

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08197

研究課題名(和文) 乾燥濾紙血を用いた脊髄性筋萎縮症スクリーニング・システムの開発

研究課題名(英文) Development of Newborn Screening System for Spinal Muscular Atrophy

研究代表者

西尾 久英(Nishio, Hisahide)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：80189258

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)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は、日本で非常に高い頻度で発生する遺伝性の運動ニューロン疾患である。本研究の目的は、乾燥濾紙血液を用いたSMAの診断検査システムを構築し、SMAの新生児スクリーニングに応用することである。本研究で以下の成果が得られた。(1)研究者らは、乾燥濾紙血検体を用いたSMN1遺伝子欠失スクリーニング法を開発した。(2)研究者らは、SMN1遺伝子内変異検出法を開発した。(3)研究者らは、SMA新生児スクリーニング検査における偽陽性の原因を解明し、新生児疾患の治療に使用されるヘパリンに関連していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy: SMA)は、全身の筋萎縮と筋力低下を主症状とする遺伝性運動ニューロン病である。発生頻度は1～2万出生に1人と高く、保因者頻度は50～7人あたり1人と予測されている。1995年に染色体5q13領域のSMN1遺伝子が疾患遺伝子であることが報告され、その後の研究でSMN1遺伝子の近傍に存在するSMN2遺伝子が重症度を規定する遺伝子であることが明らかになった。最近、有効な治療薬が開発されて、しかも早期治療が有効であることが明らかになった。SMAは、臨床症状だけで診断するのが困難である。早期診断のシステム構築が喫緊の課題となった。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is a hereditary motor neuron disease that occurs very frequently in Japan. The purpose of this study is to establish a diagnostic test system for SMA using dried filter paper blood and apply it to newborn screening for SMA. The following results were obtained in this research. (1) We developed a screening method for SMN1 gene deletion using dried blood on filter paper. (2) We developed a method for detecting SMN1 intragenic mutations. (3) We have elucidated the cause of false positives in the SMA newborn screening test and found that they are related to heparin, which is used to treat neonatal disease.

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 乾燥血液ろ紙検体 SMN1遺伝子欠失 SMN1遺伝子内変異

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) は、全身の筋萎縮と筋力低下を主症状とする遺伝性運動ニューロン病である。発生頻度は1~2万出生に1人と高く、保因者頻度は50~7人あたり1人と予測されている。1995年に染色体5q13領域のSMN1遺伝子が疾患遺伝子であることが報告され、その後の研究でSMN1遺伝子の近傍に存在するSMN2遺伝子が重症度を規定する遺伝子であることが明らかになった。これまで有効な治療法がない疾患であったが、最近、SMN2遺伝子のスプライシングを修正するアンチセンスオリゴヌクレオチド製剤 (スピラザ®、バイオジェン社) が導入され、SMA患者の生命予後、運動予後の改善が見込まれるようになった。

SMN1遺伝子の異常に基づくSMAは、臨床症状だけで診断するのが困難である。乳児期・小児期のSMAは、筋緊張低下あるいは運動発達遅延を示す他疾患と類似の症状を示すからである。特に、乳児期のPrader-Willi症候群や筋強直性ジストロフィー、小児期の遺伝性運動感覚ニューロパチーとの鑑別は困難である。また、成人期のSMAについても、筋力低下を示す他の神経・筋疾患と臨床的に鑑別することは容易でない。特に、肢帯型筋ジストロフィーや球脊髄性筋萎縮症の症状は、SMAと区別が難しい。そのため、SMAは、神経・筋疾患の専門家であっても誤診することは稀ではなかった (誤診症例)。

申請者の調査では、1型患者 (生後6か月までに発症) 59例の平均検査時月齢は19.4か月 (標準偏差49.4か月, 検査時年齢の最高齢者は19歳) 2型患者 (生後1歳6か月までに発症) 33例の平均検査時年齢は16.3歳 (標準偏差17.2歳, 検査時年齢の最高齢者は44歳) であった。診断遅延症例には、それまでSMAが見逃されていた症例も含まれる (西尾ら B10 Clinica(2018)33:70-73)。

現在のSMAの問題点は「診断」である。上述したように、SMAでは、誤診症例、疾患見逃し例、診断遅延例が数多く存在している。しかし、有効な治療を提供するためには、正確な診断が必要である。また、新規治療薬の治験の結果によれば、乳児期早期に治療を開始した患者ほど生命予後も、運動予後も良かった。新生児期・乳児期早期から治療を開始するためには、迅速な診断も必要である。

SMAのような難病・希少疾患に苦しむ人に対して、遅滞なく適切な診断・治療が提供されることが喫緊の課題であることから、申請者らは、正確かつ迅速な診断システムを構築することを考えた。そして、その診断システムを、現行の乾燥濾紙血を使った新生児スクリーニングに応用すれば、新生児期においてもSMA診断が可能になると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は「乾燥濾紙血を用いたSMAスクリーニング・システムの開発」である。乳児期早期にスピラザ®治療が開始された群は、治療開始が遅れた群と比較して、生命予後も、運動予後も良かった。早期治療の重要性が明らかになった現在、診断の遅延は許されなくなった。しかも、前述したとおり、SMAは臨床症状だけで診断するのが困難である。これらのことから、SMAの新生児スクリーニング・システムの確立は喫緊の課題となっている。

3. 研究の方法

(1) 新規 DNA スクリーニング・システムの完成：乾燥濾紙血検体から DNA を抽出せずに、パンチした濾紙をそのまま PCR チューブに入れ、リアルタイム PCR 法にて SMN1 遺伝子増幅を行う。方法論の妥当性は、SMA 患者検体を用いて検討した。

(2) SMN1 遺伝子内変異検出法の開発と遺伝子内変異の疾患関連性の評価：SMN1 遺伝子内変異を検出するアルゴリズムを開発した。また、SMN1 遺伝子内変異を含むミニ遺伝子を構築し、それを使用して細胞実験を実行した。

(3) 新生児スクリーニングの社会実装：SMA の家族歴の有無とは無関係に、SMA 患者を発見する。ここでは、従来の先天代謝異常スクリーニングと同じように考え、新生児全体をカバーするようなスクリーニングを目指す。

4. 研究成果

(1) 新たな SMN1 遺伝子欠失スクリーニング法の開発：乾燥濾過血液を用いた新たなスクリーニング法を開発した。この方法では、SMN1 遺伝子と CFTR 遺伝子を同時に増幅し、増幅産物の融解曲線解析により SMN1 遺伝子の欠失を検出する。

(2) SMN1 遺伝子内変異検出法の開発と遺伝子内変異の疾患関連性の評価：SMN1 遺伝子内変異を検出するアルゴリズムを開発した。また、SMN1 遺伝子内変異を含むミニ遺伝子を構築し、それを使用して細胞実験を実行した。変異ミニ遺伝子から作られたタンパク質の安定性や内因性 SMN タンパク質との親和性を調査し、変異の種類と臨床症状との関係を検討した。

(3) SMA 新生児スクリーニングの社会実装：SMA の新生児スクリーニング検査 (SMA-NBS) が 2021 年に神戸市と兵庫県 (研究者が居住し研究活動を行っている地域) で開始された。研究者らは、SMA-NBS の偽陽性の原因を解明し、新生児疾患の治療に使用されるヘパリンに関連していることも発見した。

(4) 研究成果の発表：以上の研究結果はすべて論文として発表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wijaya YOS, Nishio H, Niba ETE, Shiroshita T, Kato M, Bouike Y, Tode C, Ar Rochmah M, Harahap NIF, Nurputra DK, Okamoto K, Saito T, Takeuchi A, Lai PS, Yamaguchi S, Shinohara M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Dried Blood Spot Screening System for Spinal Muscular Atrophy with Allele-Specific Polymerase Chain Reaction and Melting Peak Analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genet Test Mol Biomarkers	6. 最初と最後の頁 293-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/gtmb.2020.0312.	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 該当する
1. 著者名 Wijaya YOS, Nishio H, Niba ETE, Okamoto K, Shintaku H, Takeshima Y, Saito T, Shinohara M, Awano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Detection of Spinal Muscular Atrophy Patients Using Dried Saliva Spots.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 1621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12101621.	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 該当する
1. 著者名 Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Ar Rochmah M, Takarada T, Takeuchi A, Kimizu T, Okamoto K, Saito T, Awano H, Takeshima Y, Shinohara M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Stability and Oligomerization of Mutated SMN Protein Determine Clinical Severity of Spinal Muscular Atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13020205.	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 該当する
1. 著者名 Kimizu T, Ida S, Okamoto K, Awano H, Niba ETE, Wijaya YOS, Okazaki S, Shimomura H, Lee T, Tominaga K, Nabatame S, Saito T, Hamazaki T, Sakai N, Saito K, Shintaku H, Nozu K, Takeshima Y, Iijima K, Nishio H, Shinohara M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Spinal Muscular Atrophy: Diagnosis, Incidence, and Newborn Screening in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Neonatal Screen.	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijns7030045.	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 Wijaya Yogik Onky Silvana, Nishio Hisahide, Niba Emma Tabe Eko, Shiroshita Tomoyoshi, Kato Masako, Bouike Yoshihiro, Tode Chisato, Ar Rochmah Mawaddah, Harahap Nur Imma Fatimah, Nurputra Dian Kesumapramudya, Okamoto Kentaro, Saito Toshio, Takeuchi Atsuko, Lai Poh San, Yamaguchi Seiji, Shinohara Masakazu	4. 巻 25
2. 論文標題 Dried Blood Spot Screening System for Spinal Muscular Atrophy with Allele-Specific Polymerase Chain Reaction and Melting Peak Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetic Testing and Molecular Biomarkers	6. 最初と最後の頁 293 ~ 301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/gtmb.2020.0312	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 該当する

1. 著者名 Wijaya Yogik Onky Silvana, Purevsuren Jamiyan, Harahap Nur Imma Fatimah, Niba Emma Tabe Eko, Bouike Yoshihiro, Nurputra Dian Kesumapramudya, Rochmah Mawaddah Ar, Thursina Cempaka, Hapsara Sunartini, Yamaguchi Seiji, Nishio Hisahide, Shinohara Masakazu	4. 巻 6
2. 論文標題 Assessment of Spinal Muscular Atrophy Carrier Status by Determining SMN1 Copy Number Using Dried Blood Spots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Neonatal Screening	6. 最初と最後の頁 43 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijns6020043	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 該当する

1. 著者名 Wijaya Yogik Onky Silvana, Nishio Hisahide, Shinohara Masakazu et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Phenotypes of SMA patients retaining SMN1 with intragenic mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	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) 10.1016/j.braindev.2021.03.006	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 Noguchi Yoriko, Bo Ryosuke, Nishio Hisahide et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 PCR-Based Screening of Spinal Muscular Atrophy for Newborn Infants in Hyogo Prefecture, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 2110 ~ 2110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13112110	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------