

細胞老化の特徴

- 発癌を防御することが主な役割
- 個体老化と関連している
- 細胞の増殖が不可逆的に停止した状態
- 細胞が扁平した状態に広がる
- SA-B-galactosidase染色に陽性

細胞老化を引き起こす要因

1. 酸素圧(20%)、酸化ストレス
2. 染色体のテロメアの欠損、侵食

ヒト細胞では、抗酸化能力が高く、テロメアが比較的短いため、主にテロメア長が短くなることが細胞老化を引き起こす。

マウス細胞では、抗酸化能力が低く、テロメア長が長いため、主に酸素の存在が細胞老化を引き起こす。

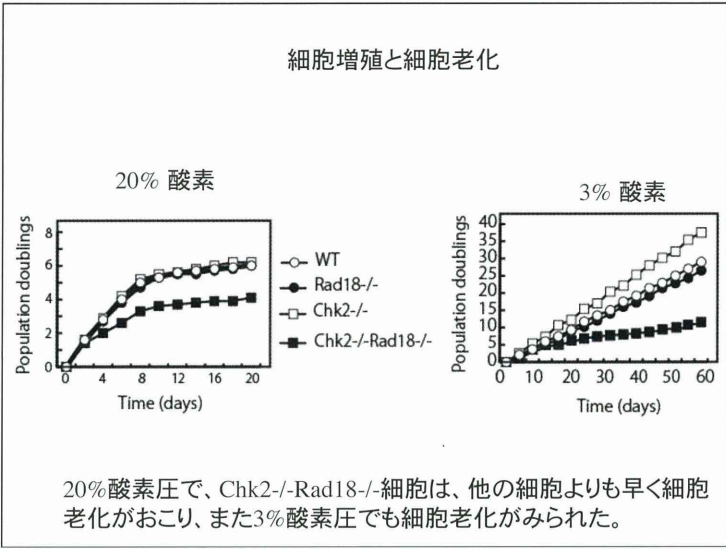
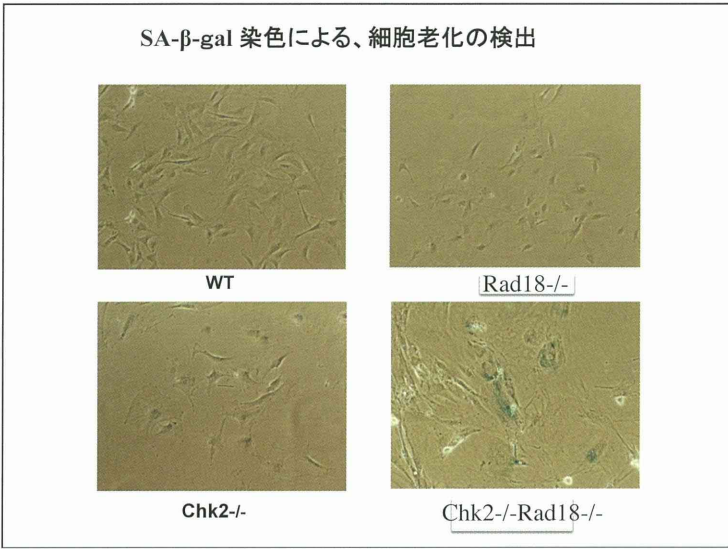
次の2つの遺伝子に着目して、細胞増殖と細胞老化について調べた

Chk2 : DNA損傷に応答して細胞周期を制御するリン酸化酵素。癌抑制遺伝子として知られている。この遺伝子の異常は、人口の約0.5%にみられ、発癌のリスクが約3倍増加することが報告されている。

Rad18 : 色素性乾皮症バリエーションの原因遺伝子産物である損傷乗越え複製酵素を制御するユビキチンライゲース。

用いた細胞の名前

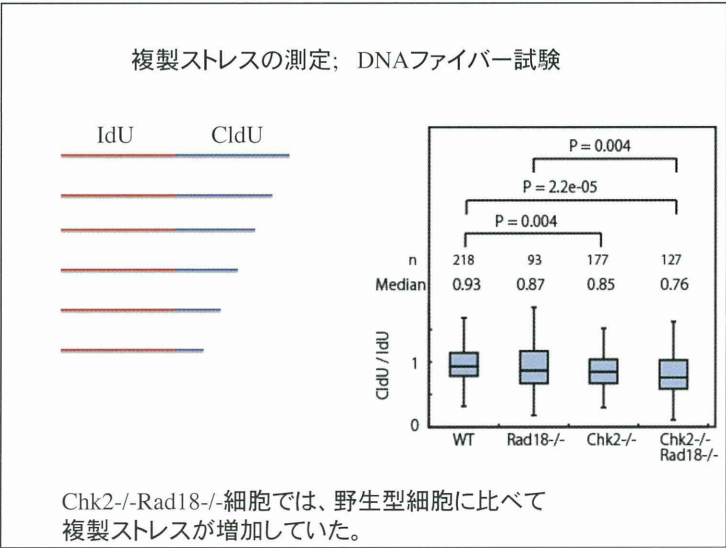
- wild-type (WT) 細胞
- RAD18^{-/-} 細胞
- Chk2^{-/-} 細胞
- Chk2^{-/-} RAD18^{-/-} 細胞



DNAの複製が突然停止すること(複製ストレス)が、細胞老化を引き起こす要因であると、提唱されている。

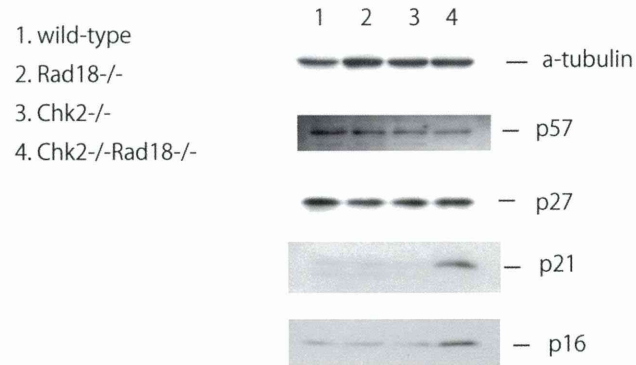
複製ストレスがおこる原因

- 発癌遺伝子の発現による、DNA複製の亢進
- G-rich配列など複製しにくい領域でのDNA複製
- DNA傷害されている領域の複製
- DNA結合タンパクによる複製阻害



Chk2^{-/-}Rad18^{-/-}細胞では、細胞周期を停止させる分子である

p16およびp21タンパクが強く発現していた



まとめ

1. Chk2とRad18を欠損する細胞は、細胞老化をおこす。
2. この細胞では、複製ストレスが増加していた。
3. p16およびp21などの、細胞周期抑制因子が強く発現していた。
4. Chk2遺伝子の異常により発癌した組織に対してRad18を阻害する薬剤を投与することにより、細胞老化を誘導させ発癌を抑制できる可能性が考えられる。

Contributors

熊本大学 発生医学研究所
損傷修復分野

立石 智 (細胞診断)

熊本大学 発生医学研究所
幹細胞誘導分野

江良 択実 (ips細胞作成)

長崎大学大学院
医歯薬学総合研究科
原爆後障害医療研究施設

荻 朋男 (CSゲノム解析)

三重大学大学院医学系研究科
機能プロテオミクス講座

杉村 和人 (DNAファイバー)

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

Cockayne（コケイン）症候群 の睡眠障害、アセチルコリン 神経病変の検討

(財)東京都医学総合研究所
こどもの脳プロジェクト

林 雅晴

コケイン症候群の中中枢神経病理 所見、および他の臓器病理所見の 解析

東京都神経科学総合研究所
神経発達・再生
林 雅晴

case	Study/Year/case ID	Cachexia	Cockayne Facies	Skin Changes or Malignancies	Vascular or Other Medical Problems
1	Miyauchi et al/1994/case2 (Sib of case 2)	No	No	UV sensitive, freckled itive, dry, itic, freckled itive, freckled	No Hypertension, renal failure Dysphagia, elevated transaminases
Cockayne症候群剖検脳での 脳血管病変の解析					
6	This case	Yes	Yes	Mildly UV sensitive	Atherosclerosis, dysphagia
7	Paddison et al/1963/case5; Moosy/1965 (cousin of case 12)	Yes	—	UV sensitive	Early atherosclerosis
8	Shirasaki et al/1986	Yes	—	Dry, pigmented, freckle	L ICA+R MCA stenosis; aneurysm R ICA hyperlipoproteinemia
9	Kennedy et al/1980	Yes	Yes	UV sensitive	—
10	Fryns et al/1991	Yes	Yes	—	Dysphagia
11	Shemen et al/1984	Yes	Yes	—	Mild aortic atherosclerosis
12	Paddison et al/1963/case3 (cousin of case 7)	Yes	—	—	—
13	Unpublished	Yes	Yes	—	Dysphagia
14	Crome and Kanjilal/1971	Yes	Yes	UV sensitive	Atheroma: minimal systemic, extensive intracranial
15	Nance and Berry/1992	Yes	Yes	UV sensitive, dry, scaly in exposed areas	Hepatomegaly, diarrhea elevated liver function tests
16	Brumback et al/1978/CS2BE	Yes	Yes	—	—

— = no information; ICA = internal carotid artery; L = left; MCA = middle cerebral artery; R = right; UV = ultraviolet

Rapin I, et al. Cockayne syndrome in adults: review with clinical and pathologic study of a new case. *J Child Neurol* 2006;21:991-1006

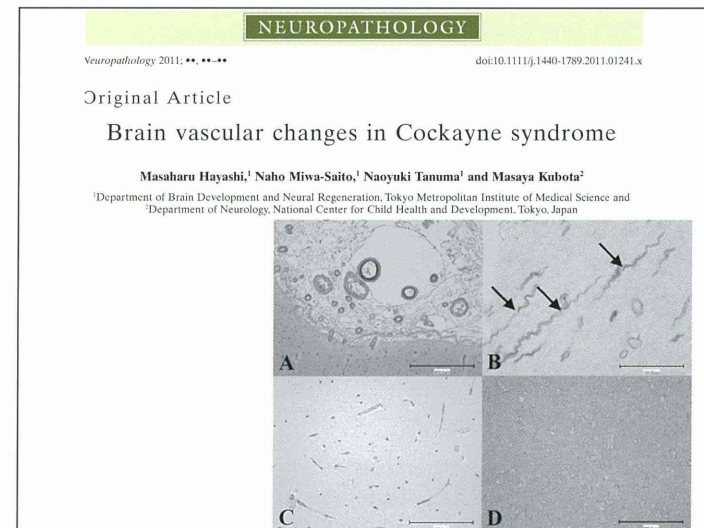
Cockayne症候群における主要症候一覧 (N=42)

Cockayne症候群	あり	なし	不明	
光線過敏性	32例	2例	6例	76.2%
皮下脂肪の減少	32例	1例	9例	76.2%
低身長	42例	0例	0例	100.0%
精神発達遅滞	42例	0例	0例	100.0%
萎縮した皮膚	28例	5例	9例	66.7%
色素沈着	23例	6例	13例	54.8%
大きな目	29例	1例	12例	69.0%
膨隆した目	17例	1例	23例	40.5%
かき鼻	25例	8例	9例	59.5%
う歯	27例	9例	5例	64.3%
四肢の冷感	35例	0例	6例	83.3%
束縛型アノーゼ	11例	4例	26例	28.2%
振戦	16例	6例	19例	38.1%
関節の可動域制限	34例	2例	4例	81.0%
難聴	27例	6例	8例	64.3%
白内障	17例	6例	18例	40.5%
視神経萎縮	20例	4例	17例	47.6%
発汗減少	14例	14例	13例	33.3%
白髪	6例	2例	33例	14.3%
側溝	15例	3例	23例	35.7%
虚血性心疾患	0例	5例	36例	
脳血管疾患	4例	5例	31例	
			10才でThrombosis	1例
			11才で急性硬膜下血腫	1例
			11才で硬膜下血腫	1例
			13才で硬膜下血腫	1例

その他、早発老化に関連すると思われる所見

高血圧	4例
腎不全	3例

中村博志, 重田政樹.
早発老化の発生機序に
関する研究, 早老症の
疫学 (その2).
厚生省厚生科学研究
(長寿科学研究事業)
1993



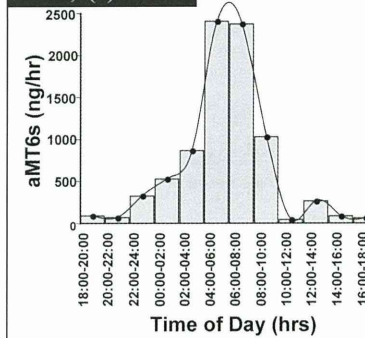
平成23年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 コケイン症候群の病態解明および治療とケアの指針作成のための研究班
 班会議 2012/1/28 11:00~16:00

Cockayne（コケイン）症候群 の睡眠障害、アセチルコリン 神経病変の検討

(財)東京都医学総合研究所
 こどもの脳プロジェクト
 林 雅晴

ヒト脳でのメラトニン代謝

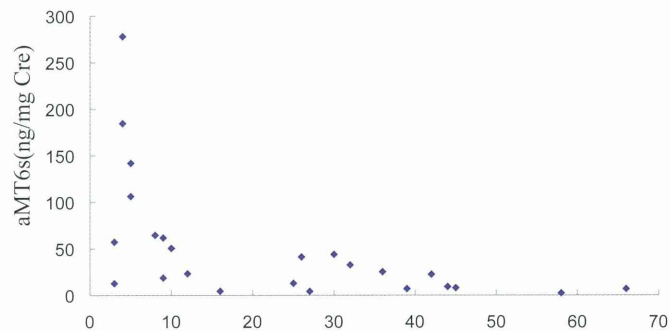
J Clin Sleep Med
 2008;4(1):66-69.



メラトニンは夜脳内で分泌され、リズム形成に関与する。尿中代謝物（aMT6s）は朝ピークを示す。米国ではサプリメントとして市販されているが、日本では承諾の上で試薬が投与されてきた。

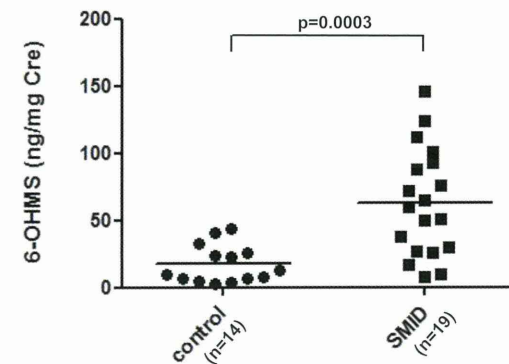
2010年メラトニン受容体刺激薬ラメルテオンが睡眠導入薬として日本で販売された（成人）。

対照での早朝尿aMT6s値の年齢による変化

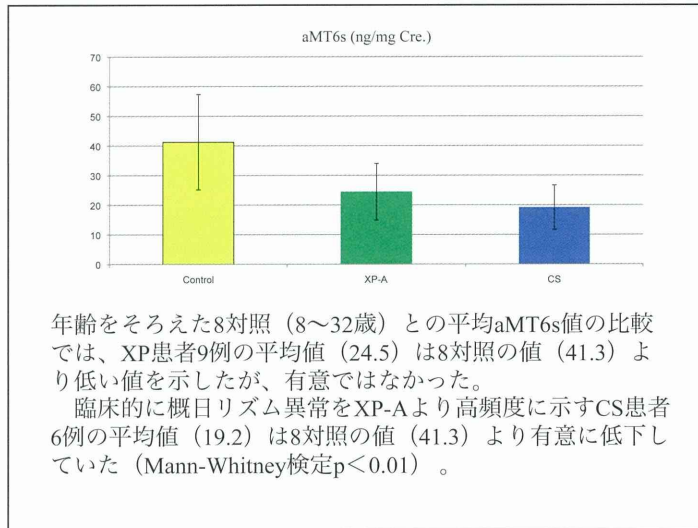


対照のaMT6s値は幼児期に高値を示し、思春期で成人レベルとなり、以後、年齢に応じて低下した。

対照（control）と重症心身障害児・者（SMID）での早朝尿6-OHMS値の比較



第37回日本重症心身障害学会（2011.9.30）



1. 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例での結果を集計した。
2. CS 4 剖検例（7～35歳）と対照の視床下部で、MAP2, GFAP, Acetylcholinesterase (AChE), Tyrosine hydroxylase (TH), Calbindin D28K (CD), Vasopressin (VP), Orexin A (OxA) などに対する免疫組織化学染色（免疫染色）を試みた。
3. 中脳・橋境界部にありREM睡眠維持に重要な役割を持つ脚橋被蓋核（PPN）に関して、CS剖検例でMAP2、GFAP、AChE、TH、CDに対する免疫染色を施行した。

視床下部とその障害

視床下部は間脳（第三脳室の側壁）に位置し、自律神経系と内分泌機能を統合的に調節している。情動、体温、空腹・満腹（背・腹内側核）、飲水・Vasopressin分泌（視索上核）、下垂体ホルモン分泌、性行動・Gonadotropin分泌（視索前核）、体内時計（視交叉上核）、睡眠の中核が存在する。

視床下部障害により、自律神経症状、体温調節異常（発作性・持続性の低体温・高体温、変動体温）、病的やせ・肥満、高ナトリウム血症・中枢性尿崩症、下垂体ホルモン分泌異常（成長障害、思春期早発症・遅発症）、睡眠障害が出現する。

コケイン症候群の睡眠に関するアンケート

コケイン症候群では、時に睡眠の問題が見られ生活の質に影響を及ぼすことがあります。その実情は十分検討されていません。今回、厚生労働省の班会議を通じて睡眠に関するアンケート調査を行うことにしました。ご協力いただけなくても不利になることはありませんし、個人情報には十分留意致します。また、本調査で得られた結果はコケイン症候群の診療・研究にのみ用い、その他の目的に使用することはございません。本文書にご記入下さり、返信用封筒で東京都神経科学総合研究所の林雅晴までご返送下さい。ご質問がごありの場合は、林までお願い申し上げます。

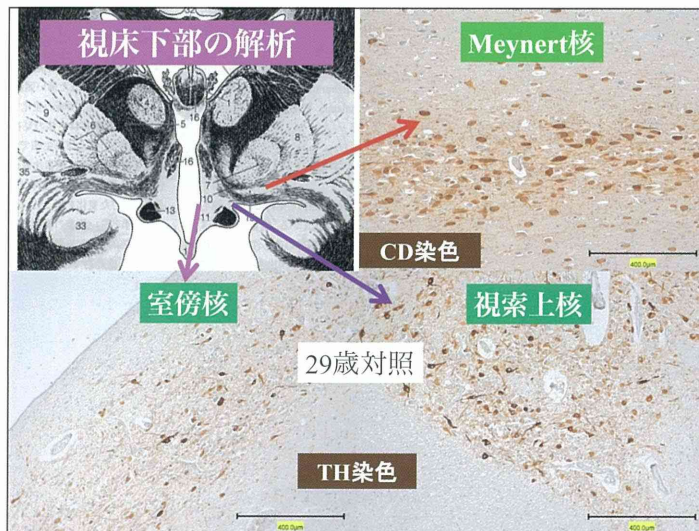
Age/ Sex	Motor ability	Deaf- ness	Blind- ness	Bed- time	Rise time	Nap (/day)	Sleep problems	Thermal dysregulation	Poor peripheral circulation
4/M	Walk with support	1+	1+	19:00	6:00	1	(-)	(-)	(-)
5/F	Walk with support	2+	1+	20:00	6:00	1	Daytime drowsiness	Hypothermia	1+
6/F	Walk with support	2+	1+	20:00	7:00	1-2	Hard to wake up	Frequent fever	(-)
7/M	Walk with support	(-)	1+	21:00	6:00	1	(-)	Poikilothermia	1+
9/M	Creep	2+	1+	22:00	7:00	1	(-)	Poikilothermia	2+
10/F	Creep	2+	1+	23:00	7:00	1	(-)	Hypothermia	1+
12/F	Sit	2+	2+	0:00	8:00	1	Hard to sleep and wake up	Fever responding to environment	1+
21/M	Wheel chair	2+	1+	23:00	4:00	1	3:00 9:00 Frequent arousal during sleep	Fever responding to environment	(-)
31/F	Wheel chair	1+	1+	20:00	6:00	0-1	22:00 8:00 Excitement in sleep	(-)	(-)
31/F	Wheel chair	1+	1+	19:00	7:00	1	20:00 8:00 Excitement in sleep	(-)	(-)

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。

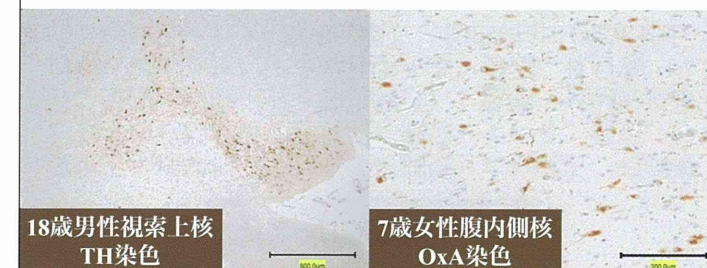
さらに10例中6例で睡眠障害（日中の眠気、入眠・覚醒障害、夜間睡眠中の中途覚醒が頻回、睡眠時間での興奮）が認められた（表1）。

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。



脳萎縮にもかかわらず、TH・CD・VP染色により、対照と同様に室傍核、視索上核、腹内側核、外側野が同定され、腹内側核にOxA陽性細胞も確認された。GFAP陽性アストロサイトは増加していなかった。脳内時計の存在が推定される視交叉上核は4例とも切出されていなかった。



	Age/ Sex	Thermal dysregulation	Sleep problem	Cause of death	Brain weight
1	7y/F	Hypothermia	(-)	Pneumonia	260g
2	18y/M	Hypothermia	(-)	Asthma status	400g
3	18y/M	Hypothermia	(-)	Renal failure	414g
4	35y/F	Frequent fever	Insomnia	Neuroleptic malignant syndrome	810g

Meynert核アセチルコリン神経が減少していた。

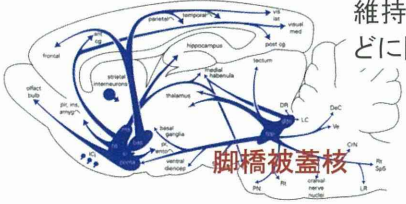
	AChE NbM	Calbindin-D28K		Tyrosine hydroxylase			Vaso- pressin	Orexin VM
		NbM	Hypo- thalamus	SO	PV	VM	Lat	VM
1	(-)	(-)	VM	n/A	2+	1+	1+	2+
2	(-)	2+	SO, PV, Lat	2+	2+	1+	1+	1+
3	(-)	2+	(-)	1+	1+	1+	n/A	(-)
4	(-)	(-)	(-)	1+	2+	1+	n/A	1+

	Calbindin-D28K		Tyrosine hydroxylase		
	Nucleus of Meynert	Paraven- tricularis	Paraven- tricularis	Supra- opticus	Ventro- medial
19y/Male	2-	N	N	N	N
19y/Male	2-	(n/A)	(n/A)	(n/A)	N
21y/Male	N	N	N	(n/A)	N
23y/Female	2-	(n/A)	(n/A)	N	(n/A)
24y/Female	1-	N	N	N	N
26y/Female	1-	(n/A)	(n/A)	N	N

XP-A剖検脳でも、対照脳と同様に、Calbindin-D28K染色により室傍核、Tyrosine hydroxylase染色により室傍核、視索上核、腹内側核がそれぞれ描出された。


アセチルコリン神経 (AChN)

PPNは基底核・視床を介し大脳皮質と連絡し、REM睡眠維持、筋緊張形成、歩行などに関与する。

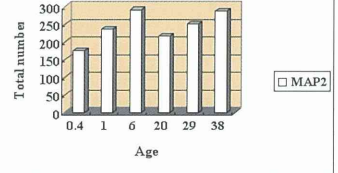


脚橋被蓋核

中枢神経系AChNは、Meynert核等の前脳基底部細胞群と、PPNを中心とする群に大別される。



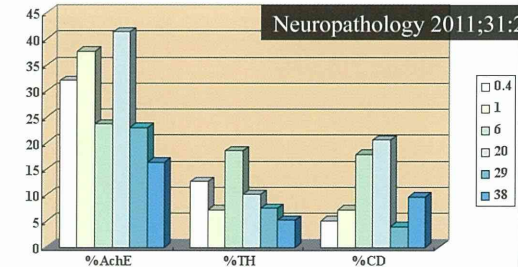
MAP2



乳児期～40歳未満の対照PPNでは、MAP2陽性神経細胞数は244±45と一定。

AchN 29±10%
 CAN 10±5%
 GABAi 11±7%

Neuropathology 2011;31:280-285



全例のPPNで、MAP2陽性神経細胞とAchNの減少、GFAP陽性アストロサイトの増加がみられた。

	MAP2	AchE	%AchE	TH	%TH	CD	%CD
Controls (n=6, 4m-38y)	243 (41)	68 (16)	29 (9)	25 (13)	10 (5)	27 (17)	11 (6)
Cockayne (n=4, 7-35y)	124 (27)	1 (1)	1 (1)	19 (5)	15 (5)	19 (7)	16 (4)
<Mann-Whitney>	p <0.01	p <0.01	p <0.01				

18歳男性PPN GFAP染色

18歳男性PPN TH染色

Meynert核

29歳女性対照 AchE染色

21歳男性XP-A AchE染色

PPNの神経細胞	Controls (Mean±SD)	XP-A (Mean±SD)	Mann-Whitney test (p value)
Microtubule associated protein 2	244±44.5	96±16	<0.01
Acetylcholine esterase (%)	68.2±18 29±9.6	0 0.2±0.4	<0.01
Tyrosine hydroxylase (%)	24.8±14.6 10.2±4.8	3.4±2.8 3.3±2.5	<0.01
Calbindin-D28K (%)	26.8±18.2 10.7±6.9	20±12 20.1±12.3	ns

Brain Dev (in press)

まとめと考察

1. 昨年度の5例では体温調節障害を強調した。今回、10例（4～31歳）の約3分の2例で体温調節障害と睡眠障害を認めた。CSでは発育障害が必発だが、性発育異常、下垂体ホルモン障害は明らかではない。メラトニン分泌低下と合わせ脳内時計の障害が想定された。
2. 視床下部での免疫染色では、視交叉上核を除く垂核を同定することができた。下垂体ホルモン分泌に異常を認めないことと合致していた。

3. XP-Aと同様に、Meynert核と脚橋被蓋核（PPN）のアセチルコリン神経（AchN）が減少していた。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もみられたが、TH陽性CANは保たれていた。
PPN病変はREM睡眠に影響を及ぼす可能性があり、メラトニン分泌低下とともに、CS患者の睡眠などの概日リズム障害に関与していると推定された。また、Meynert核AchNは知能と関連するので、AchN病変が知的障害に関連している可能性も考えられた。

今後の方向性

1. 睡眠障害、メラトニン代謝異常、アセチルコリン神経病変 ⇒ 論文化
2. CS・XP-A剖検例での白質病変の検討
3. CS・XP-Aにおけるオートファジー解析

疾患における発達

Cockayne 症候群の運動発達

古山晶子, 久保田雅也

- 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, とくに転写と共役した DNA 修復の異常であることが明らかになっている。
- 臨床的には早老, 光線過敏, 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^{1,2)}。

CS 病型

- CS の 3 病型を ① にまとめる。
- 運動発達の経過で見ると CS の 3 病型の違いは明らかである。
- 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の障害による痙性, 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。
- 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。

CS1 型の運動発達

- 新生児期, 乳児期早期には特記すべき発達遅滞を認めない*1。

*1 初期には特異的な顔貌や症状が明らかでなく, 脳性麻痺や原因不明の発達遅滞と診断されている例もある。

*2 歩行は前述した歩容異常が徐々に増悪し, これに足の変形が加わり, 歩行困難となる。

*3 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) 「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」の全国実態調査中間集計。

① CS の病型

1 型	2 型	3 型
<ul style="list-style-type: none"> ● CS 全体の 80% を占める。出生前の成長は正常で, 生下時体重, 身長, 頭囲は正常である。 ● 2 歳までに発達遅滞が明らかになり, 体重, 身長, 頭囲は正常の 5 パーセントイルをはるかに下回る。 ● 視力, 聴力といった中枢神経性の障害とともに末梢神経の障害や小脳症状も引き起こす。 ● 多くは 10~20 歳代で死亡する。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 先天性 CS とも呼ばれる。 ● 出生時にすでに成長障害を認めており, 生下時より低身長, 小頭を呈する。 ● 先天性の白内障や眼の構造異常を認め, 早期より脊柱側彎, 関節拘縮を認める。 ● 生後の神経学的発達がほとんどなく, 多くは 7 歳ころまでに死亡する。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 上記 2 型に比して発症年齢は遅く, 臨床症状も軽度であることが多い。 ● 成人例の報告もあるが, 症例数は少ない。

- 遅いながらも独歩までは獲得するが、その後乳児期に発達の遅れを指摘されて受診に至ることが多い。
- 6か月ころより小頭が明らかとなり、1～2歳ころより痙性歩行、失調性歩行、歩行耐久性低下、転倒の増加が認められ、以降は進行性の運動発達遅滞を呈する。
- 二次運動ニューロン障害に基づく症状が前面に出ている時期は四肢末梢部に拘縮が見られる。
- やがて四肢体幹の痙性を背景に上下肢の屈筋群の拘縮が、体幹では一側の側屈拘縮や骨盤の回旋拘縮などが出現する。
- 運動は、走行、歩行*² など高度な動作から徐々に退行していく。

診断

- 診断基準を②に示す。
- 多くは症状や顔貌で診断される。

② Cockayne 症候群 診断基準

大症状

低身長
精神発達遅滞
小頭症
小脳失調
網膜色素変性
感音性難聴
早発老化徴候
脳内石灰化

小症状

日光過敏性
亀背
関節拘縮
視神経萎縮
う歯
大きく冷たい手足
性腺機能低下

症例 1 Cockayne 症候群 1 型

11歳、女児。9歳の妹が同疾患と診断されている。満期産、3,438gで出生。定頻3か月、坐位保持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、ものをつかむとき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歳時下肢尖足、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、下肢尖足拘縮で歩行不可、深部反射消失。

考察 1型はいったん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。

最近の調査*³によると、CS1型生存例9名(平均18.3歳、6～38歳)中8名が歩行可能であった。そのうち6名が下肢深部反射亢進、3名が足クローヌス陽性、2名がBabinski反射陽性、下肢深部反射が低下・消失した1名も足クローヌス、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CS1型死亡例12名(平均18.8歳、14～26歳)中8名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名が下肢深部反射亢進、1名が足クローヌス陽性、3名がBabinski反射陽性、関節抗縮は11例、側彎は3例に認めた。

より下流がすでに機能不全の場合、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CS1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³⁾。

MCV: motor nerve conduction velocity, CT: computed tomography.

■ 症例 2 Cockayne 症候群 2 型

在胎 41 週，出生時体重 2,472g，身長 44cm，頭圍 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，とく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。坐位保持不可。日ご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 5,695g (-3.5SD)，頭圍 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 (2)。1 歳～1 歳 6 か月時，手で支えての坐位，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 歳時両上肢を腹臥位ですって移動可能になる。呼ぶと振り向く。足関節の拘縮を認める。

2 歳 6 か月時，音への反応が悪くなる。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 (3)，補聴器装用で音への反応が改善した。

3 歳時，体重 6,270g，身長 68.2cm，頭圍 38cm。坐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。う歯多数。頭部 CT 上基底核に石灰化を認め (2)，CS と確定。

4 歳時，頭圍 38cm と変わらず。体重 5,760g。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。

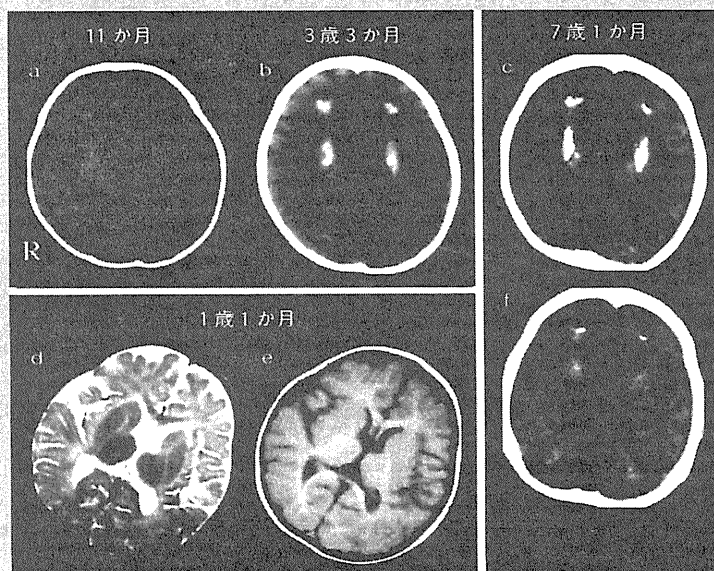
5 歳時，体重 5,345g。腹臥位で下肢を伸展し，肘を使ってずりばいをする。足関節，股関節の拘縮が目立つ。単語は出ないが，バ行，バ行の表出，TV を見ての模倣，バイバイの模倣が可能となる。「ちょうだい」「食べたい」などをジェスチャーで表す。活発で表情もよい。右手をよく使うようになる。粗大運動の低下に比べると微細な運動はまだ保たれている。睡眠覚醒リズムは規則的である。

6 歳時，視力 0.1。体重 4,980g。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。

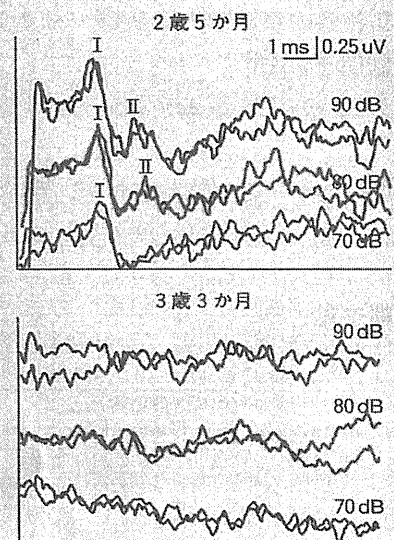
7 歳時，臥床状態で下痢が続き，経口摂取量も減少傾向にあった。誤嚥性肺炎で入院。腎不全悪化。一日尿蛋白 549mg，収縮期血圧は 90～150mmHg の間を変動，呼吸不全となり死亡。

考察 2 型の移動はずりばいまでで，つかまり

2 症例 2 (Cockayne 2 型) の CT, MRI の経年齢による変化



3 症例 2 (Cockayne 2 型) の ABR の経年齢による変化



立ちができて立位での移動は不可能である。

CS2 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。

ABR : auditory brainstem response (聴性脳幹反応), SCV : sensory nerve conduction velocity, DQ : developmental quotient (発達指数), BUN : blood urea nitrogen, Cr : creatinine, MRI : magnetic resonance imaging.

この 2 例は同様の末梢神経伝導速度の低下を認めた。

CS2 型の初期乳児期の発達は決して悪くなく(上記)、1 歳 1 か月の MRI 上髄鞘化にとくに問題はなかった (2)。

症例 3 Cockayne 症候群 3 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。小学校高学年ころ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て歩行困難となり、28 歳で車椅子使用となった。現在、坐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。

考察 3 型は自力歩行可能で通常の運動能力を

示す時期が少なくとも 10 歳代中盤まで続き、その後ゆっくりとした退行を認める。

CS3 型 2 例(双胎)では歩行障害の顕在化した 20 歳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 歳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髄線維減少、硝子化様の線維化、変性を認めた。

- 皮膚線維芽細胞の紫外線感受性試験で高感受性を認める。
- 特徴的な神経所見を ④ にまとめる。

遺伝子診断

- CS の 75% が ERCC6 の変異であり、残り 25% が ERCC8 の変異である。

本研究の一部は平成 22 年度において、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服事業)を受け実施した研究の成果である。

文献

- 1) 杉田克生. Cockayne 症候群の臨床症状. 医学のあゆみ 2005 ; 214 : 209-11.
- 2) Neilan EG. Cockayne syndrome. GENE Reviews (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=cockayne>)
- 3) Iwasaki S, Kaga K. Chronological changes of auditory brainstem responses in Cockayne's syndrome. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1994 ; 30 : 211-21.

④ 特徴的な神経所見

中枢神経障害

感音性難聴
視神経萎縮
大脳基底核の石灰化

末梢神経障害

筋電図の神経原性変化
神経伝導速度の遅延
神経生検で脱髄性神経所見

小脳障害

失調歩行
振戦
協調運動障害
構音障害

Choreo-Ballistic Movements in a Case Carrying a Missense Mutation in Syntaxin Binding Protein 1 Gene

Video



Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE), also called Ohtahara syndrome, is an epileptic syndrome characterized with seizure onset within the first 2 to 3 months after birth, tonic spasms in an isolated form or in a series, suppression-bursts on the electroencephalography (EEG), and poor prognosis with severe mental and motor retardation. The syndrome is often associated with structural brain damage. A few cases with metabolic disorders have also been reported.¹ Some cases are cryptogenic in which genetic factors may be involved.² Recently, *syntaxin binding protein 1* (*STXBPI*) mutations were identified in individuals with cryptogenic EIEE.³ We describe a case of EIEE, carrying a missense mutation in *STXBPI*, who developed severe choreo-ballism.

A 10-year-old boy was admitted to our hospital with the chief complaint of severe automatic involuntary movements (AIMs). The parents and the 2 siblings were healthy, and there was no family history of AIMs. The patient had no perinatal complications. He developed EIEE 2 months after birth, which evolved into West syndrome. He continued to have frequent tonic seizures and started to manifest vigorous AIMs at the age of 5 years. Seizures and AIMs were intractable, and he had to be placed on high-dose phenobarbital. He showed profound psychomotor developmental delay.

Paroxysmal AIMs, involving the face, neck, and extremities were repeated at short intervals in the awake state (Supporting Information Video), never appearing during sleep. The AIMs showed a stereotypical pattern. Quick orofacial movements, such as grimacing and mouth opening, and abrupt head rotations were observed. The AIMs in his extremities were proximally dominant and flinging with torsive components. Jerky flexion and extension of the fingers, wrists, and toes were also observed. The AIMs were induced by tactile stimuli and were suppressed when a part of his body, such as the upper or lower extremities, was wrapped with cloth. The nature of his AIMs was consistent with choreo-ballism. EEGs in the sleep (Fig. 1A) and awake (Fig. 1B) states showed continuous multifocal spikes and spike-wave complexes, maximal in bilateral occipital, and posterior temporal areas. No change in electrical activity was observed preceding or during the AIMs (Fig. 1B). Tc99m ECD single-photon emission computed tomography in the awake state showed a decreased uptake of Tc99m in the bilateral frontotemporal lobes, both with and without AIMs. No increase in Tc99m uptake was observed with AIMs in the cingulate gyrus or in other areas. These results confirmed

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Financial disclosure: Nothing to report.

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Published online 18 August 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.23164

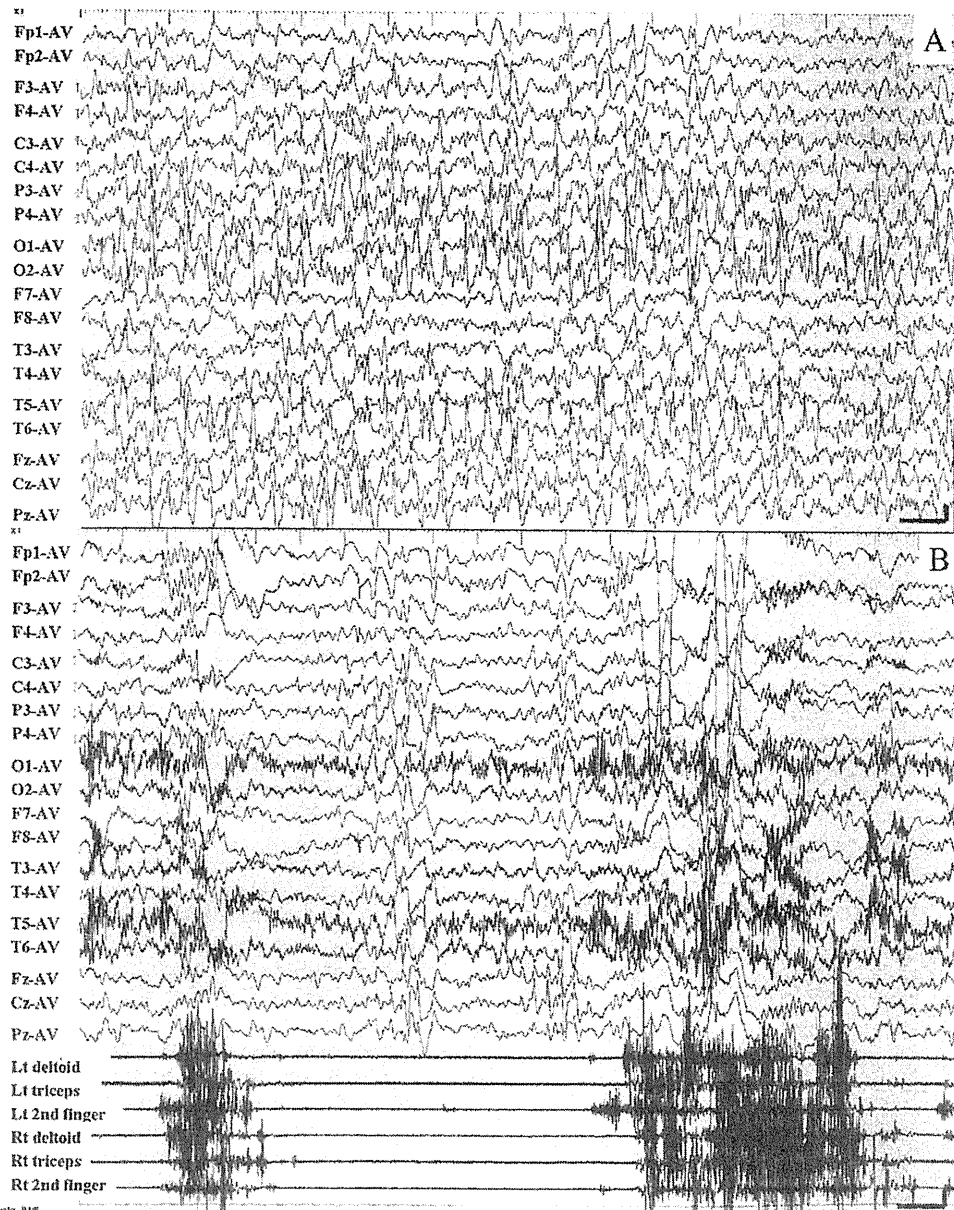


FIG. 1. A: Sleep EEGs. B: EEGs in the awake state with surface electromyography. EEGs in the awake state showed no change in electrical activity, whether it was accompanied by AIMs or not. Sensitivity 20 $\mu\text{V}/\text{mm}$. AV, average.

that his AIMs were not epileptic seizures, including those originating from the cingulate cortex.

Brain MRI showed no structural anomalies. Blood chemistry, lactate and pyruvate in blood and cerebrospinal fluid (CSF), amino acids in plasma and urine, and organic acids in urine, lysosomal enzyme activities, and chromosome G-banding were within normal limits. CSF analysis including homovanillic acid, 5-hydroxyindolacetic acid, and methoxyhydroxyphenylglycol showed no abnormalities. Ophthalmological examinations were normal. The case was considered as a cryptogenic EIEE.

However, he has recently been shown to have a heterozygous missense mutation 251T \rightarrow A(V84D) in *STXBPI*, at 9q34.11.³

STXBPI, a neuronal Sec1/Munc-18 protein, controls fusion between synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane and plays a central role in synaptic neurotransmitter release.⁴ In 2008, defects in *STXBPI* were identified in 5 individuals with cryptogenic EIEE, including the present case.³ Hamdan et al.⁵ subsequently identified mutations in *STXBPI* in 2 patients with severe mental retardation (MR) and non-EIEE epilepsy. Impaired synaptic vesicle release

caused by *STXBPI* haploinsufficiency is speculated to contribute to the pathogenesis of epilepsy and MR.

The present case is remarkable because he developed vigorous choreo-ballism subsequent to EIEE. Such severe AIMs in an EIEE case have not been previously reported, and no movement disorders including choreo-ballism were recognized in the other 4 cases reported by Saitsu et al.^{3,6} Interestingly, the 2 cases reported by Hamdan et al.,⁵ however, manifested diffuse tremor.⁵ The pathogenesis of chorea and ballism is considered to involve dysfunction of the indirect pathway in the motor loop, which connects the basal ganglia, thalamus, and motor cortex.⁷ The dysfunction of the motor loop including the basal ganglia has also been associated with the pathogenesis of tremor. As the pathways are regulated by excitatory and inhibitory neurotransmitters, such as dopamine, glutamate, and GABA, aberrant neurotransmitter release caused by *STXBPI* mutations may well be a cause of basal ganglia disorders as well as epilepsy and MR. The observation in the present case, however, is not a final proof of causality. The clinical features of *STXBPI* mutations have not been determined due to a limited number of cases reported. This disorder, however, may give an important clue to the common molecular pathophysiology of epilepsy, MR, and basal ganglia diseases.

Legends to the Video

The AIMs start in the left fingers and spread to the face, neck, and extremities. The AIMs of the extremities are of a flinging nature with torsive components. They stereotypically repeat at short intervals.

Author Roles: Kyoko Kanazawa: conception and design, data acquisition and analysis, drafting, and revising of the text. Satoko Kumada: conception and design, data acquisition and analysis, and revision of the text. Mitsuhiro Kato: data analysis and revising of the text. Hirotomo Saitsu: Data acquisition and drafting of the text. Eiji Kurihara: conception and design, and revising of the text. Naomichi Matsumoto: data acquisition and drafting of the text.

Kyoko Kanazawa, MD*
Satoko Kumada, MD, PhD
Department of Neuropediatrics
Tokyo Metropolitan Neurological Hospital
Tokyo, Japan
*E-mail: brisedemer-ezweb@umin.ac.jp

Mitsuhiro Kato, MD, PhD
Department of Pediatrics
Yamagata University School of Medicine
Yamagata, Japan

Hirotomo Saitsu, MD, PhD
Department of Human Genetics
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Yokohama, Japan

Eiji Kurihara, MD
Department of Neuropediatrics
Tokyo Metropolitan Neurological Hospital
Tokyo, Japan

Naomichi Matsumoto, MD, PhD
Department of Human Genetics
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Yokohama, Japan

References

1. Aicardi J, Ohtahara S. Severe neonatal epilepsies with suppression-burst pattern. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, editors. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2005. p 39–50.
2. Kato M, Saitoh S, Kamei A, et al. A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome). *Am J Hum Genet* 2007;81:361–366.
3. Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBPI (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2008;40:782–788.
4. Gerst JE. SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:707–734.
5. Hamdan FF, Piton A, Gauthier J, et al. De novo STXBPI mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Ann Neurol* 2009;65:748–753.
6. Tohyama J, Akasaka N, Osaka H, et al. Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter. *Brain Dev* 2008;30:349–355.
7. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990;13:266–271.

Original Article

Brain vascular changes in Cockayne syndrome

Masaharu Hayashi,¹ Naho Miwa-Saito,¹ Naoyuki Tanuma¹ and Masaya Kubota²¹Department of Brain Development and Neural Regeneration, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science and²Department of Neurology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Cockayne syndrome (CS) and xeroderma pigmentosum (XP) are caused by deficient nucleotide excision repair. CS is characterized by cachectic dwarfism, mental disability, microcephaly and progeria features. Neuropathological examination of CS patients reveals dysmyelination and basal ganglia calcification. In addition, arteriosclerosis in the brain and subdural hemorrhage have been reported in a few CS cases. Herein, we performed elastica van Gieson (EVG) staining and immunohistochemistry for collagen type IV, CD34 and aquaporin 4 to evaluate the brain vessels in autopsy cases of CS, XP group A (XP-A) and controls. Small arteries without arteriosclerosis in the subarachnoid space had increased in CS cases but not in either XP-A cases or controls. In addition, string vessels (twisted capillaries) in the cerebral white matter and increased density of CD34-immunoreactive vessels were observed in CS cases. Immunohistochemistry findings for aquaporin 4 indicated no pathological changes in either CS or XP-A cases. Hence, the increased subarachnoid artery space may have caused subdural hemorrhage. Since such vascular changes were not observed in XP-A cases, the increased density of vessels in CS cases was not caused by brain atrophy. Hence, brain vascular changes may be involved in neurological disturbances in CS.

Key words: brain vessels, CD34, Cockayne syndrome, immunohistochemistry, xeroderma pigmentosum.

INTRODUCTION

Cockayne syndrome (CS) is a rare genetic disorder caused by deficient nucleotide excision repair (NER), and it is characterized by cachectic dwarfism, mental disability, microcephaly, cerebellar ataxia, retinal pigmentation, and

neural deafness.¹ Neuropathological findings of CS patients show small cerebrum, tigroid leukoencephalopathy (dysmyelination), basal ganglia calcification, cerebellar atrophy and demyelinating peripheral neuropathy.² Many features of CS resemble those of premature aging, and hence, CS is considered as a progeroid syndrome.³ Nancy and Berry divided 140 published cases into three types: type I, the most prevalent classical childhood disorder; type II, an infrequent, severe congenital, or infantile variant of the disorder; type III, atypical late onset of the disorder with prolonged survival.⁴

Xeroderma pigmentosum (XP) is an inherited neurocutaneous disorder caused by defects in the NER system.¹ Complementation studies using cell hybridization assays revealed the existence of eight genes in XP (groups A–G and a variant) and two in CS (A and B). NER includes global genome repair and transcription-coupled repair (TCR), which involves several XP genes (especially *XP-A* to *XP-G*) and two CS genes (*CSA* and *CSB*). In XP, the initial presentations are skin symptoms and progressive neurological manifestations, including cognitive and motor deterioration, neuronal deafness, peripheral neuropathy and brain atrophy, mainly in XP-A, XP-B, XP-D and XP-G cases.² The molecular basis of CS includes recessive mutations in *CSA* (*CKNI* or *ERCC8*) and *CSB* (*CKN2* or *ERCC6*) genes, but it has not been systematically mapped to the clinical phenotypes. We investigated neurodegeneration in autopsy cases of CS and XP-A.²

Arteriosclerosis in the brain⁵ and cerebral vascular disorders have been reported in a few cases.⁶ In order to characterize the brain vascular changes in CS, we compared the immunohistochemical changes in the brain vessels between CS cases and XP-A cases as disease controls.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The clinical study comprised five cases of clinically and genetically confirmed CS, six cases of clinically and

Correspondence: Masaharu Hayashi, Project Leader, Department of Brain Development and Neural Regeneration, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6, Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan. Email: hayashi-ms@igakuken.or.jp

Received 16 May 2011; revised and accepted 31 May 2011.

Table 1 Summary of brain vascular changes in subjects

Subject	Age (years)	Sex	Cause of death	Brain weight (g)	Increase of subarachnoid small arteries	Twisted capillaries in the white matter	Density of CD34-immunoreactive vessels	
							Frontal Mean (SD)	Temporal Mean (SD)
Controls								
1	9	Male	Acute leukemia	N/A	(-)	(-)	29 (2)	21 (5)
2	13	Male	Chronic hepatitis	n/A	(-)	(-)	31 (1)	N/A
3	16	Male	Pneumonia	1505	(-)	(-)	29 (3)	25 (1)
4	20	Male	Malignant hyperthermia	N/A	(-)	(-)	26 (2)	25 (5)
5	29	Female	Guilain-Barre syndrome	N/A	(-)	(-)	38 (3)	33 (6)
6	36	Female	Thrombotic thrombocytopenic purpura	1475	(-)	(-)	37 (1)	30 (4)
7	47	Male	Acute leukemia	1400	(-)	(-)	35 (5)	38 (3)
8	55	Male	Lung cancer	N/A	(-)	(-)	38 (3)	36 (4)
9	60	Female	Breast cancer	1080	(-)	(-)	41 (7)	43 (4)
10	71	Male	Lung cancer	N/A	(-)	(-)	49 (3)	41 (4)
Cockayne syndrome								
1	7	Female	Pneumonia	295	1+	1+	44 (4)	41 (2)
2	15	Male	Renal failure	340	1+	1+	45 (4)	43 (4)
3	16	Female	Asthma	615	1+	(-)	48 (6)	N/A
4	18	Male	Renal failure	400	1+	1+	53 (5)	49 (5)
5	18	Male	Renal failure	414	1+	1+	44 (5)	45 (4)
Xeroderma pigmentosum group A								
1	19	Male	Candidiasis	580	(-)	(-)	28 (7)	26 (3)
2	19	Male	Renal failure	610	(-)	(-)	29 (11)	27 (2)
3	21	Male	Pneumonia	720	(-)	(-)	28 (3)	28 (2)
4	23	Female	Pneumonia	580	(-)	(-)	32 (2)	30 (3)
5	24	Female	Pneumonia	500	(-)	(-)	39 (4)	38 (4)
6	26	Female	Pneumonia	530	(-)	(-)	39 (3)	38 (4)

N/A, not assessed.

genetically confirmed XP-A, and 10 controls without any pathological changes in the CNS, aged 9–71 years (Table 1). The clinical and pathological findings in the CS cases 1–4 and XP-A cases 1–2 and 4–6 were reported previously.⁷ The study was approved by the ethical committee of Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science; informed consent was obtained from the patients' families before performing post mortem analyses.

Histochemistry and immunohistochemistry

The brains were fixed in buffered formalin solution; coronal sections of each formalin-fixed brain sample were cut and embedded in paraffin. Serial 6- μ m-thick sections were cut from selected brain regions, including the superior frontal cortex, middle temporal cortex, basal ganglia and thalamus. HE staining and elastica van Gieson (EVG) staining were performed. After microwave antigen retrieval, each section was treated with CD34 (Nichirei, Tokyo, Japan) and rabbit polyclonal antibody to aquaporin 4 (AQP4; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA). Each section was pretreated with proteinase K and mouse monoclonal antibody to collagen type IV (Col4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The antibody concentrations used for analysis were as follows: 1:1 (CD34), 1:100 (AQP4) and 1:500 (Col4). Antibody binding was visualized

by means of the avidin–biotin immunoperoxidase complex method (Nichirei, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative evaluation and data analysis

To determine the densities of the immunoreactive vessels, including arteries, veins and capillaries in the superior frontal cortex and middle temporal cortex, we determined the numbers of vessels immunoreactive for CD34 in five nonoverlapping microscopic subfields at 200-fold magnification by using a counting box (0.5 mm²). Data were presented as mean (SD) and analyzed by nonparametric Mann–Whitney *U*-test to compare the results in different subjects. The level of significance was set at $P < 0.05$ to adjust for comparisons.

RESULTS

The results of HE and EVG staining and immunohistochemistry suggested that only CS patients had increased small arteries and arterioles in the subarachnoid space filled with fibrotic tissue and without arteriosclerosis (Table 1 and Fig. 1A). Further, small twisted and longitudinally running capillaries in cerebral white matter were observed in 4/5 CS patients but were not found in the brain