

200 936099A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

コケイン症候群の実態把握および治療と
ケアの指針作成ための研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久保田 雅也

平成22（2010）年3月

目次

[I] 総括・分担研究報告書

研究代表者	久保田雅也	1
研究分担者	杉田克生	7
研究分担者	林 雅晴	10
研究分担者	田沼直之	11
研究分担者	熊田聡子	13
研究分担者	星野英紀、研究協力者 中根裕信	15

[II] 参考資料

一次アンケート	17
二次アンケート	18

[III] 研究成果の刊行に関する一覧表 22

[IV] 班員名簿 24

[I] 総括・分担研究報告書

総括研究報告書

コケイン症候群の実態把握および治療とケアの指針作成ための研究

研究代表者 久保田雅也 国立成育医療センター 神経内科 医長

研究要旨 全国の小児科臨床研修認定施設、小児病院、療育施設合計 921 病院にコケイン症候群 (CS) 生存例および過去の死亡例についての一次調査を行った。合計 674 病院から回答を得た (回収率は 73.2%)。この結果コケイン症候群生存例 34 名、死亡例 39 名という結果が判明した。現在までのところコケイン症候群生存例 16 名 (CSI 型 13 名、CSIII 型 3 名)、死亡例 15 名 (CSI 型 13 名、CSII 型 2 名)、合計 31 名の臨床経過が集積され、CSII 型および CSIII 型の発症頻度は CSI 型の約 1 割であることが判明した。

A. 研究目的

Cockayne 症候群 (CS) は常染色体劣性遺伝疾患であり、頻度は 100 万人に 1 人程度とまれな疾患である。近年、DNA 修復機構の一つであるヌクレオチド除去修復異常、特に転写と共役した DNA 修復の異常であることが明らかになっている。臨床的には光線過敏、早老、低身長、精神運動発達遅滞、小脳失調、網膜色素変性など多彩な症状を呈し、精神運動発達遅滞は必発である。従来、発症年齢と症状の重篤度により、古典型 (1 型) と重症型 (2 型) とに分けられていたが、近年、より軽症で発症年齢の遅い 3 型の報告がなされている。

これまで世界で 200 例以上の報告があるが、日本における診療実体は不明である。CS は古典型とされる CSI 型、新生児期、早期乳児期

より症状が出現し、重症型とされる CSII 型、より軽症の経過をたどる CSIII 型に分類される。本研究では日本における CS の発生頻度、各病型における多様な症状の出現の年齢依存性、診療の実態、また死亡例の検索から死因の解析を行い、治療およびケアのための指針の基礎データとし、患者家族の QOL の改善を目指すものである。

B. 研究方法

全国の小児科臨床研修認定施設、小児病院、療育施設合計 921 病院にコケイン症候群生存例および過去の死亡例についての一次調査を行った。一次調査のハガキを別掲した通りである。二次調査は患者有りとの回答を得た病院・施設に別掲の二次調査票を送付した。二次調査は新生児、乳児期の発達から合併症、診断の詳細、診療の詳細

細、死亡していれば死因を尋ねるものである。

C. 研究結果

合計 674 病院から回答を得た（回収率は 73.2%）。この結果コケイン症候群生存例 34 名、死亡例 39 名という結果が判明し、現在二次調査の回収および解析を行っている。現在までのところコケイン症候群生存例 16 名（CSI 型 13 名、CSIII 型 3 名）、死亡例 15 名（CSI 型 13 名、CSII 型 2 名）、合計 31 名の臨床経過が集積され、CSII 型および CSIII 型の発症頻度は CSI 型の約 1 割であることが判明した。死亡例 15 名の死亡時平均年齢は 18.3 才、平均体重は 8.4kg と著明な成長障害を認め、8 名は著明な腎不全が死因に関係し、4 名は重症肺炎が死因であった。拡張型心筋症が 2 名にみられた。これに対し生存例 16 名の平均年齢は 22.3 才、平均体重は 19.5kg、腎機能低下は 1 名のみであった。生存例では歩行可能 10 名中 8 名、有意語 10 名中 7 名を認めたが、死亡例では歩行可能 12 名中 6 名、有意語 12 名中 6 名とわずかだが差を認めた。

運動発達については CSI 型生存例 9 人中（平均 18.3 才。6-38 才）8 人が歩行可能であった。そのうち 6 人が下肢深部反射亢進、3 人が足クローヌス陽性、2 人が Babinski 反射陽性、下肢深部反射が低下-消失した 1 人も足クローヌス、Babinski 反射は陽性であった。全例に下肢関節抗縮、尖足を認めた。側彎は 1 例のみ、ジストニア、ミオクローヌスなど不随意運動は全例で認めず。手指振戦は 3 例に認めた。また CSI 型死亡例 12 人中（平均 18.8 才。14-26 才）8 人が歩行可能であったが徐々に退行し移動不能になる例が多かった。そのうち 6 人が下肢

深部反射亢進、1 人が足クローヌス陽性、3 人が Babinski 反射陽性、関節抗縮は 11 例、側彎は 3 例に認めた。末梢神経伝導検査は解析するほどのデータが得られず。

CSII 型死亡例 2 例において 1 例は眼振、手指振戦を有し下肢深部反射は亢進、Babinski 反射陽性であったが、他の 1 例は眼振を認めず、手指振戦を有し下肢深部反射は消失し Babinski 反射陰性であった。いずれも関節抗縮、尖足を認めた。この 2 例は同様の末梢神経伝導速度の低下を認めた。

CSIII 型 2 例（双胎）では歩行障害の顕在化した 20 才前後では筋トーンは上下肢でやや低下、深部反射は上下肢で低下、Babinski 反射陰性、上下肢深部感覚障害あり、関節抗縮あり（尖足、肘外反）、28 才での所見は自力での立位保持不可、四肢の筋緊張亢進あり。rigidity あり。関節拘縮、変形あり。振戦あり。深部反射は消失、Babinski 反射は陽性であった。末梢神経伝導速度は遅延、針筋電図では脱神経所見、末梢神経生検では有髓線維減少、硝子化様の線維化、変性を認めた。

約 8 割の患者が小児科以外にてんかん発作のための小児神経科、抗縮予防や良姿勢維持のためのリハビリ科、齲歯治療のための歯科口腔外科、腎不全のための腎臓内科、糖尿病などのための内分泌科、難聴フォローのための耳鼻咽喉科、視機能フォローのための眼科など多くの科でのフォローを受けていることが判明したが、その包括化、体系化の必要性が重要と思われた。

以上の中で典型的な経過を示していると思われるコケイン症候群 1-3 型の 3 名の発達の詳細を示す。

【症例 1：コケイン症候群 I 型】

11歳女児。9歳の妹が同疾患と診断されている。満期産、3438gで出生。定頸3か月、座位保持8か月、つかまり立ち1歳2か月、独歩2歳10か月、有意語1歳5か月と運動発達遅滞を認めた。10m程度の歩行は可能であったが、痙性が強く、失調様であった。3歳で独歩不可能となり、ものをつかむ時などに四肢振戦が出現した。運動神経伝導速度(MCV)の上下肢での低下、CTでの基底核石灰化を認め、CSと診断された。5歳時に当院に紹介された。初診時、四肢は痙性で独歩不可能、上肢の運動失調あり。手をひかれての歩行は可能。視力、聴力障害はなし。顔貌は老人様ではなかった。身長94cm(-2.7SD)、体重11.7kg(-2.4SD)、頭囲44cm(-3.4SD)。6才時下肢尖足、深部反射亢進、Babinski反射陽性。経過中に難聴の進行あり、10歳時より補聴器を使用。同時期に眼科では網膜色素変性、白内障の進行を指摘されている。疲れで経口摂取量が容易に減少するため、年に数回、入院や外来での点滴を要する。CSに特徴的な老人様顔貌も年齢とともに明らかになった。現在、有意語は消失し、眼振なし、下肢尖足抗縮で歩行不可、深部反射消失。

【症例2：コケイン症候群 II型】

在胎41週、出生時体重2472g、身長44cm、頭囲31cm、頭位自然分娩にて出生。仮死なし。哺乳障害なし。定頸4か月、寝返り5か月、追視、音への反応あり。下肢、特に足関節の緊張はやや亢進していた。10か月時寝返りで移動できた。深部反射は全般に低下。座位保持不可。日さしの強い日には眼の周囲、頬部に発赤ができた。

11か月時身長61cm(-4SD)、体重5695g

(-3.5SD)、頭囲36cm(-4SD)。特徴的な顔貌、運動発達遅滞、光線過敏(頬部)、難聴(ABRは両側III波以降導出不良)、末梢神経障害(正中神経伝導速度:MCV 32.1m/s,SCV 26.9m/s)からCSを強く疑われた。頭部CT上の石灰化は認めず(図1)。

1才~1才6か月時手で支えての座位、寝返りでの移動がスムーズになる。上肢の振戦あり。音に対する反応は遅い。下肢のrigidityが目立つ。

2才時両上肢を腹臥位ですべて移動可能になる。呼ぶと振り向く。足関節の拘縮を認める。

2才6か月時音への反応が悪くなった。60dBの聴力損失。津守式でDQ37。バイバイがわかり、よく笑う。ABR上II波まで確認(図1)、補聴器装用で音への反応が改善した。3才時体重6270g、身長68.2cm、頭囲38cm。座位の姿勢で前方へ移動、つかまり立ち可能となる。尖足が目立ち、しゃがみ込むことはできず。やや発声が増えるも単語は出ず。齲歯多数。頭部CT上基底核に石灰化を認め(図1)、CSと確定。

4才時頭囲38cmと変わらず。体重5760g。はいはいはできず。眼振はないが、上肢の振戦あり。聴力損失85-95dB。補聴器装用で50-70dB。高音域の損失が大きい。名前を呼ぶと笑い右手を上げる。発声が増える。5才時体重5345g。腹臥位で下肢を伸展し、肘を使ってずりばいをする。足関節、股関節の拘縮が目立つ。単語は出ないが、パ行、バ行の表出、TVを見ての模倣、バイバイの模倣が可能となる。「ちょうだい」、「食べたい」などをジェスチャーで表す。活発で表情もよい。右手をよく使うようになる。粗大運動の低下に比べると微細な運動はまだ保

たれている。睡眠覚醒リズムは規則的である。

6才時視力0.1。体重4980g。食事摂取量が減ってくる。皮膚がたるみやせが目立つようになる。腎機能悪化、BUN 35.8mg/dl, Cr 0.78mg/dl。

7才時 臥床状態で下痢が続き、経口摂取量も減少傾向にあった。誤嚥性肺炎で入院。腎不全悪化。一日尿蛋白 549mg, 収縮期血圧は90-150の間を変動、呼吸不全となり死亡。

【症例3：コケイン症候群 III型】

30歳女性。双子の妹も同疾患と診断されている。独歩はやや遅かったが明らかな精神運動発達の遅れはなく、小学校低学年ころまでは普通に運動できていた。小学校高学年頃より運動が苦手になり、学業成績も落ちてきた。18歳時、歩行のふらつきが明らかになり、病院受診するも診断には至らなかった。24歳、紫外線感受性試験でCS1型と正常の中間の感受性であり、CS3型と診断された。手指振戦が出現、徐々に下肢関節拘縮が進行し歩行困難となり、28歳で車いす使用となった。現在、座位の保持は困難である。食事は全量経口摂取可能であるが摂取量は落ちてきている。

D. 考察

本研究から約8割のCSの患者が小児科以外に小児神経科、リハビリ科、歯科口腔外科、腎臓内科、内分泌科、耳鼻咽喉科、眼科を併診していることが判明した。今後各科の診療内容の詳細な解析によりケアの指針作成を行う。末梢神経、中枢神経ともに退行して行く疾患であるが、予後を規定する因子として栄養や、

腎機能が重要である。特に腎不全は死亡原因として最も多く綿密なフォローと治療体系が必要と思われた。

本研究のデータが治療およびケアのための指針作成の基礎データとなると考えられる。国際的にも小規模の患者団体での調査はあるがCS患者のその時々ニーズがどこにあるかを全国規模で行った調査は今回が初めてであり、社会的意義も大きい。今後さらに各病型における多様な症状の出現の年齢依存性、診療の実態、また死亡例の検索から死因の詳細な解析を行い、治療およびケアのための指針を作成する。稀少難病故の患者家族の孤立や医療者側の情報不足も予想され、本研究による治療およびケアのための指針は患者家族、医療者双方に有用であると考えられる。本研究の指針作成は早期老化を特徴とする疾患のトータルケアの範型ともなりうるものであり、本症候群のみでなく多臓器にわたる多彩な症状に苦しむ重症心身障害児・者のケアにも有益な情報を与えるものである。

運動発達の経過でみるとCSの3病型の違いは明らかである。I型は一旦自力歩行可能な時期もしくは介助歩行可能な時期がありその後徐々に退行していく。II型の移動はずりばいまででつかまり立ちができて立位での移動は不可能である。III型は自力歩行可能で通常運動能力を示す時期が少なくとも10代中盤まで続きその後ゆっくりとした退行を認める。

大脳白質および皮質、基底核、小脳、末梢神経が多系統に障害されるCSの運動発達を単一の系統の病態で説明することは不可能である。錐体路を含む大脳白質による痙性、および末梢神経障害による筋萎縮、筋力低下、変形拘縮、感覚性失調が複合して

歩行機能が低下、さらに小脳病変が関与した運動のタイミングの拙劣さ、基底核が関与した筋緊張制御の異常がこれを修飾悪化させると考えられる。小脳萎縮や基底核の石灰化は高度であるが病型による差はほとんどない。より下流が既に機能不全の場合、小脳や基底核の病態への関与の評価は困難であるが、少なくともCSI型は基底核の石灰化が強い段階でも歩行可能であり錐体路を含む大脳白質および末梢神経障害が歩行障害の主要因であろう。ABRの経時的変化でも中枢から末梢への病理（上部脳幹から聴神経）の進行が報告されている。CSII型の初期乳児期の発達は決して悪くなく（上記）、1才1か月のMRI上髄鞘化に特に問題はなかった（図1）。CSの経過は停滞ではなくまさに退行である。錐体路を含む大脳白質および末梢神経障害の強度と分布、経時的変化の速度が3病型を決定するのであろう。

今回の研究をもとにCSの病態の全貌（特に分子遺伝学的、神経生理学および病理学的検討により）に迫る中・長期的な課題も策定された。

1. 酸化ストレスマーカーの測定と解析：CS患者由来の細胞は紫外線以外に活性酸素による酸化的DNA損傷に対して高感受性を示し、その修復能も低下している。今回の少数例の尿を用いた酸化ストレスマーカーおよび抗酸化能の解析で本疾患の病態と酸化ストレスの関連が示唆されたのでさらに症例数を増やして検討する。抗酸化剤による治療の基礎的データとなることが期待される。

2. CSの分子遺伝学的解析：CSの責任遺伝子はCSA, CSBが知られているがそれぞれの遺伝型と表現系を検討し病態の重症度を決定する因子につき検討する。

3. CSモデル動物の解析：XPA欠損マウスはヌクレオチド除去修復能を欠損し、低線量の紫外線照射により高頻度に皮膚癌を発症しその解析はこれまで色素性乾皮症で多くなされているがCSのモデル動物としても検討が重ねられるようになった。その他XPGマウスについても新たなCSモデルとして解析を予定する。

4. 軽症型CSの分子遺伝学的な解析：CSの軽症例小児期には診断がつきにくい、軽少な病態の原因を分子遺伝学的に検討する。

5. CSの不随意運動に対する神経生理学的解析：CS患者の早期からの振戦の機序は不明だが末梢神経、小脳、基底核の関与が想定されるため表面筋電図などの神経生理学的解析によりその本態に迫る。脊髄小脳変性症でTRHの効果が認められるが、本疾患においてもTRHによる治療の可能性を検討する。

6. CSの病理学的検討：剖検例において中枢神経系および他の臓器、特に腎臓、肝臓など症状発現、検査所見の異常を呈しやすい臓器の詳細な検討を行う。

以上のようなCS診断の遺伝学的検討も含めたプロトコールはこれまでになく完成すると多科にかかるCS患者のみでなく医療者にも有用なものとなる。

E. 結論

今回の調査でCSI型26例、CSII型2例、CSIII型3例の詳細な臨床経過が明らかになり、その発生頻度は大凡CSII型およびCSIII型がCSI型の約1割という結果であった。約8割のCSの患者が小児科以外に小児神経科、リハビリ科、歯科口腔外科、腎臓内科、内分泌科、耳鼻咽喉科、眼科を併診していることが判明した。特に腎不全は死亡原因として最も多く綿密なフォローと治療体系が必要と思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

今後発表予定

H. 知的所有権の取得状況

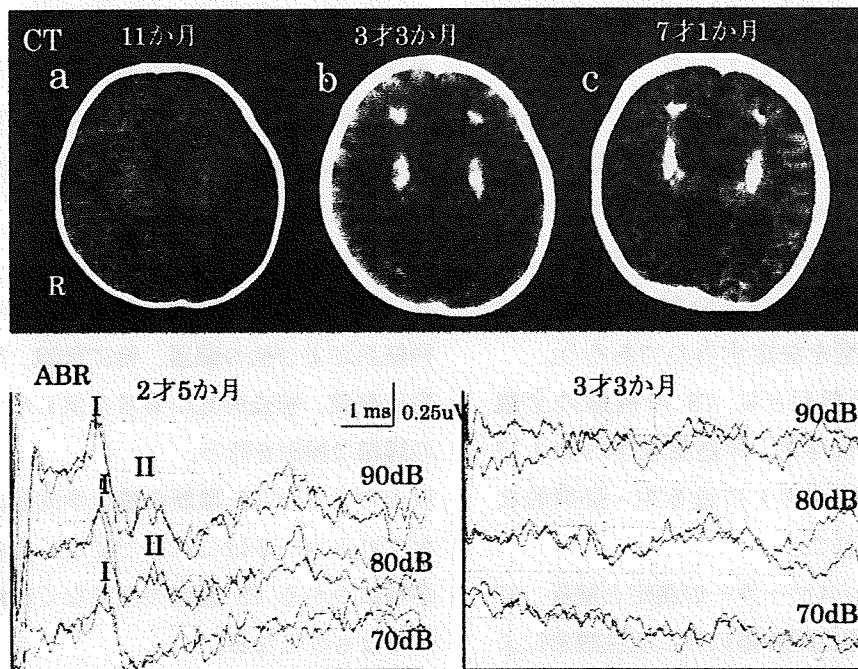
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 症例2：コケイン症候群 II型の頭部CTとABRの推移。



コケイン症候群の実態把握および治療とケアの指針作成ための研究

HSPB-Aによるコケイン症候群紫外線致死耐性化に関する研究

研究分担者 杉田克生 千葉大学教育学部 教授

研究要旨 コケイン症候群（CS）患者における紫外線（UVC）致死感受性を軽減化（UVC耐性化）するヒト生体内生理活性因子の探索を目指し、今回、HSP27結合タンパク HSPB-Aの作用を調査した。その結果、CSBB細胞をHSPB-Aで前処理すると、紫外線致死耐性化することを見出した。

A. 研究目的

コケイン症候群（CS）患者における紫外線（UVC）致死感受性を軽減化（UVC耐性化）するヒト生体内生理活性因子や薬品・食品素材の発見を目指している。すでに、その耐性化をサイトカインの一種であるヒトインターフェロンがCS患者由来培養細胞（CSC）にて示すことを報告している（Sugita K., et al., *Mutat. Res.*, 357, 177-81, 1996）ことより、今回は、サイトカイン様因子の探索を行うこととした。このインターフェロンによる作用メカニズムについては、究極、シャペロンを介して行われるとの示唆を得ており、Heat Shock Protein (HSP)類の関与を見出している。一方、シャペロンないしシャペロンに結合する分子の中には、細胞外への放出や血液中の存在が報告されている。そこで、HSP-Binding Protein (HSPB)に着目し、CSCのUVC耐性化を検証した。本報告では、HSP27結合タンパク HSPB-Aの作用を報告する。

B. 研究方法

(1) 培養ヒト細胞

RSa細胞：UVC致死高感受で、ヒトインターフェロンなどによるUVC感受性のレベルの調節を判定しやすい標準細胞である。ヒト胎

児より得た繊維芽細胞をSimian virus 40とRous Sarcoma virusで感染後樹立された細胞株である（Suzuki N., et al., *Mutat. Res.*, 202, 179-83, 1988）。

CSC細胞：英国MRC Genome Damage and Stability CentreのProf. LehmannよりCS transformed cells(CS3BES3G細胞、今回の報告ではCSBBと略記)を提供され、実験に用いた（Mayne L.V., et al., *Exp Cell Res.*, 162, 530-8, 1986）

(2) 細胞培養

牛胎児血清を10%(w/w)と抗生物質（100 µg/mLストレプトマイシンと100 units/mLペニシリン）を含むminimum essential medium (MEM) 中で培養した。ただし、RSa細胞用には、牛血清を用い、5% (w/w)含有とした。直径100 mmディッシュ（コーニング細胞培養用ディッシュ）を使用した。

(3) UVC照射

254nmの波長を主として発生する紫外線ランプ（6-W National germicidal lamp, 1 J/m²/sec）を使用し、線量はUV radiometer (UVR-254, 東京光学機械)を使用し測定した。細胞への紫外線照射は、培養液を除き、phosphate buffer saline (PBS) でディッシュを洗った後、PBSを除いた状態で行った。

(4) HSPB-Aタンパク質の精製

大腸菌にて、次のような方法で作製した組換え体タンパクを使用した。PCR 増幅した HSPB-A cDNA を GST 融合型組換えタンパク質発現ベクター pGEX6P(GE ヘルスケアバイオサイエンス)に挿入した。このプラスミドを大腸菌 BL21 株へトランスフォーメーションし、0.2 mM IPTG 存在下で GST-HSPB-A タンパク質を発現させた。大腸菌より細胞ライゼートを抽出し、これをグルタチオンセファロース 4B カラム(GE ヘルスケアバイオサイエンス)にアプライした。カラムに吸着した GST-HSPB-A タンパク質は、Precission Protease (GE ヘルスケアバイオサイエンス)を用いてカラム内で GST と HSPB-A に限定分解させた後、HSPB-A のみを溶出した。次いで、10 mM グルタチオンを含む溶液で、GST を溶出した。精製した、HSPB-A および GST は、透析した後、ポアサイズ 0.22 μ m のフィルターで滅菌し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。このタンパクを UVC 照射前 0.2 μ g/ml で 24 時間メディウム中へ添加した。比較タンパクとして GST を用いた。

C. 研究結果

(1) RSa 細胞における耐性化

RSa 細胞の UVC 致死感受性は、 D_{010} 値が 1.9 J/m^2 である (図 1)。ところが、HSPB-A 前処理により、 D_{010} 値が 2.7 J/m^2 と増大化し、致死耐性化した。

(2) CSBB 細胞における耐性化

CSBB 細胞の UVC 致死感受性は、 D_{010} 値が 2.5 J/m^2 である (図 2)。ところが、HSPB-A 前処理により、 D_{010} 値が 4.0 J/m^2 と増大化し、致死耐性化した。

D. 考察

RSa 細胞は、DNA 修飾複製能力のレベルが HeLa 細胞や正常組織由来細胞と比較し、

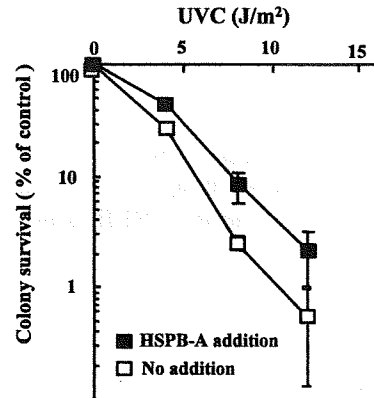


図 1 HSPB-A 前処理による RSa 細胞の紫外致死線耐性化

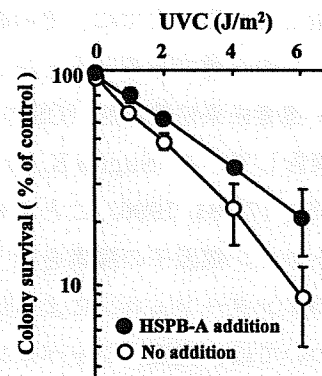


図 2 HSPB-A 前処理による CSBB 細胞の紫外致死線耐性化

約 1/2 に低下している細胞であり、ヒトインターフェロンは、その低レベルの修復能力を上昇させることが見出されている (Suzuki N., *Mutat. Res.*, 175, 189-93, 1986)。また、CS 細胞は、DNA 修復に関わる分子の欠損が知られている。従って、CS 細胞で欠損している分子が関わる以外の DNA 修復経路の活性化が HSPB-A により、もたらされている可能性がある。今後、その経路を探索したい。また、HSPB-A がヒト血清中に存在するか否

か、もし存在するなら CS 患者の血清中の濃度はどの程度かを調査する必要がある。その上で、HSPB-A がヒト体液中の生理活性因子として機能する場合、その機能を高めることによる治療法の開発も、一つの可能性と考えられよう。一方、HSPB-A やインターフェロンの作用と類似の化合物が、薬品・食品の中に存在するか否かを調査する必要もある。特に、植物中に存在する可能性を追究している。植物は、太陽光紫外線による傷害に対応して生存してきたと考えるからである。

E. 結論

紫外線感受性の RSa 細胞および CSBB 細胞を HSPB-A で前処理すると、紫外線致死耐性化した。HSPB-A による致死抵抗化のメカニズムは未だ不明であるが、CS 細胞で欠損している分子が関わる以外の DNA 修復経路の活性化が HSPB-A により、もたらされている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Torii M, Shimoyama I, Sugita K.,
Phonemic and semantic working memory in information processing in children with high function pervasive developmental

disorders. IMJ Vol 17, No 1, 35-39, 2010.

2) Sugita K, Suzuki N, Oi K, Allen-Tamai M, Sugita Ki, Shimoyama I. Cross-Sectional Analysis for Matching Words to Concepts in Japanese and English Languages. IMJ Vol 17, No 1, 41-45, 2010.

2. 学会発表

田尾克生他：右片麻痺を呈した進行性顔面半側萎縮症の 3 歳男児、第 51 回小児神経学会関東地方会、2009/9/19

塩浜直他：酵素補充療法をおこなった糖原病 II 型の 1 例、第 21 回千葉県小児神経懇話会 2009/11/14

水落弘美他：結節性硬化症における MRI 画像所見—結節様嚢胞病変について—、第 21 回千葉県小児神経懇話会 2009/11/14

G. 健康危険情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

コケイン症候群の実態把握および治療とケアの指針作成ための研究

コケイン症候群の中枢神経病理所見、および他の臓器病理所見の解析
分担研究者 林 雅晴 東京都神経科学総合研究所神経発達・再生

研究要旨 コケイン症候群（CS）では脳血管病変の合併が指摘されている。CS の神経症状の解析を目指して剖検脳で脳血管異常の免疫組織化学的検討を進めた。5 CS 症例と 9 対照の前頭葉と線条体・淡蒼球の連続切片において、Elastica van Gieson 染色ならびに Collagen Type IV、CD34、アクアポリンに対する免疫組織化学染色を行い評価した。文献で報告されている毛細血管のねじれが大脳白質内に見出された。さらに高齢対照に類似した毛細血管密度と軟膜下小動脈分枝の増加が認められ、脳血管病変や早発老化との関連が示唆された。

A. 研究目的

Cockayne 症候群（CS）は転写関連の塩基損傷修復機構の遺伝的欠損により生じ、発育障害、老人様顔貌、日光過敏症、白内障、網膜色素変性、感音性難聴、末梢神経障害、腎障害などが見られる。さらに神経病理では脳萎縮、大脳白質・基底核での石灰化、髄鞘脱落が見られ、硬膜下血腫や脳血栓などの脳血管病変の合併も指摘されている。CS の剖検脳において脳血管異常に関する免疫組織化学的解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

5 CS 症例（死亡時年齢 7～18 歳）および中枢神経系に異常が見られない 9 対照（死亡時年齢 9～71 歳）の前頭葉と線条体・淡蒼球の連続切片において、Elastica van Gieson (EVG) 染色ならびに Collagen Type IV (Col4)（基底膜マーカー）、CD34（内皮細胞マーカー）、アクアポリン(AQP)4（脳血液関門の形態的指標）に対する免疫組織化学染色を行い評価した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は東京都神経研と協力医療機関の倫理委員会から承認されている。生体資料・剖検脳の収集ならには治療にあたっては十分な説明の上での書面による同意を患者家族から受けている。

C. 研究結果

EVG・Col4・CD34 染色ともに、CS 症例では対照と比較して、肥厚した軟膜下に小動脈の分枝が増加していた。さらに大脳白質内に縦走する毛細血管に異常なねじれが認められたが、髄鞘病変との関係は明らかでなかった。次に前頭葉 CD34 染色切片において 0.5 mm² 当たりの毛細血管密度を計測した。対照では加齢に応じて毛細血管密度の緩徐増加が認められた。CS 剖検例での毛細血管密度は、死亡時年齢が 20 歳未満であったにもかかわらず、高齢対照を上回る増加傾向を示した。加えて CS 剖検例では線条体に見られる異常石灰化周囲にも血管増生が認められた。一方、AQP4 染色では、脳血液関門を形成するアストロサイトの突起が CS 剖検例でも対照と同

様に濃染していたが、異常な染色構造は見られなかった。

D. 考察

Rapin らは CS 成人例の脳において、脱髄を示す大脳白質でのちりめん状の毛細血管（string vessel）増加を指摘している。今回の検討でも大脳白質内に毛細血管のねじれが見出されたが、髄鞘病変との関係は明らかではなかった。さらに高齢対照を凌駕する毛細血管密度と軟膜下小動脈分枝の増加が認められ、硬膜下血腫や脳血栓などの脳血管病変の誘因になりうる可能性が示唆された。さらに CS において推定されている早発老化との関連も想定された。今後、ヌクレオチド修復機構の遺伝的欠損により CS と同様に多彩な神経異常を呈する色素性乾皮症剖検例においても脳血管異常に関する免疫組織化学的解析を行い、CS での解析結果との比較を行う。

E. 結論

死亡時年齢 20 歳以下の CS 剖検例において、毛細血管の異常なねじれ、毛細血管密度の増加、軟膜下小動脈分枝の亢進が明らかになり、CS 患者での脳血管病変合併や早発老化との関連が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 林雅晴. 色素性乾皮症・コケイン症候群の神経変性機序と治療の試み. 医学のあゆみ 2009;228:143-6 (レビュー).
- 2) 林雅晴. 脳発達障害と酸化ストレス. 日本小児科学会雑誌 2009;113: 657-66 (レビュー).

2. 学会発表

- 1) 林雅晴ら. A 群色素性乾皮症剖検脳での知的障害に関する免疫組織化学的解析 (第 2 報). 第 51 回日本小児神経学会総会、米子 (2009, 5.30).

H. 知的所有権の出願・取得状況

（予定を含む）

該当するものは無い。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
分担研究報告書

コケイン症候群の実態把握および治療とケアの指針作成のための研究

コケイン症候群の病態と酸化ストレスの関連についての研究
研究分担者 田沼 直之 都立府中療育センター小児科医長

研究要旨 色素性乾皮症（XP）やコケイン症候群（CS）の神経変性には、酸化ストレスが関与しているという仮説を立て、XP・CS患者の尿を用いて酸化ストレスマーカー解析を行った。XP・CSともに年齢が進むにつれ、酸化ストレスマーカーが上昇していく傾向がみられたことから、両者の神経変性には酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

色素性乾皮症（XP）・コケイン症候群（CS）はともに DNA 修復機構に先天的な異常があり発症する疾患である。XP では光線過敏症、皮膚癌に加えて、半数以上の群で進行性の神経症状を呈し、CS でも小頭症、小脳失調、難聴など多彩な神経症状がみられる。我々はこれまでに剖検脳での神経病理学的解析を通じて、XP・CS患者の神経変性での酸化ストレスの関与を明らかにしてきた。今回尿中酸化ストレスマーカーの測定を行い、両者を比較検討した。

B. 研究方法

対象は A 群 XP（XPA）9 例（7～29 歳）、D 群 XP（XPD）1 例（13 歳）、CS 5 例（8～29 歳）で、採取した尿中の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）（DNA 酸化障害マーカー）、ヘキサノイルリジン付加体（HEL）（脂質酸化障害マーカー）、抗酸化能 potential anti-oxidant（PAO）を ELISA キット（日本老化制御研究所製）を用いて測定した。8-OHdG、HEL は尿中クレアチニン値にて補正し、正常対照の測定値の平均値+

2SD を cut off 値とした。

（倫理面への配慮）

倫理委員会での承認ならびに保護者から書面での同意（インフォームド・コンセント）を得て尿を採取した。

C. 研究結果

XP 例で対照に比べ尿中 8-OHdG・HEL 値の有意な上昇を認めた。8-OHdG・HEL 値上昇を示した XPA4 例中 1 例と XPD1 例で PAO が軽度低下していた。XPD1 例での HEL 上昇・PAO 低下は年齢が長じるにつれて正常化した。一方 CS 例では、年長例 2 例において HEL 値の上昇を認め、うち 1 例は抗酸化能の低下がみられた。8-OHdG 値は CS5 例中 1 例のみ上昇していた。

D. 考察

XP・CS ともに年齢が進むにつれ、酸化ストレスマーカーが上昇していく傾向がみられた。XP 患者尿では酸化ストレスマーカーの上昇に比して抗酸化能の低下は軽度であった。一方 CS は酸化ストレスマーカーの上昇は XP に比べて軽度で、抗酸化能の低下が目立つ傾向

があった。今後症例数を蓄積し、更なる解析が必要である。

E. 結論

尿中酸化ストレスマーカの解析は、XP・CSの病態解析に有用と思われた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanuma N, Miyata R, Kumada S, Kubota M, Takanashi JI, Okumura A, Hamano SI, Hayashi M. The axonal damage marker tau protein in the cerebrospinal fluid is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Brain Dev. 2009 Aug 11. [Epub ahead of print]

2) Kanda S, Saito M, Hayashi M, Atsumi S, Komine S, Tanuma N. Hypoglossal hypoplasia and hyperplasia of the area postrema following perinatal hypoxic brain damage. Brain Dev. 2010 Apr;32(4):285-288. Epub 2009 Dec 14.

2. 学会発表

1) 田沼直之、宮田理英、林 雅晴、大野文誉、奥村彰久、高梨潤一、久保田雅也、星野英紀、浜野晋一郎、吉成 聡. HHV-6脳症・けいれん重積症における髄液酸化ストレスマーカ・サイトカイン解析. 第52回日本小児神経学会総会. 2009年5月. 脳と発達 41, S165, 2009.

2) 田沼直之、小峯聡、富永恵子、永田仁郎、小沢浩、宮田理英、林雅晴. レット症候群と酸化ストレス. 第35回日本重症心身障害学会学術集会. 2009年9月. 日本重症心身障害学会誌 34, 285, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

コケイン症候群の実態把握および治療とケアの指針作成ための研究

コケイン症候群に見られる不随意運動に関する研究

研究分担者 熊田 聡子 東京都立神経病院神経小児科医長

研究要旨 コケイン症候群双胎例に見られた不随意運動を電気生理学的検査を中心に解析した。中枢神経系病変に伴う小脳性失調症・ジストニアに加え、末梢神経障害に伴う筋線維束性収縮と深部覚障害が、本例の複雑な不随意運動を形成していると推定した。

A. 研究目的

コケイン症候群(CS)は DNA 修復障害を生じる常染色体劣性遺伝性疾患で日光過敏性・発育障害・神経障害・白内障・難聴・う歯・特徴的顔貌・早老症など多彩な症状を示す。臨床的に、1 歳前後に発症するⅠ型(古典型)、出生時より症状を認めるⅡ型(先天型)、発症が遅く進行も緩徐なⅢ型に分けられる。神経学的異常としては、精神運動発達遅滞・筋緊張亢進・小脳性失調の他、振戦やジストニアなどの不随意運動も報告されるが、本症候群の不随意運動に関する詳細な解析の報告は少ない。今回、CS の不随意運動に対する治療法開発を目標に、CS Ⅲ型双胎例に見られた不随意運動を電気生理学的検査を中心に解析した。

B. 研究方法

症例は 29 歳女性双胎例、2 例とも類似の経過を示す。小学校低学年までは正常発達を示したが、その後歩行時のふらつきが出現、知的退行も生じた。特徴的顔貌より 24 歳時に皮膚線維芽細胞の紫外線感受性試験が行われ、CSⅢ型と診断。頭部画像では、白質変性・大脳基底核石灰化・小脳萎縮が

見られた。29 歳時には立位不可。構音障害、筋緊張亢進(痙縮及び固縮)、遠位優位の筋萎縮、深部腱反射消失、尿閉を認めた。上肢に手指及び手関節を素早く屈伸させる振戦様の不随意運動が見られ、また手指を過伸展させる肢位からジストニアの存在が推定されていた。今回、不随意運動時の表面筋電図をビデオ撮影と同時に施行した。また末梢神経伝導検査・針筋電図・体性感覚誘発電位(SEP)を施行した。

(倫理面への配慮)

ビデオの撮影ならびに研究会などでの公表については、保護者からの文書による同意を得た。

C. 研究結果

不随意運動時の表面筋電図では、前腕筋群に持続の短い(50-100ms)不規則な筋放電が頻発、時に拮抗筋間で同期した。また右優位の下腿筋群には持続のより短い(約 20ms)筋放電が頻発していた。これらの筋放電は、ミオクロヌスないし筋線維束性収縮と考えられた。振戦に合致する拮抗筋間に相反性の群化放電や、ジストニアを示唆する拮抗筋間に同期性の持続性筋収縮な

らびに筋放電のオーバーフロー現象は見られなかった。末梢神経伝導検査では、運動・感覚神経ともに、伝導速度の遅延と低振幅波形を認めた。針筋電図では、安静時に脱神経電位を認め、随意収縮時の運動単位電位は高振幅であった。体性感覚誘発電位は潜時が延長していたが、振幅の増大(giant SEP)は見られなかった。

D. 考察

CSの神経障害にはDNAの酸化的障害の関与が推定される。中枢神経病変としては、白質の髄鞘化障害・大脳基底核石灰化・小脳変性が認められ、筋緊張異常・ジストニア・小脳性失調などを生じる。さらに末梢神経にも障害を生じ、運動神経障害に伴う筋線維束性収縮や深部覚障害に伴う運動失調も認められる。今回のCS双胎例においても、これらの病変及び症状が認められた。CS患者の複雑な不随意運動には、これら多巣性の中核及び末梢神経病変が関与していると考えられた。

E. 結論

CS患者の不随意運動の治療に当たっては、その機序を解明する必要がある。今後さらに症例を集積して電気生理学的検査を含む詳細な解析を行う。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

学会発表：コケイン症候群Ⅲ型双胎例に見られた不随意運動の解析。熊田聡子，久保田雅也，古山晶子，奥村さやか，柏井洋文，星野英紀，林雅晴。第52回日本小児神経学

会総会(2010年5月発表予定)。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服 研究事業）
分担研究報告書

コケイン症候群の実態把握および治療とケアの指針作成ための研究

XPG nullマウスにおけるコケイン症候群様臨床症状の検討

研究分担者 国立成育医療研究センター 神経内科 医員 星野英紀
研究協力者 鳥取大学医学部機能形態統御講座 ゲノム形態学分野 助教 中根裕信

研究要旨 XPG nullマウスは、成長障害、小脳失調症状、短寿命を示すことから、コケイン症候群のモデルと言われてきた。XPG nullマウスにおけるコケイン様臨床症状の検討を病理学的に行い小脳の発育不全、皮下脂肪の欠如が観察され、同マウスのコケイン症候群の疾患モデルとして可能性が示された。

A. 研究目的

XPG nullマウスにおけるコケイン様臨床症状と各臓器の病変との関係を病理学的に検討し、同マウスがコケイン症候群の疾患動物として有用性を調べることを目的とする。

B. 研究方法

XPG nullマウスにおけるコケイン様臨床症状の検討するために、各日令のXPG nullマウス（～3週令）の組織検索を行う。検索には、各日令マウスを灌流固定した標本を作成し（固定条件を一定にするため）、光学顕微鏡（場合によっては透過電子顕微鏡を用いて）で検索する。当然、ヒトとマウスの種の違いには、細心の注意を払って検索する。ヒトのコケイン患者さんの剖検症例の所見を参考にして、以下の点に留意する。同マウスの皮下組織[異栄養性小人症]、性腺[性腺機能低下]、網膜[網膜色素変性症、視神経萎縮]、聴覚器[感音性難聴]、小脳[小脳失調]、関節[関節拘縮、亀背]、脳の髄鞘化[髄鞘障害]、歯・唾液腺[齲歯、唾液分泌]等を検索する。[]内は、コケイン症候群の臨床症状を示す。

（倫理面への配慮）

本研究は、鳥取大学・動物実験安全委員会に実験計画の承認を受けて実施している。

C. 研究結果

XPG nullマウスにおけるコケイン様臨床症状の検討を病理学的に行い、小脳失調の病変として小脳の発育不全、成長障害の病変として皮下脂肪の欠如が観察された。

D. 考察

コケイン症候群の患者さんの小脳の変性過程の病理像の報告がないので詳細は不明であるが、XPG nullマウスの小脳失調・歩行異常の病変として小脳の発育不全、成長障害の病変として皮下脂肪の欠如が観察されコケイン患者さんと同様の病変を示した。今後、コケイン様臨床症状に合うXPG nullマウスの他の臓器の病理学的検索を行うことで、同マウスのコケイン症候群の疾患動物として有用性が明らかになるだろう。

E. 結論

XPG nullマウスの小脳失調の病変として小脳の発育不全、成長障害の病変として皮下脂肪の欠如が観察され、同マウスのコケイン症候群の疾患モデルとして可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 中根裕信 ヌクレオチド除去修復欠損マウス
転写異常とその病態(解説/特集) 医学のあゆみ
(0039-2359)、2009;228:157-158.

2. 学会発表

1. Pathological analysis of XPG-deficient mi
ce. Nakane H, Hirota S, Shiomi T, Ohama E, Ka
meie T, Inaga S, Naguro T. 第115回日本解剖学
会総会・全国学術集会、2010年3月28-30、岩手県
盛岡市、ポスター発表

2. XP・CSモデルマウスの分子病態 中根裕信 XP
(色素性乾皮症)全国大会報告書 p5、2009年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定
を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他

コケイン症候群の難治性疾患克服研究事業(特定
疾患調査研究分野)への認定に関わる特定疾患対
策懇談会への意見書。

[II] 参考資料