

201324154B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

早老症の病態解明、診断・治療法の確立と普及を
目的とした全国研究

平成24～25年度 総合研究報告書

平成26年3月

研究代表者 横手 幸太郎
千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学講座

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

早老症の病態解明、診断・治療法の確立と普及を
目的とした全国研究

平成24～25年度 総合研究報告書

平成26年3月

研究代表者 横手 幸太郎
千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学講座

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

早老症の病態解明、診断・治療法の確立と
普及を目的とした全国研究

総括研究報告書

研究代表者 横手 幸太郎
千葉大学大学院医学研究院 細胞治療内科学講座

分担研究者

竹本 稔 千葉大学大学院医学研究院 細胞治療内科学講座
清水孝彦 千葉大学大学院医学研究院 先進加齢医学寄附講座

平成 24年度 事業経過の概要

平成24年

- 4月 6日 厚生労働省より、平成24年度厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)の交付基準額通知の発行
- 6月 13日 厚生労働省より、補助金交付決定通知書の通知が届く
- 6月 22日 研究費補助金入金
- 8月 3日 「ウェルナー症候群の診断・診療ガイドライン」ホームページ掲載
(<http://www.chiba-u.jp/class/clin-cellbiol/werner/index.html>)

平成 25 年

- 2月 ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 全国疫学調査
アンケート送付
- 3月15日 アンケート調査受付締切
- 3月20日 アンケート集計
- 5月 16日 厚生労働省より、平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)の交付基準額通知の発行
- 7月 26日 ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 全国疫学二次調査
アンケート送付
- 7月 30日 厚生労働省より、補助金交付決定通知書の通知が届く
- 8月 8日 研究費補助金入金
- 9月 20日 アンケート調査受付締切
- 10月 30日 アンケート集計

目 次

I. 総合研究報告書	研究代表者 横手 幸太郎	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		13
III. 研究成果の刊行物・別刷り		17
IV. 参考資料		33

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業))

総合研究報告書

研究課題:「早老症の病態解明、診断・治療法の確立と普及を目的とした全国研究」

研究代表者: 横手 幸太郎

千葉大学大学院医学研究院 細胞治療内科学講座 教授

研究要旨

早老症は全身に老化徴候が早発する疾患の総称である。ハッチンソンギルフォード症候群(以下、HGFSと略)、ウエルナー症候群(WSと略)、コケイン症候群(CSと略)など、早老の程度に差のある約10疾患を含むが、それぞれ希少であり、治療法はもとより我が国における患者実態も不明である。うちWSは思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため40歳半ばで死亡する常染色体劣性疾患で、国内推定患者数は約2,000名、世界の報告の6割が日本人と我が国に多い。原因遺伝子は1994年に同定されたが、早老機序は未解明、根治療法も未確立であり、多くの患者が難治性皮膚潰瘍に伴う下肢切断、悪性腫瘍や糖尿病のため、生命の危機や重篤な後遺症に苦悩している。このような背景の下、平成21~23年度の厚生労働科学研究により、我々は385症例のWS患者を新規に同定、その解析成果を基に治療ガイドラインを完成した。

他の早老症についても、WSの経験をもとに、日本における実態解明と診断・治療法確立を全国規模で進めることが肝要であり、平成25年度までの本研究により小児期発症のHGFSに関して、我が国における実態を解明した。さらに革新的治療への糸口としてWS患者由来iPS細胞を樹立した。

研究分担者

竹本 稔 千葉大学大学院医学研究院

細胞治療内科学講座 准教授

清水 孝彦 千葉大学大学院医学研究院

先進加齢医学寄附講座 准教授

A. 研究目的

早老症は全身に老化徴候が早発する疾患の総称である。ハッチンソンギルフォード症候群(以下、HGFSと略)、ウエルナー症候群(以下、WSと略)、アクロジェリア、ロスムンドトムソン症候群、ブルーム症候群、コケイン症候群、色素性乾皮症など、早老の程度に差のある約10疾患を包むが、各々が希少であり、治療法はもとより患者の実態も不明である。

うちWSは思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため40歳半ばで死亡する常染色体劣性疾患で、国内推定患者数は約

2,000名、世界の報告の6割が日本人と我が国に多い。原因遺伝子は1994年に同定されたが、早老機序は未解明、根治療法も未確立であり、多くの患者が難治性皮膚潰瘍に伴う下肢切断、悪性腫瘍や糖尿病のため、生命の危機または死を免れずとも重篤な後遺症に直面する。平成21~23年度の厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業により、我々は日本全国で385症例のWS患者を新規に同定、その解析成果をもとに新たな診断基準を作成し、世界初の治療ガイドラインを完成した。これを普及・検証・発展させ、真に患者の予後改善に役立てる必要がある。さらに未だ研究が進んでいない他の早老症についても、WSの経験をもとに、日本における実態解明と診断・治療法確立を全国規模で進めることが肝要である。そこで、平成24、25年度は、WSの診

療ガイドラインの普及、新たな患者の同定と疾患 iPS 細胞樹立に取り組むとともに、我が国における HGPS 患者の実情把握調査を計画した。小児期発症の稀少かつ重篤な早老症である HGPS はこれまで全世界でおよそ 150 症例が報告されているが、我が国における実情やその臨床的特徴は明らかでない。

B. 研究方法

【HGPS 患者全国研究】

全国の 200 床以上の病院の小児科を対象にして一次アンケート調査を行い、HGPS 患者数の把握を行った（参考資料①）。アンケート調査は各診療科に過去 10 年間に経験された症例のうち、遺伝子診断が行われた症例を「確定」例、臨床症状から診断された症例を「疑い」例として回答を依頼した。

一次アンケート調査で明らかとなった HGPS 患者に対して、二次アンケート調査（参考資料②）を行い臨床的特徴に関する調査を行った。

【早老症患者由来 iPS 細胞樹立】

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、組織レベルで、奇形腫形成を確認することにより三胚葉系細胞への分化能を検討した。また、樹立した WSiPS 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、可逆性を評価した。さらに継代培養を 4-5 回重ねて線維芽細胞に分化させ、元の WS 患者由来線維芽細胞と細胞形質を比較した。

C. 研究結果

【HGPS 患者全国研究】

1173 施設にアンケート調査を郵送し、768 施設からの回答を得た（回答率 65%）。その結果、診断確定症例は男性 3 名、女性 2 名、不明 1 名、疑い症例は男性 3 名、女性 5 名、不明 1 名の計 15 名であった（表 1）。続いて、15 名の HGPS 患者の臨床症状に関するアンケート調査を行った（参考資料③）。その結果、5 名の HGPS 患者の臨床所見に関する結果を得ることができた（表 2）

表 1 全国 HGPS アンケート調査の結果

	確定			疑い		
	男性	女性	不明	男性	女性	不明
秋田	1					
福島			1			1
埼玉				1	2	
東京					1	
滋賀		1				
愛知					1	
鳥取					1	
福岡	1			2		
佐賀		1				
大分	1					
合計	3	2	1	3	5	1

表2 HGPS 二次アンケート調査結果

症例	1	2	3	4	5
性別	男性	男性	女性	女性	女性
年齢	10	4	3	17	13
死亡時年齢	10	4	不明	17	存命中
身長	95	70	76.3	105.6	107.5
体重	10.9	7.2	7.68	12.8	12.3
BMI	12.1	14.7	13.2	11.5	10.6
最終診察時の年齢	10	4	3	17	13
出生時体重	2580g	不明	2550g	不明	2838g
早老顔貌					
白髪または脱毛	有	有	有	有	有
前額突出	有	無	不明	有	有
小顎症	有	有	有	有	有
皮膚の変化					
萎縮	有	有	有	有	有
潰瘍	無	無	無	無	無
硬化	有	有	有	有	有
足の変化					
鶏眼や胼胝	有	無	無	無	不明
扁平足	有	有	不明	不明	不明
足の変形	有	有	無	有	有
白内障	無	有	無	不明	無
骨異常	無	有	無	不明	無
関節の拘縮	有	有	有	有	有
血族結婚	無	無	無	無	無
月経の有無			無	無	無
糖代謝異常	無	無	無	無	無
脂質異常症	無	無	無	有	無
脂肪肝	無	不明	無	不明	無
高血圧	有	有	無	無	無
動脈硬化性疾患					
脳出血	有	無	無	無	無
脳梗塞	有	有	無	無	有
狭心症または心筋梗塞	有	無	無	無	有
閉塞性動脈症	有	無	無	無	無
骨粗鬆症	無	無	無	無	無
尿中ヒアルロン酸の増加	不明	無	無	不明	無
遺伝子変異 (LMNA 変異)	有	不明	有	不明	有
尿蛋白の有無	有	不明	有	不明	有
腫瘍性病変	無	無	無	無	無

【iPS 細胞樹立】

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 細胞の形態を示す株を樹立した (図 1)。

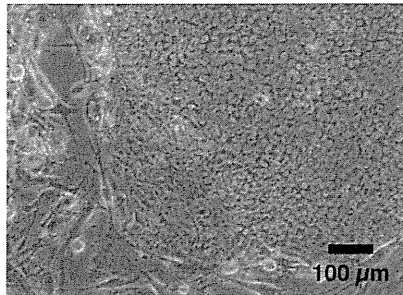


図 1 : WS iPS 細胞 (WSCU iPS02)

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と判断した。

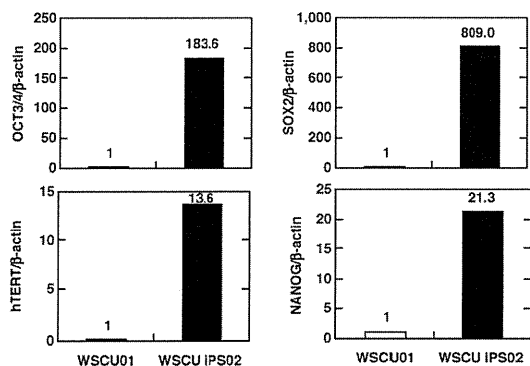


図 2 : WS iPS 細胞 (右 : WSCU iPS02) はもとの WS 由来線維芽細胞 (左 : WSCU01) に比較して、未分化マーカー (Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog) の発現が顕著に亢進していた。

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。(図 3)

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、元の線維芽細胞と比較して増殖速度が速まっていたことから、iPS 化によって細胞老化表現型の軽減したことが明らかとなった (成績未提示)。

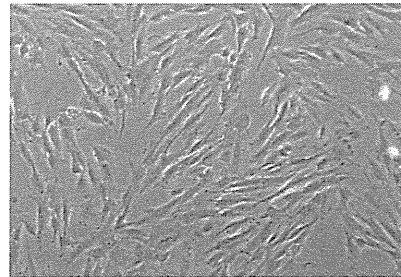


図 3 : 線維芽細胞に分化誘導した WS iPS 細胞。継代 5 回で典型的な線維芽細胞様の形態を示した。

D. 考察

【HGPS 患者全国研究】

HGPS (OMIM # 17667) は、1886年に Jonathan Hutchinson が「毛髪や乳腺の先天的欠如と、皮膚ならびにその付随器の萎縮を伴った 3 歳時症例」として世界で初めて報告し [1]、その後 Hasting Gilford によって 1904 年に命名された疾患である [2]。

その頻度は 400~800 万人に 1 名とされ [3]、これまでの症例報告の殆どが白人である。遺伝形式は常染色体優性遺伝であり、疾患の発症には突然変異 (*de novo* mutation) が関与していると考えられている。原因遺伝子は Eriksson らによってポジショナルクローニング法を用いて同定され [4]、核内中間フィラメントの一種である lamin A をコードする *LMNA* における変異であることが明らかにされている。多くの患者ではエクソン 11 内の点突然変異 (G608G, GGC>GGT) が生じ、スプライシング異常に伴い、N 末の 50 アミノ酸が欠損した変異 lamin A タンパク (progerin) が生じる [5]。

通常 lamin A は 664 アミノ酸からなる prelamin A として産生される。Prelamin A は C 末端に CAAX box を有し、この部位に

翻訳後ファルネシル化が生じる。ファルネシル化の後に、C末のメチル化が生じアミノ酸の一部が切断されることによって最終的に646アミノ酸からなる成熟型のLamin Aが生じる。HGPSにおける遺伝子変異で産生される変異タンパクprogerinは、翻訳後のプロセッシング異常に伴いタンパクのファルネシル化が持続し、核膜や核内マトリックスに異常を生じることが明らかになっている。

HGPSの患児は正常に出生するものの、生後1～2年より水頭症様顔貌、禿頭、脱毛、怒張した頭皮静脈、両眼の突出、少顎、強皮症などの特徴的な臨床所見を呈する。成長遅延、低身長を呈するが、精神運動機能や知能は正常である。脳梗塞、冠動脈疾患、末梢動脈性疾患等の動脈硬化性疾患、心臓弁膜症、高血圧、耐糖能障害、性腺機能障害を合併し、心筋梗塞や心不全の発症に伴い平均寿命は13歳（7歳～27歳）と報告されている。診断はその特徴的な身体所見、皮膚生検による異常な核形態の検出や遺伝子検査（LMNA）によってなされる。

現時点で根本的な治療法はなく、少量のアスピリン投与やファルネシル化抑制を期待してfarnesyltransferase inhibitor [6], [7]やスタチン[8]、ビスホスホネート[9]の投与が期待されているが、その効果に関する検証はまだ十分ではない。このようにHGPSの病態に関しては少しずつ明らかになってきているが、我が国におけるHGPSの実態に関しては依然不明のままであった。

今回、我々が実施した全国一次アンケート調査により、少なくとも15名のHGPSの患者が同定され、うち5名については臨床所見を収集することができた。5名の内訳は男性2名、女性3名、3名が死亡、1名は不明、1名は現在も存命中であった。死亡例3名の平均寿命は9歳であったが、症例が少なく我が国のHGPS患者が海外の報告の平均年齢13歳に比し短命とは断定で

きない。HGPSの患児は正常に出生することが報告されているが、情報を得た3名の平均出生体重は2656gと我が国の平均出生体重 3020g（厚生労働省大臣官房統計情報部、平成21年度統計）に比し低出生体重であった。

身体的な特徴としては脱毛、前額突出、小顎、皮膚の萎縮、硬化、関節拘縮はほぼ全例に観察された。代謝疾患に関してはHGPSではインスリン抵抗性を示すが明らかな糖尿病は発症しないと報告されており、我々の検討でも糖尿病症例はなく、脂質異常症は1例、高血圧は2例に観察された。動脈硬化性疾患に関しては脳出血

1例、脳梗塞 3例、狭心症/心筋梗塞 2例、閉塞性動脈硬化症 1例とこれまでの報告通りに動脈硬化性疾患の高有病率を示した。ただし症例4に関しては17歳で死亡しているが動脈硬化性疾患の記載はなく、その死因に関して現在調査を行っている。腫瘍性病変に関してもこれまでの報告通りに観察された例はなかった。

動脈硬化や腫瘍の発症・進展には細胞老化が深く関与することが知られている。HGPSと同様に遺伝性早老症の一つであるWSにおいても高率に動脈硬化性疾患を合併するが、WSにおいてはHGPSと異なり腫瘍性病変の合併が多く観察される。

平成21～23年度の厚生労働科学研究 難治性疾患克服事業の一環として行った我々の検討では、185症例のWS患者のうち、1.1%に脳出血、2.7%に脳梗塞、10.3%に虚血性心疾患、17.3%に閉塞性動脈硬化症を合併していた。さらに、これらの動脈硬化性疾患はWSに高率に合併する高血圧、脂質異常症、糖尿病といった代謝異常の罹患率と有意に相関することを報告している[10], [11]。

WSでは20歳前後で白髪・禿頭、皮膚の硬化などの身体的な老化徴候が出現し、動脈硬化性疾患や腫瘍性病変が40歳以降に出現する。WSはWRN遺伝子変異により生じる。WRN遺伝子がコードするRecQ型 DNA

ヘリケース (WRNタンパク) は、二重鎖DNAを解きほぐす酵素であり、細胞分裂の際などにATPの存在下に3′→5′方向あるいは5′→3′方向に二重鎖DNAを巻き戻し一本鎖にする作用を有する。またWRNタンパクは、他のRecQ型DNAヘリケースにはない、3′→5′方向へのエクソヌクレアーゼ活性を有するという特徴がある[12]。このエクソヌクレアーゼ活性はDNAの修復に重要とされる。WRNタンパクは二重鎖DNAのみならず、ホリデージャンクションやdisplacement loops (D-loops)などの三重鎖、四重鎖DNA基質にも特異度が高い[13]。さらにDNA二重鎖切断修飾や塩基除去修復に関与するXRRC4/ Ligase IV[14]、DNA polymerase β [15]、topoisomerase I [16]やDNAの相同組換えに関与するRAD54 B[17]、RAD52、細胞の大きな二重鎖切断部の修飾に関与するMRN complex[18]やKu 70/80[19]とも相互作用があることが報告されている。これらの実験的観察は、WSタンパクがDNA複製中に生じるエラーの修復に重要であることが示唆する。その事実を裏付けるように、WS患者由来細胞においては細胞寿命の短縮と細胞周期におけるS期の延長が観察され、ゲノムの不安定性を象徴するように染色体レベル転位等の異常が観察される[20]、[21]。また、WRNタンパクは細胞のDNA障害時や複製時のストレスを感知する上で重要なコンポーネントであるATM kinaseやATR kinaseによってリン酸化を受けることも報告されており、DNA障害時のチェックポイントシグナルの一端を担っていることが示唆されている[22]。さらにWRNタンパクの重要な機能として染色体末端のテロメアの維持を通してゲノムの安定性に関与していることが挙げられる[23]。WS患者由来の繊維芽細胞を培養するとテロメアが加速度的に短縮することや、これまで作成された、いくつかのWRN遺伝子ノックアウトマウス単独では老化の表現型に乏しいものの、テロメア伸長酵素の欠損

マウスとのダブルノックアウトマウスにおいて老化徴候を示すこと[24]、WRNタンパクがTRF1、TRF2といったテロメアを保護するシェルトリンタンパクと結合することからも裏付けられる[25]。このようにWRNタンパクはヘリケース活性やエクソヌクレアーゼ活性を有し、DNA鎖の修復やテロメアの維持を担っており、WRNタンパクの機能不全がゲノムの不安定性を来たし、老化徴候が促進するものと推測されている。

HGPSの病因に関してもテロメアの機能異常が深く関与していることが報告されている[26]一方で、WSとHGPSでは老化の表現型や動脈硬化の表現型の発現時期に大きな差がある。代謝異常の観点では両疾患においてインスリン抵抗性を伴うことが報告されている点で類似しているものの、HGPSは糖尿病や脂質異常症を伴わずに動脈硬化性疾患を発症する。HGPS患者に観察される変異タンパクprogerinが血管の壁構成細胞全てに観察されることが報告されており、それぞれの遺伝子の血管壁構成細胞における発現様式や血管機能に対する遺伝子機能の差が、動脈硬化の発症様式の差につながっている可能性がある。特にWRNに関しては遺伝子変異そのものが動脈硬化の発症につながるというよりは、WRN遺伝子の変異に伴い、血管壁構成細胞の代謝性疾患に対する感受性が亢進することが動脈硬化の発症に関与しているのかもしれない。

腫瘍に関して、WSでは上皮性腫瘍は47.2±8.5歳、非上皮性腫瘍は45.2±10.9歳、悪性腫瘍全体では45.8±10.2歳で発症することを我々は報告している[27]。WSでは10代で非上皮性腫瘍、20代で観察される上皮性腫瘍の出現が観察されるが、HGPSでは一般的に腫瘍の合併の報告はなく、今回我々の検討でも良性、悪性ともに腫瘍の合併は観察されなかった。HGPSにおける身体的な老化徴候は1~2歳で出現し、平均寿命が13年、WSでは20代で身体的な

老化徴候が出現し、平均寿命は50代である。HGPSでは加速された「老化期間」がおよそ10年以上あるにも関わらず、腫瘍の発生がないことも興味深い。この点においても同じ早老症ではあるが、HGPSとWSでは老化関連疾患の発症・進展様式が異なり、今後さらに両疾患の研究を推進することにより、一般的な老化関連疾患の理解が進むことも期待される。

【iPS細胞樹立】

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。さらに、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細胞であ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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Watanabe K, Kobayashi K, Takemoto M, Ishibashi R, Yamaga M, Kawamura H, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, He P, Yokote K. (2013) Sitagliptin

improves postprandial hyperglycemia by inhibiting glucagon secretion in Werner syndrome with diabetes. *Diabetes Care* 36:e119

- ② Kitamoto T, Takemoto M, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, Kobayashi K, Kawamura H, Yokote K. (2012) Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in werner syndrome with diabetes. *Diabetes Care* 35 (12):e83.
- ③ Onishi S, Takemoto M, Ishikawa T, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. (2012) Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer. *Acta Diabetol*. Epub ahead of print.
- ④ Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, Yokote K. (2012) Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int*, Epub ahead of print
- ⑤ Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. (2012) Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in individuals with Werner syndrome in Japan. *J Am Geriatr Soc* 60(5):997-998

【作成に寄与したガイドライン・指針】

Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, Yokote K. (2012) Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int* 13:475-481.

2. 学会発表

- ① Yokote K. (2013) (招待講演) Achievement of Healthy Aging: from a Japanese Medical Point of View. China Medical University, Nov 5, Shenyang, China.

- ② Yokote K. (2013) (招待講演) Multidisciplinary approach for the treatment of diabetes in the elderly. 4th International Association of Gerontology and Geriatrics Master Class on Ageing-Kyoto, Oct 30, Kyoto.
- ③ Yokote K. (2013) (シンポジスト) New diagnostic criteria and treatment guideline for werner syndrome. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, June 25, Seoul.
- ④ Shimizu T, Koyama H, Shibuya S, Shimamoto A, Takemoto M, Yokote K. 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).
- ⑤ Onishi S, Takemoto M, Ishikawa T, Okabe E, Ishibashi R, Peng He, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer 20th World Congress of the International Association of Gerontology and Geriatrics (IAGG2013) 2013.6.23-27, Seoul, Korea
- ⑥ Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, Peng He, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in Werner syndrome patients in Japan. 20th World Congress of the International Association of Gerontology and Geriatrics (IAGG2013) 2013.6.23-27, Seoul, Korea.
- ⑦ Yokote K. (2013) Achievement of healthy aging: from a Japanese medical point of view. The 1st meeting for JST-VINNOVA Scoping Group for university-industry collaboration program, May 21-22, Tokyo.
- ⑧ Yokote K. (2012) Lipid management guideline in A-P region. 8th Congress of Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases, October 22, Phuket, Thailand.
- ⑨ Yokote, K. (2012) (パネリスト) Familial hypercholesterolemia, model of care in Asian-Pacific region. 8th Congress of Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases, October 20, Phuket, Thailand.
- ⑩ Yokote K. (2012) (特別招待講演) Mission of medical research in aging society. May 3, Kaohsiung Medical University(高雄医学大学), Taiwan.
- ⑪ Yokote K. (2012) (Symposium) Cellular regulation in diabetic complications. 2012 Shanghai Symposium on Obesity and Diabetes, April 7, Shanghai, China.
- ⑫ 横手幸太郎 (2013) (講演) 早老症の病態と幹細胞。第13回日本抗加齢医学会総会 ベーシックサイエンス3、6月28日、横浜。
- ⑬ 大西俊一郎、竹本稔、小林一貴、藤本昌紀、河村治清、石川崇広、岡部恵見子、石橋亮一、賀鵬、横手幸太郎 遺伝子性早老症 Werner 症候群における糖尿病と悪性腫瘍の関連。第56回日本糖尿病学会年次学術集会 熊本 2013年5月16-18日
- ⑭ 藤本昌紀、大西俊一郎、竹本稔、岡部恵見子、小林一貴、河村治清、石川崇広、石橋亮一、賀鵬、久野響子、横手幸太郎。糖尿病合併 Werner 症候群におけるピオグリタゾンと悪性腫瘍との関連に関する検討。第56回日本糖尿病学会年次学術集会 熊本 2013年5月16-18日
- ⑮ 小林一貴、大西俊一郎、岡部恵見子、竹本稔、藤本昌紀、河村治清、石川崇広、石橋亮一、賀鵬、横手幸太郎。Werner 症候群の糖尿病合併例におけるピオグリタゾンと悪性腫瘍に関する検討。第55回日本老年医学会学術集会 2013年6月4-6日 大阪
- ⑯ 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

- ⑰ 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
- ⑱ 岡部恵美子 他、横手幸太郎 (2012) Werner 症候群における代謝性疾患と動脈硬化性疾患罹患率の相関について。第 54 回 日本老年医学会学術集会、6 月 29 日、東京。
- ⑲ 大西俊一郎、竹本稔、小林一貴、藤本昌紀、河村治清、石川崇広、岡部恵美子、石橋亮一、賀鵬、横手幸太郎 (2012) 遺伝性早老症 Werner 症候群における悪性腫瘍と糖尿病の関連。第 54 回 日本老年医学会学術集、6 月 28 日、東京。

参考文献

- [1] J. Hutchinson, Congenital absence of hair and mammary gland with atrophic condition of skin and its appendages in a boy whose mother had been almost totally bald from alopecia areata from the age of six, *Medicochir. Trans.* 69 (1886) 473-477.
- [2] Y M. Gilford, Progeria – a form of senilism, *Practitioner* 73 (1904)188-217.
- [3] F.L. DeBusk, The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr* 80 (1972) 697-724.
- [4] M. Eriksson, W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M.R.Erdos, C.M. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A.B. Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, and F.S. Collins, Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423 (2003) 293-8.
- [5] A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C.L. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, and N. Levy, Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria.

science 300 (2003) 2055.

- [6] J.I. Toth, S.H. Yang, X. Qiao, A.P. Beigneux, M.H. Gelb, C.L. Moulson, J.H. Miner, S.G. Young, and L.G. Fong, Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 12873-8.
- [7] S.H. Yang, M.O. Bergo, J.I. Toth, X. Qiao, Y. Hu, S. Sandoval, M. Meta, P. Bendale, M.H. Gelb, S.G. Young, and L.G. Fong, Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 10291-6.
- [8] M. Columbaro, C. Capanni, E. Mattioli, G. Novelli, V.K. Parnaik, S. Squarizoni, N.M. Maraldi, and G. Lattanzi, Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci* 62 (2005) 2669-78.
- [9] I. Varela, S. Pereira, A.P. Ugalde, C.L. Navarro, M.F. Suarez, P. Cau, J. Cadinanos, F.G. Osorio, N. Foray, J. Cobo, F. de Carlos, N. Levy, J.M. Freije, and C. Lopez-Otin, Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 14 (2008) 767-72.
- [10] Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in individuals with Werner syndrome in Japan. *J Am Geriatr Soc.* 60 (2012) :997-8
- [11] ウェルナー症候群の診断・診療ガイドライン 2012 版 <http://www.m.chiba-u.jp/class/clin-cellbiol/werner/index.html>
- [12] S. Huang, B. Li, M.D. Gray, J. Oshima, I.S. Mian, and J. Campisi, The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nat Genet* 20 (1998) 114-6.
- [13] R.M. Brosh, Jr., P.L. Opresko, and V.A. Bohr,

- Enzymatic mechanism of the WRN helicase/nuclease. *Methods Enzymol* 409 (2006) 52-85.
- [14] R. Kusumoto, L. Dawut, C. Marchetti, J. Wan Lee, A. Vindigni, D. Ramsden, and V.A. Bohr, Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing. *Biochemistry* 47 (2008) 7548-56.
- [15] J.A. Harrigan, D.M. Wilson, 3rd, R. Prasad, P.L. Opresko, G. Beck, A. May, S.H. Wilson, and V.A. Bohr, The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 745-54.
- [16] M. Lebel, E.A. Spillare, C.C. Harris, and P. Leder, The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. *J Biol Chem* 274 (1999) 37795-9.
- [17] M. Otterlei, P. Bruheim, B. Ahn, W. Bussen, P. Karmakar, K. Baynton, and V.A. Bohr, Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest. *J Cell Sci* 119 (2006) 5137-46.
- [18] W.H. Cheng, C. von Kobbe, P.L. Opresko, L.M. Arthur, K. Komatsu, M.M. Seidman, J.P. Carney, and V.A. Bohr, Linkage between Werner syndrome protein and the Mre11 complex via Nbs1. *J Biol Chem* 279 (2004) 21169-76.
- [19] B. Li, S. Navarro, N. Kasahara, and L. Comai, Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* 279 (2004) 13659-67.
- [20] D. Salk, K. Au, H. Hoehn, and G.M. Martin, Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. *Cytogenet Cell Genet* 30 (1981) 92-107.
- [21] C.E. Ogburn, J. Oshima, M. Poot, R. Chen, K.E. Hunt, K.A. Gollahon, P.S. Rabinovitch, and G.M. Martin, An apoptosis-inducing genotoxin differentiates heterozygotic carriers for Werner helicase mutations from wild-type and homozygous mutants. *Hum Genet* 101 (1997) 121-5.
- [22] P. Pichierri, F. Rosselli, and A. Franchitto, Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* 22 (2003) 1491-500.
- [23] L. Crabbe, A. Jauch, C.M. Naeger, H. Holtgreve-Grez, and J. Karlseder, Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 2205-10.
- [24] S. Chang, A.S. Multani, N.G. Cabrera, M.L. Naylor, P. Laud, D. Lombard, S. Pathak, L. Guarente, and R.A. DePinho, Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat Genet* 36 (2004) 877-82.
- [25] P.L. Opresko, Telomere ResQue and preservation--roles for the Werner syndrome protein and other RecQ helicases. *Mech Ageing Dev* 129 (2008) 79-90.
- [26] Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhaefer JE, Olive M, Erdos MR, Nabel EG, Collins FS. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest*. 121 (2011) :2833-44.
- [27] 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 (2012) :S259-6

Ⅱ. 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, Peng He, Yokote K.	Sitagliptin Improves Postprandial Hyperglycemia by Inhibiting Glucagon Secretion in Werner Syndrom With Diabetes.	Diabetes Care	36(8)	e119	2013
Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, Yokote K.	Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey.	Geriatr Geroutol int	13(2)	475-481	2013
Kitamoto T, Takemoto M, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, Kobayashi K, Kawamura H, Yokote K.	Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in werner syndrome with diabetes.	Diabetes Care	35 (12)	e83	2012
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	Suppl1	S259-260	2012
Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K.	Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in individuals with Werner syndrome in Japan.	J Am Geriatr Soc	60(5)	997-998	2012
大西俊一郎、竹本稔、 横手幸太郎	ウェルナー症候群	日本臨牀社 別冊 先天代謝異常症候群 (第2版) 上		675-680	2012

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

OBSERVATIONS

Sitagliptin Improves Postprandial Hyperglycemia by Inhibiting Glucagon Secretion in Werner Syndrome With Diabetes

Werner syndrome (WS) is a typical progeria syndrome and often leads to diabetes (1). Here, we report a case in which sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, normalized the postprandial glucagon secretion and improved postprandial blood glucose levels.

A 54-year-old female was admitted to our hospital. She developed bilateral cataracts at 35 years of age. Thereafter, at 44 years of age, because of her progeria-like face, she underwent genetic testing and was diagnosed with WS (mutation 4/6, compound heterozygote). At 49 years of age, she developed diabetes. Her height was 144 cm, weight 30.4 kg, and BMI 14.6 kg/m². Her visceral fat area was 124.8 cm². At the time of the hospitalization, she was prescribed 30 mg pioglitazone daily. The initial examination presented the following results: fasting blood glucose levels, 93 mg/dL; 2-h postprandial blood glucose levels, 207 mg/dL; and HbA_{1c} levels, 5.9%. For an understanding of the mechanism of pathogenesis of postprandial hyperglycemia in this case, pioglitazone administration was ceased for 7 days and the changes in the hormone levels were analyzed after consumption of a test meal. The meal was Calorie Mate (500 g; calorific level: carbohydrate:fat:protein = 60:26:14).

The respective results at 0, 15, 30, 60, and 120 min after the meal were as follows: 95, 131, 195, 240, and 216 mg/dL for blood glucose levels; 17.7, 132.4, 113.6, 259, and 390 IU/mL for insulin levels; 67, 95, 99, 80, and 68 pg/mL for glucagon

levels; and 7.4, 41.7, 10.3, 9.2, and 2 pmol/L for levels of active forms of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). The areas under the curve were 24,390 for blood glucose levels, 28,029 for insulin levels, 9,795 for glucagon levels, and 1,386 for GLP-1 levels.

Sitagliptin (50 mg/day) was then initiated, and the same examination was repeated after 4 days. We obtained the following results: 82, 86, 170, 182, and 202 mg/dL for blood glucose levels; 21.7, 17.3, 143.1, 189.1, and 539 IU/mL for insulin levels; 56, 64, 69, 63, and 57 pg/mL for glucagon levels; and 5.1, 5.6, 18.4, 16.4, and 19.9 pmol/L for GLP-1 levels. The following were the area under the curve values: 19,980 for the blood glucose levels, 28,321 for the insulin levels, 7,477 for the glucagon levels, and 1,871 for GLP-1 levels.

These results indicated an improvement in the postprandial hyperglycemia without any changes in the total amount of secreted insulin; moreover, an increase in GLP-1 levels and an inhibition of glucagon secretion after the meal were observed.

Although the patients with WS are insulin resistant (2,3), it has been suggested that only those who have impaired insulin secretion develop overt diabetes (4). In this study, we revealed the paradoxical pattern of postprandial glucagon secretion in WS with diabetes. We have recently reported that a single dose of sitagliptin was well tolerated in a WS patient with diabetes (5). This study showed that sitagliptin improved postprandial glucose along with its inhibitory effects on glucagon secretion. Therefore, sitagliptin is certain to become the primary treatment option for WS with diabetes.

KANEYUKI WATANABE, MD¹
 KAZUKI KOBAYASHI, MD, PHD^{1,2}
 MINORU TAKEMOTO, MD, PHD^{1,2}
 RYOICHI ISHIBASHI, MD^{1,2}
 MASAYA YAMAGA, MD^{1,2}
 HARUKIYO KAWAMURA, MD, PHD^{1,2}
 MASAKI FUJIMOTO, MD, PHD^{1,2}
 TAKAHIRO ISHIKAWA, MD, PHD^{1,2}
 SHUNICHIRO ONISHI, MD, PHD^{1,2}
 EMIKO OKABE, MD^{1,2}

PENG HE, BM¹
 KOUTARO YOKOTE, MD, PHD^{1,2}

From the ¹Department of Clinical Cell Biology and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan; and the ²Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, Department of Medicine, Chiba University Hospital, Chiba, Japan.

Corresponding author: Minoru Takemoto, minoru.takemoto@faculty.chiba-u.jp.
 DOI: 10.2337/dc13-0709

© 2013 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Acknowledgments—No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

K.W. and K.K. researched data. M.T. wrote the manuscript and researched data. R.I., M.Y., H.K., M.F., T.I., S.O., E.O., and P.H. researched data. K.Y. contributed to the discussion and reviewed and edited the manuscript. M.T. and K.Y. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

1. Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. Werner's syndrome: a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 1966; 45:177–221
2. Hattori S, Kasai M, Namatame T, Hattori Y, Kasai K. Pioglitazone treatment of insulin resistance in a patient with Werner's syndrome. *Diabetes Care* 2004;27:3021–3022
3. Yokote K, Hara K, Mori S, Kadowaki T, Saito Y, Goto M. Dysadipocytokemia in werner syndrome and its recovery by treatment with pioglitazone. *Diabetes Care* 2004;27:2562–2563
4. Yamada K, Ikegami H, Yoneda H, Miki T, Ogihara T. All patients with Werner's syndrome are insulin resistant, but only those who also have impaired insulin secretion develop overt diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:2094–2095
5. Kitamoto T, Takemoto M, Fujimoto M, et al. Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in Werner syndrome with diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:e83