

## 論文の内容の要旨

論文題目 SMN1 Gene Dosage Analysis and  
Molecular Pathology Testing for Autosomal  
Recessive Spinal Muscular Atrophy

和訳 常染色体性劣性脊髄筋萎縮症における  
SMN1 遺伝子定量解析と分子病理学的検査

指導教官 深山 正久 教授

東京大学大学院医学系研究科  
平成5年4月入学医学博士課程 病因病理学専攻

氏名 荻野 周史

### 背景と目的

約94%の常染色体性劣性脊髄筋萎縮症（以下、SMA）患者は両方の第5番染色体(5q13)にあるSMN1遺伝子を欠く。大多数のSMAキャリアーはSMN1を1コピーのみ持つが、時に2つSMN1コピーを持つキャリアーも存在する。それらは、遺伝子欠失キャリアーのもう一つの第5番染色体に2コピーSMN1が存在する（2コピーアレル）ため、あるいは遺伝子内の小さい変異（非欠失性変異アレル）を持つキャリアーによる。この研究の第一目的は種々のSMN1正常および異常アレルの頻度と de novo 突然変異率を計測し、SMN1遺伝子定量解析—SMAキャリアー遺伝子検査における偽陰性度推定に役立てることである。SMN1遺伝子定量解析はSMN1とSMN2のPCR増幅の後、制限酵素DraIによるSMN2消化により、

SMN1 と SMN2 を区別する。しかし、PCR の最終サイクル中に形成する SMN1/SMN2 異性体二重鎖は制限酵素により消化されず、SMN1 のみかけの信号強度を上げ、SMN1 遺伝子定量検査に影響を与える可能性がある。この SMN1/SMN2 二重鎖の定量解析を行なうのが第二の目的である。第三の目的は種々の (SMN1 コピー数) : (SMN2 コピー数) (以下、n1:n2) の遺伝子型の頻度を一般人や SMA の様々なキャリアーにおいて測定することである。

## 方法

180 人の SMA の家族歴のない健常人と 102 人の SMA 患者の両親を対象として、蛍光標識プライマーを用いた SMN1 遺伝子定量解析により SMN1 コピー数が求められた。この SMN1 遺伝子定量解析は SMN1 と SMN2 の PCR 増幅の後、制限酵素 DraI による SMN2 消化により、SMN1 と SMN2 を区別するほか、同時に CFTR gene、一定量試験管に加えられた SMN internal standard と CFTR internal standard を PCR 増幅、定量し、さらにその後、5 つの SMN1 2 コピーのコントロールを使って、SMN1 の信号強度を修正し (NA3 を得た)、SMN1 コピー数を定める。SMN2 のコピー数は SMN1 と SMN2 の信号強度の比較により求められた。他の文献のデータと統合することにより、種々の SMN1 の正常と異常アレルの頻度と SMN1 の de novo 突然変異率が定められた。SMN1/SMN2 二重鎖定量のためには対象の 273 人の SMN1 と SMN2 のコピー数を求め、種々の n1:n2 の遺伝子型のグループにわけて、修正された SMN1 信号強度 (NA3) を 2 : 0 グループの NA3 と比較し、NA3 の見かけ上の偏位から SMN1/SMN2 二重鎖の量を計算した。n1:n2 の遺伝子型の頻度の測定と比較には、偏りを避けるために 177 人の SMA の家族歴のない健常人と 105 人の SMA 患者の両親を対象とした。

## 結果

家族歴のない 180 人の SMN1 コピー数の分布は以下のようであった。1 コピー 3 名、2 コピー 164 名、3 コピー 11 名、4 コピー 2 名。102 人の SMA 患者の両親の SMN1 コピー数の分布は以下のようであった。1 コピー 96 名、2 コピー 6 名 (うち 1 コピーアレルを二つ持つ者 2 名、2 コピーアレルと 0 コピーアレルをあわせ持つもの 4 名)。おおよその SMN1 アレルの頻度は次の

如くであった。0コピー（欠失変異）アリアル頻度=0.0097、非欠失変異アリアル頻度=0.00030、1コピーアリアル頻度=0.95、2コピーアリアル頻度=0.038。この結果、キャリアーであって2コピーのSMN1を持つ頻度は1/15（=2コピーアリアルを持つ頻度1/26+非欠失変異を持つ頻度1/34）と計算された。これにより、検査前のキャリアーである確率を用いて、SMN1遺伝子定量解析—SMAキャリアー遺伝子検査において2コピーの結果が得られたのにもかかわらずまだキャリアーである確率、即ち偽陰性の確率が計算できることになる。またde novo突然変異率は1/5000 live birth（父親からの場合）と1/14000 live birth（母親からの場合）であった。SMN1/SMN2二重鎖形成はSMN1コピー数が一定の場合、SMN2コピー数が増えるに従って増大する。どのSMN2のあるグループも2:0グループと比較した際、有意にSMN1の信号強度(NA3)が高く、SMN1/SMN2二重鎖の存在が裏付けられた。種々のn1:n2グループにおけるSMN1/SMN2二重鎖定量結果と比較は次の如くであった。26%（2:3グループ、N=4）対11%（2:2グループ、N=81）（ $p < 0.001$ ）。11%（2:2グループ）対5%（2:1グループ、N=53）（ $p < 0.0001$ ）。5%（2:1グループ）対0%（2:0グループ、N=14）（ $p = 0.023$ ）。19%（1:3グループ、N=18）対14%（1:2グループ、N=57）（ $p = 0.044$ ）。14%（1:2グループ）対11%（1:1グループ、N=27）（ $p = 0.14$ ）。n1:n2遺伝子型では、一般健常人においては2:2グループが最も多く（N=89、50%）、以下2:1グループ（N=60、34%）、2:0グループ（N=10、6%）、3:1グループ（N=9、5%）と続く。3:1グループ（N=9）は全ての3コピーSMN1の対象（N=11）の中で高頻度であり、SMN2からSMN1への遺伝子変換の仮説を裏付けることになった。また1:3グループ（N=16）や1:4グループ（N=1）も全ての1コピーSMN1の対象（N=103）の中で比較的高頻度であり、SMN1からSMN2への遺伝子変換の仮説の裏付けとなった。SMA I型家系とSMA II型 III型家系を比較すると1:1グループはよりSMA I型家系に多く（38%対16%）（ $0.05 < p < 0.10$ ）、1:3と1:4グループはよりSMA II型とIII型家系に多かった。（37%対13%）（ $0.05 < P < 0.10$ ）。

## 結論

SMN1 遺伝子定量解析と計算された SMN1 アリール頻度により、SMA キャリアー検査における偽陰性の確率の算出が可能となる。SMN1/SMN2 異性体二重鎖形成は SMN1 コピー数が一定の場合、SMN2 コピー数が増えるに従い増大し、SMN1 の見かけ上の信号強度を増大させる。SMN1 の信号強度を修正する目的で使われる 2 コピー SMN1 のコントロールの選定には、SMN2 のコピー数も考慮する必要がある。なぜならこうした 2 コピー SMN1 コントロールの SMN1 の信号強度も SMN2 のコピー数の影響を受けるからである。こうした異性体二重鎖形成は、類似した二つの鋳型を使った PCR 増幅一制限断片多形性を使った定量解析で常に念頭に入れておく必要がある。SMN1 と SMN2 遺伝子定量解析の結果は、SMN2 から SMN1 への、または SMN1 から SMN2 への遺伝子変換の仮説を裏付けするものであった。最後に SMN1 と SMN2 遺伝子定量解析は将来、胎児等の SMA の型の推定に有用な可能性がある。