

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08259

研究課題名(和文) 濾紙血中のSMNタンパク測定による脊髄性筋萎縮症の新生児スクリーニング

研究課題名(英文) Neonatal screening for spinal muscular atrophy by measuring SMN protein in dried blood spots

研究代表者

中村 公俊 (Nakamura, Kimitoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：30336234

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、脊髄の前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を呈する疾患であるが、発症の早期から治療を行うことで筋症状の改善が認められるようになった。SMAでは、qPCR法を用いた新生児スクリーニング法が開発されているが、遺伝子診断を用いたスクリーニングであるため、倫理的な課題が多い。われわれは新生児スクリーニング用の濾紙血を用いて、SMN蛋白を測定する方法を開発した。そして濾紙血検体を用いたSMN蛋白測定による新生児期のSMAのスクリーニングを実施した。この検査によって、実際に新生児スクリーニングにおいてSMA患者を発見し、早期治療として遺伝子治療を行うことができた。

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、遺伝子治療薬の開発も進んでおり、生後早期に治療をおこなうと、歩行が可能なまでに発達できることが分かってきた。このSMAでは、qPCR法を用いた新生児スクリーニング法が開発されているが、遺伝子診断を用いたスクリーニングであるため、倫理的な課題は多く、産科施設で説明をおこなってスクリーニングをおこなうには解決すべき点が多い。本研究によって本症の早期診断と新生児期のスクリーニングを可能にし、適切な治療時期の検討を行うことで、SMAの早期診断と治療の意義を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is a disease that presents with muscle atrophy and progressive muscle weakness due to degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord. For SMA, a newborn screening method using qPCR has been developed, but there are many ethical issues because it is screening using genetic diagnosis. We have developed a method to measure SMN protein using filter paper blood for neonatal screening. Then, neonatal SMA was screened by measuring SMN protein using filter paper blood samples. This test actually identified SMA patients during newborn screening and allowed gene therapy to be used as an early treatment.

研究分野：新生児スクリーニング

キーワード：新生児スクリーニング SMN蛋白

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(SMA)は、脊髄の前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を呈する疾患であり、体幹、四肢の近位部優位の筋力低下、筋萎縮を示す (Finkel RS, Neurology 2014)。発症年齢、臨床経過に基づき、I型、II型、III型、IV型に分類され、I、II型の95%にSMN1遺伝子欠失を認める。重症例は人工呼吸管理を行わなければ1歳までに死に至る(Kolb SJ, Ann Neurol 2017)。最近、アンチセンスオリゴ核酸薬による治療が可能となり、発症の早期から治療を行うことで筋症状の改善が認められるようになった(Finkel RS, N Eng J Med 2017)。さらに、遺伝子治療薬の開発も進んでいる(Mendell JR, N Eng J Med 2017)。生後早期にこれらの治療をおこなうと、歩行が可能にまで発達できることが分かってきた。このSMAでは、qPCR法を用いた新生児スクリーニング法が開発されているが、遺伝子診断を用いたスクリーニングであるため、倫理的な課題は多く、産科施設で説明をおこなってスクリーニングをおこなうには解決すべき点が多い。

2. 研究の目的

脊髄性筋萎縮症(SMA)は神経筋疾患の一つで、SMN1蛋白の欠損が原因である。このSMN1蛋白をコードしているSMN1遺伝子 (MIM 600354)の変異によって発症し、常染色体劣性遺伝形式を示す。発症時期および症状によってI型からIV型に分類されており、I型：重症型(Werdnig-Hoffmann病)、II型：中間型(Dubowitz病)、III型：軽症型(Kugelberg-Welander病)、IV型：成人期以降の発症とされている。特にI型では、出生直後から生後6か月以内に発症し、定額の獲得がなく、哺乳困難や呼吸不全、舌の線維束性収縮を認める。人工呼吸管理を行わなければ生後6~9か月で死亡する。SMAでは、このI型の頻度が高いと考えられており、その95%はエクソン7領域を含む遺伝子の欠失であることが分かっている。そのため、qPCR法による遺伝子診断が確定診断として確立している。生後早期~数か月でフロッピーインファントとして本症を疑われ、遺伝子解析により診断できるものの、確定診断までに時間を要し、生後早期の治療介入は困難である。最近、アンチセンスオリゴ核酸薬や遺伝子治療薬による治療が可能となり、発症の早期から治療を行うことで筋症状の改善が認められるようになった。特に生後早期に治療をおこなうと、歩行が可能にまで発達できることが分かってきた。

本症の確定診断には遺伝子解析が有用である。出生後の健診でフロッピーインファントと診断された場合や、体幹、四肢の近位部優位の筋力低下、筋萎縮などの臨床症状をきたして小児科を受診した場合には、説明と同意に基づいたSMN1遺伝子解析により確定診断をおこなう。しかし、確定診断までに症状が進行している場合は、治療をおこなっても救命できない症例や、神経症状の改善が乏しい症例も認められる。SMAの治療は、これまでは対症的なものとして人工呼吸器管理、在宅医療などが行われてきた。2018年にSMN2 mRNA前駆体を標的としたアンチセンスオリゴ核酸薬による、完全長の機能性SMNタンパク質の産生を増加させる治療が国内承認された。このアンチセンスオリゴ核酸薬は、SMN2 mRNA前駆体のイントロン7にあるイントロン・スプライシング・サイレンサーN1に特異的に結合し、エクソン7の含有を阻害するスプライシング因子と置き換わることで、SMN2 mRNAにエクソン7が含まれるようになることを利用したものである。この治療を早期に行うと、運動ニューロンの変性・消失を防ぐことができ、I型のSMAであっても、人工呼吸器管理が不要となり、座位や歩行の獲得まで可能になるとされている。

ところが、本症の治療は十分に早期に診断することが必要であり、新生児スクリーニングによ

で診断された本症の治療を、生後2週間程度までに開始することが、予後の改善には必須であることが分かってきた。そのため、qPCR法を用いた本症の遺伝子スクリーニングが試みられている。新生児スクリーニングを先行実施している米国、台湾では本検査の有用性が確認されている。しかし、遺伝子を解析する新生児スクリーニングを、十分な説明と同意に基づいて産科施設で実施することは容易ではなく、治療法もスクリーニング法も確立している本症の早期診断がなかなか拡大しない大きな要因となっている。

われわれは、新生児スクリーニング用の濾紙血を用いて、SMN蛋白を測定する方法を開発した(特許出願準備中)。本研究では、従来のqPCR法によって生じる倫理的な課題を解決し、濾紙血検体を用いたSMN蛋白量測定による新生児期のSMAのスクリーニングをおこなう。すなわち、遺伝子解析を用いた新生児スクリーニングでは、産科施設で説明と同意に基づいた遺伝子解析を新生児スクリーニングとして実施しなければならない。この検査によって、本症の早期診断と新生児期のスクリーニングを可能にし、適切な治療時期の検討を行うことで、SMAの疾患概要を明らかにする。

3. 研究の方法

われわれが開発したSMN蛋白量測定法では、ELISA法を用いて血液中のSMN1蛋白を測定する。この方法は従来の先天性甲状腺機能低下症におけるTSH測定と同様の原理を用いており、産科施設における説明も比較的容易である。もちろん、遺伝学的検査としての新生児スクリーニングであるため、ご両親の希望があれば遺伝カウンセリングの実施を求められる場合がある。しかし遺伝子解析をおこなう新生児スクリーニングと比較すると、産科施設における説明ははるかに容易であると考えられる。

予備実験において、我々は既にqPCR法によるSMAスクリーニングと、ELISA法によるスクリーニングを試みている。qPCR法では、濾紙血の検体から直接qPCRをおこない、SMAI型患者と正常者とを容易に区別することができる。さらに、われわれが開発した濾紙血抽出-ELISA法を用いて、4件の患者検体と1,629件の新生児検体とを測定したところ、それらを容易に区別することができた(図1)。SMN1蛋白の測定値は、新生児検体の平均が34.6pg/disk (min-max 8.76-170.5 pg/disk)、4件の患者検体の測定値は、患者A:3.14、患者B:5.72、患者C:2.71、患者D:3.31 (pg/disk)であり、新生児検体の最低値である8.76 pg/diskと容易に区別することができた。また、カットオフ値を<10 pg/diskと設定した場合に、陽性率は0.31%(5/1,629)であり、再検査、精密検査を迅速に進めることで、新生児スクリーニングの実施が可能な値であると考えられた。実際に新生児スクリーニングをおこなう際には、測定結果は新生児マススクリーニングの実施施設を通じて、産科施設から保護者へと報告され、精密検査の対象者は熊本大学病院小児科外来を受診していただき、診察および遺伝子解析をおこなって、確定診断をおこなう。そしてフロップインファントとして既に発症が考えられるSMAI型乳児型では早期治療の適応と治療開始時期を決定する。精密検査や重症例に対する治療は、通常の保険診療によりおこなわれる。本研究により、SMAの早期診断と新生児期のスクリーニングを可能にし、適切な治療時期の検討を行うことで、脊髄性筋萎縮症の疾患概要を明らかにし、効果的なスクリーニングを実施し、患者発見から診断、治療までを迅速かつ効率的に行う医療体制を構築する。

4. 研究成果

脊髄性筋萎縮症(SMA)は、脊髄の前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を呈する疾患であり、体幹、四肢の近位部優位の筋力低下、筋萎縮を示す。発症年齢、臨床経過に基づき、I型、

II 型、III 型、IV 型に分類され、I、II 型の 95% に SMN1 遺伝子欠失を認める。重症例は人工呼吸管理を行わなければ 1 歳までに死に至る。最近、アンチセンスオリゴ核酸薬による治療が可能となり、発症の早期から治療を行うことで筋症状の改善が認められるようになった。さらに、遺伝子治療薬の開発も進んでいる。生後早期にこれらの治療をおこなうと、歩行が可能にまで発達できることが分かってきた。この SMA では、qPCR 法を用いた新生児スクリーニング法が開発されているが、遺伝子診断を用いたスクリーニングであるため、倫理的な課題は多く、産科施設で説明をおこなってスクリーニングをおこなうには解決すべき点が多い。われわれは、新生児スクリーニング用の濾紙血を用いて、SMN 蛋白を測定する方法を開発した（特許出願準備中）。本研究では、従来の qPCR 法によって生じる遺伝子解析による偶発的所見や病型診断といった倫理的な課題を解決することを試みた。そして濾紙血検体を用いた SMN 蛋白測定による新生児期の SMA のスクリーニングを実施した。この検査によって、実際に新生児スクリーニングにおいて SMA 患者を発見し、早期治療として遺伝子治療を行うことができた。本研究によって本症の早期診断と新生児期のスクリーニングを可能にし、適切な治療時期の検討を行うことで、SMA の早期診断と治療の意義を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sawada J, Nakagawa N, Kano K, Saito T, Katayama T, Sawada T, Momosaki K, Nakamura K, Hasebe N	4. 巻 60(12)
2. 論文標題 Characteristics of Neurological Symptoms in Adult Japanese Patients with Fabry Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 1819-1826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.6420-20.	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 Naramura T, Imamura H, Yoshimatsu H, Hirashima K, Irie S, Inoue T, Tanaka K, Mitsubuchi H, Nakamura K, Iwai M	4. 巻 118(1)
2. 論文標題 The Predictive Value of Procalcitonin and High-Sensitivity C-Reactive Protein for Early Bacterial Infections in Preterm Neonates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neonatology	6. 最初と最後の頁 28-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512523	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 Hama R, Kido J, Sugawara K, Nakamura T, Nakamura K	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Hyperprolinemia type I caused by homozygous p.T466M mutation in PRODH.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Genome	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） 10.1038/s41439-021-00159-5.	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 Sawada T, Kido J, Sugawara K, Momosaki K, Yoshida S, Kojima-Ishii K, Inoue T, Matsumoto S, Endo F, Ohga S, Hirose S, Nakamura K	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Current status of newborn screening for Pompe disease in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis	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） 10.1186/s13023-021-02146-z.	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 Kinoshita Y, Momosaki K, Matsumoto S, Murayama K, Nakamura K	4. 巻 64(1)
2. 論文標題 Severe metabolic acidosis with cardiac involvement in DNML-related mitochondrial encephalopathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 e14879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14879.	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 Kido J, Haberle J, Sugawara T, Tanaka T, Nagao M, Sawada T, Wada Y, Numakura C, Murayama K, Watanabe Y, Kojima-Ishii K, Sasai H, Kosugiyama K, Nakamura K	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical manifestation and long-term outcome of citrin deficiency: Report from a nationwide study in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Inherit Metab Dis.	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) 10.1002/jimd.12483. Online ahead of print.	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 Sawada T, Kido J, Sugawara K, Yoshida S, Matsumoto S, Shimazu T, Matsushita Y, Inoue T, Hirose S, Endo F, Nakamura K	4. 巻 -
2. 論文標題 Newborn screening for Gaucher disease in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep.	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.ymgmr.2022.100850.	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 Sawada Takaaki, Kido Jun, Nakamura Kimitoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Newborn Screening for Pompe Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Neonatal Screening	6. 最初と最後の頁 31~31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijns6020031	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 Kido Jun, Nakamura Kimitoshi, Era Takumi	4. 巻 108
2. 論文標題 Role of induced pluripotent stem cells in lysosomal storage diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103540 ~ 103540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2020.103540	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 Sawada Takaaki, Kido Jun, Sugawara Keishin, Matsumoto Shirou, Takada Fumio, Tsuboi Kazuya, Ohtake Akira, Endo Fumio, Nakamura Kimitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Detection of novel Fabry disease associated pathogenic variants in Japanese patients by newborn and high risk screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1502	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 Yoshida Shinichiro, Kido Jun, Sawada Takaaki, Momosaki Ken, Sugawara Keishin, Matsumoto Shirou, Endo Fumio, Nakamura Kimitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Fabry disease screening in high-risk populations in Japan: a nationwide study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 e220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13023-020-01494-6	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 Nakamura Kimitoshi, Kawashima Satoshi, Tozawa Hiroataka, Yamaoka Mariko, Yamamoto Tatsuyoshi, Tanaka Noboru, Yamamoto Ryuji, Okuyama Torayuki, Eto Yoshikatsu	4. 巻 130
2. 論文標題 Pharmacokinetics and pharmacodynamics of JR-051, a biosimilar of agalsidase beta, in healthy adults and patients with Fabry disease: Phase I and II/III clinical studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 215 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2020.04.003	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 Sawada Takaaki, Kido Jun, Yoshida Shinichiro, Sugawara Keishin, Momosaki Ken, Inoue Takahito, Tajima Go, Sawada Hirotake, Mastumoto Shirou, Endo Fumio, Hirose Shinichi, Nakamura Kimitoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Newborn screening for Fabry disease in the western region of Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100562 ~ 100562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygmgr.2019.100562	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 Sawada Takaaki, Kido Jun, Sugawara Keishin, Yoshida Shinichiro, Ozasa Shiro, Nomura Keiko, Okada Kentaro, Fujiyama Natsumi, Nakamura Kimitoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Newborn screening for spinal muscular atrophy in Japan: One year of experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100908 ~ 100908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygmgr.2022.100908	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田真一郎1)、山内芳裕1)、水上智之2)、遠藤文夫3)、中村公俊4)
2. 発表標題 熊本地域における新生児SCID pilot スクリーニングの経過報告
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 松本志郎1, 澤田貴彰1, 百崎謙2, 三淵浩3, 遠藤文夫4, 中村公俊1
2. 発表標題 乾燥る紙血を用いたライソゾーム病スクリーニング陽性症例とその臨床像
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 澤田貴彰 1、小篠史郎 1、吉田真一郎 2、中村公俊 1
2. 発表標題 新生児スクリーニングで発見され症状の発症前に治療できた脊髄性筋萎縮症
3. 学会等名 第48回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村公俊
2. 発表標題 シンポジウム2 拡大スクリーニングの現状と公費化への課題
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

〔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
---------	---------