Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-02

SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper: Application of COP-PCR to the SMN1 Deletion Test

Kato, Nozomu

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2015-03-06

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙第3275号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003275

※ 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。

学位論文の内容要旨

SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper: Application of COP-PCR to the *SMN1* Deletion Test

Dried Blood Spot を用いた SMA スクリーニングシステム COP-PCR の *SMN 1* 遺伝子欠失検査への応用

神戸大学大学院医学研究科
地域社会医学・健康科学講座　疫学分野
（指導教員：西尾久英教授）

加藤　望

【緒言】

脊髄性筋萎縮症（Spinal muscular atrophy, SMA）は、脊髄前角細胞の変性・脱落にともない、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運動ニューロン病の一つである。SMA の原因遺伝子である *SMN1* 遺伝子は 1995 年にクローニングされた。SMA 患者の 95%以上が *SMN1* 遺伝子の完全な欠失（*SMN1* 遺伝子欠失のホモ接合体）、残り（< 5%）が *SMN1* 遺伝子内に変異が存在するか、または *SMN1* 遺伝子異常とは関係のない SMA（non-5q-SMA：5 番染色体上の遺伝子の異常に基づかない SMA）の可能性がある。したがって、診断の最初に、*SMN1* 遺伝子の欠失試験が必要となる。

一方、*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子は、ほとんど同一の塩基配列を有する。コーディング領域の違いはエクソン 7 の 6 番目の塩基の違いのみである。そのため、*SMN2* 遺伝子の存在が *SMN1* 遺伝子の欠失の検出を難しくしていると考えられる。この問題に対処するため、PCR-制限酵素法(PCR-RFLP)などの種々の特別な PCR システムが用いられている。われわれは以前に、competitive oligonucleotide priming-PCR（COP-PCR）により、通常の PCR を使って *SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子を別々に増幅できることを見出した。また、ろ紙の乾燥血スポット（DBS）が採取、運搬、保管が簡単であることは知られているが、我々は，DBS が SMA 診断のための DNA 源としても使用可能であることを報告した。この両者のメリットを生かして、DBS からの DNA 抽出と COP-PCR 分析を組み合わせた方法を確立し、その有用性を検討した。

【方法】

1．患者と対照検体

SMA 患者 28 例および比較対照者 22 例を分析に供した。今回用いた全例は新鮮血から採取した DNA を用いて、PCR-RFLP 法での分析は既に終了している。分析に先がけて、研究参加者からのインフォームド・コンセントは得られた。なお本研究は神戸大学大学院医学研究科の倫理委員会により承認を得て行った。

2．DBS からの DNA 抽出

FTA Elute カードを用いて、SMA 患者および対照者から血液を採取した。FTA Elute カードの保存期間は 1－8 年の範囲で、暗所で室温（20-25℃）に保存した。ゲノム DNA は既報に従って抽出した。すなわち 11mm 径の DBS から切り出した 3mm 径のパンチアウト片 7 個（全 50uL に相当）を蒸留水で洗浄したの

ち、75uL の Tris-EDTA, pH8.0(TE buffer)を加え、95℃で 30 分加熱して鋳型 DNA を抽出した。DNA 濃度と吸光度比（260/280 OD ratio）は NanoDrop ND-1000 spectrometer を用いた。

3．*SMN1*/*SMN2* exon 7 の COP-PCR

SMN1 と *SMN2* から別々にエクソン 7 を増幅するために、COP-PCR を行った。蒸留水、鋳型ゲノム DNA (50-500ng)、10 pmol/uL forward primer (R111)、*SMN1* 用または *SMN2* 用 reverse primer（*SMN1*-COP または *SMN2*-COP）、10mM dNTP、MgCl2 含有 10xbuffer、Taq DNA polymerase（Fast Start Taq DNA polymerase, Roche Applied Science）を加えて全量 30uL とした。PCR 温度条件は 94℃ 7min の後、94℃ 1min、35℃ 1min 、72℃ 1min で 30 サイクル、さらに 72℃ 7min であった。COP-PCR 増幅産物の一部を 4%アガロースゲルに適用して、1xTBE で電気泳動を行い、エチジウムブロミドで可視化した。

4．COP-PCR 産物のシーケンス

SMN1/*SMN2* エクソン 7 の COP-PCR 増幅産物は、精製後 R111primer でサイクルシーケンスリアクションをした。その産物を直接 dye terminater cycle sequencing ABI PRISM（Life Technologies）に適用してシーケンスを行った。反応産物は ABI PRISMR 310 Genetic Analyzer（Life Technologies）で分析した。

【結果】

1．DBS からの抽出量と保存期間

直径 11 mm の DBS からの DNA 収量は 21,171±7,485 ng (M±SD) で、260/280 OD 比が 1.49 から 2.1（M±SD；1.67±0.13 であった。

4 人の DNA 検体（3 人対照者および 1 人 SMA 患者）は COP-PCR により、*SMN1*/*SMN2* のいずれの遺伝子も増幅されなかった。*SMN1*/*SMN2* 欠失は致死となるので、何らかの問題があったものと思われる。これらの DNA 検体自体に問題がないかを *CFTR* 遺伝子の PCR で増幅を試みたところ、増幅されなかった。したがって、DNA 検体に問題があったとして以後の実験には使わなかった。

4 年以上長く保存されていた 29 人の DNA 検体のなかに、これらの 4 人の DNA 検体があった。しかし、残り 25 検体の DNA 濃度と 260/280 OD 比率は *SMN1*-COP または *SMN2*-COP で増幅された他の検体と類似していた。

2．COP-PCR 産物のパターン解析

COP-PCR 増幅により *SMN2* exon 7 と *SMN1* exon 7 を分離することが可能であった。

解析を行なった 46 検体の内、18 人の対照者および *SMN1* 遺伝子内に変異を持つ 2 人の患者において、R111 と *SMN1*-COP または R111 と *SMN2*-COP を使って、COP-PCR を行ったところ *SMN1*/*SMN2* の両方のバンドが得られた。3 人の対照者に、R111 と *SMN2*-COP を使ったところ *SMN2* のバンドが見られなかった。23 人のホモ欠失患者においては、R111 と *SMN2*-COP を使った条件でのみ *SMN2* のバンドが見られた。

3．シーケンスにより増幅産物の特異性検証

COP-PCR 増幅産物の特異性を確認するため、シーケンス分析を実行した。以前の報告で、イントロン 6 に *SMN1* と *SMN2* は、それぞれ特異的なヌクレオチドを有する。すなわちエクソン 7 からポジション-44 の位置は *SMN1* の場合 G 、*SMN2* は A である。これらの発見は、別々の COP-PCR 実験が *SMN1* エクソン 7 と *SMN2* エクソン 7 を特異的に増幅していることを示した。

4．新鮮血由来 DNA を用いた PCR-RFLP と DBS-DNA を用いた COP-PCR の比較

DBS-DNA を用いた COP-PCR 結果は、新鮮血-DNA を用いた PCR-RFLP の結果と完全に一致した。感度も特異性も同等であった。COP-PCR 結果は、患者のスクリーニングに有用であると判断された。

【考察】

1．DBS

この研究において、DBS から DNA 抽出と *SMN1* と *SMN2* の COP-PCR 分析を組み合わせて、世界中で使用可能な簡単かつ正確な *SMN1*-欠失検出システムを確立した。DBS-DNA は，PCR 鋳型として十分量 DNA を得ることができた。また DBS は，取り扱い，輸送，保存およびコスト面で、実用的である。

DBS は Guthrie と Susi が DBS からフェニルアラニン濃度を測定するためにフェニルケト尿症のスクリーニング法として開発し、50 年以上使われてきた。DBS を使ったアプリケーションが多く開発され、代謝産物（例えば副腎白質ジ

ストロトフィー)、ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホルモン)、酵素活動（例えば、グルコース—6—リン酸デヒドロゲナーゼ)、および薬（例えば、抗マラリア薬）の測定のような医療目的に応用されてきた。

DBS は現在よい DNA 源と認められており、DBS-DNA と PCR の組み合わせは、遺伝分析を可能にしている。DBS-DNA は，デュシェンヌ／ベッカー筋ジストロフィーと嚢胞性線維症の分子のスクリーニング使用にすでに報告されていた。我々の発見は、DBS は，病気診断を目的とした DNA ソースとして有用であることをサポートした。しかし、DBS による長期保存には限界があり，PCR 増幅が実施出来ない場合がある。

2．COP-PCR

COP-PCR は、*SMN*（*SMN1*、*SMN2*）遺伝子を別々に増幅できることを示す。COP-PCR は遺伝子変異差のある配列に適応可能である．そこで、2 種のオリゴヌクレオチド primer が DNA とアニーリングするために競合する。競合する primer は通常（18－25 mer）の primer より短く、配列の中央に異なるヌクレオチドを配している以外は同じである。マッチした primer の方がマッチしてない primer より 100 倍増幅する。増幅産物について，シーケンスを行なった結果，*SMN1* と *SMN2* エクソン 7 を特異的に増幅していた。COP-PCR と PCR-RFLP の結果は同じだったことから COP-PCR 法が正確であることが証明された。さらに、COP-PCR による *SMN1* 欠失の検出は、制限酵素による消化操作がないので PCR-RFLP より速い。所要時間として COP-PCR は 3 時間であるが、PCR-RFLP は 8 時間必要である。

【結論】

ろ紙の DBS から DNA 抽出と *SMN1* と *SMN2* を特異的に検出する COP-PCR を組み合わせて、世界のどこでも使える実用的で新しい *SMN1* 欠失の検出システムを確立した。さらに、ろ紙の DBS が病気診断のための DNA ソースとして有用であることも証明した。

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 2137 号	氏 名	加藤 望
論文題目 Title of Dissertation	SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper: Application of COP-PCR to the *SMN1* Deletion Test 乾燥濾紙血を用いた SMA スクリーニングシステム: COP-PCR の *SMN 1* 遺伝子欠失検査への応用		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 森岡 一朗 副 査 Vice-examiner 白坂 敏朗 副 査 Vice-examiner 河野 誠司		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

脊髄性筋萎縮症（Spinal muscular atrophy、SMA）は、脊髄前角細胞の変性・脱落にともない、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運動ニューロン病の一つである。SMA の原因遺伝子である *SMN1* 遺伝子は 1995 年にクローニングされた。SMA 患者の 95%以上が *SMN1* 遺伝子の完全な欠失（*SMN1* 遺伝子欠失のホモ接合体）である。したがって、鑑別診断の最初のステップとして *SMN1* 遺伝子の欠失試験が必要となる。

しかし、*SMN1* 遺伝子欠失の検出は必ずしも容易ではない。*SMN1* 遺伝子の近傍に存在する *SMN2* 遺伝子は、ほとんど同一の塩基配列を有する相同遺伝子である。そのため、*SMN1* 遺伝子欠失を検出するためには、*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子を区別する必要がある。そこで、PCR-制限酵素法(PCR-RFLP)などの種々の特別な PCR システムが用いられてきた。

本研究者のグループは以前に、competitive oligonucleotide priming-PCR（COP-PCR）により、*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子を特異的に増幅できることを報告した。一方、新生児マススクリーニングに使われてきた乾燥濾紙血スポット（DBS）は、血液の採取、運搬、保管が簡単であることは知られている。本研究者のグループは、この DBS が SMA 診断のための DNA ソースとして使用可能であることも報告している。今回、本研究者は、この両者のメリットを生かすべく、DBS の DNA 抽出と COP-PCR 分析を組み合わせた方法を工夫、確立し、その有用性を証明した。

【方法】

1．患者と対照検体

SMA 患者 28 例および対照者 22 例の検体が分析に供された。ただし、いずれの例においても、新鮮血から採取した DNA を用いた PCR-RFLP 法での検査は既に終了している。分析に先がけて、研究参加者からのインフォームド・コンセントを得た。なお、本研究は神戸大学大学院医学研究科の倫理委員会により承認を得て行われたものである。

2．DBS からの DNA 抽出

乾燥血液を載せた FTA Elute カードの保存期間は 1−8 年の範囲で、暗所で室温に保存した。11mm 径の DBS から切り出した 3mm 径のパンチアウト片 7 個（全血 50uL に相当）を蒸留水で洗浄後、TE buffer を加え、95℃で 30 分加熱して鋳型 DNA を抽出した。DNA 濃度と吸光度比（260/280 OD ratio）は NanoDrop ND-1000 spectrometer を用いた。

3．*SMN1*/*SMN2* exon 7 の COP-PCR

SMN1 と *SMN2* から別々にエクソン 7 を増幅するため、COP-PCR を行った。Forward primer (R111)、*SMN1* 用または *SMN2* 用 reverse primer（*SMN1*-COP または *SMN2*-COP）を含む反応溶液を PCR 反応に供した。COP-PCR 産物は、4%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロミドで可視化した。

4．COP-PCR 産物のシーケンス

SMN1/*SMN2* エクソン 7 の COP-PCR 産物は、精製後 R111 を用いてシーケンスを行った。反応産物は ABI PRISMR 310 Genetic Analyzer（Life Technologies）で分析した。

【結果】

1．DBS からの抽出量と保存期間

直径 11mm DBS の DNA 収量は 21,171±7,485 ng（M±SD）で、260/280 OD 比が 1.49 から 2.1（Mean±SD；1.67±0.13）であった。

4 人の DNA 検体（3 人の健常対照者および 1 人 の SMA 患者）は COP-PCR により、*SMN1*/*SMN2* のいずれの遺伝子も増幅されなかった。これら 4 検体の保存期間は 4 年以上であり、検体 DNA の劣化が原因と考えられた。

2．COP-PCR のパターン解析

COP-PCR 反応により *SMN1* exon 7 と *SMN2* exon 7 の特異的増幅が可能であった。R111 と *SMN1*-COP または R111 と *SMN2*-COP を使って、COP-PCR 診断スクリーニングを実施した。解析を行なった 46 検体の内、18 人の対照者および *SMN1* 遺伝子内に変異を持つ 2 人の患者においては、*SMN1*/*SMN2* の両方のバンドが得られた。*SMN2* 遺伝子を欠失していた 3 人の対照者は、*SMN 1* のバンドのみ検出された。23 人のホモ欠失患者は、*SMN2* のバンドのみ検出された。これらの結果は、新鮮血-DNA の PCR-RFLP の結果と全く一致した。

3．シーケンスによる増幅産物の特異性検証

DBA-DNA を用いた COP-PCR 法の特異性を確認するため、シーケンス分析を実施した。その結果、*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子がそれぞれ特異的に増幅されていることが明らかになった。

4．新鮮血-DNA の PCR-RFLP と DBS-DNA の COP-PCR の比較

上述したように、DBS-DNA を用いた COP-PCR 結果は、新鮮血-DNA を用いた PCR-RFLP の結果と完全に一致した。感度も特異性も同等であった。以上の結果より、DBS-DNA を用いた COP-PCR は、SMA 患者のスクリーニングに有用であると判断された。

【考察】

1．DBS－DNA について

本研究は、DBS-DNA 抽出法と *SMN1* と *SMN2* の COP-PCR 分析を組み合わせることによって、世界中で使用可能かつ正確な *SMN1*-欠失検出システムを確立したというものである。DBS-DNA は、PCR 鋳型として十分量の DNA を取得することが出来る。さらに DBS は、取り扱い、輸送、保存およびコスト面で、非常に実用的であると思われる。しかし、本研究者によれば、DBS による長期保存には限界があり、PCR 増幅が実施出来ない場合があるとのことである。

2．COP-PCR について

本研究では、COP-PCR が *SMN1*、*SMN2* 遺伝子を特異的に増幅することが示された。PCR 産物の特異性については、本研究者はシーケンス実験を行い、*SMN1*、*SMN2* 遺伝子の確認も行っている。

COP-PCR 診断結果と PCR-RFLP の診断結果は全く同じであったことから COP-PCR による診断が正確であることも保証されている。

また COP-PCR による *SMN1* 欠失診断は、制限酵素による消化操作がないため PCR-RFLP より短い時間で診断が可能であることも示された（COP-PCR：3 時間、PCR-RFLP：8 時間以上）。

以上のように、本研究者は、DBS からの DNA 抽出と *SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子を特異的に検出可能な COP-PCR を組み合わせることによって、世界のどこでも使える新しい *SMN1* 欠失診断出システムを確立した。

本研究は、脊髄性筋萎縮症について、その遺伝子診断の方法を研究したものであるが、従来全く行なわれてこなかった「乾燥濾紙血と COP-PCR を組み合わせた遺伝子診断法」の開発に成功し、DNA スクリーニング法についても重要な知見を得たものであると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。