMA 治療薬の探索や、SMA 治療薬の分子創薬へと繋がるものと思われる。

(1) SMA 治療薬の探索システムの基礎となる細胞株の確立

SMN2 遺伝子のエクソン 6-8 とルシフェラーゼ遺伝子で構成されるミニ遺伝子を作成し、本研究室が有している未分化神経芽腫細胞株へとミニ遺伝子をトランスフェクションすることにより、視覚的に mRNA の正しいスプライシングがおこっているか、正しく神経細胞が分化しているかを評価できる細胞株を確立する。

(2) スプライシング調節および神経細胞の分化の視覚的な評価システムの確立

顕微鏡での観察を行い、ルシフェラーゼ遺伝子の発光の強度により mRNA のスプライシングの評価を行うとともに、分子マーカー標識法を用いて未分化神経芽腫細胞の分化の評価を行う。また、全長型 SMN2 mRNA および SMN 蛋白の発現量の評価を PCR およびウエスタンブロッティングを用いて評価する。

(3) SMA 治療薬の探索システムを用いた脊髄性筋萎縮症の治療薬候補の探索

過去の文献を参考とし、治療薬の候補となりうる薬剤（バルプロ酸など）あるいは新規化合物（アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）を投与し、治療薬がスプライシング修復と運動ニューロンへの分化の両方の効果

を十分に認めるかどうかを評価する。

3. 研究の方法

(1) SMA 治療薬の探索システムの基礎となる細胞株の確立

mRNA の正しいスプライシングがおこっているか、正しく神経細胞が分化しているかを視覚的に評価できる細胞株を確立する。

まず、スプライシング修正を視覚的に評価するためのミニ遺伝子を作成し、ベクターに組み込む。ミニ遺伝子にはルシフェラーゼ遺伝子を組み込んでおく。全長型のスプライシングであればルシフェラーゼ遺伝子がインフレームになり蛍光するが、エクソン7をスキップした短縮型のスプライシングだとルシフェラーゼ遺伝子がアウトオブフレームとなり蛍光しないように設計する。

次に、申請者の所属する研究室が既に保有している、分化誘導により神経系細胞へと分化する未分化神経芽腫細胞株を使用する。作成したミニ遺伝子が組み込まれたベクターを、リポフェクション法を用いてこの未分化神経芽腫細胞株に導入し、細胞培養室で培養を行い、G418 によって安定発現細胞を選択する。

ミニ遺伝子が正しく導入されているか確認するために、培養した細胞株から gDNA を抽出し、ルシフェラーゼ遺伝子の有無を PCR 法を用いて確認する。

(2) スプライシング調節の定量的な評価システムの確立

① 健常成人 cDNA を用いた PCR による SMN 遺伝子のエクソン 6-8 の増幅
健常成人末梢血リンパ球由来の cDNA を用いて SMN 遺伝子のエクソン 6-8 の PCR 増幅を行う。その際、フォワードプライマーには FAM 標識したものをを用いる。スプライシングを評価するのに最適なサイクル数を決定するため、PCR のサイクル数は 36、38、40、42、44 サイクルの 5 条件で行う。PCR 産物は 179bp の全長型 SMN mRNA (FL-SMN) と 125bp のエクソン7欠失型 SMN mRNA (Δ 7-SMN) の二種類が同時に増幅される。電気泳動でこれらのサイズの PCR 産物が得られていることを確認する。

② フラグメント解析によるスプライシングの定量的評価

①で得られた PCR 産物を使用し、Applied Biosystems 社のキャピラリー電気泳動装置 ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer のフラグメント解析による定量的な評価を行う。まず、サイクル数毎にターゲットサイズ (FL-SMN、 Δ 7-SMN) のピークの面積を求める。次にスプライシングを評価する指標として FL-SMN のピーク面積と Δ 7-SMN のピーク面積の比 (FL/ Δ 7) を求め、最適な PCR サイクル数を

決定する。

③ バルプロ酸 (VPA) 治療を行った SMA 患者の末梢血リンパ球由来 cDNA 検体を用いたスプライシング評価

②で確立した評価方法を使用し、SMA の治療目的に VPA 投与を行った SMA 患者の末梢血リンパ球由来の cDNA (投与前、投与後 1 か月、投与後 3 か月) を用いてスプライシング評価を行う。VPA 投与は、通常のでんかん治療の方法と同様に、VPA 血中濃度を至適域 (血中トランプ値 50~100 μ g/ml) に保つように投与する。

4. 研究成果

(1) SMA 治療薬の探索システムの基礎となる細胞株の確立

SMN2 遺伝子のホモ接合性欠失を有する SMA 患者の gDNA と、SMN1 遺伝子のホモ接合性欠失を有する健常成人の gDNA とホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むベクター (pGL3 ベクター) を使用した。

まず、エクソン 7 がスキップするとルシフェラーゼ遺伝子が out of frame になり、エクソン 7 が挿入したときのみ in frame になって蛍光が得られるようなミニ遺伝子の作成を行った。ベクターへのミニ遺伝子のサブクローニングの妨げとなる、長大なイントロン 6 の配列を短縮するため、まず、SMN 遺伝子エクソン 6 からイントロン 6 上流の PCR による増幅を行った。次に、イントロン 6 下流からエクソン 7 の PCR による増幅を行った。その際、次に行うオーバーラッピング PCR の際にのりしろとなるイントロン 6 の上流の配列をフォワードプライマーに付加し、エクソン 7 のストップコドンを壊すためにエクソン 7 の 1 塩基をスキップするようにリバースプライマーを設計した。この 2 つの PCR 産物をテンプレートとしてオーバーラッピング PCR を行い、イントロン 6 の配列を大幅に短縮させたエクソン 6-7 の PCR 産物を得た (鋳型 DNA ①)。

次にエクソン 7-エクソン 8 の PCR を行った (鋳型 DNA ②)。フォワードプライマーはのちに行うオーバーラップ PCR ののりしろとなるように、鋳型 DNA ①のリバースプライマーと相補的になるように設計した。

また、pGL3 ベクターを使用して、ルシフェラーゼ遺伝子の PCR を行った (鋳型 DNA ③)。鋳型 DNA ②のリバースプライマーと相補的になるようにフォワードプライマーに SMN 遺伝子エクソン 8 の配列を付加した。

これらの鋳型 DNA ①-③を使用してオーバーラッピング PCR を行い、目的のミニ遺伝子を作成した。この遺伝子を pCI-neo ベクターへとサブクローニングした。

次にこのミニ遺伝子の未分化神経芽腫細胞へのトランスフェクションを試みた。しかしながら安定発現細胞の樹立が困難であり、残念ながら治療効果の評価システムとして実用性に乏しいものであった。

(2) スプライシング調節の定量的な評価システムの確立

① 健常成人 cDNA を用いた PCR による SMN 遺伝子のエクソン 6-8 の増幅

まず、適切な PCR 条件を決定するために、健常成人末梢血リンパ球由来の cDNA (100ng) を用いて SMN 遺伝子のエクソン 6-8 の PCR 増幅を行った。PCR 産物をフラグメント解析に用いるために、フォワードプライマーには FAM 標識したものを用いた。スプライシングを評価するのに最適なサイクル数を決定するため、PCR のサイクル数は 36、38、40、42、44 サイクルの 5 条件で行い、PCR 産物を 1% アガロースゲルを用いて 100V、20 分で電気泳動を行った。電気泳動にて目的の PCR 産物 (179bp の FL-SMN と 125bp の Δ 7-SMN) の 2 種類が同時に増幅されていることを確認できた。FL-SMN のバンドの太さが 42 サイクルと 44 サイクルでほぼ同じであり、PCR 増幅がプラトーとなっている可能性が示唆された (図 1)。

(図 1) 電気泳動結果

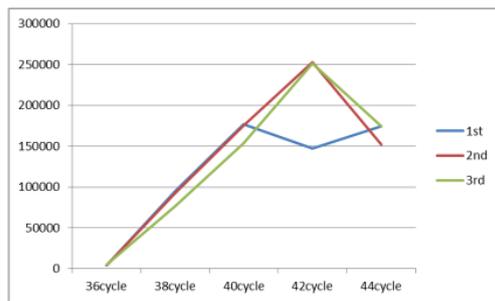


② フラグメント解析によるスプライシングの定量的評価

次に、この PCR 産物を使用し、Applied Biosystems 社のキャピラリー電気泳動装置 ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer のフラグメント解析によって定量的な評価を行った。Size standard には Applied Biosystems 社の GeneScan™ 500 TAMRA™ Size Standard を用いた。まずサイクル数毎に FL-SMN、 Δ 7-SMN のピークの面積を求めた。次にスプライシングを評価する指標として FL/ Δ 7 を計算した。測定時に誤差が生じる可能性を考慮し、同じ条件で 3 回実験を繰り返した。

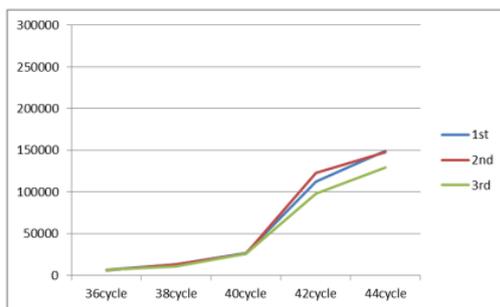
FL-SMN では、42-44 サイクルで PCR がプラトーとなっていることが判明した。これは電気泳動の結果と矛盾しないものであった。FL-SMN からは、スプライシング評価に用いる PCR サイクル数は 42 サイクル以下が望ましいと考えられた (図 2)。

(図2) FL-SMN



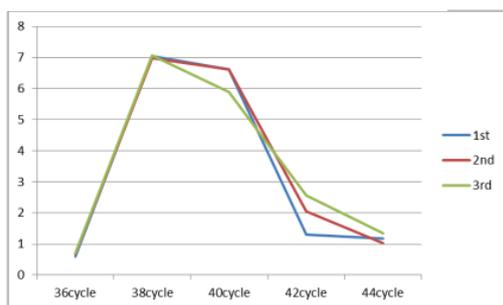
次に $\Delta 7$ -SMN の解析を行った $\Delta 7$ -SMN の解析では、PCR 増幅はプラトーとはならなかった (図3)。

(図3) $\Delta 7$ -SMN



スプライシング評価のために FL/ $\Delta 7$ の計算を行ったところ、38 サイクルから 40 サイクルの間でプラトーとなった。36 サイクルで低値を取ったのは PCR 増幅が不十分であり、FL-SMN と $\Delta 7$ -SMN の間の蛍光強度の差がつかなくなったものと思われた。また、42 サイクル以上で FL/ $\Delta 7$ が低値を取ったのは FL-SMN の PCR 増幅がプラトーとなってしまったためと考えられた (図4)。

(図4) FL/ $\Delta 7$



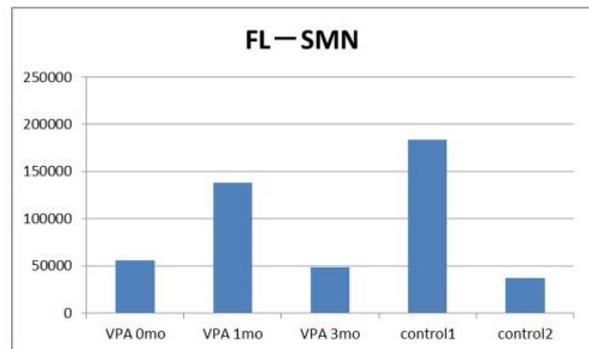
③ VPA 治療を行った SMA 患者の末梢血リンパ球由来 cDNA 検体を用いたスプライシング評価

②で確立した評価方法を使用し、SMA の治療目的に VPA 投与を行った SMA 患者 (5 歳女児、SMA type2、SMN 遺伝子欠失、SMN2 遺伝子 3 コピー) の末梢血リンパ球由来の cDNA

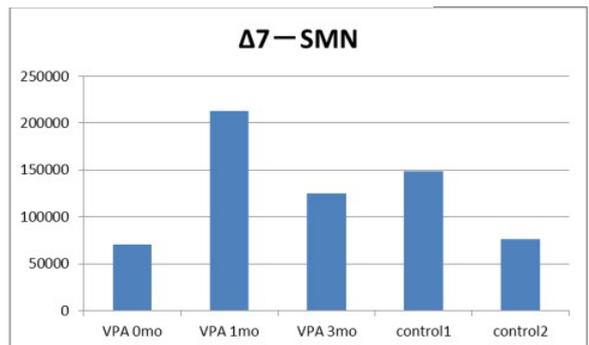
を用いてスプライシング評価を行った。VPA 投与は、通常のでんかん治療の方法と同様に、VPA 血中濃度を至適域(血中トラフ値 50~100 $\mu\text{g/ml}$) に保つように投与した。スプライシング評価は、投与前、投与後 1 か月、投与後 3 か月の 3 点で行った。

FL-SMN、 $\Delta 7$ -SMN はともに VPA 投与後 1 か月で発現の増加を認めたが、VPA 投与後 3 か月には低下傾向を認めた。(図5, 6)

(図5) FL-SMN

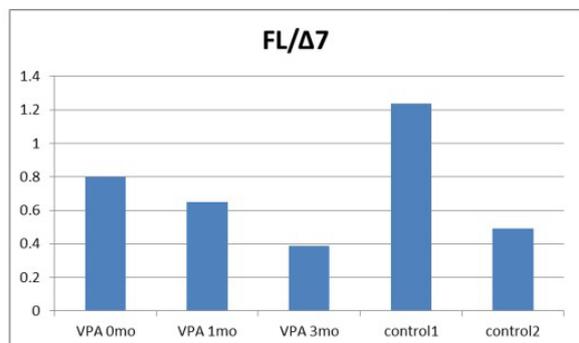


(図6) $\Delta 7$ -SMN



FL/ $\Delta 7$ は、VPA 投与後低下傾向を認めた。このことから、VPA は SMN2 遺伝子の発現を促進するものの、スプライシング調節には関与しない事が示唆された (図7)。

(図7) FL/ $\Delta 7$



2012 年に Harahap らは SMA 患児の皮膚線維芽細胞を用いた研究で VPA 酸投与によって FL-SMN の発現が増加するものの、 $\Delta 7$ -SMN の発現も増加し、FL/ $\Delta 7$ は不変であったと報告

している。今回の研究の結果は Harahap らの報告と矛盾しないものであった。

以上の事から、この評価方法はスプライシング評価に有用であり、治療薬による効果判定の際に使用可能であると考えられた。

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 3 件)

- ① Harahap NI, Harahap IS, Kaszynski RH, Nurputra DK, Hartomo TB, Pham HT, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Rusdi I, Widiastuti R, Nishio H. Spinal muscular atrophy patient detection and carrier screening using dried blood spots on filter paper. Genet Test Mol Biomarkers. 査読有, 2012, 16:123-129
- ② Harahap IS, Saito T, San LP, Sasaki N, Gunadi, Nurputra DK, Yusoff S, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Lee MJ, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Valproic acid increases SMN2 expression and modulates SF2/ASF and hnRNPA1 expression in SMA fibroblast cell lines. Brain Dev. 査読有, 2012, 34:213-222
- ③ Morikawa S, Harahap IS, Kaszynski RH, Yamamoto T, Pramudya DK, Pham HT, Hartomo TB, Lee MJ, Morioka I, Nishimura N, Yokoyama N, Ueno Y, Matsuo M, Nishio H. Diagnosis of spinal muscular atrophy via high-resolution melting analysis symmetric polymerase chain reaction without probe: a screening evaluation for SMN1 deletions and intragenic mutations. Genet Test Mol Biomarkers. 査読有, 2012, 15:677-684.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 寶田 徹, 近江 昇一, 竹内 敦子, Nurputra Dian Kesuma Pramudya, 森川 悟, 西尾 久英. 脊髄性筋萎縮症患者の SMNプロモーター領域における転写活性. 日本薬学会第 132 年会. 2012. 3. 28-31. 札幌
- ② 森川 悟, 中川 卓, 富永 康仁, 沖永 剛志, 西村 範行, 竹島 泰弘, 松尾 雅文, 西尾 久英. SMN2 遺伝子量解析による予測よりも軽症の経過をとった脊髄性筋萎縮症患者に対するプロモーター解析. 第 54 回日本小児神経学会総会. 2012. 5. 17-19. 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 悟 (MORIKAWA SATORU)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50457074