

Werner 症候群の脂質代謝異常および脂肪肝について

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（WS）12 症例の脂質代謝関連項目および脂肪肝に関する検討を行った。WS における脂質異常症の合併率は 73%と高率であったが、LDL-C 値・HDL-C 値・TG 値それぞれの管理目標値達成率は 91%、91%、82%と高く、また高リスク患者のすべてが LDL-C 値管理目標を達成していた。WS における脂肪肝合併率は 44%と、非常に高率であった。その臨床的特徴として、一般人における脂肪肝は肥満との関連が強いことが知られているが、WS での脂肪肝症例の BMI は平均 16.7（最大 17.80）であり、BMI 上昇を伴わずに異所性（肝臓）に脂肪が蓄積する病態を呈していることが明らかとなった。また、脂肪肝を有する者では HDL-C が低値、TG 値が高値と、動脈硬化惹起性の脂質異常症を呈することも判明した。

A. 研究目的

Werner 症候群（以下、WS）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。2012 年に WS の新診断基準が作成されたが、その診断基準にある通り、WS は老年性顔貌や白内障、皮膚硬化・潰瘍などの主要徴候に加え、早期に現れる動脈硬化症もその特徴の一つである。

動脈硬化症は悪性腫瘍と並んで WS 患者の 2 大死因である。動脈硬化症の中では冠動脈疾患と閉塞性動脈硬化症の発症頻度が WS で高いことが知られているが、後者は WS 患者の皮膚潰瘍を難治性とする一因と考えられる。WS における動脈硬化症の成因

は、分子メカニズムは未解明であるものの疾患特異的な早老現象に起因するところが大きいと考えられるが、WS に合併しやすい糖代謝異常・脂質代謝異常もその促進因子として作用していると考えられる。そして、このような代謝異常には、WS で高頻度に認められる脂肪肝（NAFLD）・内臓脂肪蓄積によるインスリン抵抗性が大きく寄与していると考えられる。また近年、NAFLD あるいは NASH からの肝細胞癌の全肝細胞癌に占める割合が一般人において上昇してきていることが報告されており、WS においてもその対応が重要となってくる。

本分担研究では、近年の WS 症例の脂質代謝関連項目および脂肪肝の実態について、横断的な検討を加えることとした。また、脂質異常症に関しては、研究分担者が保有

する 2011 年度の特定健診のデータベースの値との比較を行うことも目的とした。

B. 研究方法

千葉大学にて経過観察中の、2010 年以降（ほとんどの症例が 2014 年のもの）の脂質異常症および脂肪肝に関する詳細なデータが使用可能な 12 症例（男性 5 例、女性 7 例、平均年齢 50.1 ± 8.5 歳、39-60 歳）の WS を対象とした。臨床生化学データに関しては、データ採取時に悪性疾患の合併のない 11 症例（男性 4 例、女性 7 例、平均年齢 50.7 ± 8.6 歳、39-60 歳）を対象とした。脂質関連データ解析に関しては、脂質値およびアポ蛋白値について、各症例の背景（糖尿病、下肢潰瘍、閉塞性動脈硬化症、スタチン内服）別に検討を行うとともに、それぞれの値の相関関係などについて検討を行った。LDL-C 値は、Friedewald の式を用いて算出した。脂肪肝に関しては、肝機能データと腹部 CT による肝/脾 CT 値比が揃っている 9 症例での検討を行った。また、脂質異常症の管理状況に関しては、2011 年度の特定健診のデータ（総数 289,713 名）のうち、患者との年齢がほぼ同等である 40-59 歳の者（78,729 名）のデータとの比較を行った。データ解析には SPSS (versions 21.0 & 22.0) およびエクセル統計 2015 を用いた。

（倫理面への配慮）

本報告では、Werner 症候群を診療するにあたり必要であるデータを用いての検討を行った。また、患者の特定が不可能とするように解析者には連結不可能な状態でデータが供与され、個人情報流出を防ぐよう配慮された。

C. 研究結果

1. 患者背景

12 名の WS 患者のうち、糖尿病を合併している症例は 6 例（50%）、耐糖能異常を合併する症例は 1 例（8.3%）であった。一方、2011 年の 40-59 歳の特定健診受診者における糖尿病治療中の者の割合は、男性 4.6%、女性 2.3%であった。

下肢潰瘍を有する者は、12 例中 9 名（75%）であった。閉塞性動脈硬化症（PAD）を有する者は 3 名（25%）であり、PAD を有する症例はいずれの症例も糖尿病と下肢潰瘍を合併していた。心筋梗塞の既往のあるものはおらず、動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版の高リスクに該当する患者は 6 名（50%）であった。なお、2011 年の 40-59 歳の特定健診受診者における冠動脈疾患の既往のある者の割合は、男性 2.6%、女性 1.6%であり、脳血管障害の既往のある者の割合は男性 1.9%、女性 1.0%であった。

脂質異常症治療薬を内服している症例は 5 症例（42%）であり、すべての症例がストロングスタチン（アトルバスタチン、ロスバスタチン、ピタバスタチン）を内服していた。5 症例のうち 4 症例は高リスク病態に該当する症例であった。

2. 脂質代謝関連項目に関する検討

WS 患者 11 症例のうち、①スタチン内服中の患者、またはスタチン非内服でリスクに応じた LDL-C 管理目標値に達していないものが 6 例、②HDL-C 40 mg/dL 未満であるものが 1 例、③TG 値 150 mg/dL 以上のものが 2 例、であり、脂質異常症と診断できるもの（どれか一項目でも満たすもの）は 8 症例（73%）であった。11 症例中 10 症

例 (91%) はリスクに応じた LDL-C 管理目標値に達していた。高リスク病態 6 症例においては、すべての症例で LDL-C と TG の管理目標値は達成されており、HDL-C に関しては 5 症例 (83%) において目標値が達成されていた。

特定健診での糖尿病患者の平均 LDL-C 値は男性 114.0 mg/dL、女性 122.9 mg/dL であったが、WS 糖尿病患者の LDL-C 値は 84.5 ± 21.4 mg/dL (最小値 51.0 mg/dL、最大値 105.4 mg/dL) と、管理状況が良好であった。HDL-C 値は特定健診での平均値 (男性 52.6 mg/dL、女性 58.9mg/dL) とほぼ同等レベルの値 (54.7 mg/dL) であったが、中性脂肪値は特定健診の糖尿病患者の平均値 (男性 166.9 mg/dL、女性 135.8 mg/dL) よりも WS では良好であった (119.8 mg/dL)。

PAD を有する WS 症例の LDL-C 値は 75.1 ± 23.2 mg/dL (最小値 51.0 mg/dL、最大値 97.4 mg/dL) であり、特定健診で冠動脈疾患以外の動脈硬化性疾患である脳血管障害の既往を有する者の値 (男性 115.7 mg/dL、女性 123.2 mg/dL) よりも管理状況が良好であった。HDL-C 平均値 (WS 62.0 mg/dL、特定健診男性 54.9 mg/dL、特定健診女性 63.4 mg/dL)、TG 平均値 (WS 114.7 mg/dL、特定健診男性 147.0 mg/dL、特定健診女性 115.3 mg/dL) も、WS では全国平均レベルまたは全国レベルよりも良好にコントロールされていた。

性別、スタチン内服有無別、下肢潰瘍有無別、PAD 有無別、糖尿病有無別に、LDL-C、non HDL-C、HDL-C、TG、LDL-C/HDL-C 比、アポ蛋白 (以下、Apo) A1、ApoA2、ApoB、ApoC2、ApoC3、ApoE、ApoB/ApoA1

比、ApoC3/ApoC2 比に有意な差が存在するかどうかを検討した (t 検定)。PAD 合併者では ApoC2 が有意に高値 (5.53 ± 0.60 vs 3.11 ± 1.52 mg/dL) であった。また、糖尿病を有する者は非糖尿病患者よりも ApoC2 (5.05 ± 1.04 vs 2.45 ± 0.77 mg/dL) と ApoC3 (9.72 ± 1.45 vs 7.75 ± 1.04 mg/dL) が有意に高値であり、ApoC3/ApoC2 比は有意に低値 (1.98 ± 0.42 vs 3.46 ± 1.30) であった。また、スタチン内服者は ApoC3 が高値である傾向、下肢潰瘍を有する者は ApoC2 と ApoC3 が高値である傾向を認めた。他のパラメーターに群間で有意差のあるものはなかった。

ApoA1、ApoA2、ApoB、ApoC2、ApoC3、ApoE、ApoB/ApoA1 比、ApoC3/ApoC2 比と、LDL-C、non HDL-C、HDL-C、TG、LDL-C/HDL-C 比、のそれぞれの値の相関を検討したところ、ApoA1 は HDL-C、LDL-C/HDL-C 比、ApoB は LDL-C、non HDL-C、LDL-C/HDL-C 比、ApoE は TG、ApoB/ApoA1 比は HDL-C、LDL-C、non HDL-C、LDL-C/HDL-C 比と有意な相関を示した。ApoC2 や ApoC3 と TG、あるいは non HDL-C との相関は認めなかった。

3. 脂肪肝に関する検討

肝/脾 CT 値比 (以下、LS 比) の値がそろっており、かつ悪性疾患を合併していない 9 症例について解析を行った。また、LS 比が 1.0 未満のものを脂肪肝合併症例とした。

脂肪肝症例 (以下、FL) は 4 症例 (44%) であった。平均年齢は、FL、非 FL それぞれ 51.5 歳、50.2 歳であった。糖尿病・耐糖能異常の合併は、FL 75%、非 FL 60%、PAD 合併は FL 0%、非 FL 40%、下肢潰瘍の合併

は FL 75%、非 FL 80%、スタチン内服率は FL 50%、非 FL 60%であった。

全症例の平均 BMI は 16.9 であったが、FL 症例の平均 BMI は 16.7 (最大 17.80、最小 15.52)、非 FL は 17.1 であり、群間に有意差は認めなかった。臨床生化学データ (LDL-C、HDL-C、non HDL-C、TG、AST、ALT、 γ GTP、ChE、AST/ALT 比) で FL 群と非 FL 群の比較 (t 検定) を行ったところ、HDL-C 値が FL 群 46.0 ± 8.1 mg/dL、非 FL 群 64.6 ± 13.3 mg/dL と、FL 群で有意に低かった ($P < 0.05$)。また TG 値に関しては、FL 群 183.5 ± 76.4 mg/dL、非 FL 群 97.0 ± 29.8 mg/dL と、FL 群において高い傾向を認めた ($p = 0.51$)。他のパラメーターにおいては群間での有意差は認めなかった。

LS 比と各種パラメーターとの相関を検討したところ、TG 値と負の相関 ($R^2 = 0.509$ 、 $p = 0.031$)、HDL-C 値と正の相関 ($R^2 = 0.609$ 、 $p = 0.013$) を認めたが、それ以外のパラメーターとの相関は認めなかった。

D. 考察

一般人での動脈硬化性疾患 (冠動脈疾患または脳血管障害) を有する率は男性 4.5%、女性 2.6%であるのに対し、WS では 50%もの患者が動脈硬化性疾患 (冠動脈疾患または末梢動脈硬化症) を合併していること、さらに、糖尿病合併率も 40-59 才の成人の罹患率 (男性 4.6%、女性 2.3%) よりもはるかに高く 50%にも達することが改めて認識され、脂質管理が動脈硬化性疾患進展抑制に重要であろうことが再認識された。脂質代謝に関しても、73%と非常に高頻度で脂質異常症が WS に合併していることが分かった。

一方で、特定健診データでの高リスク病態 (糖尿病、脳血管障害既往) 者における LDL-C 管理率は平均 60%程度であるのに対し、WS 高リスク病態者でのそれは 100%と、脂質異常症管理状況は極めて良好であり、かつ実際の達成値も非常に良好であることも判明した。このように達成率が高いことに関しては、おそらく WS が動脈硬化性疾患を非常に高い率で合併することが認識されており、診療をしている医師の意識が高いことが寄与していると考ええる。

アポ蛋白と血清脂質との関連、基礎疾患との関連の検討では、糖尿病患者において ApoC2 と C3 が高値であること、PAD 患者でも apoC2 が高値であることが分かった。一般に糖尿病患者では高 TG 血症や non HDL-C 値の上昇を認め、それに伴って apoC2 や C3 の上昇を認めることが多い。本研究では、糖尿病の有無による TG 値や non HDL-C 値の相違、あるいは TG 値や non HDL-C 値と ApoC2、C3 値との相関は認めなかったものの、おそらく症例数が少なかつたための結果であらうと考えられる。さらに症例数を増やしての検討が必要であらうと推察する。また、PAD 患者で ApoC2 が高値であり、いわゆる残余リスクとしての中性脂肪に富んだリポ蛋白がその動脈硬化進展を促進している可能性が考えられる。

近年、脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) として注目されているが、一般日本人においてはその肥満の増加に伴い NAFLD は増加し、現在約 30%の者が NAFLD を有しているといわれている。一般人における BMI 別の NAFLD 合併率は、28 以上で約 85%、25-28 で約 60%、23-25 で約 40%であり、23 未満のものでは 10%程度であ

ることが報告されている。一方、WS では、44%と一般人よりも高率に NAFLD の合併を認めており、さらにその特徴として、すべての症例が BMI 18 未満（平均 16.7）とやせ形であることが挙げられる。WS における脂肪肝発症の分子メカニズムはいまだ不明ではあるが、脂肪肝によるインスリン抵抗性からの糖尿病発症、あるいは NAFLD をベースとする肝硬変や肝細胞癌発症を考慮すると、どのような介入が脂肪肝改善に結びつくのか、という検討も今後必要になると考える。また、脂肪肝を合併する症例では TG 値が高く HDL-C 値が低いため、動脈硬化との関連も今後検討する必要があると考えられた。

E. 結論

今回、12 症例の Werner 症候群患者のデータを用いてその脂質代謝関連項目・脂肪肝のデータの解析を行った。脂質異常症・脂肪肝のいずれも、一般人と比較して、WS での合併率が非常に高いことが判明した。また、一般人と異なり、脂肪肝を呈する症例でも BMI はすべて 18 未満であった。今後、現在倫理審査申請中である Werner 症候群レジストリー研究によるデータ集積により、更なる詳細なデータ解析が期待できるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hasegawa K. Tsukamoto K. Kunimi M, Asahi K. Iseki K. Moriyama T. Yamagata K. Tsuruya K. Fujimoto S. Narita I. Konta T. Kondo M. Kimura K. Kurahashi I. Ohashi Y. Watanabe T. Control status of atherosclerotic cardiovascular risk factors among Japanese high-risk subjects. Analyses

of a Japanese Health Check Database from 2008 through 2011 *J Atheroscler Thromb* in press

2. 学会発表

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

早老症の皮膚潰瘍治療薬臨床試験に向けた調査に関する研究

研究分担者 中神 啓徳 大阪大学大学院医学系研究科
健康発達医学寄附講座教授

研究要旨

ウエルナー症候群などの早老症においては難知性皮膚潰瘍が生活のQOLを著しく低下させることが知られている。皮膚潰瘍の成因は血流不全、骨格異常による物理的な圧迫、繊維芽細胞の増殖能低下など多因子であるが、特にアキレス腱部、足底部など圧のかかる部位に好発、しかも難治性で創部閉鎖まで長期間を要するために創傷被覆材が用いられることが多い。この増悪要因の1つは創部密封環境での細菌増殖・感染で生じる創傷治癒の遅延であり局所感染のコントロールは重要である。しかし、既存の消毒・抗菌作用をもつ薬剤は創傷治癒を遅らせる作用があり、創傷に対して治癒の促進と感染の防御との間で最適環境を整えることは難しい課題である。そこで、創傷治癒も感染防御も妨げることのない薬剤として、我々はSR-0379液の創修復作用と抗菌活性の両方の特性を活かしながら、難治性潰瘍に対する外用薬として開発を進めている。今年度はフェーズ1/2a試験としての糖尿病性潰瘍・下腿潰瘍を対象とした初期評価試験を開始し、次相以降に実施予定の早老症患者への繋げる予定である。

A. 研究目的

ウエルナー症候群などの早老症においては難知性皮膚潰瘍が生活のQOLを著しく低下させることが知られている。皮膚潰瘍の成因は血流不全、骨格異常による物理的な圧迫、繊維芽細胞の増殖能低下など多因子であるが、アキレス腱部、足底部など圧のかかる部位に好発するため創傷被覆材が用いられる。この難治性潰瘍の増悪要因の一つは細菌感染による創傷治癒の遅延であるが、既存の消毒・抗菌作用をもつ薬剤は創傷治癒を遅らせる作用があり、創傷に対して治癒の促進と感染の防御との間で最適環

境を整えることは難しい課題である。そのため、創傷治癒も感染防御も妨げることのない薬剤の開発は、未だに誰も着手していない領域である。我々はSR-0379液の創修復作用と抗菌活性の両方の特性を活かしながら、難治性潰瘍に対する外用薬として開発を進めている。

創に対する治療法として、創傷治癒を促進するための湿潤環境を作る湿潤療法が提唱されている。他方、創部では皮膚のバリア機構が破綻しているために種々の細菌が繁殖することが多く、創の治りに関与しない汚染あるいは繁殖（コロニ

ゼーション)の状態か、又は創の治癒を遅延させる感染の状態かを正確に見極めて、適切な治療を行うことが重要とされる。

難治性皮膚潰瘍では局所感染兆候(発熱・発赤・腫脹・疼痛)の判定が困難なことが多く、その感染に至る前段階(クリティカルコロニゼーション)での見極めが難しい。

我々が同定した新規抗菌性ペプチドAG30を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発は、早期探索型臨床試験拠点のシーズとし選定されたことを契機に、医師主導型治験あるいは将来的な企業への導出を念頭におき改変体を作成し、AG30/5Cペプチドが血清によって分解される代謝産物の機能解析から、20残基のアミノ酸で一部D体にアミノ酸を置換した低コストで活性のあるペプチドの作成に成功した(SRペプチド)。このペプチドを用いた同疾患への医師主導型治験を計画しており、そのためのフェーズ1/2a試験として糖尿病性潰瘍・下腿潰瘍を標的とした初期評価試験を行う。

B. 研究方法

(1) 医師主導治験に向けたGLP・GMP・GCP関連書類の整理

治験に向けたこれまで行ってきた各種書類を申請書類用に整理し、ファイル化を行う。

非臨床試験：ラット全層欠損モデルでの創傷治癒促進作用、各種細菌に対する抗菌活性、薬物動態試験(LC/MS)、毒性試験(ラット4週間反復毒性試験)、安全性薬理試験(中枢神経・呼吸・心血管)、刺激性・感作性試験(ウサギ単回および反復皮膚累積刺激性試験、モルモット皮膚感作性

試験)、安全性薬理試験

治験薬管理：原薬の分析試験・安定性試験、出荷試験

臨床試験：治験薬概要書、健常人での皮膚刺激性試験(パッチテスト)の実施計画書、患者同意説明文書、IRB申請資料、治験届関連資料

(2) 臨床試験の立案・準備

フェーズ1/2a試験として糖尿病性潰瘍・下腿潰瘍を標的とした初期評価試験に向けた準備を行う。その中から次相以降の早老症を対象とした臨床試験に向けた準備を行う。

(倫理面への配慮)

本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

- ・ 「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)
- ・ 「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年度厚生労働省告示第71号)

非臨床試験は、非臨床試験は薬事法の「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」に則りGLP基準で遂行する。

医師主導治験は、「医薬品の臨床試験の実施に関する基準(Good Clinical Practice: GCP)」に準拠し、適切な説明に基づく被験者の同意の確保、及び被験者の人権保護に配慮することにより実施される。また、実施医療機関の治験審査委員会の審査、承認を経て、自ら治験を実施しようとする者から厚生労働大臣宛てに治験計画届書が提出される。

C. 研究結果

(1) 医師主導治験に向けた GLP・GMP・GCP 関連書類の整理

将来的に薬事申請に必要な各種書類に関して、その充足性を確認しながらファイルの整理を行った。非臨床試験においては薬理薬効試験で信頼性保障付実験が必要な箇所があることから、今後臨床試験と並行して薬理薬効試験を行っていく予定である。その他の試験に関しては、早期探索的な初期評価試験を行う上での充足性は PMDA に確認済であるが、将来的に追加実施する必要性のある非臨床試験は並行して行うこととした。具体的には、ラット長期（6ヶ月）毒性試験、ラット皮膚組織での薬物濃度測定をまずは実施することとした。CMC に関しては、治験薬 GMP の実施体制の確認、原薬製造・製剤化に関する書類を確認しながら整理を行った。

臨床試験に関しては、GCP に則った各種書類の作成・管理を行い、治験調整事務局としての書類の整理・管理を行った。

(2) 臨床試験の立案・準備

フェーズ 1/2a 試験として糖尿病性潰瘍・下腿潰瘍を標的とした初期評価試験に向けた準備を行う。その中から次相以降の早老症を対象とした臨床試験に向けた準備を行う。実施計画書立案において、特に以下の点は次相での早老症患者での試験に踏襲できるように議論を行った。

1 用法・用量の適切性

- ・用量: 0.02%、0.1%、0.5%のSR-0379液
- ・用法: 潰瘍面を清拭後、治験薬専用の噴霧器を用い、潰瘍面から約 5 cm 離して 1

日 1 回、5 回噴霧する。治験薬は、4 週間連続投与する。

治験薬の濃度は、非臨床試験の結果から効果が期待される初期用量を 0.02% と推定し、健康成人男性での第 I 相試験（皮膚安全性試験）の結果から、SR-0379 の濃度を 0.02、0.1 及び 0.5% の 3 濃度を設定した。

本治験での治験薬の投与期間は、トラフェルミン製剤の治験の投与期間を参考に、4 週間に設定した。動物モデルを用いた薬効薬理試験の結果から、SR-0379 はトラフェルミン製剤と同等又はそれを上回る効果が期待されると期待できると考えている。

2 主要・副次評価項目の適切性

主要評価項目及び副次評価項目は、以下のとおり設定する予定である。

治験薬評価のために、二重盲検試験で実施する。

< 主要評価項目 >

- ・ 本治験薬の忍容性及び安全性評価
- ・ 潰瘍の大きさ（潰瘍部位の写真撮影による面積の推移）
- ・ 血中薬物濃度の測定

< 副次評価項目 >

- ・ 潰瘍面積が 50% 以上縮小した「改善度」
- ・ 創評価（DESIGN-R）
- ・ 創閉鎖までの日数
- ・ 創部培養検査による定性的評価
- ・ 最終評価時の全般改善度

3 症例数

今回計画している SR-0379 の医師主導治験（初期評価試験: フェーズ I/IIa 臨床試験）は、皮膚潰瘍患者に対し初めて SR-0379 を適用

する臨床試験である。本治験では、難治性潰瘍患者にSR-0379を5噴霧/回/日、創部に4週間連続噴霧し、噴霧部位の局所反応及び全身的な安全性を評価するとともに、創部に対する治療効果の探索的評価および薬物動態評価をすることを目的としている。本治験では、SR-0379の0.02%、0.1%、0.5%の3用量段階を予定しており、プラセボ群も含めた合計4群での治験を予定している。

今回の試験デザインに対し、解析ソフト(Prism6)を用いて統計学的考察を行った。

皮膚潰瘍患者対象の試験(①試験)において、何例で試験を行い、そのうち何例が有効である、といったデータを得たとする(ただし、有効率は50%以上を仮定)。

このデータを用いて有効率を推定し、これを次相の試験の症例数計算に用いるとすると、次相にどれくらい症例数が必要か算出した結果を示す。

<①試験>

シナリオ1:1群3例

有効例	有効率	80%信頼区間	95%信頼区間
2例	67%	20~97%	9~99%
3例	100%	46~100%	29~100%

上記の①試験における有効率の推定値を用いて、この試験の必要症例数を算出する(カイ二乗分布近似)。このとき、プラセボ群の有効率は10%及び15%を想定する。被験薬群の有効率については、上記のシナリオ1及び2における信頼区間の下限値を用いた場合を計算した。これは、有効率を保守的に見込むことで試験成功の確率を上げるためである。なお、検出力は80%とした。

【有効例が2例の場合】

有意水準(両側)	プラセボ群	被験薬群	必要症例数(1群)
5%	10%	20%	199例
	15%	20%	906例
10%	10%	20%	157例
	15%	20%	714例

【有効例が3例の場合】

有意水準(両側)	プラセボ群	被験薬群	必要症例数(1群)
5%	10%	46%	24例
	15%	46%	34例
10%	10%	46%	19例
	15%	46%	27例

D. 考察

初期評価試験をもとにして、次相の試験ではSR-0379最大用量群とプラセボ群との二重盲検試験を行う予定である。

主要評価項目および副次評価項目に関しては、本来であれば創部治癒による傷閉鎖が最も適切なエンドポイントと考えられるが、治験実施期間が大幅に長くなることを考慮して、潰瘍の大きさを主要評価項目とした。また、副次的項目として、潰瘍自体のスコア化して評価するためにDESIGN-Rスコアを用いることとした。また、改善度に関しては、面積比で50%以上の改善の有無で評価を行うこととした。その他、局所の細菌菌量定性と専門医による全般改善度も評価項目として加えることとした。

また、first-in-patientの試験であることから薬物濃度の測定も併せて行うこととした。これは非臨床試験のTmaxが5分あるいは15分であることを考慮して、治験薬投与15

分後と1時間後を採血ポイントとした。

E. 結論

早老症に合併する難治性皮膚潰瘍の新規治療薬開発を目指して、非臨床試験・CMC・臨床試験に向けた書類整備、臨床試験の立案・遂行を行なった。

F. 研究発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

Werner 症候群における下肢皮膚潰瘍に関する症例集積研究

研究分担者 窪田吉孝 千葉大学形成外科

研究要旨

Werner 症候群では皮膚軟部組織潰瘍が高率にみられる。これまでの経験から Werner 症候群でみられる皮膚軟部組織潰瘍には、糖尿病性潰瘍や虚血性潰瘍とは異なる独特の病態が存在することが判明した。今後の治療・管理の指針作成にあたっては、Werner 症候群特有の病態を把握することが必要であるため調査を行った。今回の調査により、Werner 症候群では、特徴的とされるアキレス腱石灰沈着による潰瘍の他にも多彩な潰瘍が出現していることが明らかになった。また、胼胝が高率にみられ胼胝を契機としたと思われる骨髄炎症例も存在した。Werner 症候群においては潰瘍を一度発症してしまうと極めて難治であるため、潰瘍発生予防のための総合的な取り組みが重要であると考えられた。

A. 研究目的

Werner 症候群では皮膚軟部組織潰瘍が高率にみられる。Werner 症候群でみられる皮膚軟部組織潰瘍は難治である点で虚血肢潰瘍や糖尿病性潰瘍と共通しているが、その様態や治療・管理は大きく異なっている点もあり注意が必要である。

しかし、Werner 症候群は稀な疾患であり、Werner 症候群の皮膚潰瘍について一定の傾向を掴むのは困難であった。

今回、我々は 6 例という比較的大きな規模の皮膚潰瘍を持つ Werner 症候群患者集団のについて経時的に詳細な記録を得ることができたため報告する。

B. 研究方法

(1) 対象と調査内容

千葉大学医学部附属病院形成外科を受診した Werner 症候群の患者にみられた皮膚

軟部組織潰瘍について調査した。

潰瘍発生部位、大きさ、深度、感染の有無、石灰の有無、骨髄炎の有無、胼胝の有無、治療経過について調査した。特にアキレス腱後面以外の潰瘍、潰瘍発症前段階における徴候、予防法、治療上の問題点について重点的に調査した。

C. 研究結果

(1) 対象と潰瘍の治療経過

臨床写真を含めた詳細な記録を得られたのは 6 例だった。6 例 12 下肢のうち、2 下肢は初診時に膝下切断済みだった。経過観察期間は 8-60 ヶ月間だった。

(a)潰瘍部位別の頻度と様態

(i) アキレス腱部潰瘍

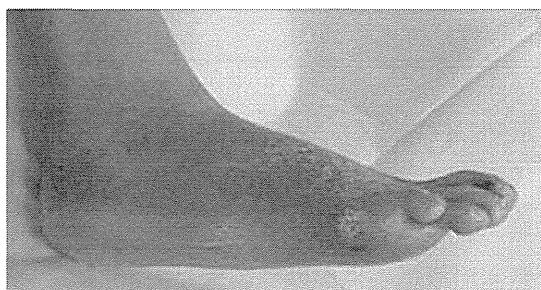
初診時に Werner 症候群の特徴的な症状とされるアキレス腱石灰化によるアキレス

腱部潰瘍が存在したのは1例1下肢のみだった。

つまり、Werner症候群患者のうち潰瘍について形成外科や皮膚科を受診するのは皮膚軟部組織に何らかの問題を生じているケースと考えられるが、典型症状とされるアキレス腱石灰化によるアキレス腱部潰瘍が診療の中心的な対象とは必ずしも言えないことが明らかになった。

(I) アキレス腱潰瘍の発生と経過

アキレス腱部潰瘍出現前からアキレス腱部潰瘍出現およびその後の経過を詳細に記録することができた症例について報告する。



初診時、アキレス腱部潰瘍はみられない。主訴は第5MTP関節外側部の胼胝だった。

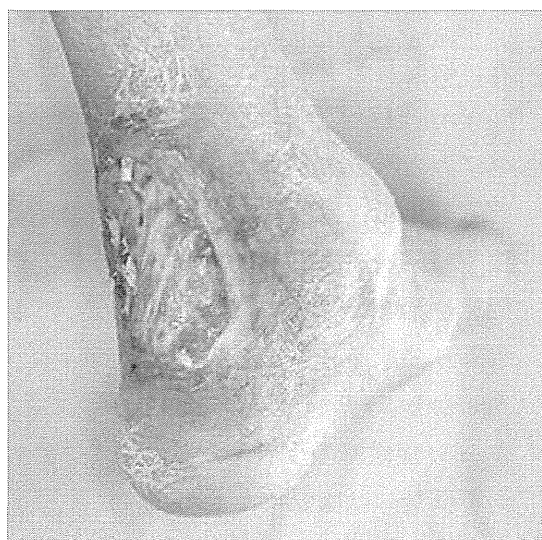


初診7ヶ月後誘因なくアキレス腱部発赤が出現した。発赤、腫脹、疼痛がみられる。

一部、石灰が皮膚を破って自然露出している。感染コントロールのため切開、排膿、デブリードマンを行った。



デブリードマン時に摘出した多量の石灰を示す。



潰瘍化が急速に進行した。アキレス腱部発赤出現後4ヶ月後の時点で、感染の沈静化と大半の肉芽化が得られた。しかし、創収縮と上皮化は極めて緩徐であり難治であった。

(II) アキレス腱部潰瘍の管理

このようにWerner症候群でみられるア

キレス腱石灰化による皮膚潰瘍は誘因無く生じ、かつ、一度生じると急速に進行拡大し、また、難治である。

また、アキレス腱部潰瘍は浸出液が多いことがしばしばあり、日常のガーゼ交換の負担が重くなるなど QOL 低下につながる事がみられた。

アキレス腱部が潰瘍化した状態にあつてはアキレス腱部石灰を除去することが感染沈静化のためや肉芽化を促進して処置の負担を減らすために望ましい。

(ii)外果潰瘍

外果潰瘍は初診時6例10下肢のうち2例3下肢でみられた。経過中に1例1下肢で新たに生じた。



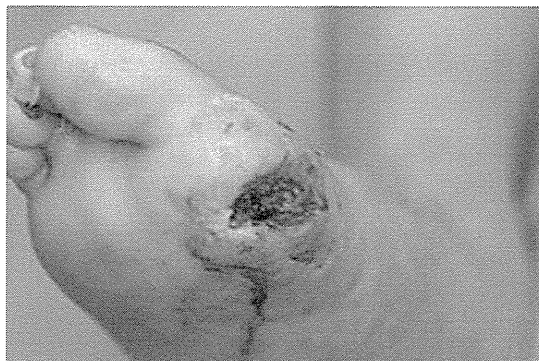
外果にみられた潰瘍。アキレス腱部潰瘍はなかった。

(iii)第1・第5中足趾節関節(MTP)部潰瘍

第1 MTP 内側部潰瘍は2例2下肢、第5 MTP 外側部潰瘍は1例1下肢でみられた。

Werner 症候群では外反母趾、内反小趾を合併していることも多く、

潰瘍発生素因の一つになっていると考えられた。

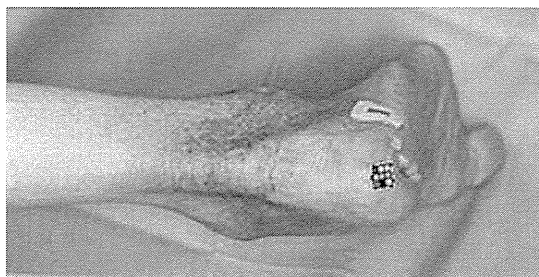
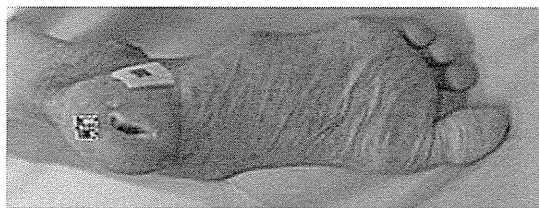


第1中足趾節関節外側にみられた潰瘍。

(iv)踵部の胼胝・潰瘍

(I)潰瘍

踵部潰瘍は1例1下肢でみられ、頻度としては他部位の潰瘍より低かったが、その1例では踵骨骨髓炎も伴っていた。踵骨骨髓炎を伴っていた症例では、虚血肢を合併していたものの、足の他部位の潰瘍はなかった。踵骨骨髓炎の発症機序としては、先行して発症した踵部胼胝により圧迫された踵骨骨皮質が障害を受け潰瘍化、骨髓炎化したことが推定された。



踵部潰瘍と踵骨骨髓炎がみられた。虚血肢合併により第2足趾切断済みである。他部位の潰瘍はみられず比較的良好な状態であることがわかる。



脂肪抑制 T2 強調 MRI 画像。踵部皮膚潰瘍の直上の踵骨に high intensity area がみられる。

(II) 胼胝

踵部潰瘍と引き続く踵骨骨髓炎の原因となり得る踵部胼胝踵部胼胝は軽度のものも含めれば6例10下肢中、全10下肢でみられた。

D. 考察

Werner 症候群でみられる皮膚軟部組織潰瘍は四肢遠位や肘関節、膝関節に好発し、特に下肢潰瘍は患者の QOL を低下させる重大な原因となる。

Werner 症候群でみられる下肢潰瘍はそのケアにおいて糖尿病性潰瘍や虚血性潰瘍などの日常診療で頻繁に遭遇する下肢潰瘍に対するものと共通する部分も多い。よって、

医療者にあっては一般的なフットケアに習熟し、患者に対しケアや教育を供給できる体制を整備する必要があることは論を待たない。

しかし、一方で Werner 症候群では著明な皮膚軟部組織硬化、アキレス腱石灰化、線維芽細胞機能低下など特異的な病態があり、潰瘍の予防と治療は他の一般的にみられる下肢潰瘍に対するものとは同一ではない。よって、Werner 症候群における下肢潰瘍の独特の病態の把握と潰瘍発生予防法と治療法を確立することが急務である。

しかし、Werner 症候群は極めて稀な疾患であるため、Werner 症候群の皮膚潰瘍については症例報告が殆どであり、傾向を把握することが容易ではない。Werner 症候群の潰瘍に関しては、Honjo ら(Rejuvenation Res 2008)の7症例16関節に石灰化を伴う難治性潰瘍を認めた報告が規模として最大である。本分担研究報告書における6症例の検討はそれに次ぐ規模であり、経過観察期間は8-60ヶ月間と比較的長い。

今回の検討により明らかになったのは以下の点である。

(a) 部位別潰瘍の頻度と病態

アキレス腱部石灰化は Werner 症候群の特徴的な症状の一つであり注目されやすい。アキレス腱に石灰が沈着することはアキレス腱自体の血流の悪さとアキレス腱上の皮膚の薄さにより潰瘍を誘発しやすい。また、アキレス腱部潰瘍はひとたび発症すると急速に進行し難治である。よって、アキレス腱部潰瘍はアキレス腱部石灰沈着から発症し Werner 症候群の特徴的な潰瘍と言える。

しかし、今回検討を行った6例10下肢の

うち形成外科初診時にアキレス腱部潰瘍がみられたのは1下肢のみであった。よって、アキレス腱部潰瘍のみに注目してWerner症候群の潰瘍治療にあたるのは適切ではないことが明らかになった。

アキレス腱部以外の下肢潰瘍発生部位としては、外果、第1趾中足指節関節内側、第5趾中足指節関節外側、踵部、足趾がみられた。足趾以外の潰瘍は足趾先端部潰瘍が無い、またはあってもわずかの症例でもみられた。このことは、足趾先端部に潰瘍が初発・多発することが多い糖尿病性潰瘍や虚血性潰瘍とは明らかに異なり、Werner症候群の際だった特徴の一つと考えられた。

(b)管理・治療と問題点

(i)潰瘍発症予防

Werner症候群の皮膚潰瘍は一度生じてしまうと急速に拡大して難治であるため潰瘍発症予防は治療の最も重要な部分である。Werner症候群においては進行性の皮膚軟部組織硬化と足部変形が皮膚潰瘍発症の主因の一つである。よって、Werner症候群の場合、血流障害や糖尿病が存在しなくとも患者教育、皮膚ケア、場合によっては装具等の使用を潰瘍発症に先行して行う必要性が高いと考えられた。

アキレス腱部潰瘍においては先行するアキレス腱石灰沈着がその発症に重要な役割を果たしているが、現在の所、アキレス腱石灰沈着そのものに対するアプローチは潰瘍発症前には難しい。今後、Werner症候群の病態解明が進み石灰沈着を予防または治療できる手段が登場することが期待される。

(ii)腓胝

腓胝は今回検討した全足に存在した。腓胝は健常者でもみられるありふれた疾患であるが、Werner症候群患者においては格別の注意を払うべきであることが明らかになった。なぜならば、踵部腓胝の圧迫から踵骨皮質の破壊、骨髄炎、潰瘍化に至った可能性がある症例の存在が確認されたからである。腓胝の圧迫による疼痛や潰瘍化はWerner症候群以外の患者でもしばしばみられるが骨皮質破壊に至ることは稀である。Werner症候群においては皮膚軟部組織硬化と足変形により通常より高い圧力が腓胝を通して深部に持続的に加わり、場合によっては骨皮質を破壊してしまうほどになるため重篤化するものと思われた。このような事態を予防するために、かかりつけ医での腓胝削り等を含めた積極的な対策の重要性が高いと考えられた。Werner症候群では潰瘍を一度発症してしまうと極めて難治であるため潰瘍発症予防のための総合的な取り組みの重要性は強調してもしすぎることはない。

E. 結論

稀な疾患であるWerner症候群6例の下肢潰瘍について調査した。Werner症候群の特徴的な病態であるアキレス腱石灰化によって引き起こされるアキレス腱部潰瘍以外にも多彩な潰瘍がみられた。

Werner症候群では潰瘍を一度発症してしまうと極めて難治であるため潰瘍発症予防のための総合的な取り組みの重要性は強調してもしすぎることはない。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

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

ウエルナー症候群の遺伝子検査に関する報告

分担研究者 竹本 稔¹、花岡 英紀²

¹千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学講座 准教授

²千葉大学医学部附属病院・臨床試験部 教授

研究要旨

平成 21 年、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患研究事業ウエルナー症候群の病態把握と治療指針作成を目的とした全国研究が開始され、その後、我々の施設ではウエルナー症候群（以下、WS）の遺伝子検査を行ってきた。全国から早老様顔貌、難治性皮膚潰瘍などの臨床症状から WS が疑われ、平成 21 年から平成 28 年 1 月までに 61 症例の遺伝子検査の依頼があり、43 症例の確定診断をした。今回、これまでの遺伝子検査の結果に関して若干の考察を加えて報告する。

A. 研究目的

ウエルナー症候群（Werner syndrome：以下、WS）は我が国に多い代表的遺伝的早期老化症である。平成21年、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患研究事業ウエルナー症候群の病態把握と治療指針作成を目的とした全国研究が開始され、現在も難治性疾患等政策研究事業として研究を継続している。平成21年以降、当科（千葉大学大学院医学研究院 細胞治療内科学講座）では全国の各施設から依頼されたWS遺伝子検査を施行してきた。今回、これまで行われた遺伝子検査結果をまとめて若干の考察を加えて報告する。

B. 研究方法

対象：平成 21 年～平成 28 年 2 月までに、各施設において遺伝子検査に関する同意が得られ、当科に遺伝子検査依頼があった 61 症例。
方法：匿名化された EDTA 2Na 採血検体よりゲノム DNA を QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて

抽出。遺伝子検査は各エクソンを参考資料 1 に示す PCR プライマーで増幅し、増幅された DNA 断片を用いてダイレクトシーケンス法にて解析した。基本的には日本人に多い 11 か所の変異を検討し、一部の症例で、さらに遺伝子解析を追加した。

C. 研究結果

平成 21 年度からの遺伝子依頼件数の推移を表 1 に示す。21 年度は 1 件であるが、平成 22 年度以降は年平均 10 件の依頼があり、これまでに総数は 61 件であった。県別の依頼数を表 2 に示すが 26 都道府県から依頼があった。診療科別では内科、皮膚科からの依頼が多かった（表 3）。遺伝子確定例は 43 症例であり、その内訳を表 4 に示す。ホモ接合体が 28 例、複合型ヘテロ 15 例、ヘテロ接合体 2 例（一つの対立遺伝子のみに変異あり）、変異なしが 16 名であった。

D. 考察

1978年、1981年の我が国における家系調査によりWSは常染色体劣性遺伝形式で発症することが明らかとなった¹⁾。WS症例はこれまで世界中でおよそ1,200例以上が報告されているが、その内のおよそ1,000例は我が国において確認されている²⁾。神奈川県内の一般住民1,000人を対象として行われた遺伝子調査によると、6名にWRN遺伝子変異をヘテロ接合体として保有していたという報告があり、計算上は毎年23人程度のホモ接合体が生まれることになる³⁾。

WSの原因遺伝子は、1992年に連鎖解析により第8染色体短腕(8p11-12)に存在することが示された。1996年には原因遺伝子(WRN)がクローニングされ(WRN遺伝子: OMIM 604611) 7)、遺伝子がコードする蛋白質はRecQ型DNAヘリカーゼ(RECQ PROTEIN-LIKE 2: RECQL2)であることが報告された。DNAヘリカーゼは、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し、修復、複製、組み換え、転写の際に重要な役割を果たす。またWRNヘリカーゼは、他のRecQ型DNAヘリカーゼにはない、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。WRNヘリカーゼはDNA複製中に生じるエラーの修復やDNA構造異常の解きほぐしに重要であることが伺われる。こ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。

WRN遺伝子の変異は90種類あり(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=WRN>)、ナンセンス変異、スプライシング変異、フレームシフト変異などを含む。国ごとにドミナントな変

異箇所が異なり、我が国においてはエクソン26の直前の塩基がGからCへと変異するタイプ4変異(c.3139-1G>C)が一番多く(50.4%)、続いてタイプ6変異(c.1105C>T)が17.5%との報告がある²⁾。今回の遺伝子検査が確定した43症例中においてもmut4が51%と最多であり、既報と同様の割合であった。このようなホモタイプの発症は、いとこ婚や血族婚でみられることが多く、非血族婚症例などでは変異4/6などの複合型ヘテロ接合体による発症が観察される。以前の報告ではWSは血族婚による発症が多く、複合型ヘテロによる発症は5%と稀であったが²⁾、平成21年に行われた、WS全国疫学調査では血族婚は43%と以前の報告に比し低く⁴⁻⁷⁾、そのことを反映するように、今回の検討では複合型ヘテロが34%と増加しており、我が国では非血族婚によるWS発症が増加していることを裏付けている。

またWSでは遺伝子型と臨床的な重症度との関連性を示唆する報告は殆どない。そのため、例えばホモ接合体と複合型ヘテロとで表現型に差があるかなどは今後の検討事項の一つである。今後、日本医療研究開発機構研究費(難治性疾患実用化研究事業)「早老症ウェルナー症候群の全国調査と症例登録システム構築によるエビデンスの創生」によりWSレジストリーが構築され、患者の前向き調査が進むことにより、このような検討事項が明らかになることが期待される。

さらに今回の検討により、新しい遺伝子変異を3か所同定することができた。この新たな変異と表現型との関連も興味深い。また臨床的には早老症が疑われた症例のうち、16症例においてはWRN遺伝子に変異を認めておらず、今後はlamin遺伝子を含めたさらなる遺伝子解析を予定しており、新しい早老症の同定にもつながる可能性がある。

年	人数
2009	1
2010	11
2011	15
2012	4
2013	11
2014	9
2015	10

表 1 千葉大における年毎の遺伝子検査数

診療科	紹介人数
内科	33
皮膚科	14
小児科	3
眼科	2
整形外科	1
総診	1
臨床検査	1
遺伝子診療	1
看護科	1
不明	3

表 2 診療科別の遺伝子検査依頼数

都道府県	人数
北海道	1
青森	1
福島	1
新潟	1
栃木	1
茨城	1
千葉	15
東京	1
神奈川	1
山梨	1
長野	1
石川	2
福井	1
愛知	3
三重	2
京都	3
大阪	9
和歌山	1
兵庫	1
岡山	2
広島	2
愛媛	1
福岡	6
大分	1
宮崎	1
熊本	1

表 3 県別の遺伝子検査依頼数

遺伝子型	人数
ホモ	28
複合型ヘテロ	15
ヘテロ	2
不明	16
総数	61

表 4-1 遺伝子型の内訳

遺伝子型 (ホモ)	人数
Mut 4 (c.3139-1 G>C)	22
Mut 6 (c.1105 C>T))	5
c.407delC (新規変異)	1

表 4-2 ホモ接合体の内訳

遺伝子型 (複合型ヘテロ)	人数
Mut 4/6	4
Mut 4/7	5
Mut 4/1	2
Mut 4/11	2
Mut 4/ IVS 14+1 G>A (新規変異)	1
Mut 6/ 2772delA (新規変異)	1

表 4-3 複合型ヘテロの内訳

参考文献

- 1) Goto M et al.: Family analysis of Werner's syndrome: a survey of 42 Japanese families with a review of the literature. Clin Genet 19:8-15, 1981.
- 2) Matsumoto T et al.: Mutation and haplotype analyses of the Werner's syndrome gene based on its genomic structure: genetic epidemiology in the Japanese population. Hum Genet 100:123-130, 1997.
- 3) Satoh M et al.: Prevalence of Werner's syndrome heterozygotes in Japan. Lancet 353:1766, 1999
- 4) Takemoto M et al.: Diagnostic criteria for Werner

syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. Geriatr Gerontol Int 13:475-481, 2013.

- 5) 竹本 稔、横手 幸太郎 ウェルナー症候群の診断・診療ガイドライン 2012年版、III. ウェルナー症候群の診断 1. ウェルナー症候群 診断基準2012、23-28、2012
- 6) 木下 大輔、竹本 稔、横手 幸太郎 ウェルナー症候群 難治性内分泌代謝疾患 Update 120-122. 2015
- 7) <http://www.nanbyou.or.jp/entry/4218>

E. 結論

遺伝子検査を通じて現在のウェルナー症候群の現状を把握することができ、さらに遺伝子-表現型関連解析や新しい早老症の同定につながる可能性がある。

F. 研究発表

なし。

1. 論文発表

1. A Case of Sarcomatoid Carcinoma occurring in a Patient with Werner Syndrome
Mitamura Y, Azuma S, Matsumoto D, Takada-Watanabe A, Takemoto M, Yokote K, Motoshita J, Oda Y, Furue M, Takeuchi S The Journal of Dermatology 2016, in press
2. Ide S, Yamamoto M, Takemoto M, Fujimoto M, Ide K, Kobayashi K, Yokote K. Improved Glycemic Control and Vascular Function and Reduction of Abdominal Fat Accumulation with Liraglutide in a Case of Werner Syndrome with Diabetes Mellitus. J Am Geriat Soc. 2016;64:687-688.
3. Takemoto M, Yamaga M, Furuichi Y, Yokote K. Astaxanthin Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Werner Syndrome with Diabetes