

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860860

研究課題名(和文) 濾紙血を用いたHRMA法による脊髄性筋萎縮症迅速診断法の確立

研究課題名(英文) A Rapid, Accurate and Simple Diagnostic Method for Spinal Muscular Atrophy: High-Resolution Melting Analysis Using Dried Blood Spots on Filter Paper

研究代表者

森川 悟 (Morikawa, Satoru)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50457074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は最も頻度の高い致死性の運動ニューロン病で、95%以上にSMN1遺伝子の欠失を認めている。SMAは治療法のない病気とされてきたが、現在いくつかの薬剤の治験がすでに開始されている。そこで、SMAのマススクリーニングの可能性について、倫理的、法的、社会的側面からも検討されるようになってきた。

今回、研究者らは、技術的な側面を検討し、濾紙血を用いた高解像度融解曲線分析(HRMA)法によるSMN1遺伝子欠失迅速診断法を確立したので報告する。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is a common neuromuscular disorder caused by mutation of the survival of the motor neuron 1 (SMN1) gene. More than 95% of SMA patients carry a homozygous deletion of SMN1. SMA is recognized as an incurable disease, but there are now promising therapeutic candidates from recent clinical trials. Researchers and clinicians have just started to investigate the possibilities of mass screening for SMA according to ELSI (Ethical, Legal and Social Implications) and mutation-screening techniques [1]. In this study, we investigated the possibilities of SMA mass screening from the technical viewpoint and established a rapid, accurate and simple screening system for SMA with PCR-HRMA using DNA extracted from DBSS on filter paper.

研究分野：小児科学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 迅速診断 SMN1遺伝子 スクリーニング 乾燥濾紙血 PCR 高解像度融解曲線分析  
HRMA

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は最も頻度の高い致死性の運動ニューロン病である。95%以上の患者で、SMN1 遺伝子の欠失を認めている。これまで SMA は治療法のない病気とされてきた。

しかし、SMA モデルマウスを用いた動物実験では、病状改善に有効な薬剤が発見され、しかも早期に治療が開始されるほど効果が高い事が証明されている。このような SMA モデルマウスでの知見に基づいて、ヒトに対しても、臨床応用が企図される時代になった。いくつかの薬剤の治験は、すでに開始されている。

次のステップは、SMA の早期診断の道を拓くことである。現在、SMA のマススクリーニングの可能性について、倫理的、法的、社会的側面からも議論されるようになってきた。しかし、SMA のマススクリーニングの方法論がいまだ確立していない現状では、このような議論は単なる『絵空事 (えそらごと)』でしかない。

本プロジェクトは、マススクリーニングの技術的側面について開発研究をおこない、SMN1 遺伝子欠失迅速診断法を確立することをめざした。

## 2. 研究の目的

迅速かつ正確、しかも低コストであるような SMN1 遺伝子欠失診断法を確立することが最終目的である。

濾紙は低コストであり、しかも郵送可能である。また、濾紙血を用いる事は、現行の先天性代謝異常症マススクリーニングの制度を利用することが可能であり、実現性が非常に高い。

一方、高解像度融解曲線分析 (HRMA) 法による HRMA は多検体を短時間・低コストで解析できる。

以上の事から、乾燥濾紙血と HRMA を組み合わせた SMA のスクリーニング方法の開発を目指すことにした。

## 3. 研究の方法

70 例の乾燥濾紙血 (ワットマン FTA Elute カード GE ヘルスケアバイオサイエンス社 に新鮮血を滴下し、室温放置の状態

乾燥させたもの) 検体から抽出した DNA を用いて、PCR-HRMA 解析が可能であるか否かを検討した。具体的には、乾燥濾紙血の室温・暗所での保存年数、PCR 条件 (プライマーの塩基配列、サイクル数) を検討した。

なお、PCR 増幅の対象となった塩基配列は、SMN 遺伝子 (SMN1 遺伝子、SMN2 遺伝子を含む) のエクソン 7 である。HRMA 解析は、エクソン 7 の内部、周辺領域に存在する SMN1 遺伝子特異的塩基、SMN2 遺伝子の特異的塩基の差異を利用して (図 1)、SMN1 遺伝子特異的融解曲線パターンおよび SMN2 遺伝子特異的融解曲線パターンを得ようというものである。

## 4. 研究成果

### (1) 乾燥濾紙血 DNA を用いた PCR

室温・暗所で、1~8 年保管されていたものを用いた。煮沸法で乾燥濾紙血から抽出した DNA は、通常の PCR 条件 (30 サイクル) では、全例 HRMA 解析は出来なかった。

しかし、PCR のサイクル数を通常の 1.5 倍まで (45 サイクル) まで引き上げることで、70 検体中 69 検体は HRMA 解析が可能になった。

なお、この時に用いたプライマーセットは、Lefebvre らが 1995 年に報告した R111 と 541C770 である (図 1)。

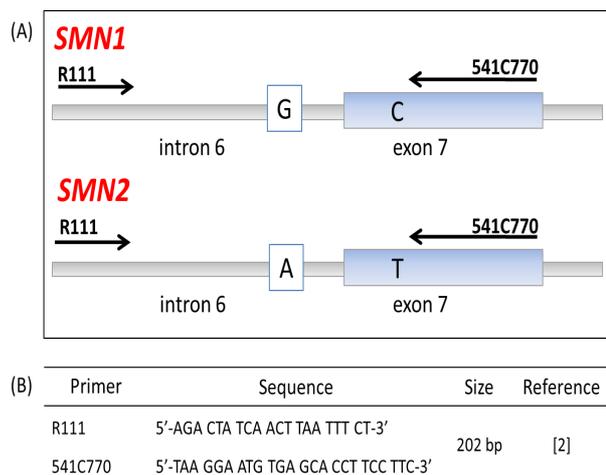


Fig 1 PCR primers.

### (2) PCR-HRMA 法による遺伝子型の区別

SMN 遺伝子エクソン 7 を増幅する PCR では、

SMN1 エクソン 7(+)/SMN2 エクソン 7(+)  
 SMN1 エクソン 7(+)/SMN2 エクソン 7(-)  
 SMN1 エクソン 7(-)/SMN2 エクソン 7(-)  
 の 3 種類の遺伝子型に基づくフラグメントを得ることができる。

PCR に引き続いて行われた HRMA 解析では、3 種類の遺伝子型に基づくフラグメントの融解曲線は明瞭に区別することができた(図 2)。

従って、本法で、SMN1 遺伝子の欠失を確実に検出できることが分かった。

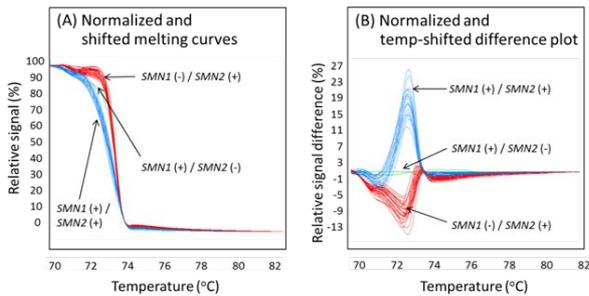


Fig 2 HRMA of three genotypes.

### (3) 従来法 (PCR-RFLP 法) との比較

従来から、SMN1 遺伝子の欠失診断には、PCR-RFLP 法 (van der Steege 法) がよく用いられてきた。今回の PCR-HRMA 法の結果は PCR-RFLP 法 (van der Steege 法) の結果と全く一致した(表 1)。

Table 1 HRMA with DBS-DNA vs PCR-RFLP with DNA freshly collected blood.

(A)	PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood			Total
		SMN1 (+)	SMN1 (-)	
HRMA with	SMN1 (+)	29	0	29
DBS-DNA	SMN1 (-)	0	40	40
	Total	29	40	69
sensitivity 1.0, specificity 1.0				

(B)	PCR-RFLP with DNA from freshly collected blood			Total
		SMN2 (+)	SMN2 (-)	
HRMA with	SMN2 (+)	66	0	66
DBS-DNA	SMN2 (-)	0	3	3
	Total	66	3	69
sensitivity 1.0, specificity 1.0				

### (4) 結論

乾燥濾紙血は長期保存に耐え、また、そこから抽出した DNA は HRMA 解析が可能な質と量を有する。したがって、乾燥濾紙血と HRMA を組み合わせた SMA のスクリーニングは可能である。

### (5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

現在のところ、SMA の診断が可能な地域は、分子遺伝学的診断が可能な先進国に限られている。しかし、乾燥濾紙血は世界中のどこからでも郵送が可能であり、この乾燥濾紙血を用いる診断法を用いれば、低開発国においても患者に正確な診断を提供できる。

また、乾燥濾紙血の DNA が HRMA に使用可能である程度の質と量を有していることは、我々が開発した方法が大規模な新生児スクリーニングにも応用可能であることを示している。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MR, Morikawa S, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H. A Rapid, Accurate and Simple Screening Method for Spinal Muscular Atrophy: High-Resolution Melting Analysis Using Dried Blood Spots on Filter Paper. Clinical Laboratory, 査読有 2014 in press.

Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. Brain Dev, 査読有, Vol.36, No.10, 2014, 914-920. DOI:10.1016/j.braindev.2013.11.009.

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. *Ann Hum Genet*, 査読有, Vol.77, No.5, 2013, 435-63. DOI:10.1111/ahg.12031.

Morioka I, Miwa A, Yokota T, Huu CT, Nagasaka M, Koda T, Matsuo K, Morikawa S, Shibata A, Hisamatsu C, Nishio H, Yamada H, Nishijima E, Iijima K. Severely high serum unbound bilirubin level after abdominal surgery in a newborn. *Pediatr Int*. 査読有, Vol.55, No.3, 2013, e59-62. doi: 10.1111/ped.12018.

Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K. Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*, 査読有, Vol.36, No.1, 2014, 10-5. DOI:10.1016/j.braindev.2012.12.009.

〔学会発表〕(計 1 件)

Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Morikawa S, Nishio H. A Rapid, Accurate and Simple Screening Method for Spinal Muscular Atrophy: High-Resolution Melting Analysis Using Dried Blood Spots on Filter Paper. ガジヤマダ大学創立記念年次集会サテライトセミナー, 2015年3月2-9日, ガジヤマダ特別市(インドネシア).

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 該当なし

## 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・非常勤講師  
研究者番号：50457074