



PCR-Based Screening of Spinal Muscular Atrophy for Newborn Infants in Hyogo Prefecture, Japan

野口, 依子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-06-19

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3444号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492472>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

PCR-Based Screening of Spinal Muscular Atrophy for Newborn
Infants in Hyogo Prefecture, Japan

兵庫県における PCR を用いた脊髄性筋萎縮症の新生児スクリーニング

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 久保亮治教授)

野口 依子

【はじめに】

脊髄性筋萎縮症（SMA; Spinal muscular atrophy）は脊髄前角細胞の変性・脱落を示す運動ニューロン病であり、常染色体潜性遺伝疾患である。SMA は臨床的に 5 つのサブタイプに分類され、0 型（最重症型；胎児期に発症、出生後に重度の呼吸器障害）、1 型（重症型；生後 6 ヶ月以内に発症、座位不能）、2 型（中間型；生後 18 ヶ月未満に発症、立位や歩行不能）、3 型（軽症型；生後 18 ヶ月以降に発症、立位や歩行可能）、4 型（最軽症型；30 歳以降に発症）がある。SMA 患者の約半数が 1 型であり、呼吸補助が利用できない場合、多くが 2 歳までに呼吸困難により死に至る。

1995 年に SMA に関与する遺伝子として *SMN1* と *SMN2*（survival motor neuron 1 and 2）が同定され、両者は極めて相同性の高い配列を持つことが知られている。SMA 患者の 90% 以上が *SMN1* のホモ欠失接合体であり、まれではあるが *SMN1* のヘテロ欠失と *SMN1* の微小変異による複合ヘテロ接合体である患者がいる。一方、*SMN2* のコピー数と疾患の重症度は逆相関関係にあり、*SMN2* のコピー数が多いほど軽症となる。SMA の診断や重症度の予測においては、*SMN1*、*SMN2* のコピー数判定による遺伝子検査が有用である。

SMA は治療法のない疾患であるとされてきたが、2016 年に米国にて承認された新規治療薬（Nusinersen）により SMA1 型患者が補助なしに座位可能となるなど、予後が大きく改善した。その後も 2 種類の治療薬（Onasemnogene abeparvovec, Risdiplam）が追加で承認され、日本でも米国に続きこれらの新規治療薬が使用可能となった。最新の臨床研究では、SMA の 1 型、2 型の患者における発症前の早期治療により運動機能が劇的に改善し、立位や歩行が可能となることが示された。

そこで、SMA における新生児スクリーニング（SMA-NBS）によって、これらの新規治療薬の効果は最大限に発揮されると期待されるようになり、先進諸国で乾燥濾紙血液スポット（DBS）を用いて、PCR 法で *SMN1* の有無について調べる SMA-NBS が導入されるようになった。日本では 2020 年よりまず千葉県にて SMA-NBS が開始され、兵庫県においては 2021 年 2 月よりパイロット研究が開始された。

【目的】

兵庫県において開始された SMA-NBS について、偽陽性例の原因検索と SMA の確定診断につながった症例の詳細と治療経過について示し、SMA-NBS について評価することを目的とした。

【対象と方法】

1. 対象

SMA-NBS 開始前の 2007 年から 2016 年の間に神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座にて実施された遺伝子検査にて SMA と診断された兵庫県で出生の SMA 患者 18 例、2021 年 2 月から 2022 年 8 月までに兵庫県におけるパイロット研究に参加した 8336

例の新生児を対象とした。

2. 方法

SMA-NBS においては、出生後 4・6 日の新生児のかかとから血液を採取し、DBS を作成した。作成した DBS を用いて、SMCL（積水メディカルクリエティブラボラトリー）センターにて SMA スクリーニングキットにより定量的リアルタイム PCR を実施し、*SMN1* の有無を判定した。陽性と判定された患者については、神戸大学医学部附属病院検査部にて新鮮末梢血より DNA を抽出し、multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA）ならびに droplet digital PCR（ddPCR）により *SMN1* と *SMN2* のコピー数を判定し、確定診断を行った。

【結果】

1. SMA の発生頻度

SMA-NBS 開始前の 2007 年から 2016 年までに診断された患者の数から、兵庫県における SMA 患者は出生 100,000 人あたり 4.96 人、20,000～25,000 人に 1 人の割合であることが統計学的に算出された。

2. SMA-NBS の結果

2021 年 2 月から 2022 年 8 月の間に実施された SMA-NBS において、8336 例中、陽性例は 12 例であった。SMA-NBS 陽性例に対して、MLPA を用いて確認のための遺伝子検査が実施された。その結果、2 例は真の陽性、10 例は偽陽性であることが判明した。

3. ヘパリン使用による偽陽性例発生の可能性

SMA-NBS 偽陽性例発生の原因として、ヘパリンによる PCR 阻害や血液の希釈による影響の可能性が考えられたため、ヘパリン加血液による DBS サンプルを作成し、PCR による *SMN1* の測定を実施した。その結果、ヘパリン濃度依存性に PCR 産物が減少すること、対照遺伝子である *CFTR* と比較して *SMN1* の PCR 効率が低いことが示された。

4. SMA-NBS によって発見された SMA 患者 2 例の臨床経過

MLPA にて SMA の確定診断がなされた 2 例のうち、1 例は診断時症状、2 例目は無症状であった。1 例目については出生直後からフロッピーポジションをとるなどの症状を認め、生後 21 日目に SMA-NBS 陽性が判明、23 日目に MLPA により *SMN1* ホモ欠失、*SMN2* は 2 コピーであることが確定し診断がなされた。25 日目から治療が開始され、運動機能を示す CHOP-INTED スコアは治療前の 12 から 24 週目には 44 まで改善した。

2 例目は無症状で診断がなされた初めての症例であった。生後 17 日目に SMA-NBS 陽性が判明、21 日目に MLPA にて *SMN1* ホモ欠失、*SMN2* は 2 コピーであることが確定した。

SMA1 型の発症前での診断であったと考えられたが、22 日目から治療が開始され、その後症状を示すことなく経過した。

【考察】

（１）兵庫県における SMA の発生頻度

本研究にて、年間出生数約 40,000 人からこれまで実施してきた有症状の SMA 患者の遺伝子検査に基づき、兵庫県における SMA 患者の割合は 20,000 人～25,000 出生に 1 人であることを算出した。SMA-NBS がすべての新生児に実施されるようになればより正確な数字が算出されることになるだろう。今後、両親の SMA の疾患や治療についての十分な理解を得ることが重要である。

（２）SMA-NBS 偽陽性

通常、SMA-NBS 偽陽性例は極めて少ないとされているものの、兵庫県におけるパイロット研究では陽性となった 12 例のうち 10 例が偽陽性であり、ハイリスクの新生児医療などで使用されることの多いヘパリンによる影響が示唆された。DBS サンプル作成時はヘパリン加血液の使用は避けるよう改めて注意喚起する必要がある。

（３）SMA 早期治療の効果

SMA-NBS によって、発症前の段階での治療が可能となることが期待されている。臨床試験においても、有症状の患者より発症前に治療を開始できた患者の方が予後の改善が著しいことが明らかとなっている。

今回、我々の研究においては SMA-NBS により有症状、無症状の SMA 患者が発見され、遺伝子検査の結果からいずれも SMA1 型であることが疑われた。発症前の治療の有効性が明らかではあるものの、無症状である新生児への治療薬の投与は患者家族の受け入れが容易でないことは想像に難くなく、心理面のサポートも重要となる。

また、有症状の患者においては、発症前の診断にはいたらなかったが、早期の診断、早期の治療開始によって、より重篤な症状の発現を予防できたものと考えている。

【結論】

PCR を用いた SMA-NBS は発症前の治療を可能とするのみならず、必ずしも発症前の治療が可能でなかった場合においても、診断の遅れを防ぐことができ、患者の予後改善に大きく貢献することが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 2184 号	氏 名	野口 依子
論 文 題 目 Title of Dissertation	兵庫県における PCR を用いた脊髄性筋萎縮症の新生児スクリーニング PCR-Based Screening of Spinal Muscular Atrophy for Newborn Infants in Hyogo Prefecture, Japan		
審 査 委 員 Examiner	主 査 菱 本 明 豊 Chief Examiner 副 査 山 口 雅 士 Vice-examiner 副 査 永 瀬 裕 朗 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【はじめに】

脊髄性筋萎縮症（SMA; Spinal muscular atrophy）は脊髄前角細胞の変性・脱落を示す運動ニューロン病であり、常染色体潜性遺伝疾患である。SMA患者には1～5型があり約半数（1型）は、呼吸補助が利用できない場合、多くが2歳までに呼吸困難により死に至る。SMAに関与する遺伝子、SMN1とSMN2が同定され、2016年に米国にて承認された新規治療薬（Nusinersen）によりSMA1型患者が補助なしに座位可能となるなど、予後が大きく改善した。その後も2種類の治療薬（Onasemnogene abeparvovec, Risdiplam）が追加承認され、日本でも米国に続きこれらの新規治療薬が使用可能となった。最新研究では、SMA1型、2型の患者発症前の早期治療により運動機能が劇的に改善し、立位や歩行が可能となることが示された。そこで、SMAの新生児スクリーニング（SMA-NBS）によって、これらの新規治療薬の効果は最大限に発揮されると期待され、先進諸国で乾燥濾紙血液スポット（DBS）を用いて、PCR法でSMN1有無について調べるSMA-NBSが導入されるようになった。兵庫県において2021年2月よりパイロット研究が開始された。

【目的】

兵庫県で開始されたSMA-NBSについて、偽陽性例の原因検索とSMA確定診断につながった症例の詳細と治療経過について示し、SMA-NBSについて評価することを目的とした。

【対象と方法】

1. 対象：SMA-NBS開始前の2007年から2016年の間に神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座にて実施された遺伝子検査にてSMAと診断された兵庫県出生のSMA患者18例、2021年2月から2022年8月までにパイロット研究に参加した県内8336例の新生児を対象とした。

2. 方法：SMA-NBSにおいては、出生後4-6日の新生児のかかとかから血液を採取し、DBSを作成した。作成したDBSを用いてSMAスクリーニングキットにより定量的リアルタイムPCRを実施し、SMN1の有無を判定した。陽性と判定された患者については、神戸大学医学部附属病院検査部にて新鮮末梢血よりDNAを抽出し、multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA）ならびにdroplet digital PCR（ddPCR）によりSMN1とSMN2のコピー数を判定し、確定診断を行った。

【結果】

1. SMAの発生頻度：兵庫県におけるSMA患者は出生100,000人あたり4.96人、20,000～25,000人に1人の割合であることが統計学的に算出された。

2. SMA-NBSの結果：SMA-NBSにおいて、8336例中、陽性例は12例であった。SMA-NBS陽性例に対して、MLPAによる遺伝子検査が実施され、2例は真の陽性、10例は偽陽性であった。

3. ヘパリン使用による偽陽性例発生の可能性：SMA・NBS偽陽性例発生原因として、ヘパリンによるPCR阻害や血液の希釈による影響の可能性が考えられた。

4. SMA・NBSによって発見されたSMA患者2例の臨床経過：MLPAにてSMAの確定診断がなされた2例のうち、1例は診断時症状、2例目は無症状であった。1例目はMLPAによりSMN1ホモ欠失、SMN2は2コピーであった。25日目から治療が開始され、運動機能を示すCHOP-INTEDスコアは治療前の12から24週目には44まで改善した。2例目は無症状で診断された初めての症例であった。生後17日目にSMA・NBS陽性が判明、21日目にMLPAにてSMN1ホモ欠失、SMN2は2コピーであることが確定した。22日目から治療開始され、その後症状を示すことなく経過した。

【考察】

(1) 兵庫県におけるSMAの発生頻度は20,000人～25,000出生に1人であることを明らかにした。今後、両親のSMAの疾患や治療についての十分な理解を得ることが重要である。

(2) SMA・NBS偽陽性の要因はハイリスクの新生児医療などで使用されることの多いヘパリンによる影響が示唆された。DBSサンプル作成時はヘパリン加血液の使用は避けるよう改めて注意喚起する必要がある。

(3) SMA・NBSによって、SMA発症前の段階での治療が可能となることが期待される。臨床試験においても、有症状患者より発症前治療を開始できた患者の方が予後の改善が著しいことが明らかとなっている。発症前治療の有効性が明らかではあるものの、無症状である新生児への治療薬投与は患者家族への心理面のサポートも重要となる。また、有症状患者においては、早期診断、早期治療開始によって、より重篤な症状の発現を予防できたものと考えている。

【結論】

PCRを用いたSMA・NBSは発症前の治療を可能とするのみならず、必ずしも発症前の治療が可能でなかった場合においても、診断の遅れを防ぐことができ、患者の予後改善に大きく貢献することが示唆された。

よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。