

ALS における Survival Motor Neuron 遺伝子数多型の疾患修飾因子としての検討

The SMN gene copy number states in Japanese ALS patients.

石原 智彦, 小山 哲秀, 小野寺 理

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 分子神経疾患資源解析学分野

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の治療法開発には, ALS の発症メカニズムの理解が重要となる. TDP-43 蛋白の核からの消失と同蛋白陽性細胞質内封入体形成は, ALS の病理学的特徴である. 同蛋白質は, RNA 代謝に関連する核内蛋白であり, その機能低下が ALS 病態機序の一つとして注目されている. ALS では, 筆者らを含めた複数のグループから, 運動神経細胞の核内構造物 Gemini of coiled bodies (GEM) の減少と, それに伴う RNA 代謝異常が報告されている. TDP-43 蛋白は核で GEM 小体と共局在し, TDP-43 の発現量が GEM 小体数と関連する¹⁾²⁾. GEM 小体は SMN 蛋白を主要構成成分とし, その生理的機能として, pre messenger RNA の splicing 反応を司る機能性 RNA, small nuclear RNA (snRNA) の成熟がある³⁾⁴⁾. 興味深いことに遺伝的な SMN 蛋白の低下は, 小児発症の運動ニューロン疾患である脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy : SMA) を引き起こす. SMA では, GEM 小体および snRNA の発現低下と messenger RNA の splicing 異常が報告されており⁵⁾⁶⁾, 筆者らは同様の現象を ALS においても見出している¹⁾. これらの事実は, SMA と ALS という 2 つの運動ニューロン疾患に共通した病態機序の存在を示す.

SMN 遺伝子は *SMN1* 遺伝子と, *SMN2* 遺伝子が存在する. 両者の違いはごくわずかであるが, そこから合成される蛋白質の性質は大きく異なる. *SMN2* 遺伝子由来の蛋白質は不安定で, *SMN1* 遺伝子由来の 10% 程度の活性を有するとされる⁴⁾. 通常, 遺伝子は 1 対, 2 個ずつ存在するが, SMN1,2 遺伝子数は人によって, 0-4 個と異なる. この数の変化はコピー数多型 (copy number variants : CNV) と呼ばれる. SMN1 が 0 個の場合, 運動ニューロン疾患 SMA を発症し, SMN2 の CNV がその重症度を規定する⁴⁾⁷⁾. SMA では, SMN 蛋白の発現量増加が重要な治療対象である. 本来不安定である *SMN2* 遺伝子由来の SMN を安定化させるために, バルプロ酸などの薬剤⁸⁾, 核酸製剤を用いた治療研究がなされている⁹⁾. 我々は ALS においても, *SMN* 遺伝子の CNV が疾患修飾因子となると推定した. もしこれが事実であれば, SMA で行われている治験が ALS にも応用できる可能性がある.

しかし, 現在まで *SMN* 遺伝子の CNV と ALS の発症リスクとの間には一定の見解が得られていない. フランスでは *SMN1* 遺伝子の欠失が ALS 発症リスクとされた¹⁰⁾, 一方,

オランダでは逆に *SMN1* 遺伝子の重複が ALS の発症リスクになると報告されており一定の見解を得ていない¹¹⁾。 *SMN2* 遺伝子に関しては、韓国では本遺伝子の欠失が ALS の発症リスクとなると報告されている¹²⁾。疾患の進行に対しては、スウェーデンの報告では *SMN2* 遺伝子欠損が ALS 進行の抑制因子となるとされた¹³⁾。これら *SMN* 遺伝子と ALS との関連については相反する結果が報告されており、より正確な検討が必要である。また日本人に関しては、いまだ検討がなされていない。

2. 研究の目的

本邦での *SMN* 遺伝子 CNV と ALS との関連を多面的に明らかにする事を目的とする。

3. 方法

本邦における ALS 遺伝子バンクである JaCALS (本部：名古屋大学) より遺伝子検体の供与を受け、孤発性 ALS 症例群 447 例 (男性 258 名, 平均年齢 61.3 ± 11.2 歳), 対照群 299 例 (男性 114 名, 平均年齢 62.3 ± 10.3 歳) を解析対象とした。ALS 症例は El Escorial 診断基準で, possible ALS 以上の症例を対象とした。さらに初発部位から, 球型 111 例 (男性 50 名, 平均年齢 64.7 ± 10.1 歳), 脊髄型 (上肢, 下肢発症) 293 例 (男性 184 名, 平均年齢 64.7 ± 10.1 歳), その他に分類した。

SMN 遺伝子 CNV 解析には, droplet digital PCR system (ddPCR) QX200 (Bio-Rad 社) を用い, Taq-Man PCR 法にて実施した。測定対象として, *SMN1*, *SMN2* 遺伝子に加え, reference として *BCKDHA* 遺伝子を選択した。Primer, Probe については既報を参照した¹⁴⁾。本研究は新潟大学 遺伝子倫理委員会にて承認を得ている。

4. 結果

ALS 症例群において, *SMN1* 遺伝子が 0 個の症例, すなわち成人型 SMA と診断される症例は認めなかった。また *SMN1* 遺伝子の CNV 解析では両群に差異を認めなかった。*SMN1* 遺伝子の 3 ないし 4 個への増加は, 対照群で 8.7%, ALS 群で 5.8% であり, 対照群で多い傾向は認めたが, 有意差は認めなかった (オッズ比 0.645, 95%信頼区間 0.37-1.14, p=0.13)。

SMN2 遺伝子の 0 ないし 1 個への減少が, 対照群で 35.8%, ALS 群で 44.3% であり, ALS 群で有意に多かった (オッズ比 1.43, 95%信頼区間 1.06-1.93, p=0.02)。

病型分類では、*SMN2* 遺伝子の 0 ないし 1 個への減少は、球型で 50.4% (オッズ比 1.83, 95%信頼区間 1.18-2.84, $p=0.007$) とより顕著にみられた。一方で脊髄型では 40.9% (オッズ比 1.24, 95%信頼区間 0.89-1.73, $p=0.20$) であった。

5. 考察

我々の結果からは *SMN2* 遺伝子の減少が ALS の発症リスクとなる可能性が示された。これは我々の推論を裏付ける。すなわち SMN 蛋白質低下による GEM 小体, snRNA の減少が運動ニューロン疾患, SMA, ALS に共通する疾患メカニズムであることが, CNV 解析の面からも示唆された。

SMA と ALS は代表的な運動ニューロン疾患であるが、異なる特徴を持つ。SMA は新生児期, 小児期発症で、下位運動ニューロン障害を来す。球症状は呈さない。ALS は成人発症で、上位下位運動ニューロン障害を来し、球症状を呈する。SMN 蛋白質低下が共通の疾患メカニズムであるとした場合、両者の臨床症状の差異を説明する必要がある。この理由としては両者の発症年齢における ‘Ribostasis’ を考慮する必要がある。

神経系の各々のシステムの多様性は、システムを形成する細胞の RNA の多様性 (mRNA や non coding RNA , snRNA などの機能的 RNA の量的、質的多様性) により影響をうける。このシステム特異的な RNA の多様性を維持する RNA 代謝機構を ‘Ribostasis’ と呼ぶ¹⁵⁾。Ribostasis は各神経組織、発生段階、年齢により異なると考えられる。実際に snRNA の発現量は出生後の短期間で大きく変動する⁶⁾。幼小児期, 成人後のそれぞれで、SMN 蛋白質の減少が Ribostasis に与える影響が異なることが、SMA, ALS で罹患組織が異なる一因と考えることもできる。

SMN 遺伝子 の CNV は SMN 発現に影響するが、これには地域差、人種差が存在する¹⁶⁾。このことは ALS における SMN CNV の影響が、報告により様々ある理由の一つと考えられる。我々の解析では、*SMN2* 遺伝子の減少が、ALS の発症リスクとなった。これは韓国からの報告と一致している¹²⁾。地理的、遺伝学的に近いと考えられる、本邦と韓国からの報告が同様の結果となったことは、SMN CNV の地域差と、疾患リスクとの関係を裏付けるものといえる。

本検討では、CNV解析には Droplet digital PCR (ddPCR : Bio Rad 社)を用いた。ddPCR法では、反応液中の目的遺伝子の量を絶対定量する事が可能である。従来用いられる real-time PCR 法や Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法と比較した場合、正確性に優れることが大きな利点である。さらにライゲーション反応が不要であるため、短時間で解析が終了する利点がある。

1. Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2013
2. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, et al. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med.* 2013;5:221-234
3. Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 2007;8:340-345
4. Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:597-609
5. Lotti F, Imlach WL, Saieva L, et al. An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell.* 2012;151:440-454
6. Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, et al. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell.* 2008;133:585-600
7. Wirth B, Brichta L, Schrank B, et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet.* 2006;119:422-428
8. Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, et al. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol.* 2003;54:647-654
9. Dal Mas A, Rogalska ME, Bussani E, et al. Improvement of SMN2 Pre-mRNA Processing Mediated by Exon-Specific U1 Small Nuclear RNA. *Am J Hum Genet.* 2015;96:93-103
10. Corcia P, Camu W, Halimi JM, et al. SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for

sporadic ALS. *Neurology*. 2006;67:1147-1150

11. Blauw HM, Barnes CP, van Vught PW, et al. SMN1 gene duplications are associated with sporadic ALS. *Neurology*. 2012;78:776-780
12. Lee J-B, Lee K-A, Hong J-M, et al. Homozygous SMN2 deletion is a major risk factor among twenty-five Korean sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Yonsei medical journal*. 2012;53:53-57
13. Corcia P, Ingre C, Blasco H, et al. Homozygous SMN2 deletion is a protective factor in the Swedish ALS population. *Eur J Hum Genet*. 2012;20:588-591
14. Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, et al. Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab Chip*. 2011;11:2167-2174
15. Ramaswami M, Taylor JP, Parker R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*. 2013;154:727-736
16. Sangare M, Hendrickson B, Sango HA, et al. Genetics of low spinal muscular atrophy carrier frequency in sub-Saharan Africa. *Ann Neurol*. 2014;75:525-532