



Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy : three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity

原田, 陽介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-09-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2831

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002831>

※ 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。



【 1 5 1 】

氏 名・（本 籍） 原田 陽介 （ 広島県 ）

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1950号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年9月14日

【 学位論文題目 】

Correlation between SMN2 copy number and clinical
phenotype of spinal muscular atrophy : three SMN2
copies fail to rescue some patients from the disease
severity

（脊髄性筋萎縮症の病型と SMN2 遺伝子コピー数の関係：
SMN2 遺伝子3コピー有していても、重症型を免れない）

審 査 委 員

主 査 教 授 丸 尾 猛

教 授 林 祥剛

教 授 丹 生 健一

【緒言】

脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy; SMA)は、脊髄前角細胞の変性・脱落に伴い、体幹・四肢近位部優位の進行性の筋緊張低下・萎縮を生じる遺伝性神経変性疾患である。遺伝形式は常染色体劣性遺伝形式をとる。SMA は、発症年齢と臨床経過により、重症型である1型（座位保持能力なし）、中間型である2型（座位保持可能、歩行能力なし）、軽症型である3型（自立歩行可能）の3つの臨床型に分類される。

SMA の原因遺伝子は5q13領域に存在する survival motor neuron 1 (SMN1) 遺伝子である。SMN1 遺伝子はエクソン1から8よりなる38-kDa の SMN 蛋白をコードしている。SMN 蛋白は抗アポトーシス、RNA 代謝、転写活性等に関わっているとされているが、その機能は未だ明らかになっていない。また 5q13 領域には SMN1 遺伝子と相同性の高い SMN2 遺伝子が存在しており、SMN2 遺伝子は SMN1 遺伝子と同一の蛋白をコードしている。SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子の配列の違いは、RNA スプライシングに反映されている。SMN1 遺伝子からは完全長の mRNA が産生されるのに対し、SMN2 遺伝子由来のものは大部分がエクソン7をスキップした mRNA となる。

しかし、SMN2 遺伝子からもわずかではあるが機能のある SMN 蛋白が産生されており、SMN2 遺伝子の臨床症状への影響が議論されている。また、SMN2 遺伝子のコピー数には個人差があることが分かっている。そこで本研究では、SMN2 遺伝子と SMA の臨床症状の関係を明らかにするため、27 人の SMN1 を欠損した SMA 患者の病型と SMN2 コピー数の関係を検討した。

【方法・結果】

SMN1 遺伝子欠失のある日本人 SMA 患者 27 人(1型 11 人、2型 14 人、3型 2 人)についてインフォームドコンセントを得た後、採血し DNA を抽出した。SMN2 遺伝子コピー数は患者ゲノム中の SMN 遺伝子及び 2 コピーある遺伝子として cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)遺伝子とを PCR で増幅した後、Gene Scan にて定量し SMN/CFTR 比を算出することにより求めた。また、PCR 効率及び PCR 反応に用いられた DNA 量をモニターするために、SMN、CFTR 遺伝子それぞれに PCR 増幅産物のサイズの違いを認識できる内部標準を作成し、競合的 PCR を行った。

その結果、重症型である1型患者の SMN2 遺伝子コピー数の平均は 2.2 ± 0.6 であり、中間型、軽症型である2型、3型患者のコピー数の平均は 3.1 ± 0.3 となった。1型と2、3型との間で χ^2 検定を行ったところ有意差がみとめられ ($p < 0.01$)、SMN2 遺伝子コピー数と SMA 臨床症状には相関があることが明らかになった。しかしながら、2型、3型患者は全員 SMN2 遺伝子を3コピー以上持っており2コピー以下の患者は認められなかったのに対し、11 人の1型患者のうち3人は SMN2 遺伝子コピー数を2型、3型患者と同様に3コピー有していた。このことは SMN2 遺伝子の発現は患者ごとに異なる可能性を示唆した。

そこで、1型にも関わらず SMN2 遺伝子を3コピー持つ1患者 (Patient MR) について患者家族を含めた遺伝子コピー数解析を行った。その結果、Patient MR は3コピーの SMN2 遺伝子のうち1コピーが父由来で残りの2コピーが母由来であることが予想された。このことは SMN 遺伝子のプロモーター領域にある Ag1-CA 多型解析により裏付けられた。さらに、Patient MR の SMN 遺伝子の発現を RT-PCR 法によって検討したところ、完全長の SMN mRNA はごくわずかな量しか発現していないことが明らかになった。また、RT-PCR によって増幅された産物をダイレクトシーケンスによって解析した結果、SMN2 mRNA には変異・欠失は認められなかった。

【考察】

本研究では、遺伝子コピー数解析によって SMN2 遺伝子コピー数が SMA の臨床症状に相関することを示した。この結果は日本人以外の民族による解析の結果と一致する。しかし、1型患者の中にも2型、3型程度の SMN2 遺伝子コピー数を有する例も認められ、SMN2 遺伝子コピー数のみが SMA の病態を決定しているのではないことが示された。この結果に関しても、最近報告された real-time PCR を用いたコピー数解析した他施設の研究結果と矛盾しない。従って、SMA の病型には SMN2 遺伝子コピー数の他に SMN2 遺伝子転写後から蛋白発現に至る過程、例えば RNA スプライシング機構などの他の遺伝的要因が関わっていることが考えられる。

SMA モデルマウスを作成し、SMA の症状における SMN2 遺伝子の発現の違いについて明らかにした報告もある。マウス本来の SMN 遺伝子を欠失させ、ヒトの SMN2 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成すると SMA モデルマウスとなる。SMA モデルマウスは様々な臨床症状をとり、軽症のマウスでは脊髄における完全長の SMN 蛋白はわずかに検出されるが、重症なマウスではほとんど検出されない結果となった。この結果は Patient MR で完全長の SMN2 mRNA 量が非常に少ない結果と矛盾しない。

SMA の治療には SMN2 遺伝子からより多くの機能的な SMN 蛋白を発現させることを目的として研究が進んでいる。実際、in vitro では Htra- β 1、sodium butyrate、acrarubicin 等が SMN2 遺伝子からより多く完全長の mRNA を産生できるとの報告がある。こうした状況の中、患者ごとの SMN2 遺伝子コピー数を把握できることは SMA の疾患の理解にのみならず、今後 SMA の治療に関わっていくものと考えられる。

学位論文審査の報告書

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1952 号	氏 名	原 田 陽 介
論文題目 Title of Dissertation	Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity (脊髄性筋萎縮症の病型とSMN2遺伝子コピー数の関係: SMN2遺伝子3コピー有していても、重症型を免れない)		
審査委員 Examiner	主 査 丸 尾 猛 Chief Examiner 副 査 林 祥 剛 Vice-examiner 副 査 丹 生 謙 一 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 7 月 20 日		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy; SMA)は、脊髄前角細胞の変性・脱落に伴い、体幹・四肢近位部優位の進行性の筋緊張低下・萎縮を生じる遺伝性神経変性疾患である。SMA の遺伝形式は常染色体劣性遺伝形式をとり、その原因遺伝子は 5q13 領域に存在する survival motor neuron 1 (SMN1) 遺伝子である。この領域には SMN1 遺伝子と相同性の高い SMN2 遺伝子が存在しており、SMN2 遺伝子は SMN1 遺伝子と同一の蛋白をコードしている。SMN1 遺伝子と SMN2 遺伝子の配列の違いは RNA スプライシングに影響する。SMN1 遺伝子からは完全長の mRNA が産生されるのに対し、SMN2 遺伝子由来のものは大部分がエクソン 7 をスキップした mRNA となる。しかし、SMN2 遺伝子からもわずかながら機能のある SMN 蛋白が産生されており、SMN2 遺伝子の臨床症状への影響が議論されている。また、SMN2 遺伝子のコピー数には個人差があることが分かっている。研究者らは、SMN2 遺伝子と SMA の臨床症状の関係を明らかにするため、競合的 PCR 法を用いて 27 人の SMN1 を欠損した SMA 患者の病型と SMN2 コピー数の関係を検討した。

研究者らは SMN2 遺伝子コピー数を患者ゲノム中の SMN 遺伝子及び 2 コピーある遺伝子として cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) 遺伝子とを PCR で増幅した後、Gene Scan にて定量し SMN/CFTR 比を算出することにより求めた。また、PCR 効率及び PCR 反応に用いられた DNA 量をモニターするために、SMN、CFTR 遺伝子それぞれに PCR 増幅産物のサイズで違いを認識できる内部標準を作成し、競合的 PCR を行った。

その結果、重症型である 1 型患者の SMN2 遺伝子コピー数の平均は 2.2 ± 0.6 であり、中間型、軽症型である 2 型、3 型患者のコピー数の平均は 3.1 ± 0.3 であった。 χ^2 検定で両者の間には有意差 ($p < 0.01$) を認め、SMN2 遺伝子コピー数と SMA 臨床症状には相関があることを明らかにした。しかしながら、2 型、3 型患者は全員 SMN2 遺伝子を 3 コピー以上持っており 2 コピー以下の患者は認められなかったのに対し、11 人の 1 型患者のうち 3 人は SMN2 遺伝子コピー数を 2 型、3 型患者と同様に 3 コピー有していた。以上より研究者らは SMN2 遺伝子の発現は患者ごとに異なる可能性を示唆した。

そこで、研究者らは 1 型にも関わらず SMN2 遺伝子を 3 コピー持つ 1 患者についてさらに解析を行った。まず患者家族を含めた遺伝子コピー数解析を行った結果、この患者は 3 コピーの SMN2 遺伝子のうち 1 コピーが父由来で残りの 2 コピーが母由来であることを予想した。このことは SMN 遺伝子のプロモーター領域にある Ag1-CA 多型解析により裏付けた。次に RT-PCR 法による mRNA 発現につ

いて検討し、この患者の SMN2 遺伝子からは完全長の SMN mRNA はごくわずかな量しか発現していないことを明らかにした。また、RT-PCR によって増幅された産物をダイレクトシーケンスによって解析し、SMN2 mRNA には変異・欠失が無いことを確認している。以上のことから SMN2 遺伝子コピー数は一般的には SMA の臨床症状と関連しコピー数が多いほど臨床症状は軽症であるが、たとえコピー数が多い場合でもその機能的な蛋白の発現量が低い場合は重症例となることを示唆した。研究者らはこの原因として SMN2 遺伝子が転写されて SMN 蛋白に翻訳される過程、たとえば RNA スプライシングの過程など他の遺伝的要因を考えた。またこの結果は、SMA モデルマウスの SMN 蛋白発現量と臨床症状を検討した研究において、重症なマウスほど SMN 蛋白の発現が少ないとの報告と矛盾しないものであった。

本研究は、遺伝子コピー数解析によって SMN2 遺伝子コピー数が SMA の臨床症状と関連することを明らかにした。また同時に SMN2 コピー数のみでその臨床症状を説明できない例もあることを示し、RNA スプライシング機構など他の遺伝的要因の関与を示唆した。SMA の治療には SMN2 遺伝子からより多くの機能的な SMN 蛋白を発現させることを目的として研究が進んでおり、実際、*in vitro* では Htra- β 1、sodium butyrate、acrarubicin 等が SMN2 遺伝子からより多く完全長の mRNA を産生できるとの報告がある。こういった状況の中、本研究は、SMN2 遺伝子量が SMA の重症度を規定する因子であることを明らかにし、さらに SMN2 遺伝子のスプライシングのあり方が SMA の重症度を規定する可能性を初めて示したもので、価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士（医学）として学位を得る資格があると認める。