

研究課題：コケイン症候群の病態解明および治療とケアの指針作成のための研究」

2. コケイン症候群の歯髄の神経病理について

久保田雅也 （国立成育医療研究センター神経内科 医長）

佐藤哲二 （鶴見大学歯学部解剖・組織細胞学講座 教授）

研究要旨

CS 3 型の 2 名（30 才双胎女性）の齲歯治療で抜歯した歯髄の免疫染色を行い、神経自体の減少を観察した。CS においては発汗低下、唾液分泌低下、軽度痛覚鈍麻、神経因性膀胱などから自律神経系の障害が起こってくるが、これらの徴候は C 線維、A δ 線維の減少をはじめとする末梢神経障害で説明可能であり、歯髄神経病理の異常は CS 病態の一部を反映しているといえる。

分担研究者

久保田雅也 （国立成育医療研究センター
神経内科 医長）

佐藤哲二 （鶴見大学歯学部解剖・組織細胞学講座 教授）

A. 研究目的

コケイン症候群（CS）は中枢神経系以外に末梢神経の障害も早期から認められる。機能低下は運動、感覚、自律神経系におよび様々な症状をもたらすが、今回 CS 3 型の患者の齲歯治療で抜歯した歯髄の神経病理を検討し、発汗低下や痛覚鈍麻との関係を検討した。

B. 研究方法

CS 3 型の 2 名（30 才双胎女性）の齲歯治療で抜歯した歯髄の免疫染色を行った。染色は PGP9.5 染色、神経鍍銀法、HE 染色、 β III Tubulin 免疫染色を行った。

C. 研究結果

CS 3 型の歯髄は図 1 に示したように血管壁にのみ PGP9.5 陽性線維がみられたため、交感神経性 C 線維ではないかと考えられたが、一部 A β 線維が残っている可能性もある。図 2-4 のコントロールにおける染色と比較

すると明らかに神経自体が疎である。先天性無痛無汗症の患者の歯髄を図 5、6 に示す。先天性無痛無汗症は先天的に C 線維、A δ 線維が欠損し、痛覚消失、発汗低下—消失を呈する難病であるが、CS においても程度は軽いが類似の C 線維、A δ 線維の減少が起こっている可能性がある。

D. 考察

2 名の臨床経過については昨年度の報告書において詳述した。3 型の特性として CS に特有な臨床徴候が遅れて出現するが、2 名の齲歯に関してもこの年齢になるまで問題になることはなかった。臨床的に CS に特徴的な顔貌、知的障害、頭部 CT 上の石灰化、足関節拘縮等の他に末梢神経障害も認める。また、発汗低下、唾液分泌低下、軽度痛覚鈍麻、神経因性膀胱などから自律神経系の障害も顕在化している。これらの徴候は C 線維、A δ 線維の減少をはじめとする末梢神経障害で説明可能である。CS においては末梢神経障害は脱髄、軸索障害のいずれも起こり、運動・感覚神経伝導検査での異常が早期から出現する。これらの検査では検出不能な細い線維の障害も今回の

歯髄で認めたように全身的に起こっていると推測される。

E. 結論

CS 3 型の 2 名（30 才双胎女性）の齲歯治療で抜歯した歯髄の免疫染色を行い、神経自体の減少を観察した。CS においては発汗低下、唾液分泌低下、軽度痛覚鈍麻、神経因性膀胱などから自律神経系の障害が起こってくるが、これらの徴候は C 線維、A δ 線維の減少をはじめとする末梢神経障害で説明可能であり、歯髄神経病理の異常は CS 病態の一部を反映しているといえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

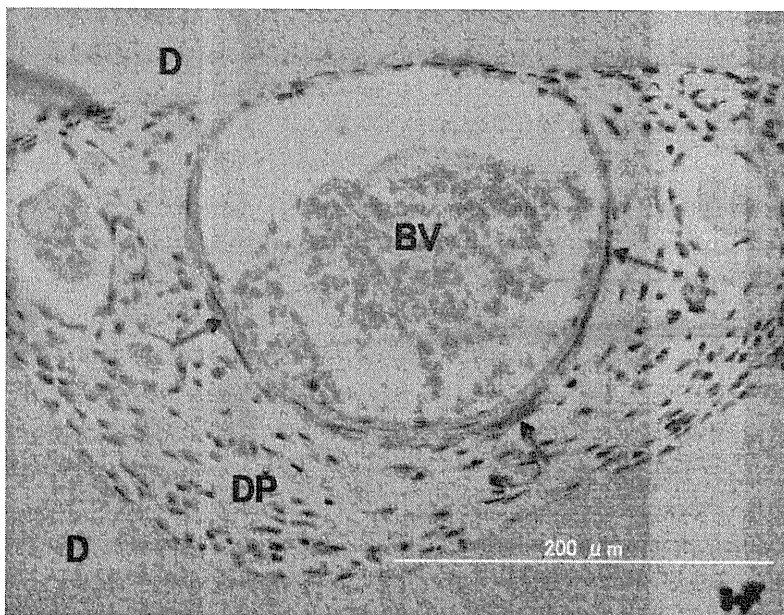


図1 Cockayne 症候群：歯髄組織の神経線維。歯根部の歯髄（DP）にみられる血管（BV）の壁に分布する PGP9.5 陽性神経線維（→）を示す。D 象牙質；ヘマトキシリンで核染色。通常の歯髄組織に認められる感覚神経は検出されず。

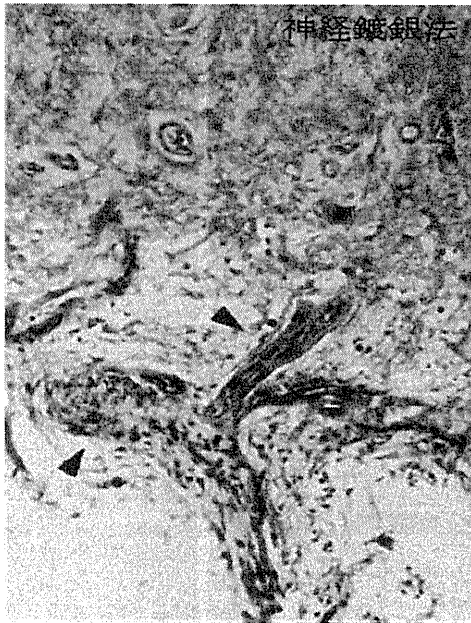


図2 コントロール。根尖部の歯髄にみられた神経線維束 (▼ : Aβ 有髄線維だと思われる)

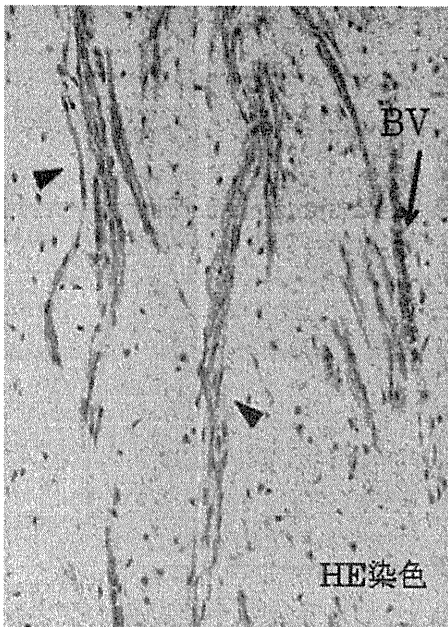


図3 コントロール。歯髄の中央部を走る神経線維束 (▼) が血管 (BV) と判行する。

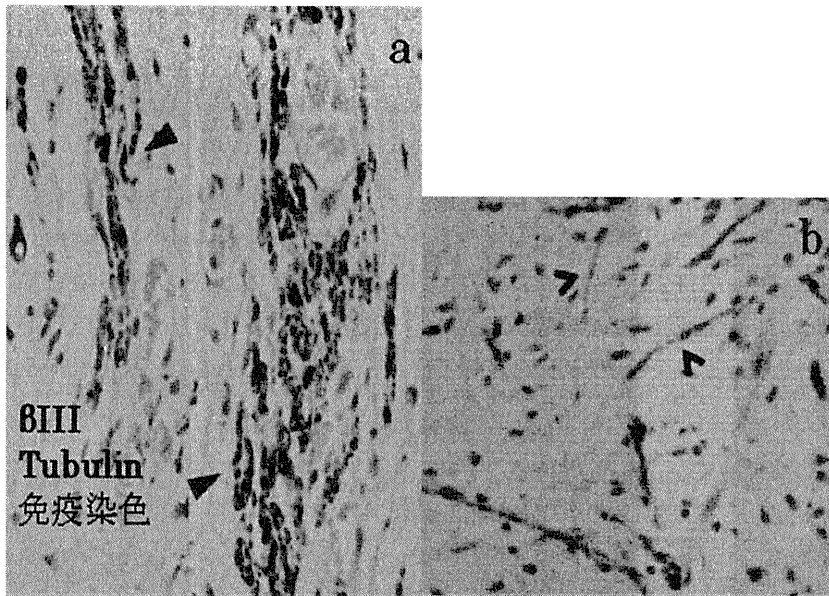


図4 コントロール。歯髄中央部を走行する神経線維束 (▼: Aβ、Aδ 有髄繊維線維だと思われる) 神経線維束が血管 (BV) に沿って走っている(a)。細い神経繊維 (∧) でかつ Varicosity 様の膨らみが見えることから C-fiber とと思われる(b)。

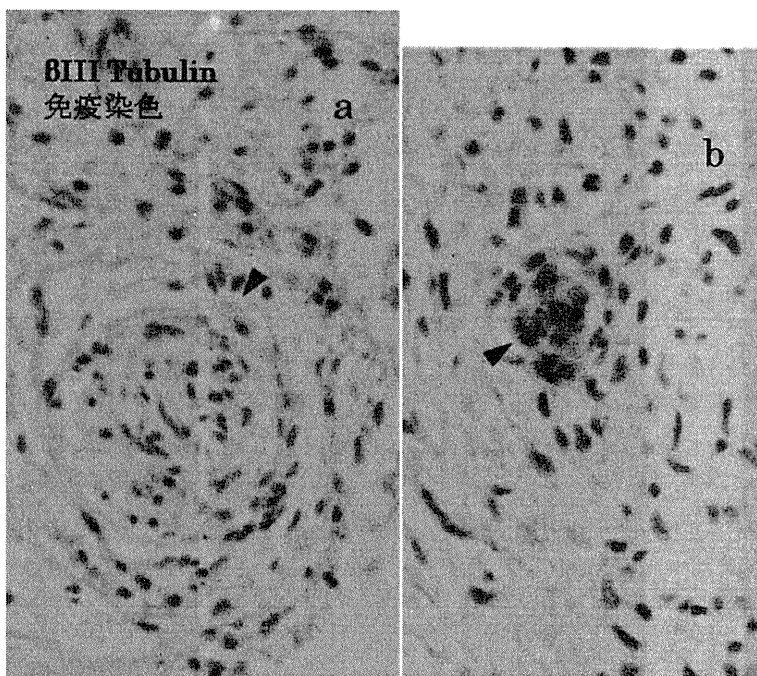


図5。無痛無汗症の歯髄。a:神経線維束 (Aβ 有髄繊維線維だと思われる) の横断面だが、反応は陰性である。b:同様の Aβ 有髄繊維線維だと思われる横断面の反応は陽性である。

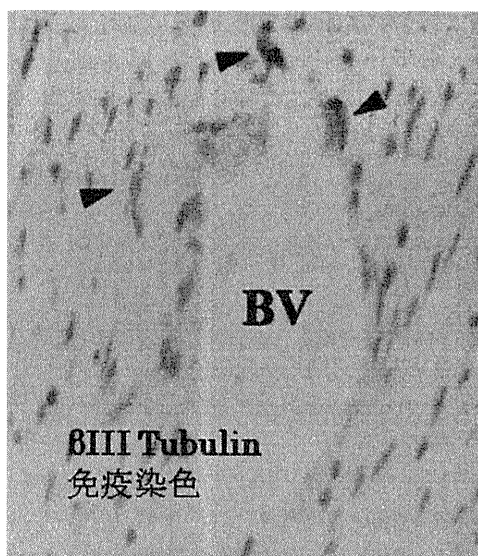


図6。無痛無汗症の歯髄。血管（BV）の周囲に分布する陽性線維。比較的血管の表層に分布していること、Varicosity様の膨らみが観察されないことから、Aβの有髄線維と思われる。

研究課題：コケイン症候群の病態解明および治療とケアの指針作成のための研究」

3. コケイン症候群の発生頻度

久保田雅也 （国立成育医療研究センター神経内科 医長）

研究要旨

コケイン症候群(CS)は常染色体劣性遺伝疾患であり、頻度は100万人に1人程度のまれな疾患とされるが正確な発生頻度については不明である。昨年度の本研究班の報告でも全国調査データを基にCSの発生頻度を解析、検討したが。今年度は二次調査の再度の依頼を行い15名の新たな患者情報が集積された。そのうち患者数の実態を反映していると思われる1980年以降でCS発生頻度を計算すると100万出生あたり2.76(2.19-3.11、95%信頼区間)となった。今回の調査の不十分性を考慮してもCS発生頻度は日本においては西ヨーロッパにおける100万出生あたり2.7とほぼ同様の値をとり人種差は大きくないと考えられる。

分担研究者

久保田雅也 （国立成育医療研究センター神経内科 医長）

A. 研究目的

コケイン症候群(CS)は常染色体劣性遺伝疾患であり、頻度は100万人に1人程度のまれな疾患とされるが正確な発生頻度については不明である。今回昨年度に引き続き新たに追加された二次調査に基づく全国調査データを基にCSの発生頻度を解析、検討した。

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CS生存例および過去の死亡例についての一次調査を行い合計674病院から回答を得た(回収率は73.2%)。この結果CS生存例37名、死亡例39名、合計76名という結果が判明し患者有りとの回答を得た病院・施設に臨床経過の詳細を尋ねる二次調査票を実施した。本年度二次調査を再度依頼した結果、CS生存例24名(CS1型21名、CS3型3名)、死亡例23名(CS1型20名、CS2型2名、CS/XPD1名)、合計47名の臨床経

過が集積された。この結果を基にCSの発生頻度を算出した。

(倫理面での配慮) 研究遂行に際し、臨床研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

47名中臨床経過および出生年月日の明らかな46名の5年ごとの出生年を表にまとめた。(1名は年齢不明のため除外した) また厚生労働省平成21年人口動態統計の年間推計中の第1表人口動態総覧の年次推移(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikai09/index.html>)より年間出生数を求め、出生100万人あたりのCS発生頻度を計算した。

年	n/5年	n/100万出生あたり
2005-2009	2	0.37
2000-2004	5	0.87
1995-1999	7	1.174
1990-1994	5	0.823
1985-1989	14	2.083
1980-1984	8	1.05
1975-1979	3	0.339
1970-1974	2	0.198

1965-1969	0	0
1960-1964	1	0.122
平均	4.7	0.703

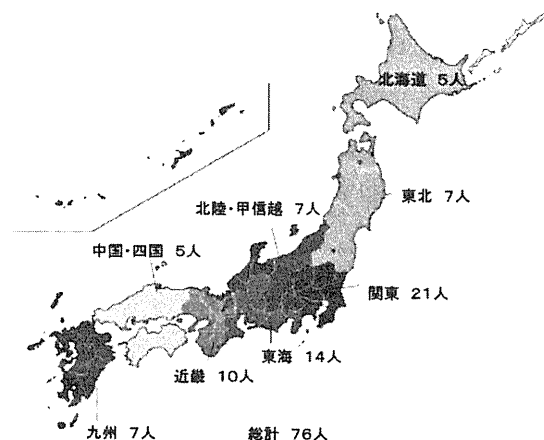
図 コケイン症候群 76 人の地域別分布

表 追加された全国調査でのコケイン症候群の 5 年ごとの発生人数および 100 万出生あたりの発生人数

追加された全国調査のデータから計算すると 100 万出生あたりの CS の発生頻度は 0.703 となった(表)。

これをもとに一次調査を行った病院・施設に全ての CS 患者が関わっている、および二次調査で回答の来なかった 76 名中 30 名の年齢分布が今回の 46 名と同じであるという 2 つの仮定の下に出生 100 万あたりの CS 発生頻度を求めると $(0.703/0.732) \times (76/46) = 1.59$ となる。(0.732 は一次調査の回収率)

今回の全国調査では CS の発生頻度は 100 万出生あたり 1.59 である。患者がほとんど把握できなかった 1960 年代を除外すると(1970-2009 年)100 万出生あたり 1.99(0.98-2.83、95%信頼区間)となる。患者数の実態を反映していると思われる 1980 年以降(1980-2009 年)で計算するとこれは 2.76(2.19-3.11、95%信頼区間)となる。また図に示すように CS の分布に地域差は認めなかった。



D. 考察

CS の発生頻度は 100 万人に 1 人とされていたが本邦での実体は不明であった。今回の全国調査の結果 100 万出生あたり 1.59 という結果が出たが、いくつか注意が必要である。大半の CS は小児科領域でのフォローがなされるであろうが今回の調査には成人神経内科でのフォローや小児科以外でのフォロー(整形外科、リハビリ科、眼科、耳鼻科、皮膚科)のみの患者は把握されていない可能性がある。また低年齢での診断の困難さがあり最近 5 年間の少なさはおそらく未診断が影響していると考えられる。また 1960 年代での患者数は実態を表しているとはいえないであろう。1960 年代を除外すると 100 万出生あたり 1.99 となった。また 1980 年以降で計算するとこれは 2.76 となった。Kleijer et al(1)によると西ヨーロッパにおける CS の発生頻度は 100 万出生あたり 2.7 である。これは今回の我々の得た値と大差はない。先に述べた今回の調査の不十分性を考慮すると CS 発生頻度は日本においては西ヨーロッパにおけるそれと大きくは変わらず、人種による差や地域差はないといえる。

E. 結論

今回の全国調査において CS の発生頻度は 100 万出生あたり 1.59 と判明した。1980 年以降でこれを計算するとこれは 2.76(2.19-3.11、95%信頼区間)となる。

今回の調査の不十分性を考慮すると CS 発生頻度は日本においては西ヨーロッパにおける発生頻度 100 万出生あたり 2.7 と大きくは変わらないといえる。

文献

- (1) Kleijer WJ et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. DNA Repair (Amst).

2008;7:744-50.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 古山晶子、久保田雅也 Cockayne 症候群の運動発達 「ここまでわかった小児の発達」五十嵐隆、久保田雅也 編集 中山書店 2010 pp170-173

2) 久保田雅也 ヒトの随意運動の発達 「ここまでわかった小児の発達」五十嵐隆、久保田雅也 編集 中山書店 2010 pp2-6.

2. 学会発表

1) 太田さやか, 寺嶋宙, 柏井洋文, 星野英紀, 古山晶子, 林雅晴, 熊田聡子, 杉田克生,

田沼直之, 久保田雅也 コケイン症候群の病型による臨床経過の違いと診療実態について -全国調査より- 日本小児神経学会 2011.5.28 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究課題：「コケイン症候群の病態解明および治療とケアの指針作成のための研究班」

4. コケイン症候群患者由来培養細胞における紫外線抵抗化生理因子の解析

杉田克生（千葉大学教育学部・教授）

研究協力者：喜多和子（千葉大学大学院医学研究院）

研究要旨

CS 患者由来細胞は紫外線による DNA 損傷に対し修復能が低下している。紫外線致死抵抗化に関わる heat shock protein 27 (HSP27)などのシャペロンとその結合分子である annexin II を用い、CS 細胞での紫外線致死軽減機構を解析した。また、CS の紫外線抵抗化を図るため、GRP78、HSP27 などのシャペロンや annexin II の代謝に作用し紫外線高感受性を軽減する生理活性物質を検討した。紫外線高感受性細胞の内と外の annexin II 量を増大化させると、ともに紫外線致死軽減化することができた。シャペロンや annexin II の代謝を変動させる生理活性物質として、味噌成分である HEMF を同定した。HEMF は GRP78 の細胞内発現レベルを増加させることで、紫外線致死抵抗化や変異誘導抑制に関わることが示唆された。

分担研究者

杉田克生（千葉大学教育学部・教授）

研究協力者：喜多和子（千葉大学大学院医学研究院）

A. 研究目的

紫外線高感受性を示すコケイン症候群（CS）は中枢および末梢神経、皮膚、眼、腎臓など多臓器の早発性老化を生じる常染色体劣性遺伝の疾患である。CS 患者由来細胞は紫外線による DNA 損傷に対し修復能が低下している。紫外線致死抵抗化に関わる heat shock protein 27 (HSP27)などのシャペロンとその結合分子である annexin II を用い、CS 細胞での紫外線致死軽減機構を解析する。また、CS の紫外線抵抗化を図るため、GRP78、HSP27 などのシャペロン

や annexin II の代謝に作用し紫外線高感受性を軽減する生理活性物質を探索する。その結果 CS での DNA 損傷に対する修復機構の創薬開発につなげる。

B. 研究方法

CS 由来 transform 樹立細胞において、annexin II 遺伝子導入法や recombinant annexin II タンパク質 (rANX II) を用いて、細胞の内外で annexin II 量を増大化させると、紫外線感受性と紫外線損傷 DNA 修復機能が変動するかを調べた。紫外線致死感受性は、紫外線照射後のコロニー形成法により、DNA 修復機能レベルは、損傷 DNA (6-4PP と CPD) に特異的な抗体を用いた損傷除去能力の解析法により調査した。アポトーシス誘導を TUNEL 法で、アポトーシス誘導関連分子などのタンパク質量を Western blot

法で解析した。また、annexin II の細胞外表面への結合を、細胞外表面タンパク質のビオチン標識により解析した。

さらに、Bcl-xL の発現抑制は、siRNA を用いて行った。

C. 研究結果

遺伝子導入による細胞内の annexin II 発現増大化、培養液中への rANX II 添加による細胞外の annexin II 発現増大化は、ともに紫外線致死高感受性を軽減化した。細胞内 annexin II の増大化は損傷 DNA 修復能力を増加させたが、細胞外の annexin II 発現増大化によって、損傷 DNA 修復能力の亢進は観察されなかった。培養液中に rANX II 添加すると、紫外線によるアポトーシス誘導が抑制された (図 1)。rANX II 添加された CS 細胞において、Ca²⁺-依存的な annexin II の細胞外表面への結合量増大と紫外線致死軽減とが連動した。また、細胞外への rANX II により、Bcl-xL/Bax の比が上昇したが、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) シグナル伝達阻害剤 LY294002 を rANX II と共に培養液中に添加すると、rANX II 添加による Bcl-xL/Bax の比の上昇と紫外線致死軽減化が共に抑制された (図 2)。さらに、siRNA により Bcl-xL の発現を抑制すると、rANX II 添加による紫外線致死軽減化が抑制された。

これまでの共同研究者らの研究成果によると、シャペロン GRP78 が紫外線致死抵抗化に関わるとともに紫外線による遺伝子変異誘導の抑制にも関与することがわかった。本研究で、種々の味噌抽出液および味噌成分の一つである 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) を RSa 細胞に添加すると、細胞内 GRP78 発現量が増加し、紫外線変異誘導が抑制された。

D. 考察/結論

紫外線高感受性細胞の内と外の annexin II 量を増大化させると、ともに紫外線致死軽減化する

ことができた。しかし、そのメカニズムは異なり、細胞内 annexin II は、損傷 DNA 修復能力を増加させ、一方、細胞外 annexin II は、Ca²⁺-依存的に細胞外表面に結合し、PI3K 依存的なシグナルを介して Bcl-xL/Bax の比を上昇させることにより CS 細胞の紫外線致死高感受性を軽減化することが示唆された。

シャペロンや annexin II の代謝を変動させる生理活性物質として、味噌成分である HEMF を同定した。HEMF は GRP78 の細胞内発現レベルを増加させることで、紫外線致死抵抗化や変異誘導抑制に関わることが示唆された。

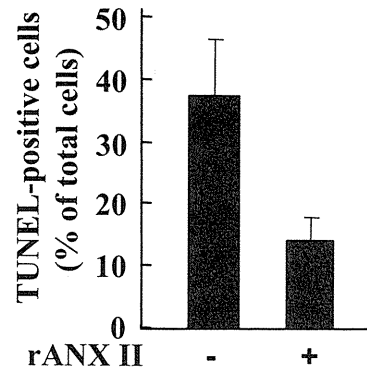


図 1. 培養液中への rANX II 添加による紫外線誘導アポトーシスの抑制

CS 細胞の培養液に rANX II (0.5 mg/ml) を添加 24 時間後、紫外線 (UVC, 3 J/m²) 照射し、さらに 24 時間培養した後、アポトーシス誘導細胞を TUNEL 法で解析した。

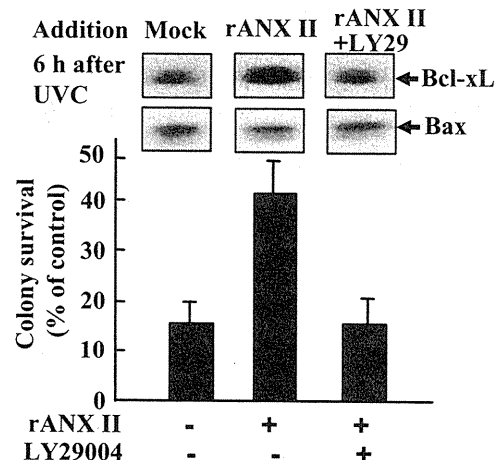


図 2. PI3K シグナル伝達阻害剤 LY294002 による rANX II 誘導 Bcl/Bax 比の上昇抑制および紫外線致死軽減化抑制

CS 細胞の培養液に rANX II(0.5 µg/ml) と LY29004(50 µg/ml)を添加 24 時間後、紫外線 (UVC,3 J/m²) 照射し 6 時間後の Bcl-xL と Bax 量を Western blot 法で解析した。紫外線致死感受性はコロニー形成法で解析した。

G. 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.

3) Chen S-P, Dong M, Kita K., Shi Q-W, Cong B, Guo W-Z, Sugaya S, Sugita K., Suzuki, N. Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of labdane and abietane diterpenoids from the pulp of *Torreya nucifera* in HeLa cells. Mol. Med. Rep. 3, 673-678, 2010.

4) Lu J, Hu G, Kita K., Suzuki N. Retrovirus-mediated transduction of a short hairpin RNA gene for GRP78 fails to downregulate GRP78 expression but leads to cisplatin sensitization in HeLa cells, Oncol. Rep. 25, 879-885, 2011.

5) Zahed M, Suzuki T, Kita K., Sugaya S, Suzuki N. Screening of novel peptide ligands bound to the carboxy-terminal domain of GRP94 by phage display. Chiba Medical J. in press.

2. 学会発表

1) 佐々枝里子、小林悟、中島葉子、岩山秀之、石田敦士、服部文子、安藤直樹、伊藤哲哉、石川達也、杉田克生「コケイン症候群の全身管理プロトコールの作成」第 34 回日本小児神経学会東海地方会 2011/1/29 名古屋

2) 田沼直之、宮田理恵、林雅晴、久保田雅也、杉田克生、金子節子、荒木聡、百崎謙、大野耕策 「色素性乾皮症・Cockayne 症候群における尿中酸化ストレスマーカー解析」第 51 回日本小児神経学会 2010/5/21-23 福岡

3) 喜多和子、杉田克生、陳 仕萍、佐藤哲生、郭 文智、鈴木敏和、菅谷 茂、鈴木信夫「細胞外に添加された HSPB-A によるコケイン症候群患者由来細胞の紫外線致死抵抗化」第 53 回放射線影響学会大会 2010/10/20-22 京都

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

3. その他

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

5. コケイン症候群の中樞神経病理所見、および他の臓器病理所見の解析

分担研究者 林 雅晴 東京都医学総合研究所こどもの脳プロジェクト 副参事研究員

研究要旨 コケイン症候群（CS）患者では睡眠異常、体温調節障害が合併する。CSの視床下部障害を明らかにし、治療法を考案するため、アンケート調査、4 CS 剖検例の視床下部と脚橋被蓋核で免疫組織化学的評価を進めた。10 例のアンケート解析では約3分の2の症例で、体温調節障害、睡眠障害がみられた。また、高度の脳萎縮にもかかわらず視床下部亜核は比較的保たれていたが、脳内時計に関係する視交叉上核は切片上の問題から同定できなかった。一方、Meynert 核と脚橋被蓋核でアセチルコリン神経の高度減少が認められ、REM 睡眠障害、知的障害と関連する可能性が示唆された。

分担研究者 林 雅晴 東京都医学総合研究所
こどもの脳プロジェクト 副参事研究員

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。CS 患者では時に睡眠や体温調節の異常がみられ、視床下部障害の合併が疑われるが、臨床的な解析は十分で行われていなかった。本年度も昨年度に引き続き CS 患者の生活の質を大きく左右する視床下部障害に関して、臨床神経病理学的検討を進めた。

B. 研究方法

(1) CS 患者家族会「日本 CS ネットワーク」の協力を得て睡眠・体温調節異常に関するアンケート調査を実施し、4～31 歳の 10 例での結果を集計評価した。

(2) CS 剖検脳 4 例（死亡時年齢 7～35 歳）において、年齢相当対照剖検例とともに、視床下部に対する免疫組織化学染色（免疫染色）を試みた。指標とした蛋白は、神経細胞・アストロサイトのマーカーである MAP2・GFAP、視床下部の基本構造マーカーの Tyrosine hydroxylase (TH)、Calbindin D28K (CD)、Substance P (SP)、視床下部ホルモ

ン Vasopressin (VP)、Orexin A (OxA)、視床下部に隣接する Meynert 核のマーカー Acetylcholine esterase (AChE)。

(3) 中脳と橋の境界部に存在する脚橋被蓋核 (PPN) は、REM 睡眠の確立に重要な役割を担う。さらに CS と同様に、塩基修復の遺伝的異常により光線過敏と神経変性を来す色素性乾皮症において、研究者は前記 Meynert 核と PPN のアセチルコリン神経の障害が睡眠機構の異常を惹起することを報告した (Brain Dev Epub)。そこで前記 CS 4 剖検例において PPN での MAP2、GFAP、AChE、TH、CD に対する免疫染色を行った。

(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

(1) 10 例中 7 例で体温調節障害（変動体温、低体温、夏季の高熱）がみられた。さらに 10 例中 6 例で睡眠障害（日中の眠気、入眠・覚醒障害、夜間睡眠中の中途覚醒が頻回、睡眠時間での興奮）が認められた（表 1）。10 例中 4 例では体温調節障害と睡眠障害が合併していた。なお昨年度

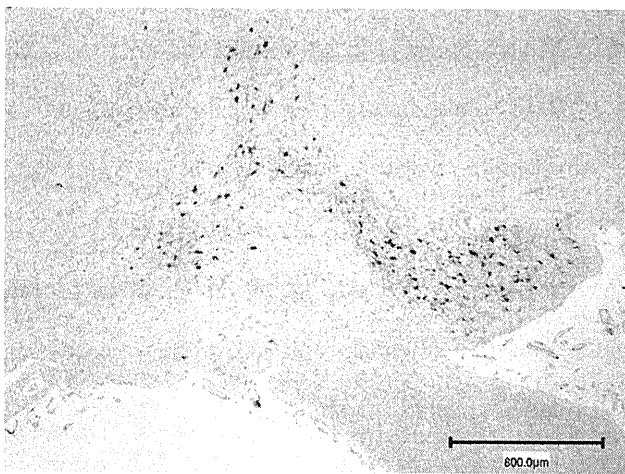
と同様に、家族からの聞き取り調査により二次性徴発現に問題がみられないことを確認した。

(2) 高度の脳萎縮にもかかわらず、MAP2・TH・CD・VP 染色により、対照と同様に、視床下部垂核（室傍核、視索上核、腹内側核、外側野）に陽性神経細胞集団を同定でき（図 1 A）、腹内側核では OxA 陽性細胞も確認された（図 1 B）。いずれの垂核にも GFAP 陽性アストロサイトの増加を認めなかった。ただし脳内時計の存在が想定される視交叉上核は、4 例とも部位が切片に切出されておらず、解析することはできなかった。一方、Meynert 核では AchE 陽性アセチルコリン神経が高度に減少していた。

(3) PPN では MAP2 陽性神経細胞の減少、GFAP 陽性アストロサイトの増加がみられた（図 2 A）。さらに 4 例全例で AchE 陽性アセチルコリン神経が高度に減少していた。TH 陽性カテコールアミン神経は比較的保たれていたが（図 2 B）、CD 陽性 GABA 系介在神経も軽度の減少を示した。

図 1 CS 剖検例視床下部での免疫染色

(A) 18 歳男性例 a の視索上核 TH 染色



(B) 7 歳女性例の腹内側核 OxA 染色

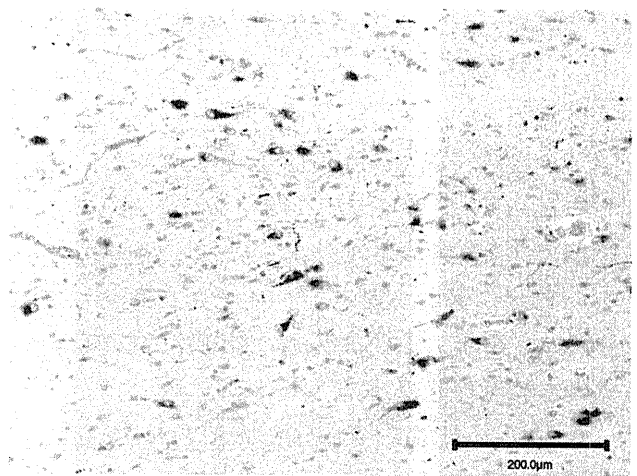
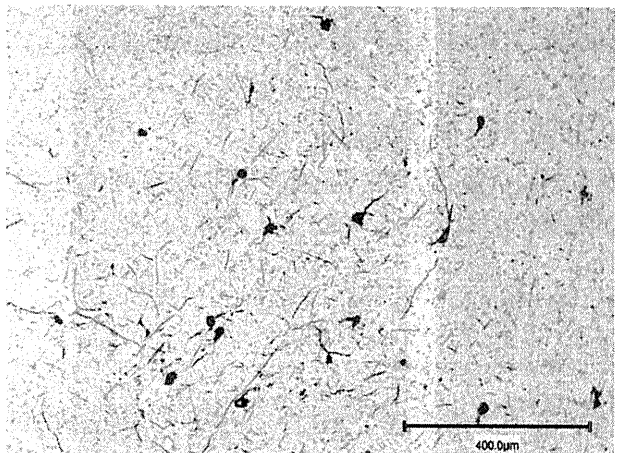


図 2 CS 剖検 PPN での免疫染色

(A) 18 歳男性例 a の GFAP 染色



(B) 18 歳男性例 b の TH 染色



D. 考察

(1) 昨年度は 5 例の解析で体温調節障害を指摘したが、本年度の 10 例（4～31 歳）での検討では、約 3 分の 2 の症例で体温調節障害、睡眠障害を認めた。一般に CS では、発育障害が必発だが、性発育異常や下垂体ホルモンの調節障害は明ら

かではないとされる。昨年度、報告した尿中メラトニン排泄低下と合わせて脳内時計の障害が示唆された。

(2) 視床下部での免疫染色では、XP と同様に(投稿中)、視交叉上核を除く垂核を同定することができた。性腺ホルモンを含めた下垂体ホルモンの分泌に異常を認めないこととの関連が示唆された。視交叉上核は高度の脳萎縮の影響か、4例とも検討不能だった。

(3) XP と同様に、Meynert 核と PPN の AchE 陽性アセチルコリン神経が高度に減少していた。PPN 病変には MAP2 神経細胞減少、GFAP 陽性アストロサイトの増加もみられ、XP の PPN 病変より重度だった。PPN 病変は REM 睡眠維持に悪影響を及ぼすことが推定され、脳内時計の障害と合わせて CS 患者での睡眠障害に関与する可能性が示唆された。また、Meynert 核アセチルコリン神経は知能発達・学習との関連が知られ、Meynert 核病変が CS 患者の知的障害に関連している可能性も考えられた。

E. 結論

CS 患者では体温調節障害、睡眠異常など視床下部障害を推定する症状が有名である。CS 患者 10 例のアンケート解析では、約 3 分の 2 の例で体温調節障害、睡眠障害がみられた。また、高度の脳萎縮にもかかわらず視床下部垂核は確認されたが、視交叉上核は同定できなかった。一方、Meynert 核と脚橋被蓋核でアセチルコリン神経の高度減少が認められ、CS 患者での REM 睡眠障害、知的障害と関連する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi M, et al. Lesions of cortical GABAergic interneurons and acetylcholine neurons in xeroderma pigmentosum group A. Brain Dev (Epub) DOI: 10.1016/j.braindev.2011.06.015
2. Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Takahashi Y. Focal encephalopathy having recurrent episodes

of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome.

Brain Dev (Epub)DOI: 10.1016/j.braindev.2011.06.011

3. Hayashi M, et al. Brain vascular changes in Cockayne syndrome. Neuropathology (Epub)DOI:10.1111/j.1440-1789.2011.01241.x.
4. Tanaka R, Iwasaki N, Hayashi M, et al. Abnormal brain MRI signal in 18q⁻ syndrome not due to dysmyelination. Brain Dev (Epub) DOI:10.1016/j.braindev.2011.05.008
5. Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification dying the intracerebral hemorrhage. Neuropathology (Epub) DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01231.x.
6. Miyata R, Hayashi M, et al. Oxidative stress in mild encephalitis/ encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS). Brain Dev (Epub) DOI: 10.1016/j.braindev.2011.04.004
7. Shioda M, Hayashi M, et al. Lesions in the central tegmental tract in autopsy cases of developmental brain disorders. Brain Dev 2011;33(7):541-547.
8. Hayashi M, Miyata R, Tanuma N. Decrease in acetylcholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus in a patient with Prader-Willi syndrome. Neuropathology 2011;31(3):280-285.
9. Saito T, Hayashi M, et al. Neocortical layer-formation of human developing brains and

- | | |
|--|---------------------------------|
| lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. Cerebral Cortex 2011;21(3):588-596. | なし |
| 10. <u>林雅晴</u> . 色素性乾皮症の神経病変. Visual Dermatology 2011; 10(5):456-458. | 2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし |
| 2. 学会発表 | |
| 1. <u>林雅晴</u> . 大脳基底核疾患の画像と病理：最近の話題. 第6回小児神経放射線研究会, 京都 (2011, 10.29) | |
| 2. <u>林雅晴</u> . こどもの脳の発達における環境因子と神経伝達物質代謝の影響. 東京都医学研開所記念シンポジウム、東京 (2011, 7.20) | |
| 3. Segawa M, Nomura Y, <u>Hayashi M</u> . An autopsy on 90 year old female of Segawa disease. 15 th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Toronto, Canada (2011, 6.8) | |
| 4. <u>林雅晴</u> 、宮田理英、田沼直之. 毛細血管拡張性運動失調症の小脳皮質病変. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会, 京都 (2011, 6.4) | |
| 5. <u>林雅晴</u> 、宮田理英、田沼直之. 色素性乾皮症におけるモノアミン神経病変に関する解析. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜 (2011, 5.28) | |
| 6. 大場大樹、 <u>林雅晴</u> 、他. 進行性の小脳失調症とFanconi症候群を呈し診断のついていない1例. 第16回小児神経症例検討会 (蔵王セミナー), 山形・上山 (2011, 2.11) | |
| G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) | |
| 1. 特許取得 | |

平成 23 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）研究報告書
[II]分担研究報告書

研究課題：「コケイン症候群の病態解明および治療とケアの指針作成のための研究班」

6. コケイン症候群の分子遺伝学的解析

7.

森脇真一（大阪医科大学皮膚科・教授）

研究要旨

コケイン症候群（CS）など紫外線性DNA修復異常で発症するすべての遺伝性光線過敏症に対する本邦唯一の診断センターを本年度も研究分担者の施設で維持し、各種DNA修復試験、分子生物学的手法を駆使して本年度は新規に3例の小児CSを確定診断した。さらに皮膚症状のみしか呈さしておらずUV-sensitive syndrome（UVSS）と過去に診断した症例（61歳、女性）に最近CS類似の神経症状が出現し再検討したところCSBであることが判明した。CSBとUVSSの異同に関しては昨年度の報告書にも記載したが、最近遺伝子が同定されたUVSS-Aに変異を持つ症例を除き、UVSSは包括的疾患概念としてのCSであると考えべきである。またこれまで非常に稀と考えられていたⅢ型CS（遅発型、軽症型CS）であるが潜在的な患者は存在する可能性は高い。

研究分担者

森脇真一（大阪医科大学皮膚科・教授）

DS）測定、②紫外線感受性試験、③相補性試験などのDNA修復テスト、④遺伝子解析、⑤タンパク解析などにより行った。

A. 研究目的

研究分担者は平成10年よりコケイン症候群（CS）、色素性乾皮症（XP）など紫外線性DNA修復異常で発症するすべての遺伝性光線過敏症の診断センターを本邦で唯一維持し、各種DNA修復試験、分子生物学的手法を駆使してこれまで新規に22例のCSを確定診断した。今年度も引き続き新たにCSが疑われて紹介されてきた患者に対して細胞生物学、分子遺伝学的な解析を行い、さらに臨床症状を詳細に検討することにより、CSにおけるゲノタイプ・フェノタイプの関連についての検討を行った。本研究によりCSにおいて多岐にわたる臨床症状の発症機序解明や分子レベルでの情報取得による重症度や予後の推定に役立つものと思われる。

B. 研究方法

CSの確定診断は患者皮膚由来の培養線維芽細胞を用いて①紫外線照射後の不定期DNA合成能（unscheduled DNA synthesis；U

（倫理面への配慮）

上記の研究は大阪医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査会において承認されている。研究はその審査会の基準を遵守し、患者あるいは家族の文書による同意を得た後に施行し、その場合検体は連結可能コード化して取り扱った。個人情報には十分配慮し、検体の保管も厳重に行った。またコントロール細胞など一部の細胞はすでに論文などで発表されており本研究者が長年連結不可能化して保持しているものである。

C. 研究結果

CSの確定診断は宿主細胞回復能を指標にした相補性試験にて施行中である。

CS診断センターにおいては年度間に新規に1例のCSA（10歳男児例）、2例のCSB（4歳男児と63歳女性）、1例のXPD/CS（1歳、男児）を確定した。CSBとUVSSの異同に関しては昨年度の報告書にも

記載したが、最近遺伝子が同定されたUVSS-Aに変異を持つ症例を除き、UVSSは包括的疾患概念としてのCSであると考えべきである。またこれまで非常に稀と考えられていたⅢ型CS（遅発型、軽症型CS）であるが潜在的な患者は存在する可能性は高い。

D. 考察

今回の遅発型CSB症例の結果はUVSSが遅発型CSBに移行する可能性あるいはUVSSが独立疾患ではなくCSBという包括的な疾患概念の中に位置する可能性を示唆する。

E. 結論

CSは稀な疾患ではあるがCS様の臨床症状を呈する患者の診断、潜在的な軽症患者の発掘のためには本邦唯一維持しているCS診断センターは引き続き継続することが重要であると考えられる。またその過程で得られる貴重な臨床材料（多彩な臨床症状を呈する患者皮膚由来の初代培養線維芽細胞など）を詳細に検討することによりCSの病態のさらなる解明がいつそう進むものと予想する。このような病態の解明は近い将来 iPS細胞などによる再生医療が進歩した後に可能となるかもしれない「遺伝病の根本的な治療」に対しても有用な情報をもたらすものであろう。最後にCS患者会を通して、CS患者・家族はCSという疾患の認知が低い故に多くの社会的制約や差別を受けていることが判明した。市民や医療関係者を対象とした研修会はこれからも有用と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriwaki S, Takigawa M, Igarashi N, Nagai Y, Amano H, Ishikawa O, Khan SG, Kraemer KH Xeroderma pigmentosum complementation group G patient with a novel homozygous mutation and no neurological abnormalities, *Exp Dermatol* in press.
- 2) Moriwaki S, Takahashi Y, Shimizu H, Inoue M, Sugiyama Y, Inoue S Decreased repair of singlet oxygen-induced DNA damage in xeroderma pigmentosum group A cells

determined by plasmid host cell reactivation *J Derm Sci*, in press.

- 3) Moriwaki S, Yamashita Y, Nakamura S, Fujita D, Kohyama J, Takigawa M, Ohmichi H Prenatal diagnosis of xeroderma pigmentosum group A in Japan. *J Dermatol*, in press.

- 4) Hirata Y, Koga S, Fukui N, Yu A, Koshida S, Kosaka Y, Moriwaki S 5-Aminolevulinic acid (ALA) - mediated photodynamic therapy to superficial malignant skin tumors using Super Lizer™. *J Dermatol* 38:748-754, (2011)

- 5) Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh K-S, Imoto K, Inui H, Moriwaki S, Emmert S, Pike KM, Raziuddin A, Plona T, DiGiovanna JJ, Tucker MA, Kraemer J Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum : long term follow-up characterizes the role of DNA repair. *Med Genet* 48:168-176, (2011)

- 6) Hiura Y, Nakanishi T, Tanioka M, Takubo T, Moriwaki S Identification of autoantibodies for α - and γ - enolase in serum from a patient with melanoma. *Jpn Clin Med* 2:35-417, (2011)

(邦文)

- 1) 森脇真一 誤診：しみ、本当は色素性乾皮症 誤診されている皮膚疾患（メディカ）レビュー 印刷中
- 2) 森脇真一 色素性乾皮症 皮膚疾患 最新の治療 2011-2012 p116 2011 南江堂 印刷中
- 3) 森脇真一 紫外線を用いた皮膚病治療 皮膚科セミナー 日本皮膚科学会雑誌 印刷中
- 4) 森脇真一 色素性乾皮症 今日の皮膚疾患治療指針 医学書院 印刷中
- 5) 森脇真一 光線過敏症患者に対する遮光指導 第21回太陽紫外線防御研究会シンポジウム報告書 21:49-52, 2011
- 6) 森脇真一 遺伝性光線過敏症と患者家族会活動 日本皮膚科学会雑誌、印刷中
- 7) 森脇真一 遺伝性早老症の病態、診断と治療 難病と在宅ケア 印刷中

- 8) 森脇真一 DNA 修復機構と色素性乾皮症 Monthly Book Derma (全日本病院出版会) 印刷中
- 9) 森脇真一 高齢者の光線過敏症をみたら? 高齢者の皮膚トラブル FAQ (診断と治療社) p94-97, 2011
- 10) 森脇真一 色素性乾皮症の遺伝子診断 Visual Dermatology 10:448-451, 2011
- 11) 森脇真一 晩発性皮膚ポルフィリン症 皮膚で見つける全身疾患 (メディカルレビュー社) p23 2011
- 12) 森脇真一 色素性乾皮症バリエント
- 皮膚で見つける全身疾患 (メディカルレビュー社) p40 2011
- 13) 森脇真一 皮膚疾患と看護 小児臨床看護学各論 小児看護学 (改訂12版) p415-425 医学書院 2011
- 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
 3. その他
なし

8. 光線過敏症の簡易な細胞診断方法の確立ならびにコケイン症候群由来細胞を用いた ips 細胞の樹立、細胞老化の誘導による細胞増殖の抑制機構の解明に関する研究

立石 智（熊本大学発生医学研究所講師）

研究要旨

アイソトープを使用せずに不定期 DNA 合成、RNA 合成回復、DNA 合成回復試験を行い、コケイン症候群を含む光線過敏症を簡易に細胞診断する方法を開発した。共同研究により、コケイン症候群の患者様由来の繊維芽細胞から ips 細胞を樹立した。また、癌抑制遺伝子に異常をもつ細胞に対して、細胞老化を誘導させることにより、細胞増殖を抑制する機構を解明した。

研究分担者 立石 智（熊本大学発生医学研究所講師）

A. 研究目的

これまで、コケイン症候群の細胞診断は、放射性同位元素を用いる専門的な手技であり、難易度が高かった。今回、蛍光試薬を用いる細胞診断方法により、色素性乾皮症（バリエーションを含む）およびコケイン症候群の簡易な細胞診断法を確立する。また、共同研究者との共同研究により、コケイン症候群の患者様由来の繊維芽細胞から ips 細胞を樹立することを試みる。また、癌抑制遺伝子に異常をもつ細胞に対して、細胞老化を誘導させることにより、細胞増殖を抑制する機構を解明する。

B. 研究方法

細胞診断は、1. 紫外線に対する感受性試験 2. 不定期 DNA 合成試験(UDS) 3. RNA 合成回復試験(RRS) 4. DNA 合成回復試験(DRS)の4つの基準により、判定する。コケイン症候群の患者様由来の繊維芽細胞を用いて、ips 細胞を樹立する。

（倫理面での配慮）

当該病院または熊本大学大学院生命科学研究部での疫学研究倫理審査委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で審理を経て承認されている。

C. 研究結果

アイソトープを使用せずに蛍光試薬を用いて、UDS、RRS または RDS 試験を行うことで簡易に、色素性乾皮症、色素性乾皮症バリエーションまたはコケイン症候群を細胞診断できることがわかった。細胞診断の流れを、図 1 のフローチャートで示す。今回、特に蛍光試薬を用いて RDS 試験により、色素

性乾皮症バリエーションとコケイン症候群由来の細胞を区別して診断できることがわかった(図 2)。コケイン症候群由来の繊維芽細胞にヤマナカ因子を導入することにより、ips 細胞を樹立することに成功した(図 3)。これは、熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野(江良教授)との共同研究により行われた。

Chk2 は癌抑制遺伝子であり、この遺伝子に異常をもつと癌のリスクが上昇することが知られている。今回、Chk2 と Rad18 の両方の遺伝子を欠損すると、細胞老化が誘導されることを見つけた。

D. 考察

蛍光試薬を用いる簡易診断方法では、蛍光顕微鏡で撮影したデジタル画像をイメージングソフトウェアで定量することにより客観的で信頼性のあるデータが得られ、色素性乾皮症、色素性乾皮症バリエーションまたはコケイン症候群が疑われる細胞の診断を簡易に行えることがわかった。コケイン症候群は酸化ストレスに対して感受性を示すことから、ips 細胞を樹立するのは困難であることが予想されていたが、定法により樹立できることがわかった。今後この細胞を用いて、基礎研究および臨床応用に向けて役立ててゆきたい。癌抑制遺伝子である Chk2 遺伝子と損傷トランスに関与する遺伝子である Rad18 を欠損する細胞で、細胞老化が誘導されることがわかった。この研究を進展させて、コケイン症候群における細胞老化の発現機構を明らかにしてゆきたい。

E. 結論

コケイン症候群を含む光線過敏症に対する、簡易な細胞診断法を確立した。コケイン症候群の患者様由来の繊維芽細胞を用いて、ips 細胞を樹立した。Chk2 と Rad18 遺伝子を欠損すると、細胞老化が誘導されることがわかった。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

① *Tateishi, S. A novel Rad18 ubiquitin ligase-mediated pathway for repair of camptothecin-induced DNA damage. *Cell Cycle* 10, (13) 2057-2058. (2011)

② Yanagihara, H., Kobayashi, J., Tateishi, S., Kato, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Yamada, K., Takezawa, J., Sugasawa, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Weemaes, C. M., Mori, T., Komatsu, K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol η -dependent translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* 43, (5) 788-797. (2011)

③ Hendel, A., Krijger, P. H., Diamant, N., Goren, Z., Langerak, P., Kim, J., Reibner, T., Lee, K. Y., Geacintov, N. E., Carell, T., Myung, K., Tateishi, S., D'Andrea, A., Jacobs, H., Livneh, Z. PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Genet.* (9) e1002262. (2011)

2. 学会発表

Tateishi, S., Watanabe, K., Sun, J., Iwabuchi, K., Yomogida, K. Rad18 is required for double-stranded break repair and long-term spermatogenesis, The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan, Workshop 2011 Dec. 13-16 Yokohama, Japan
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他