

## 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6日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591127

研究課題名（和文）SMN2 遺伝子転写制御を中核技術とする脊髄性筋萎縮症治療法の開発研究

課題名（英文）Establishment of treatment strategy for spinal muscular atrophy based on the *SMN2* gene transcription control

研究代表者

西尾 久英 (Nishio Hisahide)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80189258

研究成果の概要（和文）：脊髄筋萎縮症(SMA)患者の95%以上に、SMN1 遺伝子のホモ接合性欠失が認められる。このような SMA 患者では、SMN1 遺伝子とつよい相同性を有する SMN2 遺伝子が残存していて、かなりの程度 SMN1 遺伝子の欠失を補償しているものと考えられている。実際、SMN2 遺伝子のコピー数は、SMA の臨床的重症度と逆相関の関係が認められている。SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列はほとんど同一であると報告されているが、c. -318 GCC 挿入多型は SMN1 遺伝子プロモーター領域に特有のものであると考えられてきた。今回の研究プロジェクトにおいて、私たちは、SMN2 遺伝子のコピー数が少ないことから重症であると予想されたのにもかかわらず、意外にも軽症であった SMN1 遺伝子欠失患者の SMN2 遺伝子プロモーター領域を解析し、c. -318 GCC 挿入多型を見いだした。私たちは、この多型の SMN2 遺伝子転写に与える影響を解析し、脊髄性筋萎縮症治療法の開発を目指した。しかし、この c. -318 GCC 挿入多型は SMN2 遺伝子プロモーターの転写活性を上昇させず、白血球中の SMN2 遺伝子転写産物は他の 5 人の SMN1 遺伝子欠失患者より少なかった。c. -318 GCC 挿入多型を有するプラスミドを使ったレポーター遺伝子アッセイでも、この多型が転写効率に対してわずかではあるが負の効果を持っていることが明らかになった。結論として、SMN2 遺伝子プロモーターの c. -318 GCC 挿入多型は、意外にも軽症であった臨床像には関係がなかったものと思われる。また、このことは、非 SMN2 遺伝子関連症状修飾因子が SMA の重症度に関わっていることを示唆している。また、c. -318 GCC 挿入多型は SMN2 遺伝子の転写活性を低下させることが明らかになった。このことは、SMA 治療の際には、SMN2 遺伝子の転写活性にかかわる薬剤の種類や量を、c. -318 GCC 挿入多型の有無によって変える必要があることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：More than 95% of spinal muscular atrophy (SMA) patients show homozygous deletion of *SMN1*. *SMN2*, a highly homologous gene of *SMN1*, compensates for the *SMN1* deletion to some degree; copy number of *SMN2* is inversely correlated to the clinical severity of SMA. Although the promoter sequences of the two genes are almost identical, c. -318 GCC insertion has been identified as a specific polymorphism to the *SMN1* promoter. In this study, we found c. -318 GCC insertion polymorphism in the *SMN2* promoter of an *SMN1*-deleted SMA patient with milder phenotype than expected for low copy number of *SMN2*. However, transcript amount of *SMN2* in the white blood cells was smaller than other five *SMN1*-deleted SMA patients, suggesting that the polymorphism did not increase the transcriptional activity. Besides, reporter gene assay using plasmid constructs with or without c. -318 GCC insertion polymorphism demonstrated that the polymorphism had a slightly negative effect on the transcription efficiency. In conclusion, c. -318 GCC insertion polymorphism in the *SMN2* promoter may not be associated with the milder phenotype of the patient, suggesting the presence of non-*SMN2*-related modifying factors of SMA severity. Our experimental data using plasmid constructs with or without c. -318 GCC insertion polymorphism suggested that in the case of medical treatment for SMA, it is necessary to change the kind and quantity of the *SMN2*-activating medicine by the presence of c. -318 GCC insertion polymorphism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄筋萎縮症(SMA)患者の95%以上に、

SMN1 遺伝子のホモ接合性欠失が認められる。このような SMA 患者では、SMN1 遺伝子とつよい相同性を有する SMN2 遺伝子が残存していて、かなりの程度 SMN1 遺伝子の欠失を補償しているものと考えられている。実際、SMN2 遺伝子のコピー数は、SMA の臨床的重症度と逆相関の関係が認められている。

(2) SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子遺伝子のプロモーター領域の塩基配列はほとんど同一であると報告されているが、c. -318 GCC 挿入多型は SMN1 遺伝子プロモーター領域に特有のものであると考えられてきた。c. -318 GCC 挿入多型が転写活性に及ぼす影響については、いまだ報告がない。

(3) 今回の研究プロジェクトにおいて、私たちは、SMN2 遺伝子のコピー数が少ないことから重症であると予想されたのにもかかわらず、意外にも軽症であった SMN1 遺伝子欠失患者の SMN2 遺伝子プロモーター領域を解析し、c. -318 GCC 挿入多型を見いだした。

## 2. 研究の目的

(1) SMA 患者における重症度と SMN2 遺伝子量との関係を明らかにする。

(2) c. -318 GCC 挿入多型の一般集団における頻度、SMA 患者集団における頻度を明らかにする。

(3) c. -318 GCC 挿入多型の SMN2 遺伝子転写に与える影響を解析し、脊髄性筋萎縮症治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 症例：2歳の男児で、定頸は生後4か月、座位は生後8カ月で達成したが、伝い歩きは生後18カ月と遅く、2歳の時点で独歩不能であった。臨床型はSMA3型に近いSMA2型と判断した。

(2) SMN1 遺伝子欠失試験：PCR-RFLP 法を用いて、SMN1 遺伝子欠失を判定した。

(3) SMN2 遺伝子量測定：リアルタイム PCR 法を用いて、SMN2 遺伝子コピー数を測定した。

(4) SMN2 遺伝子プロモーター領域解析：SMN2 遺伝子プロモーター領域のダイレクトシーケンスを行った。

(5) 白血球中 SMN2 遺伝子転写産物測定：リアルタイム PCR 法を用いて、Total SMN2 mRNA、FL SMN2 mRNA を測定した。

(6) レポーター遺伝子アッセイ：c. -318 GCC 挿入多型を有する SMN プロモーターを挿入したルシフェラーゼ遺伝子ベクター、GCC 挿入多型を有していない SMN プロモーターを挿入したルシフェラーゼ遺伝子ベクターを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。

## 4. 研究成果

(1) 症例の遺伝子型：SMN1 遺伝子欠失を認めた。SMN2 遺伝子量は2コピーであった。

(2) 症例における重症度と SMN2 遺伝子量との関係：当研究室で遺伝子解析を行った SMN1 遺伝子のホモ接合性欠失を認める患者89名に関して、SMN1 遺伝子欠失を認める SMA 患者の表現型と SMN2 遺伝子量との関係を調べた。SMN2 遺伝子量が2コピーの症例は35例あった。そのうち33例(94%)が重症(SMA1型)であり、本症例は例外的に軽症であった。

(3) 症例の SMN2 遺伝子プロモーター領域の塩基配列：症例の一方の SMN2 遺伝子プロモーター領域に c. -318 GCC 挿入を認めた。

(4) c. -318 GCC 挿入の頻度：SMN1 遺伝子欠失患者50例(症例は含まれていない)、健常対照50例について、c. -318 GCC 挿入の頻度を調べた。c. -318 GCC 挿入を有する人は、SMN1 遺伝子欠失患者群にはいなかったが、健常対象者群には12人(24%)いた。この結果は、c. -318 GCC 挿入は、従来、SMN1 遺伝子プロモーター領域に特有のものであると考えられてきたことと一致する。また、症例の SMN2 遺伝子プロモーター領域に c. -318 GCC 挿入は例外的なことであることが分かる。

(5) 白血球中 SMN2 遺伝子転写産物測定：それでは、症例の臨床症状が軽症であったことと、SMN2 遺伝子プロモーター領域に c. -318 GCC 挿入が生じたこととは関連があるのか。

このことを検証する目的で、白血球中 SMN2 遺伝子転写産物の測定を行った。SMN1 遺伝子欠失患者5例(臨床的にはSMA2型、SMN2 遺伝子量は3コピー)と比較すると、Total SMN2 mRNA 量、FL SMN2 mRNA 量は最も少なかった。このことから、症例の白血球中 SMN2 遺伝子転写産物は、症状軽減を期待できるほどに十分には発現していなかった。

(6) レポーター遺伝子アッセイ-1：作成したコンストラクトを培養神経芽細胞に導入し、転写活性を比較した。その結果、c. -318 GCC 挿入を有するコンストラクトの転写活性は、有していないコンストラクトの転写活性よりも低いことが明らかになった。

(7) レポーター遺伝子アッセイ-2：c. -318 GCC 挿入多型領域近辺には CREB サイトが存在することから、cAMP に対する反応性の検討が重要であると考えられた。cAMP に対する反応性を検討するために、Bt2cAMP、フォルスコリンを添加したが、上記の傾向は変わらなかった。すなわち、c. -318 GCC 挿入を有するコンストラクトの転写活性は、有していないコンストラクトの転写活性よりも低かった。

(8) 結論：SMN2 遺伝子プロモーターの c. -318 GCC 挿入多型は、意外にも軽症であった臨床像には関係がなかったものと思われる。また、このことは、非 SMN2 遺伝子関連症状修飾因子が SMA の重症度に関わっていることを示唆している。

また、c. -318 GCC 挿入多型は SMN2 遺伝子

の転写活性を低下させることが明らかになった。このことは、SMN2 遺伝子の転写活性にかかわる薬剤の種類や量を、c. -318 GCC 挿入多型の有無によって変える必要があることを示唆している。

## 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 12 件)

- ① Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, Kubo Y, Takeuchi A, Saito T, Takeshima Y, Tohyama Y, Tay SK, Low PS, Saito K, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials. *Annals of Human Genetics*, 査読有, 2013, in press.
- 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.  
DOI: 10.1016/j.braindev.2011.04.010
- ③ 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.* 2012, 査読有, 16:123-129.  
DOI: 10.1089/gtmb.2011.0109
- ④ Marini M, Sasongko TH, Watihayati MS, Atif AB, Hayati F; Gunadi, Zabidi-Hussin ZA, Ravichandran M, Nishio H, Zilfalil BA. Allele-specific PCR for a cost-effective & time-efficient diagnostic screening of spinal muscular atrophy. *Indian J Med Res.* 査読有, 2012, 135:31-35.  
DOI: 10.4103/0971-5916.93421
- ⑤ 西尾久英, 斉藤利雄, 森川悟, 山本友人, Dian Kesumapramudya Nurputra, 寶田徹, 竹内敦子, 西村範行, 竹島泰弘, 松尾雅文. 小児医学最近の進歩 脊髄性筋萎縮症と SMN 蛋白と低分子量リボ核蛋白合成. 小児科, 査読あり 2011, 52:1535-1542.
- ⑥ 栗野宏之, 李知子, 八木麻理子, 竹島泰弘, 西尾久英, 松尾雅文. 非侵襲的陽圧換気療法と器械による咳介助を活用し気管内挿管から離脱した脊髄性筋萎縮症 I 型. *日本小児科学会雑誌*, 査読有, 2011, 115: 1451-1455.
- ⑦ Katayama M, Naritomi H, Nishio H, Watanabe T, Teramoto S, Kanda F, Hazama A. Long-term stabilization of respiratory conditions in patients with spinal muscular atrophy type 2 by continuous positive airway pressure: a report of two cases. *Kobe J Med Sci.* 査読有, 2011, 57: E98-E105.  
[http://www.lib.kobe-u.ac.jp/handle\\_kernel/81003741](http://www.lib.kobe-u.ac.jp/handle_kernel/81003741)
- ⑧ Morikawa S, Harahap IS, Kaszynski RH, Yamamoto T, Pramudya DK, Van 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, 2011, 15:677-684.  
DOI: 10.1089/gtmb.2010.0237
- ⑨ Sasongko TH, Gunadi, Yusoff S, Atif AB, Fatemeh H, Rani A, Marini M, Aziz CB, Zabidi-Hussin Z, Nishio H, Zilfalil BA. Screening of the LIX1 gene in Japanese and Malaysian patients with SMA and/or SMA-like disorder. *Brain Dev.* 査読有, 2010, 32:385-389.  
DOI: 10.1016/j.braindev.2009.06.008
- ⑩ 西尾久英, 斉藤利雄, 西村範行, 森川悟, 山本友人, 三宅理, 栗野宏之, 竹島泰弘, 松尾雅文, 小児医学最近の進歩 脊髄性筋萎縮症 up to date 医学的管理, 小児科, 査読あり 2010, 51:1797-1806.
- ⑪ 西尾久英, Harahap Indra Sari Kusuma, 斉藤利雄, 西村範行, 森川悟, 山本友人, 中川卓, 竹島泰弘, 松尾雅文, 小児医学最近の進歩 脊髄性筋萎縮症 up to date 治療戦略, 小児科, 査読あり 2010, 51: 1535-1542.
- ⑫ 西尾久英, 西村範行, 森川悟, 山本友人, 松尾雅文, 小児医学最近の進歩 脊髄性筋萎縮症 up to date 遺伝子診断, 小児科, 査読あり 2010, 51:1535-1542.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Harahap Imma, Nurputra Dian, 山本友人, 森川悟, 西村範行, 西尾久英.

Salbutamol modulates SMN2 expression in SMA fibroblast. 第 57 回日本人類遺伝学会, 2012 年 10 月 27 日, 東京

- ② 齋藤利雄, Dian K Nurputra, Imma Harahap, 森川悟, 山本友人, 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与. 第 57 回日本人類遺伝学会, 2012 年 10 月 27 日, 東京
- ③ 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 年 5 月 17 日, 札幌
- ④ 齋藤利雄, 西尾久英, 松村剛. 脊髄性筋萎縮症の心機能異常. 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月 18 日, 札幌
- ⑤ 實田徹, 近江昇一, 竹内敦子, Kesuma Pramudya, Nurputra Dian, 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 年 3 月 30 日, 札幌
- ⑥ 西尾久英, 西村範行, 森川悟, 山本友人, ディアン・ヌルプトラ, 中川卓, 竹島泰弘, 飯島一誠, 松尾雅文, 齋藤利雄. 臨床的に脊髄性筋萎縮症と診断された患者の SMN 遺伝子解析. 第 82 回日本衛生学会総会 2012 年 3 月 25 日, 京都
- ⑦ 戸田壮一郎, 湯浅正太, 高梨潤一, 田邊雄三, 西尾久英. 歩行可能まで発達したが以後急速に運動機能の低下を認めた脊髄性筋萎縮症の 1 例. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011 年 5 月 26 日 (横浜)
- ⑧ 粟野宏之, 李知子, 八木麻理子, 竹島泰弘, 西尾久英, 松尾雅文. 非侵襲的陽圧換気療法と器械による咳介助で呼吸ケアをおこなっている脊髄性筋萎縮症 1 型の 1 例. 第 43 回日本小児呼吸器疾患学会, 2010 年 10 月 29 日, 福岡
- ⑨ 粟野宏之, 李知子, 八木麻理子, 竹島泰弘, 西尾久英, 松尾雅文. 非侵襲的陽圧換気療法でよりよい QOL を維持できている脊髄性筋萎縮症 1 型の 1 例. 第 251 回日本小児科学会兵庫県地方会, 2010 年 9 月 25 日, 姫路
- ⑩ 森川悟, 山本友人, 西村範行, 西尾久英, 竹島泰弘, 松尾雅文. SMN1 遺伝子の片側アレルの欠失を認め、もう一方のアレルに点突然変異を認めた脊髄性筋萎縮症の 1 例. 第 250 回日本小児科学会兵庫県地方会総会 2010 年 5 月 29 日, 神戸

[図書] (計 1 件)

- ① 西尾久英. 金芳堂, 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル, 2012, 5 章遺伝子疾患としての SMA 5-1 小児期発症 SMA の原因と病態

は何ですか。(31-35 頁)、12 章 SMA の新しい治療法の開発研究 (114-118 頁).

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西尾 久英 (Nishio Hisahide)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 80189258

### (2) 研究分担者

西村 範行 (Nishimura Noriyuki)  
神戸大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 00322719

### (3) 研究分担者

竹島 泰弘 (Takeshima Yasuhiro)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 40281141