

【経過】

来院後、糖尿病の病態把握の目的で糖負荷検査を行った。その結果、著大な負荷後高血糖が観察され、Insulinogenic Index 0.11、HOMA-R は 5.68、HOMA-βは 81.7 とインスリン初期分泌の低下、インスリン抵抗性に加えて、グルカゴンが糖負荷後に増加するなどグルカゴンの分泌異常も観察された。

身体所見では窪んだ眼、窪んだ頬、尖った鼻など皮下脂肪の萎縮によるCSに特徴的な顔貌を認め、腹部CTでは内臓脂肪面積 13.7cm² と内臓脂肪の減少と軽度脂肪肝が観察された。患者は自立歩行不能であり、感音性難聴、知能低下により会話不能であった。食事は胃瘻より経腸栄養剤（ラコール 200mL(200kcal) 中の組成：糖質 31.24g、脂肪 4.46g、たん白質 8.76g) 朝、昼、夕それぞれ 100ml に加えて、時に介助にてバナナなどを経口摂取をしていた。

治療方針として、患者のADLや生命予後も考慮し、低血糖や代謝異常をきたすような著大な高血糖を避けるような比較的マイルドな治療法を選択することとした。最初に糖負荷検査にて著大な高血糖が観察されたため、ボグリボーズ 0.2mg を胃瘻から注入開始したものの、投与後すぐに下痢が生じたためボグリボーズは中止とした。続いて、食後高血糖改善、グルカゴン分泌正常化を期待して、単剤使用では低血糖のリスクが低いシタグリプチンを 12.5mg から開始し、忍容性を確認

しつつ 25mg まで増量した。その結果、HbA1c は 6.8% まで低下したものの、その後漸次増加し、HbA1c 7.6% となったため、シタグリプチンに加えてインスリン抵抗性の改善を目的にメトホルミンを 125mg から開始した。血糖値、HbA1c は併用療法により HbA1c 6.7% まで一時低下傾向があったものの再度 HbA1c の上昇を認めたためメトホルミン 250mg まで増量を行うも、脱水を契機に高血糖を来し、高血糖高浸透圧性昏睡 (HHS) となり緊急入院となった。補液とインスリン療法を開始し、速やかに HHS は改善し退院となったが、退院時には今後の脱水時のリスクを考慮して、メトホルミンは中止し、シタグリプチン 25mg とインスリン グラルギンの併用とした。その後、外来にて朝食後の高血糖に対しインスリン アスパルトを追加するも、HbA1c は 9% 台であったため、皮下脂肪萎縮に伴うインスリン抵抗性も考慮してピオグリタゾン を 7.5 mg 追加した。その結果、投与 3 週間で空腹時血糖は投与前平均 148mg/dL から投与後平均 128mg/dL に、食後血糖は投与前平均 303mg/dL から投与後 201mg/dL へと低下した。HbA1c は投与前 9.2% から投与後 5 か月目では 7.3% まで改善している。現在までの観察では低血糖はなく、浮腫、体重増加などの副作用も観察されていない。また経過中、食後血糖改善を目的にラコールから食後糖質吸収遅延を期待してパラチノース含有の明治インスローを昼のみ試すも腹部膨満が強くなり中止となっている。

D. 考察

今回我々は、24歳の糖尿病を合併したCSを経験した。身体所見では低身長、低体重、皮下脂肪（顔面）の萎縮が観察された。糖尿病の病態としてはインスリンの初期分泌低下やインスリン抵抗性、グルカゴン分泌異常を認め、内臓脂肪面積は著明に低下していた。

これまで糖尿病合併のCSは我々が調べた限りでは5例の報告があり、その内の4例が我が国からの報告である(3)(4)(5)。その4例と本症例を合わせた年齢、性別、体重、臨床所見を記載する(表1)。

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	本症例
年齢	42	55	40	29	24
性別	男性	男性	女性	男性	男性
身長 (cm)	146	148	134	115.8	106
体重 (kg)	57	57	25	20	17
BMI	26	26	13.9	14.9	15.1
糖尿病発症年齢	34	50	40	29	23
血族結婚	-	-	+	+	-
皮下脂肪萎縮	+	-	+	-	+
主徴候					
小人症	+	+	+	+	+
精神遅滞	+	+	+	+	+
小脳症	+	-	+	+	+
運動失調	+	+	+	+	+
網膜色素変性症	-	-	-	+	-
感音性難聴	+	+	+	+	+
早老顔貌	+	-	+	+	+
頭蓋内石灰化	+	-	+	+	+
副徴候					
光過敏症	+	+	+	-	+
脊柱後弯	-	-	N/A	-	-
関節硬直	-	-	N/A	+	-
視神経萎縮	-	-	N/A	N/A	-
齲歯	+	+	+	N/A	+
大きな冷たい手足	-	-	N/A	N/A	-
性腺機能低下	+	-	-	N/A	-
遺伝子変異	報告なし	報告なし	報告なし	報告なし	Exon 3/9
報告年	1994	1994	1997	1986	
文献	3	3	4	5	

表1

症例 1, 2 は兄弟例である。症例 3 では剖検が行われており、膵臓に形態的な異常はなく、また生前の下垂体機能を含めた内分泌学的な精査でも異常は報告されていない。NanceらのCS140症例の網羅的な解析においては、CSでは時に高インスリン血症や耐糖能異常は観察されるものの、糖尿病の発

症は観察されなかったと記載がある(6)。

CSの原因遺伝子のCSA、CSBはそれぞれ1992年、1995年に同定されているが、我々の症例は解析の結果、CSB遺伝子のexon3とexon9のそれぞれのナンセンスミューテーション複合型ヘテロであった。CSでは散发例が多いことを裏付けるように複合型ヘテロ変異も多く報告されている。

CSA、CSBはともにRNAポリメラーゼIIのコファクターであり、転写共役型DNA修復経路に関わることが報告され、障害されたDNA鎖の鋳型鎖のRNAポリメラーゼIIが働くさいのヌクレオチド除去修復複合体のアダプターとして働くことが知られている。加えてCSAやCSBは核内において酸化変性したDNAの修復に役割をもつことや、CSA、CSBタンパクがミトコンドリア内でDNA修復タンパクと関連することも報告されている。CS患者由来細胞(CS細胞)ではミトコンドリアの酸化還元バランスに変化が生じていることや、オートファジーやミトファジー機能に異常をきたし、酸化ストレスの亢進が観察されておりCSの臨床病態に関与することが推測されている(7)。CSに観察されるような酸化ストレスの亢進は一般的に糖尿病の発症にも深く関与することが報告されている。しかしながらNanceらのCS140症例に関する報告では明らかな糖尿病症例はなく、本症例を含めて6例の糖尿病合併CSのうち5例が我が国の報告であ

ることより、CSにおける糖尿病の発症には遺伝的背景の関与が大きいことが推測される。

CSに合併した糖尿病の特徴に関しては症例4において糖負荷検査の結果が報告されており、糖負荷後インスリンの過剰遅延反応が観察され、血糖値も負荷後2時間で400mg/dL近くまで上昇しているものの、本症例に観察されたようなインスリンの初期分泌低下は観察されていない。CSではインスリン抵抗性を合併することをCottenら(8)やFujimotoら(9)が報告している。本症例においてもHOMA-IR 5.68と高値でありCSにおける糖尿病の発症にはインスリン抵抗性が深く関与していることを示唆する。インスリン抵抗性の機序としては、本症例で評価した内臓脂肪面積は13.7cm²と少なく、顔面の皮下脂肪萎縮が著明なことより脂肪萎縮性糖尿病の病態に近い可能性がある。ただし、脂肪萎縮性糖尿病で観察されるレプチンの低下は本症例では観察されていない。本症例では検討はしていないが、骨格筋量の低下がインスリン抵抗性に関与している可能性もあり今後の詳細な検討が必要である。

糖尿病の治療に関してはこれまで殆ど報告がない。2型糖尿病の病態にはインスリンの分泌・作用不足に加えてグルカゴンの分泌異常が関与することが古くから知られている。近年経口血糖降下剤であるdipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)阻害剤が食後イ

ンスリン分泌を改善するのみならずグルカゴン分泌抑制を介して食後血糖値を改善することが報告されている。我々の検討では、CSと同様に早老症の一つであるウェルナー症候群において食後グルカゴン分泌異常が観察され、DPP-4阻害剤がその異常を改善させることを報告している(10)(11)。そこで、今回のCS症例においても負荷後にグルカゴン分泌異常が観察されたため、DPP-4阻害剤を投与した。その結果、一時的にはHbA1cの低下効果が観察されたものの、その効果はすぐに減弱した。比較的短期間にDPP4阻害剤の効果が減弱した理由は不明であるが、本症例では食事・運動に関しては一定であることから考えると、DPP4阻害剤によって安定するインクレチンの効果減弱の関与が推察され、その場合、膵臓においてインクレチンのdesensitizationが生じているのかもしれない。

今回の症例ではインスリン抵抗性改善を期待してピオグリタゾン投与することにより血糖値の改善が観察された。ウェルナー症候群においてもピオグリタゾンは血糖値改善には有用であり、IL-6といった炎症性サイトカインの低下効果と低下したアディポネクチン値の上昇効果が観察される(12)。本症例ではピオグリタゾン投与前にはIL-6や同じく炎症性サイトカインであるTNF- α 値の上昇はなく、アディポネクチンの低下も観察されていないが、投与前のIL-6値7.6pg/ml、アディポネクチン値

8.5mg/ml から投与値 1 か月では IL-6 値 7.1pg/ml、アディポネクチン値 11.9mg/ml と僅かながらも変化を認めており、ピオグリタゾンの脂肪細胞への作用が血糖値改善につながっている可能性が示唆される。

遺伝性早老症 CS における糖尿病治療に関する詳細な報告は世界的にもまだなく、本症例の観察は重要である。今後も長期的な血糖値、アディポサイトカイン値、内臓脂肪、皮下脂肪への効果・作用の観察を行ってゆく予定である。

参考文献

- (1) Cockayne EA: Dwarfism with retinal atrophy and deafness. Arch Dis Child 11:1-8, 1936
- (2) Laugel V et al. Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. Hum Mutat 31:113-126
- (3) Miyauchi H et al. Cockayne syndrome in two adult siblings. J Am Acad Dermatol 30:329-335, 1994
- (4) Inoue T et al. An adult case of Cockayne syndrome without sclerotic angiopathy. Intern Med 36:565-570, 1997
- (5) Shirasaki N et al. [Cockayne's syndrome presenting cerebral ischemic attack: case report]. No To Shinkei 38:871-875, 1986
- (6) Nance MA, Berry SA: Cockayne syndrome: review of 140 cases. Am J Med Genet 42:68-84, 1992
- (7) D'Errico M et al. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. Mech Ageing Dev 134:261-269
- (8) Cotton RB et al. Abnormal blood glucose regulation in Cockayne's syndrome. Pediatrics 46:54-60, 1970
- (9) Fujimoto WY et al. Cockayne's syndrome: report of a case with hyperlipoproteinemia, hyperinsulinemia, renal disease, and normal growth hormone. J Pediatr 75:881-884, 1969
- (10) Kitamoto T et al. Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in Werner syndrome with diabetes. Diabetes Care 35:e83, 2012
- (11) Watanabe K et al. Sitagliptin improves postprandial hyperglycemia by inhibiting glucagon secretion in Werner syndrome with diabetes. Diabetes Care 36:e119, 2013
- (12) Yokote K et al. Metabolic improvement and abdominal fat redistribution in Werner syndrome by pioglitazone. J Am Geriatr Soc 52:1582-1583, 2004

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

林愛子、竹本稔、北本匠、渡邊周之、小林一貴、杉田克生、横手幸太郎 遺伝性早老症ウエルナー症候群とコケイン症候群に合併した糖尿病の治療法に関する検討 日本内科学会総会

2014年 東京

Watanabe K, Kobayashi K, Takemoto M, Ishibashi R, Yamaga M, Kawamura H, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, He P, Yokote K: Sitagliptin improves postprandial hyperglycemia by inhibiting glucagon secretion in Werner syndrome with diabetes. Diabetes Care 36:e119, 2013

Onishi S, Takemoto M, Ishikawa T, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K: Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer. Acta Diabetol 49 Suppl 1:S259-260, 2014

H. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

Werner症候群患者皮膚繊維芽細胞由来iPS細胞の樹立と治療薬の探索

研究分担者 清水 孝彦 千葉大学大学院医学研究院

研究要旨

代表的な遺伝的早老症Werner症候群（以下、WS）は、思春期以降 全身性に老化徴候を示し、糖尿病や動脈硬化、がんを好発し、40 歳代で死亡する。WS患者の皮膚由来線維芽細胞にOct-4, Sox2, Klf4, c-Mycの山中4因子を導入し、無限分裂能の獲得した細胞の樹立に成功した。この細胞を免疫不全マウスの精巣への移植により三胚葉系細胞への分化（奇形腫形成）を確認した。リプログラミングによりWS患者由来iPS細胞を得ることができた。一方、WSには一部の患者にナンセンス変異が知られている。近年、読み飛ばし活性を持つリードスルー薬が開発され、遺伝子欠損の改善例が報告されている。ナンセンス変異を持つWS由来線維芽細胞に対し、リードスルー薬の保護効果を調べ、治療薬としての可能性を考察した。

A. 研究目的

1996 年に WS の原因遺伝子として DNA ヘリケース（WRN）が同定されたが、個体・細胞レベルで早老をきたすメカニズムの解明は国内外を通じて進んでいない。理由の一つとして、WRN 遺伝子のノックアウトマウス（KO）が早老の表現型を示さず、健常に生育するため、有用な動物モデルが無い点にある。また WS の皮膚由来線維芽細胞は、通常、数代の継代培養により老化関連 β ガラクトシダーゼ活性上昇などの細胞老化形質を示し、分裂を停止する。そのため、患者由来細胞を用いた発症メカニズムの解明も容易ではない。本研究では、WS の早老発症メカニズムを解明するために、無限分裂能を有する iPS 細胞の技術を用いて、WS 患者由来 iPS 細胞を樹立することを目的とする。

また、WS 患者の遺伝子変異の中に、ナンセ

ンス変異が知られている。ナンセンス変異を有する異常 mRNA は、NMD (nonsense-mediated mRNA decay) と呼ばれる mRNA 分解機構により通常の mRNA 分解と異なる経路で即座に分解される。本研究は、異常な終止コドンを読み飛ばす（リードスルー）薬を WS 患者細胞に投与し、機能性 WRN タンパク質の産生が認められ、細胞表現型が可逆的に改善するかどうか調べ、治療薬としての有効性を明らかにする。

B. 研究方法

WS の皮膚由来線維芽細胞（WSCU01）に Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc の山中4因子をレトロウイルスベクターで導入し、無限分裂能を有する細胞株を単離する。また多分化能を示す ES 細胞で高発現が認められる未分化マーカー遺伝子（Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog）の発現量を調べる。

さらに免疫不全マウス(SCID マウス)精巣に、候補細胞を接種し、2 ヶ月後に精巣を解剖し、組織レベルで、奇形種形成を確認することで、三胚葉系細胞への分化能を調べた。また、樹立した WS iPS 細胞の可逆的性質を調べるために、WS iPS 細胞を ES 培地で3日間浮遊培養し胚様体を形成させた後、HEF 培地とゼラチンコートシャーレ上で培養させた。継代培養を4-5回重ねることで、線維芽細胞に分化させた。元の WS 患者由来線維芽細胞の細胞形質を比較した。

次に、ナンセンス変異を持つ WS 患者(889 残基目の Arg 残基が TGA 終止コドンとなった変異 6 型のホモ接合体)由来線維芽細胞(WCU130131)に対し、mRNA 上の異常な UGA 終止コドン読み飛ばす活性のあるリードスルー薬(PTC124, Selleck 社)を添加して、ウエスタンブロット方で WRN タンパク質の検出を行った。PTC124 のリードスルー活性を評価する陽性対照として、pGL3 ベクター(Promega 社)の Luciferase 遺伝子の 190 番目の Thr 残基に TGA, TAA, または TAG の 3 種類の終止コドンを変異導入したベクターを別々に遺伝子導入した細胞抽出物の Luciferase 活性を Luciferase Assay キットで(Promega 社)測定することで評価した。

(倫理面への配慮)

患者由来 iPS 細胞の樹立と治療応用についてはヒト幹細胞を用いる臨床研究と遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づいてこれを実施する。

C. 研究結果

WSの皮膚由来線維芽細胞にOct-4, Sox2, Klf4,

c-Mycの山中4因子をレトロウイルスベクターで導入し、典型的なiPS細胞の形態を示した株を樹立した(図1)。この細胞は、ES細胞に特徴的な未分化マーカー(Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog)を発現し(図2)、老化関連βガラクトシダーゼ活性低下や無限分裂能の獲得を確認した。また免疫不全マウス(SCIDマウス)の精巣への移植により三胚葉系細胞への分化(奇形腫形成)を確認し得た。以上の結果から、リプログラミングによりWS患者由来iPS細胞を得ることができた。

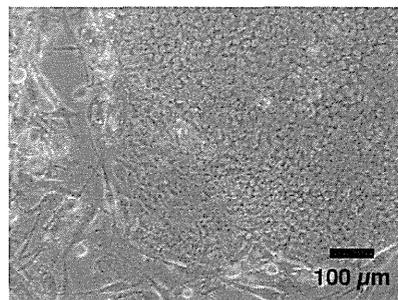


図1：WS iPS細胞 (WCSU iPS02)

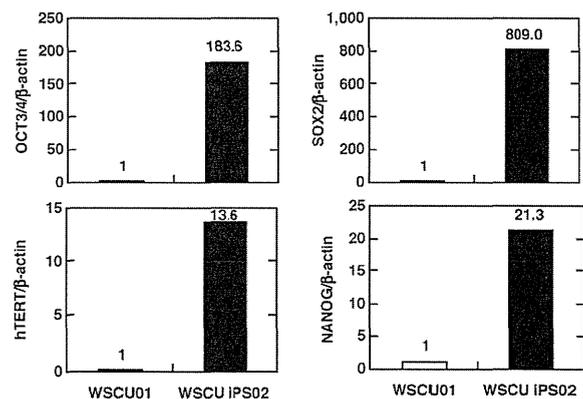


図2：WS iPS細胞(右：WCSU iPS02)はもとのWS由来線維芽細胞(左：WCSU01)に比較して、未分化マーカー(Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog)の発現が顕著に亢進していた。

さらに、WS iPS細胞を胚様態形成と線維芽細胞分化培地で培養することで、逆に線維芽細胞に分化させた。その結果、線維芽細胞様の細胞分化に成功した。また本細胞は、増殖速度が速まり、細胞老化表現型の軽減が明ら

かとなった (図3)

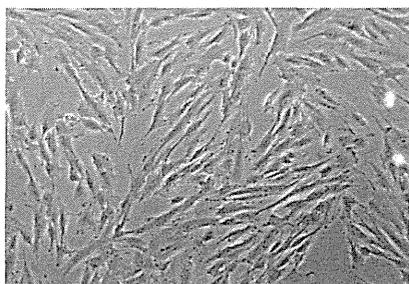


図3：線維芽細胞に分化誘導したWS iPS細胞。継代5回で典型的な線維芽細胞様の形態を示した。

次に、ナンセンス変異を有するWS患者に対するリードスルー薬の治療応用を検討するために、TGAコドンを読み飛ばす活性を持つPTC124に着目し、*in vitro*の添加実験を行った (図4)。

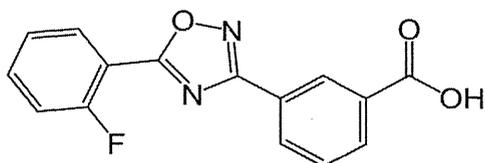


図4：PTC124の化学構造。

HEK293細胞に3種類の終止コドンを変異導入したLuciferase遺伝子を持つレポーターベクターpGL3を別々に遺伝子導入し、PTC124添加24時間後のLuciferase活性を測定した。その結果、TGA終止コドンを持つ遺伝子導入株のみ有意なLuciferase活性を示した。本薬剤のリードスルー活性を確認した (データは示さない)。さらに、TGA終止コドン変異を持つ変異6型のホモ接合体WS患者由来線維芽細胞 (WS130131)に5 μ M PTC124を添加し、10日間培養した。細胞抽出物を抗ヒトWRN抗体によるWB法で解析した。その結果、正常ヒト線維芽細胞抽出物には、WRNタンパク質が検出されたが、

WS細胞には認められなかった (図5)。

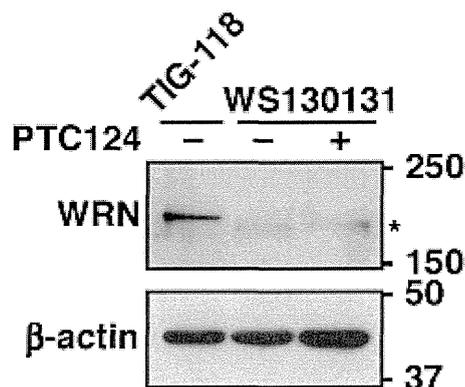


図5：変異6型のホモ接合体WS患者由来線維芽細胞 (WS130131)に5 μ M PTC124を添加し、10日後のWB。WRNタンパク質は認められない。TIG-118はヒト正常皮膚線維芽細胞、★印は非特異的バンド。

次に、ナンセンス変異はNMDを惹起し、WRN mRNAの顕著な低下をもたらすことが考えられた。変異4型と6型の複合ヘテロ接合体を持つWS由来線維芽細胞 (WSCU01)のWRN mRNA量をRT-PCRで調べたところ、16%に減少していることが明らかとなった。一方、WS iPS細胞は増殖能が回復し、細胞老化表現型が改善していることが明らかとなっている (図1)。そこで、WS iPS細胞 (WSCU iPS02)のWRN mRNA量をRT-PCRで調べたところ、7.5倍増加していることが明らかとなった (図6)。

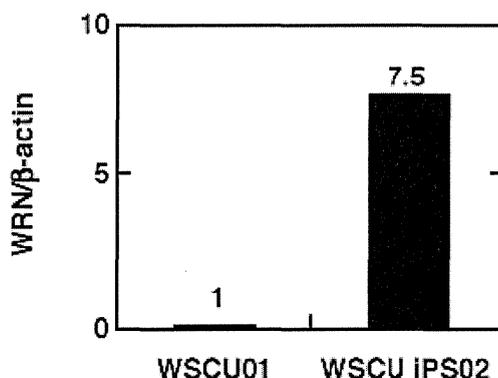


図6：WS iPS細胞 (右：WSCU iPS02) はもとのWS由来線維芽細胞 (左：WSCU01) に比較して、WRNの発現が7.5倍増加していた。

次に、本WS iPS細胞 (WSCU iPS02) に5 μ M PTC124を添加し、10日間培養した。細胞抽出物を抗ヒトWRN抗体によるWB法でWRNタンパク質を検出した。その結果、正常ヒト線維芽細胞抽出物に認められるWRNタンパク質はWS iPS細胞 (WSCU iPS02) には認められなかった(図7)。

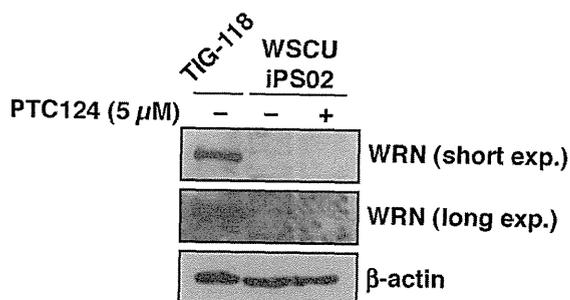


図7：変異4型/6型の複合ヘテロ接合体WS iPS細胞 (WSCU iPS02) に5 μ M PTC124を添加し、10日後のWB。TIG-118ヒト正常皮膚線維芽細胞(TIG-118)で認められるWRNタンパク質がWS iPS細胞では認められない。

D. 考察

WS由来iPS細胞は、正常人由来iPS細胞を細胞レベルでの特性に差異が認められないことから、iPS細胞レベルでは、WRN遺伝子の欠損が多分化能や細胞増殖能に大きな影響を示さないことが示唆された。また、細胞老化マーカーである老化関連 β ガラクトシダーゼ活性も顕著に低下することから、iPS化は細胞老化を抑制し、細胞増殖能を可逆的に回復したことが示された。また、WS由来iPS細胞から線維芽細胞への細胞分化実験を行ったところ、形態的に線維芽細胞に酷似した細胞が得られた(図1-3)。詳細な細胞表現型の解析が待たれるが、本WS iPS細胞は多分化能を有するiPS細胞で有ることが強く示唆された。今後、複数のWS患者由来のiPS細胞の樹立や、clonal variationの差異の検討が必

要ではあるが、皮膚線維芽細胞に加えて、血管内皮細胞や脂肪細胞等への分化実験時に、遺伝子発現やプロテオミクス解析を行い、健常者由来iPS細胞との比較により、早発性老化に関わる新規候補遺伝子の同定が期待される。

遺伝性疾患の中で、ナンセンス変異による遺伝子欠失(タンパク質欠損)は、遺伝子治療による遺伝子補充や組換えタンパク質の補充による治療法の開発が進められている。しかし、個々の遺伝子やタンパク質の特性の問題、遺伝子導入の臨床的課題等が開発の障害となっている。一方で、ナンセンス変異をリードスルーする活性で、翻訳時に終止コドンを読み飛ばし、機能性タンパク質を回復させる薬剤は、有望な治療薬として期待される。PTC124 (Ataluren) は、TGA終止コドン選択的リードスルー薬ではあるが、基礎研究レベルで多くの改善例が報告され、臨床試験に供されている。本研究では、TGA変異となる6型変異ホモ接合体WS患者線維芽細胞に対し、PTC124添加試験を行ったが、タンパク質の検出には至らなかった(図5)。WS患者細胞ではNMD亢進によるWRN mRNAの減少が想定され、実際に16%まで減少している例を明らかにした。リードスルー薬は十分なmRNAが細胞内に存在しなければ、タンパク質として翻訳できないため、WRN mRNA量が高めることが同時に必要かもしれない。そのため、WRN mRNAが有意に増加したWS iPS細胞に対する添加実験を行ったが、WRNタンパク質は検出できなかった(図6-7)。この結果は、WRN mRNAの2次構造やWRN遺伝子特有な問題、本研究に用いたWS患者細胞の特有な問題な

どが影響した可能性がある。今後、TGA ナンセンス変異を有する別の WS 患者細胞を複数系統調べることや、WRN 遺伝子の遺伝子発現を高める薬剤との併用などの検討が必要と考えられる。

遺伝性早老症患者由来細胞では、活性酸素産生の亢進が共通して認められることが知られている。実際、複数の WS 由来線維芽細胞で細胞内活性酸素の産生亢進を明らかにしている（データは示さない）。この結果から、抗酸化剤による治療の可能性を検討するために、安全性の高い抗酸化剤ビタミンC添加実験を行った。その結果、活性酸素産生の低下とともに、細胞老化マーカーSA-β-Gal 活性の顕著な低下が認められた（図 8）。同時に細胞増殖能を調べたところ、増殖能の改善は認められなかった。別な抗酸化剤でも同様の結果を得たことから、WS 細胞で発生する活性酸素は細胞老化の一部の表現型の出現に関わっており、部分的な改善が期待出来るかもしれない。現在、*Wrn*^{-/-}、*Tert*^{-/-}の2重欠損マウスを作出し、世代交配を進めている。G4-G6 世代のマウスの早老症表現型に対し、抗酸化剤を投与することで、レスキュー効果をモデルマウスレベルで検証できると期待される。

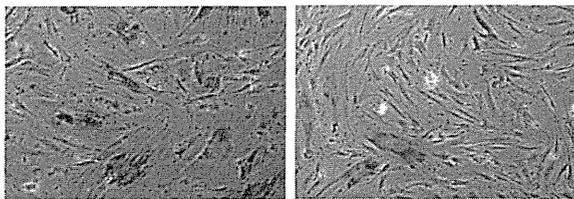


図 8：WS 由来線維芽細胞（左：WSCU01）は顕著な細胞老化マーカーSA-β-Gal 活性を示すが、50 μM ビタミンCを10日間添加すると、顕著にSA-β-Gal 活性が減少する（左）。

E. 結論

WS 患者の皮膚由来線維芽細胞に Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc の山中4因子を導入し、無限分裂能の獲得した細胞の樹立に成功し、WS 患者由来 iPS 細胞を樹立した。ナンセンス変異を有する WS 患者由来線維芽細胞にリードスルー薬を添加したが、WRN タンパク質は検出できなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kojima, T., Wakamatsu, H. T., Dogru, M., Ogawa, Y., Igarashi, A., Ibrahim, O., Inaba, T., Shimizu, T., Noda, S., Obata, H., Nakamura, S., Wakamatsu, A., Shirasawa, T., Shimazaki, J., Negishi, K., Tsubota, K. Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: Evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (*Sod1*) knockout mice. *Am J Pathol* 180, 1879-1896 (2012).

Fujita, H., Fujishima, H., Takahashi, K., Sato, T., Shimizu, T., Morii, T., Shimizu, T., Shirasawa, T., Qi, Z., Breyer, M., Harris, C., Yamada, Y. and Takahashi, T. SOD1, but not SOD3, deficiency accelerates diabetic renal injury in C57BL/6-*Ins2*^{Akita} diabetic mice. *Metabolism* 61, 1714-1724 (2012).

Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Irie, K., Shirasawa, T. & Shimizu, T. Stimulation of the amyloidogenic pathway by cytoplasmic superoxide radicals in an Alzheimer's disease mouse model. *Biosci Biotechnol Biochem* 76, 1098-1103 (2012).

Ogawa, K., Kim, H., Shimizu, T., Abe, S., Shiga, Y., Calderwood, S. Plasma heat shock protein 72 as a biomarker of sarcopenia in elderly people. *Cell Stress & Chaperones* 17, 349-359 (2012).

Kulic, L., McAfoose, J., Welt, T., Tackenberg, C., Späni, C., Wirth, F., FINDER, V., Konietzko, U., Giese, M., Eckert, A., Kinoshita, N., Shimizu, T., Murakami, K., Irie, K., Rasool, S., Glabe, C., Hock, C., & Nitsch, R. M. Early accumulation of intracellular fibrillar oligomers and late congophilic amyloid angiopathy in mice overexpressing the Osaka intra-A β APP mutation. *Transl Psychiatry* 13, e183 (2012).

Morikawa, D., Nojiri, H., Saita, Y., Kobayashi, K., Watanabe, K., Ozawa, Y., Koike, M., Asou, Y., Takaku, T., Kaneko, K., Shimizu, T. Cytoplasmic reactive oxygen species and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2368-2380 (2013).

Koyama, H., Nojiri, H., Kawakami, S., Sunagawa, T., Shirasawa, T., Shimizu, T. Antioxidants improve the phenotypes of dilated cardiomyopathy and muscle fatigue in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Molecules* 18, 1383-1393 (2013).

Watanabe, K., Shibuya, S., Koyama, H., Ozawa, Y., Toda, T., Yokote, K., and Shimizu, T. *Sod1* loss induces intrinsic superoxide accumulation leading to p53-mediated growth arrest and apoptosis. *Int J. Mol. Sci.* 14, 10998-11010 (2013).

Kinoshita, M., Sakamoto, T., Kashio, A., Shimizu, T., and Yamasoba, T. Age-related

hearing loss in Mn-SOD heterozygous knockout mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 325702, 13 pages (2013).

2. 学会発表

小山浩史、澁谷修一、嶋本顕、横手幸太郎、清水孝彦. ウェルナー症候群患者由来細胞に対するビタミンCの細胞老化改善作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013 年 3 月 25-27 日

Takahiko Shimizu, Hirofumi Koyama, Shuichi Shibuya, Akira Shimamoto, Minoru Takemoto, Koutaro Yokote. Oxidative stress, aging and progeric syndrome. Recent progress in basic and clinical research on progeroid syndrome. *The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2013), Seoul*, June 23-27 (2013).

横手幸太郎、清水孝彦、竹本稔. 早老症の病態と幹細胞. 「幹細胞と老化」シンポジウム. 第 13 回日本抗加齢医学会総会、横浜、2013 年 6 月 28-30 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe K, Kobayashi K, Takemoto M, Ishibashi R, Yamaga M, Kawamura H, Fujimoto M, Ishikawa T, Ohnishi S, Okabe E.	Sitagliptin Improves Postprandial Hyperglycemia by Inhibiting Glucagon Secretion in Werner Syndrom With Diabetes.	Diabetes Care	36(8)	e119	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

V. 參考資料

参考資料 目次

- 資料1. ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 二次調査 …41
- 資料2. 読売新聞『医療ルネサンス 難病とともに』 2013年11月18日(月)掲載 …42
- 資料3. 「患者家族の会」活動実績 …43

ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 (二次調査用紙)

症例者1名(1症例)につき、用紙1枚となります。

※複数の症例者が確認されている場合、お手数ではございますが、この用紙をコピーし、症例欄にチェックを入れ、ご記載頂きますようお願い申し上げます。

施設/診療科名: 千葉大学医学部附属病院 内科

001-9999-99

症例欄

症例1 症例2 症例3 症例4 症例5 症例6

記載者御氏名: _____

- 現在通院中の患者である
- 疑いがある患者である
- 過去5年以内に通院された患者

症例者の性別

- 男性
- 女性

症例者の最終診察時の年齢

() 歳
亡くなっている場合は、死亡時の年齢() 歳

身体的特徴	徴候の有無	発症年齢
1. 身長及び体重		身長()cm 体重()kg
2. 早老様顔貌 ・白髪または脱毛 ・前額突出・小顎症 ※目の異常突出およびまたは小さい「くちばし状」鼻	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	
3. 皮膚の変化 ・萎縮 ・潰瘍	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり (□上肢/□下肢) <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 () 歳
4. 足の変化 ・鶏眼や胼胝 ・扁平足 ・足趾の変形	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 () 歳 () 歳
5. 白内障	<input type="checkbox"/> あり (□片側/□両側) <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳

徴候と所見	徴候の有無	発症年齢
1. 血族結婚	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	
2. 月経の有無	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳
3. 糖代謝異常 ・境界型糖尿病 ・糖尿病	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 () 歳 使用薬剤名 ()
4. 脂質異常症	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 使用薬剤名 ()
〔初診時 もしくは 治療前〕 ・LDLコレステロール ≥ 140 mg/dl ・HDLコレステロール < 40 mg/dl ・中性脂肪 ≥ 150 mg/dl	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	
5. 脂肪肝	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳
6. 高血圧	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 使用薬剤名 ()
7. 動脈硬化性疾患 ・脳出血 ・脳梗塞 ・狭心症または心筋梗塞 ・閉塞性動脈硬化症	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 () 歳 () 歳 () 歳
8. 腫瘍性病変(良性・悪性を含む)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	() 歳 腫瘍性病変の部位、種類 ()
9. 骨粗しょう症	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	使用薬剤名 ()
10. 尿中ヒアルロン酸の増加	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	
11. 遺伝子変異(LMNA変異)	<input type="checkbox"/> 確定済み <input type="checkbox"/> 変異なし <input type="checkbox"/> 未検査	確定済みの場合は、() 遺伝子変異の部位 ()
※確定されていない場合は、当研究班において無料で検査を致します。 <input type="checkbox"/> 希望する <input type="checkbox"/> 希望しない		
12. 尿蛋白の有無	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明	

【自由記入欄】 ※その他使用歴のある薬剤がございましたらご記載下さい(成長ホルモンなど)

※ご不明な点がございましたら、ご相談下さい。

見過ごされる患者も



足が不自由な石井さん(右)だが、夫のサポートで患者会活動に参加するなど明るく暮らしている

「これまでのいろいろな症状は、この病気が原因で起こっていたということが初めて理解できました」
ウエルナー症候群の患者で、東京都江戸川区の主婦、石井奈津子さん(55)は2011年、この病気を専門的に研究する医師に出会った時のことを振り返る。

10年ほど前、右足のアキレス腱が切れて入院したが、傷口が細菌感染し、膝下を切断。その後、今度は左足に潰瘍ができ、かかとから先を切った。

ウエルナー症候群は、思春期以降、急速に老化が進む遺伝子疾患。原因不明で、根本的な治療法はない。40歳くらいまでに白内障になったり、皮膚が萎縮してひどい潰瘍ができたりする。患者はがんや糖尿病になりやすい傾向もある。

石井さんも、治療の過程でウエルナー症候群とは聞いていたが、どのような病気なのか、どんな症状を引き起こすのかといったことについて、「詳しい先生がいなくて、わかりやすい説明はありませんでした」。医師も本人も、目の前の症状への対処に精いっぱいだったということもある。

この病気の治療で実績のある千葉大病院(千葉市)で、足の血流を良くする血管の手術を受けるなどした石井さんは、病状がやや改善。同病院と自宅近くの病院で通院治療を続けている。

この病気の患者は国内に推定2000人とそもそも少ないが、確認できている患者は疑いも含め約400人に過ぎない。多くが診断されず見過ごされているとみられている。

「適切な診断基準を広め、一番いい診療をどこでも受けられるように標準化した」と、同大教授(細胞治療内科学)の横手幸太郎さんは話す。横手さんらの研

究班は12年、診断と診療の指針をまとめた。それまで参考にされてきた「診断の手引き」は1984年に作られたもので、後に可能になった遺伝子診断が含まれていないなどの問題があった。

指針は、この手引きを改善したもので、例えば、アキレス腱の付け根が硬くなる「石灰化」という状態が主な兆候の一つに加えられた。これは患者の8割に見られる症状で、エックス線画像で客観的に確認できる。

横手さんによると、90年代まで、この病気の患者は平均40代半ばで亡くなっていったが、2000年代になると平均50代半ばまで延び、中には60代を迎えた患者もいた。

横手さんは「適切な診療で病状の改善はできる。潜在的な患者を見つけ、支援することが必要です」と訴えている。

(高梨ゆき子)

(次は「脱・短命県」です)

医療・健康情報はインターネットサイト「ヨミドクター」(<http://yomidr.jp>)で

くらし 家庭

(参考資料3)

【患者家族の会 活動】

- 2013年6月5日第5回患者会ウェルナー症候群患者・家族の会「George M. Martin先生を囲んで」 大阪国際会議場
- 2013年10月20日 近畿・中部地区集会～愛知県名古屋市（ウィルあいち）
- 2013年10月19日 九州地区集会～福岡県福岡市（ホテルセントラーゼ博多 ザ・ラウンジ）
- 2013年10月14日中国地区集会～広島県広島市（広島大学）
- 2013年10月13日関東地区集会～千葉県（千葉大学病院第2講堂）