

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症候群モデルマウスの作出と解析

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。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進んでいない。病態メカニズム解明のため、Wrn欠損マウスが作出されたが、表現型を示さないことから、病態を呈するモデルマウスの開発が望まれている。本研究は、テロメラーゼ (Tert) 欠損マウスとWrn欠損マウスの2重欠損マウスを作出し、世代交配を重ね、WS症状を呈するかどうか明らかにすることを目的に行った。また既報との表現型比較を行い、マウスにおけるWS病態発症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  $\beta$  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、テロメア短縮に基づいた WS マウスモデル作出を行い、WS 動物モデルを樹立することを目的とする。

B. 研究方法

Wrn 欠損マウスは米国 MMRRRC (Dr. B. Johnson) より、テロメラーゼ (Tert) 欠損マウスは理化学研究所バイオリソースセンター(京都大学・石川教授) より入手した。Tert 欠損マウスと Wrn 欠損マウスを自然交配に繁殖し、2 重欠損マウス(G1 世代)を作出した。兄弟間の世代交配により、2 重欠損マウスを G4 世代まで作出した。

G0, G2, G4 世代のマウス尾から DNA を抽出し、PCR 法により、テロメア長を解析した。また、G0, G2, G4 世代のマウス個体を解剖し、肝臓、脾臓、下腿三頭筋、脳、精巣の臓器重量を測定し、病理組織を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、千葉大学実験動物委員会の認可のもとで行った実験である (許可番号: 動 26-251)。

C. 研究結果

G0, G2, G4世代のマウス尾からDNAを抽出し、PCR法により、テロメア長を解析した結果、世代を経る毎に相対的なテロメア長の減少が認められ、テロメラーゼ欠損によるテロメア短縮が確認できた(図1)。

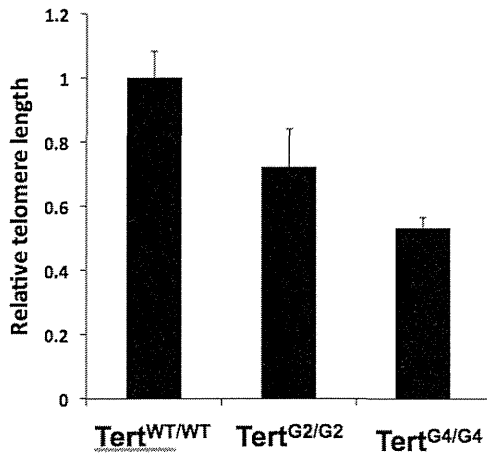


図1 : Wrm/Tert 2重欠損マウスのテロメア長

G0, G2, G4世代の2重欠損マウスの体重を測定したところ、Wrm遺伝子の欠損の有無、Tert遺伝子の欠損の世代間のいずれでも大きな変動は認められなかった。

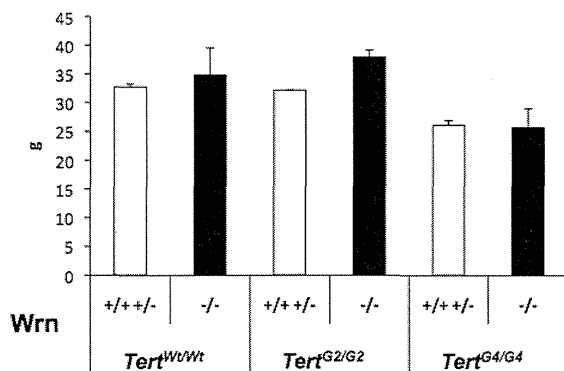


図2 : G0, G2, G4世代の2重欠損マウスの体重

また、肝臓、脾臓、下腿三頭筋、脳、精巣重量を測定しても、体重と同様にいずれの遺伝子型で差が認められなかった(データは示さな

い)。さらに組織解析により組織障害を調べたところ、肝臓や脾臓では明らかな組織形態学的な異常も認められなかった(図3)。

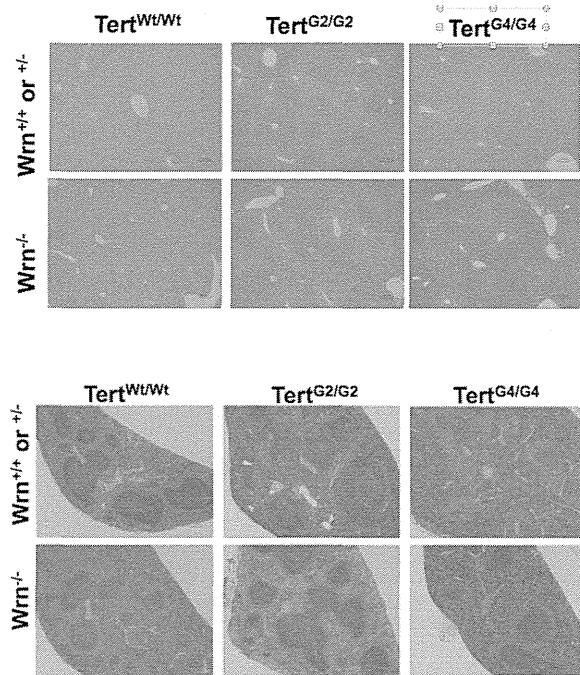


図3 : G0, G2, G4世代の2重欠損マウスのHE染色像(上段:肝臓、下段:脾臓)。

一方、精巣では、Wrm<sup>-/-</sup> Tert<sup>G4/G4</sup>精細管配列の乱れおよび空洞化が認められた。(図4)。

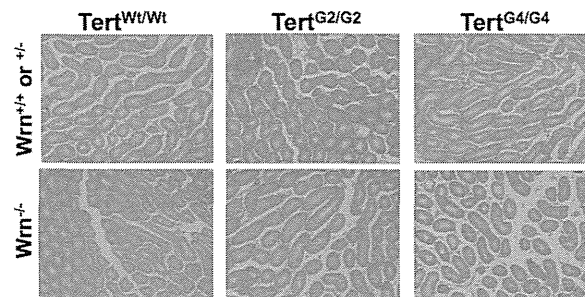


図4 : G0, G2, G4世代の2重欠損マウスの精巣HE染色像。

次に、マウス背部皮膚の組織像を調べたところ、真皮および表皮層に世代依存的な非薄化傾向が認められた。特に、Wrm<sup>-/-</sup> Tert<sup>G4/G4</sup>マウスの皮下脂肪層厚の減少が顕著に認められたが、Wrm<sup>+/+</sup> Tert<sup>G4/G4</sup>マウスでも同様の傾向が認めら

れたことから、テロメア短縮による皮膚非薄化と考えられた。(図5)。

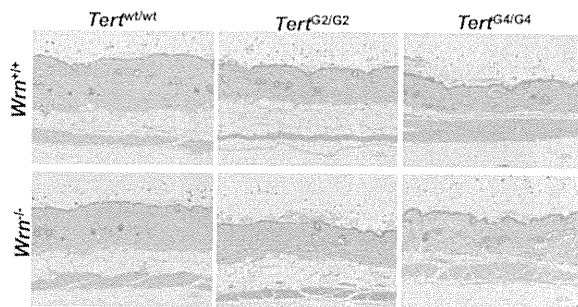


図5：G0, G2, G4世代の2重欠損マウスの背部皮膚HE染色像。

#### D. 考察

WS 病態メカニズム解明のため、テロメラーゼ (Tert) 欠損マウスと Wrn 欠損マウスの 2 重欠損マウスを作出し、世代交配を重ね、WS 症状を呈するかどうか形態学的・組織学的な解析を行った。Tert 遺伝子の欠損世代を軸に、世代交配により G0-G4 世代の 2 重欠損マウスの作出に成功した。これらのマウスからゲノム DNA を抽出し、相対的テロメア長を PCR 法で測定したところ、世代を経る毎にテロメア長の短縮が認められ、テロメラーゼ活性の消失による生殖細胞系列でのテロメア短縮を確認した(図1)。しかし、個体レベル、組織学レベルでの解析では、Tert 欠損の世代間で、また Wrn 欠損による目立った病理学的変化は認められなかった(図2、3)。ただ、精巣や皮膚厚において、Tert 欠損の世代間で個体数が少なく有意差は認められていないが、形態学的な変化が観察された(図4)。

Changらは、*Wrn*<sup>-/-</sup>、*Terc*<sup>-/-</sup>の2重欠損マウスのG4~G6世代が白内障、骨粗鬆症、白髪、脱毛などの早老症表現型を呈すると報告している(Nat Genet, 2004)。本マウスとの違いは、Tert 遺伝子と Terc 遺伝子の違いに加え、G5-G6 世代の

マウスを解析群に加えていないことが上げられる。しかし、Chang らは、2004 年の論文で、*Wrn*<sup>-/-</sup>、*Terc*<sup>-/-</sup> 2重欠損マウスのG4~G6世代でも早老症の表現型を呈するマウスの割合は50%程度と記述している。今回の研究結果と考え合わせると、マウスにおいて、テロメア短縮による表現型と Wrn 欠損の表現型との関連は強くないことが考えられる。今後は、G5-G6 世代マウスを解析群に加えること、個体数を増やして確定的なデータを出すこと、組織学的な解析に加え生化学的な解析を加えること、さらに欠損マウスから単離した初代培養細胞を用いた細胞実験データも加えて、総合的な解釈が必要であると考えられる。

哺乳類には、Wrn ヘリケースが属する RecQ ヘリケースファミリーとして 5 種類の遺伝子 (RecQL1, Wrn, Blm, Rts, RecQL5) が同定されている。単独の Wrn 欠損マウスが早老の表現型を示さず健全に生育すること、かつテロメラーゼ欠損マウスとの 2 重欠損マウスも顕著な早老症の表現型を示さないことを考えると、5 種類 RecQ ヘリケース遺伝子の機能的な重複を考慮する必要があると考えられる。Wrn 欠損マウスと他の RecQ ヘリケース遺伝子欠損マウスとの 2 重欠損マウスを作出し、新しい早老症発症モデルマウスの作製を試みる必要があるであろう。

#### E. 結論

Tert 欠損マウスと Wrn 欠損マウスの 2 重欠損マウスを作出し、世代交配を重ね、WS 症状を呈するかどうか調べたが、既報と同様に、顕著な早老症発症は認められなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Shimamoto, A., Kagawa, H., Zensho, K., Sera, Y., Kazuki, Y., Osaki, M., Mitsuo Oshimura, Ishigaki, Y., Hamasaki, K., Kodama, Y., Yuasa, S., Fukuda, K., Hirashima, K., Seimiy, H., Koyama, H., Shimizu, T., Takemoto, M., Yokote, K., Goto, M., and Tahara, H. Reprogramming Suppresses Premature Senescence Phenotypes of Werner Syndrome Cells in Long-Term Culture. *PLoS One* 9, e112900 (2014).

Shibuya, S., Ozawa, Y., Watanabe, K., Izuo, N., Yokote, K., and Shimizu, T. Palladium and platinum nanoparticles attenuate aging-like skin atrophy via antioxidant activity in mice. *PLoS One* 9, e109288 (2014).

Watanabe, K., Shibuya, S., Ozawa, Y., Nojiri, H., Izuo, N., Yokote, K., and Shimizu, T. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *BioMed. Res. Int.* 2014, 140165, (2014).

Ibrahim, O.M., Dogru, M., Matsumoto, Y., Igarashi, A., Kojima, Wakamatsu, T.H.F., Inaba, T., Shimizu, T., Shimazaki, J., Tsubota, K. Oxidative stress induced age dependent meibomian gland dysfunction in Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *PLoS One* 9, e99328 (2014).

Miyazaki, Y., Kaneko, K., Mizushige, T., Kanamoto, R., Yoshikawa, M., Shimizu, T., and Ohinata, K. Orally administered a  $\delta$  opioid agonist peptide rubiscolin-6 stimulates food intake in aged

mice with ghrelin resistance. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 2046-2052 (2014).

Kondo, Y., Masutomi, H., Noda, Y., Ozawa, Y., Takahashi, K., Handa, S., Maruyama, N., Shimizu, T., and Ishigami, A. Senescence marker protein-30/Superoxide dismutase 1 double knockout mice exhibit increased oxidative stress and hepatic steatosis. *FEBS Open Bio.* 4, 522-532 (2014).

Shibuya, S., Ozawa, Y., Toda, T., Watanabe, K., Tometsuka, C., Ogura, T., Koyama, Y., and Shimizu, T. Collagen peptides and vitamin C additively attenuate age-related skin atrophy in *Sod1*-deficient mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1212-1220 (2014).

Sunagawa, T., Shimizu, T., Matsumoto, A., Tagashira, M., Kanda, T., Shirasawa, T., Nakaya, H. Electrophysiological alterations in the heart of heart/muscle-specific Mn-superoxide dismutase-deficient mice. *BioMed. Res. Int.* 2014, 704291, (2014).

Morikawa, D., Itoigawa, Y., Nojiri, H., Sano, H., Itoi, E., Saijo, Y., Kaneko, K., Shimizu, T. Contribution of oxidative stress to the degeneration of rotator cuff entheses. *J Shoulder Elbow Surg.* 23, 628-635 (2014).

### 2. 学会発表

Koutaro Yokote, Takahiko Shimizu, Akira Shimamoto and Minoru Takemoto. Progeroid syndrome as a model of aging-related metabolic disorders. 第 37 回日本分子生物学会年会@横浜、2014.11.25-27.

澁谷修一、小澤裕介、横手幸太郎、清水孝彦。  
Pd ナノコロイドは Pt ナノコロイドの酸化劣化  
を抑制する。第 37 回日本分子生物学会年会@  
横浜、2014.11.25-27.

渡辺憲史、澁谷修一、小澤裕介、横手幸太郎、  
清水孝彦。SOD1 欠損は p53 過剰亢進と細胞死  
を誘導する。第 37 回日本分子生物学会年会@  
横浜、2014.11.25-27

泉尾直孝、久米利明、村上一馬、入江一浩、  
泉安彦、赤池昭紀、横手幸太郎、清水孝彦。  
アルツハイマー病病理に関連するアミロイド  
 $\beta$  の「毒性コンホマー」および「非毒性コンホ  
マー」の同定。第 37 回日本分子生物学会年会@  
横浜、2014.11.25-27

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等政策研究事業)

分担研究報告書

糖尿病多発神経障害における足趾運動機能と身体バランスに関する研究

奈良県立医科大学 整形外科<sup>1)</sup> 奈良県立医科大学附属病院 リハビリテーション部<sup>2)</sup>

富和清訓<sup>1)</sup> 田中秀和<sup>2)</sup> 谷口晃<sup>1)</sup> 田中康仁<sup>1)</sup>

研究要旨

日常生活動作 (ADL) において足趾機能は重要であるが、適切な評価法が確立されていない。ウェルナー症候群では高率に糖代謝異常を合併することが知られている。そこで足趾機能の評価法を確立する目的で、まず糖尿病多発神経障害 (DP) 患者を対象に調査した。対象は DP を有する患者 44 名(以下 DP 群)、DP を有しない患者 54 名(以下 DP なし群)、健常者 34 名で足関節並びに足趾筋力と足部柔軟性や可動域、そして身体バランスを計測した。結果、DP 群は足部の筋力や足関節可動域、足部柔軟性、さらには身体バランスが DP なし群や健常者に比べ低下していた。DP 群では足部の力を効果的に床面に伝達することが難しい状態となっており、バランスの低下も生じていた。今回考案した方法で、足趾機能の評価が可能であることが分かった。

A. 研究目的

ウェルナー症候群では足趾機能の低下が日常生活機能の低下に関与している可能性が考えられる。ウェルナー症候群では高率に糖代謝異常を合併することが知られており、足趾機能の評価法を確立する目的で、まず今回は患者数の多い DP 症例を対象に検討した。DP は一般に知覚障害から発症し、進行とともに自律神経障害、運動機能障害へ進行していく。そして運動機能障害は下肢の筋力低下、足関節や足趾の可動域制限、足趾の変形の原因になるとされている。以前から糖尿病患者と転倒の関連性が報告されており、これは ADL の低下に直接関連する。DP の有無での運動機能に対する比較検討がなされていない。DP による ADL の低下を足部、足趾機能とバランス能力の方向から考えることで、DP の有無が足部に与える影響について検討する。

B. 研究方法

当院通院中の2型糖尿病でDPを有する患者44名(以下DP群) (男性32名、女性12名)、2型糖尿病でDPを有さない患者54名(以下DPなし群) (男性32名、女性22名)。対照として健常者34名 (男性20名、女性14名) について調査した。平均年齢はそれぞれ67±12歳 (40-85)、61.7±11.9歳 (43-73)、62.4±7.3歳 (43-75) であり、日常生活が可能で連続して約500m以上歩行可能な者を対象とした。等尺性足関節背屈筋力並びに底屈筋力、足趾把持筋力、母趾圧迫力、足部柔軟性、足関節可動域(背屈・底屈)、ファンクショナルリーチ、開眼片足立ち時間を計測した(図1~5)。DPの有無については糖尿病性神経障害を考える会の診断基準を用いて判断した。

(データの解析)

統計解析としてANOVAと、その後の多重比較にはTukey 補正検定を用い、有意水準 $p < 0.05$  の場合に有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究は当大学の倫理委員会にて審議され承認されたものであり、全対象者に本研究の主旨と内容を十分説明し、書面にて同意を得たうえで調査を行った。

### C. 結果

DP群は足部の筋力や足関節可動域、足部柔軟性、さらには身体バランスがDPなし群や健常者に比べ低下していた(図6~12)。今回の結果からDP群では足部の力を効果的に床面に伝達することが難しい状態となっており、バランスの低下も生じていた。(図13,14)

### D. 考察

Andersen [1]は膝関節屈筋群で 14%、足関節背屈筋群で 17%、底屈筋群で 14%の筋力低下を認め、それらは神経障害の程度と関連していると報告しているが、足趾機能に関しては検討されていない。今回の我々の研究では健常者と比較して足関節背屈筋力は 45%、底屈筋力は 39%低下しており、足趾把持筋力や母趾圧迫力もそれぞれ 53%と母趾圧迫力 57%低下していた。この方法で足趾機能の評価が可能であることが分かった。

今回の結果では DP 群における動的、静的バランスが DP なし群や健常者と比較して低下していた。末梢神経障害を有する糖尿病患者では転倒頻度が高いという報告もあり[2][3]、DP の評価は転倒予防の目的からも重要である。

#### 図 説明



図 1 足関節背屈力測定 センサーパッドが母趾中足骨頭背側にかかるよう調節し計測する



図 2 足関節底屈力測定 センサーパッドが母趾中足骨頭底側にかかるように調節し計測する。

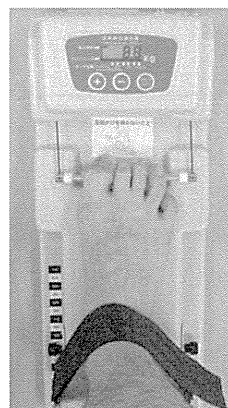


図 3 足趾把持力測定 母趾の末節骨を中心に第 2~4 足趾が可能な限り足趾把持バーにかかるよう調節し計測する。

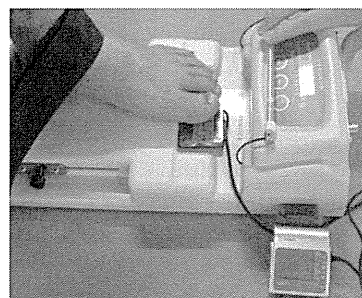


図 4 母趾圧迫力測定 足趾把持訓力測定器に足を乗せた状態にて母趾の基節骨と末節骨がセンサーパッドに乗るようにして計測する。

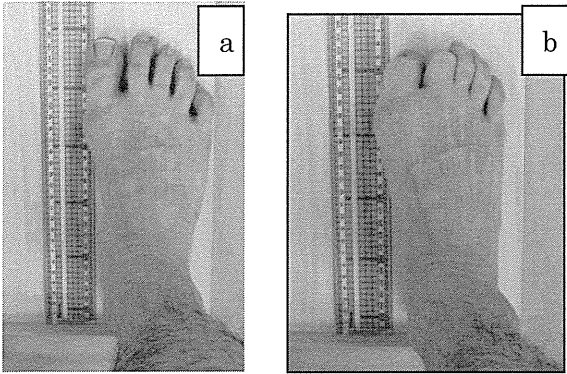


図5 足部柔軟性測定 膝関節 90° 屈曲位で端座位をとらせて測定させた足長(a)に対する足趾最大屈曲での踵部からの趾尖部までの距離(b)の比として計測する。

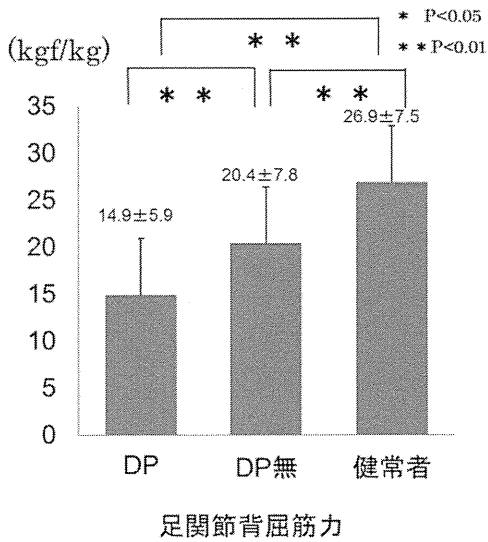


図6 足関節背屈筋力結果

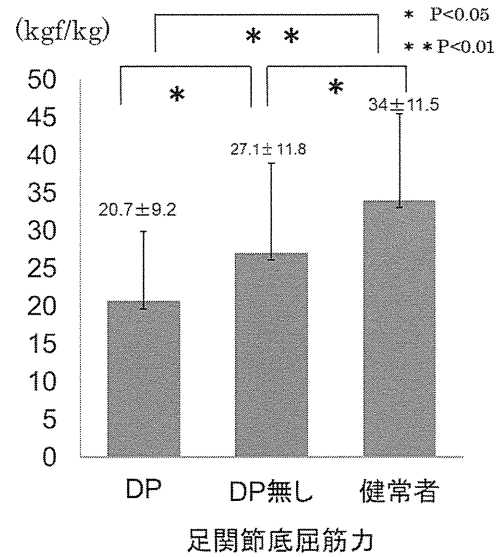


図7 足関節底屈筋力結果

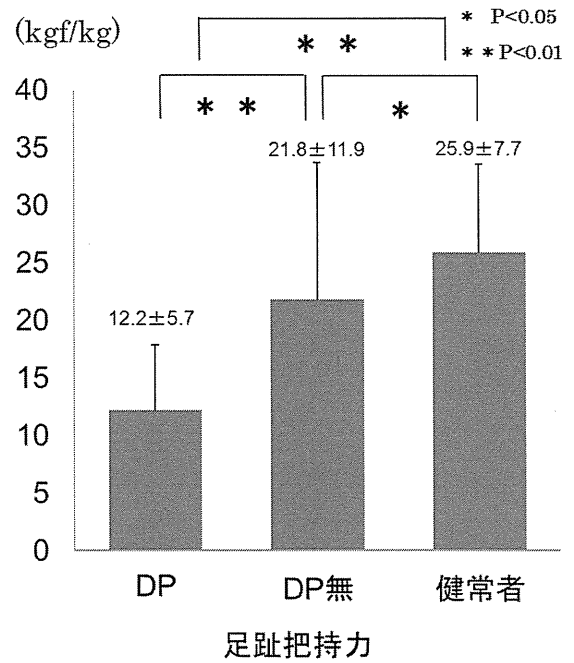


図8 足趾把持力結果



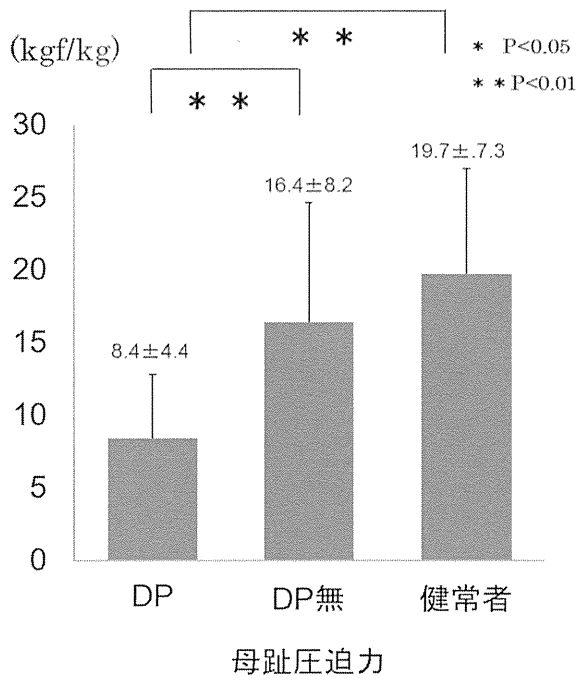


図9 母趾圧迫力結果

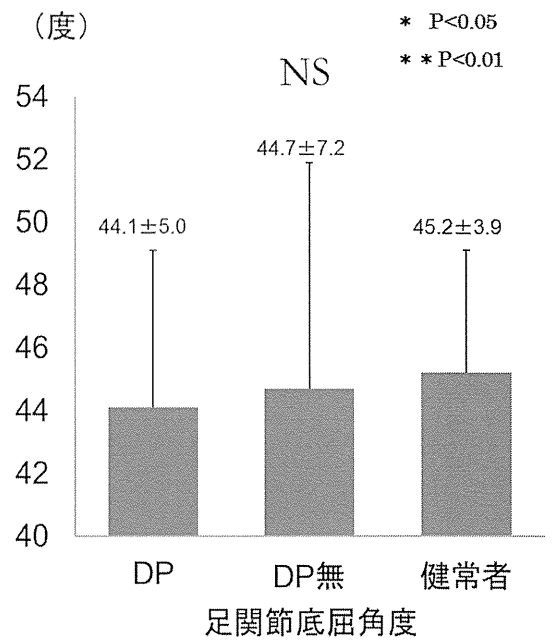


図11 足関節底屈角度結果

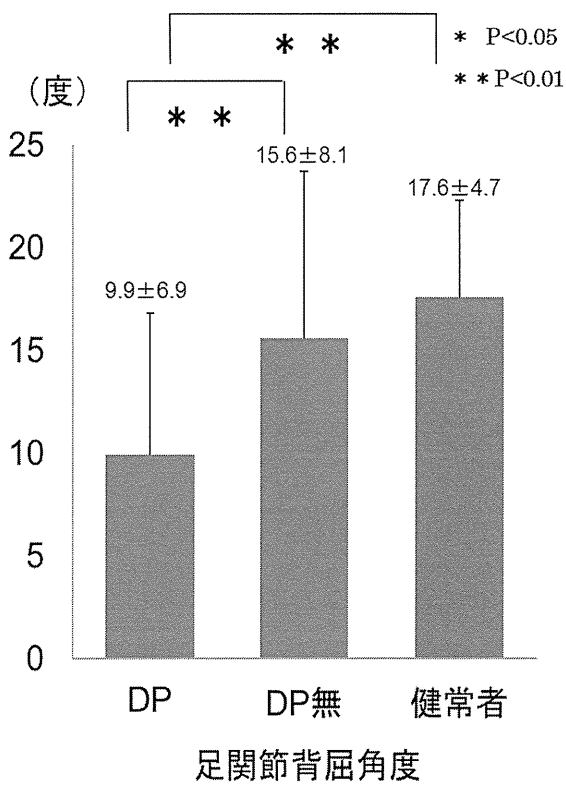


図10 足関節背屈角度結果

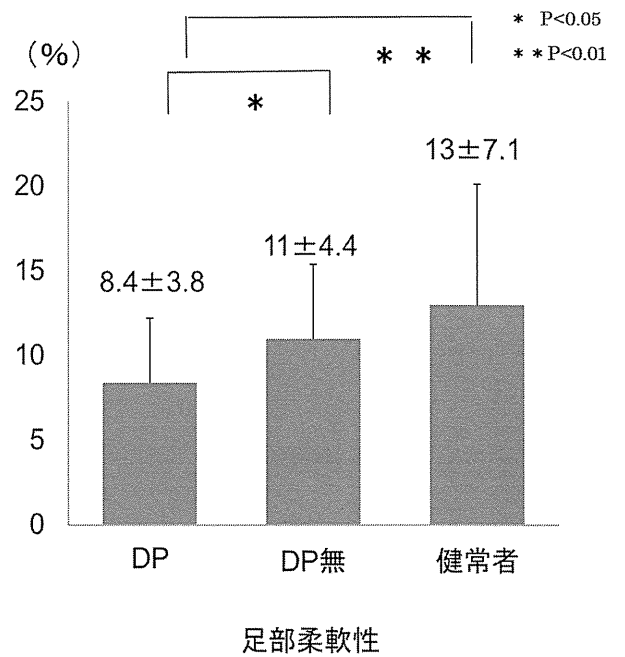


図12 足部柔軟性結果

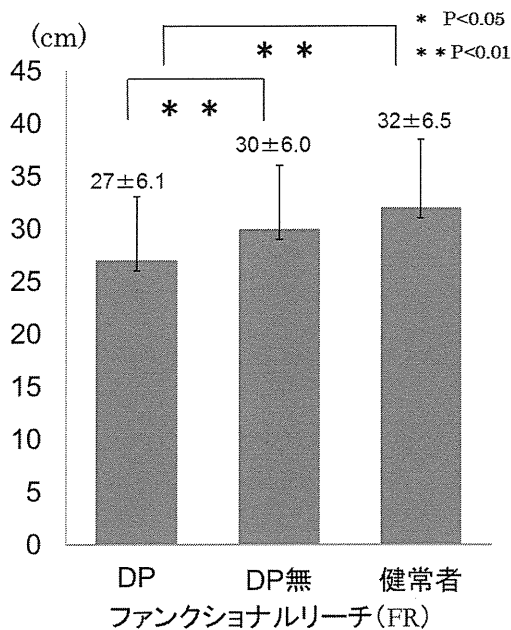


図 13 ファンクショナルリーチ結果

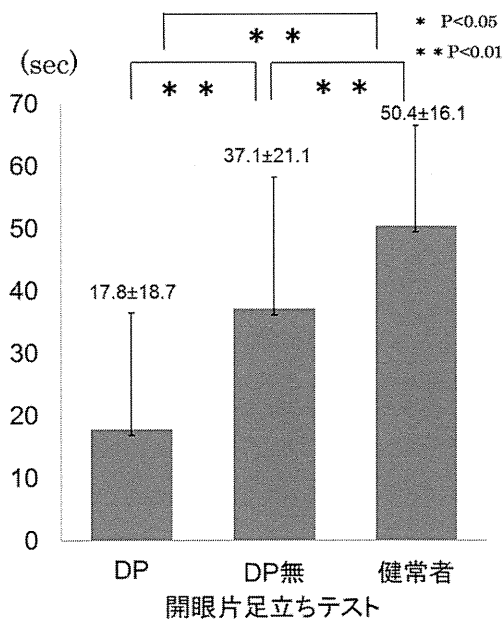


図 14 開眼片脚立ち結果

文献

1. Andersen H, Nielsen S, Mogensen CE, Jakobsen J. Muscle strength in type 2 diabetes. *Diabetes. United States* 2004;1543-8.
2. 荒木厚 千. 高齢者糖尿病における転倒,および転倒リスクの研究. 厚生労働省 2011: 52-8.
3. Macgilchrist C, Paul L, Ellis BM et al. Lower-limb risk factors for falls in people with diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2010; 27: 162-8.

E. 結論

糖尿病患者、特に DP を有する患者では、早期から足部、足関節の筋力や柔軟性、バランス能力を評価し、維持することは點頭防止の観点からもきわめて重要である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
分担研究報告書

ウェルナー症候群に合併する脂肪肝に対するアスタキサンチンの効果に関する検討

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  
三木 哲郎 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授  
籠持 淳 獨協医科大学・皮膚科学 教授  
佐藤 兼重 千葉大学大学院医学研究院・形成外科学 教授

研究要旨

ウェルナー症候群では高率に脂肪肝を合併する。しかしながら、その原因ならびに治療方法は未確立である。アスタキサンチンは藻の一種である *Haematococcus pluvialis* から抽出された抗酸化作用を有する天然カオテノイドであり機能性食品として市販され、抗酸化作用に加え、抗炎症、脂質の過酸化抑制作用を有し、糖尿病、心血管病、がんなどに対し多彩な作用を有することが報告されている。今回、脂肪肝合併ウェルナー症候群に対するアスタキサンチン（アスタノール® 12mg/日）を3か月投与した結果、肝酵素の改善と腹部CT上の脂肪肝改善が得られた症例を経験した。アスタキサンチンはウェルナー症候群に観察される脂肪肝に対し有効な機能性食品となる可能性がある。

A. 研究目的

ウェルナー症候群（Werner syndrome: WS）は早老症の代表的疾患である。最初に現れる臨床所見は思春期成長スパートの欠如であり、その後、皮膚の萎縮、硬化、部分的な皮下脂肪の喪失、白髪や禿頭などの毛髪の変化、白内障などの老化徴候が出現し、糖尿病(1)、動脈硬化(2)、悪性腫瘍(2)などを高率に合併する。また、多くの WS 患者が非アルコール性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD）を合併することが報告されているが(2)、その原因や治療法は未確立である。一般的に、NAFLD の発症にはインスリン抵抗性や酸化ストレスの亢進が関与することが推察されている。本研究は抗酸化作用を有する機能性食品である天然カオテノイ

ド アスタキサンチンの WS に合併した肝脂肪に対する効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

【症例】58歳 女性

【主訴】両側足底部潰瘍の原因精査

【現病歴】平成20年から両側足潰瘍が出現し、近医にて治療開始。平成23年9月には難知性の右足アキレス腱潰瘍に対して皮弁術が施行された。平成23年11月、難知性潰瘍の原因精査目的に当科紹介となった。

【既往歴】16歳 肺結核、36歳 両側白内障手術、57歳 脳髄膜腫手術

【家族歴】父に脳梗塞、母に糖尿病、両親 いとこ婚

【嗜好】酒、たばこなし

【生理】初潮 14歳、閉経 51歳

妊娠歴：妊娠2回、出産2回（出生体重2700g、2900g、共に男児）

【薬剤】テルミサルタン 40mg、アトルバスタチン 5mg

【経過】本症例は早老性毛髪変化（白髪、禿頭）（図1 A）、両側白内障、皮膚の萎縮硬化、難治性潰瘍、アキレス腱の石灰化（図1 B）、鳥様顔貌（図1 A）と、ウェルナー症候群診断基準 2012の主要徴候を認め(3)、さらに遺伝子検査でも Mut6 (c1105 C>T) であり、ウェルナー症候群と診断した。飲酒の既往歴はないが、腹部 CT では内臓脂肪面積 111cm<sup>2</sup> と内臓脂肪蓄積と高度の脂肪肝が観察され、血液検査では AST 41mg/dL、ALT 75mg/dL と ALT 優位の肝機能障害と総コレステロール 222mg/dL、中性脂肪 219mg/dL、HDL コレステロール 60mg/dL と脂質異常症や空腹時血糖値 84mg/dL、インスリン値 35.1 IU/mL、HOMA-R 7.3 とインスリン抵抗性を認めた。当科受診後、食事療法にて肝機能障害、中性脂肪を経過観察するも、肝脂肪の改善なく、患者の同意を得て抗酸化作用を有する機能性食品である、アスタキサンチン（アスタノール® 12mg/日）を内服開始し、その臨床効果を観察することにした。

#### C. 研究結果

アスタキサンチンを投与前、投与3か月、投与6か月後に採血ならびに腹部 CT にて評価した。アスタキサンチン投与による有害事象は生じなかった。結果、腹部 CT 画像上、肝脂肪の改善（肝臓/脾臓比 前 0.41、投与3か月 0.71、投与6か月 0.94 Hounsfield units）が観察され（図1 C）、血液検査においても ASL、ALT 値に改善がみられた（表1）。その他、高感度 CRP、酸化 LDL（マロンジアルデヒド修飾 LDL）、血中ヒアルロ

ン酸値には大きな変化を認めなかった。

#### D. 考察

脂肪肝は良性の疾患として捉えられてきたが、一部の症例では脂肪の沈着とともに肝臓において炎症や線維化が進行し、肝硬変や肝細胞がんを引き起こし、必ずしも良性の疾患ではないことが近年明らかとなった。脂肪性肝疾患とは肝細胞に中性脂肪が蓄積する疾患の総称であるが、本症例のように明らかに飲酒歴がない脂肪性肝疾患は非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) と呼ばれ、単に脂肪が沈着している単純性脂肪肝と脂肪沈着に伴い炎症や線維化が生じる脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に大きく分けられる。

NASH の原因は明らかではないが、古典的にはインスリン抵抗性に伴う肝脂肪の蓄積 (first hit) に引き続き生じる酸化ストレス (second hit) の亢進が肝における炎症や線維化を引き起こす「two-hit theory」が提唱された(4)。近年の研究によると、肝細胞のミトコンドリアの ATP 産生障害、ミトコンドリア由来のグルタチオン産生低下、肝血流障害による低酸素、脂肪細胞由来のアディポサイトカインの分泌異常等の多因子が同時に生じ NASH の進行に関与すると考えられている(5)。NASH 発症に関する様々な要因の中でも、脂肪摂取量の増加、de novo の脂肪合成亢進、インスリン抵抗性増大による脂肪細胞の脂肪分解による大量の遊離脂肪酸 (FFA) の肝臓への流入が NASH の発症に重要と考えられている。大量の FFA はセラミド、ジアシルグリセロール、リゾフォスファチジル コリン、酸化コレステロールなど毒性の強い脂質代謝産物へと変換され、活性酸素 (Reactive Oxygen Species、ROS) の産生に寄与し、肝細胞障害に関与すると考えられる(脂

肪毒性: lipotoxicity)。

WS患者の50%に脂肪肝を合併することや(6)(7)、NASHの合併率も高いことも報告されている(8)。WS患者では内臓脂肪蓄積に伴うインスリン抵抗性や、アディポサイトカインの分泌異常(9)、さらにWS細胞由来の線維芽細胞ではROS消去系であるsuperoxide dismutase活性低下に伴う酸化ストレスの亢進が報告されており(10)、それぞれがWSにおける脂肪肝やNASHの発生に関与することが推察される。

アスタキサンチンは藻の一種であるHaematococcuspluvialisから抽出された抗酸化作用を有する天然カオテノイドであり(11)機能性食品として市販されている(アスタノール®富士薬品)。アスタキサンチンは分子構造上、両端に水酸基を伴ったβ-イオン環を有し(12)、ルテインやベータカロテンの10倍、α-トコフェノールの100倍の抗酸化作用を発揮することが報告されている。その生物学的作用は抗酸化作用に加えて、抗過酸化脂質作用、抗炎症作用などが報告され、糖尿病、心血管病、がんに対する効果の報告もある(13)。これまでアスタキサンチンの肝臓に対する作用としては、マウスに投与することにより、肝細胞における小胞体ストレスやnuclear factor-kappa B依存性の炎症を抑制することが報告されている(14)。しかし、ヒトの脂肪肝に関する報告はなかった。我々の今回の検討によって、アスタキサンチンはWS患者にける脂肪肝に有用な可能性が示唆された。しかしながら、アスタキサンチン投与前後における抗炎症、抗酸化マーカーの変化は観察されず、有効性のメカニズムは不明である。今後、さらに多くのWS患者や非WS患者に観察される脂肪肝に関する効果を検証し、その作用メカニズムを検討する必要がある(15)。

### E. 結論

アスタキサンチンはWS患者の脂肪肝に有効である可能性がある

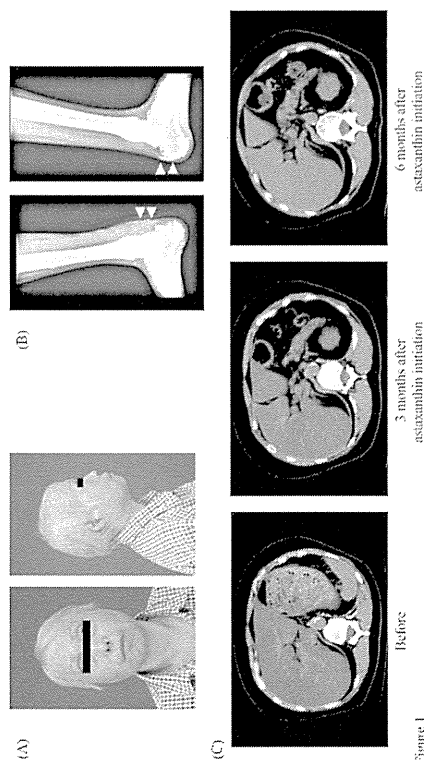


図1

検査項目	単位	投与前	投与6カ月
TP	mg/dL	8.3	8.8
ALB	mg/dL	4.6	4.6
GOT	IU/L	40	20
GPT	IU/L	69	34
GGT	IU/L	38	35
ChE	IU/L	360	331
LDH	IU/L	226	213
UA	mg/dL	6.2	6.4
血糖	mg/dL	93	88
A1c	%	6.1	6.4
TC	mg/dL	149	170
LDLC	mg/dL	82	89
TG	mg/dL	102	122

HDL	mg/dL	55	60
non-HDL	mg/dL	94	110
Apo-A1	mg/dL	148	139
Apo-A2	mg/dL	28.2	26.5
Apo-B	mg/dL	71	86
Apo-C2	mg/dL	3.1	3.9
Apo-C3	mg/dL	8.7	11
Apo-E	mg/dL	3	3.5
MDA-LDL	U/L	138	133
ヒアルロン酸	ng/mL	50	48
CRP	mg/dL	0.2	3.3
HS-CRP	ng/mL	1690	7770
▽チン	ng/mL	38.5	45.8

表 1

#### 参考文献

1. Mori S, Murano S, Yokote K, Takemoto M, Asami S, Take A, Saito Y: Enhanced intra-abdominal visceral fat accumulation in patients with Werner's syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:292-295, 2001
2. 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:e83, 2012
3. 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 Gerontol Int* 13:475-481, 2012
4. Day CP, James OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-845, 1998
5. Peverill W, Powell LW, Skoien R: Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci* 15:8591-8638, 2014
6. 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* 60:997-998, 2012

7. Mori S, Morisaki N, Murano S, Shirai K, Satio Y, Yoshida S: [Fatty liver as a complication of patients with Werner's syndrome]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 25:626-631, 1988
8. Hashizume H, Sato K, Takagi H, Kanda D, Kashiwara T, Kiso S, Mori M: Werner syndrome as a possible cause of non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Pathol* 62:1043-1045, 2009
9. 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* 27:2562-2563, 2004
10. Goto M, Iwaki-Egawa S, Watanabe Y: Ageing in Werner syndrome. *Biosci Trends* 6:33-37, 2012
11. Zhang J, Sun Z, Sun P, Chen T, Chen F: Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food Funct* 5:413-425, 2014
12. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H: Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 69:443-449, 2006
13. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswath anarayana RG: Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Mar Drugs* 12:128-152, 2014
14. Bhuvaneshwari S, Yogalakshmi B, Sreeja S, Anuradha CV: Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor-kappaB-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice. *Cell Stress Chaperones* 19:183-191, 2014
15. Takemoto M, Yamaga M, Furuichi Y, Yokote K: Astaxanthin improved non-alcoholic fatty liver disease in Werner syndrome with diabetes *J Am Geriatr Soc* in press

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

竹本 稔

1. Takemoto M, Yamaga M, Furuichi Y, Yokote K (2015) Astaxanthin improved non-alcoholic fatty liver disease in Werner syndrome with diabetes. *J Am Geriatr Soc.*

in press

2. Sakamoto S, Kuno K, Takemoto M, He P, Ishikawa T, Onishi S, Ishibashi R, Yamaga M, Kobayashi K, Kawamura H, Tokuyama H, Maezawa Y, Yokote K (2015) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects glomerular podocytes from inflammatory injuries. *J Diabetes Res* in press
3. Ishibashi R, Nakamura S, Takemoto M, Mukai C, Yokote Y (2015) *Helicobacter cinaedi* infection in patients with diabetes: A Case report. Springerplus. in press
4. Hayashi A, Takemoto T, Shoji M, Hattori A, Sugita K, Yokote K (2015) Pioglitazone improves fat tissue distribution and hyperglycemia in a case of Cockayne syndrome with diabetes. *Diabetes Care*. in press
5. Yokoh H, Kobayashi K, Sato Y, Takemoto M, Uchida D, Kanatsuka A, Kuribayashi N, Terano T, Hashimoto N, Sakurai K, Hanaoka H, Ishikawa K, Onishi S, Yokote K; SUCCESS Study Group. (2015) Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin compared with alpha-glucosidase inhibitor in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin or pioglitazone alone (SUCCESS-1): a multicenter, randomized, open-label, non-inferiority trial. *Journal of Diabetes Invest*,6(2):182-191.
6. Toda N, Ihara K, Takemoto M, Yokote K, Hara T. (2014) Endocrine and metabolic abnormalities in a girl with childhood Werner syndrome: case report. *J Am Geriatr Soc*. 62:1404-1405.
7. Oshitari T, Kitahashi M, Mizuno S, Baba T, Kubota-Taniai M, Takemoto M, Yokote K, Yamamoto S, Roy S. (2014) Werner syndrome with refractory cystoid macular edema and immunohistochemical analysis of WRN proteins in human retinas. *BMC Ophthalmol*. 14:31.
8. Kobayashi K, Yokoh H, Sato Y, Takemoto M, Uchida D, Kanatsuka A, Kuribayashi N, Terano T, Hashimoto N, Sakurai K, Hanaoka H, Ishikawa K, Onishi S, Yokote K; SUCCESS Study Group. (2014) Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin compared with alpha-glucosidase inhibitor in Japanese patients with T2DM inadequately controlled on sulfonylurea alone (SUCCESS-2): a multicenter, randomized, open-label, non-inferiority trial. *Diabetes Obes Metab*,16:761-765

#### 籾持 淳

1. Inokuchi R, Kurata H, Endo K, Kitsuta Y, Nakajima S, Hatamochi A, Yahagi N: Vascular ehlers-danlos syndrome without the characteristic facial features: a case report. *Medicine*, in press, 2014.
2. 池田芳紀, 丸山春子, 古庄知己, 籾持 淳, 石田時一: 分娩中に自然子宮破裂を發症した血管型 Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. *日本周産期・新生児医学会雑誌*, 50 卷 3 号 Page1088-1094 (2014.09).

3. 滝口寛人, 安達優真, 原 靖果, 沼倉忠久, 浅野浩一郎, 籠持 淳, 松浦圭文: 繰り返す血痰と移動性肺野陰影を認めた血管型エーラス・ダンロス症候群の1例. 日本呼吸器学会誌, 3巻3号 Page414-417 (2014.05).

佐藤 兼重

1. Mitsukawa N, Morishita T, Saiga A, Omori N, Kubota Y, Akita S, Satoh K. A Case of Crouzon Syndrome Treated by Simultaneous Bimaxillary Distraction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 67: 24-25, 2014.
2. Mitsukawa N, Shimokawa S, Saiga A, Satoh K. Reduction Cranioplasty for Macrocephaly Caused by Giant Occipital Cystic Lesion. *J Craniofac Surg*, 25: e74-76, 2014.
3. Mitsukawa N, Moriyama H, Shiozawa K, Satoh K. Study on distribution of terminal branches of the facial nerve in mimetic muscles (orbicularis oculi muscle and orbicularis oris muscle). *Ann Plast Surg*, 72:71-74, 2014.
4. Mitsukawa N, Saiga A, Morishita T, Satoh K. Special distraction osteogenesis before bone grafting for alveolar cleft defects to correct maxillary deformities in patients with bilateral cleft lips and palates: distraction osteogenesis performed separately for each bone segment. *J Cranio-Maxillofac Surg*, 42: 623-628, 2014.
5. Mitsukawa N, Saiga A, Satoh K. Changing the Facial Features of Patients with Treacher Collins Syndrome: Protocol for Three-Stage Treatment for Hard- and Soft-Tissue Hypoplasia in the Upper Half of the Face. *Ann Plast Surg*, 73:39-42, 2014.
6. Mitsukawa N, Saiga A, Satoh K. Protocol of surgical indications for scar contracture release before childbirth: Women with severe abdominal scars after burn injuries. *J Plast Surg Hand Surg*. 2014.
7. Mitsukawa N, Kubota Y, Akita S, Saiga A, Satoh K. Postsurgical fixation of a buried penis. *J Plast Reconstr Aesth Surg*. in press, 2014.
8. Mitsukawa N, Kubota Y, Akita S, Hasegawa M, Saiga A, Satoh K. Urethroplasty using Diverticular Tissue for Hypospadias. *Lower Urinary Tract Symptoms*. in press, 2014.
9. Kubota Y, Mitsukawa N, Uchida M, Uchida Y, Akita S, Hasegawa M, Satoh K. Low Level Mesodermal Somatic Mutation Mosaicism: Late-onset Craniofacial and Cervical Spinal Hyperostoses. *American Journal of Medical Genetics*, 164:741-747, 2014.
10. Kubota Y, Mitsukawa N, Akita S, Hasegawa M, Satoh K. Postoperative Patency of the Retrograde Internal Mammary Vein Anastomosis in Free Flap Transfer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 67:205-211,2014.
11. Satoh K, Mitsukawa N. Mandibular Marginal Contouring in Oriental



Aesthetic Surgery: Refined Surgical Concept and Operative Procedure. Ann Plast Surg, 72:498-502, 2014.

12. Akita S, Mitsukawa N, Kuriyama M, Hasegawa M, Kubota Y, Tokumoto H, Ishigaki T, Hanaoka H, Satoh K. Suitable therapy options for sub-clinical and early-stage lymphoedema patients. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 67:20-525, 2014.
13. Satoh K, Mitsukawa N, Abe T. Is prophylactic decompression of the optic canal necessary in surgical correction of fronto-orbital fibrous dysplasia?:A review of 11 consecutive cases. J Craniomaxillofac Surg, 1614-1616, 2014.

## 2. 学会発表

1. 石橋亮一、竹本稔、黒田正幸、小川真、若林華恵、鶴谷悠也、服部暁子、茂手木宏美、渡邊亜紀、横手幸太郎 (2014) 抗 LCAT 抗体により低脂血症とネフローゼ症候群をきたした 1 例。(ポスター発表) 第 24 回臨床内分泌代謝 Update、11 月 29 日、大宮。
2. 北原綾、徳山宏丈、松本淳子、野本尚子、服部暁子、竹本稔、横手幸太郎 (2014) 肥満症患者における心理的特徴の検討。(ポスター発表) 第 35 回日本肥満学会、10 月 24 日、宮崎。
3. 大原恵美、徳山宏丈、北本匠、服部暁子、出口ハンナ、北原綾、竹本稔、林秀樹、横手幸太郎 (2014) 高度肥満の成長ホルモン分泌に対する影響。(ポスター発表) 第 35 回日本肥満学会、10 月 24 日、宮崎。
4. 山賀政弥、河村治清、竹本稔、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、石川崇広、石橋亮一、賀鵬、坂本憲一、服部暁子、正司真弓、横手幸太郎 (2014) 粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析。第 29 回日本糖尿病合併症学会、10 月 4 日、東京。
5. 正司真弓、小林一貴、竹本稔、佐藤泰憲、河村治清、徳山宏丈、石川崇広、石橋亮一、平山吉朗、花岡英紀、原正則、横手幸太郎 (2014) 糖尿病腎症における尿中ポドカリキシンと各種病態指標との前向き検討。第 29 回糖尿病合併症学会、10 月 3 日、東京。
6. 前澤善朗、竹本稔、井出真太郎、井出佳奈、Tuncer Onay, Rizaldy Scott, Susan E. Quaggin、横手幸太郎 (2014) ポドサイトにおける転写因子 Tcf21 の欠損は糖尿病性腎症の増悪をもたらす。第 29 回糖尿病合併症学会、10 月 3 日、東京。
7. 坂本憲一、竹本稔、久野響子、石川崇広、石橋亮一、賀鵬、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、横手幸太郎 (2014) DPP-4 基質である脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) のポドサイトでの抗炎症作用に関する検討。第 29 回糖尿病合併症学会、10 月 3 日、東京。
8. 坂本憲一、竹本稔、久野響子、石川崇広、大西俊一郎、石橋亮一、賀鵬、正司真弓、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、横手幸太郎 (2014) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) のポドサイトにおける抗炎症作用に関する検討。(ポスター発表) 第 46 回日本動脈硬化化学会総会・学術集会、7 月 11 日、東京。
9. 山賀政弥、河村治清、竹本稔、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、石川崇広、石橋亮一、賀鵬、坂本憲一、服部暁子、正司真弓、横手幸

- 太郎 (2014) 粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析。(ポスター発表) 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、7月10日、東京。
10. 北原綾、徳山宏丈、松本淳子、野本尚子、服部暁子、竹本稔、横手幸太郎 (2014) 肥満症患者における心理的特徴の検討。(ポスター発表) 第 32 回日本肥満症治療学会学術集会、7月5日、滋賀。
  11. 大原恵美、林愛子、熊谷仁、竹本稔、林秀樹、松原久裕、横手幸太郎 (2014) Metabolic Surgery ～手術療法の諸問題、コンセンサスをめざして～手術適応基準を考える～内科的観点から～。第 32 回日本肥満症治療学会学術集会、7月5日、滋賀。
  12. 蓬田沙織、正司真弓、山賀政弥、千葉瑞季、加藤陽子、藤岡優子、烏祐香里、野本尚子、木村厚子、天田祐子、北原綾、徳山宏丈、竹本稔、横手幸太郎 (2014) 多職種介入により全介助から社会復帰にまで至った高度肥満患者の一例。(ポスター発表) 第 32 回日本肥満症治療学会学術集会、7月4日、滋賀。
  13. 山賀政弥、林愛子、徳山宏丈、服部暁子、小林一貴、竹本稔、北原綾、茂手木宏美、野本尚子、櫻井健一、林秀樹、横手幸太郎 (2014) 2 型糖尿病を合併した高度肥満高齢者に対して肥満外科治療を施行した一例。(ポスター発表) 第 32 回日本肥満症治療学会学術集会、7月4日、滋賀。
  14. 北本匠、小林一貴、横尾英孝、佐藤泰憲、竹本稔、内田大学、金塚東、栗林伸一、櫻井健一、寺野隆、橋本尚武、花岡英紀、石川耕、大西俊一郎、横手幸太郎、SUCCESS 研究グループ (2014) インスリン抵抗性改善薬投与中の高齢 2 型糖尿病患者へのシタグリプチン追加による血糖改善効果の検討。第 56 回日本老年医学会学術集会 シンポジウム 5、6月13日、福岡。
  15. 山賀政弥、河村治清、竹本稔、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、石川崇広、大西俊一郎、石橋亮一、賀鵬、北本匠、坂本憲一、服部暁子、正司真弓、横手幸太郎 (2014) 粥状動脈硬化形成における Semaphorin 3G の機能解析。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪。
  16. 前澤善朗、Tuncer Onay, Rizaldy Scott, Lindsay Keir, Henrik Dimke, 竹本稔、横手幸太郎、Susan Quaggin (2014) ポドサイトにおける Tcf21 の欠損は糖尿病性腎症の増悪をもたらす。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪。
  17. 石橋亮一、竹本稔、秋元義弘、河村治清、小林一貴、大西俊一郎、石川崇広、賀鵬、Betsholtz Christer (2014) ポドサイト分泌タンパク Semaphorin3g の糸球体における機能解析。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪。
  18. 坂本憲一、竹本稔、久野響子、石川崇広、大西俊一郎、石橋亮一、賀鵬、北本匠、服部暁子、正司真弓、山賀政弥、河村治清、小林一貴、徳山宏丈、前澤善朗、横手幸太郎 (2014) 神経伝達因子 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)のポドサイトにおける抗炎症作用に関する検討。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪。
  19. 服部暁子、徳山宏丈、山賀政弥、正司真弓、坂本憲一、北本匠、石橋亮一、石川崇広、大西俊一郎、前澤善朗、河村治清、小林一貴、島田典生、竹本稔、横手幸太郎 (2014) DPP-4 阻害剤はマクロファーシ/単球活性化マーカー可溶性 CD163 を抑制する。第 57 回日本

糖尿病学会年次学術集会、5月24日、大阪。

20. 横尾英孝、小林一貴、佐藤泰憲、竹本稔、内田大学、金塚東、栗林伸一、櫻井健一、寺野隆、橋本尚武、花岡英紀、石川耕、大西俊一郎、横手幸太郎、SUCCESS 研究グループ (2014) インスリン抵抗性改善薬投与中の2型糖尿病患者における追加投薬の肥満の有無による効果の検討 (SUCCESS-1 研究サブグループ解析)。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、5月23日、大阪。
21. 賀鵬、河村治清、小林一貴、徳山宏文、石川崇広、大西俊一郎、石橋亮一、岡部恵見子、坂本憲一、山賀政弥、北本匠、服部暁子、正司真弓、竹本稔、横手幸太郎 (2014) 腎糸球体ポドサイトにおけるシロスタゾール/プロブコールの相加的抗炎症メカニズム。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、5月23日、大阪。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
分担研究報告書

Werner 症候群の診断基準及び重症度分類について  
—— 症例からの考察 ——

研究分担者 福島県立医科大学会津医療センター 糖尿病・代謝・腎臓内科学講座  
塚本 和久

研究要旨

Werner 症候群症例の病歴・経過・現在の病状を鑑み、Werner 症候群の診断基準項目に挙げられている各種疾病の特徴について考察するとともに、本研究課題で作成中の重症度分類について考察を行った。その結果、Werner 症候群の糖尿病は内臓脂肪肥満に伴う筋肉におけるインスリン抵抗性が重要な因子であることが示唆されるとともに、研究グループで議論・推敲した重症度分類は現在までの本患者の病歴を鑑みて、適切なものであると考えられた。そして、Werner 症候群を難病に指定し、重症度分類 3 度以上のものに対する公費負担を速やかに推進することが必要と考えられた。

A. 研究目的

Werner 症候群は DNA ヘリカーゼの異常により発症する非常にまれな遺伝性疾患である。そして、稀な疾患ではあるが、日本人での症例報告が約 8 割を占めており、人種的に見て日本人での頻度が極めて高い。Werner 症候群の診断基準は、昭和 59 年に尾形班による診断の手引きが作成された後しばらく改訂されずに経過していたが、平成 21 年度から 23 年度の本研究主任研究者横手らによる全国調査に基づき、現在利用可能な検査法も取り入れて、2012 年、新たな診断基準が作成された。

診断基準にある通り、Werner 症候群は早老性顔貌や白内障、皮膚硬化・潰瘍に加え、糖尿病や脂質代謝異常、早発性の動脈硬化症、非上皮性悪性疾患などを合併する難治性疾患である。このように多彩な合併症を

呈する遺伝的疾患であるにもかかわらず、いまだ難病には指定されていない。Werner 症候群に合併する病態の中には、糖尿病などのように、薬物の進歩によりコントロールが比較的良好となる病態もあるが、そのコントロールには薬物・検査費用がかさむこととなる。また、肘や踵に生ずる難治性潰瘍はその疼痛により患者の生活の質を大きく左右するものであり、場合によっては下肢切断などの大きく QOL を低下させる状態となることもあり、かつ悪性疾患の母体となる可能性がある。

本分担研究では、現在経過を観察中の症例を鑑み、診断基準に挙げられている疾患、特に糖尿病の病態生理の考察、そして本課題の重点項目である重症度分類について考察する。