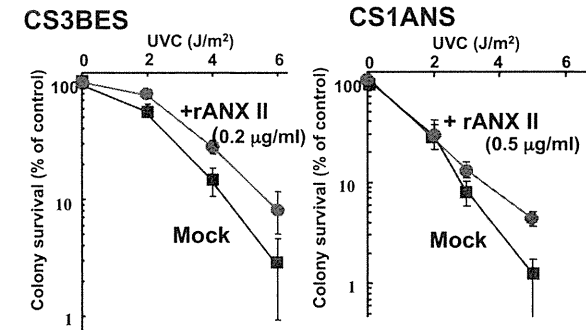


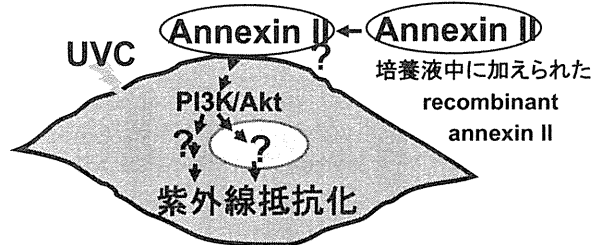
コケイン症候群患者由来培養細胞  
における紫外線抵抗化生理因子の解析

千葉大学教育学部基礎医科学 杉田克生  
千葉大学大学院医学研究院 喜多和子

培養液中にrecombinant annexin II(rANX II)を添加された不死化コケイン細胞における紫外線致死抵抗化

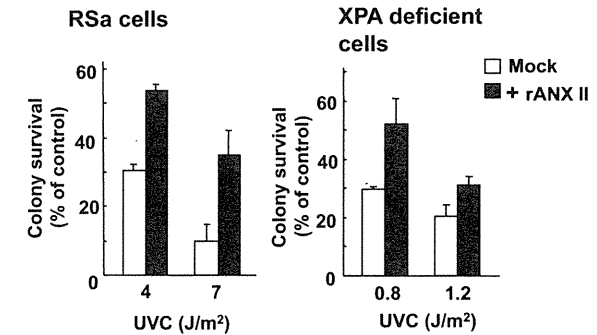


(Kita K, Sugita K *et al.*, Rad. Res., 2011)

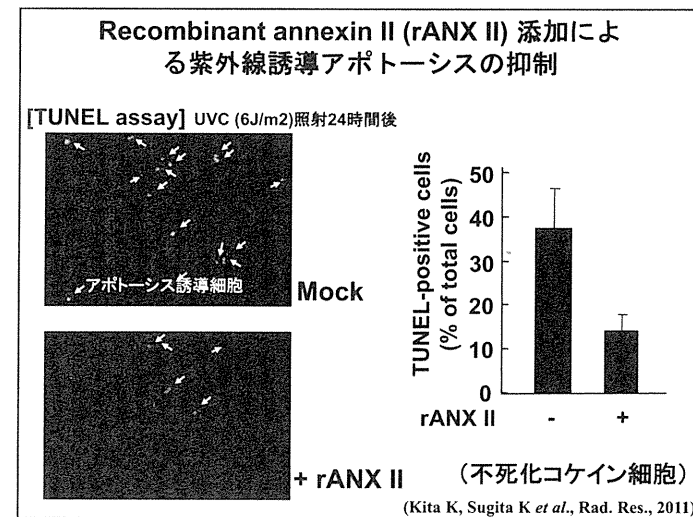
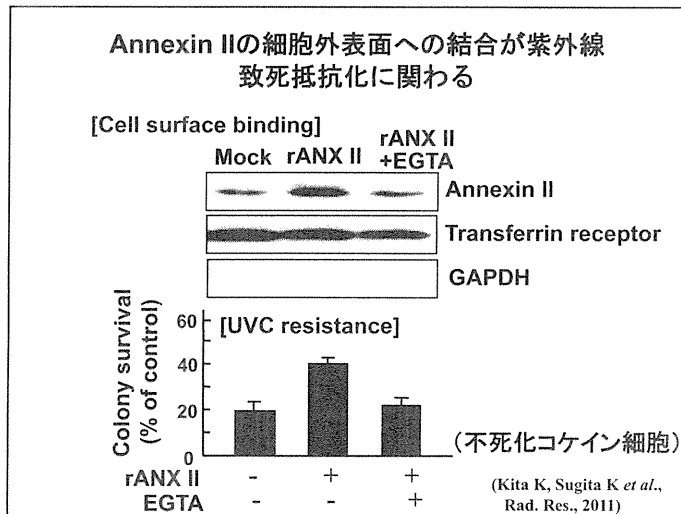
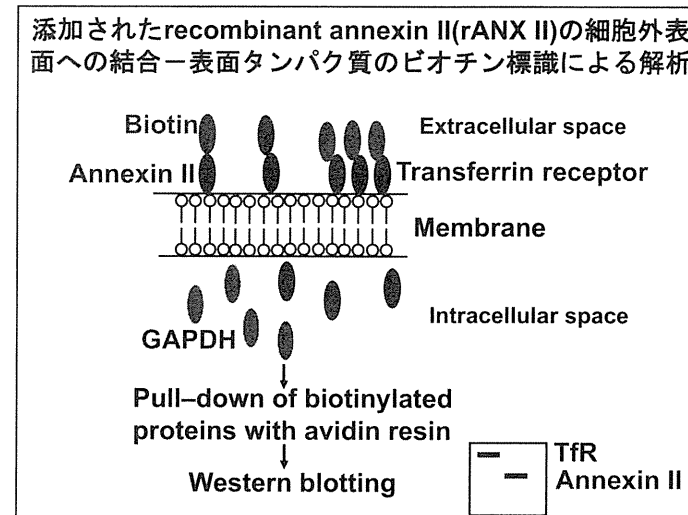
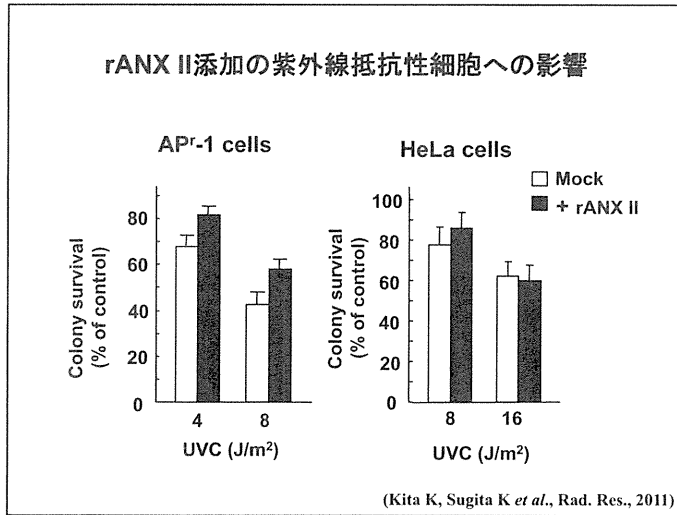


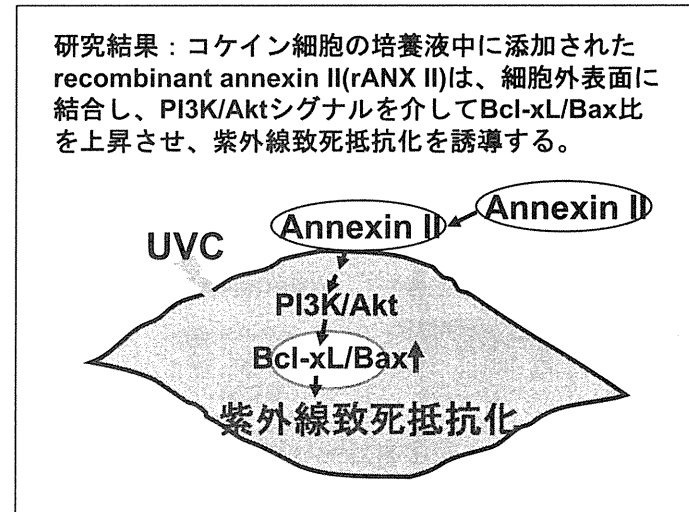
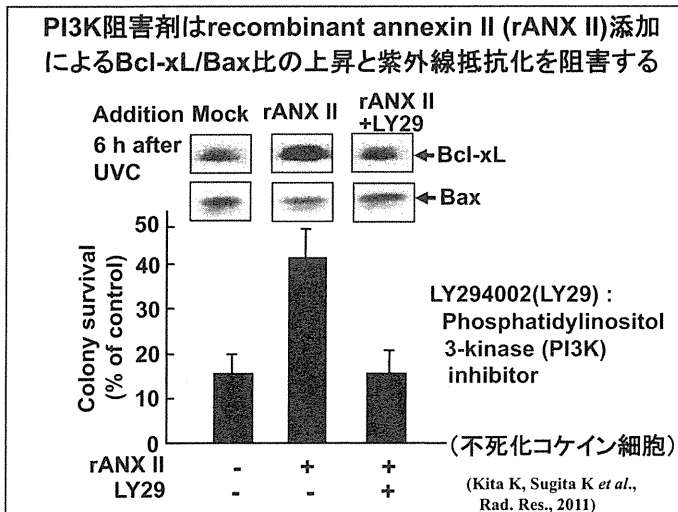
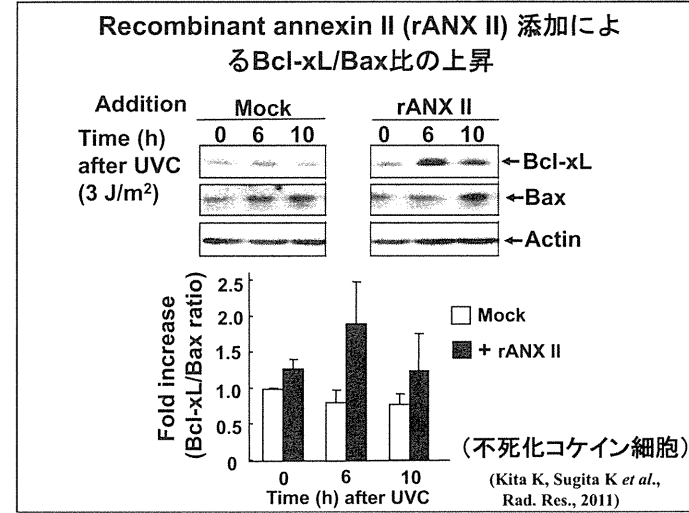
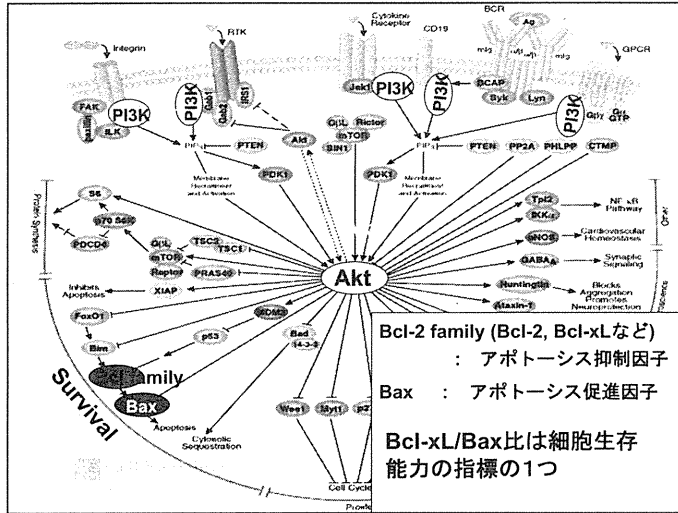
他の紫外線感受性細胞への適用?  
Annexin IIIは細胞表面に結合するか?  
細胞死誘導調節分子の関与?

Recombinant annexin II(rANX II)添加による他の紫外線感受性細胞の紫外線致死抵抗化

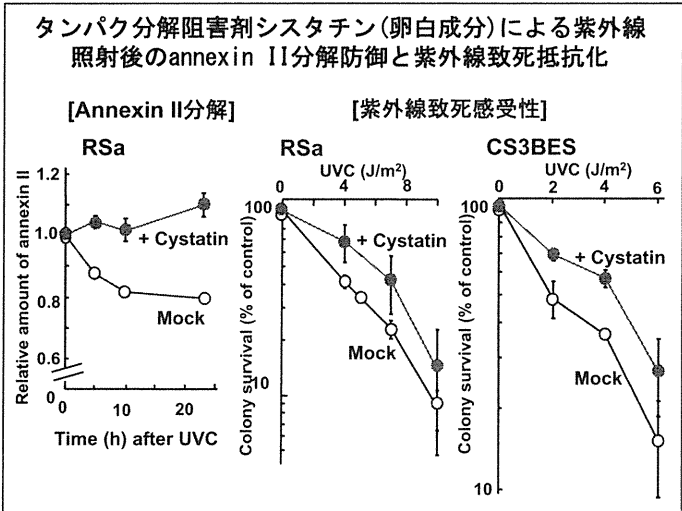
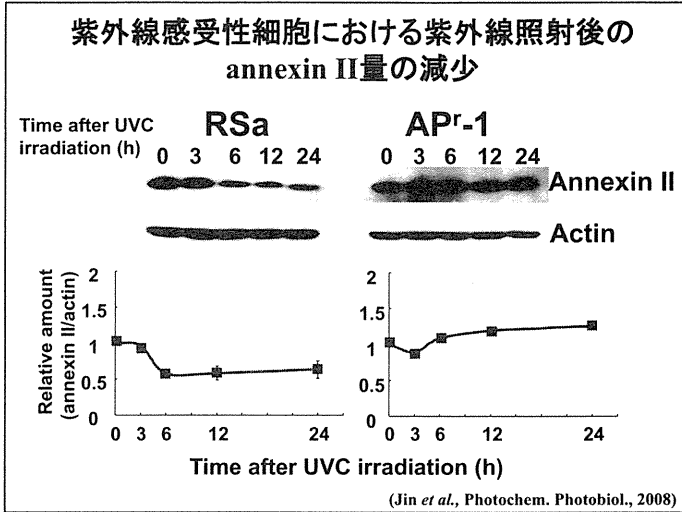


(Kita K, Sugita K *et al.*, Rad. Res., 2011)





Annexin IIの紫外線照射後の代謝変動とその変動に影響を及ぼす生理活性物質



*A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing.*

- Freitas AA, de Magalhães JP. *Mutat Res.* 2011 Jul-Oct;728(1-2):12-22. Epub 2011 May 10.
- Abstract
- Given the central role of DNA in life, and how ageing can be seen as the gradual and irreversible breakdown of living systems, the idea that damage to the DNA is the crucial cause of ageing remains a powerful one. DNA damage and mutations of different types clearly accumulate with age in mammalian tissues. Human progeroid syndromes resulting in what appears to be accelerated ageing have been linked to defects in DNA repair or processing, suggesting that elevated levels of DNA damage can accelerate physiological decline and the development of age-related diseases not limited to cancer. Higher DNA damage may trigger cellular signalling pathways, such as apoptosis, that result in a faster depletion of stem cells, which in turn contributes to accelerated ageing. Genetic manipulations of DNA repair pathways in mice further strengthen this view and also indicate that disruption of specific pathways, such as nucleotide excision repair and non-homologous end joining, is more strongly associated with premature ageing phenotypes. Delaying ageing in mice by decreasing levels of DNA damage, however, has not been achieved yet, perhaps due to the complexity inherent to DNA repair and DNA damage response pathways. Another open question is whether DNA repair optimization is involved in the evolution of species longevity, and we suggest that the way cells from different organisms respond to DNA damage may be crucial in species differences in ageing. Taken together, the data suggest a major role of DNA damage in the modulation of longevity, possibly through effects on cell dysfunction and loss, although understanding how to modify DNA damage repair and response systems to delay ageing remains a crucial challenge.

# Xpg nullマウスの解析

鳥取大学医学部 ゲノム形態学分野  
中根裕信

# Xpg nullマウスの解析

鳥取大学医学部 ゲノム形態学分野  
中根裕信

## Xpg nullマウスにおけるコケイン様臨床症状の検討

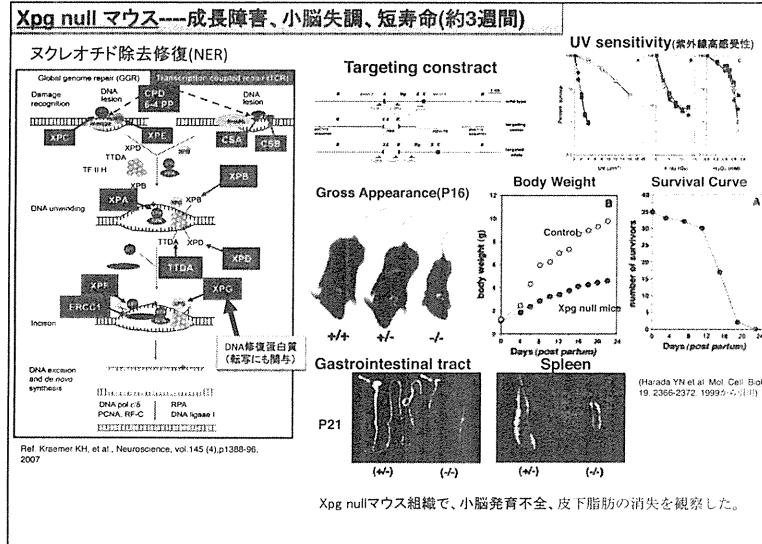
1) 各日令のXpg nullマウス(〜3週令)の組織検索を行う。検索には、各日令マウスを灌流固定した標本を作成し(固定条件を一定にするため)、光学顕微鏡(場合によってはTEMを用いて)で検索する。当然、ヒトとマウスの種の違いには、細心の注意を払って検索する。

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。

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]、尖足[歩行異常]、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。

[ ] : コケインの臨床症状。

2) 顕著な病理変化が見られない場合でも、蛋白質の発現レベルの違いがある可能性もあるので、各日令Xpg nullマウスの各臓器(腎臓)のmRNAを採取して、腎臓機能に関与する遺伝子発現をReal-time PCR、免疫組織学的手法等で検討する。



Xpg nullマウス組織で、小脳発育不全、皮下脂肪の消失を視察した。

## ヌクレオチド除去修復症候群の主な臨床症状

疾患	色素性乾皮症/ コケイン症候群 (XP-CS)	コケイン症候群 ( Cockayne syndrome: CS)	Xpg nullマウス
日光過敏	++	+++ *	++
色素沈着の異常	++	-	N. D.
皮膚癌	++	-	N. D.
悪液質性小人症(皮下脂肪消失)	++	++	?
神経細胞の髄鞘化異常	++	++	?
性腺機能低下	++	++	?
失調 (歩行異常)	++	++	+
感音性難聴	++	++	?
眼球異常	++	++	?
当てはまる疾患の 相補性群	XP-B/CS XP-D/CS XP-G/CS 転写異常	CS-A, CS-B 遺伝性早老症 [寿命約12才] 転写異常	重篤な成長障害 寿命短縮 (約3週令)

### コケイン症候群の各脂肪組織

コケイン症候群の診断基準には、著しい体重の増加不良があるので、各脂肪組織に注目し臨床文献を検討した。

脂肪組織	脂肪組織 (肉質の減少が特徴)	心臓
皮下脂肪	皮下脂肪組織 (皮下脂肪の減少)	心臓
筋内脂肪	筋内脂肪組織 (筋内脂肪の減少)	筋内脂肪
腸系脂肪	腸系脂肪組織 (腸系脂肪の減少)	腸系脂肪
鼻翼脂肪	鼻翼脂肪組織 (鼻翼脂肪の減少)	鼻翼脂肪
アキレス腱の脂肪結核 (Kager's fat pad (KFP))	アキレス腱の脂肪結核 (アキレス腱の脂肪結核の減少)	アキレス腱

引用文献 組織学(11版 広川書店)、ネット解剖学図鑑(2版 丸善)、プロメテウス解剖学アトラス(4版 医学書院)、  
Ultrasound of the Musculoskeletal System, Bianchi S. et al. 2007, Springer

コケイン症候群のいくつかの臨床症状は、何らかの理由で生じる各脂肪組織の消失によって生じる可能性がある。

### Xpg nullマウスの 歩行異常

Xpg nullマウスは、早い時期から四肢を突っ張るように歩行し、よくひっくり返っていた。また、生後3週令では後肢の足底はしっかりと接地しないで、つま先で不安定に歩くことも観察していた。

### Xpg nullマウスの関節内および関節周囲の脂肪組織の検索

関節内脂肪組織の状態を光顕標本で観察したところ、対照群マウスに比べ生後3週令Xpg nullマウスの膝関節内の脂肪組織の減少が見られた。また、同様に足関節内および足底の脂肪組織も減少していた。このことから、関節内の脂肪組織の減少が、関節の動きの制限にもなりうることから固い動き(四肢を突っ張るようなぎこちない動き)となる可能性を見いだした。今後さらに末梢神経の詳細な検索により、固い動きとの関係も解明する必要がある。

以上より、Xpg nullマウスの歩行異常は、小脳失調によるだけでなく、関節内の脂肪組織の減少による関節の動きの異常により生じている可能性があると考えられた。

今後の解析から、Xpg nullマウスがCSの関節拘縮の病態を解析するためのモデルとなる可能性がある。

### Xpg nullマウスの腎臓の解析

コケイン症候群の患者さんでは腎障害が生命予後に深く関わるため、その病態解明が急務である。CSの腎障害の病態解明のために、Xpg nullマウスの腎臓の解析を行った。

#### ヌクレオチド除去修復(NER)の欠損状態と腎臓との関係

- 1) NER欠損状態(Xpa遺伝子欠損マウス)で、腎臓での遺伝子の突然変異頻度が上昇するとの報告がある。  
[Dolé ME et al., Mutation Research, vol.596 :p22-35, 2006, Increased genomic instability is not a prerequisite for shortened lifespan in DNA repair deficient mice.]
- 2) NERの欠損状態(Xpa遺伝子欠損マウス)に、フェナセチン(薬剤)を投与すると、同マウスの腎皮質の近位尿細管上皮細胞の細胞核がkaryomegaliaを示し、遺伝子の突然変異頻度が上昇するとの報告がある。[Luijten M et al., Mutation Research, vol.596:p143-50, 2006, Phenacetin acts as a weak genotoxic compound preferentially in the kidney of DNA repair deficient Xpa mice]

上記より、NER欠損状態では、腎臓に何らかの異常が生じる可能性が考えられた。

そこで、15日令および21日令Xpg nullマウス腎臓を光顕で検索したが、対照群に比べ顕著な病変は見られなかった。それと同時に、予備実験で、Xpg nullマウス腎臓における腎臓機能関連遺伝子のReal-time PCRによる遺伝子発現解析を行ったところ、対照群マウスと比較していくつかの遺伝子の発現に差がみられた。現在、検体数を増やして遺伝子発現解析を行い、その遺伝子と腎機能との関連を解析中である。

今後の解析を進めることで、CSの腎障害の病態の解明につながる可能性があると考えられる。

### 考察

本研究班で実施した解析により、Xpg nullマウスの関節病変がわかったことで歩行異常の病態に迫ることができた。しかし、脳および末梢神経と本病態との関係が明らかになることで、CSの新たな治療戦略に結びつくものと考ええる。

また、当初、短寿命のため、Xpg nullマウス腎臓では病変が生じず、遺伝子発現の変化も差がないのではないかと推測していた。しかし、予備実験で検索したいくつかの腎臓関連遺伝子の発現変化が見られたことから尿・血液等を調べ、腎機能との関連を検索する必要がある。さらにCS症例の腎臓の病理切片での検索をすることで、CSの腎病変と遺伝子発現異常との関係を調べる。

さらに解析を進め、Xpg nullマウス腎臓とCSの腎障害との異同が明らかになれば、CS患者さんの腎臓に対する薬剤感受性を調べるためのin vivoモデル(薬剤への感受性・毒性試験)として役立つ可能性がある。

以上からXpg nullマウスの検索の仕方によっては、CSの新たな病態解明の糸口が見いだせる可能性があると考えている。

最後に  
このCS班に参加させていただき、多くの助言・協力をいただいたおかげで、Xpg nullマウスがCSの疾患モデルとしての可能性を示せ、少しでもCSの病態解明の手がかりを得られたと感じています。

# コケイン症候群の腎障害と 酸化ストレス

都立府中療育センター 小児科  
田沼 直之



## コケイン症候群の腎障害と酸化ストレス

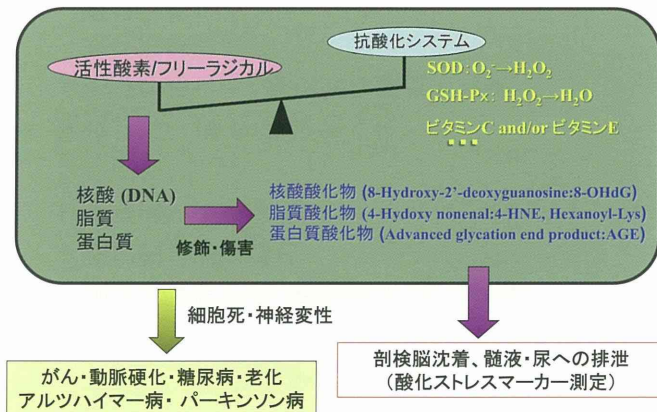
都立府中療育センター 小児科  
田沼 直之

## 背景

コケイン症候群(CS)は色素性乾皮症(XP)とともにDNA修復機構に先天的な異常があり発症する疾患である。

我々はこれまでに剖検脳での神経病理学的解析や尿中酸化ストレスマーカー解析を通じて、CS・XP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。

## 酸化ストレスのメカニズム



## カルボニル化蛋白

- タンパク質の酸化修飾体として、カルボニル化タンパク質はよく研究されている。
- カルボニル化タンパク質はタンパク質中のプロリン、アルギニン、リシン、スレオニンなどのアミノ酸が活性酸素種(ROS)により酸化修飾を受け、カルボニル誘導体となったタンパク質の総称である。
- カルボニル誘導体は化学的に安定なため、酸化ストレスマーカーとして頻繁に用いられている。
- 糖尿病患者(IDDM)において血漿中のカルボニル化蛋白レベルが上昇するほか、老化に伴い組織中のカルボニル化蛋白が増加することが報告されている。

## CSと腎障害

- 平成21年度全国調査報告書によると
  - 死亡例15例中8名
  - 生存例16例中1名
- 病理所見(過去の報告より)
  - 糸球体硬化症, 糸球体基底膜の肥厚
  - 急性尿細管壊死
  - 間質性変化

## 今年度の研究成果

- 酸化ストレスマーカーの解析(継続)
  - カルボニル化蛋白(免疫染色&ELISA)
- CSにおける腎障害
  - 剖検例での解析(XPとの比較)

### DNA・脂質に対する酸化ストレスマーカー

老化制御研 8-OHdGマウスモノクローナル抗体(2000倍)  
老化制御研 4-HNEマウスモノクローナル抗体(2000倍)

### カルボニル化蛋白指標

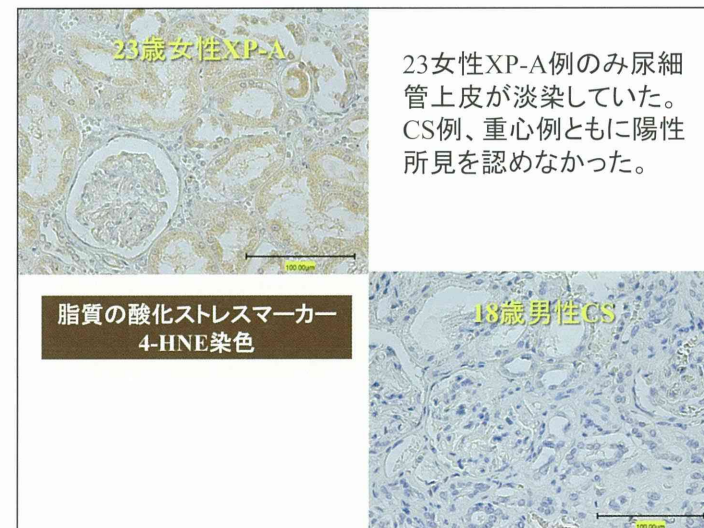
TransGenic AGEマウスモノクローナル抗体(3000倍)

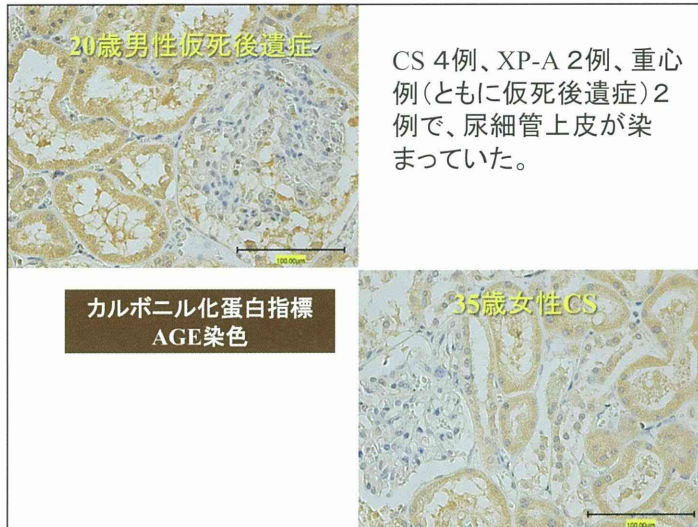
### 抗酸化酵素

Stressgen Cu/ZnSODウサギポリクローナル抗体(750倍)  
Stressgen MnSODウサギポリクローナル抗体(500倍)

### 老化モデルマウス*Klotho*蛋白

ABCAM *Klotho*ウサギポリクローナル抗体(250倍)





20歳男性仮死後遺症

CS 4例、XP-A 2例、重心例(ともに仮死後遺症)2例で、尿細管上皮が染まっていた。

カルボニル化蛋白指標  
AGE染色

35歳女性CS



24歳男性仮死後遺症

近位尿細管(曲部=直部)上皮細胞、糸球体ボーマン腔が、CS例(残存部)、XP-A例、重心例の全てで濃染していた。

抗酸化酵素  
Cu/ZnSOD  
染色

18歳男性CS

### DNA・脂質に対する酸化ストレスマーカー

老化制御研 8-OHdGマウスモノクローナル抗体(2000倍)  
老化制御研 4-HNEマウスモノクローナル抗体(2000倍)

### カルボニル化蛋白指標

TransGenic AGEマウスモノクローナル抗体(3000倍)

### 抗酸化酵素

Stressgen Cu/ZnSODウサギポリクローナル抗体(750倍)  
Stressgen MnSODウサギポリクローナル抗体(500倍)

### 老化モデルマウスKlotho蛋白

ABCAM Klothoウサギポリクローナル抗体(250倍)

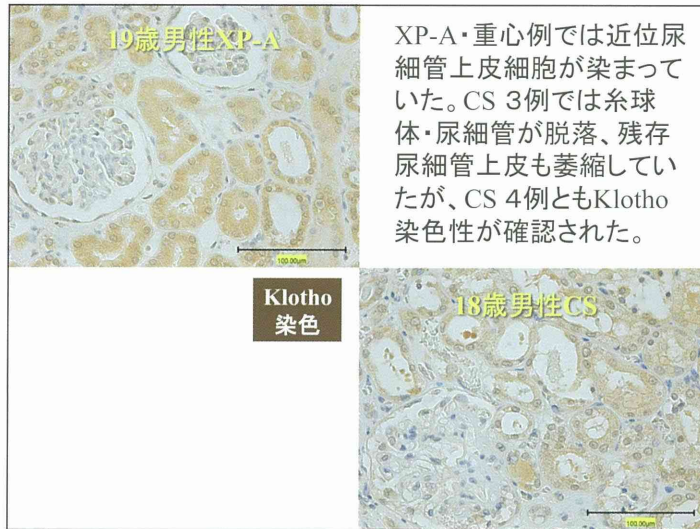
## klotho遺伝子



- klotho発現欠如マウス(klothoマウス)は、多彩なヒト型の老化徴候を示し、生後約100日で老化により死亡する。
- klotho遺伝子は、カルシウムホメオスタシスの中枢である腎尿細管、脳の脈絡膜、副甲状腺ホルモンを産生する副甲状腺の主細胞で強く発現している。
- klotho遺伝子発現・蛋白量が腎不全患者の腎組織で顕著に低下している(BBRC: Koh N et al.;2001;280:1015-1020)。

Klothoとはヒトの運命を司る3人のギリシャ神話の女神のひとり、生命の誕生に立ち会い、生命の糸を紡ぐ女神の名前である。  
まず「運命の糸」をみずからの糸巻き棒から紡ぐのがクローター(Klotho、「紡ぐ者」の意)で人間に「割り当てる者」がラクセス(Lakshesis、「運命の図柄を描く者」の意)で、こうして最後にこの割り当てられた糸を、三番目のアトロpos(Atropos、「不可避のもの」の意)が切った。このようにして人間の寿命は決まるのである。

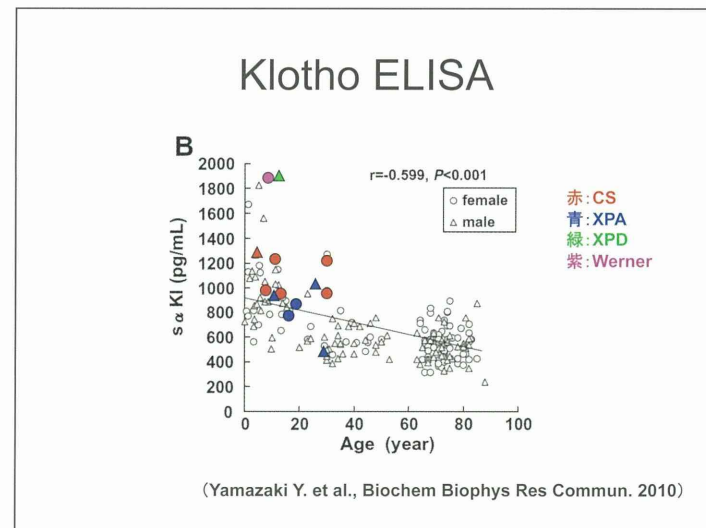




No.	Age/Sex	Glomerular changes	Tubular changes	8-OHdG	4-HNE	AGE	Reduced expression	
<i>Cockayne syndrome</i>								
1	18y/Male	1+	1+	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
2	18y/Male	2+	2+	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
3	28y/Female	(-)	(-)	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
4	35y/Female	1+	1+	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
<i>Xeroderma pigmentosum group A</i>								
1	19y/Male	(-)	(-)	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
2	23y/Female	1+	(-)	(-)	1+	1+	(-)	(-)
<i>Sequel of ter perinatal asphyxia</i>								
1	20y/Male	(-)	(-)	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
2	24y/Male	(-)	(-)	(-)	(-)	1+	(-)	(-)
<i>Sequel of ter encephalopathy</i>								
3	30y/Male	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

### Klotho ELISA

No.	age/sex	klotho (pg/ml)
<i>Cockayne syndrome</i>		
1	4y/Male	1290
2	6y/Female	947
3	10y/Female	1210
4	13y/Female	913
5	31y/Female	1240
6	31y/Female	911
<i>Xeroderma pigmentosum group A</i>		
1	7y/Male	927
2	16y/Female	778
3	18y/Female	825
4	26y/Male	1010
5	29y/Male	462
<i>Xeroderma pigmentosum group D</i>		
1	13y/Male	1970
<i>Werner syndrome</i>		
1	8y/Female	1910



## 結果・考察

- CSの腎病変の免疫染色では酸化ストレスマーカーはAGE(カルボニル蛋白指標)以外は染色されなかった。AGEは腎病変のない疾患コントロールでも陽性のため、CSの腎病変に直接的には関与していないと考えられた。
- Klotho免疫染色ではCS例の尿細管はXPや疾患コントロールと同様に陽性染色を示し、発現量の低下は認めなかった。ELISAにおいても血清サンプルで同様の所見が確認されたが、尿サンプルではサンプル間のばらつきが目立ち、一定の傾向が得られなかった。

## 結語

コケイン症候群(CS)の腎障害には酸化ストレスが直接的に関与していることは証明できなかった。今後さらに解析を進め病態を明らかにしていくことが必要である。

# 光線過敏症の簡易な細胞診断方法確立、 細胞老化と細胞増殖に関する研究

熊本大学 発生医学研究所 損傷修復分野

立石 智

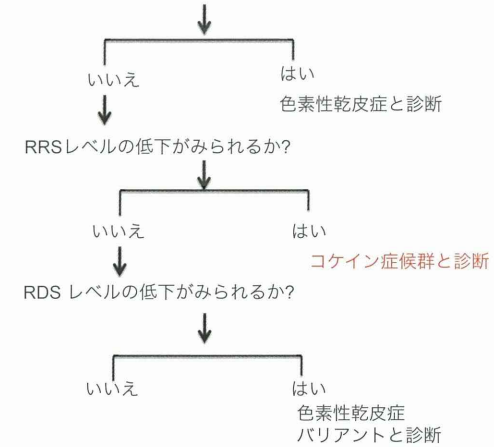
光線過敏症の簡易な細胞診断方法確立、  
細胞老化と細胞増殖に関する研究

熊本大学 発生医学研究所 損傷修復分野

立石 智

図1 色素性乾皮症およびコケイン症候群の簡易細胞診断方法

UDSレベルの低下がみられるか?



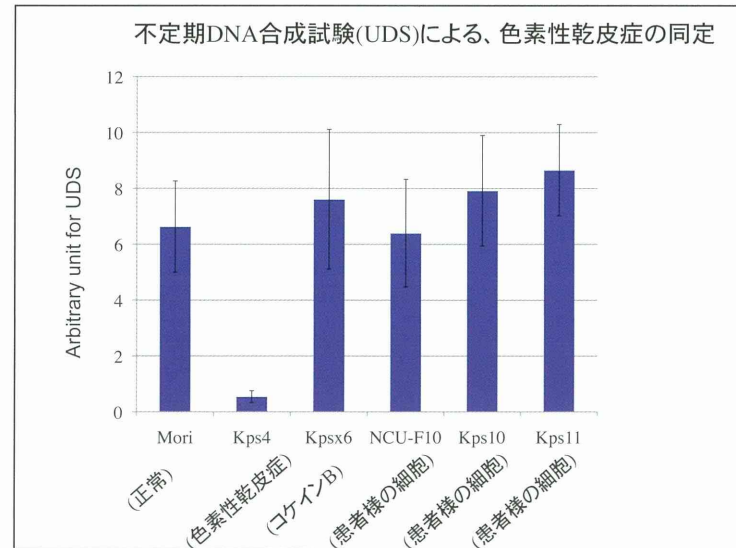
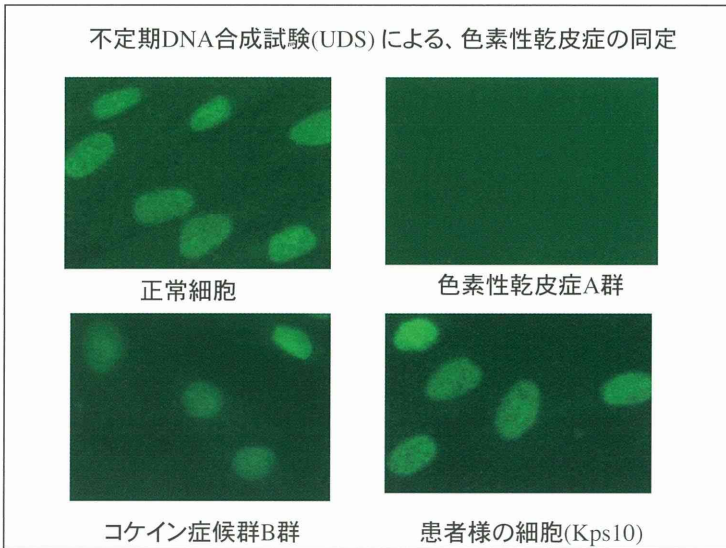
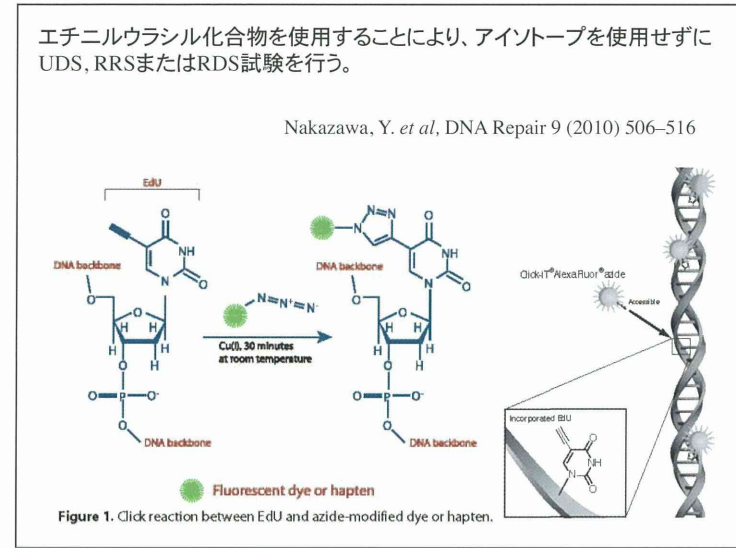
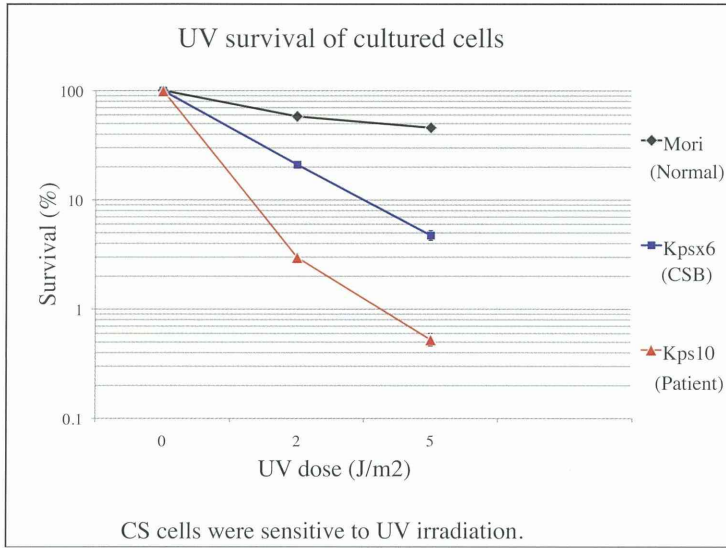
Itoh, T. et al, J. Invest. Dermatol. 1996

コケイン症候群であると細胞診断するために  
必要な診断基準

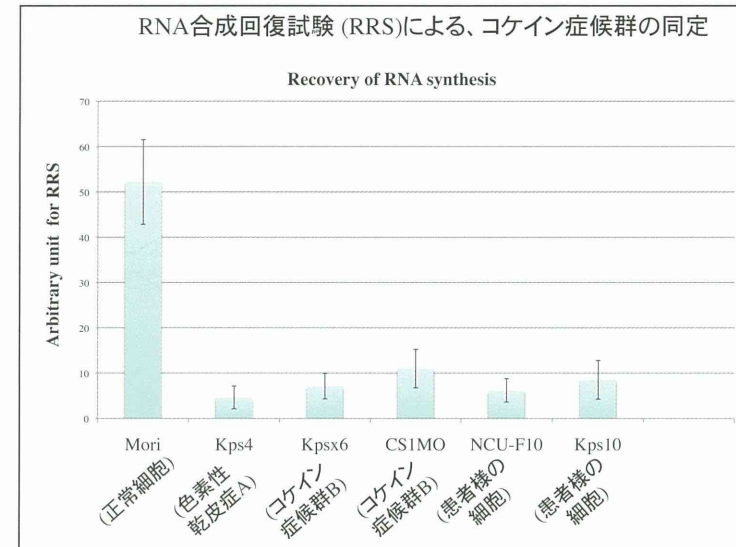
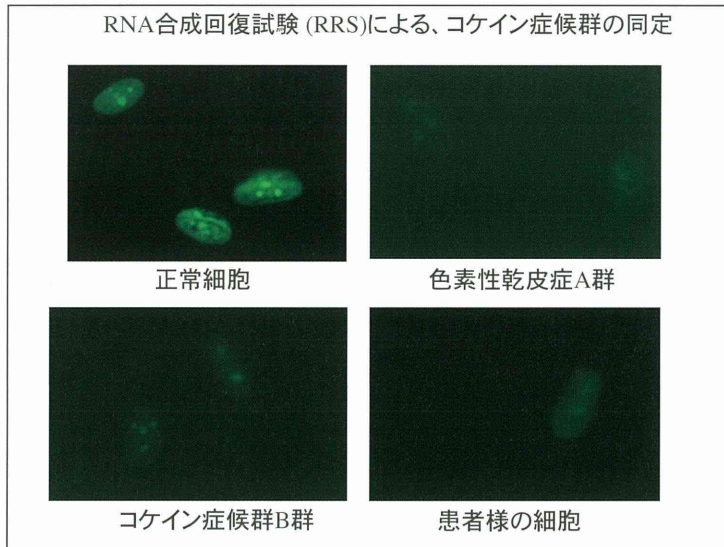
1. 細胞に紫外線を照射して感受性がみられること  
(UV照射後の細胞の生存率の低下)
2. 不定期DNA合成 (UDS) が陽性であること
3. RNA合成回復 (RRS)が陰性であること

Kps10

5歳7ヶ月の男児。  
臨床症候はSugarmanらの診断基準をほぼ満たす。  
大脳基底核の石灰化はみられないが、  
MRIで大脳/小脳萎縮と髄鞘化遅延の所見は合致している。







これまでのコケイン症候群が疑われる症例の細胞診断結果およびips細胞の作成状況

細胞名	由来	UV sensitivity	UDS	RRS	細胞診断	ips細胞作成
NCU-F10	名古屋	sensitive	positive	negative	コケイン症候群	ほぼ終了
Kps10	福岡	sensitive	positive	negative	コケイン症候群	作成予定
Kps11	熊本	Not sensitive	positive	positive		

NCU-F10とKps10は、CSAおよびCSB遺伝子の配列を長崎大学医学部の萩先生との共同研究により解読している。  
CSAのエキソン4に異常がある可能性がある。

Kps11

26歳女性、低身長、精神発達遅滞(3歳児程度か?)、小頭症、開脚位で不安定な歩行、日光過敏、難聴、くちばし状の鼻、上あごの突出を認める。  
上肢は低緊張、下肢は痙縮がみられ、下肢の腱反射の亢進、バビンスキー反射、チャドック反射陽性、原始反射陽性を認める。

臨床経過: 幼少期(4.5歳時?)には皮膚症状出現、その後に歩行障害が出現し11歳時に整形外科で麻痺性内反足に対して手術が施行されている。

知的には退行なし。  
精神発達遅滞はあった。  
齲歯は歯科で定期的に治療中。

RDS (Recovery of DNA synthesis)による、  
色素性乾皮症バリエントの細胞診断の試み

細胞の由来	RDS
正常細胞	陽性
色素性乾皮症A群	陽性
色素性乾皮症バリエント	陰性
コケイン症候群	陰性

色素性乾皮症バリエントだけではなく、コケイン症候群も陰性の値を示した。このため、両者を区別する工夫が必要。

色素性乾皮症バリエント細胞に、原因遺伝子を導入し、RDSの値が回復するか試験する予定

## 色素性乾皮症バリエント(XPV)とは

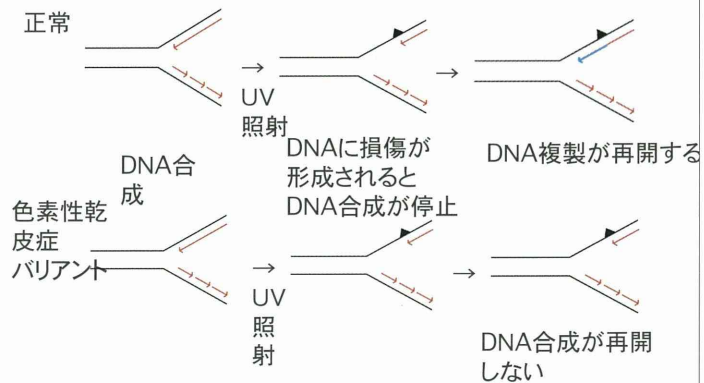
- 光線過敏症のひとつ
- 常染色体劣性遺伝病
- 身体的特徴
  - 5~7歳・・・顔面に雀卵斑様色素斑、皮膚の乾燥や粗糙、老人性疣贅様皮疹
  - 20歳以降・・・基底細胞上皮腫(BCE)、扁平上皮癌(SCC)



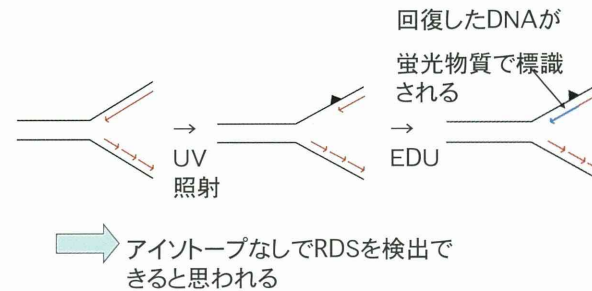
『光線過敏症』改訂第2版 佐藤吉昭 編 金原出版 1991

## RDSとは

DNA合成の回復 (Recovery of DNA Synthesis)



## 実験の内容



## 実験結果

正常細胞 (Mori)



DNA合成が再開し、RDSの値が高かった

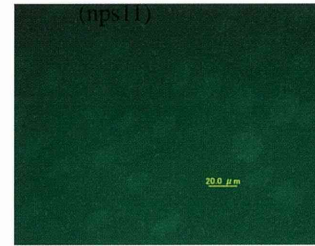
コケイン症候群由来の細胞



コケインでも、RDSの値が高いケースも見られた

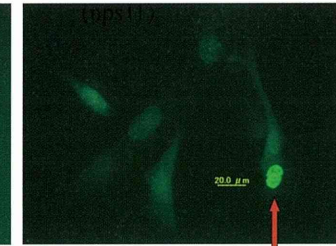
## ・色素性乾皮症バリエント患者様由来の細胞

遺伝子導入前



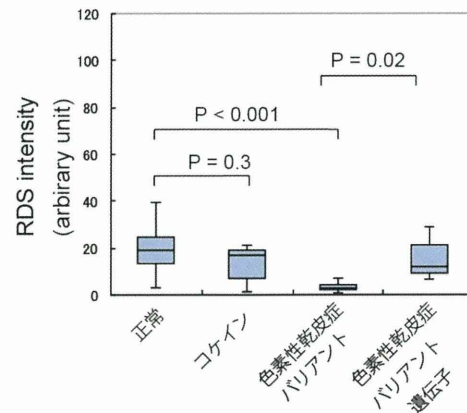
RDSは見られない

遺伝子導入後



XPVの原因遺伝子を導入すると、RDSが回復した

色素性乾皮症バリエント患者様由来の細胞では、正常細胞またはコケイン症候群細胞に比べて、RDS値が低下している。原因遺伝子であるXPVを細胞へ導入することにより、RDSの回復がみられた。



## 結論

- ・蛍光物質によって標識することで、DNA合成回復(RDS)を検出した。
- ・色素性乾皮症バリエント由来の細胞では、RDSが低下していることが確認できた。
- ・色素性乾皮症バリエントの原因遺伝子を患者細胞に導入することにより、RDSが回復することが確認できた。


**コケイン症候群の患者様由来のips細胞の作成**

1. 患者様の非露光部位からの皮膚片の生検による採取
2. 皮膚片を用いて繊維芽細胞の樹立
3. コケイン症候群のための細胞診断の実施
4. 繊維芽細胞にセンダイウイルスベクターにより、ヤマナカ因子を導する。
5. ips用の培地で培養を継続し、未分化な状態を保つips細胞のコロニーを選択する。


**図3 SeVベクターによるiPS細胞誘導**

SeV 導入 day0      フィーダー細胞上へ day7      播き直し day8      コロニーピックアップ day20~30      AP 染色 day30

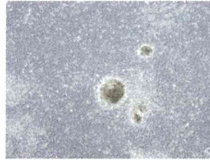
DMEM
  DMEM/F12+KSR+L-Gln+NEAA+2ME+bFGF



day3



day13



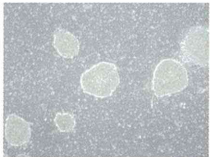
day18

**Cockayne病由来 iPS**

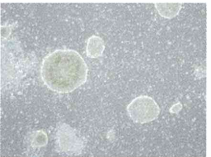
clone-1

clone-2

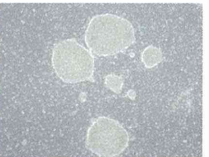
clone-3



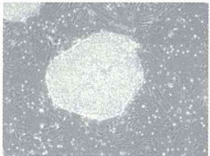
×40



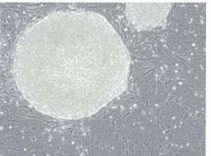
×40



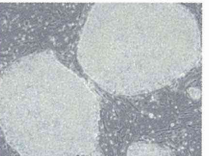
×40



×100



×100



×100


**細胞老化と細胞増殖に関する研究**

}

老化

—

個体の老化

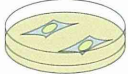


—

器官の機能の低下など

—

細胞の老化



—

長期にわたる細胞増殖の停止

6