

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860829

研究課題名(和文) 脊髄性筋萎縮症患者由来細胞を用いたSMN発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of SMN expression regulation mechanism using SMA patient-derived cells

研究代表者

荒川 玲子 (Arakawa, Reiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：40623111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)はSMN1遺伝子の変異により脊髄前角細胞の変性を生じ、全身性の筋萎縮を呈する。SMA患者ではSMN2遺伝子由来のSMNタンパク質が生命維持に重要な役割を果たしている。本研究ではSMA患者から採取した線維芽細胞およびリンパ球から細胞株を作成し、SMNタンパク質発現について検討した。新規SMNタンパク質解析法として、蛍光顕微鏡システムとフローサイトメトリー法の機能を合わせ持つイメージングフローサイトメトリー法の開発を行った(国内特許登録済、特許6115979号)。本手法により、SMA患者由来線維芽細胞およびリンパ球におけるSMNタンパク質発現量および局在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy is a neurodegenerative disorder caused by the deficient expression of survival motor neuron protein in motor neurons. In SMA patients, SMN protein derived from SMN2 gene plays an important role. In this study, we developed the imaging flow cytometry method having both functions of fluorescence microscope system and flow cytometry method as an analysis method for SMN protein. Using this method, we revealed the expression patterns and subcellular localization of SMN protein in SMA patient-derived fibroblasts and lymphoblasts.

研究分野：小児神経学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 SMNタンパク質

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症(SMA)は、全身の筋力低下を示す進行性の遺伝性筋萎縮症である。survival motor neuron 1 (*SMN1*)遺伝子の変異により、*SMN2*遺伝子のみがSMNタンパク質発現を担っているためにSMNタンパク質発現量が低いことが原因である。SMAでは治療開発が進み、治療効果判定の標準化が求められる時代となっている。そのため、精度の高いバイオマーカーを確立することが急務となっている。研究開始当初は、患者細胞におけるSMNタンパク質を鋭敏に解析できる手法が確立されていなかった。その理由は、ELISA法およびウェスタンブロット法といった従来法においては、細胞を潰してタンパク抽出液の状態として組織全体のSMNタンパク質を解析する方法をとらざるを得ないためであった。特に血液細胞は、血球分画ごとにSMNタンパク質発現量が異なることが示唆され、末梢血を一塊としてタンパク抽出液を作成してからSMNタンパク質を測定する手法では、鋭敏な解析が困難であった。このことから、SMA患者由来細胞におけるSMNタンパク質発現量については、これまで詳細な検討がなされていなかった。

2. 研究の目的

SMA患者では*SMN2*遺伝子由来のSMNタンパク質が生命維持に重要な役割を果たしている。*SMN2* mRNAから翻訳されるSMNタンパク質の発現制御機構を探索することを目的とし、イメージングフローサイトメトリー法(IFC法)を用いた患者由来細胞のSMNタンパク質発現解析法を確立する。IFC法を用いて、SMA患者由来細胞に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC inhibitor)であるバルプロ酸ナトリウム(VPA)投与した際のSMNタンパク質発現制御への影響について検討する。さらに、*SMN2*遺伝子コピー数の異なるSMA患者由来リンパ芽球を対象として、リンパ芽球のSMNタンパク質発現の定量化を行い、*SMN2*遺伝子コピー数とSMNタンパク質発現量と関連性についての検討を行う。

3. 研究の方法

(患者試料の収集、不死化細胞株の樹立)SMA患者もしくは代諾者、健常人へのインフォームドコンセントにより文書による同意の上、皮膚細胞、血液細胞を採取した。皮膚細胞は、胃ろう造設時や側彎手術時などに皮膚組織を採取した。皮膚細胞を採取後、20%胎児ウシ血清-DMEM培地で培養、増殖させた。血液細胞は採血後、リンパ球の分離を行った。リンパ芽球はEpstein-Barrウイルスでトランスフォームすることにより不死化細胞株を樹立した。

(*SMN2*遺伝子コピー数解析)患者由来細胞からDNAを抽出し、MLPA法(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification analysis)にて、*SMN2*遺伝子のコピー数解析を実施した。

(健常人由来皮膚線維芽細胞、SMA患者由来皮

膚線維芽細胞、末梢血単核球細胞、リンパ芽球細胞株を使用した免疫組織染色)

健常人由来線維芽細胞およびSMA型患者由来線維芽細胞を用いて、抗SMN抗体(mouse monoclonal anti-SMN antibody 2B1, BD)、抗gemin2抗体を用いた免疫組織化学染色法を行った。さらに、健常人およびSMA患者血液由来の末梢血単核球細胞(PBMC)およびEBV-transformedリンパ芽球細胞株を用いて細胞浮遊液を調整し、Smear Gell(GenoStaff)を塗抹したスライドガラス標本作製し、抗SMN抗体による免疫組織化学染色を行った。

(線維芽細胞へのVPA投与)SMA患者由来線維芽細胞にVPA(0, 0.1mM, 1mM, 10mM)を添加し、24時間培養を行った。24時間後に、細胞をトリプシン処理、洗浄、固定し、SMNおよび核に対する各蛍光標識抗体で細胞内染色を行った。上記の染色を実施した後に、ELISA法、ウェスタンブロット法およびIFC(FlowSight)により、細胞内SMNタンパク質の発現量および、SMNタンパク質の凝集能の定量化を行った。

(SMNタンパク質C末端認識抗体の作成)ヒトSMNタンパク質のexon7領域のアミノ酸配列をエピトープに持つマウスモノクローナル抗体およびラットモノクローナル抗体の作製を行った。ペプチド合成を行い、マウスおよびラットに免疫、細胞融合、ELISA法による一次スクリーニングを実施した。限界希釈、単クローン化培養上清、ハイブリドーマを作製した。作製したモノクローナル抗体についてSMA患者由来線維芽細胞を用いて、免疫組織化学染色にてスクリーニングを実施した。

(*SMN2*遺伝子コピー数の異なるSMA患者由来リンパ芽球におけるSMNタンパク質発現の検討)*SMN2*遺伝子が2コピーであり、5歳時点で定額未獲得の患者および、*SMN2*遺伝子が3コピーで1歳6か月で定額を獲得したSMA1型患者から採取したリンパ球から不死化細胞株を樹立した。培養、増殖させた後に固定、洗浄した。そしてSMNおよび核に対する各蛍光標識抗体で細胞内染色を行った。上記の染色後に、IFC法を用いて、細胞内SMNタンパク質の発現量および、SMNタンパク質の凝集能の定量化を行った。

本研究は、東京女子医科大学倫理委員会の承認のもとで実施した。

4. 研究成果

SMA患者由来細胞におけるSMNタンパク質発現解析を行う手法として、IFC法を用いた新規SMNタンパク質発現解析法の開発を行った(特許取得済み:特願2016-511649、取得年月日:平成29年3月31日)。IFC法はフローサイトメトリーに蛍光顕微鏡システムを導入し、タンパク質の発現強度だけでなく、細胞内局在を定量化できるシステムである。

接着培養系である健常人由来線維芽細胞の

抗 SMN 抗体による免疫組織化学染色法では、1 次抗体濃度 2.5 µg/ml、反応時間は室温 1 時間で SMN タンパク質が検出された。抗 gemin2 抗体と核染色の 3 重染色においては、SMN タンパク質と gemin2 タンパク質が共局在した核内 gems の存在を認めた。SMA 患者由来線維芽細胞では、SMN 発現量の低下が認められた。本知見をもとに IFC 法を実施した。その結果、IFC 法は接着培養系細胞でも評価が可能であることが判明し、SMA 患者由来線維芽細胞では、健常人由来細胞と比較し、有意に SMN タンパク質量および凝集能が低いことが分かった。さらに線維芽細胞における SMN タンパク質局在解析に成功した。

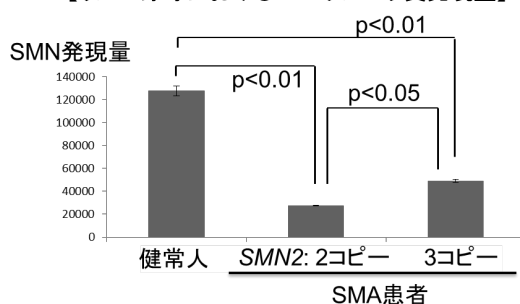
浮遊系細胞である PBMC およびリンパ芽球細胞を用いた免疫組織化学染色では健常人由来細胞と比較して、SMN タンパク質発現量が低いことが確認された。さらに IFC 法により、SMA 患者由来リンパ芽球では、健常人由来細胞と比較し、有意に SMN タンパク質量および凝集能が低いことが判明した。

さらに SMA 患者由来線維芽細胞にバルブロ酸ナトリウム (0, 0.1mM, 1mM, 10mM) を添加した際の SMN タンパク質発現の変化について、ELISA 法、ウエスタンブロット法および IFC 法で解析した。その結果 VPA 濃度依存的に SMN タンパク質発現の上昇を認め、さらに有意に核内 SMN タンパク質凝集能が上昇することが判明した (Arakawa M et al., BBRC 2014)。

また機能を有する全長型の SMN タンパク質を特異的に認識するために SMN タンパク質の C 末端領域のペプチド鎖を作成し、特異的なマウスおよびラットモノクローナル抗体の作製を試みたが、非特異的な抗体だけが産生された。

SMA 患者において、SMN2 コピー数が 2 コピーで重症度の高い患者由来リンパ芽球では、3 コピーの患者細胞と比較し、有意に SMN タンパク質発現および凝集能が低かった。このことから、SMA の重症度とリンパ芽球における SMN 発現量および凝集能には相関が認められることが判明した。(Arakawa R et al., Pediatric Neurology 2016)。

【リンパ芽球における SMN タンパク質発現量】



本研究では、線維芽細胞とリンパ芽球を用いて、IFC 法を確立するための抗 SMN 抗体による免疫組織染色法を実施した。IFC 法は、従来の ELISA 法やウエスタンブロット法と異なり、細胞からタンパク抽出液を作製する工程が不要で、各細胞の細胞形態、タンパク質発現量、タンパク質局在解析が可能な手法であり、特許を取得した。本手法により、SMA 患者由来細胞における SMN タンパク質発現量、局在解析および凝集能解析およびが可能となった。さらに、HDAC inhibitor による血液細胞の SMN タンパク質発現および凝集能への影響を定量化することに成功した。

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 2 件)

1) Arakawa R, Arakawa M, Kaneko K, Otsuki N, Aoki R, Saito K. Imaging flow cytometry analysis to identify differences of SMN protein expression in spinal muscular atrophy patients. *Pediatric Neurology*. 61:70-75. 2016. 査読有

2) Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A. A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 453: 368-374. 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 荒川玲子、久保祐二、金子芳、浦野真理、青木亮子、伊藤万由里、斎藤加代子、治療新時代に入った脊髄性筋萎縮症における SMN1 遺伝子の遺伝学的検査、第 23 回遺伝子診療学会、2016.10.6-8、於：イインホール & カンファレンスセンター(東京都千代田区)

2) Arakawa R, Otsuki N, Arakawa M, Kaneko K, Aoki R, Saito K. Development of SMN protein analysis in human blood cells as a spinal muscular atrophy biomarker. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016.4.3-7、於：京都国際会議場

(京都府京都市)

3) Arakawa M, Arakawa R, Aoki R, Nomoto A, Shibasaki M, Saito K, A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy. 20th International congress of the world muscle society. 2015.9.30-10.4、
於：ブライトン（イギリス）

4) Arakawa M, Arakawa R, Saito K, BIT 's 8th Annual World Protein&Peptide Conference、2015.4.25-28、
於：南京（中華人民共和国）

5) 荒川玲子、大月典子、金子芳、青木亮子、荒川正行、斎藤加代子、イメージングフローサイトメトリー法を用いた新規 SMN タンパク質解析法、日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015.10.14-17、
於：京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

取得状況（計 1 件）

名称：SMN タンパク質の発現を検出する方法
発明者：荒川玲子、斎藤加代子、荒川正行、野本明男

権利者：学校法人東京女子医科大学、公益財団法人微生物化学研究会

番号：特願 2016-511649

取得年月日：平成 29 年 3 月 31 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 玲子 (Arakawa Reiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：40623111