

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と

患者 QOL を向上する全国研究

令和 4 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横手 幸太郎

令和 5（2023）年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者QOLを向上する全国研究
代表研究者 横手 幸太郎

(資料1) 第65回日本糖尿病学会学術集会 プログラム

(資料2) 第64回日本老年医学会学術集会 プログラム

(資料3) 第95回日本生化学会 プログラム

(資料4) 脳心血管抗加齢研究会第19回学術大会 プログラム

(資料5) Lifetime extension and the recent cause of death in Werner syndrome: a retrospective study from 2011 to 2020.

(資料6) Case of Werner syndrome with significant improvement of refractory skin ulcer despite fibroblast cellular senescence.

(資料7) Optical coherence tomography findings in three patients with Werner syndrome.

(資料8) RNaseH2A downregulation drives inflammatory gene expression via genomic DNA fragmentation in senescent and cancer cells.

(資料9) Targeted long-read sequencing identifies missing pathogenic variants in unsolved Werner syndrome cases.

II. 分担研究報告

1. ウェルナー症候群：診療の質および患者QOL向上を向上する全国研究

分担研究者 竹本 稔
分担研究者 中神 啓徳
分担研究者 窪田 吉孝
分担研究者 茂木 精一郎
分担研究者 谷口 俊文
分担研究者 渡邊 一久
分担研究者 谷口 晃
分担研究者 忍足 俊幸

2. ハッチンソン・ギルフォード症候群の新規治療薬ロナファルニブの国内承認に向けた取り組みと全国一次調査（再調査）

分担研究者 井原 健二
分担研究者 松尾 宗明
分担研究者 小崎 里華

(資料1) 2023分担報告書一次調査集計（表1，表2）

3. ロスモンド・トムソン症候群診療ガイドラインの作成

分担研究者 金子 英雄
研究協力者 大西 秀典

(資料1) Minds 準拠の診断基準・診療ガイドライン

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）

総括研究報告書

早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

横手幸太郎 千葉大学大学院医学研究院 内分泌代謝・血液・老年内科学 教授

研究要旨

早老症は、全身に老化徴候が早発・進展する疾患の総称である。その代表例として Werner 症候群（以下 WS と略）、Hutchinson-Gilford Progeria 症候群（以下 HGPS と略）や Rothmund-Thomson 症候群（以下 RTS と略）が知られる。WS は思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため歳半ばで死亡し、国内推定患者数は約 700～2,000 名、世界の報告の 6 割を日本人が占める。平成 21～25 年度の難治性疾患克服研究事業により診断基準改訂と世界初の WS 診療ガイドラインが作成され、平成 26 年度、重症度分類が作成され、平成 26 年 5 月指定難病に指定された。平成 29 年度には診療ガイドライン、重症度分類を改訂し、令和 2 年には診療ガイドラインを英文誌に公表した。HGPS は 1～2 歳時に早老徴候が出現し、10 歳代でほぼ全例が死亡する重篤な小児疾患であり、平成 25 年度に施行した全国調査により、我が国で 6 名の患者が新規に同定され、平成 29 年度には世界初の HGPS 診断基準が作成され、令和元年 4 月指定難病に指定された。RTS は特徴的な皮膚所見が乳児期から認められ骨格異常や癌腫を合併する。平成 30 年に施行した全国調査により 10 名の患者を同定し、診断基準を改定した。

本研究は①WS 診断・診療ガイドラインの普及啓蒙と改訂、②その他の早老症研究（WS 類似疾患）、③HGPS、RTS の診療ガイドライン作成、④早老症の早期診断の実現と小児・成人を一体的に研究・診療できる体制の構築、⑤早老症レジストリを運用し、指定難病患者データベースの構築とそのフォローアップを行う。本研究班では、内科医・外科医・小児科医・臨床研究専門家の連携・融合による集学的な取り組みを通じて、小児から成人までの「早老症」の予後と QOL 改善を目指す。

A. 研究目的

早老症は、全身に老化徴候が早発・進展する疾患の総称である。その代表例として Werner 症候群（以下 WS と略）、Hutchinson-Gilford Progeria 症候群（以下 HGPS と略）や Rothmund-Thomson 症候群（以下 RTS と略）が知られる。WS は思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため 40 歳半ばで死亡し、国内推定患者数は約 700～2,000 名、世界

の報告の 6 割を日本人が占める。平成 21～25 年度の難治性疾患克服研究事業により診断基準改訂と世界初の WS 診療ガイドラインが作成され、平成 26 年度、重症度分類が作成され、平成 26 年 5 月指定難病に指定された。平成 29 年度には診療ガイドライン、重症度分類を改訂し、令和 2 年には診療ガイドラインを英文誌に公表した。HGPS は 1～2 歳時に早老徴候が出現し、10 歳代でほぼ全

例が死亡する重篤な小児疾患であり、平成 25 年度に施行した全国調査により、我が国で 6 名の患者が新規に同定され、平成 29 年度には世界初の HGPS 診断基準が作成され、令和元年 4 月指定難病に指定された。RTS は特徴的な皮膚所見が乳児期から認められ骨格異常や癌腫を合併する。平成 30 年に施行した全国調査により 10 名の患者を同定し、診断基準を改定した。さらに早老症の実態を明らかにすべく難治性疾患実用化研究として推進されている早老症レジストリー研究と連携してきた。これらの研究を推進し、早老症の医療水準や患者QOL 向上に貢献することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

WS研究：①都道府県難病診療連携拠点病院を中心とした、難病医療支援センター、関連学会やナショナルセンター等と連携して診断基準や診療ガイドラインを啓蒙普及する。②WSの早期診断のための情報を収集するとともに、小児科と内科の連携により小児・成人を一体的に研究・診療できる体制を構築する。③早老症レジストリーを運用してAMED「再生医療実現拠点ネットワークプログラム（疾患特異的iPS細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム）」「老化メカニズムの解明・制御プロジェクト／個体・臓器老化研究拠点」厚労科研「指定難病の普及・啓発にむけた統合研究」を支援する。④ウェルナー症候群レジストリーを運用し、引き続き患者登録及びフォローアップを行う。⑤ウェルナー症候群に対するニコチンアミド リボシドの安全性・有効性を検証するための前向き、単施設試験（責任研究者 千葉大学 横手幸太郎）を支援する。⑥本研究班において策定した診断基準に基づき、ウェルナー症候群患者の遺伝子診断を支援する。また、遺伝子診断の保険適応申請を支援する。

HGPS研究：①診療ガイドラインの作成へ向け、エビデンス収集を開始する。②関連学会において診療ガイドラインの承認を得る、③患者・家族会の設立を支援する。④小児科と内科の連携により小児・成人を一体的に研究・診療できる体制を構築する。

その他の早老症：①RTS の診療ガイドラインの作成へ向け、エビデンス収集を開始する。②WS 全国疫学調査の結果をもとに、aWS や WS 類似疾患の情報を収集する。

C. 研究結果

WS 研究：これまでの早老症に関する臨床的進歩、研究の普及・啓発活動をすべく以下のことを行った。これまでの早老症に関する臨床的進歩、研究の普及・啓発活動をすべく以下のことを行った。第65回日本糖尿病学会年次学術集会（5月14日、神戸）において、シンポジウム “New perspectives on research for aging and metabolism” にて “Progeroid syndrome and insulin resistance”（加藤尚也、横手幸太郎）と題して講演した。第33回日本老年学会総会・第64回日本老年医学学術集会では、シンポジウム『「第2期老年医学推進5か年計画に向けて(2)老年医学会 次世代による未来への挑戦 座長、横手幸太郎」にて、「老化」を治療する～早老症研究から見た抗老化医療の今後の展望～』（加藤尚也）、また、YI受賞者講演 「早老症ウェルナー症候群におけるメタボロミクスを介した老化機序解明および老化バイオマーカーの開発。」（加藤尚也）として講演を行った（6月3日）。第95回日本生化学会 シンポジウム「ダウン症から学ぶ多面的な病態生化学（11月11日）では「遺伝性 早老症 ウェルナー症候群に見る老化のメカニズム」（前澤善朗）として、脳心血管抗加齢研究会シンポジウム「老化と遺伝性疾患」我が国の早老症の現状—12月2日「Werner症候群 Update -遺伝性早老症にみる細胞老化と疾病-」（前澤善朗）として講演した。

さらに、適切な診療の向上のため、患者会と連携しweb患者会に複数回にわたって参加、（横手幸太郎、前澤善朗、越坂理也、加藤尚也）患者の要望や、生活の制限について意見を交換した。また、ウェルナー症候群ハンドブックの英文化と、ウェルナー症候群ホームページの英文化を行った。加えて、ウェルナー症候群の診療経験のある医療機関より承諾を得て当該機関のリスト化を行い、患者の医療機関選定の際に役立てるべく、ホームページへ掲載予定である。また、ウェルナー症候群患者における悪性腫瘍サーベイランスのストラテジ案を作成した。

加えて、本研究より派生したAMED「再生医療実現拠点ネットワークプログラム（疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム）」（課題名：早老症疾患特異的 iPS 細胞を用いた老化促進メカニズムの解明を目指す研究（研究開発代表者））との連携研究において 1) WS 患者脂肪組織由来間葉系幹細胞は早期老化と老化関連分泌現象（senescence associated secretary phenotype）による炎症所見を示し、脂肪分化能が減少すること、さらに、この知見は抗老化薬としても知られる mTORC1 の阻害剤であるラパマイシンによって改善することを見出し、論文が Aging誌にて revise 中である。

また2) WS 患者由来皮膚線維芽細胞は早期老化所見を示し、この背景として小胞体ストレスの亢進が関与することを見出し、論文投稿準備中である。3) WS 患者 iPS 細胞由来間葉系幹細胞は、VEGF シグナルに関連するスプライシングの変化をきたしていることを見出し、第 64 回日本老年医学会で発表した。加えて、4) ウェルナー症候群の MDS/AML は TP53 変異と関連することを報告した。また、5) ウェルナー症候群患者の寿命は1991年には41歳であったが、2016年には59歳まで延伸していることを報告した。また、根本治療として開発中の、エクソスキッピング法を用いた WRN 遺伝子の発現回復治療の開発に進捗が見られた。

加えて、難治性疾患実用化研究事業として推進されている早老症レジストリ研究においても、51名の症例が登録され、横断解析で10年ほど前の報告と比べ、心筋梗塞、脳梗塞といった動脈硬化性疾患の減少を認めた。一方、3年間の縦断的分析で、平均糸球体濾過率が $74.8\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ から $63.4\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ と急速な低下を示し、腎障害の進展、悪性新生物が平均発症年齢49.7歳と早期から観察され、3年間の調査期間中にも患者の約30%で観察され、主要な死因になっているなどの新規知見を得ている。

HGPS 研究 :HGPS患者を対象にFDAが承認した治療薬 Zokinvy™ (lonafarnib)の日本導入の可能性を探っている。我々は全国的な疫学調査と複数の会議を通じて、HGPSの現状と患者数を一次調査した。全国の医療機関へのアンケート調査の結果、現時点で約50症例のHGPS、HGPS疑い患者、それ以外のラミノパチー患者の診療経験が報告された。今後二次調査により全症例を重複なく把握するとともに詳細な臨床情報を収集する予定である。

その他の早老症：①ロスムンド・トムソン症候群診療ガイドラインの作成

本邦での全国調査とPubMedで得られた文献情報をもとにして、クリニカルクエスチョンを作成した。班会議での意見をもとに修正を加えた。修正したものをガイドライン案として日本小児遺伝学会に学会承認の申請をした。

②ロスムンド・トムソン症候群市民公開講座の開催：2022年11月25日（金）にZoomを用いたWeb形式で開催した。

D. 考察

ほぼ研究計画に沿って研究が行われた。本研究組

織は、全国各地域の大学や国立研究センターに在籍する分担研究者と研究協力者によって構成される。これらのメンバーが WS、HGPS、RTSの症例集積を継続的に実施し、主要なエビデンスを収集、相互に協調しつつ診断基準や診療ガイドラインの作成・改訂や重症度分類の作成、検証が行われた。また、臨床研究中核病院である千葉大学医学部附属病院の臨床試験部に設置された「早老症レジストリ」事務局において症例の登録とフォローアップが継続進行中であり、今回、世界初の3年間の縦断研究の成果を取りまとめ、論文をPublishした。今後、長期的に臨床経過が詳細に観察され、現代の早老症患者の自然史が明らかになることが期待される。さらに本研究の成果（症例情報）をベースとして新規研究課題が採択された、AMED「再生医療実現拠点ネットワークプログラム（疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム）」（課題名：早老症疾患特異的 iPS細胞を用いた老化促進メカニズムの解明を目指す研究（研究開発代表者））および「老化メカニズムの解明・制御プロジェクト／個体・臓器老化研究拠点」（課題名：早老症に立脚したヒト老化病態の解明とその制御への応用（研究開発分担者））の研究を支援しこれらについても、前述の結果を得てこれらについても論文を予定しており、一部はrevise中である。

とくに HGPS、WS は患者・家族用の資材が作成され、患者の日常生活における QOL 向上に貢献するものと思われる。今後も公開講座などを通じて国民へ啓発活動を行ってゆき、最終的に、小児から成人までの「早老症」の予後改善を目指してゆきたい。

HGPS

2020年（令和2年）度診療報酬改定において LMNA 遺伝子検査が保険診療の遺伝学的検査（5,000点）に追加された。ハッチンソン・ギルフォード症候群患者家族と専門研究者・臨床医を結び付ける国際的 NPO 法人である Progeria Research Foundation (PRF) が発行する患者向けハンドブック（The Progeria Handbook 2nd Edition）の日本語訳（プロジェリアハンドブック第2版）を作成し、PRF に提供しホームページに公開された。2020年度はこれまでの診療情報を統合し、広く日本社会に発信するため日本語のホームページを作成した（令和3年1月に公開）。さらに GeneReviews 日本語版に疾患情報を公開した。これらにより本疾患の情報を日本人が日本語で容易にアクセス可能になり、医療現場、学校、行政機関など幅広い利用が期待できる状況が整備された。一方、現時点で国内では確立した治療法はなく、老化に伴う症状に対す

る対症療法のみである。近年Gタンパク質のファルネシル転移酵素 (FT) 阻害剤による臨床治験が海外で進行し、2020年11月ファルネシル転移酵素阻害薬ロニブは、米国食品医薬品局 (FDA) に医薬品として承認された。ハッチンソン・ギルフォード症候群という超希少疾患に対する新しい治療薬の国内の患者に対する使用には様々な障壁がある。米国の製薬会社と国内代理店と医療者を連携する取り組みが必要である。本班では厚生労働省の未承認薬委員会への申請を同時に進めた。今後 HGPS の診断法と治療法を整理し診療ガイドライン作成を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato H, Koshizaka M, Kaneko H, Maezawa Y, Yokote K. Lifetime extension and the recent cause of death in Werner syndrome: a retrospective study from 2011 to 2020. *Orphanet J Rare Dis.* 2022 Jun 13;17(1):226.
2. Kinoshita D, Kato H, Kaneko H, Ishikawa T, Teramoto N, Tsukagoshi A, Maeda Y, Minamizuka T, Hayashi A, Shoji M, Sawada D, Funayama S, Koshizaka M, Ogata H, Kubota Y, Mitsukawa N, Takemoto M, Yokote K, Maezawa Y. Case of Werner syndrome with significant improvement of refractory skin ulcer despite fibroblast cellular senescence. *Case Reports Geriatr Gerontol Int.* 2023 Mar;23(3):239-241.
3. Nagai T, Yokouchi H, Miura G, Koshizaka M, Maezawa Y, Oshitari T, Yokote K, Baba T. Optical coherence tomography findings in three patients with Werner syndrome. *BMC Ophthalmol.* 2022 Nov 19;22(1):448.
4. Sugawara S, Okada R, Loo TM, Tanaka H, Miyata K, Chiba M, Kawasaki H, Katoh K, Kaji S, Maezawa Y, Yokote K, Nakayama M, Oshima M, Nagao K, Obuse C, Nagayama S, Takubo K, Nakanishi A, Kanemaki TM, Hara E, Takahashi A. RNaseH2A downregulation drives inflammatory gene expression via genomic DNA fragmentation in senescent and cancer cells. *Commun Biol.* 2022 Dec 28;5(1):1420.
5. Miller DE, Lee L, Galey M, Kandhaya-Pillai R, Tischkowitz M, Amalnath D, Vithlani A, Yokote K, Kato H, Maezawa Y, Takada-Watanabe A, Takemoto M, Martin GM, Eichler

EE, Hisama FM, Oshima J. Targeted long-read sequencing identifies missing pathogenic variants in unsolved Werner syndrome cases. *J Med Genet.* 2022 May 9;59(11):1087-1094.

2. 学会発表

1. Progeroid syndrome and insulin resistance, 加藤尚也, 横手幸太郎, シンポジウムーNew perspectives on research for aging and metabolismー, 第 65 回日本糖尿病学会学術集会, 2022. 5. 14,
2. ウェルナー症候群 41 例の 3 年間の経過報告, 前田祐香里, 越坂理也, 正司真弓, 前澤善朗, 横手幸太郎, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022. 6. 3
3. 遺伝性早老症 Werner 症候群の脂肪組織における老化促進メカニズムの解明, 澤田大輔, 加藤尚也, 前澤善朗, 木下大輔, 船山真一郎, 金子ひより, 南塚拓也, 越坂理也, 塩浜直, 横手幸太郎, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022. 6. 3
4. 「老化」を治療する ~早老症研究から見た抗老化医療の今後の展望~, 加藤尚也, 前澤善朗, 横手幸太郎, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022. 6. 3
5. 早老症ウェルナー症候群 iPS 細胞由来間葉系幹細胞の創傷治療における有用性, 船山真一郎, 加藤尚也, 前澤善朗, 高山直也, 大内靖夫, 岩間厚志, 江藤浩之, 横手幸太郎, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022. 6. 3
6. 小胞体ストレスが早老症ウェルナー症候群の老化促進に与える影響の解明, 金子ひより, 加藤尚也, 前澤善朗, 大内靖夫, 高山直也, 岩間厚志, 江藤浩之, 横手幸太郎, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022. 6. 3
7. 早老症ウェルナー症候群におけるメタボロミクスを介した老化機序解明および老化バイオマーカーの開発, 加藤尚也, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022. 6. 3
8. 遺伝性早老症ウェルナー症候群に見る老化のメカニズム, 前澤善朗, 加藤尚也, 横手幸太郎, シンポジウムーダウン症から学ぶ多面的な病態生化学ー, 第 95 回日本生化学会, 2022. 11. 11
9. Werner 症候群 Update ー遺伝性早老症にみる細胞老化と疾病, 脳心血管抗加齢研究会シンポジウムー「老化と遺伝性疾患」我が国の早老症の現状ー, 脳心血管抗加齢研究会第 19 回学術大会, 2022. 12. 2

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

ウェルナー症候群：

診療の質および患者 QOL を向上する全国研究

研究分担者

竹本 稔 国際医療福祉大学・医学部・教授（代表）
中神啓徳 大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
窪田吉孝 国立大学法人千葉大学・大学院医学研究院・准教授
茂木精一郎 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
谷口俊文 国立大学法人千葉大学・医学部附属病院・講師
渡邊 一久 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
谷口 晃 奈良県立医科大学・医学部・准教授
忍足俊幸 国立大学法人千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究要旨: 早老症は、全身に老化徴候が早発・進展する疾患の総称である。その代表例として Werner 症候群（以下 WS と略）が知られる。WS は思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため 40 歳半ばで死亡し、国内推定患者数は約 700～2,000 名、世界の報告の 6 割を日本人が占める。平成 21～25 年度の難治性疾患克服研究事業により診断基準改訂と世界初の WS 診療ガイドラインが作成され、平成 26 年度、重症度分類が作成され、平成 26 年 5 月指定難病に指定された。平成 29 年度には診療ガイドライン、重症度分類を改訂し、令和 2 年には診療ガイドラインを英文誌に公表した。早老症の実態を明らかにすべく難治性疾患実用化研究として推進されている早老症レジストリー研究とも連携してきた。さらに診療ガイドラインの改定を行い、日本語版と英語版を作成し、英語版に関しては英文雑誌に掲載した。加えて、患者用リーフレットを作成した。本研究では、これら一連の研究を広く周知する目的で、学会におけるシンポジウムの企画・発表、研究成果の学会誌への掲載、そして我が国を代表する内科学の教科書に記載しウェルナー症候群の普及・啓蒙活動を行った。

A. 研究目的

早老症あるいは早期老化症候群（progeroid syndrome、premature aging syndromes）では暦年齢に比較して加齢現象が促進して観察される。特定の早老徴候が特定の臓器に誇張された形で観察されることより、部分的早老症候群（segmental progeroid syndrome）とも呼ばれる。代表的な疾患としてウェルナー症候群（以下 WS と略）や Hutchinson-Gilford 症候群が挙げられる。それぞれ原因遺伝子は同定されているが、早老機序は必ずしも明らかではなく、根本的な治療法開発

には至っていない。WS は思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため 40 歳半ばで死亡する早老症であり、国内推定患者数は 700～2,000 名、世界の報告の 6 割を日本人が占める。平成 21～25 年度の難治性疾患克服研究事業により 25 年ぶりの診断基準改訂と治療の標準化や世界初の WS 診療ガイドラインが作成され、平成 26 年度の政策研究事業により WS 重症度分類が作成され、平成 26 年 5 月指定難病に指定された。さらに難治性疾患実用化研究として推進されている早老症レジストリー研究と連携し、平成 29 年度には診療

ガイドライン、重症度分類を改訂した。

本研究の目的はこれまでの研究をさらに発展させ WS の診療の質および患者 QOL 向上に貢献することである。

B. 研究方法

1. これまでの早老症に関する臨床的進歩、研究の普及・啓発活動

（倫理面への配慮）

本研究では個人情報収集のため、個人情報保護法、文部科学省・厚生労働省・経済産業省：ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針、文部科学省・厚生労働省：疫学研究に関する倫理指針、厚生労働省：臨床研究に関する倫理指針、経済産業省：情報システムの信頼性向上に関するガイドライン、民間部門における電子計算機処理に係る個人情報の保護に関するガイドラインなどを順守して研究計画の立案・遂行を行う。調査・研究の実施に際しては、各施設の倫理委員会に諮り、許可を申請する。患者の血液検体解析においては、事前に文書で本人に説明と同意を得ることとし、不参加の場合でも何らの不便・不都合とならないことを伝える。解析にあたっては患者のプライバシーに配慮し、臨床経過が個人と結びつかないようデータを管理した。

C. 研究結果

これまでの早老症に関する臨床的進歩、研究の普及・啓発活動をすべく以下のことを行った。これまでの早老症に関する臨床的進歩、研究の普及・啓発活動をすべく以下のことを行った。第 65 回日本糖尿病学会年次学術集会（5 月 14 日、神戸）において、シンポジウム “New perspectives on research for aging and metabolism” にて “Progeroid syndrome and insulin resistance”（加藤尚也、横手幸太郎）と題して講演した。第 33 回日本老年学会総会・第 64 回日本老年医学学術集会では、シンポジウム『「第 2 期老年医学推進 5 か年計画に向けて(2)老年医学会 次世代による未来への挑戦 座長、横手幸太郎」にて、「老化」を治療する ~早老症研究から見た抗老化医療の今後

の展望~』（加藤尚也）、また、YI 受賞者講演 「早老症ウエルナー症候群におけるメタボロミクスを介した老化機序解明および老化バイオマーカーの開発。」

（加藤尚也）として講演を行った（6 月 3 日）。第 95 回日本生化学会 シンポジウムダウナー症から学ぶ多面的な病態生化学（11 月 11 日）では「遺伝性早老症ウエルナー症候群に見る老化のメカニズム」（前澤善朗）として、脳心血管抗加齢研究会シンポジウム「老化と遺伝性疾患」我が国の早老症の現状—12 月 2 日「Werner 症候群 Update -遺伝性早老症にみる細胞老化と疾病-」（前澤善朗）として講演した。

さらに、適切な診療の向上のため、患者会と連携し web 患者会に複数回にわたって参加、（横手幸太郎、前澤善朗、越坂理也、加藤尚也）患者の要望や、生活の制限について意見を交換した。また、ウエルナー症候群ハンドブックの英文化と、ウエルナー症候群ホームページの英文化を行った。加えて、ウエルナー症候群の診療経験のある医療機関より承諾を得て当該機関のリスト化を行い、患者の医療機関選定の際に役立てるべく、ホームページへ掲載予定である。また、ウエルナー症候群患者における悪性腫瘍サーベイランスのストラテジ案を作成した。

加えて、本研究より派生した AMED「再生医療実現拠点ネットワークプログラム（疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム）」（課題名：早老症疾患特異的 iPS 細胞を用いた老化促進メカニズムの解明を目指す研究（研究開発代表者））との連携研究において 1) WS 患者脂肪組織由来間葉系幹細胞は早期老化と老化関連分泌現象 (senescence associated secretary phenotype) による炎症所見を示し、脂肪分化能が減少すること、さらに、この知見は抗老化薬としても知られる mTORC1 の阻害剤であるラパマイシンによって改善することを見出し、論文が Aging 誌にて revise 中である。また 2) WS 患者由来皮膚線維芽細胞は早期老化所見を示し、この背景として小胞体ストレスの亢進が関与することを見出し、論文投稿準備中である。3) WS 患者 iPS 細胞由来間葉系幹細胞は、VEGF シグナルに関連するスプライシングの変化をきたしていることを見出し、第 64 回日本老年医学会で発表した。加えて、4) ウエルナー

症候群の MDS/AML は TP53 変異と関連することを報告した。また、5) ウェルナー症候群患者の寿命は 1991 年には 41 歳であったが、2016 年には 59 歳まで延伸していることを報告した。また、根本治療として開発中の、エクソンスキッピング法を用いた WRN 遺伝子の発現回復治療の開発に進捗が見られた。

加えて、難治性疾患実用化研究事業として推進されている早老症レジストリ研究においても、51 名の症例が登録され、横断解析で 10 年ほど前の報告と比べ、心筋梗塞、脳梗塞といった動脈硬化性疾患の減少を認めた。一方、3 年間の縦断的分析で、平均糸球体濾過率が $74.8\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ から $63.4\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ と急速な低下を示し、腎障害の進展、悪性新生物が平均発症年齢 49.7 歳と早期から観察され、3 年間の調査期間中にも患者の約 30% で観察され、主要な死因になっているなどの新規知見を得ている。

D. 考察

2009 年 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患研究事業では、我が国における WS の現状を調査すべく、2009 年年 9 月には一次アンケート調査を、2009 年 10 月には一次アンケートで明らかとなった症例に対する二次アンケート調査を行った。そしてこれらの調査で明らかとなった臨床的特徴をもとにして、診断基準の改訂が行われた。2012 年 2 月 19 日には東京国際フォーラムにて「遺伝性早老症ウェルナー症候群のこれまでの研究の歩みとこらからの展望」とのタイトルで研究報告会が行われたが、この会では患者・家族の会も同時に行われ、その当時の最新の研究成果を研究者のみならず患者・家族会でも共有した。この年には我が国におけるウェルナー症候群の臨床経験をもとにして世界で初めて「ウェルナー症候群の診療ガイドライン 2012 年版」が発表された。2015 年には WS の重症度分類を作成し発表した。そして、2015 年 7 月 1 日、WS は指定難病に選定された。

その後、2016 年には 2 回目の全国調査が施行され、2020 年にはレジストリー研究の一部が報

告されている。また大阪大学の中神らは創修復作用と抗菌活性の両方の特性をもつ SR-0379 液を難治性潰瘍に対する外用薬として開発し、この薬剤の効果が WS においても検証された。その結果、SR-0379 はプラセボに対して有意に潰瘍サイズを縮小 (22.9% vs. 0.1%) させたことが報告されている。今後のウェルナー症候群の難治性潰瘍治療に貢献することを期待したい。また最近の WS の臨床的特徴を検討すべく、2009 年の全国 2 次調査の結果と、2020 年のレジストリー研究の結果が比較検討された。その結果、難治性皮膚科潰瘍、狭心症、心筋梗塞、悪性腫瘍の併存率が減少していることが報告されている。狭心症、心筋梗塞に関しては診断を受けた症例の脂質、血圧、血糖管理の成果が奏功している可能性がある。内服薬の比較でもスタチンは両年ともに 65% 以上に、ARB は 42.1%、35.3% 処方されていた。血糖降下薬に関しては両年で使用トレンドが異なってきたが、SGLT2 阻害剤、GLP-1 受容体作動薬といった一般の糖尿病患者において心血管イベント抑制作用が報告されている薬剤も登場してきており、WS における適応やその効果に関して今後の解析が必要と思われる。

また、今回の解析では、WS 患者において動脈硬化性疾患が大きく減少し、主要な死因が悪性腫瘍となった。中でも、上皮性癌よりも、非上皮性肉腫が死因となることが多く、主要サーベイランスの方法構築が必要である。また、腎機能低下は一般老化と比較して十倍急速であることも判明し、今まで注目されていなかった WS の腎機能低下に今後注目していく必要がある。このような知見の発信、並びに英語化されたパンフレットやホームページを介して、日本国内のみならず世界中の WS の治療が標準化され、患者の生命予後や QOL 向上に寄与することを期待したい。

E. 結論

一般的に老化を進行させる要因として遺伝因子と環境因子が挙げられるが、WS においては遺伝要因がその早老機序に関与することは疑いの余地はない。一方、WS 患者の平均寿命は以前の報告に比し延長して

おり、WS をより早期に診断し、より早期から合併する代謝性疾患や下肢潰瘍の管理を行うことは寿命延長や QOL の向上の観点から意義は大きい。WS は日本に多いとはいえ、推定 2000 症例であり、希少疾患である。教科書的に、アメリカでは 8000 種類の希少疾患に 300 万人罹患しており、適切な診断までに平均で 7.6 年かかり、多くの不必要な検査がなされること、診断までに 8 人の医師（4 人の家庭医と 4 人の専門医）を受診し 2~3 の異なった診断をされると記載がある。WS の発症年齢が 26.1 ± 9.5 年であるのに対し、診断年齢は 42.5 ± 8.6 年と報告されており、適切な診断まで実に 16 年の歳月を要している。このギャップを埋めることは喫緊の課題といえよう。また、今回明らかになった急速な腎機能低下と悪性腫瘍、特に間葉系腫瘍の高率な合併は今後の治療ストラテジーの改善のために重要な要素となると思われる。また本研究班ではウェルナー症候群に限らず、Hutchinson-Gilford 症候群や Rothmund-Thomson 症候群の臨床研究が行われている。2018 年 2 月 16 日~18 日には、千葉県のかずさアカデミアパークにて「国際シンポジウム・早老症と関連疾患 2018」が開催され多くの臨床医、研究者による意見交換が行われた。このような活動を通じて早老症全体の ADL、QOL の向上や予後が改善することを今後も期待したい。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato H, Koshizaka M, Kaneko H, Maezawa Y, Yokote K. Lifetime extension and the recent cause of death in Werner syndrome: a retrospective study from 2011 to 2020. *Orphanet J Rare Dis.* 2022 Jun 13;17(1):226.
2. Kinoshita D, Kato H, Kaneko H, Ishikawa T, Teramoto N, Tsukagoshi A, Maeda Y, Minamizuka T, Hayashi A, Shoji M, Sawada D, Funayama S, Koshizaka M, Ogata H, Kubota Y, Mitsukawa N, Takemoto M, Yokote K, Maezawa Y. Case of

Werner syndrome with significant improvement of refractory skin ulcer despite fibroblast cellular senescence. *Case Reports Geriatr Gerontol Int.* 2023 Mar;23(3):239-241.

3. Nagai T, Yokouchi H, Miura G, Koshizaka M, Maezawa Y, Oshitari T, Yokote K, Baba T. Optical coherence tomography findings in three patients with Werner syndrome. *BMC Ophthalmol.* 2022 Nov 19;22(1):448.
4. Sugawara S, Okada R, Loo TM, Tanaka H, Miyata K, Chiba M, Kawasaki H, Katoh K, Kaji S, Maezawa Y, Yokote K, Nakayama M, Oshima M, Nagao K, Obuse C, Nagayama S, Takubo K, Nakanishi A, Kanemaki TM, Hara E, Takahashi A. RNaseH2A downregulation drives inflammatory gene expression via genomic DNA fragmentation in senescent and cancer cells. *Commun Biol.* 2022 Dec 28;5(1):1420.
5. Miller DE, Lee L, Galey M, Kandhaya-Pillai R, Tischkowitz M, Amalnath D, Vithlani A, Yokote K, Kato H, Maezawa Y, Takada-Watanabe A, Takemoto M, Martin GM, Eichler EE, Hisama FM, Oshima J. Targeted long-read sequencing identifies missing pathogenic variants in unsolved Werner syndrome cases. *J Med Genet.* 2022 May 9;59(11):1087-1094.

2. 学会発表

1. Progeroid syndrome and insulin resistance, 加藤尚也, 横手幸太郎, シンポジウム—New perspectives on research for aging and metabolism—, 第 65 回日本糖尿病学会学術集会, 2022.5.14,
2. ウェルナー症候群 41 例の 3 年間の経過報告, 前田祐香里, 越坂理也, 正司真弓, 前澤善朗, 横手幸太郎, 第 64 回日本老年医学会学術集会, 2022.6.3
3. 遺伝性早老症 Werner 症候群の脂肪組織における老化促進メカニズムの解明, 澤田大輔, 加藤尚也, 前澤善朗, 木下大輔, 船山真一郎, 金子ひ

より，南塚拓也，越坂理也，塩浜直，横手幸太郎，第 64 回日本老年医学会学術集会，2022.6.3

4. 「老化」を治療する ～早老症研究から見た抗老化医療の今後の展望～，加藤尚也，前澤善朗，横手幸太郎，第 64 回日本老年医学会学術集会，2022.6.3
5. 早老症ウエルナー症候群 iPS 細胞由来間葉系幹細胞の創傷治療における有用性，船山真一郎，加藤尚也，前澤善朗，高山直也，大内靖夫，岩間厚志，江藤浩之，横手幸太郎，第 64 回日本老年医学会学術集会，2022.6.3
6. 小胞体ストレスが早老症ウエルナー症候群の老化促進に与える影響の解明，金子ひより，加藤尚也，前澤善朗，大内靖夫，高山直也，岩間厚志，江藤浩之，横手幸太郎，第 64 回日本老年医学会学術集会，2022.6.3
7. 早老症ウエルナー症候群におけるメタボロミクスを介した老化機序解明および老化バイオマーカーの開発，加藤尚也，第 64 回日本老年医学会学術集会，2022.6.3
8. 遺伝性早老症ウエルナー症候群に見る老化のメカニズム，前澤善朗，加藤尚也，横手幸太郎，シンポジウムーダウン症から学ぶ多面的な病態生化学ー，第 95 回日本生化学会，2022.11.11
9. Werner 症候群 Update ー遺伝性早老症にみる細胞老化と疾病，脳心血管抗加齢研究会シンポジウムー「老化と遺伝性疾患」我が国の早老症の現状ー，脳心血管抗加齢研究会第 19 回学術大会，2022.12. 2

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

ハッチンソン・ギルフォード症候群の新規治療薬ロナファルニブの
国内承認に向けた取り組みと全国一次調査（再調査）

研究分担者

井原 健二 大分大学医学部・小児科学・教授

松尾 宗明 佐賀大学・医学部小児科学・教授

小崎 里華 国立成育医療研究センター・小児内科系専門診療部 遺伝診療科・診療部長

研究要旨：ハッチンソン・ギルフォード症候群 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome;HGPS)は、出生後から重度の成長障害、脱毛、老化顔貌、皮下脂肪の減少、動脈硬化性疾患の合併症により平均寿命は 14.6 歳と報告されている遺伝性早老症の中でも症状が特に重篤な疾患である。また国内で 10 例程度、全世界でも 350～400 人の患者が報告されているのみの超希少疾患でもある。2020 年 11 月ファルネシル転移酵素阻害薬ロナファルニブが米国食品医薬品局（FDA）に新規医薬品として承認された。本研究班では国内代理店を通してロナファルニブの薬剤承認に向けた申請を進めている。前回の全国患者の疫学調査から約 10 年が経過しているため、新規発症の HGPS, HGPS 疑い患者、それ以外のラミノパチーの把握のため新たに一次調査を行った。

A. 研究目的

ハッチンソン・ギルフォード症候群 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome;HGPS) は、出生後から重度の成長障害、脱毛、老化顔貌、皮下脂肪の減少、動脈硬化性疾患の合併症により平均寿命は 14.6 歳と報告されている遺伝性早老症の中でも症状が特に重篤な疾患である。国内で 10 例程度、全世界でも 350～400 人の患者が報告されているのみの超希少疾患でもある。

本研究班では、アメリカ合衆国 FDA で承認されたファルネシル化酵素化タンパク質阻害剤 Zokinvy™ (lonafarnib:ロナファルニブ)の日本国内の患者への治療承認に向けて、米国 Eiger BioPharmaceuticals 社の日本代理店 (A 社) と協議を進めている。

本研究班では国内代理店を通してロナファルニブの薬剤承認に向けた申請を進めている。前回の全国患者の疫学調査から約 10 年が経過しているため、新規発症 HGPS, HGPS 疑い患者、それ以外のラミノパチーの把握のため新たに一次調査を行った。

B. 研究方法と結果

(1) ロナファルニブの国内承認に向けた協議

Zokinvy™ (ロナファルニブ)の国内承認に向け、米国 Eiger BioPharmaceuticals 社と日本代理店契約を交わした会社 (A 社) と本班が協議を継続している。

第 1 回：2021 年 9 月 28 日 (火) の Web 会議では、HGPS の疾患説明、未承認薬会議への関与状況、

最新の全国調査の結果について本班から初回説明を行った。

第2回：2022年2月1日(火)のWeb会議は、研究班で把握する(日本で生存中の)患者数および施設・医師名の開示に向けた方策、毎年の新患の患者数および発生時の把握方法、研究班の概要、日本における臨床試験実施の可否などについて具体的な方向性を協議した。

第3回：2022年5月31日のWeb会議は、ロナファルニブの薬剤承認に向けて、疾患の診断法などを協議した。

第4回：2022年7月1日の対面会議(大分大学医学部で開催)は、今後の国内患者の把握のための一次調査スケジュールや調査内容を協議した。

第5回：2022年8月19日の対面会議(A社内で開催)は、HGPSとその類縁疾患の理解のために相互の情報共有を行った。

(1) 全国患者疫学調査(1次調査)

全国の医療機関を対象にHGPS, HGPS疑い患者、それ以外のラミノパチーの診療数等を把握を目的としたアンケートを行った。(二次調査以降は一次調査の結果を基に詳細な実態調査を行う予定)。

1次調査の対象施設

【選択基準】

- 1) 小児科もしくは新生児科もしくは遺伝科(等)の標榜がある200床以上の病院
- 2) 小児専門病院

【除外基準】

- 1) 精神科もしくはがん専門施設
- 2) 200床未満の病院

【対象期間】 研究対象施設に調査票が到着した時より過去5年間

【対象施設数】

- 1) 小児科または新生児科の標榜がある200床以上の病院 (1175施設)

2) 遺伝科(等)のみ標榜がある200床以上の病院 (3施設)

3) 小児専門病院 (61施設)

合計 1229施設

【研究方法】 HGPS, HGPS疑い患者、それ以外のラミノパチーを診察した経験について、往復はがきを用いたアンケート調査を行った。

【調査項目】 HGPS, HGPS疑い患者、それ以外のラミノパチーを診察した経験の有無とその人数。なお、経験ありの場合、その人数や報告者の連絡先の情報：氏名、施設/所属、電話番号とEメールアドレス(任意回答)

【評価項目】

主要評価項目: HGPS, HGPS疑い患者、それ以外のラミノパチー患者数の推定

副次評価項目: HGPS, HGPS疑い患者、それ以外のラミノパチー患者の診療経験のある施設名と担当医の情報

C. 結果(表1)

全体では、1513の医療施設を対象にアンケート調査を行った。その結果、986施設から回答を得られ、全体の回答率は65.2%であった。

以下に各施設種別の回答率を示す：

- ① 200床以上の小児科：回答施設数774/対象施設数1175(回答率65.9%)
- ② 200床以上の遺伝科：回答施設数72/対象施設数121(回答率59.5%)
- ③ 200床以上の新生児科：回答施設数40/対象施設数64(回答率62.5%)
- ④ 遺伝科のみ：回答施設数3/対象施設数3(回答率100%)
- ⑤ 小児専門病院-小児科：回答施設数43/対象施設数61(回答率70.5%)
- ⑥ 小児専門病院-遺伝科：回答施設数13/対象施設数20(回答率65.0%)

- ⑦ 小児専門病院-新生児科：回答施設数 15／対象施設数 24（回答率 62.5%）
- ⑧ 小児専門病院-代謝・内分泌：回答施設数 12／対象施設数 18（回答率 66.7%）
- ⑨ 小児専門病院-神経科：回答施設数 14／対象施設数 27（回答率 51.9%）

小児専門病院において比較的高い回答率が得られた。

現在診療経験がある、もしくは過去に診療経験があると回答した施設とその人数は以下の通りである。合計 38 施設における診療経験者数（現在：過去）は、HGPS が 23 名（11 名：12 名）、HGPS 疑が 8 名（4 名：4 名）、他の LP が 18 名（13 名：5 名）であった（表 2）。

同一施設内の複数の診療科から回答があった場合や近隣の医療機関からの回答には同一患者が含まれている可能性が高いため、今後、2 次調査を実施し、重複がないように全例を把握しながら詳細な臨床情報を整理する。

D. 考察

HGPS, HGPS 疑い患者、それ以外のラミノパチー患者に対して国内では現時点で確立した治療法はなく、老化に伴う症状に対する対症療法のみである。本疾患に対する新しい治療法に関しては数種類の臨床治験が海外で進行しており、その中ではファルネシル転移酵素阻害薬ロナファルニブは、2020 年 11 月米国食品医薬品局（FDA）に医薬品として承認された。その後欧州や中国でも承認された。超希少疾患に対する本薬剤の国内承認に向けて、米国の製薬会社と国内代理店と医療者が連携した取り組みを進めている。今後、二次調査を通して本症候群の詳細な疫学情報を明らかにすることで、本邦で薬剤承認後に速やかにすべての患者に治療の選択肢が提案するために本疫学研究を進める予定である。

D. 結論

今回、国内一次調査により、国内に約 30 名の HGPS, HGPS 疑い患者、それ以外のラミノパチー患者が、全国各地の専門医療機関で診療を受けていることが明らかになった。今後、二次調査により本症候群の詳細な疫学情報を調査する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

井原健二：遺伝病と遺伝相談：近未来の小児科のあり方. 小児科(臨時増刊号)63(13), 1506-1512, 2022

1. 学会発表

1) 井原健二：ゲノム医療に向けた遺伝カウンセリングと医療倫理. 第 26 回 東北小児成長フォーラム. 2022 年 1 月 27 日、仙台市（WEB 開催）

2) 井原健二：小児内分泌医の視点で「早い成熟」と「早い老化」を考えてみよう. 第 9 回 中国四国若手内分泌の会. 2022 年 5 月 14 日、岡山市

3) 井原健二：遺伝性小児内分泌疾患の診断. 第 95 回日本内分泌学会学術総会. 2022 年 6 月 2 日、別府市

4) 井原健二：遺伝性早老症ハッチンソンギルフォード症候群の新規治療薬 lonafarnib：国内承認に向けた取り組み. 第 18 回脳心血管抗加齢研究会. 2022 年 12 月 2 日、大阪市

3. ホームページ等

1) ハッチンソン・ギルフォード症候群：日本語ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/hgps/>

2) ハッチンソン・ギルフォード症候群：

GeneReviews 日本語版

<http://grj.umin.jp/grj/hgps.htm>

F. 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

ロスムンド・トムソン症候群診療ガイドラインの作成

研究分担者 金子 英雄 岐阜県総合医療センター 小児療育内科部長

研究協力者 大西 秀典 岐阜大学大学院医学系研究科

生殖・発達医学講座 小児科学分野教授

研究要旨:ロスムンド・トムソン症候群は、多形皮膚萎縮症、骨格の異常を特徴とする常染色体劣性の遺伝形式をとる疾患である。我々は2010年と2020年にロスムンド・トムソン症候群の全国調査を行い本邦での特徴を報告した。本邦での患者数は2010年10症例、2020年8症例であった。元来、ロスムンド・トムソン症候群は稀少疾患であるが、他の要因として医療関係者におけるロスムンド・トムソン症候群の認知度の低さも考えられた。疾患の認知度を高め、ロスムンド・トムソン症候群の早期診断・早期治療介入を可能とするには、診療ガイドラインの策定が必要である。そこで、我々は全国調査による本邦の特徴を参考にした上でロスムンド・トムソン症候群の診療ガイドラインを作成し、学会承認を得ることができた。さらに、医療関係者以外にロスムンド・トムソン症候群の理解を深めてもらうために、市民公開講座を開催した。これらの研究活動を通じて、ロスムンド・トムソン症候群の認知度を高めることで、患者のQOLの向上、生命予後の改善が期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、本邦でのロスムンド・トムソン症候群の実態を明らかにし、患者のQOLの向上、生命予後の改善を図ることである。本邦における実態を明らかにするため2010年と2020年に2回のアンケート調査を実施した。以前報告したように、本邦での患者数は2010年10症例、2020年8症例と非常に少なかった。

元来、ロスムンド・トムソン症候群は稀少疾患ではあるが、他の要因として医療関係者も含めて人々のロスムンド・トムソン症候群に対する認知度の低さが関与している可能性が考えられた。そこで、疾患の認知度を高めるために、全国調査による本邦の特徴を参考にした上でロスムンド・トムソン症候群の診療ガイドラインを作成するとともに、市民公開講座を開催した。

B. 研究方法

ガイドラインの作成

本邦での全国調査とPubMedで得られた文献情報をもとにして、クリニカルクエスチョン(CQ)を作成した。班会議での意見をもとに修正を加えた。修

正したものをガイドライン案として日本小児遺伝学会に学会承認の申請をした。

市民公開講座の開催

2022年11月25日(金)15時から16時

Zoomを用いたWeb形式で開催した。

(倫理面への配慮)

臨床情報を収集する場合は、連結可能匿名化した。「ロスムンド・トムソン症候群の全国疫学調査」として国立病院機構長良医療センター、岐阜県総合医療センターの倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

ロスムンド・トムソン症候群の検索式として下記を用いた。PubMed及び医中誌で2022年6月30日までの文献に関して以下の通り検索を行い、重要と思われる17件を参考文献とした。

1. “Rothmund-Thomson” AND “syndrome” 751件
2. “RECQL4” AND “mutation” 208件
3. “Baller-Gerold” AND “syndrome” 83件
4. “RAPADILINO” AND “syndrome” 43件

4. “Rothmund-Thomson 症候群” or “ロスムンド・トムソン症候群” 161 件

文献検索と本邦症例の検討から、3つのCQを設定した（表）。

表 ガイドラインで用いたCQ

CQ1	RTSの診断に多形皮膚萎縮症は有用か？
CQ2	RTSに合併した骨肉腫の治療に通常のプロトコールは有用か？
CQ3	RTSの皮膚癌発症予防に紫外線を避けることが推奨されるか？

また、診療ガイドラインに組み入れる診断指針を以前、日本小児遺伝学会に承認された診断指針から修正した（図1）。変更点の概要は以下である。

ロスムンド・トムソン症候群を type1 と type2 に分けて記載した。type1 は、多形皮膚萎縮症、若年性白内障を特徴とする。骨肉腫の合併は稀である。一方、type2 は、多形皮膚萎縮症、骨の変形を特徴とし、骨肉腫を高率に合併する。

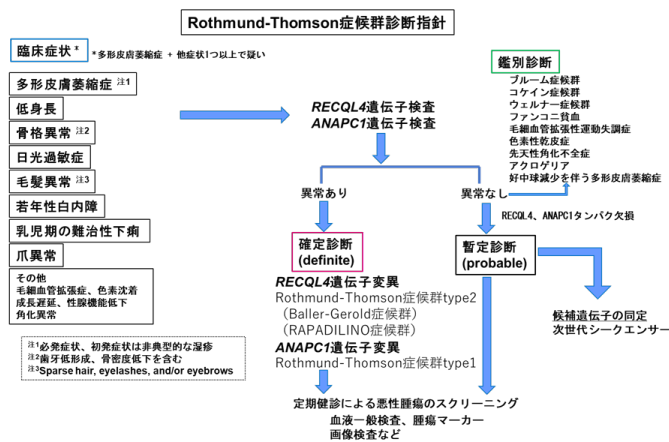


図1 ロスムンド・トムソン症候群診断指針

病因遺伝子は今後さらに新たな遺伝子が追加される可能性はあるが、現時点での知見として type1 ANAPC1、type2 RecQL4とした。

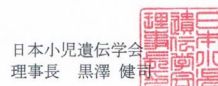
以上の内容を診療ガイドライン（案）として作成した。2022年度第1回研究班の会議に診療ガイドライン（案）を提出し、妥当性について議論した。班員からの修正のコメントを反映させた後、日本小児遺伝学会に、診療ガイドライン（案）の学会承認を依頼し申請した。日本小児遺伝学会での審議を経たのち、診療ガイドラインは学会承認を得ることが

できた（図2）（添付資料）。

日本小児遺伝学会審議結果通知書

令和5年1月29日

（申請者）
厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 難治性疾患政策研究
研究課題名：早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する
全国研究
課題番号：21FC1016
研究代表者：横手 幸太郎 殿



令和4年10月26日付けで申請のあった事項に係る審議結果を次のとおり通知します。

審議事項名	Minds 準拠の診断基準・診療ガイドライン 「ロスムンド・トムソン (Rothmund-Thomson) 症候群」 学会承認
審議結果	承認 【承認番号 2022-2】

図2 診療ガイドラインの日本小児遺伝学会による承認

市民公開講座を2022年11月25日Webで開催した（図2）。参加者はロスムンド・トムソン症候群患者2名、バレー・ジェロルド症候群患者1名とその家族、主治医であった。

市民公開講座終了後参加者から下記の質問、意見があった。

- ・皮膚の症状に対して保湿、UV ケアは具体的にどこまですればよいのか。
- ・学校でのUV遮蔽のシールについて、学校が対応してくれない場合がある。
- ・難聴があるがロスムンド・トムソン症候群には多いのか。

以上の質問事項に関して、患者間での情報交換を行うとともに、学校関係者に病気の簡単な説明書を作成し理解を得ることとした。



図3 市民公開講座の案内

D. 考察

ロスマンド・トムソン症候群のように希少疾患の診療ガイドラインを作成する際、CQに対する根拠の確からしさのエビデンスが問題となる。3つのCQに対して、既報の文献の情報から確かさはB~Dとしたが、今後の検討により変更の可能性もある。

病因遺伝子は、type1 *ANAPC1*、type2 *RecQL4* を記載したが、type1,2ともに*ANAPC1*、*RecQL4* 遺伝子が正常な家系が知られており、今後の研究の進展により病因遺伝子の追加の記載が必要となる。

市民公開講座の参加者は、多くはなかったが本邦で初の試みであり、参加者からは有意義であったと評価していただいた。患者が日々の生活で直面する困りごとを研究者と患者が共有し、今後の研究活動の中で、解決策をみいだしていきたい。

E. 結論

本邦での全国調査の結果を踏まえてロスマンド・トムソン症候群の診療ガイドラインを作成し、

学会承認を得ることができた。さらに、医療関係者以外にロスマンド・トムソン症候群への理解を深めてもらうために、市民公開講座を開催した。これらの研究活動を通じて、患者のQOLの向上、生命予後の改善が期待される。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kaneko H, Kawase C, Seki J, Ikawa Y, Yachie A, Funato M.

Intellectual disability and abnormal cortical neuron phenotypes in patients with Bloom syndrome.

J Hum Genet. 2023 in press

2) Okada Y, Funato M, Takeda S, Kaneko H. Duchenne muscular dystrophy diagnosis using fibroblast-derived myotube cells.

Pediatr Int. 2022 Jan;64(1):e15151. doi:

10.1111/ped.15151.

3) Kaneko H, Takemoto M, Murakami H, Ihara K, Kosaki R, Motegi SI, Taniguchi A, Matsuo M, Yamazaki N, Nishigori C, Takita J, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K.

Rothmund-Thomson syndrome investigated by two nationwide surveys in Japan.

Pediatr Int. 2022 Jan;64(1):e15120. doi:

10.1111/ped.15120.

2. 学会発表

1) 村上博昭、小林桜子、水野朋紀、湯澤壮太郎、阪下達哉、小林瑛美子、松波邦洋、桑原秀次、所訓子、松隈英治、今村淳、金子英雄：先天異常症候群の保険収載遺伝学的検査に対する当院の取り組み。日本小児科学会(第125回)(2022年4月15-17日 郡山市)

2) 村上博昭、熊木達郎、榎本友美、阪下達哉、寺澤厚志、今村淳、黒澤健司、金子英雄

STAG1を含むde novoの3q22.1q22.3欠失を有する、重度成長発達遅滞、多発奇形の男児例。

日本人類遺伝学会(第67回)(2022年12月14-17日 横浜市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
井原健二	他の疾患・条件に伴う糖尿病	日本小児内分泌学会編	小児内分泌疾患の診断と治療	診断と治療社	東京	2022年	244-246

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
井原健二	遺伝病と遺伝相談：近未来の小児科のあり方	小児科 (臨時増刊号)	63(13)	1506-1512	2022
Kato H, Koshizaka M, Kaneko H, Maezawa Y, Yokote K.	Lifetime extension and the recent cause of death in Werner syndrome: a retrospective study from 2011 to 2020.	Orphanet J Rare Dis.	17(1)	226	2022
Kinoshita D, Kato H, Kaneko H, Ito H, Teramachi N, Tsukagoshi A, Maeda Y, Minamizuka T, Hayashi A, Shoji M, Sawada D, Funayama S, Koshizaka M, Ogata H, Kubota Y, Mitsukawa N, Takemoto M, Yokote K, Maezawa Y.	Case of Werner syndrome with significant improvement of refractory skin ulcer despite fibroblast cellular senescence.	Case Reports in Geriatr Gerontol Int.	23(3)	239-241	2023
Nagai T, Yokouchi H, Miura G, Komshizaka M, Maezawa Y, Oshitari T, Yokote K, Baba T.	Optical coherence tomography findings in three patients with Werner syndrome.	BMC Ophthalmol.	22(1)	448	2022

Sugawara S, Okada R, Loo TM, Tanaka H, Miyata K, Chiba M, Kawasaki H, Katoh K, Kaji S, Maezawa Y, Yokote K, Nakayama M, Oshima M, Nagao K, Obuse C, Nagayama S, Takubo K, Nakaniishi A, Kanemaki TM, Hara E, Takahashi A.	RNaseH2A downregulation drives inflammatory gene expression via genomic DNA fragmentation in senescent and cancer cells.	Commun Biol.	5(1)	1420	2022
Miller DE, Lee L, Galey M, Kandhaya-Pillai R, Tischkowitz M, Amalnath D, Vithlanani A, Yokote K, Kato H, Maezawa Y, Takada-Watanabe A, Takemoto M, Martin GM, Eichler EE, Hisama FM, Oshima J.	Targeted long-read sequencing identifies missing pathogenic variants in unsolved Werner syndrome cases.	J Med Genet.	59(11)	1087-1094	2022
Kaneko H, Kawasabe C, Seki J, Ikawa Y, Yachie A, Funato M.	Intellectual disability and abnormal cortical neuron phenotypes in patients with Bloom syndrome.	J Hum Genet	in press		2023
Okada Y, Funato M, Takeda S, Kaneko H.	Duchenne muscular dystrophy diagnosis using fibroblast-derived myotube cells.	Pediatr Int	doi: 10.1111/ped.15151.		2022
Kaneko H, Takemoto M, Murakami H, Ihara K, Koyasaki R, Motegi SI, Taniguchi A, Matsuo M, Yamazaki N, Nishigori C, Takita J, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K.	Rothmund-Thomson syndrome investigated by two nationwide surveys in Japan	Pediatr Int	doi: 10.1111/ped.15120.		2022

第65回 日本糖尿病学会年次学術集会

▶ HOME

開催形式について

▶ 会長挨拶

▶ 開催概要

▶ 海外演者のご紹介

▶ プログラム

▶ 抄録検索Webアプリ

▶ 日本糖尿病医療学学会合同企画（ハイブリッド開催）

▶ オンライン参加登録

▶ 参加者へのご案内

▶ 発表者・座長の方へのご案内

▶ ポスター作製に関して

▶ プレス申込

▶ 関連学会告知・広報のお申込み

▶ 宿泊に関して

▶ 演題募集（一般演題）

▶ 企業協賛のご案内

▶ 各種お問い合わせ先・リンク

NOSTER®

TEIJIN 帝人ファーマ株式会社

おいしいと健康



“適正糖質”で、
おいしさも健康も
あきらめない。

ThermoFisher
SCIENTIFIC

OFFICIAL TRAVEL GUIDE OF

KOBE

特設サイト



プログラムの配信は終了いたしました

5月12日（木）～14日（土）の3日間、神戸会場ならびにライブ配信にて多くの方にご参加いただき、盛会のうちに終了いたしました。また6月1日(金)より行っておりましたオンデマンド配信につきましても、7月11日(月)をもって終了いたしました。改めて、皆様方のご支援・ご協力に深く感謝申し上げます。

お問い合わせの際は下記「よくあるお問い合わせ」をご確認の上、
メールにてご連絡をお願いいたします。

よくあるお問い合わせ



【第65回日本糖尿病学会年次学術集会 運営準備室】

E-mail : 65jds@convention.co.jp

オンライン参加登録済の方でIDやパスワードに関するお問い合わせは、
下記へメールにてご連絡をお願いいたします。

【第65回日本糖尿病学会年次学術集会 オンライン参加登録サポートデスク】

E-mail : 65jds@reg-convention.com

知の輝きと技の高みへ —人の集いがつくる明日の糖尿病学—

現地開催・LIVE配信

2022年

5月12日(木)～14日(土)

オンデマンド配信期間

2022年

6月1日(水)～30日(木)

会場 神戸ポートピアホテル、
神戸国際展示場、神戸国際会議場

会長 小川 渉

神戸大学大学院医学研究科 内科学講座
糖尿病・内分泌内科学部門 教授

注目 👁️ /
Welcome to
KOBE!

開催形式のご案内（2022年2月9日時点）



シンポジウム 29

第3日 5月14日(土) 8:30~11:00 第11会場 神戸国際会議場 1F メインホール

New perspectives on research for aging and metabolism

老化と代謝研究の新展開

座長 片桐 秀樹 東北大学糖尿病代謝内科学分野
山縣 和也 熊本大学大学院生命科学研究部病態生化学

-
- S29-1 **Restoring metabolism of myeloid cells reverses cognitive decline in ageing**
Katrin Andreasson
Department of Neurology and Neurological Sciences, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA
-
- S29-2 **Productive Aging の世紀を迎えて—哺乳類における老化・寿命制御機構の理解と抗老化医療の社会実装—**
今井 眞一郎
ワシントン大学医学部発生生物学部門・医学部門(兼任)/国立研究開発法人国立長寿医療研究センター
-
- S29-3 **Intracellular glucose/NAD metabolism affects β -cell function and identity in aging and diabetes**
村尾 直哉
藤田医科大学医学部内分泌・代謝・糖尿病内科学
-
- S29-4 **Proinsulin and β -cell aging**
佐藤 叔史
熊本大学大学院生命科学研究部病態生化学講座
-
- S29-5 **Glucose metabolism and lifespan**
片桐 秀樹
東北大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科学分野
-
- S29-6 **Progeroid syndrome and insulin resistance**
加藤 尚也
千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学/千葉大学医学部附属病院糖尿病・代謝・内分泌内科
-

タイトル (60 文字以内): Progeroid syndrome and insulin resistance (41 文字)

アブストラクト (2000 文字以内):

It is widely known that the insulin resistance of the human body increases with aging. Age-related organismal visceral fat accumulation and sarcopenia are contributing factors to insulin resistance. At the cellular level, various abnormalities such as mitochondrial dysfunction, increased inflammatory signals, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and impaired autophagy underlie these conditions. Progeroid syndromes caused by abnormal DNA damage responses exhibit symptoms that mimic general aging from an early age. In particular, Werner syndrome, which is considered a model disease of human aging due to the acceleration of aging-like symptoms after puberty, is markedly associated with early onset of diabetes, dyslipidemia, and atherosclerotic diseases, and the average age of death is in the 50s. We have previously found that patients with Werner syndrome manifest remarkable visceral fat accumulation and sarcopenia, which are closely associated with insulin resistance and diabetes. In basic research, we also discovered abnormalities in Werner syndrome-derived cells, such as accumulation of dysfunctional mitochondria and increased endoplasmic reticulum stress, which might contribute to the development of insulin resistance and diabetes. Furthermore, we have found that these underlying abnormalities can be ameliorated by anti-aging therapeutics. This symposium will discuss the pathophysiology and treatment of insulin resistance associated with aging, based on discoveries through clinical and basic research of progeroid syndromes.

(1561 文字)

第64回日本老年医学会学術集会 日程および次第

(「P. 数字」の数字は、抄録が掲載されているページを示す。)

会長 楽木 宏実 (大阪大学大学院医学系研究科老年・総合内科学教授)
テーマ：幸福長寿実現のための老年医学：知と技の結集

理事長講演 (6月2日 13:20~13:50) P.1 日本老年医学会：最近のあゆみと今後の計画 座長：楽木 宏実 (大阪大学大学院医学系研究科老年・総合内科学) 演者：秋下 雅弘 (東京大学大学院医学系研究科老年病学)	特別講演2 (6月3日 14:35~15:25) P.5 認知症科学の未来：アルツハイマー病の疾患修飾療法に向けて 座長：秋下 雅弘 (東京大学大学院医学系研究科老年病学) 演者：岩坪 威 (東京大学大学院医学系研究科/国立精神・神経医療研究センター神経研究所)
会長講演 (6月2日 14:40~15:10) P.2 幸福長寿実現のための老年医学：知と技の結集 座長：荻原 俊男 (森ノ宮医療大学) 演者：楽木 宏実 (大阪大学大学院医学系研究科老年・総合内科学)	特別講演3 (6月4日 10:35~11:25) P.6 老いとケアの現象学 座長：葛谷 雅文 (名鉄病院) 演者：榊原 哲也 (東京女子大学現代教養学部人文学科哲学専攻)
海外招請講演 (6月2日 18:30~19:10) P.3 Treatment strategies in old hypertensive subjects according to their functional status 座長：荒井 秀典 (国立長寿医療研究センター) 演者：Athanas Benetos (President of the European Geriatric Medicine Society (EuGMS) / The Geriatric Department, University Hospital of Nancy, The FHU-CARTAGE, Université de Lorraine)	尼子賞受賞講演 (6月2日 12:50~13:20) P.7 老年医学の進歩と社会実装 座長：秋下 雅弘 (東京大学大学院医学系研究科老年病学) 演者：大内 尉義 (国家公務員共済組合連合会虎の門病院)
特別講演1 (6月2日 13:50~14:40) P.4 免疫研究と臨床応用～神経免疫代謝連関の話題も含めて～ 座長：神崎 恒一 (杏林大学医学部高齢医学) 演者：熊ノ郷 淳 (大阪大学医学系研究科)	教育講演1 (老年医学研究シリーズ) P.8 個体老化と細胞老化の基礎研究 シリーズ座長：新村 健 (兵庫医科大学総合診療内科) 演者：清水 孝彦 (国立長寿医療研究センター・老化ストレス応答研究PT)
	教育講演2 (老年医学研究シリーズ) P.8 自然老化マウスの育成と加齢変化一亜系統の比較からエンドポイント設定一 シリーズ座長：新村 健 (兵庫医科大学総合診療内科) 演者：小木曾 昇 (国立長寿医療研究センター研究所研究推進基盤センター)

教育講演 3 (老年医学研究シリーズ) P.8

ゲノム情報を活用した認知症予防と老年医学

シリーズ座長: 新村 健 (兵庫医科大学総合診療内科)

演者: 池内 健 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)

教育講演 4 (老年医学研究シリーズ) P.9

早老症診療の Up-to-date

シリーズ座長: 新村 健 (兵庫医科大学総合診療内科)

演者: 竹本 稔 (国際医療福祉大学医学部糖尿病・代謝・内分泌内科学)

教育講演 5 (老年医学研究シリーズ) P.9

経済産業省におけるヘルスケア ICT 関連施策

シリーズ座長: 新村 健 (兵庫医科大学総合診療内科)

演者: 飯村 康夫 (経済産業省商務・サービスグループヘルスケア産業課)

教育講演 6 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 1) P.9

ICOPE ガイドラインに学ぶ高齢者のための包括的ケア

シリーズ座長: 北岡 裕章 (高知大学老年病・循環器内科学)

演者: 浦野 友彦 (国際医療福祉大学医学部老年病学講座)

教育講演 7 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 1) P.10

高齢者総合機能評価を日常診療にどう活かすか

シリーズ座長: 北岡 裕章 (高知大学老年病・循環器内科学)

演者: 川嶋 修司 (国立研究開発法人国立長寿医療研究センター)

教育講演 8 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 1) P.10

フレイル, サルコペニアの評価を日常診療に活かす

シリーズ座長: 北岡 裕章 (高知大学老年病・循環器内科学)

演者: 若林 秀隆 (東京女子医科大学大学院医学研究科リハビリテーション科学講座)

教育講演 9 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 1) P.10

高齢者の安全な薬物療法について

シリーズ座長: 北岡 裕章 (高知大学老年病・循環器内科学)

演者: 江頭 正人 (東京大学大学院医学系研究科医学教育学)

教育講演 10 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 1) P.11

低栄養に対する多職種協働アプローチ

シリーズ座長: 北岡 裕章 (高知大学老年病・循環器内科学)

演者: 前田 圭介 (国立長寿医療研究センター老年内科)

教育講演 11 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 2) P.11

治療可能な認知症“iNPH”と治療可能な症状“BPSD”に対する早期診断と治療

シリーズ座長: 長井 篤 (鳥根大学医学部内科学第三)

演者: 数井 裕光 (高知大学医学部神経精神科学講座)

教育講演 12 (老年科医が老年医学を究めるシリーズ 2) P.11

高齢者の運転免許証: 日常診療で対応のエッセンス

シリーズ座長: 長井 篤 (鳥根大学医学部内科学第三)

演者: 武原 格 (東京都リハビリテーション病院リハビリテーション科/東京慈恵会医科大学リハビリテーション医学講座)

シンポジウム 32 (高齢者医療委員会)

(6月4日 12:40~14:40)

P.78

高齢者オンライン診療の課題と未来

- 座長：野村 和至 (医療法人社団野村医院)
 本間 聡起 (独立行政法人地域医療機能推進機構埼玉メディカルセンター)
 演者：野村 和至 (医療法人社団野村医院/東京大学大学院医学系研究科老年病学)
 本間 聡起 (独立行政法人地域医療機能推進機構埼玉メディカルセンター)
 山口 潔 (医療法人社団創福会ふくろうクリニック等々力)
 池端 幸彦 (医療法人池慶会池端病院/福井県医師会/日本慢性期医療協会)
 米澤 麻子 (株式会社 NTT データ経営研究所)
 新谷 正義 (衆議院議員)

シンポジウム 33 (6月4日 12:40~14:10)

P.81

誤嚥性肺炎の予防・治療・ケア・EOL

- 座長：前田 圭介 (国立長寿医療研究センター老年内科)
 若林 秀隆 (東京女子医科大学病院リハビリテーション科)
 演者：吉松 由貴 (Greenwich University/Queen Elizabeth Hospital)
 高島 英昭 (長崎大学病院リハビリテーション科)
 森川 暢 (市立奈良病院)
 渡邊 一久 (名古屋大学医学部附属病院老年内科)

シンポジウム 34 (エンドオブライフに関する小委員会)

(6月4日 13:50~15:50)

P.83

ACPのあり方を検討するーよりよい人生の集大成支援のために

- 座長：勝谷 友宏 (医療法人社団勝谷医院)
 会田 薫子 (東京大学大学院人文社会系研究科死生学・応用倫理センター上席講座)
 演者：柳川まどか (名古屋鉄道健康保険組合名鉄病院老年内科)
 三浦 久幸 (国立長寿医療研究センター)
 山口 泰弘 (自治医科大学附属さいたま医療センター)
 西川 満則 (国立長寿医療研究センター)
 弓野 大 (医療法人社団ゆみの)

シンポジウム 35 (6月4日 14:20~15:50)

P.85

第2期老年医学推進5か年計画に向けて(2)老年医学会次世代による未来への挑戦

- 座長：横手幸太郎 (千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学)
 飯島 勝矢 (東京大学高齢社会総合研究機構/未来ビジョン研究センター)
 演者：飯島 勝矢 (東京大学高齢社会総合研究機構/未来ビジョン研究センター)
 加藤 尚也 (千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学)
 田中 友規 (東京大学高齢社会総合研究機構)
 田村 嘉章 (東京都健康長寿医療センター糖尿病・代謝・内分泌内科)

シンポジウム 36 (6月4日 14:20~15:50)

P.87

高齢者の心不全パンデミックに備える

- 座長：大石 充 (鹿児島大学心臓血管・高血圧内科学)
 木田 圭亮 (聖マリアンナ医科大学薬理学)
 演者：青山 里恵 (船橋市立医療センター)
 大木元明義 (市立宇和島病院循環器内科)
 矢島あゆむ (佐賀大学医学部循環器内科)
 窪田 琢郎 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心臓血管・高血圧内科学)

委員会特別企画1 (教育委員会) (6月2日 16:55~18:25)**若手・基礎ミーティング**

- 座長：武地 一 (藤田医科大学医学部認知症・高齢診療科)
 竹屋 泰 (大阪大学大学院医学系研究科老年看護学)

シニアアドバイザー：

- 古川 勝敏 (東北医科薬科大学医学部地域医療学)
 里 直行 (国立長寿医療研究センター)
 小島 太郎 (東京大学医学部附属病院老年病科)

第 64 回日本老年医学会学術集会一般演題

(プログラム)

一般演題査読者 (63名・50音順)

会田 薫子	阿部 康二	荒木 厚	飯島 節	飯島 勝矢	石橋 英明	乾 明夫
植村 和正	梅垣 宏行	浦上 克哉	浦野 友彦	江崎 貞治	江頭 正人	海老原 覚
海老原孝枝	大石 充	大黒 正志	大八木保政	小川 純人	金子 英司	亀山 祐美
来住 稔	北岡 裕章	小柴 賢洋	小島 太郎	小原 克彦	小林 一貴	駒津 光久
古和 久典	近藤 和泉	近藤 克則	近藤 祥司	紺家千津子	櫻井 孝	佐竹 昭介
里 直行	真田 弘美	島田 裕之	新村 健	杉本 研	鈴木 隆雄	鈴木 裕介
須藤 紀子	千田 一嘉	武田 朱公	武地 一	竹屋 泰	田妻 進	田村 嘉章
徳田 治彦	富田 尚希	新野 直明	長谷川 浩	藤原 佳典	古川 勝敏	松井 康素
丸山 光生	三浦 久幸	水野 有三	山口 泰弘	山田 実	倭 英司	横手幸太郎

第 2 日 大阪国際会議場 10F 第 6 会場 (会議室 1006-1007)

一般演題 口述発表 0-76—0-101

8:00~9:12 (0-76—0-81) 個体老化・早老症・老化マーカー・GWAS

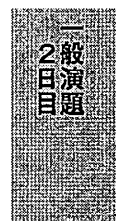
座長：前澤 善朗 (千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学)

- 0-76. ウェルナー症候群 41 例の 3 年間の経過報告
(千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学)前田祐香里, 越坂理也, 正司真弓, 前澤善朗, 横手幸太郎
- 0-77. 遺伝性早老症 Werner 症候群の脂肪組織における老化促進メカニズムの解明
(千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院小児病態学²⁾澤田大輔¹⁾, 加藤尚也¹⁾, 前澤善朗¹⁾, 木下大輔¹⁾, 船山真一郎¹⁾, 金子ひより¹⁾, 南塚拓也¹⁾, 越坂理也¹⁾, 塩浜 直²⁾, 横手幸太郎¹⁾
- 0-78. 早老症ウェルナー症候群 iPS 細胞由来間葉系幹細胞の創傷治療における有用性
(千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院イノベーション再生医学²⁾, 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学³⁾, 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)⁴⁾船山真一郎¹⁾, 加藤尚也¹⁾, 前澤善朗¹⁾, 高山直也²⁾, 大内靖夫²⁾, 岩間厚志³⁾, 江藤浩之⁴⁾, 横手幸太郎¹⁾
- 0-79. 高齢者の非特異的慢性疼痛におけるゲノムワイド関連解析
(国立長寿医療研究センター整形外科¹⁾, 国立長寿医療研究センター運動器疾患研究部²⁾, 国立長寿医療研究センター老年社会学研究センター³⁾) 酒井義人¹⁾, 渡邊 剛¹⁾, 若尾典充¹⁾, 松井寛樹¹⁾, 渡邊研²⁾, 島田裕之³⁾
- 0-80. 超高齢者・百寿者における血中高分子アディポネクチン濃度と生存時間解析
(慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター¹⁾, 北海道大学大学院医学研究院公衆衛生学教室²⁾, 慶應義塾大学医学部予防医療センター³⁾) 佐々木貴史¹⁾, 平田 匠²⁾, 阿部由紀子¹⁾, 高山美智代³⁾, 新井康通¹⁾
- 0-81. 小胞体ストレスが早老症ウェルナー症候群の老化促進に与える影響の解明
(千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院イノベーション再生医学²⁾, 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学³⁾, 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)⁴⁾金子ひより¹⁾, 加藤尚也¹⁾, 前澤善朗¹⁾, 大内靖夫²⁾, 高山直也²⁾, 岩間厚志³⁾, 江藤浩之⁴⁾, 横手幸太郎¹⁾

9:20~10:20 (0-82—0-86) 総合的機能評価

座長：伊奈孝一郎 (伊奈クリニック)

- 0-82. DASC-8 による高齢者の認知機能・ADL のカテゴリー分類は、死亡と新規要介護認定のリスクを反映する
(東京都健康長寿医療センター糖尿病・代謝・内分泌内科¹⁾, 東京都健康長寿医療センター循環器内科²⁾, 東京都健康長寿医療センター研究所認知症未来社会創造センター³⁾) 勝俣 悠¹⁾, 豊島堅志¹⁾, 全 秀剛¹⁾, 小寺玲美¹⁾, 大庭和人¹⁾, 石川譲治²⁾, 田村嘉章¹⁾, 千葉優子¹⁾, 粟田主一³⁾, 荒木 厚¹⁾
- 0-83. 高齢者総合機能評価に適した聴覚スクリーニング測定用アプリケーションの開発
(東北大学病院加齢・老年病科¹⁾, 東北大学病院耳鼻咽喉・頭頸部外科²⁾, 東北大学加齢医学研究所臨床加齢医学研究分野³⁾) 冨田尚希¹⁾, 佐藤剛史²⁾, 本蔵陽平²⁾, 鈴木 淳²⁾, 香取幸夫²⁾, 瀧 靖之³⁾
- 0-84. 日本における 90 歳超高齢者の若返り現象の検証
(大阪大学大学院人間科学研究科臨床死生学・老年行動学教室) 松本清明, 権藤恭之, 春日彩花, 川崎悠丘



日本老年医学会雑誌

J a p a n e s e J o u r n a l o f G e r i a t r i c s



Vol. 59

臨時
増刊号

MAY
2022

学術集会講演抄録集

第64回日本老年医学会学術集会



一般社団法人日本老年医学会

日 老 医 誌
Nippon Ronen Igakkai Zasshi

4. 早老症診療の Up-to-date

竹本 稔

国際医療福祉大学医学部糖尿病・代謝・内分泌内科学

早老症あるいは早期老化症候群 (progeroid syndrome, premature aging syndromes) では暦年齢に比較して加齢現象が促進して観察される。特定の早老徴候が特定の臓器に誇張された形で観察されることより、部分的早老症候群 (segmental progeroid syndrome) とも呼ばれる。その代表例として Werner syndrome (以下 WS と略)、Hutchinson-Gilford Progeria 症候群 (以下 HGPS と略) や Rothmund-Thomson 症候群 (以下 RTS と略) が知られる。WS は思春期以降に発症し、がんや動脈硬化のため 50 歳半ばで死亡し、国内推定患者数は約 700~2,000 名、世界の報告の 6 割を日本人が占める。2013 年には診断基準改訂と世界初の WS 診療ガイドラインが作成され、2014 年、重症度分類が作成され、2014 年 5 月指定難病に指定された。2021 年には診療ガイドラインが Geriatr Gerontol Int 誌に公表された。HGPS は 1~2 歳時に早老徴候が出現し、10 歳代ではほぼ全例が死亡する重篤な小児疾患であり、2013 年に施行された全国調査により、我が国で 6 名の患者が新規に同定され、2017 年には世界初の HGPS 診断基準が作成され、2019 年 4 月指定難病に指定された。RTS は特徴的な皮膚所見が乳児期から認められ骨格異常や癌腫を合併する。2018 年に施行された全国調査により 10 名の患者が同定され、診断基準が改定された。本教育講演では WS を中心に、これまでの早老症に関する臨床や研究の進歩に関して概説したい。

5. 経済産業省におけるヘルスケア ICT 関連施策

飯村 康夫

経済産業省商務・サービスグループヘルスケア産業課

新型コロナウイルス感染症の拡大や超高齢化社会の進展等により社会構造が大きく変革する中で、新たなヘルスケア商品・サービスが生まれているが、質の高い商品・サービスを市場に供給することによる健全な産業振興を図る必要がある。

こうした中、ICT の活用は、健康寿命延伸や医療保険制度の持続性確保といった課題の解決に不可欠である。厚生労働省を中心にデータヘルス改革が進められ、健康・医療・介護分野における ICT の活用が検討されている。マイナポータルを活用した自身の健康記録等をスマホ等で管理できる仕組みが整備され、昨年 10 月からは新たに特定健診の記録等が提供されている。

経済産業省では、そうした個人の健康記録 (PHR: Personal Health Record) を取扱う民間 PHR サービス事業者が遵守すべき事項を「民間 PHR 事業者による健診等情報の取扱いに関する基本的指針」として、総務省、厚生労働省とともに策定するなど、PHR の利用促進に向けて取り組んでおり、その概要を紹介する。

また、日本医療研究開発機構 (AMED) 事業として、厚生労働省と経済産業省が連携して、2020 年度から予防・健康づくりの健康増進効果等のエビデンスを確認・蓄積するための実証事業を行っている。さらに、認知機能低下の抑制や心の健康保持増進、健康データを医療現場等で活用する手法等をテーマとした実証事業を行い、ヘルスケアサービスの社会実装に繋がるエビデンスを構築し、併せて、構築されたエビデンスを精査し、社会実装に必要な論点や評価指標等を整理し、適切かつ効果的にヘルスケアサービスが活用される仕組みを目指す「予防・健康づくりの社会実装に向けた研究開発基盤整備事業」についても紹介する。

本事業においては、「学術団体 (学会等) による予防・健康づくりに関するガイドライン等の策定」及び「予防・健康づくりに関するエビデンス構築のための新たなアプローチの研究開発」の研究課題を 2022 年度から公募し、アカデミア主導による予防・健康づくり領域の社会実装に向けた取組みを進めることとしている。

6. ICOPE ガイドラインに学ぶ高齢者のための包括的ケア

浦野 友彦

国際医療福祉大学医学部老年病学講座

ユニバーサル・ヘルス・カバレッジ (Universal Health Coverage (UHC)) とは、「全ての人が適切な予防、治療、リハビリ等の保健医療サービスを、支払い可能な費用で受けられる状態」を指す。UHC は、国連の「持続可能な開発計画 (SDGs)」の目標 3「すべての人に健康と福祉を」の達成の基盤になるものである。我が国においては、この目標を達成するためには、増加する高齢者の健康・社会的ケアのニーズを考慮することは必須である。

現在の医療システムは、急性の疾患や症状に対応するように設計されているが、加齢に伴う複雑で慢性的な健康に関する対応は不十分であると思える。高齢者において、包括的なプライマリヘルスケアのアプローチを構築し、実施することで、ADL 低下を予防・改善することが現在の大きな課題となっている。統合ケアアプローチは、地域に根差し、サービス提供者のニーズではなくサービスを受ける高齢者のニーズに沿って設計され、介護制度と効果的に連携する必要がある。

そういった背景の中、高齢者のための包括的ケア (integrated care for older people: ICOPE) ガイドラインは、世界保健機関 (WHO) の Department of Ageing and Life Course がまとめたものである。ICOPE ガイドラインは医療従事者に地域レベルでの適切なアプローチについてエビデンスに基づくガイダンスを提供し、重大な身体的および精神的な能力低下を見いだして管理すると共に、介護者支援のための介入を提供することを目的としている。ICOPE ガイドラインは「高齢者の健康状態に関する包括的な評価」「高齢者が身体的・精神的な能力を維持し、その低下を遅らせたり改善したりできる統合ヘルスケアの提供」「介護者を支援するための介入方法の提供」といった項目についてエビデンスに基づいた方向性を提示している。

本教育講演では ICOPE ガイドラインの主要な項目を概説する。本講演が地域医療を担う医療従事者の方々の一助となるならば幸いである。

シンポジウム 35

第 2 期老年医学推進 5 か年計画に向けて (2) 老年医学会次世代による未来への挑戦

座長のこぼ

座長 横手幸太郎 (千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学)
飯島 勝矢 (東京大学高齢社会総合研究機構/未来ビジョン研究センター)

世界最長寿国となった我が国において、高齢化の進展に伴う様々な医学的かつ社会的な諸課題が山積している。その解決のため、日本老年医学会は 2018 年に 5 つのテーマからなる「健康長寿達成を支える老年医学推進 5 か年計画」を策定し推進してきた。様々な疾患や病態が重複し、完治を望めない状態に置かれている方々も少なくない中で、特に高齢の方々に対して、どのような快活な生活を、そして安心ある日常生活を提供できたのか、改めてその進捗と成果をしっかりと評価していく時期にも来ている。さらに、これらの取り組みも踏まえ、より見えてきた課題にも対応できるよう、次なる展開も見定めていく段階にも来ている。本シンポジウムでは、「第 2 期老年医学推進 5 か年計画に向けて」として、特に日本老年医学会の次世代メンバーにご登壇いただき、基礎老化研究から地域フィールド研究、さらには、高齢者医療の臨床に加え、老年医学における医学教育までを包含する形で多面的なアプローチを共有し合い、期待される未来への挑戦を考えてみたい。

1. 座長ミニスピーチ「老年医学における多面的視点からのさらなる飛躍」

飯島 勝矢

東京大学高齢社会総合研究機構/未来ビジョン研究センター

2. 「老化」を治療する～早老症研究から見た抗老化医療の今後の展望～

加藤 尚也¹⁾、前澤 善朗^{1,2)}、横手幸太郎^{1,2)}

千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾、千葉大学医学部附属病院糖尿病・代謝・内分泌内科²⁾

加齢はあらゆる老化関連疾患における最大のリスクファクターであり、近年、「老化」そのものが「病気」であるとする概念が広まってきた。これを治療することを目指す科学分野を、“Geroscience” (ジェロサイエンス) と呼ぶ。ジェロサイエンスでは、老化の 9 つのホールマークとして知られる以下の要素に対処する必要がある。すなわち、ゲノム不安定性、テロメアの短縮、エピゲノムの変化、タンパク質恒常性の喪失、栄養感知の制御異常、ミトコンドリア機能異常、細胞老化、幹細胞の消耗、細胞間コミュニケーションの変化である。ウェルナー症候群やハッチンソン・ギルフォード症候群に代表される早老症は、老化の 9 つのホールマークを早期から示すことが知られており、「老化のモデル疾患」として世界中で広く研究が行われている。これら早老症の動物モデルや、疾患 iPS 細胞等を用いた研究により、NAD⁺増強剤であるニコチンアミドリボシドや、メトホルミン、ラバマイシンの投与が、細胞老化の抑制や動物モデルの寿命延長をもたらすことが明らかとなっている。更には、山中 4 因子をモデル動物内で強制発現させることによる「若返り」や、老化細胞を動物内で除去する“Senolytics” (セノリティクス) の投与によって、動物モデルの寿命が延長することが報告された。これらの研究結果から、一般老化を視野に入れた将来的な臨床応用に向けて、様々なプロジェクトが世界的に進行中である。本シンポジウムでは、ジェロサイエンスがもたらす抗老化医療の今後の展望や多様な応用への可能性について、最新の知見を交えながら議論する。

3. 地域実装研究から次なる時代の地域の在り方を探る：アカデミアと地域フィールドとの二人三脚で未来の地域を描く

田中 友規

東京大学高齢社会総合研究機構

老年医学の新たなアウトカムの 1 つとして、フレイルが注目を集めている。フレイル対策は、生活機能が損なわれる前段階の、より早期からの予防が重要視されている。また、フレイル状態の進行が見られる高齢者をいかに見つけ出し、然るべき介入や支援を施すか、その体制整備も重要である。したがって、当事者である高齢住民自身が地域で自然とフレイル対策に取り組むことができるような地域づくりが必要である。フレイル対策の地域づくりを効率的かつ有効性をもって推進するには、老年医学的視点を持ったアカデミアが自治体と二人三脚で課題解決と地域実装を仕掛けていくことが不可欠である。

東京大学高齢社会総合研究機構では、既定の研修を受けた高齢住民「フレイルサポーター」が主体の地域活動「フレイルチェック」を開発、全国の自治体への導入を進めている。フレイルチェックでは、参加者やサポーターはもちろん、自治体全体へのフレイル概念の普及啓発により、全住民がフレイル予防に対する関心を高め、生活改善を促すことを期待している。また重度なフレイル状態にある高齢者を医療・介護の介入や見守りへとアウトリーチする体制も同時に整備するスキームとしている。

今回、自治体行政や住民、産業との連携によるフレイル対応型の地域づくりについて、実際のプロセスと共に概説し、(1) フレイルチェックの参加が高齢者の意識変容・予防行動促進に有効か、地域全体への介入効果が期待できるか、(2) 自治体に眠る KDB データ等を活用しながら、フレイルチェックを中心とした保健事業と介護予防の一体的実施の取り組みを中心に報告する。

今回、フレイル対策を中心とした地域実践研究の経験と知見を加味しながら、老年医学者を志す我々と地域マルチステークホルダーが織りなす、次なる時代の地域の在り方と可能性に言及したい。

田中友規¹⁾, 菅谷賢司²⁾, 吉田みどり²⁾, 吉澤裕世³⁾, 孫 輔卿¹⁾, 呂 偉達⁴⁾, 飯島勝夫⁴⁾

【目的】高齢者特有の多面的な課題に対応できる保健事業の充実を目指し、フレイル状態を把握する「後期高齢者の質問票」が策定、全国自治体で活用されている。目的は、後期高齢者の医療介護レセプトデータを活用し、本質問票が要介護新規認定を予測し得るかを明らかにすることである。【方法】対象は千葉県柏市における2020年度後期高齢者健康診断の受診者20,151名の内(受診率36.8%)、介護認定情報不明者、受診前より既認定者、後期高齢者の質問票に未回答、追跡中に転居/死亡した者を除外した18,130名(平均80.1±4.1歳、女性55.1%)である。要介護認定状況は、2022年1月まで追跡した。医療レセプトデータより健診受診時の後期高齢者の質問票、年齢、性別、世帯数、BMI、ICD-10コードからチャールソン併存疾患指数、筋骨格系・結合組織の疾患の有無を評価した。【結果】追跡期間中、727名(4.0%)が新たに要介護認定を受けた(追跡日数中央値[4分位範囲]=457[408-519]日)。後期高齢者の質問票総得点の要介護新規認定に対する予測能は中程度であったが(平均2.3±1.9点;ROC曲線下面積=70%)、併存疾患指数を加味することで有意に改善した(ROC曲線下面積=74%)。要介護新規認定に対する予測精度は総得点3/4を閾値とした場合に最適となり(該当率23%、感度54%、特異度78%)、年齢や併存疾患状況とは独立して要介護新規認定のハザード率が高かった(調整ハザード比(95%信頼区間)=2.5(2.1-2.9))。【結論】後期高齢者の質問票は要介護新規認定を予測可能であり、併存疾患状況を踏まえることで予測精度が向上することが明らかとなった。本質問票を活用したフレイル状態の把握と全身疾患状況を踏まえ、保健指導と介護予防を一体的に取組むことが、自立期間の延伸に寄与する可能性がある。

O-76

ウェルナー症候群41例の3年間の経過報告

千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学
前田祐香里, 越坂理也, 正司真弓, 前澤善朗, 横手幸太郎

【目的】ウェルナー症候群(Ws)は成人発症の早老症であり、若年より様々な老化徴候を呈し、代謝性疾患や心筋梗塞、悪性腫瘍などを合併する。本疾患の症候と経年変化を明らかにすることを目的とした。【方法】WSレジストリに症例登録を行い、患者背景、主要徴候、合併症、遺伝子変異、検査結果、その他の臨床指標について、初回調査時から経年的に収集した。初年時の横断的解析、初年時と各年の縦断的解析を行った。ピアソンのカイ二乗検定、Wilcoxon符号付順位検定を用いた。【結果】41名のWS患者が登録された。WSの主要徴候は9割以上、下肢潰瘍を7割の症例に認めた。糖尿病、脂質異常症は7割、高血圧症は4割に認めた。悪性腫瘍の平均発症年齢は50.7歳であり、30代から発症し、3年間の調査期間中に約25%の症例にみられた。上皮性及非上皮性腫瘍の割合は1:1であった。腎機能は初年時の平均eGFRcre 97.8mL/min/1.73m²に対し平均eGFRcysは72.5mL/min/1.73m²とCreとCysの間に乖離を認めた。縦断的解析では、初年時平均eGFRcre 74.8mL/min/1.73m²、平均体表面積未補正eGFRcre 59.3mL/min/1.73m²、3年後の平均eGFRcre 63.4mL/min/1.73m²、平均体表面積未補正eGFRcre 50.2mL/min/1.73m²と低下が見られた。また同期間の死亡は7例で、平均死亡年齢は56.7歳、内6例は悪性腫瘍が死因であった。【結論】WS患者は悪性腫瘍が若年から発症し非上皮性腫瘍の割合が多いことが判明した。またeGFRcreとeGFRcysに乖離があり腎機能測定に難があること、加えて腎機能低下が速い可能性があるため、使用薬剤の内容や量に注意を要する。WSは心血管イベント、悪性腫瘍、骨髄炎など重症感染症のハイリスクであり、日常診療の中で積極的な検査が必要と考えられる。本疾患の早期診断と予後改善のためには幅広い持続的な啓蒙活動が必要と考えられた。

O-77

遺伝性早老症 Werner 症候群の脂肪組織における老化促進メカニズムの解明

千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾, 千葉

大学大学院医学研究院小児病態学²⁾

澤田大輔¹⁾, 加藤尚也¹⁾, 前澤善朗¹⁾, 木下大輔¹⁾, 船山真一郎¹⁾, 金子ひより¹⁾, 南塚拓也¹⁾, 越坂理也¹⁾, 塩浜 直²⁾, 横手幸太郎¹⁾

【目的】Werner 症候群 (WS) は遺伝性早老症であり、耐糖能異常、脂質異常症を高率に合併し動脈硬化から心筋梗塞に至ることから、代謝異常の制御は重要な課題である。WS では高頻度に内臓脂肪蓄積と皮下脂肪萎縮を認めるが、脂肪組織の早期老化機構は未だ不明である。我々は WS の脂肪組織における老化促進メカニズムの解明を目的とした。【方法】WS 患者由来皮下脂肪組織から Stromal vascular fraction (SVF) を分離し、WS 患者由来 SVF (WSVF) と健常者由来 SVF (HSVF) の細胞老化並びに炎症関連因子 (SASP: senescence associated secretory phenotype) を検討した。また、老化や炎症に関わる分子機構を検索するため、RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行った。加えて、SVF の脂肪分化誘導を行い、脂肪分化能を解析した。【結果】WSVF は HSVF に比べて早期に細胞増殖を停止した。細胞形態は WSVF で扁平化、膨化した老化細胞が増加し、テロメア長は有意に短縮した ($p < 0.01$)。SA β gal 染色では WSVF で陽性細胞の増加を認めた。遺伝子発現解析では WSVF で IL1B, IL6, CXCL8 などの SASP が有意に増加し (いずれも $p < 0.01$)、細胞障害マーカーの CDKN2A が上昇し ($p = 0.094$)、WSVF が細胞老化を呈することが判明した。トランスクリプトーム解析では WSVF で細胞接着や細胞構造に関わる遺伝子群が上昇し、細胞・染色体・核分裂、細胞周期に関わる遺伝子群が低下した。脂肪分化誘導では WSVF で脂肪分化が抑制された。【結論】WSVF は早期老化徴候、SASP 増加、脂肪分化抑制を示し、WS の臨床像に合致していた。

O-78

早老症ウェルナー症候群 iPS 細胞由来間葉系幹細胞の創傷治療における有用性

千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院イノベーション再生医学²⁾, 東京大学医学科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学³⁾, 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)⁴⁾

船山真一郎¹⁾, 加藤尚也¹⁾, 前澤善朗¹⁾, 高山直也²⁾, 大内靖夫²⁾, 岩間厚志³⁾, 江藤浩之⁴⁾, 横手幸太郎¹⁾

【目的】ウェルナー症候群 (WS) は代表的な遺伝性早老症である。WS に特徴的な症候である難治性皮膚潰瘍は癒傷を伴うことで患者の生活の質を著しく低下させ高頻度に下肢切断に至る。しかしその発症機序は未解明である。近年様々な疾患における皮膚潰瘍の治療に間葉系幹細胞 (MSC) の移植が応用されている。そこで我々は WS 由来 MSC の創傷治療における有用性を検討してその機序を解明し WS の病態原因因子を同定することを本研究の目的とした。【方法】健常者及び WS 患者から iPS 細胞を樹立後 MSC へと分化 (iMSC) させ難治性皮膚潰瘍モデルマウスの創傷周囲に注射することで創傷治療効果を検討した。iMSC 投与マウスの Pecam-1 陽性細胞量を比較した。iMSC との共培養における皮膚線維芽細胞の遊走能を検討した。iMSC 培養上清の蛋白質アレイ解析を行った。難治性皮膚潰瘍モデルマウスの創傷周囲に WS-iMSC と VEGF の混合注射を行い創傷治療効果を検討した。iMSC における可溶性 FLT1 (sFLT1) の遺伝子発現を検討した。健常者及び WS 患者の尿中における sFLT1 の含有量を検討した。【結果】健常 iMSC 投与群 (健常群) に比し WS-iMSC 投与群 (WS 群) では有意に創傷治療が遅延していた。WS 群では健常群に比し血管量が有意に減少していた。WS-iMSC との共培養では健常 iMSC との共培養に比し線維芽細胞の遊走能が有意に減少していた。健常 iMSC に比し WS-iMSC では培養上清中の VEGF 含有量が有意に低下していた。VEGF と WS-iMSC の混合投与群では WS 群及び VEGF 群に比し有意に創傷治療が改善していた。健常 iMSC に比し WS-iMSC では sFLT1 の遺伝子発現が有意に上昇し WS-iMSC に VEGF を添加したことで WS 群に比し有意に低下していた。尿中の sFLT1 は健常者において年齢と正の相関を示した。【結論】WS-iMSC の創傷治療効果は減弱しており sFLT1 の増加に伴う VEGF 作用低下に起因している。更に sFLT1 は WS 及び老化の病態関連因子の一部であると考えられる。

O-79

高齢者の非特異的慢性疼痛におけるゲノムワイド関連解析

国立長寿医療研究センター整形外科¹⁾, 国立長寿医療研究センター運動器疾患研究部²⁾, 国立長寿医療研究センター老年社会学研究センター³⁾

酒井義人¹⁾, 渡邊 剛¹⁾, 若尾典充¹⁾, 松井寛樹¹⁾, 渡邊 研²⁾, 島田裕之³⁾

【目的】慢性疼痛は老化による病態基盤を基に加齢とともに増加する。我々は慢性疼痛と骨格筋減少の関連を報告してきたが、疼痛発生に対する病態解明はされていない。本研究では高齢者の原因の明らかでない非特異的慢性疼痛患者データベースから、臨床情報を基にゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。【方法】慢性疼痛で整形外科通院中の原因を臨床的に特定し得ない6ヶ月以上持続する65歳以上の一連の慢性疼痛患者261例(平均78.7歳)を対象とし、研究同意を得て収集したバイオバンク血よりgDNAの提供を受け、Asian Screening Arrayによりタイピングを行った。慢性疼痛を有さない高齢者4,243例の保存血をcontrolとした。Quality control (QC)として性別不一致、kinship>0.25, 1KGp3を用いたPCA, call rate<0.95, MAF<0.001, controlにおけるHWE<1×10⁻³を除外してGWASを行った。【結果】QC後の4,333例(247 cases; 4,086 controls)に対する8,652,029 variantsを用いて行ったGWASの結果では、QQ plotによる観測では関連解析に適しており有意なSNP座位の存在が示唆された。Manhattan plotではgenome-wide significance (p<5×10⁻⁸)を示す4つの座位が同定され、そのうちprotein-coding geneであるCYP4A11, ZNF841, CUBNが有意な結果として示された。また発現制御する可能性のある分子を探索するCausal Network Analysisを実行した結果、最も低いp値であった推定上流因子として、arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA)が同定された。【結論】同定された4遺伝子のうちCYP4A11は脂質代謝や薬物代謝に関わり、アラキドン酸から20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE)の合成を触媒するP450群の主要酵素であり、TRPV1を活性化する血管収縮性メディエーターである。骨格筋における虚血が20-HETE産生を促進することから、この20-HETEが筋由来の疼痛マーカーとして、CYP4A阻害剤が新たな治療薬としての活用が期待される。一方、内因性エンドカンナビノイドと腰痛の関連が報告されており、ACEAが創薬における標的となりうる可能性も示唆される。

O-80

超高齢者・百寿者における血中高分子アディポネクチン濃度と生存時間解析

慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター¹⁾, 北海道大学大学院医学研究院公衆衛生学教室²⁾, 慶應義塾大学医学部予防医療センター³⁾ 佐々木貴史¹⁾, 平田 匠²⁾, 阿部由紀子¹⁾, 高山美智代³⁾, 新井康通¹⁾

【目的】血中高分子 (HMW) アディポネクチン (ADPN) 濃度はインシュリン感受性と相関、BMIと逆相関を示すことから有益な生理活性物質及びバイオマーカーと考えられてきたが、高齢者で有意に総死亡と相関し、高齢者高血圧患者では脳・心血管病の発症リスクの上昇と関連することが報告された。本研究では超高齢者(85-89歳)及び百寿者での血中HMW ADPN濃度測定及び生存時間解析を行った。【方法】超高齢者コホート(85-89歳:1498人,女性52.3%),百寿者コホート(100歳+:812人,女性84.4%)の血中HMW ADPN濃度をELISAにより測定した。血中HMW ADPN濃度を糖尿病の有無での比較、HDLc, BMIとの相関解析を行った。血中HMW ADPN濃度により3群に分類後Kaplan-Meier法を用いて生存時間解析を行った。【結果】血中HMW ADPN濃度は超高齢者・百寿者でも加齢とともに増加傾向を示した(r:男性:0.45,女性:0.38)。糖尿病群の血中HMW ADPN濃度は有意に低値を示した。HDLcは超高齢者及び百寿者ともに相関が認められ、BMIは超高齢者(r:男性:-0.29,女性:-0.34)では逆相関が見れたが、百寿者(r:男性:-0.12,女性:-0.12)では相関が減少した。生存時間解析の結果、超高齢男性では血中HMW ADPN高濃度群で有意に総死亡率が高かったが、超高齢女性及び百寿者では血中HMW ADPN濃度群により総死亡率に差は見られなかった。【結論】超高齢男性では血中HMW ADPN濃度と総死

亡が相関していたが、超高齢女性及び百寿者では血中HMW ADPN濃度は総死亡と相関をしていなかった。百寿者ではBMIとの相関が減少していることから、超高齢女性及び百寿者の血中HMW ADPN濃度は高齢者までとは別の機構により上昇し予後に影響しないことが示唆された。

O-81

小胞体ストレスが早老症ウェルナー症候群の老化促進に与える影響の解明

千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学¹⁾, 千葉大学大学院医学研究院イノベーション再生医学²⁾, 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学³⁾, 京都大学iPS細胞研究所 (CiRA)⁴⁾

金子ひより¹⁾, 加藤尚也¹⁾, 前澤善明¹⁾, 大内靖夫²⁾, 高山直也²⁾, 岩間厚志³⁾, 江藤浩之⁴⁾, 横手幸太郎¹⁾

【目的】ウェルナー症候群 (WS) は思春期以降から老化促進徴候を示すが、その機序の全貌は明らかではない。近年メチオニン制限(MR)による老化抑制効果が報告されているが、WSにおける効果は不明である。今回、WS患者由来皮膚線維芽細胞(以下、WF)を用いたMRの細胞老化抑制効果の検討およびその機序解明を目的とした。【方法】WFを通常培地 (Std), メチオニン制限培地 (MR)で長期培養し、成長曲線、老化関連蛋白発現、SA-β-gal染色陽性率、テロメア長を比較した。次に、MR下での蛋白合成能、小胞体 (ER) ストレス抑制効果を評価した。また、MR下において、ERストレス誘導剤であるThapsigarginを添加し、細胞老化に与える影響を検討した。さらに、健常者およびWSにおいて、電子顕微鏡による皮膚小胞体の形態および末梢血単核球のERストレスを評価した。加えて、線維芽細胞、WSモデル線虫にERストレス阻害剤を投与し、老化抑制・寿命延長効果を検討した。【結果】WFの長期培養において、成長停止に至った分裂回数は、Std 16.4, MR 19.2であり、MRにより細胞増殖能が改善し、老化関連蛋白p16およびp21の発現低下を認めた。また、MRによりSA-β-gal染色陽性率の低下 (Std 52.3%, MR 32.6%) およびテロメア長の短縮抑制を認めた。さらに、MRによって蛋白合成の低下、ERストレス関連蛋白の発現低下を認め、ERストレスの促進により細胞老化が促進した。WSは健常者に比較し、皮膚組織の小胞体拡張および末梢血単核球のERストレス亢進を認めた。加えて、ERストレスの抑制により細胞老化の抑制、線虫の寿命延長を認めた。【結論】WSの老化促進機序に、ERストレスが重要な役割を果たしていると考えられる。

O-82

DASC-8による高齢者の認知機能・ADLのカテゴリー分類は、死亡と新規要介護認定のリスクを反映する

東京都健康長寿医療センター糖尿病・代謝・内分泌内科¹⁾, 東京都健康長寿医療センター循環器内科²⁾, 東京都健康長寿医療センター研究所認知症未来社会創造センター³⁾

勝俣 悠¹⁾, 豊島堅志¹⁾, 全 秀剛¹⁾, 小寺玲美¹⁾, 大庭和人¹⁾, 石川讓治²⁾, 田村嘉章¹⁾, 千葉優子¹⁾, 栗田主一³⁾, 荒木 厚¹⁾

【目的】高齢者診療においては生命予後や機能予後を考慮し治療方針を決定する必要がある。高齢者糖尿病の血糖管理目標は、認知機能やADL、併存疾患などにより3段階のカテゴリーに分類し、低血糖リスクを考慮し、決定することが推奨されている。このカテゴリー分類が糖尿病患者において死亡リスクを反映することが最近発表された。またこのカテゴリー分類はDASC-8を用いて簡便に行うことができる。今回、縦断研究によりDASC-8によるこのカテゴリー分類が糖尿病患者に限らず他疾患患者でも死亡や新規要介護のリスクと関連するかを検討した。【方法】対象者は当院外来通院中の患者403名(平均年齢79.1±6.2歳,女性69%,糖尿病50%,高血圧76%,脂質異常症61%)。3年間の追跡期間におけるアウトカムを(A)死亡、(B)死亡または新規要介護認定とし、(B)の対象者は登録時に要支援2以下のものとした。(A)または(B)のハザード比をCox回帰でもとめた。共変量は年齢、性別、BMI、糖尿病の有無、高血圧の有無、脂質異常症の有無とした。【結果】1)(A)の対象者のうちカテゴリー



ホームご挨拶開催概要プログラム学会企画要旨閲覧システム
参加者へのご案内座長・発表者へのご案内Late-Breaking Abstracts参加登録
宿泊予約高校生発表協賛案内託児室・親子休憩室当日運営スタッフ募集
ポスター・チラシ設置申込公募シンポジウムアクセスEnglish

第95回 The 95th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society 日本生化学会大会

波及する生化学～生命科学の革新へ～

会期 2022年 11月 9日水～11日金

会場 名古屋国際会議場 会頭 門松 健治 (名古屋大学大学院医学系研究科)

参加賞・領収書のダウンロードはこちら
事前・後期参加登録者が対象です。

若手優秀賞受賞者

研究成果、またその進化的な保存性や多様な変化について細菌、古細菌、真核生物の3つのドメインを通して議論し、染色体機能維持について理解を深めたい。

3S10m

日時：11月11日（金） 9:00-11:00 会場：第10会場（223）

ダウン症から学ぶ多面的な病態生化学

オーガナイザー：

南 敬（熊本大学生命資源研究支援センター/大学院生命科学研究部・分子血管制御学）

有村 奈利子（国立精神・神経医療研究センター）

一講演者

横手 幸太郎（千葉大学 副学長 医学部附属病院長 医学研究院 内分泌代謝・血液・老年内科学）

中川 拓郎（大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻）

水津 太（香川大学医学部 病理病態・生体防御医学講座）

有村 奈利子（国立精神・神経医療研究センター）

南 敬（熊本大学生命資源研究支援センター/大学院生命科学研究部・分子血管制御分野）

一概要

アンメットメディカルニーズの最たるダウン症はヒト21番染色体がトリソミーになることで生じる症候群であり、人類遺伝学上最も高頻度で生じることから身近な存在となっている。このダウン症病態は精神発達遅滞・早期アルツハイマー病発症などの神経疾患に留まらず、心奇形・急性白血病、更にはリンパ浮腫・筋力低下・骨粗鬆症のリスク増大など全身性で多岐にわたる。一方で成人期での固形がん罹患率の大幅な低下や動脈硬化・高血圧が進展しないなど非線形的な防護的な側面があることも判明してきた。このような複合的表現型は、染色体・クロマチン動態制御、一次繊毛異常などの分子細胞生物学、神経・血管の微小環境、加齢時間軸での経時的動態変化などの多面的な要素で捉え、システムの病態相関を考える必要性・重要性がクローズアップされている。そこで本シンポジウムでは各方面で先駆的な研究を推進している講演者を交え、ダウン症、更には高齢化社会での各ライフステージにおける生活習慣病との相関について考えていきたい。

3S11m

日時：11月11日（金） 9:00-11:00 会場：第11会場（211）



TOP

研究会について

書籍情報

→ **学術大会**

→ 入会のご案内

→ English

TOP > 学術大会

学術大会



人生100年時代のアンチエイジングサイエンス
— 光輝く未来のために —


**脳心血管
抗加齢研究会
第18回学術大会**
 Society of Cerebral Cardio-Vascular Anti-Aging

会期 **2022年12月2日(金) - 3日(土)**
 会場 **梅田スカイビル タワーウエスト36F
スペース36** 大阪市北区大淀中1-1-88
 会長 **尾池 雄一** 阪本大学大学院生命科学研究所
分子遺伝学講座

HOME

[会長ご挨拶](#)

[開催概要](#)

[参加者の皆様へ](#)

[座長・発表者の皆様へ](#)

[プログラム](#)

[演題募集](#)

[単位について](#)

[会場・アクセス](#)

[宿泊案内](#)

[スペシャルゲスト](#)

[協賛企業の皆様へ](#)

[会期中のポスター掲
示、チラシ設置について](#)

[運営事務局](#)

[過去のセミナー情報](#)

最新情報

2022.11.25.

参加者の皆様へ、座長・発表者の皆様へ、プログラム、会場・アクセスのページを更新いたしました。

2022.11.8.

スペシャルゲストが決定いたしました。

2022.10.3.

参加登録を開始いたしました。

協賛企業



TEIJIN 帝人ファーマ株式会社

関連リンク



第66回 日本糖尿病学会年次学術集会

2023年
 5月11日(水) - 13日(金)
 会場: 梅田スカイビル
 会場: 大阪府立産業科学館
 会場: 大阪府立産業科学館

合同シンポジウム2

15:05 ~ 16:35

老化は病い？性差の視点から脳心血管疾患へのアプローチ

座長 野出 孝一 佐賀大学医学部 循環器内科
赤澤 純代 金沢医科大学 総合内科学／女性総合医療センター

JSY2-1 **血管・リンパ管の恒常性維持と破綻を制御するシグナルネットワーク**
渡部 徹郎 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 病態生化学分野

JSY2-2 **老化、加齢性疾患と毛細血管密度との関連**
清水 逸平, 南野 徹 順天堂大学医学部 内科学教室・循環器内科学講座

JSY2-3 **心房細動・心房心筋症と性差 一心房生検による病理学的アプローチ**
中島 夏奈¹, 山口 尊則¹, 大坪 豊和¹, 高橋 佑弥¹, 七田 茂輝¹, 新里 広大¹, 大迫 亮介¹,
福井 暁², 高橋 尚彦², 野出 孝一¹
1 佐賀大学医学部 循環器内科
2 大分大学医学部 循環器内科・臨床検査診断学講座

JSY2-4 **ひとは血管とともに老いるのか？人生100年時代の再検証**
吉田 雅幸 東京医科歯科大学生命倫理研究センター / 先進倫理医科学開発学分野

CCVAAシンポジウム

16:45 ~ 18:15

「老化と遺伝性疾患」… 我が国の早老症の現状

座長 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学
中神 啓徳 大阪大学大学院医学系研究科 健康発達医学

CSY-1 **ウェルナー症候群 Update-遺伝性早老症にみる細胞老化と疾病**
前澤 善朗 千葉大学大学院医学研究院 内分泌代謝・血液・老年内科学

CSY-2 **遺伝性早老症ハッチンソンギルフォード症候群の新規治療薬lonafarnib:国内承認に向けた取組み**
井原 健二 大分大学医学部 小児科学講座

CSY-3 **難治性皮膚潰瘍治療薬の開発**
中神 啓徳 大阪大学医学系研究科 健康発達医学

スペシャルゲスト

18:15 ~ 18:45

座長 尾池 雄一 熊本大学大学院生命科学研究部 分子遺伝学講座
山田 秀和 近畿大学 アンチエイジングセンター

ゲスト 辺見 えみり

表 1

1次調査集計結果 (1)

調査対象施設	回答施設数	回収率	診療経験あり
①200床以上-小児科(1175施設)	774	65.9%	23施設
②200床以上-遺伝科(121施設)	72	59.5%	8施設
③200床以上-新生児科(64施設)	40	62.5%	1施設
④遺伝科のみ(3施設)	3	100.0%	なし
⑤小児専門病院-小児科(61施設)	43	70.5%	4施設
⑥小児専門病院-遺伝科(20施設)	13	65.0%	1施設
⑦小児専門病院-新生児科(24施設)	15	62.5%	なし
⑧小児専門病院-代謝・内分泌(18施設)	12	66.7%	1施設
⑨小児専門病院-神経科(27施設)	14	51.9%	1施設
合計1513施設	986施設	65.17%	38施設

表2.

1次調査集計結果(2)

対象施設	診療経験あり	① 現在診療している または疑い症例あり	②過去に診察した経験がある
①200床以上- 小児科(1175)	23施設	計14名 (HGPS4名、HGPS疑い2名、 それ以外のPL8名)	計14名 (HGPS12名、HGPS疑い1名、 それ以外のPL1名)
②200床以上- 遺伝科(121)	8施設	計4名 (HGPS3名、それ以外のPL1名)	計5名 (HGPS2名、それ以外のPL3名)
③200床以上- 新生児科(64)	1施設		計1名 (それ以外のPL1名)
⑤小児専門病院- 小児科(61)	4施設	計7名 (HGPS1名、HGPS疑い1名、 それ以外のPL5名)	計2名 (HGPS疑い2名)
⑥小児専門病院- 遺伝科(20)	1施設	無回答のため詳細不明	無回答のため詳細不明
⑧小児専門病院- 代謝・内分泌(18)	1施設	計3名 (HGPS3名)	
⑨小児専門病院- 神経科(27)	1施設	計1名 (HGPS疑い1名)	計1名 (HGPS疑い1名)
合計1513施設	38施設	28名 (HGPS11名、疑い4名、 それ以外のPL13名)	21名 (HGPS12名、疑い4名、 それ以外のPL5名)

2023年1月29日日本小児遺伝学会承認

ロスムンド・トムソン(Rothmund-Thomson)症候群

金子英雄 岐阜県総合医療センター小児療育内科

大西秀典 岐阜大学大学院医学系研究科小児科学

1章 疾患の解説

疾患背景

ロスムンド・トムソン症候群:Rothmund-Thomson 症候群(RTS)は、眼科医ロスムンドが多形皮膚萎縮症、小柄な体型、両側性の若年性白内障を呈する患者を報告したのが最初である¹⁾。その後、皮膚科医トムソンが多形皮膚萎縮症、小柄な体型、骨格の異常を呈する患者を報告し²⁾、後に一つの症候群にまとめられた。RTSはtype1とtype2の2つのタイプが存在する³⁾。白内障はtype1に認められtype2では認められないことが多い。type2はRecQヘリカーゼファミリーに属する*RECQL4*が病因遺伝子であり⁴⁾、type1の一部は*ANAPC1*が病因遺伝子であることが報告されている(表1)⁵⁾。RECQL4異常によりRTSの他にBaller-Gerold症候群(BGS)、RAPADILINO症候群の2つのRTS類縁疾患が発症する⁴⁾。

病因・病態

RTS type2の病因遺伝子である*RECQL4*は、8q24.3の染色体上に位置する。ヒトRECQヘリカーゼは1~5まで知られている⁶⁾。RTS type2は*RECQL4*の両alleleの病的遺伝子変異により発症する常染色体潜性(劣性)の遺伝性疾患である。RECQL4はDNA-DNAまたはDNA-RNAの2本鎖をATP依存性に巻き戻すヘリカーゼタンパクであり、遺伝子の複製・修復に関与している⁷⁾。

RTS type1の病因遺伝子である*ANAPC1*は分裂後期促進複合体(anaphase-promoting complex)/サイクロソーム(cyclosome)(APC/C)のサブユニットの一つであるANAPC1(Anaphase-promoting complex subunit 1)タンパクをコードする。*ANAPC1*は2q13の染色体上に位置する。RTS type1の一部は*ANAPC1*の両alleleの病的遺伝子変異により発症する常染色体潜性(劣性)の遺伝性疾患であるが、他にも病因遺伝子が存在すると考えられている。APC/Cは巨大なE3リガーゼであり、細胞周期調節タンパク質のユビキチン依存的タンパク質分解を仲介し、複製と細胞分裂の間に起こるさまざまな事象を制御する⁸⁾。現時点で、RECQL4とANAPC1タンパクの機能的な相互作用については明らかでない。

表1 RTS の病因遺伝子の頻度

	RTSの中で病因遺伝子として検出される割合
<i>ANAPCI</i>	10%
<i>RECQL4</i>	60%
不明	30%

文献 5)より

臨床像と重症度分類

1) 臨床症状

RTS は type1 と type2 の 2 つのタイプに分けられ、さらに、2 つの類縁疾患(RAPALIDINO 症候群、BGS)が存在する(表 2)。RTS type2 はおよそ、60%に *RECQL4* 遺伝子異常が認められる。RTS type1 の病因遺伝子は *ANAPCI* である。RTS type1 は、多形皮膚萎縮症、外胚葉奇形、若年性白内障を特徴とする。両側の白内障の出現は早く生後 2-3 か月で出現し、1-2 歳のうちに固定する。RTS type2 は、多形皮膚萎縮症、先天性骨欠損、幼児期からの骨肉腫の合併、加齢に伴い皮膚癌の合併を特徴とする。RTS の最も特徴的な症状は、生後 3 か月から 6 か月ごろから生じる皮疹である。はじめは、紫外線のあたりやすい顔面、特に頬部に紅斑、浮腫、水泡のような皮疹が生じ(急性期)、その後、1-2 歳のうちに、四肢に広がり、最後は臀部に広がる。通常体幹には広がらない。次第に、毛細血管拡張、過剰な色素沈着、萎縮性変化を伴い(慢性期)、多形皮膚萎縮症と呼ばれる皮膚像を呈する。他の疾患でも多形皮膚萎縮は認められるため鑑別には、出現の時期、変化の時期を詳細に検討することが重要である。毛髪は疎で薄く、眉毛が認められないこともある。骨格の異常が 70%以上に認められる。前頭部の突出、鞍鼻それに長管骨の異常を特徴とする。橈骨の欠損、母指の欠損または低形成が比較的多く認められる⁹⁾。放射線検査では骨格の異常が RTS の 80%近くに認められるとの報告もある¹⁰⁾。

RECQL4 の異常により発症する 2 つの RTS の類縁疾患が知られている(表 3)。BGS は、冠状縫合の早期癒合による短頭、前頭の突出、眼球の突出、耳介低位、橈骨欠損、母指の欠損、多形皮膚萎縮症、骨肉腫、皮膚癌、悪性リンパ腫の合併を特徴とする¹¹⁾。

RAPALIDINO 症候群は、以下の特徴を有し、その頭文字をとった疾患名である。橈骨欠損・低形成(radial hypoplasia/aplasia)、膝蓋骨低形成(patella hypoplasia)、口蓋の低形成、口蓋裂(cleft palate)、慢性の下痢(diarrhea)、関節の脱臼(dislocated joints)、小柄な体型(little size)、四肢の奇形(limb malformation)、細長い鼻(nose slender)、正常な知能(normal intelligence)。多形皮膚萎縮症は含まれていない¹²⁾。

表 2 RTS、Baller-Gerold 症候群、RAPADILINO 症候群の病因遺伝子と特徴的な所見

	病因遺伝子	特徴的な臨床所見
Rothmund-Thomson 症候群 type2	<i>RECQL4</i>	骨肉腫
Baller-Gerold 症候群	<i>RECQL4</i>	狭頭症
RAPADILINO症候群	<i>RECQL4</i>	
Rothmund-Thomson 症候群 type1	<i>ANAPC1</i>	若年性白内障

表 3 Baller-Gerold 症候群、RTS、RAPADILINO 症候群における臨床所見の頻度(文献 13)

臨床所見	Baller-Gerold 症候群	RTS	RAPADILINO 症候群
低身長	ほぼ認められる	66%	ほぼ認められる(93%)
狭頭症	認められる	無い	無い
乳児突然死	1歳までに 25%	無い	無い
肛門の奇形	前方位	不定	無い
耳介奇形	後方に回転	無い	無い
多形皮膚萎縮症	珍しい	認められる	不定
疎な頭髮	無い	50%	無い
疎な睫毛・眉毛	無い	75%	無い
白内障	無い	60%	無い
下痢/摂食障害	無い	20%未満	ほぼ認められる(90%)
正常範囲内の知能	50%が発達遅滞	ほぼ認められる(95%)	85%(?)
膝蓋骨の低形成又は無形成	無い	無い	認められる
橈骨欠損	両側かつ対称性	25%	100%
母指の変形	認められる	存在する	不定
骨肉腫	低頻度	30%	リスクが増大

2) 検査所見

特徴的な検査所見はない。確定診断には、*RECQL4* 遺伝子変異または *ANAPC1* 遺伝子変異の同定が必要である。

3) 鑑別診断

好中球減少を伴う多型皮膚萎縮症は、しばしば RTS と診断されている¹⁴⁾。多形皮膚萎縮症は、乳児期に始まるが、RTS とは異なり初期は四肢に出現し、その後、顔に広がる。ブルーム症候群、

ウェルナー症候群はともに、病因遺伝子産物が RTS と同様にヘリカーゼタンパクであり、類似の表現型を示す。*RECQL2*(*WRN*)が病因遺伝子であるウェルナー症候群は早老を示す代表的な疾患である。両側の白内障、白髪、皮下組織の石灰化、下肢の潰瘍などを特徴とする。*RECQL3*(*BLM*)が病因遺伝子である Bloom 症候群は、小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全症を特徴とする。染色体検査の姉妹染色分体組み換えの頻度が亢進していることが特徴である¹⁵⁾。毛細血管拡張性運動失調症は、毛細血管拡張(眼球)、進行性の運動失調症、免疫不全症を特徴とする。色素性乾皮症は生後早期からの日光過敏症を特徴とする。悪性リンパ腫が高率に発症する。先天性角化不全症は、皮膚の異常な色素沈着、多形皮膚萎縮症、爪の異常、白斑症や骨髄の分化異常を伴うといった特徴がある。好中球減少を伴う多型皮膚萎縮症は、しばしば RTS と診断されている。多形皮膚萎縮症は乳児期に始まるが、RTS とは異なり初期は四肢に出現し、その後顔に広がるという特徴がある。コケイン症候群は日光過敏症、特異な老人様顔貌、皮下脂肪の萎縮、低身長、著明な栄養障害、視力障害、難聴を特徴とする。ファンコニ貧血は皮膚の色素沈着、身体奇形、低身長、性腺機能不全を伴うが、その表現型は多様である。小児期に進行性の汎血球減少症を発症する。アクロゲリアは四肢の遠位部分の非進行性の皮膚萎縮、特徴的な顔貌を認める。

4) 重症度分類

modified Rankin Scale (mRS)、食事・栄養、呼吸のそれぞれの評価スケールを用いて重症度を分類する。

合併症

RTS type2 では骨肉腫の合併が高率に認められる。加齢に伴い皮膚癌の発症頻度が増加する。齲歯を伴いやすい。

診断

特徴的な皮疹(多形皮膚萎縮症)、骨格の異常があれば本症を疑う。最終的に *RECQL4*, *ANAPCI* 遺伝子変異が確認できれば確定診断となる。

診断基準

研究班作成の診断基準

A. 症状

1. 多形皮膚萎縮症

2. 低身長
3. 骨格異常
4. 日光過敏症
5. 毛髪異常
6. 若年性白内障
7. 乳児期の難治性下痢
8. 爪異常
9. その他:毛細血管拡張症、色素沈着、成長遅延、性腺機能低下、角化異常

B. 検査所見(参考)

皮膚生検:組織を免疫染色し RECQL4、ANAPC1 タンパク欠損を検出

C. 鑑別診断

以下の疾患を鑑別する。

ブルーム症候群、コケイン症候群、ウェルナー症候群、ファンconi貧血、毛細血管拡張性運動失調症、色素性乾皮症、先天性角化不全症、アхроゲリア、好中球減少を伴う多形皮膚萎縮症

D. 遺伝学的検査

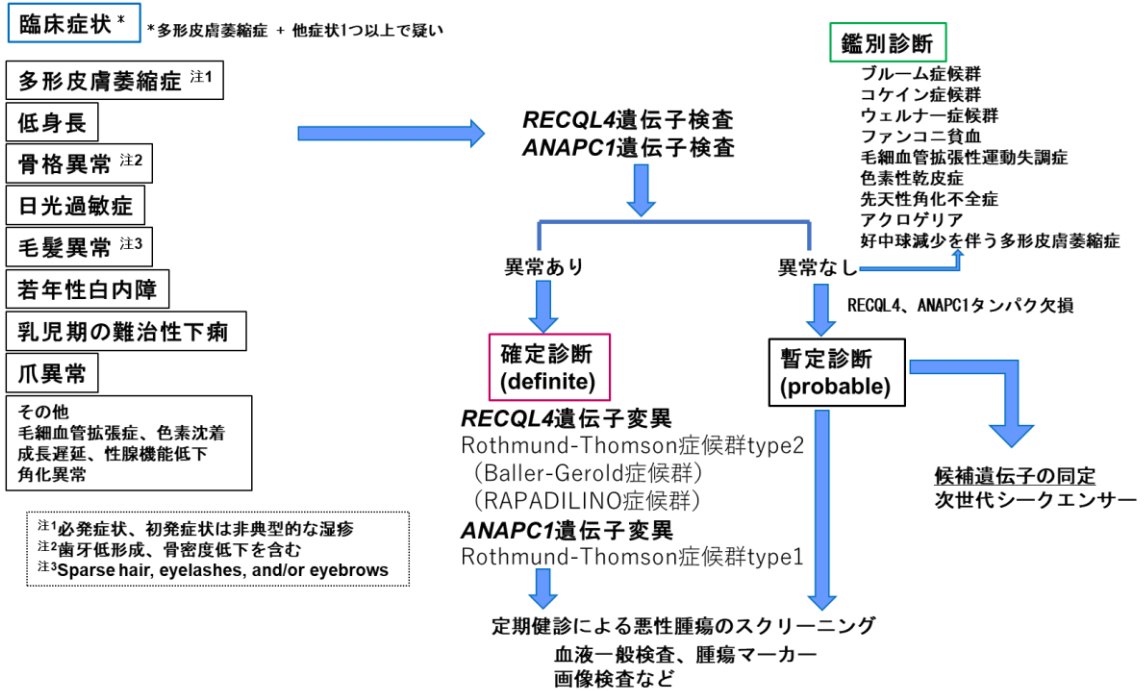
1. *RECQL4* または *ANAPC1* 遺伝子の変異

<診断のカテゴリー>

Aの症状のうち多形皮膚萎縮症とそれ以外の症状を1つ以上認め、Cを鑑別し、Dの遺伝子異常を認めた場合に確定診断(definite)する。Dの遺伝子異常を認めない場合を暫定診断(probable)とする。

診断フローチャート

Rothmund-Thomson症候群診断指針



治療

過度な日光は皮膚病変を悪化させ、また、皮膚がん発症のリスクを増すため避けるべきである。多形皮膚萎縮症などの皮膚病変について、レーザー治療が行われる場合もある。白内障、骨格の異常には、対症療法が主体となる。発癌、特に、骨肉腫の発症について定期的にフォローする必要がある。X線、UVへの感受性は、それほど高くはないが、X線を用いたスクリーニング検査はルーチンに行うべきでない。抗がん剤への感受性も他の遺伝子修復異常症である毛細血管拡張性運動失調症などと比較して高くなく、通常は、プロトコールに沿った化学療法が試みられている。しかし、抗がん剤投与後は通常以上にモニタリングを頻回に行うことが求められる。発癌がない場合、生命予後は悪くないとされている。RTSに合併した骨肉腫と、そうでない骨肉腫の5年生存率は、どちらも60-70%とかわりない¹⁶⁾。患者およびその家族には、遺伝的なカウンセリングを行う必要がある。

フォローアップ指針

2020年度に実施された本邦における集計では、骨肉腫のため8症例中2例が、それぞれ14歳、

18 歳で死亡していた¹⁷⁾。予後は、合併症(主に骨肉腫)の有無に左右される。定期的な検診により早期に悪性腫瘍の発症を診断し治療を行う。

診療上注意すべき点

悪性腫瘍の発生に常に留意する必要がある。骨肉腫、皮膚がんが多いため、骨の異常、皮膚の異常に注意し、異常がある場合は画像検査を実施する。

予後、成人期の課題

RTS は多くの診療科が連携して診療していくことが必要な疾患である。1年に1回は皮膚科医により皮膚の観察を行う。眼科医により白内障のスクリーニング治療を行う。歯科医による定期的な診察が必要である。RTS では過度の紫外線、放射線照射を避けなければならない。*RECQL4* 遺伝子変異を有する RTS では 5 歳までに骨病変が無いか明らかにするため、全身の骨の画像評価を行うべきである。骨肉腫発症の危険性についてカウンセリングを行い、患者がその症状について知識を有するように患者教育を行うことが必要である。症状が出現したら速やかに医療機関を受診していただき、検査・治療を開始すべきである¹⁸⁾。

社会保障

● 指定難病

186 番 ロスマンド・トムソン症候群

2章 推奨

CQ1 RTSの診断に多形皮膚萎縮症は有用か？

推奨

RTSの診断に、多形皮膚萎縮症は有用である。

根拠の確かさ B

要約

RTSの臨床所見として特徴的な皮疹・多形皮膚萎縮症は、ほぼ全例で認められておりRTSの診断上有用な所見である。RTSの確定診断には*RECQL4*遺伝子、*ANAPC1*遺伝子変異を同定が必要である。

解説

RTSの臨床所見は多岐にわたるが、特徴的な皮疹はほぼ全例に認められており、診断に有用である¹⁻³⁾。RTSの多形皮膚萎縮症は出現時期と出現部位に特徴がある。以下の経過ならRTSが強く疑われる。生後3か月から6か月ごろから生じる。はじめは、紫外線のあたりやすい顔面、特に頬部に紅斑、浮腫、水泡のような皮疹が生じ(急性期)、その後、1-2歳のうちに、四肢に広がり、最後は臀部に広がる。通常体幹には広がらない。次第に、毛細血管拡張、過剰な色素沈着、萎縮性変化を伴い(慢性期)、多形皮膚萎縮症と呼ばれる皮膚像を呈する。このような多形皮膚萎縮症をみたなら、*RECQL4*遺伝子の解析を行う。*RECQL4*遺伝子の解析は、保険診療で検査が可能となっている。

RTSの臨床症状の出現頻度

臨床症状	頻度(%)
多形皮膚萎縮症	100
光線過敏	33-38
四肢短縮・欠損	4-11
白内障	45-47
性腺機能低下	29-94

低身長	62-100
皮膚の悪性腫瘍	5-8
疎な頭髪・眉毛・睫毛	60-65
歯の欠損	27-59

文献3)

参考文献

1) Pujol LA, Erickson RP, Heidenreich RA, Cunniff C.

Variable presentation of Rothmund-Thomson syndrome.

Am J Med Genet. 2000 Nov 27;95(3):204-7.

2) Schmit M, Bielinsky AK.

Congenital Diseases of DNA Replication: Clinical Phenotypes and Molecular Mechanisms.

Int J Mol Sci. 2021 Jan 18;22(2):911.

3) Sznajder Y, Siitonen HA, Roversi G, Dangoisse C, Scaillon M, Ziereisen F, Tenoutasse S, Kestilä M, Larizza L.

Atypical Rothmund-Thomson syndrome in a patient with compound heterozygous mutations in RECQL4 gene and phenotypic features in RECQL4 syndromes.

Eur J Pediatr. 2008 Feb;167(2):175-81.

CQ2. RTS に合併した骨肉腫の治療に通常のプロトコールは有用か？

推奨

RTSに合併した骨肉腫の治療に通常の治療プロトコールは有用である。

根拠の確かさ C

要約

RECQL4の異常 (RTS type2、BGS、RAPADILINO症候群)では、高率に骨肉腫が発症する。RECQL4は遺伝子の複製・修復に関与するが他の染色体不安定性を示す疾患と比較し化学療法に対する忍容性は比較的保たれており、注意深い観察の上、通常の化学療法のプロトコールが推奨される。

解説

RTSは染色体不安定を示し骨肉腫、皮膚癌を高率に発症する。染色体不安定は毛細血管拡張性運動失調症、ファンconi貧血、色素性乾皮症などにも認められ、これらの疾患は化学療法に対して高感受性を示すことが知られている。Wangらは2007年にRECQL4の変異を有する12例の骨肉腫の治療経過を報告している¹⁾。組織型は9例が骨芽腫であった。全例がシスプラチン、ドキソルビシン、メトトレキサート、イホスファミドを含む標準的なプロトコールで治療をうけた。組織型で比較した化学療法の結果は、今まで報告されている孤発性の骨肉腫の化学療法の結果とほぼ同様であった。5人の患者は抗がん剤の量の調整が行われたが、最も多い理由はドキソルビシンによる粘膜症状が原因であった。Wangらは通常のRTSに発症した骨肉腫の初回の治療は通常のプロトコールで行うことを推奨している²⁾。ただし、通常のプロトコールで粘膜症状、骨髄抑制が強く出現した症例も報告されており³⁻⁵⁾、有害事象に対しての注意深い観察を行いながら化学療法を行うことが必要である。

参考文献

1) Hicks MJ, Roth JR, Kozinetz CA, Wang LL.

Clinicopathologic features of osteosarcoma in patients with Rothmund-Thomson syndrome.

J Clin Oncol. 2007 Feb 1;25(4):370-5.

2) Salih A, Inoue S, Onwuzurike N.

Rothmund-Thomson syndrome (RTS) with osteosarcoma due to RECQL4 mutation.

BMJ Case Rep. 2018 Jan 23;

3) Gutiérrez-Jimeno M, Panizo-Morgado E, Tamayo I, San Julián M, Catalán-Lambán A, Alonso MM, Patiño-García A.

Somatic and germline analysis of a familial Rothmund-Thomson syndrome in two siblings with osteosarcoma.

NPJ Genom Med. 2020 Dec 4;5:51

4) Zils K, Klingebiel T, Behnisch W, Mueller HL, Schlegel PG, Fruehwald M, Suttorp M, Simon T, Werner M, Bielack S.

Osteosarcoma in patients with Rothmund-Thomson syndrome.

Pediatr Hematol Oncol. 2015 Feb;32(1):32-40

5) Rothmund-Thomson症候群に合併した橈骨遠位端骨肉腫の1例

武田 明, 田地野 崇宏, 佐藤 勝彦, 菊池臣一

整形外科53号:183-185、2002

CQ3. RTSの皮膚癌発症予防に紫外線を避けることが推奨される？

推奨

RTSの皮膚癌予防に紫外線予防は有効である。

根拠の確かさ D

要約

RTSでは皮膚癌の発症が高率(5%)に認められる。RTSの細胞は、UVに感受性があり皮膚癌の発症予防に紫外線を避けることが推奨される。

解説

RTSに合併する癌腫で骨肉腫、皮膚癌の頻度が高い。皮膚癌は、扁平上皮癌、基底細胞癌、ボーン病が認められる¹⁾。骨肉腫に比較して発症年齢が高めで(平均34.4歳)である²⁾。RTS患者由来の繊維芽細胞に紫外線を照射すると、紫外線により生じたDNA障害が十分に修復されないことが報告されている³⁾。一般的に紫外線をさけることは皮膚癌の発症予防に有効であるが、UVによる感受性が亢進しているRTS患者ではさらに、皮膚癌発症予防に紫外線照射を避けることが有用であると考えられる。

参考文献

1) Stinco G, Governatori G, Mattighello P, Patrone P.

Multiple cutaneous neoplasms in a patient with Rothmund–Thomson syndrome: case report and published work review.

J Dermatol. 2008 Mar;35(3):154–61

2) Piquero–Casals J, Okubo AY, Nico MM.

Rothmund–thomson syndrome in three siblings and development of cutaneous squamous cell carcinoma.

Pediatr Dermatol. 2002 Jul–Aug;19(4):312–6.

3) Fan W, Luo J.

RecQ4 facilitates UV light–induced DNA damage repair through interaction with nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A (XPA).

J Biol Chem. 2008 Oct 24;283(43):29037–44.

検索式

PubMed 及び医中誌で 2022 年 6 月 30 日までの文献に関して以下の通り検索を行い、重要と思われる 17 件を参考文献とした。

1. “Rothmund–Thomson” AND “syndrome” 751 件
2. “RECQL4” AND “mutation” 208 件
3. “Baller–Gerold” AND “syndrome” 83 件
4. “RAPADILINO” AND “syndrome” 43 件
4. “Rothmund–Thomson 症候群” or “ロスムンド・トムソン症候群” 161 件

参考文献

- 1)Rothmund A. Uber cataracte in Verbindung mit einer eigenthuemlichen Hautdegeneration. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthal 1868; 14: 159–182.
- 2)Thomson MS. Poikiloderma congenitale. Brit J Dermatol. 1936; 48: 221–234.
- 3)Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund–Thomson syndrome. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5
- 4)Kitao S, Shimamoto A, Goto M, Miller RW, Smithson WA, Lindor NM, Furuichi Y. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund–Thomson syndrome. Nat Genet. 1999 May;22(1):82–4.
- 5) Ajeawung NF, Nguyen TTM, Lu L, Kucharski TJ, Rousseau J, Molidpere S, Atienza J, Gamache I, Jin W, Plon SE, Lee BH, Teodoro JG, Wang LL, Campeau PM. Mutations in ANAPC1, encoding a scaffold subunit of the anaphase–promoting complex, cause Rothmund–Thomson syndrome type 1. Am J Hum Genet. 2019; 105: 625–630.
- 6)Oshima J, Kato H, Maezawa Y, Yokote K. RECQ helicase disease and related progeroid syndromes: RECQ2018 meeting. Mech Ageing Dev. 2018; 173: 80–83.
- 7)Lu H, Davis AJ. Human RecQ Helicases in DNA Double–Strand Break Repair. Front Cell Dev Biol. 2021 Feb 25;9:640755.
- 8)Melloy PG. The anaphase–promoting complex: A key mitotic regulator associated with somatic mutations occurring in cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2020 Mar;59(3):189–202.
- 9)Piard J, Aral B, Vabres P, Holder–Espinasse M, Mégarbané A, Gauthier S, Capra V, Pierquin G, Callier P, Baumann C, Pasquier L, Baujat G, Martorell L, Rodriguez A, Brady AF, Boralevi F,

González-Enseñat MA, Rio M, Bodemer C, Philip N, Cordier MP, Goldenberg A, Demeer B, Wright M, Blair E, Puzenat E, Parent P, Sznajder Y, Francannet C, DiDonato N, Boute O, Barlogis V, Moldovan O, Bessis D, Coubes C, Tardieu M, Cormier-Daire V, Sousa AB, Franques J, Toutain A, Tajir M, Elalaoui SC, Geneviève D, Thevenon J, Courcet JB, Rivière JB, Collet C, Gigot N, Faivre L, Thauvin-Robinet C. Search for RECQL4 mutations in 39 patients genotyped for suspected Rothmund-Thomson/Baller-Gerold syndromes. *Clin Genet.* 2015; 87: 244-251.

10) Mehollin-Ray AR, Kozinetz CA, Schlesinger AE, Guilleman RP, Wang LL.

Radiographic abnormalities in Rothmund-Thomson syndrome and genotype-phenotype correlation with RECQL4 mutation status.

AJR Am J Roentgenol. 2008 Aug;191(2):W62-6.

11) Kaneko H, Izumi R, Oda H, Ohara O, Sameshima K, Ohnishi H, Fukao T, Funato M.

Nationwide survey of Baller-Gerold syndrome in Japanese population. *Mol Med Rep.* 2017; 15: 3222-3224.

12) Siitonen HA, Kopra O, Kääriäinen H, Haravuori H, Winter RM, Säämänen AM, Peltonen L, Kestilä M.

Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases.

Hum Mol Genet. 2003 Nov 1;12(21):2837-44.

13) Pujol LA, Erickson RP, Heidenreich RA, Cunniff C.

Variable presentation of Rothmund-Thomson syndrome.

Am J Med Genet. 2000 Nov 27;95(3):204-7.

14) Walne AJ, Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Dokal I.

Mutations in C16orf57 and normal-length telomeres unify a subset of patients with dyskeratosis congenita, poikiloderma with neutropenia and Rothmund-Thomson syndrome.

Hum Mol Genet. 2010 Nov 15;19(22):4453-61.

15) Kaneko H, Kondo N. Clinical features of Bloom syndrome and function of the causative gene, BLM helicase. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004; 4: 393-401.

16) Hicks MJ, Roth JR, Kozinetz CA, Wang LL. Clinicopathological features of osteosarcoma in patients with Rothmund-Thomson syndrome. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 370-375.

17) Kaneko H, Takemoto M, Murakami H, Ihara K, Kosaki R, Motegi SI, Taniguchi A, Matsuo M, Yamazaki N, Nishigori C, Takita J, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K.

Rothmund-Thomson syndrome investigated by two nationwide surveys in Japan.

Pediatr Int. 2022 Jan;64(1):e15120.

18) Wang LL, Plon SE.

Rothmund-Thomson Syndrome.

1999 Oct 6 [updated 2020 Jun 4]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]

LETTER TO THE EDITOR

Open Access



Lifetime extension and the recent cause of death in Werner syndrome: a retrospective study from 2011 to 2020

Hisaya Kato^{1,2*} , Masaya Koshizaka^{1,2}, Hiyori Kaneko^{1,2}, Yoshiro Maezawa^{1,2} and Koutaro Yokote^{1,2*}

Abstract

Background: Werner syndrome (WS) is an autosomal recessive premature ageing disease that causes accelerated ageing-like symptoms after puberty. Previous studies conducted in the late 2000s reported that malignant neoplasms and atherosclerotic diseases were the two leading causes of death, with life expectancies in the mid-50 s. However, the recent lifespan and cause of death in patients with WS remain unclear.

Objective: To clarify the latest lifespan and causes of death in patients with WS.

Method: We conducted a questionnaire-based survey in 2020 among the primary doctors of WS patients who were identified in previous nationwide surveys in Japan and clarified the following: the age of WS patients (age of death, if the patient had already died), sex, and cause of death. Patients who died in 2010 or earlier were excluded from the analysis.

Results: A total of 123 living patients were identified at the time of the survey in 2020. Fourteen WS patients died between 2011 and 2020, with a mean age of 59.0 ± 8.9 years (mean \pm SD). The most common cause of death was non-epithelial tumours, accounting for eight deaths, while no patient died of atherosclerotic diseases.

Conclusions: Compared to previous studies, this study suggests that the lifespan of patients with WS has been extended. Although there were no deaths due to atherosclerotic diseases, non-epithelial tumours were still the leading cause of death. Further development of screening and treatment methods for these tumours is required.

Keywords: Werner syndrome, Lifespan, Mortality, Epidemiology, Etiology, Rare disease, Ageing

Introduction

Werner syndrome (WS), also known as adult progeria, is a rare autosomal recessive premature ageing syndrome displaying signs of ageing, such as grey hair, hair loss, cataracts, and diabetes, early after puberty [1]. Previous studies conducted in the late 2000s reported that the average life expectancy was in the mid-50s, and

malignant tumours and cardiovascular diseases were the two leading causes of death [1–3]. As part of the Japanese Werner Consortium, we have been working on the development of diagnostic criteria, establishment of patient registries, and genetic diagnosis of suspected cases in Japan [4–6]. In the course of these efforts, we hypothesized that the recent life expectancy of individuals with WS had been extended because a number of patients recently died at a relatively advanced age compared to past cases [7]. Hence, this study aimed to clarify the latest lifespan and cause of death in WS.

*Correspondence: hisayakato@chiba-u.jp; kyokote@faculty.chiba-u.jp

¹ Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

Full list of author information is available at the end of the article



Materials and methods

We conducted a questionnaire-based survey in 2020 among the physicians who were identified as primary doctors of patients with WS in previous Japanese nationwide surveys and genetic tests [4–6, 8], to determine the following: the patient's age (at the time of death, if the patient had already died), sex, and cause of death. Those who died in 2010 or earlier were excluded from the analysis.

Results

A total of 143 physicians were contacted for the survey, and 105 (73.4%) responded. At the time of the survey in 2020, 123 patients with WS were alive (61 males and 62 females) with a confirmed diagnosis according to the Japanese diagnostic criteria [4], and the mean age was 51.9 ± 9.6 years (mean \pm SD) (Table 1). The number and age of patients who died between 2011 and 2020 were 14 (5 males and 9 females) and 59.0 ± 8.9 years (mean \pm SD), respectively. The causes of death were eight malignant non-epithelial neoplasms (including five haematological malignancies) (Table 2), three infections, two malignant epithelial neoplasms, and one unidentified.

Discussion/conclusion

This study suggests that the life expectancy of WS patients has been extended. Studies conducted in 2006 and 2008 reported that the median lifespan was 54.3 years [1], and the average lifespan was 55.0 years [3]. Also, the average age of patients who died between 1997 and 2006 was 51.8 years [2]. In the present study, the mean age of patients who died between 2011 and 2020 was 59.0 years, suggesting a 4.0 to 7.2-year increase in the lifespan of patients with WS compared to the previous studies. This increase is higher compared to the increase in life expectancy at birth in the general population in Japan from 2006 (males, 79.0 years; females, 85.8 years) or 2008 (males, 79.3 years; females, 86.1 years) to 2020 (males, 81.6 years; females, 87.7 years) [9–11]. These results imply that there are some factors that have

Table 2 Breakdown of the malignancies that caused deaths

Diagnosis	Number of patients
Non-epithelial malignancy	
MDS/AML	3
AML	1
Non-gastric MALT lymphoma	1
Fibrosarcoma	1
Osteosarcoma	1
Melanoma	1
Epithelial malignancy	
Hepatocellular carcinoma	1
Lung cancer	1

specifically improved the life expectancy of WS in addition to the general factors, such as healthcare improvement, which have contributed to lifespan extension in the general Japanese population.

Regarding the cause of death, Goto et al. previously reported in a retrospective study of patients with WS from 1917 to 2008 in Japan that cardiovascular diseases were the second leading cause of death, accounting for 30% of the total deaths [3]. However, in the present study, there were no apparent deaths from atherosclerotic diseases such as myocardial infarction or stroke. Koshizaka et al. reported that only 2.5% of patients in the WS registry in 2020 had angina pectoris, myocardial infarction, or stroke [5]. They suggested that this decrease in prevalence compared to the WS nationwide study in 2009, which showed that 18.5% of patients with WS had angina pectoris, myocardial infarction, or stroke, might be due to the improved long-term control of metabolic risk factors such as dyslipidemia, hypertension, and diabetes with better treatment modalities that developed in recent decades. In addition, in a recent autopsy of a patient with WS who died at age 76, there were almost no atherosclerotic changes in the cerebral vessels and no stenosis in the coronary arteries

Table 1 Summary of the results

	Mean age \pm SD	Number of patients
Patients with WS who were alive in 2020	51.9 ± 9.6	123 (male, 61)
Patients with WS who died between 2011 and 2020	59.0 ± 8.9	14 (male, 5)
Causes of death		
Non-epithelial malignancy		8
Infection		3
Epithelial malignancy		2
Unidentified		1

[7, 12]. A number of other recent case reports have also shown that atherosclerotic changes were absent or slightly present [13, 14]. These findings suggest that atherosclerotic diseases are being controlled in WS. This result is partially consistent with the trends in leading causes of death in the general Japanese population which showed a decrease in age-adjusted death rates of heart diseases per 100,000 population from 2005 (males, 83.7; females, 45.3) to 2019 (males, 62.0; females, 31.3) [15]. However, heart disease was still the second leading cause of death in 2019, accounting for 15.0% of total deaths in Japan [16]. These facts indicate that atherosclerotic diseases in patients with WS are susceptible to general treatment and may not occur via a WS-specific mechanism.

On the other hand, the incidence of malignancies, mainly non-epithelial tumours, remained problematic in our study, accounting for 71.4% (10 of 14 cases) of total deaths (Table 1). Goto et al. reported that the incidence ratio of non-epithelial to epithelial neoplasms was 1.5:1 in WS, which is remarkably higher than the usual ratio of 1:10 [3]. Especially, haematological malignancies accounted for 17.6% of all neoplasms in WS cases from 1996 to 2008 [3]. In another study, Lauer et al. reported in a systematic review that 9.3% of WS tumours were haematological malignancies [17]. However, in the present study, 50% (5 of 10 cases) of the tumours that caused death were haematological malignancies (Table 2). These results indicate that managing haematological malignancies in patients with WS has become a substantial problem. In the general Japanese population, however, age-adjusted mortality rates of malignant neoplasms per 100,000 population decreased from 2005 (males, 197.7; females, 97.3) to 2019 (males, 149.5; females, 83.7) [15], while malignant neoplasms remained the leading cause of death in 2019, accounting for 27.3% of the total deaths [16]. Interestingly, while haematological tumour deaths have been declining as well (2005, 22.4 per 100,000; 2019, 19.5 per 100,000), their share of total tumour deaths have increased slightly (2005, 16.0%; 2019, 17.3%) [18]. However, this prevalence is far smaller than the percentage of haematological tumour deaths in WS; tumour development in WS, unlike atherosclerotic disease, might depend on a WS-specific mechanism [19].

In this study, we found an extension of the lifespan in patients with WS, which might be attributed to a decrease in the incidence of cardiovascular diseases. Although cardiovascular diseases are being controlled, malignant neoplasms account for the majority of deaths; therefore, effective screening and treatment strategies are required.

Abbreviations

WS: Werner syndrome; SD: Standard deviation; MDS: Myelodysplastic syndrome; AML: Acute myeloid leukaemia; MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue.

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

H. Kato, M.K., Y.M., and K.Y. designed the study; H. Kato and H. Kaneko collected the data; H. Kato analyzed the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI, Grant Numbers JP20K16542 (H. Kato) and JP20H00524 (K.Y.); the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), Grant Number JP21bm0804016 (K.Y.); and the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan, Grant Number JPMH21FC1016 (K.Y.).

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study protocol was reviewed and approved by the Ethics Review Committee, Chiba University Graduate School of Medicine, Japan, Approval Number M10153. This study has been granted an exemption from requiring written informed consent by the Ethics Review Committee, Chiba University Graduate School of Medicine, Japan.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. ²Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan.

Received: 2 February 2022 Accepted: 6 June 2022

Published online: 13 June 2022

References

- Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, Poot M, Rubin CD, Chen DF, Yang CC, Juch H, et al. The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Hum Mutat.* 2006;27(6):558–67.
- Yokote K, Saito Y. Extension of the life span in patients with Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(9):1770–1.
- Goto M, Ishikawa Y, Sugimoto M, Furuichi Y. Werner syndrome: a changing pattern of clinical manifestations in Japan (1917–2008). *Biosci Trends.* 2013;7(1):13–22.
- 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.* 2013;13(2):475–81.
- Koshizaka M, Maezawa Y, Maeda Y, Shoji M, Kato H, Kaneko H, Ishikawa T, Kinoshita D, Kobayashi K, Kawashima J, et al. Time gap between the onset and diagnosis in Werner syndrome: a nationwide survey and the 2020 registry in Japan. *Aging-U.S.* 2020;12(24):24940–56.
- Yamaga M, Takemoto M, Takada-Watanabe A, Koizumi N, Kitamoto T, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Recent trends

- in WRN gene mutation patterns in individuals with Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2017;65(8):1853–6.
7. Kuzuya M, Shi RQ, Yanagawa M, Watanabe K, Samizo S, Ando R, Miyahara H, Iwasaki Y, Yoshida M. Cerebral pathological findings in long-lived patient with Werner syndrome and dementia. *Geriatr Gerontol Int.* 2021;21(8):743–5.
 8. 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.* 2012;60(5):997–8.
 9. Abridged Life Tables For Japan 2006. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. <https://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/lifetb06/1.html> (2006). Accessed 23 Apr 2022.
 10. Abridged Life Tables For Japan 2008. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. <https://www.mhlw.go.jp/za/0723/b09/b09.pdf> (2008). Accessed 23 Apr 2022.
 11. Abridged Life Tables For Japan 2020. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. <https://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/lifetb20/dl/lifetb20-01.pdf> (2020). Accessed 23 Apr 2022.
 12. Kuzuya M, Shi RQ, Yanagawa M, Watanabe K, Samizo S, Ando R. Long-lived Werner syndrome patient autopsy report: The presence of liver cirrhosis. *Geriatr Gerontol Int.* 2021;21(5):433–5.
 13. Maezawa Y, Kato H, Takemoto M, Watanabe A, Koshizaka M, Ishikawa T, Sargolzaeiaval F, Kuzuya M, Wakabayashi H, Kusaka T, et al. Biallelic WRN mutations in newly identified Japanese Werner syndrome patients. *Mol Syndromol.* 2018;9(4):214–8.
 14. Kato H, Maezawa Y. Atherosclerosis and cardiovascular diseases in progeroid syndromes. *J Atheroscler Thromb.* 2022;29(4):439–47.
 15. Age-adjusted death rates (per 100,000 population) by cause of death and sex, by year. Chapter 2 Vital Statistics. Part 1 Population and households. Handbook of Health and Welfare Statistics 2020. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. <https://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hh/xlsx/1-30.xlsx> (2020). Accessed 23 Apr 2022.
 16. Vital Statistics of Japan. The latest trends. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. <https://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/dl/81-1a2en.pdf> (2022). Accessed 23 Apr 2022.
 17. Lauper JM, Krause A, Vaughan TL, Monnat RJ Jr. Spectrum and risk of neoplasia in Werner syndrome: a systematic review. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e59709.
 18. Vital Statistics in Japan, tabulated by Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan. [https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/excel/cancer_mortality\(1958-2019\)E.xls](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/excel/cancer_mortality(1958-2019)E.xls) (2021). Accessed 23 Apr 2022.
 19. Kato H, Maezawa Y, Nishijima D, Iwamoto E, Takeda J, Kanamori T, Yamaga M, Mishina T, Takeda Y, Izumi S, et al. A high prevalence of myeloid malignancies in progeria with Werner syndrome is associated with p53 insufficiency. *Exp Hematol.* 2022;109:11–7.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



LETTERS TO THE EDITOR

CASE REPORTS

Case of Werner syndrome with significant improvement of refractory skin ulcer despite fibroblast cellular senescence

Keywords: diabetes mellitus, atherosclerosis/fat metabolism, infectious disease, skin ulcer, Werner syndrome.

Dear Editor,

Werner syndrome (WS) is a hereditary premature aging syndrome with an estimated 700–2000 cases in Japan. It is inherited as an autosomal recessive trait, and causes graying of hair, juvenile cataracts, insulin-resistant diabetes mellitus, dyslipidemia, abdominal adiposity, atherosclerosis and malignant neoplasms in patients aged in their 30s to 50s. The cause of WS is a mutation in the *WRN* gene, a RECQ helicase on chromosome 8. Among patients with WS, 67.5% experience intractable skin ulcers, which are often accompanied by severe pain and osteomyelitis, and 15% of WS patients require amputation of the lower extremities.¹ One of the causes of intractable skin ulcers is the cellular senescence of fibroblasts, which lose their proliferation capacity and express inflammatory cytokines called senescence associated secretory phenotype. Although cellular senescence itself is untreatable, the negative effects of cellular senescence might be overcome by dealing with other factors involved in ulcers. Here, we report a case of a WS patient with intractable skin ulcers and cellular senescence of fibroblasts, who was able to avoid amputation by intensive treatment.

A 48-year-old woman with WS presented with intractable ulcers. She developed bilateral cataracts at the age of 32 years, and hair loss at 44 years. For 13 months, she had multiple ulcers on her left foot, which did not resolve despite visits to several dermatologists. A bird-like face and a high-pitched hoarse voice were also detected.

Her height was 148.8 cm, weight 43.4 kg and body mass index 19.8. She had a large 5 × 3-cm ulcer on the dorsum of her left foot that reached the periosteum, with a red granulation in the center and yellow necrotic tissue around it. No bleeding was observed. A 3 × 3-cm ulcer was also found in the left Achilles tendon area, exposing necrotic tendon tissue. Both ulcers were infected (Fig. 1a). She was diagnosed with diabetes, with a glycated hemoglobin of 6.7% and fasting blood glucose of 144 mg/dL. Her C-reactive protein was 6.44 mg/dL, and magnetic resonance imaging showed a sign of osteomyelitis (Fig. 1g). X-rays showed the calcification of the bilateral Achilles tendons (Fig. 1h). The cardio-ankle vascular index, ankle brachial index and skin blood flow were normal. Computed tomography showed 108 cm² of visceral fat accumulation. Her homeostasis model assessment of insulin resistance was 3.3, and the hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp test (insulin infusion rate 1.25 mU/kg/min) showed that the patient's glucose infusion rate was 4.4 mg/kg/min (normal 9.43 ± 4.69), indicating insulin resistance. In addition, the skeletal muscle mass index was 4.68 kg/m² (normal >5.46).

According to the Japanese criteria for the diagnosis of WS, a definite diagnosis of WS was made. Genetic analysis showed that she had compound heterozygous mutations, the type 4 mutation,

c.3139-1G>C and the type 1 mutation, c.3913>T of the *WRN* gene.

Debridement of the wound, intravenous antimicrobial infusion and hyperbaric oxygenation were carried out. After negative pressure closure therapy, skin transplantation was performed from healthy femoral groin to the ulcers. These multidisciplinary treatments resulted in significant improvement of the ulcer (Fig. 1a-f).

We cultured skin fibroblasts from the wound area with the patient's consent (#1145, Chiba University Ethics Committee), and found that the proliferation of patient-derived dermal fibroblasts was slower than that of healthy individuals (data not shown). In addition, senescence-associated β-galactosidase staining showed strong cellular senescence (Fig. 1i,j). Fibroblasts from the WS patient showed increased mRNA expression of the aging marker, *CDKN1A*, the senescence-associated secretory phenotype factors *IL1B* and *IL6*. The nuclear protein LMNB1 was severely decreased (Fig. 1k). Taken together the patient's fibroblast showed severe cellular senescence. The datasets are available from the corresponding author on reasonable request.

Fibroblasts in WS show cellular senescence with decreased proliferation, increased senescence markers as seen in this case. Recently, we reported that WS fibroblasts have distinct characteristics between the trunk and the extremities, and that peripheral fibroblasts retain their osteogenic potential, while their adipogenic potential is reduced.² In addition, WS fibroblasts show overexpression of Pit1, a phosphorus transporter, and are prone to ectopic calcification.³ In other words, senescent fibroblasts are prone to develop calcification, cause inflammation, leading to ulcer formation.

Risk factors for diabetic skin ulcers, representative skin ulcers in healthy individuals, include severe neuropathy, history of foot ulcers, peripheral artery disease, depression and poor glycemic control.⁴ Sarcopenia and reduction of blood flow is also a risk factor for skin ulceration.⁵⁻⁷ Therefore, along with cellular senescence of fibroblasts, atherosclerosis or poor diabetes control might contribute to the refractoriness of skin ulcers in WS through reduction of blood flow and susceptibility to infection. In the present case, fortunately, none of these factors were observed. These facts suggest that even in the presence of cellular senescence and senescence associated-secretory phenotype, if structural changes, such as fibrosis and atherosclerosis, are mild, wound healing of WS patients can be expected. Therefore, the present case implicated the importance of early diagnosis and early treatment of skin complications of WS patients.

Acknowledgement

We thank Ms Aki Watanabe for her excellent technical assistance.

DK and HK are contributed equally to this case report.

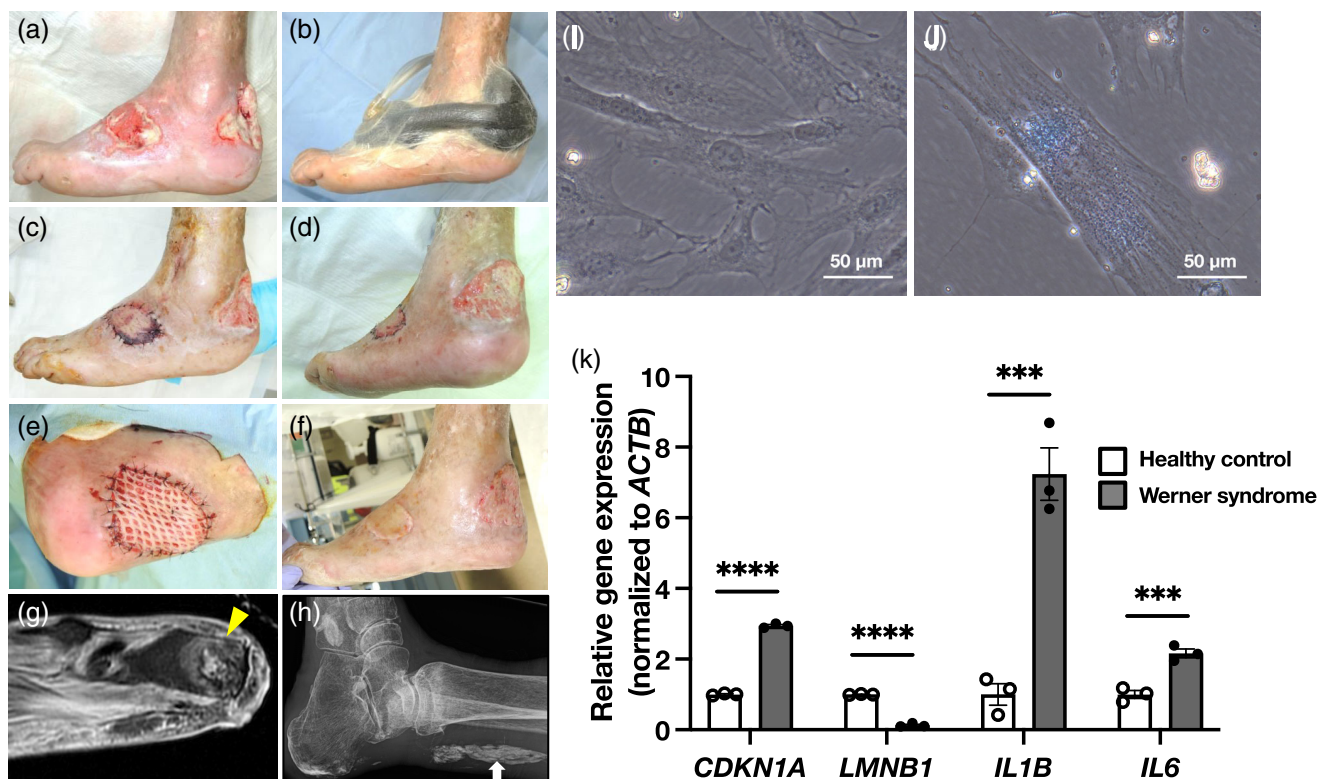


Figure 1 (a–f) The treatment of intractable skin ulcer. Hyperbaric oxygen therapy was used for 2 h at two atmospheres over 30 sessions for 68 days. Negative pressure closure therapy was used for 48 days using the V.A.C. ULTA Therapy System (KCI USA, Henderson, NE, USA). For the first 28 days, negative pressure of -75 mmHg was applied for 3 h and 30 min after immersion in 30 mL of saline for 10 min. For the second 20 days, negative pressure was applied alternately at -25 mmHg for 3 min and at -75 mmHg for 3 min. (g) Magnetic resonance imaging showing high intensity on Short tau inversion recovery (STIR), indicating osteomyelitis. (h) Achilles tendon calcification typical for Werner syndrome (WS). (i, j) Senescence-associated β -galactosidase staining of (i) normal and (j) WS fibroblasts. Normal fibroblasts were collected from a forearm of an individual without WS and without obvious chronic diseases. (k) Real-time reverse transcription polymerase chain reaction analysis using the fibroblasts from the WS patient and healthy control, showing cellular senescence. White bar: healthy control, gray bar: Werner syndrome. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Daisuke Kinoshita,¹ Hisaya Kato,¹ Hiyori Kaneko,¹
Takahiro Ishikawa,¹ Naoya Teramoto,¹
Ayano Tsukagoshi,¹ Yukari Maeda,¹
Takuya Minamizuka,¹ Aiko Hayashi,¹ Mayumi Shoji,¹
Daisuke Sawada,² Shinichiro Funayama,¹
Masaya Koshizaka,¹ Hideyuki Ogata,³
Yoshitaka Kubota,³ Nobuyuki Mitsukawa,³
Minoru Takemoto,⁴ Koutaro Yokote¹ and

Yoshiro Maezawa¹

¹Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

²Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

³Department of Plastic Surgery, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁴Department of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, International University of Health and Welfare, Chiba, Japan

References

- Koshizaka M, Maezawa Y, Maeda Y *et al*. Time gap between the onset and diagnosis in Werner syndrome: a nationwide survey and the 2020 registry in Japan. *Aging* 2020; **12**: 24940–24956.

- 2 Kato H, Maezawa Y, Takayama N *et al.* Fibroblasts from different body parts exhibit distinct phenotypes in adult progeria Werner syndrome. *Aging* 2021; **13**: 4946–4961.
- 3 Honjo S, Yokote K, Takada A *et al.* Etidronate ameliorates painful soft-tissue calcification in Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc* 2005; **53**: 2038–2039.
- 4 Boulton AJ, Armstrong DG, Albert SF *et al.* Comprehensive foot examination and risk assessment. A report of the task force of the foot care interest Group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. *Phys Ther* 2008; **88**: 1436–1443.
- 5 Cheng Q, Hu J, Yang P *et al.* Sarcopenia is independently associated with diabetic foot disease. *Sci Rep* 2017; **7**: 8372.
- 6 Boyko EJ, Ahroni JH, Cohen V, Nelson KM, Heagerty PJ. Prediction of diabetic foot ulcer occurrence using commonly available clinical information: the Seattle diabetic foot study. *Diabetes Care* 2006; **29**: 1202–1207.
- 7 Brownrigg JR, Hinchliffe RJ, Apelqvist J *et al.* Performance of prognostic markers in the prediction of wound healing or amputation among patients with foot ulcers in diabetes: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev* 2016; **32**: 128–135.

How to cite this article: Kinoshita D, Kato H, Kaneko H, et al. Case of Werner syndrome with significant improvement of refractory skin ulcer despite fibroblast cellular senescence. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2023;23:239–241. <https://doi.org/10.1111/ggi.14546>

Omicron variant infections and multiple strokes in older adults

Keywords: elderly, multiple strokes, omicron variant.

Dear Editor,

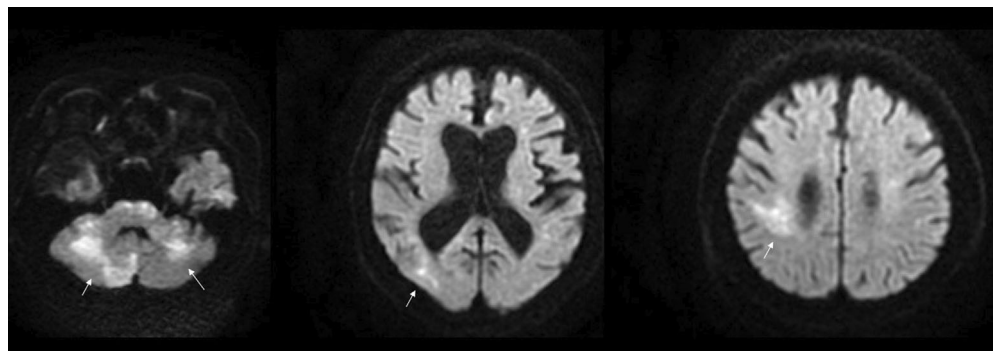
Ischemic stroke is a major complication of coronavirus infection 2019 (COVID-19).¹ Among strokes, multiple strokes, including bihemispheric cerebral infarctions, are uncommon, suggesting an embolic source, and are associated with increased death and disability.² During the seventh wave of the COVID-19 pandemic in Japan, >200 000 people a day were infected with the omicron variant. During this period, multiple strokes with poor prognosis occurred frequently in older people.

A 92-year-old woman was infected with the omicron variant due to a cluster outbreak at the facility she lived in. She had already received the third dose of the COVID-19 mRNA vaccine. She had a fever of 38°C, loss of appetite, decreased sense of smell and polymerase chain reaction testing confirmed COVID-19 infection. Chest radiographs showed no evidence of pneumonia. Considering the patient's advanced age, she received intravenous infusion of remdesivir as antiviral therapy, 200 mg on the first day, and 100 mg on and after the second day, once a day for a total of 5 days. With systemic management, COVID-19 infection did not become severe and her appetite recovered within a week. However, 2 weeks after the COVID-19 infection, she suddenly developed a loss of consciousness. Magnetic resonance imaging of the head showed swollen cerebellar hemispheres and high-intensity lesions

in the bilateral cerebellum and right occipital to parietal lobes on diffusion-weighted images, leading to a diagnosis of multiple stroke (Fig. 1). Magnetic resonance angiography at onset showed bilateral occlusion of the posterior cerebral arteries, which reopened 1 month later (Fig. 2). Electrocardiogram showed no atrial fibrillation or other arrhythmias. Blood tests were almost normal except for an elevated D-dimer level of 9.7 µg/mL. Intensive systemic management was carried out and edaravone was administered, but her level of consciousness did not improve, so she was placed on central venous nutritional management. Consent for the presentation of the case was obtained from the patient's family.

There is a risk that COVID-19 infection might induce severe thrombosis due to hypercoagulable conditions, such as large vessel occlusive ischemic stroke.³ According to the TOAST classification, this case was classified as a "stroke of unknown cause". Endothelial damage, hypercoagulability, viral myocarditis and hypoxic damage have been proposed as the pathogenesis of COVID-19-related stroke,⁴ and in the present case, hypercoagulability was one of the causes of the stroke. In a multivariate analysis controlling for race/ethnicity, COVID-19 infection was significantly and independently associated with large vessel occlusive stroke, with an odds ratio of 2.4.⁵ However, the relationship between omicron variant infection and cerebral infarction is unclear, as all of these reports of the relationship between cerebral

Figure 1 Diffusion-weighted image of the patient. High-intensity lesions were found in bilateral cerebellar hemispheres, right occipital lobe and parietal lobe, indicating the presence of multiple acute cerebral infarctions (shown by white arrows).



CASE REPORT

Open Access



Optical coherence tomography findings in three patients with Werner syndrome

Tatsuya Nagai¹, Hirotaka Yokouchi^{1*} , Gen Miura¹, Masaya Koshizaka², Yoshiro Maezawa², Toshiyuki Oshitari^{1,3}, Koutaro Yokote² and Takayuki Baba¹

Abstract

Background: Werner syndrome is a rare, autosomal recessive disorder characterised by premature aging. It is a typical hereditary progeroid syndrome that can be difficult to diagnose owing to its rarity and the similarity of some of its symptoms, such as juvenile cataracts, to other common ophthalmologic conditions. Early onset of bilateral cataracts is currently used as the ophthalmological feature for Werner syndrome; however, ophthalmologists often find performing a detailed examination of the medical history and genetic testing for Werner syndrome at the time of an ophthalmologic consultation challenging. If a unique ocular finding was observed on ocular examinations in cases of juvenile bilateral cataracts, we could consider Werner syndrome as a differential diagnosis.

Case presentation: We documented the cases of three patients with Werner syndrome in whom thinning of the retina in the retinal nerve fiber layer (RNFL) and ganglion cell complex (GCC) were observed using optical coherence tomography (OCT). Visual field tests revealed the loss of visual field mainly owing to glaucoma.

The thinning of the choroidal thickness (CT) in three patients was also observed using enhanced depth imaging (EDI)-OCT.

Conclusions: Three patients have thinning of the RNFL, GCC, and choroidal thickness and the loss of visual field. These findings suggest the need for including Werner syndrome in the differential diagnosis when patients presenting with juvenile cataracts of unknown cause also show abnormal retinal and choroidal thinning in the OCT images.

Keywords: Werner syndrome, Optical coherence tomography (OCT), Retinal thickness, Choroidal thickness, Juvenile cataracts

Background

Werner syndrome is a rare, autosomal recessive disorder characterized by premature aging. The known major signs of Werner syndrome include premature hair changes, bilateral cataracts, atrophic hardening and intractable skin ulcers, soft tissue calcification, bird-like face, and Achilles' tendon calcification. In addition, atherosclerosis is one of the most important features of this

disease. Many patients with Werner syndrome die by their mid-50s owing to diseases such as cancer or arteriosclerosis. Calcification of the Achilles tendon is considered particularly useful for the clinical diagnosis of Werner syndrome owing to its high sensitivity and specificity. The estimated number of patients with Werner syndrome in Japan is approximately 700–2000 [1–4]. In 1992, a causative gene was identified in 8p12 of the short arm of chromosome 8 [5], and in 1996, the gene responsible for this disease, i.e. *WRN*, which encodes RecQ-type DNA helicase, was discovered [6]. In terms of eye-related complications, the positive rate of cataracts is 100% (with a 96% positive rate for cataracts in both eyes) [7]. Certain

*Correspondence: yokouchi123@peace.ocn.ne.jp

¹ Department of Ophthalmology and Visual Science, Chiba University Graduate School of Medicine, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, 260-8670 Chiba, Japan
Full list of author information is available at the end of the article



reports exist of patients with Werner syndrome with cystoid macular edema [8, 9], bilateral retinal detachment [10], or primary bullous keratopathy [11]; however, few reports have documented the changes in the thickness of the retina and choroid. In healthy people, aging causes thinning of the retina and choroid [12, 13] and similar changes are speculated to occur in patients with Werner syndrome. This report documents three cases of Werner syndrome in which thinning of both the retina and the choroid was observed using optical coherence tomography (OCT) (Table 1).

Case presentation

Case 1

The case was that of a 44-year-old Japanese male who presented with six major signs of Werner syndrome, including grey hair, cataracts in both eyes, intractable skin ulcers, soft tissue calcification, Achilles' tendon calcification, and a bird-like face. The condition was attributed to a compound heterozygous mutation of type 4 mutation (c. 3139-1G>C) and novel mutation. His height was 168 cm and weight was 55 kg (body mass index [BMI]: 19.4). He had grey hair and hair loss since his 30s. Moreover, since his 40s, he had right Achilles' tendon and outer ankle ulcers, skin hardening and atrophy, soft tissue calcification, bird-like face, a high-pitched and hoarse voice, diabetes, dyslipidaemia, osteoporosis, latent hypothyroidism, atrophic thyroiditis, and sarcopenic obesity. At the age of 38 years, he had undergone cataract surgery in both eyes and had been treated with glaucoma eye drops. He had no family history of Werner

syndrome. At the initial visit, his best-corrected visual acuity (BCVA) was 1.2 and 1.2 in the right and left eyes, and the refraction was -1.00 diopter sphere (DS) / -0.50 diopter cylinder (DC) $\times 125^\circ$ and -0.50 DS / -0.50 DC $\times 120^\circ$ in the right and left eye, respectively. The axial length was 23.68 mm and 23.60 mm in the right and left eyes. The patient was already diagnosed with glaucoma and followed up at previous eye clinics before referral to our hospital. The intraocular pressure (IOP) was 6 mmHg in both eyes with treatment using tafluprost, timolol maleate, and brimonidine for both eyes.

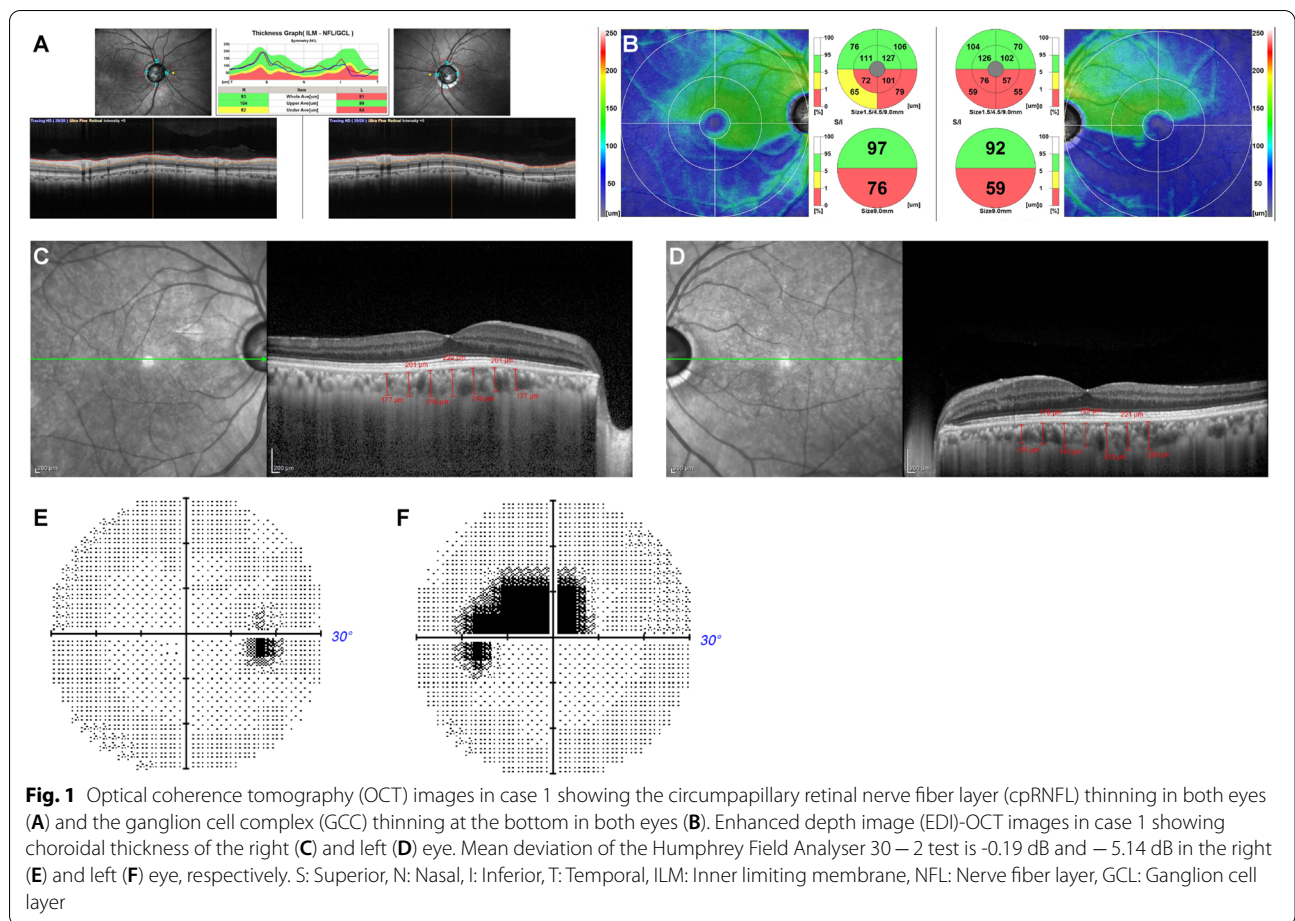
He had intraocular lenses (IOLs) in both eyes. The OCT images were all taken after the cataract surgery. The choroidal thickness was determined from the SD-OCT (Heidelberg Spectralis OCT; Heidelberg, Germany) images. We used enhanced depth imaging (EDI) methods under the same settings. Each image was obtained using the eye tracking system, and 100 scans were averaged to increase the signal-to-noise ratio, and the EDI-OCT algorithm was used. The choroidal thickness was manually measured from the outer border of the retinal pigment epithelium (RPE) to the inner border of the sclera. The RNFL and GCC were automatically measured from the inner layer membrane to the inner border of the RPE with the software in the RS3000 advance spectral domain OCT (SD-OCT; NIDEK, Gamagori, Japan). OCT showed that the average circumpapillary retinal nerve fiber layer (cpRNFL) thickness was 93 μm in the right eye and 81 μm in the left eye, indicating cpRNFL thinning in the left eye (Fig. 1A). Additionally, the ganglion cell complex (GCC) thickness was 97 μm at the superior macula and 76 μm at the inferior macula in the right eye and 92 μm at the superior macula and 59 μm at the inferior macula in the left eye, indicating GCC thinning at the inferior macula in both eyes (Fig. 1B). The central choroidal thickness (CCT) was 222 μm in the right eye (Fig. 1C) and 189 μm in the left eye (Fig. 1D). Mean deviation of the Humphrey Field Analyser 30-2 test was -0.19 dB and -5.14 dB in the right (Fig. 1E) and left (Fig. 1F) eyes, respectively.

Case 2

The case was a 57-year-old Japanese male who was referred for cataract surgery because of poor vision of his left eye. He presented with six major signs of Werner syndrome, including grey hair, cataracts in both eyes, intractable skin ulcers, soft tissue calcification, Achilles' tendon calcification, and a bird-like face. The condition was attributed to a type 6 (c. 1105 C>T) homozygous mutation. His height was 163 cm and weight was 36 kg (BMI: 13.5). He had grey hair and hair loss since his 20s and experienced Achilles' tendon pain bilaterally and skin hardening and atrophy since his 30s. In his 40s, he developed toe ulcers, osteomyelitis, and a high-pitched

Table 1 Laboratory findings in the three patients

		Case 1	Case 2	Case 3
Sex		male	male	female
Age		44	57	47
BMI	(kg/m ²)	19.4	13.5	19.3
Hematology				
WBC	(/ μL)	9,100	7,800	7,100
RBC	(/ μL)	404×10^4	339×10^4	415×10^4
Hb	(/dL)	13.5	10.8	11
PLT	(/ μL)	161×10^3	326×10^3	387×10^3
Biochemistry				
AST	(U/L)	44	29	19
ALT	(U/L)	52	25	20
ALP	(U/L)	223	298	472
γ -GTP	(U/L)	47	47	215
BUN	(mg/dl)	12	22	14
Cre	(mg/dl)	0.81	1.13	0.42
Na	(mmol/L)	138	141	149
K	(mmol/L)	4.5	4.7	4.4

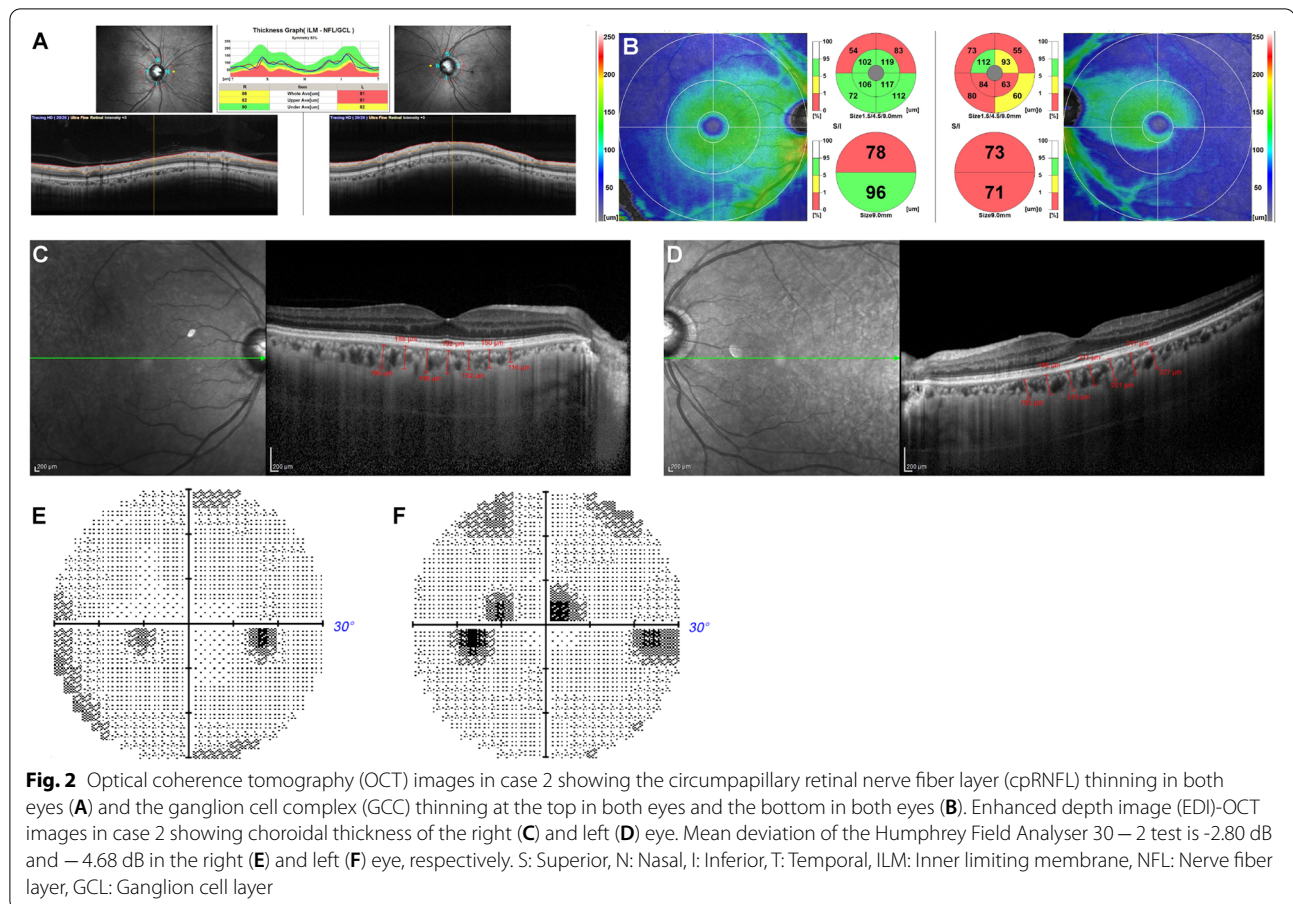


and coarse voice. After undergoing surgery for bladder cancer at 39 years of age, he had hypertension, diabetes, dyslipidaemia, osteoporosis, and hypothyroidism. At the age of 40, he underwent cataract surgery in his right eye and developed glaucoma; he had also been treated with glaucoma eye drops. At the initial visit, his best-corrected visual acuity was 1.2 and 0.02 and the refraction was +0.50 DS / -1.00 DC × 90° and -1.50 DS in the right and left eye, respectively. The axial length was 24.83 mm and 24.82 mm in the right and left eyes. The IOP was 13 mmHg in the right eye and 15 mmHg in the left eye upon treatment with latanoprost and timolol maleate for both eyes. He had an IOL in the right eye, and a cataract in the left eye. After cataract surgery in his left eye, his visual acuity improved to 1.2 and OCT revealed that the cpRNFL had thinned to 86 μm in the right eye and 81 μm in the left eye (Fig. 2A). Moreover, the GCC was 78 μm at the superior macula and 96 μm at the inferior macula in the right eye and 73 μm at the superior macula and 71 μm at the inferior macula in the left eye, indicating GCC thinning at the superior macula in the right eye and at the entire macula in the left eye (Fig. 2B). The CCT

was 192 μm in the right eye (Fig. 2C) and 211 μm in the left eye (Fig. 2D). Mean deviation of the Humphrey Field Analyser 30 – 2 test was -2.80 dB and -4.68 dB in the right (Fig. 2E) and left (Fig. 2F) eyes, respectively.

Case 3

The case was a 47-year-old Japanese female who presented with five major signs of Werner syndrome, including grey hair, cataracts in both eyes, intractable skin ulcers, Achilles’ tendon calcification, and a bird-like face. The condition was attributed to a compound heterozygous mutation of type 1 (c. 3446delA) and type 4 mutations. Her height was 149 cm and weight was 43 kg (BMI: 19.3). In her 40s, she had developed grey hair, hair loss, hardening of the Achilles tendon on her right leg, ulcers on her left leg, soft tissue calcification, bird-like face, a high-pitched and hoarse voice, diabetes, dyslipidaemia, osteoporosis, and papillary thyroid cancer. At the age of 30, she underwent cataract surgery in both eyes, followed by posterior capsulotomy for secondary cataract in her right eye. At the initial visit, her best-corrected visual acuity was 1.0 and 1.2 and the refraction was



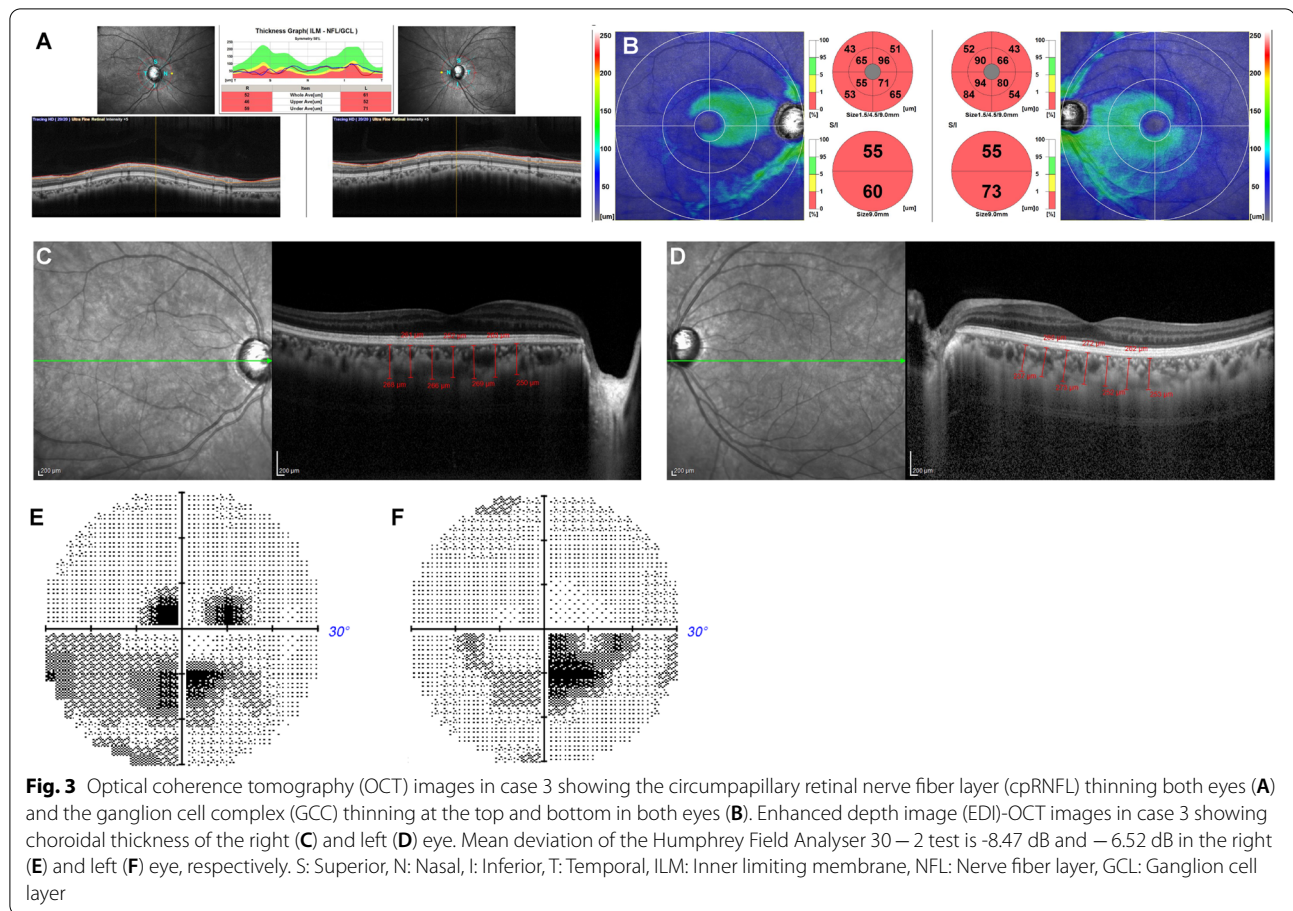
+0.50 and +0.50 DS / -2.50 DC \times 65° in the right and left eye, respectively. The axial length was 24.52 mm and 24.49 mm in the right and left eyes. The IOP was 18 mmHg in both eyes. She had IOLs in both eyes. She showed no signs of diabetic retinopathy. The cpRNFL had thinned to 52 and 61 μ m in the right and left eyes while the GCC was 55 μ m at the superior macula and 60 μ m at the inferior macula in the right eye and 55 μ m at the superior macula and 73 μ m at the inferior macula in the left eye, indicating GCC thinning at the entire macula in both eyes (Fig. 3A, B). The CCT was 252 μ m in the right eye (Fig. 3C) and 272 μ m in the left eye (Fig. 3D). Mean deviation of the Humphrey Field Analyser 30 – 2 test is -8.47 dB and -6.52 dB in the right (Fig. 3E) and left (Fig. 3F) eye, respectively.

Discussion and conclusions

Juvenile cataracts frequently occur in the patients with Werner syndrome [14]. In fact, the positive percentage of cataracts is 100% (with a 96% positive percentage for cataracts in both eyes). Therefore, the presence of cataracts is a diagnostic criterion for this disease [7]. Our patients also had the histories of cataract surgery, and two of

them already had IOLs in both eyes at their initial visit. Among Japanese people, age-related cataracts are usually observed around the age of 50, with a morbidity less than 10%, and the morbidity increases to 80% or more after the age of 70 [15]. Interestingly, the age of onset of cataracts is extremely young and is usually around 31 years for patients with Werner syndrome [16]. Therefore, most patients consult an ophthalmologist because of poor vision and are diagnosed as having juvenile cataracts of unknown cause at their first visit to an eye clinic. In fact, the causes of juvenile cataracts include diseases that are congenital or atopic dermatitis, as well as diabetes, trauma, and metabolic disorders. Werner syndrome is rarely included in the differential diagnosis because of its rarity.

A national survey in Japan also reported that Werner syndrome was often suggested by dermatologists or plastic surgeons, and not by ophthalmologists [4]. These results suggest that it is necessary to consider measures for early diagnosis and early intervention. The onset of Werner syndrome is usually recognised by bilateral cataracts or grey hair and hair loss, which are usually the first symptoms. However, many of patients



and ophthalmologists may not have adequate information to diagnose Werner syndrome. Ophthalmologists often find it difficult to perform a detailed examination of the medical history and genetic testing for Werner syndrome at the time of an ophthalmologic consultation. Therefore, it is difficult for ophthalmologists to make a diagnosis of Werner syndrome.

If a unique ocular finding other than cataracts were observed on ocular examinations in cases of juvenile cataracts in both eyes, we could consider Werner syndrome as a differential diagnosis, and this would lead to an early diagnosis of Werner syndrome. In this report, we documented the cases of three patients with Werner syndrome in whom thinning of the retina and choroid were observed using OCT.

Glaucoma is a well-known disease that causes thinning of the retina owing to the loss of retinal ganglion cells and retinal nerve fiber. The RNFL and GCC start thinning from the early stages of glaucoma, and this finding is useful for its early diagnosis [17]. In addition, aging is considered one of the most important risk factors for the development of glaucoma [18].

The patients in cases 1 and 2 had already been diagnosed with glaucoma and followed up at previous eye clinics before referral to our hospital. And we presume this patient to have glaucoma in left eye upon visual field testing. In fact, Abraham, L.M et al. have also reported primary glaucoma in three siblings with Werner syndrome [19]; however, we could not completely exclude the effect of premature aging as the main feature of this disease.

On the other hand, thinning of the RNFL and GCC also occurs with aging. Leung et al. reported that the cpRNFL thickness naturally decreased by approximately $-0.3 \mu\text{m}$ per year along with normal aging. An examination showed that the RNFL thickness of the upper area and lower temporal area decreased after the patients reached their 40s [12]. Sung et al. reported that the macular thickness in healthy individuals thinned by approximately $-0.4 \mu\text{m}$ per year [20], and other studies showed a decrease in the RNFL thickness along with aging [21]. However, the exact cause of this thinning remains unknown.

Therefore, the following question "Were the changes observed in the cases presented here simply due to the effects of glaucoma?" still remains. We cannot clearly answer this question. Because of that, next, we focussed not only on the retina but also on the choroid in our patients.

The choroid is located between the retina and sclera and is a tissue which is rich in blood vessels and pigments. The choroid can be divided into three layers. The innermost layer is the choriocapillaris, which consists of a dense network of fenestrated capillaries; the second is the Sattler's layer, which consists of small and medium-sized blood vessels; and the third is the Haller's layer, which consists of large blood vessels [22]. In healthy individuals, a relationship between choroidal thickness and aging has been reported, and choroidal thickness is known to decrease gradually with aging [23]. Therefore, we focused on the choroidal changes in the OCT images. Considering past literature, the health condition of the patients in Case 1 (44 years old) and Case 2 (57 years old) corresponded to that of a healthy person in their 80s, and the health condition of the patient in Case 3 (47 years old) corresponded to that of a healthy person in their 60s [24]. Other than aging, some factors, such as axial length [25], sex [25], intraocular pressure changes [26], diurnal fluctuations [27], blood glucose levels, and blood pressure treatment [28], have been reported to affect choroidal thickness. However, in our cases, we think that the effect of these factors on choroidal thickness was small, suggesting early age-related changes in the choroid.

Few reports have documented structural retinal changes, especially in the choroid in patients with Werner syndrome, and some cases of complications of glaucoma have also been reported [19]. As described before, the thinning of the cpRNFL and GCC observed on OCT images might be caused not only by an age-related change, but also by a glaucomatous change. However, if we consider choroidal thinning, these retinal and choroidal changes might be due to accelerated aging in patients with Werner syndrome.

When we evaluate age-related retinal and choroidal changes in a healthy human, it is very difficult to follow the changes on OCT images over decades in the same patient. In fact, most of the previous reports on the relationship between aging and choroidal changes are comparative analyses of data measured separately for each age group. However, in Werner syndrome, the same patient can be followed up for several years and we might have the possibility of witnessing the changes similar to those in a healthy human for decades because of the accelerated age-related changes in Werner syndrome. Although more cases and further research are

needed in the future, Werner syndrome might be a 'human retinal/choroidal aging model' that can help determine aging-related retinal and choroidal changes.

We should describe some limitations of this case report. First, the changes in the choroid and retina might have been due to incidental thinning. Second, these changes might be because of complications, such as glaucoma, which are associated with Werner syndrome. Third, although our cases showed no evidence of diabetic complications, such as diabetic retinopathy, the choroidal and retinal changes could possibly be due to diabetes and the effects of anti-diabetic drugs [29].

Fourth, we could not exclude the effect of atherosclerosis on retinal thickness. It is well known that atherosclerosis, which is an important aspect of Werner syndrome, is associated with reduction of retinal thickness on OCT. For example, previous studies revealed that reduction of retinal thickness is associated with chronic renal failure [30]. No serious atherosclerosis was observed in the fundus of the patients, and they did not have severe renal failure; therefore, we believe that these retinal thickness reductions were not associated with chronic renal failure in our patients.

Finally, the effects of other oral medications, such as blood pressure-lowering drugs, and diurnal fluctuations cannot be excluded.

In our three cases, OCT examination enabled the observation of retinal and choroidal thinning. In order to promote early diagnosis of Werner syndrome, it is necessary to create awareness regarding Werner syndrome among ophthalmologists. When we encounter juvenile cataracts of unknown cause and OCT images show thinning of the retina and choroid unexpected to occur naturally with aging, we should consider Werner syndrome as a differential diagnosis.

Abbreviations

BCVA: Best-corrected visual acuity; BMI: Body mass index; OCT: Optical coherence tomography; IOP: Intraocular pressure; IOLs: Intraocular lenses; cpRNFL: Circumpapillary retinal nerve fiber layer; GCC: The ganglion cell complex.

Acknowledgements

None.

Authors' contribution

HY and TN attended the case, analysed data, drafted the manuscript and revised it. GM, MK and YM analysed the data and revised the manuscript. TB and KY attended the cases and analysed the data. HY and TN had full access to all of the data in this study and take responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding

No funding was obtained for this case report.

Availability of data and materials

All the data supporting our findings are contained within the manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from the patient for publication of these case reports.

Competing interests

All authors declare no competing interests associated with this manuscript.

Author details

¹Department of Ophthalmology and Visual Science, Chiba University Graduate School of Medicine, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, 260-8670 Chiba, Japan. ²Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan. ³Department of Ophthalmology, International University of Health and Welfare School of Medicine, Narita, Japan.

Received: 10 May 2022 Accepted: 28 October 2022

Published online: 19 November 2022

References

- Matsumoto T, Imamura O, Yamabe Y, Kuromitsu J, Tokutake Y, Shimamoto A, 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.* 1997;100:123–30.
- Satoh M, Imai M, Sugimoto M, Goto M, Furuichi Y. Prevalence of Werner's syndrome heterozygotes in Japan. *Lancet.* 1999;353:1766.
- Yokote K, Chanprasert S, Lee L, Eirich K, Takemoto M, Watanabe A, et al. WRN mutation update: mutation spectrum, patient registries, and translational prospects. *Hum Mutat.* 2017;38:7–15.
- Koshizaka M, Maezawa Y, Maeda Y, Shoji M, Kato H, Kaneko H, et al. Time gap between the onset and diagnosis in Werner syndrome: a nationwide survey and the 2020 registry in Japan. *Aging.* 2020;12:2494–56.
- Goto M, Rubenstein M, Weber J, Woods K, Drayna D. Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature.* 1992;355:735–8.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, et al. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science.* 1996;272:258–62.
- Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, et al. Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int.* 2013;13:475–81.
- Oshitari T, Kitahashi M, Mizuno S, Baba T, Kubota-Taniai M, Takemoto M, et al. Werner syndrome with refractory cystoid macular edema and immunohistochemical analysis of WRN proteins in human retinas. *BMC Ophthalmol.* 2014;14:31.
- Lyons C, Gallagher D, McSwiney T, McElnea E, Kinsella F. The ophthalmic diagnosis and management of four siblings with Werner syndrome. *Int Ophthalmol.* 2019;39:1371–8.
- Sasoh M, Tsukitome H, Matsui Y, Furuta M, Kondo M. Bilateral retinal detachment in Werner syndrome. *Retin Cases Brief Rep.* 2014;8:92–4.
- Singh D, Ganger A, Gupta N, Vanathi M, Khadgawat R, Tandon R. Primary bullous keratopathy in a patient With Werner syndrome treated With corneal transplant. *Exp Clin Transplant.* 2019;17:699–701.
- Leung CK, Yu M, Weinreb RN, Ye C, Liu S, Lai G, et al. Retinal nerve fiber layer imaging with spectral-domain optical coherence tomography: a prospective analysis of age-related loss. *Ophthalmology.* 2012;119:731–7.
- Fujiwara A, Shiragami C, Shirakata Y, Manabe S, Izumibata S, Shiraga F. Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography of subfoveal choroidal thickness in normal Japanese eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 2012;56:230–5.
- Chen CL, Yang JS, Zhang X, Tian T, Zeng R, Zhang GH, et al. A case report of Werner's syndrome with bilateral juvenile cataracts. *BMC Ophthalmol.* 2018;18:199.
- Sasaki H, Jonasson F, Kojima M, Katoh N, Ono M, Takahashi N, et al. The Reykjavik Eye Study—prevalence of lens opacification with reference to identical Japanese studies. *Ophthalmologica.* 2000;214:412–20.
- Goto M, Ishikawa Y. [Werner syndrome]. *Nihon Rinsho.* 2000;58:1490–5.
- Kita Y, Kita R, Nitta A, Nishimura C, Tomita G. Glaucomatous eye macular ganglion cell complex thickness and its relation to temporal circumpapillary retinal nerve fiber layer thickness. *Jpn J Ophthalmol.* 2011;55:228–34.
- Suzuki Y, Iwase A, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, et al. Risk factors for open-angle glaucoma in a Japanese population: the Tajimi Study. *Ophthalmology.* 2006;113:1613–7.
- Abraham LM, Braganza AD, Simha AR. Primary glaucoma in three siblings with Werner syndrome. *Clin Exp Ophthalmol.* 2013;41:416–8.
- Sung KR, Wollstein G, Bilonick RA, Townsend KA, Ishikawa H, Kagemann L, et al. Effects of age on optical coherence tomography measurements of healthy retinal nerve fiber layer, macula, and optic nerve head. *Ophthalmology.* 2009;116:1119–24.
- Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, Nguyen BB, Deneen J, Wilson MR, et al. Los Angeles Latino eye Study G. *Ophthalmology.* 2004;111:1439–48.
- Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:144–68.
- Margolis R, Spaide RF. A pilot study of enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in normal eyes. *Am J Ophthalmol.* 2009;147:811–5.
- Wakatsuki Y, Shinojima A, Kawamura A, Yuzawa M. Correlation of aging and segmental choroidal thickness measurement using swept source optical coherence tomography in healthy eyes. *PLOS ONE.* 2015;10:e0144156.
- Tuncer I, Karahan E, Zengin MO, Atalay E, Polat N. Choroidal thickness in relation to sex, age, refractive error, and axial length in healthy Turkish subjects. *Int Ophthalmol.* 2015;35:403–10.
- Hata M, Hirose F, Oishi A, Hirami Y, Kurimoto Y. Changes in choroidal thickness and optical axial length accompanying intraocular pressure increase. *Jpn J Ophthalmol.* 2012;56:564–8.
- Tan CS, Ouyang Y, Ruiz H, Sadda SR. Diurnal variation of choroidal thickness in normal, healthy subjects measured by spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:261–6.
- Jo Y, Ikuno Y, Iwamoto R, Okita K, Nishida K. Choroidal thickness changes after diabetes type 2 and blood pressure control in a hospitalized situation. *Retina.* 2014;34:1190–8.
- Endo H, Kase S, Saito M, Yokoi M, Takahashi M, Ishida S, et al. Choroidal thickness in diabetic patients Without diabetic retinopathy: A meta-analysis. *Am J Ophthalmol.* 2020;218:68–77.
- Shoshtari FS, Biranvand S, Rezaei L, Salari N, Aghaei N. The impact of hemodialysis on retinal and choroidal thickness in patients with chronic renal failure. *Int Ophthalmol.* 2021;41:1763–71.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:










- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



RNaseH2A downregulation drives inflammatory gene expression via genomic DNA fragmentation in senescent and cancer cells

Sho Sugawara ^{1,16}, Ryo Okada^{1,2,16}, Tze Mun Loo¹, Hisamichi Tanaka¹, Kenichi Miyata¹, Masatomo Chiba¹, Hiroko Kawasaki¹, Kaoru Katoh³, Shizuo Kaji ⁴, Yoshiro Maezawa⁵, Koutaro Yokote⁵, Mizuho Nakayama⁶, Masanobu Oshima ⁶, Koji Nagao⁷, Chikashi Obuse⁷, Satoshi Nagayama ^{8,9}, Keiyo Takubo ¹⁰, Akira Nakanishi ², Masato T. Kanemaki ^{11,12}, Eiji Hara ¹³ & Akiko Takahashi ^{1,14,15} ✉

Cellular senescence caused by oncogenic stimuli is associated with the development of various age-related pathologies through the senescence-associated secretory phenotype (SASP). SASP is mediated by the activation of cytoplasmic nucleic acid sensors. However, the molecular mechanism underlying the accumulation of nucleotide ligands in senescent cells is unclear. In this study, we revealed that the expression of RNaseH2A, which removes ribonucleoside monophosphates (rNMPs) from the genome, is regulated by E2F transcription factors, and it decreases during cellular senescence. Residual rNMPs cause genomic DNA fragmentation and aberrant activation of cytoplasmic nucleic acid sensors, thereby provoking subsequent SASP factor gene expression in senescent cells. In addition, RNaseH2A expression was significantly decreased in aged mouse tissues and cells from individuals with Werner syndrome. Furthermore, RNaseH2A degradation using the auxin-inducible degron system induced the accumulation of nucleotide ligands and induction of certain tumourigenic SASP-like factors, promoting the metastatic properties of colorectal cancer cells. Our results indicate that RNaseH2A downregulation provokes SASP through nucleotide ligand accumulation, which likely contributes to the pathological features of senescent, progeroid, and cancer cells.

¹Division of Cellular Senescence, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan. ²Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. ³Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Ibaraki 305-8560, Japan. ⁴Institute of Mathematics for Industry, Kyushu University, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan. ⁵Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Chiba 260-0856, Japan. ⁶Division of Genetics, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192, Japan. ⁷Laboratory of Genome Structure and Function, Graduated School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan. ⁸Department of Gastroenterological Surgery, Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research, 135-8550 Tokyo, Japan. ⁹Department of Surgery, Uji-Tokushukai Medical Center, Kyoto 611-0041, Japan. ¹⁰Department of Stem Cell Biology, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo 162-8655, Japan. ¹¹Department of Chromosome Science, National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems (ROIS), Yata 1111, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan. ¹²Department of Genetics, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Yata 1111, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan. ¹³Department of Molecular Microbiology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan. ¹⁴Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation (PRIME), Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), Chiyoda-ku, Tokyo 104-0004, Japan. ¹⁵Cancer Cell Communication Project, NEXT-Ganken Program, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo 135-8550, Japan. ¹⁶These authors contributed equally: Sho Sugawara, Ryo Okada. ✉email: akiko.takahashi@jfcr.or.jp

Cellular senescence is an irreversible, arrested growth state induced by a variety of oncogenic stimuli. This important tumour suppressor mechanism prevents the proliferation of damaged cells at risk of becoming cancerous^{1–4}. Senescent cells that accumulate with age gain the ability to produce various inflammatory proteins^{5–7}. This phenomenon, which is caused by persistent DNA damage, termed as the senescence-associated secretory phenotype (SASP). SASP induces chronic inflammation in surrounding tissues and promotes numerous age-related pathologies such as cancer^{8,9}. Senolytic drugs, which selectively target senescent cells, have been the subject of recent studies because the elimination of senescent cells from mouse models improved many age-related phenotypes and maintained homeostasis in tissues by inhibiting SASP^{10–12}. Therefore, understanding the regulatory mechanisms underlying SASP induction has received attention with respect to the development of anti-ageing treatments.

In recent years, it has been demonstrated that activation of the innate immune response pathway through cyclic GMP–AMP synthase linked to a stimulator of interferon genes (cGAS–STING) signalling is important for SASP induction in senescent cells^{13–17}. Endogenous genomic DNA ligands in the cytoplasm promote SASP through activation of the cGAS–STING pathway in senescent cells. However, the molecular mechanism of chromosomal DNA fragmentation and the origin of the nucleotide ligands for DNA sensors in senescent cells have not been explained.

Ribonuclease H2 subunit A (RNaseH2A) is the catalytic subunit of the RNase H2 endonuclease complex (RNaseH2A, RNaseH2B and RNaseH2C)¹⁸. Both RNase H1 and RNase H2 complexes resolve R-loop structures, consisting of double-stranded RNA–DNA hybrid and non-template single-stranded DNA, which are formed during transcription^{19,20}. Unlike RNase H1, which can only process R-loops, RNase H2 can recognise ribonucleoside monophosphates (rNMPs) that have been incorporated into the genome because of DNA replication errors or DNA repair synthesis²¹. Accumulation of rNMPs has been considered a factor that induces genome instability^{22–24}. *RNASEH2A* is responsible for Aicardi–Goutières syndrome (AGS)²⁵. AGS is associated with a viral infection-like phenotype in the embryo and severe neurological symptoms in infancy, causing early childhood mortality¹⁹, and the cGAS–STING pathway is activated in AGS model mice^{26,27}. Accordingly, we hypothesised that RNaseH2A is involved in nucleotide ligand production and the subsequent induction of SASP during cellular senescence.

Several lines of evidence suggest that RNase H2 plays an important role in tumour progression. Intestinal epithelial-specific deletion of *Rnaseh2b* and *Trp53* leads to the spontaneous development of small intestine and colon carcinomas in mice²⁸. In addition, lower levels of RNase H2 are correlated with poor overall survival in patients with colorectal adenocarcinoma²⁸. Another group demonstrated that *RNASEH2B* deletion is frequently detected in patients with metastatic prostate cancer or chronic lymphocytic leukaemia²⁹. These reports indicate that RNase H2 functions as a tumour suppressor. However, the molecular interplay between a decrease in RNase H2 activity and gain of tumour malignancy has not been clarified.

In this study, we demonstrated that RNaseH2A gene expression is regulated by E2F transcription factors. Downregulation of RNaseH2A destabilises genomic DNA because of increased rNMP levels and facilitates nucleotide ligand accumulation, thereby activating cytoplasmic nucleic acid sensors in senescent and progeroid cells. This pathway induces inflammatory SASP-like gene expression and potentially contributes to the gain of malignant features in cancer cells.

Results

RNaseH2A expression and its enzymatic activity are suppressed in senescent cells. To identify potentially significant factors that regulate genomic DNA fragmentation and the production of nucleotide ligands for DNA sensor activation, we performed RNA sequencing (RNA-seq) using pre-senescent and senescent human diploid fibroblasts (HDFs; Supplementary Data 1 and 2). Pre-senescent TIG-3 and IMR-90 cells (early passage) were rendered senescent by either serial passage (late-passage; Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a) or ectopic expression of oncogenic Ras (HRas^{V12}; Supplementary Fig. 1b). We investigated the changes in the expression of nuclease-related molecules involved in genomic DNA fragmentation in senescent HDFs. Based on gene set enrichment analysis (GSEA)^{30,31}, the gene expression associated with nuclease activity tended to be lower in senescent HDFs (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a, b). The top 10 downregulated genes in senescent cells compared to the findings in young cells are listed in Fig. 1b and Supplementary Data 3. Of these, *Nei-like DNA glycosylase 3*, a DNA glycosylase involved in telomere maintenance, was identified³². However, the knockout of *Nei-like DNA glycosylases* did not result in chromosomal instability or DNA fragmentation³³. The next seven genes were primarily associated with homologous recombination repair, and it is known that homologous recombination decreases during cellular senescence³⁴. Although the downregulation of RNA-degrading enzymes is related to genomic instability, its association with cellular senescence has not been fully elucidated. Therefore, we focused on RNaseH2A, an endonuclease that specifically degrades rNMPs in genomic DNA.

RNA sequence analysis revealed that the expression of RNase H family genes (RNaseH2A and RNaseH2B) was significantly decreased in senescent HDFs, and several senescence markers were detected (Fig. 1c). RNase H2 is a heterotrimer composed of the catalytic subunit RNaseH2A and non-catalytic subunits RNaseH2B and RNaseH2C. Of these genes, we confirmed a significant decrease in RNaseH2A expression via quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR; Fig. 1d and Supplementary Fig. 1c) and western blotting (Fig. 1e) in senescent HDFs. Coherently, senescent HDFs exhibited a significant reduction in RNase activity in an in vitro RNase H2-specific activity assay (Fig. 1f). These results indicate that RNaseH2A activity is significantly decreased in senescent cells.

RNaseH2A expression is regulated by E2F transcription factors.

To obtain insight into the mechanism responsible for the downregulation of RNaseH2A during cellular senescence, we conducted a promoter sequence analysis of human *RNASEH2A*. The transactivation activity of the E2F family is known to be repressed by the p16^{INK4a}–RB pathway in senescent cells^{16,35,36}. Therefore, we hypothesised that E2F activity is crucial for *RNASEH2A* expression in HDFs. Based on this idea, we identified several putative binding sequences for the E2F-family transcription factors (Fig. 2a)³⁷. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis illustrated that E2F transcription factors, namely E2F1 and E2F3, bound to the promoter region of *RNASEH2A* (Fig. 2b). To confirm the importance of E2F transcription factors in RNaseH2A expression, we used small interfering RNA (siRNA) to knock down DP1, an essential activator of E2F transcription factors^{35,37}. This resulted in a significant reduction in RNaseH2A mRNA and protein expression in pre-senescent HDFs (Fig. 2c, d). Conversely, E2F3 overexpression increased the expression of RNaseH2A in HDFs (Supplementary Fig. 2a, b). Furthermore, a reporter analysis using deleted and mutated E2F-binding sites in the *RNASEH2A* promoter revealed the importance of E2F-binding sites for *RNASEH2A* expression (Fig. 2e, f and

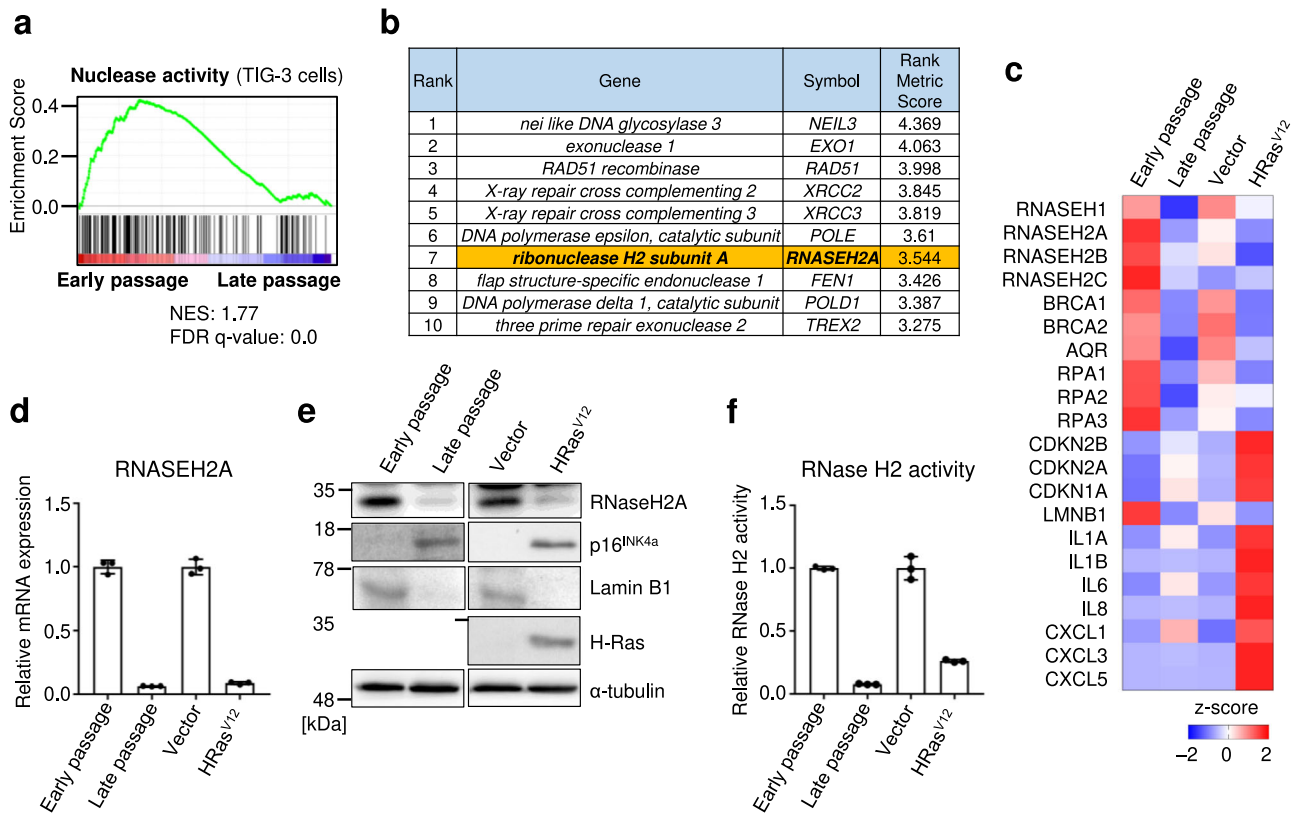


Fig. 1 RNase H2 activity is decreased in senescent cells. **a** Gene set enrichment analysis using the gene set for the nuclease activity of pre-senescent TIG-3 (early passage) and senescent TIG-3 cells (late-passage). NES: normalised enrichment score. FDR: false discovery rate. **b** List of the top ten genes from RNA sequencing. The rank reveals significantly downregulated genes in senescent TIG-3 cells compared to their expression in pre-senescent TIG-3 cells. See also Supplementary Data 1–3. **c** Heat map created by calculating the median from log₂ (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) of early-passage, late-passage, or vector-infected and oncogenic Ras (HRas^{V12})-infected TIG-3 cells. **d** Quantitative reverse transcription PCR analysis of RNASEH2A gene expression in early-passage, late-passage, vector-infected or HRas^{V12}-infected TIG-3 cells. Error bars indicate the mean ± SD of technical triplicates. **e** Western blot of TIG-3 cells as in **d** using the antibodies indicated on the right. Alpha-tubulin was used as a loading control. **f** In vitro RNase H2-specific activity assay of TIG-3 cells as in **d**. Error bars indicate the mean ± SD of technical triplicates. All data are representative of at least three biological replicates.

Supplementary Fig. 2c, d). According to ChIP-Atlas data³⁸, we confirmed the enrichment of E2F1 binding to the promoter region of *RNASEH2A* in three cancer cell lines (HeLa, MCF7 and MDA-MB231; Supplementary Fig. 2e). To further verify the significance of E2F and p16^{INK4a}-RB pathways, we treated HDFs with the cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors palbociclib and abemaciclib, observing that CDK4/6 inhibition decreases *RNASEH2A* mRNA expression (Supplementary Fig. 2f). Collectively, these data indicate that RNaseH2A expression is regulated by E2F transcription factors.

Residual rNMP levels in genomic DNA are increased in senescent cells. Previous studies demonstrated that ribonucleotides misincorporated into the genome remained following *RNASEH2* knockout in yeast and mouse cells, leading to genomic DNA fragmentation^{24,39–41}. Because RNase H2 activity was significantly reduced in senescent HDFs (Fig. 1f), we next examined whether rNMPs accumulate in the genomic DNA of senescent cells following a hydrolysis reaction under alkaline conditions using agarose gel electrophoresis. Compared to its mobility in control pre-senescent HDFs, genomic DNA from senescent HDFs exhibited significantly increased mobility following alkaline treatment (Fig. 3a, b), whereas its mobility was constant under normal conditions (without alkaline treatment; Supplementary Fig. 3a, b). We then estimated the distribution of the fragment sizes and the number of rNMPs incorporated (breakage) per cell

as previously described in refs. 24,40, finding that the length of the DNA fragments was significantly reduced and numerous ribonucleotides remained across the whole genome of senescent cells (Fig. 3c). To further investigate genomic DNA instability in senescent cells, we focused on cytoplasmic DNA fragments. A nucleic acid analyser detected an increase in short dsDNA fragments from a few to 100 bases in length in the cytoplasm of senescent cells (Supplementary Fig. 3c). In addition, we found that fragmented double-stranded DNA (dsDNA) signals significantly increased outside the nuclear membrane by super-resolution microscopic analysis (Supplementary Fig. 3d, e). Importantly, although RNaseH2A expression was reduced in quiescent cells, probably because of the decrease in E2F activity (Supplementary Fig. 3f, g), genomic DNA fragmentation was not observed by alkaline gel electrophoresis in quiescent cells (Supplementary Fig. 3h). These results suggest that genomic rNMPs and cytoplasmic dsDNA fragments are accumulated in senescent, but not quiescent, cells.

RNaseH2A suppresses the expression of SASP factor genes. To evaluate the importance of RNaseH2A for cellular senescence, we performed siRNA knockdown experiments. The depletion of RNaseH2A by siRNA in HDFs (siRNH2A#1 and #2 in TIG-3 and IMR-90 cells) resulted in increased SA-β-Gal activity (Fig. 4a, b and Supplementary Fig. 4a, b) and the accumulation of DNA damage, as previously reported^{23,24,27,29,39} (Fig. 4c and

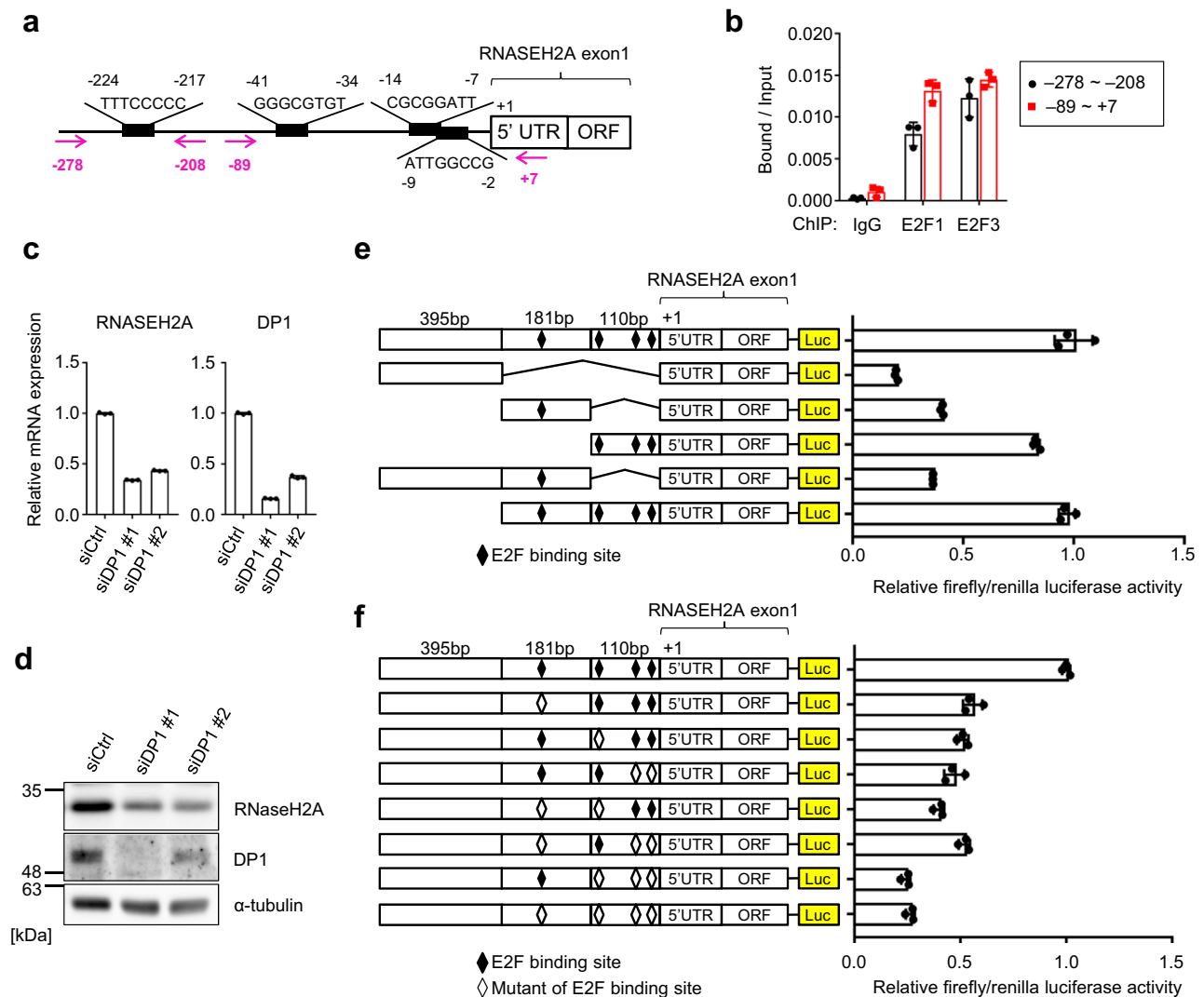


Fig. 2 RNaseH2A is regulated by E2F transcription factors. **a** Schematic diagram showing the E2F-binding sites in the RNaseH2A gene promoter. Red arrows indicate the region containing the PCR primers for ChIP analysis. **b** ChIP-qPCR analysis of pre-senescent TIG-3 cells using antibodies shown at the bottom. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **c** RT-qPCR analysis of RNaseH2A and DP1 mRNA expression with siRNA-treated TIG-3 cells. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **d** Western blot of TIG-3 cells as in **c** using antibodies shown at right. Alpha-tubulin was used as a loading control. **e** Left panel: Schematic representation of the reporter construct of human RNaseH2A gene promoter used in the analysis. Firefly luciferase is shown as Luc. Right panel: HEK293T cells were transfected with the indicated reporter plasmids and a Renilla plasmid as an internal control. After 48 h of transfection, luciferase activities were measured. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **f** Left panel: Schematic representation of the reporter construct of human RNaseH2A gene promoter used in the analysis. The E2F-binding element or its mutant is presented as a black or white rhombus. The firefly luciferase is shown as Luc. Right panel: HEK293T cells were transfected with the indicated reporter plasmids and a Renilla plasmid as an internal control. After 48 h of transfection, luciferase activities were measured. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. All data were representative of at least three biological replicates.

Supplementary Fig. 4c). In addition, genomic DNA fragments were detected at high levels in the cytoplasm of RNaseH2A-depleted HDFs (Fig. 4d). Moreover, we discovered a significant decrease in the expression of LMNB1 and induction of the CDK inhibitor gene CDKN2A and various SASP factor genes, indicating that RNaseH2A depletion results in cellular senescence (Fig. 4e and Supplementary Fig. 4d). Additionally, cGAS or STING depletion significantly attenuated the induction of SASP factors caused by RNaseH2A depletion (Fig. 4f, g). These results indicate that SASP induction by RNaseH2A depletion largely depends on the cGAS-STING pathway.

Conversely, RNaseH2A overexpression restored RNase H2 activity and inhibited the accumulation of genomic DNA fragments in the cytoplasm in Ras^{V12}-induced senescent cells

(Fig. 5a–c and Supplementary Fig. 5a). Consistent with these data, SASP-related gene expression was attenuated by RNaseH2A overexpression in HRas^{V12}- and serial passage-induced senescent TIG-3 cells (Fig. 5d and Supplementary Fig. 5b). Collectively, RNaseH2A suppresses SASP factor gene expression.

RNaseH2A is dysfunctional in cells derived from patients with Werner syndrome (WS). To determine whether RNaseH2A is downregulated during ageing in vivo, we conducted a database analysis of RNA sequences derived from the skin fibroblasts of healthy donors of various ages⁴² and found that RNaseH2A expression tends to decrease with age (Supplementary Fig. 6a). In addition, RNaseH2A was present at high levels in hepatic and

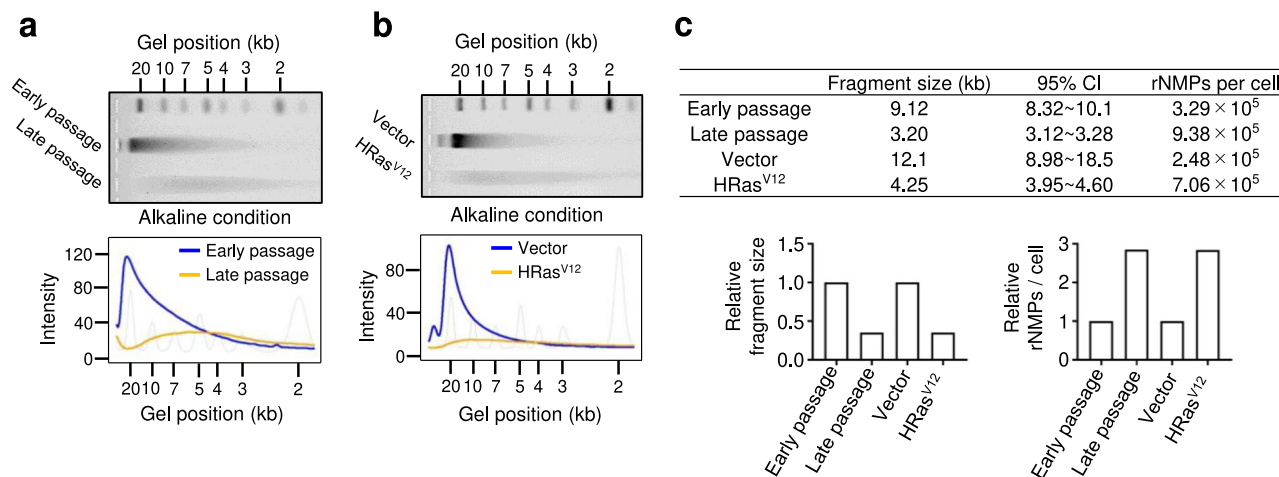


Fig. 3 Residual ribonucleoside monophosphate levels in genomic DNA are increased in senescent cells. **a** Top: Genomic DNA was extracted from pre-senescent (early-passage) or senescent (late-passage) TIG-3 cells and then subjected to alkaline gel electrophoresis following alkaline hydrolysis. The representative gel is shown from three biological replicates. Bottom: The density curves of the gel image are shown. **b** Top: Genomic DNA was extracted from pre-senescent (vector) or ectopic expression of oncogenic *ras* (HRas^{V12}) TIG-3 cells and then subjected to alkaline gel electrophoresis following alkaline hydrolysis. The representative gel is shown from three biological replicates. Bottom: The density curves of the gel image are shown. **c** The fragment sizes and numbers of ribonucleoside monophosphates (rNMPs) for each condition were estimated by the mathematical model with respect to representative data.

pancreatic cells collected from young mice; however, RNaseH2A expression was significantly decreased in p21^{WAF1/CIP1}-expressing cells, considered as senescent cells^{12,16,43–45}, in aged mouse tissues (Supplementary Fig. 6b–d). These results suggest that RNaseH2A expression is downregulated during the ageing process in vivo.

Mutations in *RNASEH2A* occur in AGS^{19,25,41}, therefore, we speculated that the ablation of RNaseH2A expression may be associated with pathological phenotypes via SASP factor secretion in some age-related diseases. Because *RNASEH2A* expression decreases with age, we examined RNaseH2A expression in patients with progeria. WS is caused by a homozygous mutation in the RecQ-type DNA helicase (WRN helicase) on the short arm of chromosome 8, resulting in multiple aging phenotypes after the age of 40 years⁴⁶. When we conducted GSEA using RNA sequence data from cells derived from patients with WS, the expression of a set of nuclease activity genes tended to be lower than that in normal fibroblasts (TIG-3 or NF; Supplementary Fig. 7a, b and Supplementary Data 3), as similarly observed in senescent cells^{47,48} (Fig. 1a). Next, we examined the expression of RNaseH2A, observing clear downregulation in fibroblasts derived from patients with WS (WF1A, WF5 and WF8L) compared to its expression in cells from healthy volunteers of the same generation (NF1 and NF8-2) or established human fibroblast lines (TIG-3, IMR-90, BJ and Hs68; Fig. 6a, b and Supplementary Fig. 7c). Consistently, RNase H2-specific enzyme activity was also reduced in cells derived from patients with WS (Fig. 6c and Supplementary Fig. 7d). Agarose gel electrophoresis under alkaline conditions revealed that ribonucleotides were frequently incorporated into the genomes of cells derived from patients with WS and in senescent cells (Fig. 6d, e and Supplementary Fig. 7e). As expected, genomic DNA fragments accumulated in the cytoplasm of cells derived from these patients (Fig. 6f and Supplementary Fig. 7f). Moreover, SASP factor gene expression was upregulated in cells derived from patients with WS (Fig. 6g and Supplementary Fig. 7g). Furthermore, knockdown of DP1 in WF1A also resulted in decreased RNaseH2A expression, indicating that RNaseH2A expression is regulated by E2F transcription factors in fibroblasts derived from patients with WS (Supplementary Fig. 7h, i). These results suggest that RNaseH2A downregulation

is associated with age-related pathologies in patients with progeria.

RNaseH2A depletion induces SASP-like gene expression in cancer cells.

Although a previous report suggested that intestinal epithelial *Rnaseh2b* deficiency in mice leads to severe DNA damage and that concomitant deletion of *Trp53* provokes spontaneous carcinogenesis²⁸, the underlying mechanism was not investigated in detail. We then hypothesised that RNaseH2A downregulation also induces inflammatory gene expression, which leads to the metastatic transformation of cancer. To test this hypothesis, we evaluated the effect of RNaseH2A ablation on SASP-like inflammatory gene expression using a degranulation-mediated protein degradation system in the HCT116 colorectal cancer cell line⁴⁹ (Fig. 7a). The degradation of RNaseH2A protein resulted in the accumulation of genomic DNA fragments in the cytoplasm (Fig. 7b, c). Coherently, the induction of some tumourigenic genes was observed in HCT116 cells (Fig. 7d). The SASP factor matrix metalloproteinase-2 can promote cell migration and invasion, contributing to cancer metastasis. Indeed, the downregulation of RNaseH2A significantly enhanced the invasiveness of HCT116 (Fig. 7e). Consistently, RNaseH2A knockdown also tended to increase SASP factor gene expression and invasion capacity in SK-OV-3 ovarian cancer cells (Supplementary Fig. 8a, b). These data suggest that RNaseH2A downregulation leads to malignant conversion in cancer cells. To further test this idea, we performed experiments using colonic organoids from colorectal cancer multistage carcinogenic model mice (Fig. 7f)⁵⁰. Consistent with a gradual decline in RNaseH2A expression, cytoplasmic DNA accumulation and tumourigenic gene expression were observed in accordance with the degree of malignancy (Fig. 7g–i).

Finally, we found a strong correlation between RNaseH2A and E2F1 expression and an inverse correlation between RNaseH2A expression and poor prognosis in patients with colon, cervical, or ovarian cancer by an analysis of TCGA database⁵¹ (Fig. 8a, b). Together, these data suggest that RNaseH2A downregulation results in the production of cytoplasmic nucleotide ligands, inducing

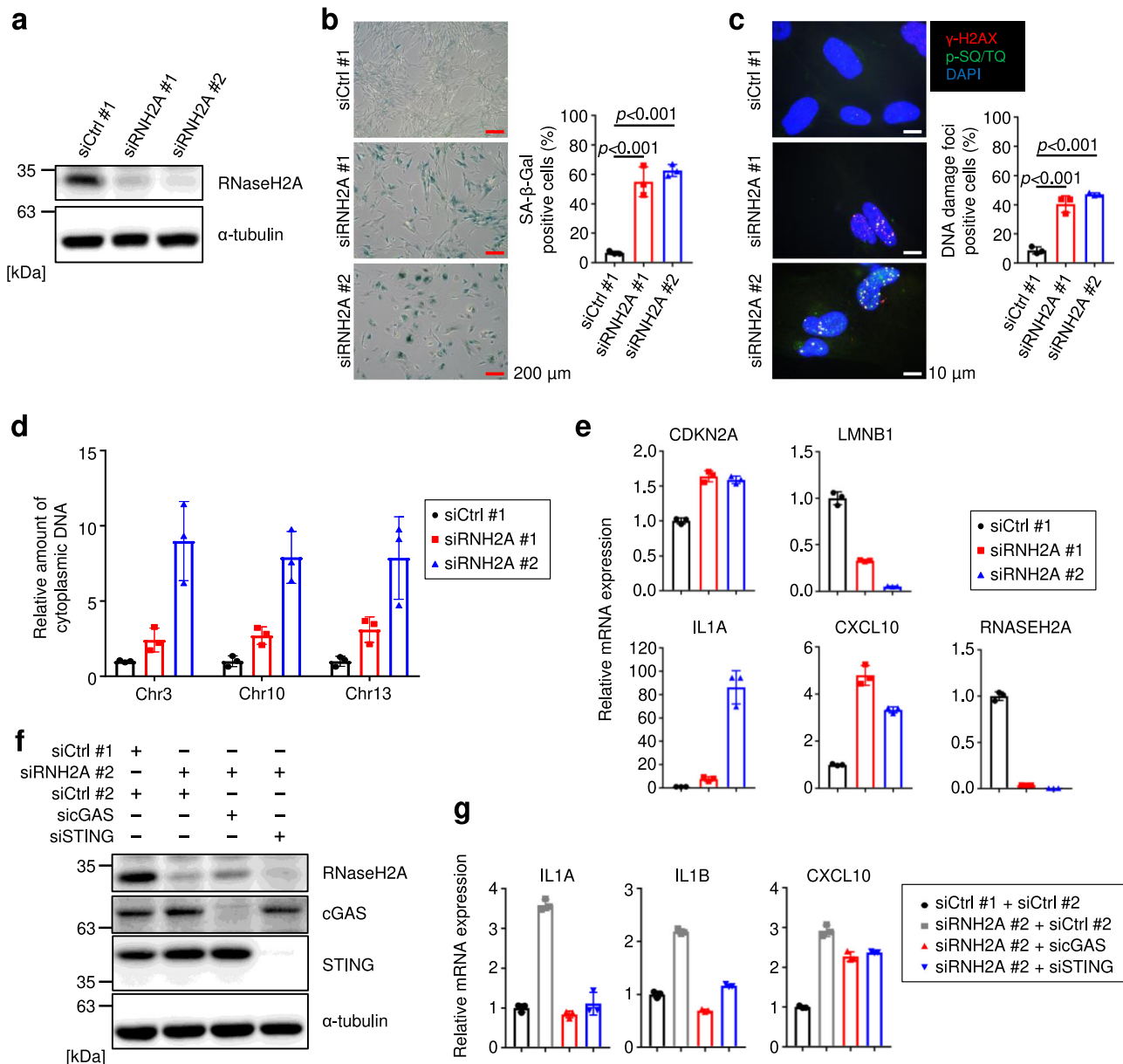


Fig. 4 RNaseH2A depletion induces cellular senescence in human fibroblast. **a** Western blot of pre-senescent TIG-3 cells treated with siRNAs (siRNH2A#1 and #2) for 72 h four times. Alpha-tubulin was used as a loading control. **b** Left: Representative images SA- β -Gal staining of TIG-3 cells as in **a**. Scale bars indicate 200 μ m. Right: Quantification of SA- β -Gal positive cells. The graphs indicate the percentage of SA- β -Gal positive cells. Error bars indicate the mean \pm SD of biological triplicates. One-way ANOVA coupled with Dunnett's multiple comparisons test. **c** Left: Representative immunofluorescence images of DNA damage marker of TIG-3 cells as in **a**. γ -H2AX (red), phospho-Ser/Thr ATM/ATR (p-SQ/TQ) substrate (green) and DAPI (blue). Scale bars indicate 10 μ m. Right: Quantification of DNA damage-positive cells. The graphs indicate the percentage of nuclei containing more than two foci positive for both γ -H2AX and p-SQ/TQ. Error bars indicate the mean \pm SD of biological triplicates. One-way ANOVA coupled with Dunnett's multiple comparisons test. **d** Quantitative PCR analysis of chromosomal DNA in the cytoplasm of TIG-3 cells as in **a** using primers against chromosomes 3, 10 and 13. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **e** RT-qPCR analysis of the indicated genes using RNA extracted from TIG-3 cells as in **a**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **f** Western blot of TIG-3 cells depleted of RNaseH2A, cGAS or STING by siRNA. Alpha-tubulin was used as a loading control. **g** RT-qPCR analysis of indicated genes using RNA extracted from TIG-3 cells as in **f**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. All data were representative of at least three biological replicates.

tumorigenic gene expression in cancer cells, which is likely linked to a poor prognosis.

Discussion

Paradoxically, cellular senescence features both physiological and pathological aspects^{2-4,10}. Although senescent cell cycle arrest can prevent tumour development, senescent cells also promote

transformation, cancer invasion, and metastasis through the secretion of SASP factors^{2-4,6}. SASP components have been reported to have both beneficial and harmful effects on human health, and these effects are regulated by multiple steps^{2,4,6,52,53}. Remarkably, it was recently reported that SASP factor gene expression can be induced via the cGAS-STING pathway¹³⁻¹⁷. In this study, we identified the novel mechanism that RNaseH2A is transcriptionally regulated by E2Fs, thereby permitting rNMPs to

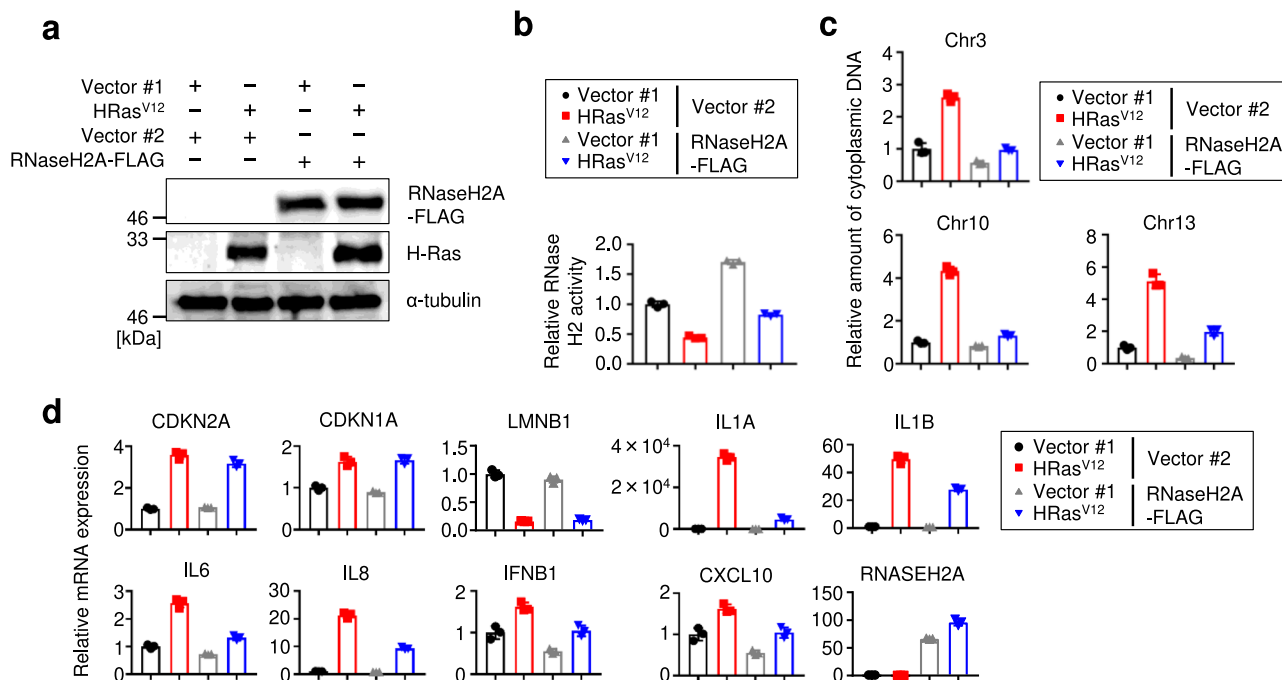


Fig. 5 RNaseH2A suppresses the expression of SASP factor genes. **a** Western blot of TIG-3 cells infected with retrovirus encoding flag-tagged RNaseH2A (lanes 3 and 4) or empty vector (lanes 1 and 2). After puromycin selection, cells were infected with retrovirus encoding HRas^{V12} and subjected to western blot analysis using the antibodies shown at right. Alpha-tubulin was used as a loading control. **b** In vitro RNase H2-specific activity assay of TIG-3 cells as in **a**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **c** Quantitative PCR analysis of chromosomal DNA in the cytoplasm from TIG-3 cells as in **a** using primers against chromosomes 3, 10 and 13. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **d** RT-qPCR analysis of the indicated genes was conducted using RNA extracted from TIG-3 cells as in **a**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. All data were representative of at least three biological replicates.

promote genomic fragility via the downregulation of RNaseH2A during cellular senescence, leading to increased levels of genomic DNA fragments in the cytoplasm and the induction of SASP factors in senescent, progeroid and cancer cells (Fig. 8c).

The pathological features observed in individuals with WS, including ocular cataracts, dyslipidemia, diabetes mellitus, osteoporosis, atherosclerosis, premature hair greying with alopecia, and refractory skin ulcers might result from the pro-inflammatory function of SASP. In this study, we observed that RNaseH2A expression was also decreased in fibroblasts from patients with WS. Most importantly, patients with WS experience concomitant oncogenic complications⁴⁶. It is possible that SASP-like gene expression contributes to the pathogenesis and oncogenesis of WS. We also observed that a decline in RNaseH2A expression is associated with the accumulation of genomic DNA fragments in the cytoplasm and oncogenic SASP-like gene expression in cancer cells and organoids. Furthermore, we found a strong correlation between E2F1 and RNaseH2A expression and an inverse correlation between RNaseH2A expression and poor prognosis in patients with colorectal, cervical, or ovarian cancer via TCGA database analysis⁵¹. In addition to a previous report regarding colorectal cancers²⁸, we also found the possibility that RNaseH2A ablation is associated with malignant phenotypes in other cancer types. Thus, further analysis is important to determine the relationship between the biological function of RNaseH2A and malignant alterations in various cancer types.

The accumulation of rNMPs in genomic DNA is associated with DNA damage and genomic instability; thus, *Rnaseh2*-knockout mice are non-viable from the embryonic stage^{24,39}. Some progeria syndromes and age-related diseases may be suppressed by the regulation of nucleotide ligand production. In recent years, several cGAS and STING inhibitors have been

reported to suppress the innate immune response^{54,55}. Consistent with these reports, we suggest that the nucleotide ligands for DNA sensors represent ideal targets for SASP regulation. Our study demonstrated that RNaseH2A is a key factor for the induction of SASP via nucleotide ligand accumulation during cellular senescence. Therefore, we anticipate that further analysis will reveal more details of this mechanism and lead to the discovery of novel strategies for SASP regulation.

Methods

Cell culture. TIG-3, IMR-90, Hs68 and HEK293T cells were obtained from the JCRB. BJ and SK-OV-3 cells were obtained from ATCC. These cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). HCT116 cells expressing OsTIR1 and AID-RNaseH2A were cultured in McCoy's 5 A medium (Thermo Fisher Scientific, 16600082) supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. To induce the degradation of AID-fused RNaseH2A protein, 500 μ M indole-3-acetic acid (SIGMA, I2886), which is a natural auxin, and 2 μ g ml⁻¹ doxycycline (Clontech, 631311) were added to the culture medium.

Senescence or quiescence induction. Early-passage TIG-3 or IMR-90 cells (fewer than 40 population doublings) were used as growing cells. Late-passage TIG-3 (more than 70 population doublings) or IMR-90 cells (more than 60 population doublings) that ceased proliferation were used as replicative senescent cells. For retroviral infection, TIG-3 cells were rendered sensitive to infection by ecotropic retroviruses. The cells were then infected with recombinant retroviruses encoding Ras^{V12} (in pBabe-puro⁵⁶) or RNaseH2A (in pMarX-puro⁵⁷) cDNA. After the selection of infected cells with puromycin, pools of drug-resistant cells were analysed 7 days after infection. For X-ray-induced senescence, IMR-90 cells were exposed to 15 Gy irradiation using a CP-160 X-ray machine (Faxitron X-ray Corporation). After irradiation, IMR-90 cells were plated at a density of 2500 cells cm⁻² and analysed 10 days after irradiation. For quiescence induction, TIG-3 cells were cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS for 48 h. We confirmed the absence of mycoplasma contamination in the cultured cells.

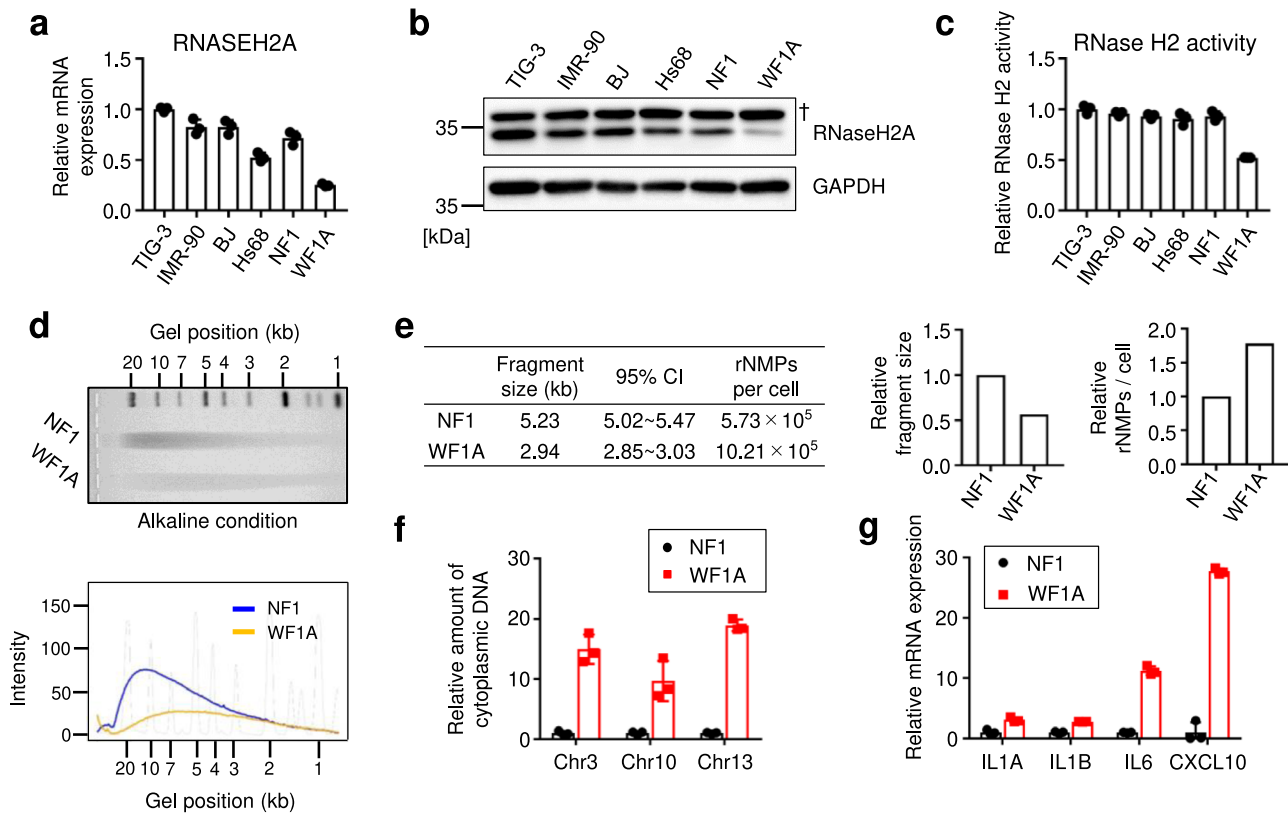


Fig. 6 RNaseH2A dysfunction also occurs in cells derived from patients with Werner syndrome. **a** RT-qPCR analysis of RNASEH2A mRNA expression in TIG-3, IMR-90, BJ, Hs68, NF1 and WF1A cells (35–40 population doublings). NF1: healthy human fibroblasts, WF1A: fibroblasts derived from patients with Werner Syndrome (WS). Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **b** Western blot of six human fibroblasts as in **a** using antibodies shown at right. Alpha-tubulin was used as a loading control. †: Nonspecific signal. **c** In vitro RNase H2-specific activity assay of six human fibroblasts as in **a**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **d** Top: Genomic DNA was extracted from NF1 or WF1A cells and then subjected to alkaline gel electrophoresis following alkaline hydrolysis. The representative gel is shown from three biological replicates. Bottom: The density curves of the gel image are shown. **e** The estimated fragment sizes and numbers of rNMPs in the NF1 and WF1A cells. **f** Quantitative PCR analysis of chromosomal DNA in the cytoplasm from the NF1 and WF1A cells using primers against chromosomes 3, 10 and 13. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **g** RT-qPCR analysis of the indicated genes was conducted using RNA extracted from the NF1 and WF1A cells. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. All data are representative of at least three biological replicates.

Plasmids. The epitope-tagged cDNAs of RNaseH2A were cloned into the pMarX-puro retroviral vector. To amplify flag-tagged RNaseH2A cDNA, the following primers were used: 5'-ACCGGATCCACCGCCATGGATCTCAGCGAGCTGGA-3' (forward) and 5'-ACCGAATTCGAGGCTGGTTGCTGACTCC-3' (reverse). All cDNAs were sequenced using Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) and a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Isolation of cytoplasmic DNA fractions. Cytoplasmic DNA was prepared by modifying a previously described method^{16,58}. Briefly, cells were centrifuged for 1 min in a microcentrifuge, resuspended in 0.3 M sucrose buffer and homogenised by pipetting. The homogenate was overlaid with the same amount of 1.5 M sucrose buffer and centrifuged at 18,506 \times g for 10 min. Cytoplasmic DNA was purified by treatment with 0.4 mg ml⁻¹ proteinase K (Wako, 160-22752), phenol–chloroform extraction, and ethanol precipitation with a carrier (Dr. GenTLE® Precipitation Carrier, TaKaRa Bio Inc., 9094). The amount of nuclear DNA was measured via real-time PCR using three different sets of primers designed for different chromosomes (human chromosomes 3, 10 and 13). The fragment length of cytoplasmic DNA was defined using an NGS 3 K Reagent Kit and a LabChip GX Touch nucleic acid analyser (PerkinElmer).

Immunofluorescence microscopy. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS (Wako, 163-20145) and permeated with 0.5% Triton X-100/Tris-buffered saline for 1 min. The cells were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, A3059) and 10% goat serum (Sigma-Aldrich, G9023)/ Tris-buffered saline for 1 h at 4 °C. The samples were then incubated with primary antibodies targeting γ -H2AX (1:1000, Millipore, 05-636) and phospho-(Ser/Thr) ATM/ATR substrate (1:500, Cell Signaling Technology, 2851). After incubation with secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific), the nucleus was stained with DAPI (Dojindo, 342-07431). After immunostaining, DNA damage-positive cells were quantified using a fluorescence microscope (Carl Zeiss).

Super-resolution microscopic analysis. The cells were fixed with 10% formalin (Wako) and 0.1% glutaraldehyde (SIGMA, G5882)/cytoskeleton stabilisation buffer (CSB) and permeated through the membrane with 0.5% Triton X-100/CSB for 1 min. CSB contained 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 2 mM EGTA and 5 mM PIPES (pH 6.1). The cells were blocked with 3% BSA/CSB for 1 h at 4 °C. NaBH₄ was used to reduce the fluorescent background caused by glutaraldehyde. Then, samples were reacted with primary antibodies targeting the dsDNA marker (1:500, HYB331-01, sc-58749) and lamin B1 (1:100, Abcam, ab16048). After incubation with antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 555, the nucleus was stained using DAPI. After immunostaining, fluorescence images were observed and photographed using a TCS SP8 STED 3X super-resolution microscope (Leica Microsystems). dsDNA signals outside and associated with lamin B1 signals were regarded as fragmented dsDNA signals.

RNase H2 activity assays. RNase H2-specific activity assays were performed using a FRET-based fluorescent substrate release assay³⁹. We annealed 10 μ M 3'-FAM labelled oligonucleotides (GATCTGAGCCTGGGgGCT for RNase H2-specific activity; uppercase DNA, lowercase RNA) to a complementary 5'-DAB-CYL-labelled DNA oligonucleotide (NIPPON GENE CO., LTD.) in 60 mM KCl and 50 mM Tris-HCl (pH 8) by heating for 5 min at 95 °C followed by slow cooling to room temperature. Reactions were performed in 100 μ l of buffer (60 mM KCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM MgCl₂, 0.01% BSA, 0.01% Triton X-100) containing 0.25 μ M oligonucleotide duplex in 96-well flat-bottomed plates at 37 °C for 3 h. In total 5 μ g of each whole-cell lysate were used for each reaction. Fluorescence was read for 100 ms using a VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (PerkinElmer), with 480-nm excitation and 535-nm emission filters.

Western blot analysis. For western blotting, cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 10%

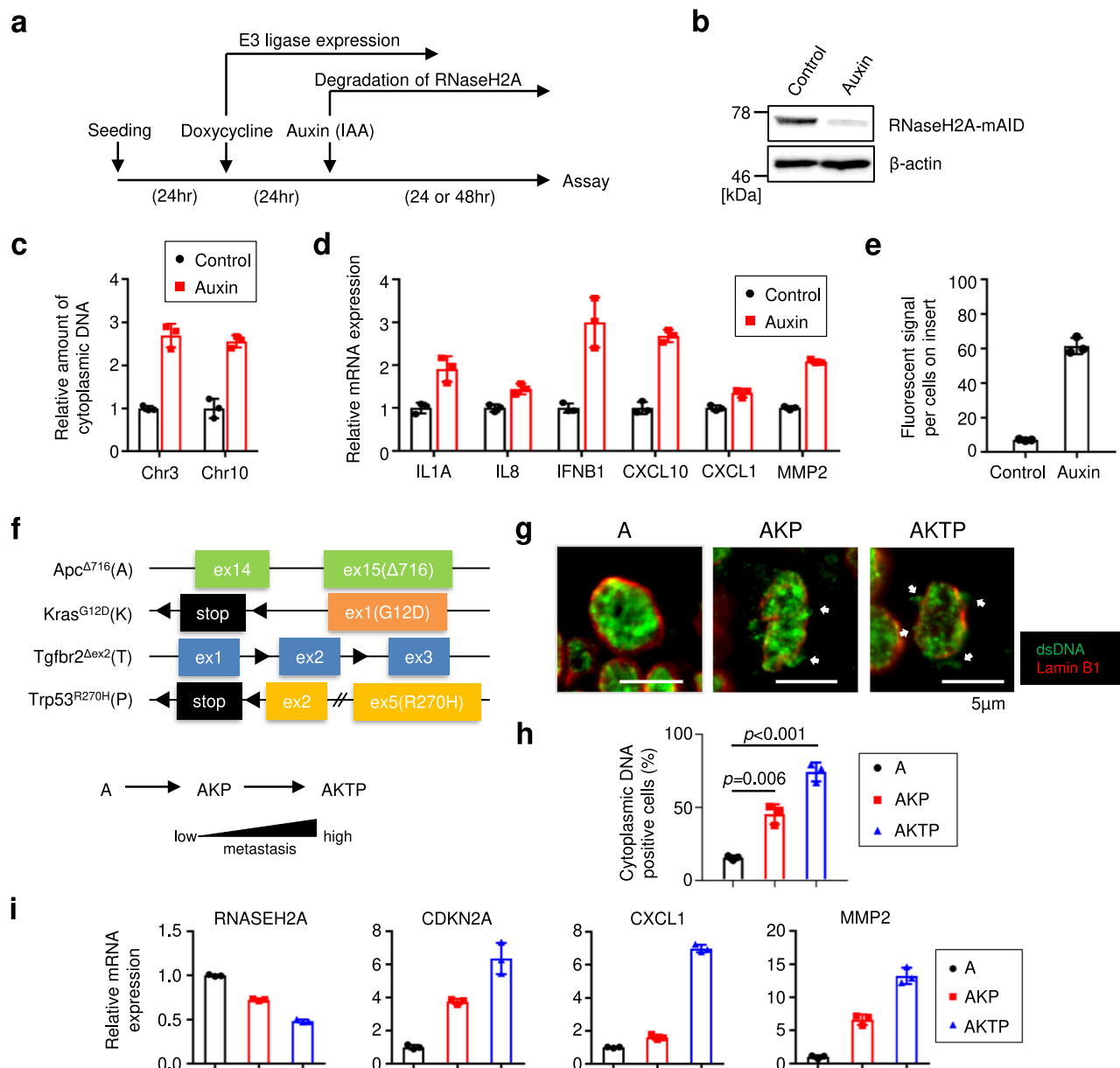


Fig. 7 RNaseH2A depletion leads to malignant transformation in cancer cells. **a** Scheme of experiments with HCT116 cells stably expressing TIR1 and RNaseH2A-mAID. Cells were treated with 500 μ M auxin to degrade RNaseH2A-mAID for 24 h (**b**, **c**, **e**) or 48 h (**d**). **b** Western blot of HCT116 cells as in **a** using antibodies shown at right. Beta-actin was used as a loading control. **c** Quantitative PCR analysis of chromosomal DNA in the cytoplasm from HCT116 cells as in **a** using primers against chromosomes 3 and 10. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **d** RT-qPCR analysis of the indicated genes was conducted using RNA extracted from HCT116 cells as in **a**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **e** Cell invasion assay using HCT116 cells as in **a**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. **f** Top: Schematic representation of mutant alleles of each driver gene. Bottom: Schematic representation model of the evolutionary changes in the gene expression pattern in association with malignant progression phenotypes. **g** Colon cancer organoids were subjected to immunofluorescence for indicated antibodies. Scale bars indicate 5 μ m. White arrows show dsDNA fragments in the cytoplasm. **h** The percentage of cytoplasmic DNA-positive cells in **g**. Error bars indicate the mean \pm SD of biological triplicates. One-way ANOVA coupled with Dunnett's multiple comparisons test. **i** RT-qPCR analysis of the indicated genes was performed using RNA extracted from colon cancer organoids as in **g**. Error bars indicate the mean \pm SD of technical triplicates. All data were representative of at least three biological replicates.

glycerol, 0.1% Tween 20 and 10 mM β -glycerophosphate) containing 1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, 25955-11). The protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad), and the proteins were separated via SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes (EMD Millipore). After blocking with 5% milk, membranes were probed with primary antibodies targeting HRas (Santa Cruz, sc-29), p16 (IBL, 11104), STING (Cell Signaling Technology, 13647), cGAS (Cell Signaling Technology, 15102), Lamin B1 (Abcam, ab16048), DP1 (Abcam, ab11834), α -tubulin (Sigma-Aldrich, T9026), RNaseH2A (PROTEINTECH, 16132-1-AP), E2F3 (Santa Cruz, sc-878), mini-AID-tag (MBL, M214-3), β -actin (Santa Cruz, sc-47778) and GAPDH (PROTEINTECH, 60004-1-Ig). The membranes were incubated with a mouse (GE Healthcare, NA931-1ML) or

rabbit secondary antibodies (GE Healthcare, NA934-1ML), visualised using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, 34096) and detected using FUSION SOLO S (Vilber Lourmat).

Alkaline agarose gel electrophoresis. Genomic DNA was purified from cultured cells by treatment with 0.4 mg ml⁻¹ proteinase K, phenol-chloroform extraction, and ethanol precipitation. For alkaline hydrolysis, 1 μ g of genomic DNA was incubated with 0.3 M NaOH at 55 $^{\circ}$ C for 2 h. After alkaline treatment, 6 \times loading buffer (300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% [w/v] Ficoll PM400, 0.15% bromocresol green and 0.25% xylene cyanol FF) was added to the treated DNA samples. Electrophoresis of alkaline-treated samples was performed using a gel containing

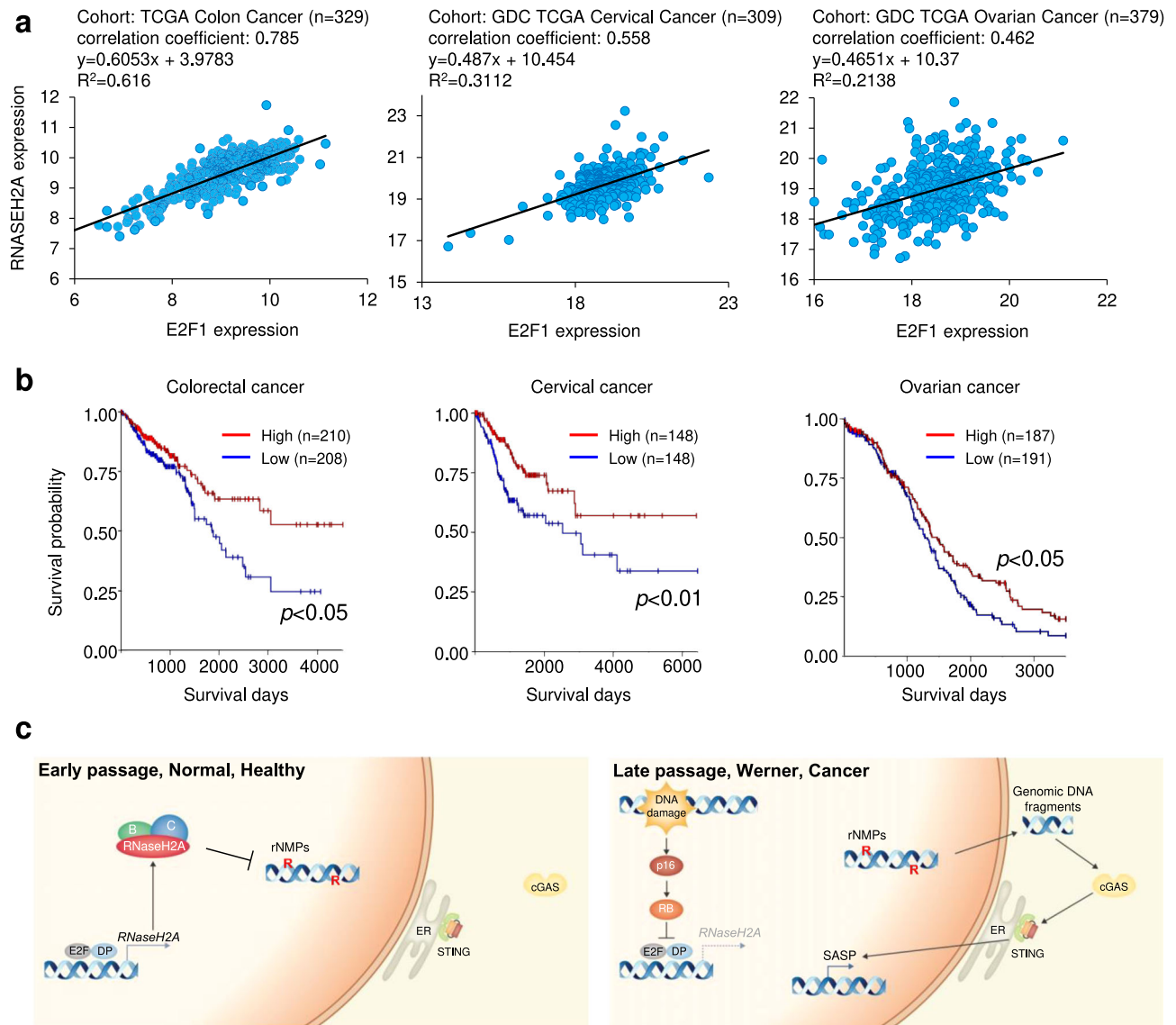


Fig. 8 Low RNaseH2A expression is associated with poor prognoses in cancer. **a** Plots of RNaseH2A and E2F1 mRNA expression levels in tissues derived from patients with colon ($n = 329$), cervical ($n = 309$) and ovarian ($n = 379$) cancers from TCGA database. The correlation between E2F1 expression and RNaseH2A expression was evaluated by Pearson's correlation coefficient. **b** Comparison of overall survival time between patients with low expression of RNaseH2A (blue) and those with high expression (red) in colorectal ($n = 418$), cervical ($n = 296$) and ovarian ($n = 378$) cancers from TCGA database. Log-rank test. **c** Outline the diagram of this paper.

50 mM NaOH, 1 mM EDTA and 0.8% w/v alkaline agarose and loading buffer containing 50 mM NaOH and 1 mM EDTA running buffer at 1 V cm^{-1} for 18 h. After electrophoresis, the gel was neutralised in 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 1.5 M NaCl, stained with FluoroStain™ DNA Fluorescent Staining Dye (SMOBIO TECHNOLOGY, INC. DS1000), and visualised using FUSION SOLO S.

Prediction of ribonucleotide incorporation rates. Ribonucleotide incorporation rates were estimated using the same similar method as that described by ref. 24. First, the densitometric images of the electrophoresis lanes corresponding to alkali-treated genomic DNA were taken. These images were pre-processed with GelJ 2.0 (Jónathan Heras, César Domínguez, Eloy Mata, César Larrea and Vico Pascual). The relevant lanes were cropped, the background was removed, and the densitometric curves were obtained. The densitometric curves were then analysed using R (R Development Core Team [2008]. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). The curves were smoothed by convoluting with a Gaussian filter (window size 3%) of the lane length. The conversion from the electrophoretic distance (d) to the fragment size (sz) was performed using the equation $d = a + b \log(sz)$, where coefficients a and b were estimated by fitting to the size reference (marker) lane. The histogram of the densitometric intensity was obtained at intervals of width $\Delta sz = 0.5 \text{ mm}$. The number of fragments at each interval was assumed to be proportional to the

densitometric intensity divided by sz . Moreover, we assumed that the probability of break at a point was uniform along the genome so that the distribution of the fragment length could be approximated by the exponential distribution. We estimated the mean (m) of the distribution and by the property of exponential distribution, the number of incorporations (breakage) per genome was obtained as m_0/m , where m_0 denotes the original size of the genome.

ChIP-qPCR analysis. ChIP analysis was conducted using Dynabeads® Protein G (Thermo Fisher Scientific, 10004D) according to the manufacturer's protocols. Briefly, chromatin was extracted from TIG-3 cells, cross-linked with formaldehyde (1% final concentration), and sonicated (Bioruptor, Cosmo Bio Co. Ltd.: 10 cycles of 30 s on/30 s off, on the highest setting) to generate DNA fragments⁵². The immunoprecipitation of cross-linked chromatin was conducted using anti-human E2F1 (Santa Cruz, sc-193X), anti-human E2F3 (Santa Cruz, sc-878X), or rabbit IgG (Cell Signalling Technology, 2729) as a negative control. After immunoprecipitation, the DNA was extracted using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, 28104), and an aliquot was amplified via real-time PCR using primers flanking the putative human E2F-binding site position at -278 to -208 bp of the human *RNaseH2A* promoter (5'-CTAGTCCCGTTAGGCTGG-3' and 5'-CGGTGGGAAGAGGGGAAAT-3') or primers flanking the putative human E2F-binding site position at -89 to $+7$ of the human *RNaseH2A* promoter (5'-GGCGTCGGTGCCTAA-3' and 5'-GCCTGCTCCGGCCAAT-3').

RNA-seq analysis. Total RNA from cultured cells was isolated using a mirVana Kit (Thermo Fisher Scientific, AM1560). DNA contamination was eliminated with DNase (TURBO DNA-free™ Kit, Invitrogen, AM1907) treatment. Library preparation was performed using a TruSeq mRNA Sample Prep. Kit (Illumina) (early passage, late-passage, TIG-3) or TruSeq Standard mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) (Vector, HRasV12, TIG-3). Sequencing was performed using the Illumina HiSeq2500 platform (early passage, late-passage, TIG-3) or the Illumina NovaSeq6000 platform (Vector, HRasV12, TIG-3). The quality of raw reads was evaluated using FASTQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). To reduce bias in the analysis, artifacts such as low-quality reads, adaptor sequence, contaminating DNA and PCR duplicates were removed using Trimmomatic 0.32 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>). Trimmed reads were mapped to the reference genome hg19 using TopHat v2.1.1 (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) splice-aware aligner. The transcript was assembled using Cufflinks v2.2.1 (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) with aligned reads that contain paired-end information. The expression profiles of assembled transcripts for each sample were calculated using Cufflinks and represented as normalised values, which were based on transcript length and coverage depth. The fragments per kilobase of transcript per million mapped reads served as the expression profile.

GSEA. GSEA was conducted using the GSEA v4.1.0 programme (Broad Institute) with the RNA-seq or microarray data³⁰ gene set for nuclease activity. We used our RNA-seq data, proliferating, senescent IMR-90 cell microarray data (GSE36640)³¹ and WS patient-derived fibroblast microarray data (GSE62114, GSE48761)^{47,48}.

Luciferase-reporter assays. The human RNaseH2A gene promoter sequence (NCBI Reference Sequence: NG_012662.1) was amplified by PCR using genomic DNA extracted from HDFs. The sequences of the PCR primer sets used to clone the RNaseH2A promoter were as follows: RNaseH2A-promoter-F, 5'-accgtaccTGGGGA-CATTCAATCTAAGTTGGGAGCCGCTCGAGATTACGATTCATTATGTGTGTG-3' (containing a KpnI site [underlined]); and RNaseH2A-promoter-R, 5'-accacgctGTTCCCGCATCTCCGTAC-3' (containing a MluI site [underlined]). Deletion mutants were prepared using standard PCR procedures. The sequences of the primer sets used to prepare deletion mutants of the RNaseH2A promoter were as follows: RNaseH2A-promoter-Cut1-F, (395 bp), 5'-accgtaccTGGGGA-CATTCAATCTAAGTTGGGAGCCGCTCGAGATTACGATTCATTATGTGTGTG-3' (containing a KpnI site [underlined]); RNaseH2A-promoter-Cut1-R, 5'-accacgctGCTTCGAAGACCCAGCCTAACG-3' (containing a MluI site [underlined]); RNaseH2A-promoter-Cut2-F, (181 bp) 5'-accgtaccCGTTAGGCTGGGTCTTC-GAAGC-3' (containing a KpnI site [underlined]); RNaseH2A-promoter-Cut2-R, 5'-accacgctCTCCTGGGAATTGTAGTCCCGA-3' (containing a MluI site [underlined]); RNaseH2A-promoter-Cut3-F (110 + 94, 181 bp), 5'-accgtaccTCGGGACTA-CAATCCCAGGAG-3' (introducing a KpnI site [underlined]); and RNaseH2A-promoter-Cut3-R, 5'-accacgctGTTCCCGCATCTCCGTAC-3' (containing a MluI site [underlined]). Promoter sequences containing point mutations were generated using a QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). The sequences of the PCR primer sets used to generate point mutations for the RNaseH2A promoter were as follows: RNaseH2A-promoter-mutation1-F, 5'-cagttccctctatttCAA-cAtctcccaccggccagc-3' (containing a mutation site [underlined]); RNaseH2A-promoter-mutation1-R, 5'-cgtgcccgtgggaagaTgTTgaataagaggaaactg-3' (containing a mutation site [underlined]); RNaseH2A-promoter-mutation2,3-F, 5'-gtgtctgccAgAA-gattgAcAAgaagcagccg-3' (containing a mutation site [underlined]); and RNaseH2A-promoter-mutation2,3-R, 5'-cggcgctcttTgTcaatCTTgTggcagaacac-3' (containing a mutation site [underlined]). The promoter fragments were inserted into the pGL3 basic firefly luciferase-reporter plasmid (Promega). All inserted DNAs were sequenced and verified. Reporter plasmids were transfected into HEK293T cells using X-treamGENE9 DNA transfection reagent (Roche, 6365809001) according to the manufacturer's protocols. The luciferase assays were performed using a Luciferase Assay System Kit (Promega, E1910). Cytomegalovirus promoter Renilla luciferase plasmid was used as an internal control.

RNA interference. RNA interference was performed by transfecting siRNA oligos using Lipofectamine™ RNAiMAX transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, 13778075), according to the manufacturer's protocols. The sequences of the siRNA oligos used in Fig. 2 and Supplementary Fig. S8 were as follows: siCtrl⁵⁹, CGCGCUUUGUAGGAUUCG; siDP1 #1, ACGCCUCAGAGACCGGCAG; and siDP1 #2, AUGACGAGAAAACAUAAG. The following ON-TARGETplus siRNAs (Dharmacon) were used in Fig. 4 and Supplementary Figs. 4, 8: siCtrl #1, ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #3 (D001810-03); siRNH2A #1, ON-TARGETplus Human RNASEH2A siRNA (J-003535-09); siRNH2A #2, ON-TARGETplus Human RNASEH2A siRNA (J-003535-12); siCtrl #2, ON-TARGETplus Non-targeting Pool (D001810-10); sicGAS, ON-TARGETplus Human MB21D1 siRNA SMARTPool (L-015607-02); and siSTING, ON-TARGETplus Human TMEM173 siRNA SMARTPool (L-024333-00).

RT-qPCR. Total RNA was extracted from cultured cells using a mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) and then subjected to reverse transcription using a PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa Bio Inc., RR037A). RT-qPCR was

performed on a StepOnePlus PCR system (Applied Biosystems) using SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa Bio Inc., RR820A). The PCR primer sequences are listed in Supplementary Data 4.

Cell invasion assay. The cell invasion assay was performed using CytoSelect™ 24-Well Cell Invasion Assay, Basement Membrane (Cell Biolabs, CBA-111) according to the manufacturer's instructions. Briefly, HCT116 cells expressing OsTIR1 and AID-RNaseH2A were incubated with 500 μM auxin (indole-3-acetic acid) after 2 μg ml⁻¹ doxycycline treatment for 24 h. After auxin treatment for 24 h, the cells were seeded at a density of 5 × 10⁵ cells per polycarbonate membrane insert utilising 300 μl of medium containing 0.1% FBS. SK-OV-3 cells were treated with 5 nM siRNA three times for 72 h each and seeded on polycarbonate membrane inserts. Then, 500 μl of medium containing 10% FBS were added to the lower well of the plate, which was cultured for 24 h. Invasive cells passed through the basement membrane layer and clung to the bottom of the insert membrane. The cells were dissociated using Cell Detachment Buffer, lysed, and quantified using CyQuant GR fluorescent dye. Fluorescence was read for 100 ms using a VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader with 480 nm excitation and 535 nm emission filters.

SA-β-gal assay. Cells were fixed in fixation buffer (2% PFA and 0.2% glutaraldehyde in PBS) and stained with staining solution (5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl and 1 mg/ml X-Gal) in citrate/sodium phosphate buffer (pH 6) overnight at 37 °C. Cells were then washed twice with PBS, and the percentage of stained cells was determined.

Organoid experiments. *Apc*^{Δ716}, *Kras*^{LSL}·*G12D*, *Tgfb2*^{lox/lox}, *Trp53*^{LSL/R270H} and *villin-CreER* mice have been described previously⁵⁰. The organoid cultures were established from small intestinal tumours, as described previously⁶⁰. We were provided with the small intestinal tumour organoids from *Apc*^{Δ716}, *Kras*^{LSL}·*G12D*, *Tgfb2*^{lox/lox}, *Trp53*^{LSL/R270H} and *villin-CreER* mice by Dr. Nakayama and Dr. Ohsima of Kanazawa University.

For passage, the organoids were removed from Matrigel (BD Biosciences) using Cell Recovery Solution (Corning, #354253) and mechanically separated into a single coding domain. The crypts were mixed with 30 μl of Matrigel and seeded in 48-well plates. After Matrigel polymerisation, growth factors (50 ng ml⁻¹ EGF [Thermo Fisher Scientific, PMG8041]), GlutaMax supplement (Thermo Fisher Scientific, 35050061), HEPES (Thermo Fisher Scientific, 15630106), N-2 supplement (Thermo Fisher Scientific, 17502048), B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific, 17504044), N-acetyl-L-cysteine (SIGMA, A9165), and medium (Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 12634010)) were added. The entire medium was changed every week. Passages were performed every 1–2 weeks at a 1:5 split ratio.

Immunofluorescence analysis were performed as previously described in ref. ⁶¹ with minor modifications. Briefly, the organoids were fixed in 4% paraformaldehyde (Nacalai Tesque, 26126)/PBS at room temperature for 30 min, mechanically dissociated from Matrigel by pipetting, washed with PBS supplemented with 0.2% BSA and suspended in 2.0% agarose (SIGMA, A2676). Then the samples were centrifuged at 1000 rpm for 3 min at room temperature in 50-ml tubes, and the samples were cooled on ice, removed from the tubes, and embedded in paraffin. Samples were sectioned on a microtome (3-μm-thick), deparaffinized in xylene, rehydrated, and then analyzed via histological examination. For antibody staining, deparaffinized and rehydrated sections were subjected to heat-induced antigen retrieval for 20 min at 121 °C in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0) in an autoclave. After washing in PBS, the sections were incubated in a blocking buffer (10% goat serum/PBS) for 1 h at room temperature. Then, the sections were incubated with primary antibodies against lamin B1 and dsDNA marker in 1% BSA/PBS overnight at 4 °C. To detect primary antibodies, relevant Alexa Fluor 488 goat anti-mouse or Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen, 1:500) were used. Fluorescence images were observed and photographed using a BZ-X700 immunofluorescence microscope (Keyence).

Animal experiments. Liver and pancreas tissues from young (6 weeks old) and aged (108 weeks old) mice were prepared using C57/BL6J mice (CLEA Japan, Inc). The biopsy samples were subjected to fluorescent immunohistochemistry using antibodies against p21^{WAF1/CIP1} (BD Biosciences, 556430) and RNaseH2A (Origene, TA306706), as previously described⁶². All animal procedures were performed using protocols approved by the Japanese Foundation for Cancer Research (JFCR) Animal Care and Use Committee in accordance with the relevant guidelines and regulations (approval number: 1804-05). Signal quantification of images was performed using the ImageJ software (NIH, v1.53).

Clinical samples. The use of clinical samples was approved by the Institutional Review Board of Chiba University Graduate School of Medicine (approval number: 1145). The samples were obtained during surgical procedures. The patients provided written informed consent before the surgery. NF1, NF8-2, WF1A, WF5 and WFBL cells are human skin fibroblasts. NF1 cells were collected from a healthy 42-year-old Japanese man and NF8-2 cells were collected from a healthy 45-year-old

Japanese man. WF1A cells were collected from a 47-year-old Japanese man diagnosed with WS, WF5 cells were collected from a 43-year-old Japanese man diagnosed with WS and WF8L cells were collected from a 43-year-old Japanese man diagnosed with WS. WF1A, WF5 and WF8L cells carried a homozygous mutation in the WRN gene (Mut4 mutation: c.3139-1 G > C). These cells were collected from patients who provided informed consent for genetic and cell biological analyses. The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. All methods were performed in accordance with the protocols approved by the Institutional Review Board (approval number: 2019-1211) of JFCR.

Statistics and reproducibility. Statistical analysis was conducted using an unpaired two-tailed Student's *t*-test, one-way ANOVA coupled with Dunnett's multiple comparisons test, two-way ANOVA coupled with Tukey's multiple comparison test, or the log-rank test. Statistical analyses were carried out by PRISM software version 7.04. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. Error bars indicate means \pm SD. Results were repeated at least three times unless indicated otherwise.

Data availability

Nucleotide sequence data reported are available in the DDBJ Sequenced Read Archive under the accession numbers DRA009786. Source data are available in Supplementary Data 5. The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

Received: 5 November 2021; Accepted: 13 December 2022;
Published online: 28 December 2022

References

- Campisi, J. & d'Adda di Fagnana, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
- Munoz-Espin, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 (2014).
- Li, X. et al. Metformin synergizes with BCL-XL/BCL-2 inhibitor ABT-263 to induce apoptosis specifically in p53-defective cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 1806–1818 (2017).
- Gorgoulis, V. et al. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell* **179**, 813–827 (2019).
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.* **28**, 436–453 (2018).
- Faget, D. V., Ren, Q. & Stewart, S. A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 439–453 (2019).
- Lee, S. & Schmitt, C. A. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell Biol.* **21**, 94–101 (2019).
- Loo, T. M., Miyata, K., Tanaka, Y. & Takahashi, A. Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer. *Cancer Sci.* **111**, 304–311 (2020).
- Birch, J. & Gil, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev.* **34**, 1565–1576 (2020).
- Childs, B. G. et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Disco.* **16**, 718–735 (2017).
- Chiche, A., Chen, C. & Li, H. The crosstalk between cellular reprogramming and senescence in aging and regeneration. *Exp. Gerontol.* **138**, 111005 (2020).
- Wakita, M. et al. A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells. *Nat. Commun.* **11**, 1935 (2020).
- Dou, Z. et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* **550**, 402–406 (2017).
- Gluck, S. et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1061–1070 (2017).
- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q. & Chen, Z. J. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E4612–E4620 (2017).
- Takahashi, A. et al. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat. Commun.* **9**, 1249 (2018).
- De Cecco, M. et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* **566**, 73–78 (2019).
- Cerritelli, S. M. & Crouch, R. J. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.* **276**, 1494–1505 (2009).
- Crossley, M. P., Bocek, M. & Cimprich, K. A. R-loops as cellular regulators and genomic threats. *Mol. Cell* **73**, 398–411 (2019).
- Marnef, A. & Legube, G. R-loops as Janus-faced modulators of DNA repair. *Nat. Cell Biol.* **23**, 305–313 (2021).
- Cerritelli, S. M. & El Hage, A. RNases H1 and H2: guardians of the stability of the nuclear genome when supply of dNTPs is limiting for DNA synthesis. *Curr. Genet.* **66**, 1073–1084 (2020).
- Nick McElhinny, S. A. et al. Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 774–781 (2010).
- Mackenzie, K. J. et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* **548**, 461–465 (2017).
- Uehara, R. et al. Two RNase H2 mutants with differential rNMP processing activity reveal a threshold of ribonucleotide tolerance for embryonic development. *Cell Rep.* **25**, 1135–1145 e5 (2018).
- Crow, Y. J. et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutieres syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* **38**, 910–916 (2006).
- Pokatayev, V. et al. RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutieres syndrome-related mutant invokes cGAS-STING innate immune-sensing pathway in mice. *J. Exp. Med.* **213**, 329–336 (2016).
- Mackenzie, K. J. et al. Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *EMBO J.* **35**, 831–844 (2016).
- Aden, K. et al. Epithelial RNase H2 maintains genome integrity and prevents intestinal tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **156**, 145–159.e19 (2019).
- Zimmermann, M. et al. CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions. *Nature* **559**, 285–289 (2018).
- Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
- Shah, P. P. et al. Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev.* **27**, 1787–1799 (2013).
- Zhou, J. et al. NEIL3 repairs telomere damage during S phase to secure chromosome segregation at mitosis. *Cell Rep.* **20**, 2044–2056 (2017).
- Rolseth, V. et al. No cancer predisposition or increased spontaneous mutation frequencies in NEIL DNA glycosylase-deficient mice. *Sci. Rep.* **7**, 4384 (2017).
- Mao, Z. et al. Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 11800–11805 (2012).
- Maehara, K. et al. Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J. Cell Biol.* **168**, 553–560 (2005).
- Takahashi, A. et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1291–1297 (2006).
- Hateboer, G. et al. Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol. Cell Biol.* **18**, 6679–6697 (1998).
- Oki, S. et al. ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. *EMBO Rep.* **19**, e46255 (2018).
- Rejns, M. A. et al. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* **149**, 1008–1022 (2012).
- Williams, J. S., Lujan, S. A. & Kunkel, T. A. Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 350–363 (2016).
- Lim, Y. W., Sanz, L. A., Xu, X., Hartono, S. R. & Chedin, F. Genome-wide DNA hypomethylation and RNA:DNA hybrid accumulation in Aicardi-Goutieres syndrome. *Elife* **4**, e08007 (2015).
- Fleischer, J. G. et al. Predicting age from the transcriptome of human dermal fibroblasts. *Genome Biol.* **19**, 221 (2018).
- Krizhanovsky, V. et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
- Kang, T. W. et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551 (2011).
- Igarashi, N. et al. Hepatocyte growth factor derived from senescent cells attenuates cell competition-induced apical elimination of oncogenic cells. *Nat. Commun.* **13**, 4157 (2022).
- Lebel, M. & Monnat, R. J. Jr. Werner syndrome (WRN) gene variants and their association with altered function and age-associated diseases. *Ageing Res. Rev.* **41**, 82–97 (2018).
- Cheung, H. H. et al. Telomerase protects werner syndrome lineage-specific stem cells from premature aging. *Stem Cell Rep.* **2**, 534–546 (2014).
- Shimamoto, A. et al. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS ONE* **9**, e112900 (2014).
- Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y. & Kanemaki, M. T. Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors. *Cell Rep.* **15**, 210–218 (2016).
- Sakai, E. et al. Combined mutation of Apc, Kras, and Tgfr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer. *Cancer Res.* **78**, 1334–1346 (2018).
- Goldman, M. J. et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* **38**, 675–678 (2020).

52. Takahashi, A. et al. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol. Cell* **45**, 123–131 (2012).
53. Miyata, K. et al. Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **118**, e2025647118 (2021).
54. Motwani, M., Pesiridis, S. & Fitzgerald, K. A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 657–674 (2019).
55. Vanpouille-Box, C., Hoffmann, J. A. & Galluzzi, L. Pharmacological modulation of nucleic acid sensors - therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat. Rev. Drug Disco.* **18**, 845–867 (2019).
56. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
57. Hannon, G. J. et al. MaRX: an approach to genetics in mammalian cells. *Science* **283**, 1129–1130 (1999).
58. Kawashima, A. et al. Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in the thyroid. *Endocrinology* **152**, 1702–1712 (2011).
59. Hatchi, E. et al. BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Mol. Cell* **57**, 636–647 (2015).
60. Sato, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
61. Fujii, E. et al. A simple method for histopathological evaluation of organoids. *J. Toxicol. Pathol.* **31**, 81–85 (2018).
62. Yamakoshi, K. et al. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.* **186**, 393–407 (2009).

Acknowledgements

We thank the members of the Takahashi laboratory for their helpful support during the preparation of this manuscript. This work was supported in part by grants from the Japan Agency of Medical Research and Development (AMED) under grant number 19gm6110023h0001; the Japan Science and Technology Agency (JST)-PRESTO under grant number JPMJPR17H7; JST-Moonshot R&D under grant number JPMJPS2022; Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) under grant number (No. 17K19618, 19H03507, 17H06413, 17H06417, 18J10977, 21J01769, 22H02907 and 22K07198); the Naito Foundation, the Uehara Memorial Foundation and the Foundation for Promotion of Cancer Science.

Author contributions

S.S., R.O. and A.T. designed the experiments and wrote the manuscript. S.S., R.O., T.M.L., H.T., K.M., M.C., H.K., K.K., S.K., Y.M., M.N., K.N., S.N., and K.T. performed the experiments. K.K., S.K., K.Y., M.O., C.O., A.N., M.T.K., E.H. and A.T. analysed the data. A.T. oversaw the projects.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04369-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Akiko Takahashi.

Peer review information *Communications Biology* thanks Katherine Aird and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Primary Handling Editor: Christina Karlsson Rosenthal. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Original research

Targeted long-read sequencing identifies missing pathogenic variants in unsolved Werner syndrome cases

Danny E. Miller ,^{1,2} Lin Lee,³ Miranda Galey,² Renuka Kandhaya-Pillai,³ Marc Tischkowitz,⁴ Deepak Amalath,⁵ Avadh Vithlani,⁵ Koutaro Yokote,⁶ Hisaya Kato,⁶ Yoshiro Maezawa,⁶ Aki Takada-Watanabe,⁶ Minoru Takemoto,⁷ George M. Martin,³ Evan E. Eichler,^{2,8} Fuki M. Hisama,⁹ Junko Oshima^{3,6}

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2022-108485>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Danny E. Miller, Department of Pediatrics, Division of Genetic Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA; dm1@uw.edu and Dr Junko Oshima, Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, WA, USA; picard@uw.edu

Received 5 February 2022
Accepted 14 April 2022
Published Online First 9 May 2022

ABSTRACT

Background Werner syndrome (WS) is an autosomal recessive progeroid syndrome caused by variants in *WRN*. The International Registry of Werner Syndrome has identified biallelic pathogenic variants in 179/188 cases of classical WS. In the remaining nine cases, only one heterozygous pathogenic variant has been identified.

Methods Targeted long-read sequencing (T-LRS) on an Oxford Nanopore platform was used to search for a second pathogenic variant in *WRN*. Previously, T-LRS was successfully used to identify missing variants and analyse complex rearrangements.

Results We identified a second pathogenic variant in eight of nine unsolved WS cases. In five cases, T-LRS identified intronic splice variants that were confirmed by either RT-PCR or exon trapping to affect splicing; in one case, T-LRS identified a 339 kbp deletion, and in two cases, pathogenic missense variants. Phasing of long reads predicted all newly identified variants were on a different haplotype than the previously known variant. Finally, in one case, RT-PCR previously identified skipping of exon 20; however, T-LRS did not detect a pathogenic DNA sequence variant.

Conclusion T-LRS is an effective method for identifying missing pathogenic variants. Although limitations with computational prediction algorithms can hinder the interpretation of variants, T-LRS is particularly effective in identifying intronic variants.

INTRODUCTION

Segmental progeroid syndromes are a group of disorders that phenotypically resemble accelerated ageing.¹ The prototypical example of an adult-onset progeroid syndrome is Werner syndrome (WS; OMIM #277700), a rare autosomal recessive disorder caused by loss-of-function variants of the gene *WRN*.^{2,3} Individuals with WS typically do not show clinical signs until their early teens when the first clinical sign—lack of a growth spurt (often recognised retrospectively)—appears. An aged appearance (grey hair, atrophic skin) begins to develop in the 20s and 30s, which is followed by a series of common age-related diseases, including bilateral cataracts, gonadal atrophy, type II diabetes mellitus, osteoporosis and arteriosclerosis.^{3,4} Alzheimer-type dementia is generally not a feature

Key messages

What is already known on this topic

- ⇒ The burden of undiagnosed genetic disorders on individuals is high.
- ⇒ In some cases, a specific genetic disorder is suspected but no variants are found in genes associated with that disorder.
- ⇒ In other cases, testing identifies a single variant in a gene associated with the suspected disorder but no second variant.

What this study adds

- ⇒ This study reports the results of targeted long-read sequencing (T-LRS) in a cohort of individuals highly suspected to have a specific genetic disorder, Werner syndrome, but only one pathogenic variant identified in the causative gene, *WRN*.
- ⇒ This study demonstrates that T-LRS in a well-phenotyped cohort has a high yield.

How this study might affect research, practice or policy

- ⇒ The implications of this work are that in a well-defined cohort with a clear phenotype T-LRS represents an excellent next best test after non-diagnostic clinical testing.

of WS. The most common causes of death in WS are myocardial infarction and malignancies at a median age of 54 years.^{5,6} The most significant quality-of-life issue is development of deep ulcerations around the ankles and, occasionally, the elbows, which are associated with soft tissue calcifications and may eventually require lower limb amputation.⁷

WRN encodes a multifunctional nuclear protein with exonuclease and RecQ-type helicase domains.⁴ Molecular and cellular evidence suggest the involvement of *WRN* in a wide variety of functions, including DNA repair, recombination, replication and telomere maintenance.⁴ Cells derived from individuals with WS exhibit limited replicative lifespan, altered epigenetic signatures and mitochondrial dysfunction.^{4,8,9} More recently, *WRN* helicase activity was shown to be essential for the survival of mismatch repair-deficient cancer cell



© Author(s) (or their employer(s)) 2022. Re-use permitted under CC BY. Published by BMJ.

To cite: Miller DE, Lee L, Galey M, et al. *J Med Genet* 2022;**59**:1087–1094.

lines, suggesting some functional overlap of these DNA repair pathways.¹⁰

To date, nearly 100 different pathogenic variants have been reported in individuals with WS worldwide.^{2 11} The majority of disease-causing variants in WS result in truncation of the WRN protein and the elimination of the nuclear localisation signal at the C-terminus and/or nonsense-mediated mRNA decay, making them functionally null.² That most variants result in little to no protein expression seems to be why all individuals with WS share similar phenotypes regardless of the causal variants. Several amino acid substitutions that abolish helicase activities have also been identified but only as compound heterozygous variants in combination with null variants.¹² Founder variants have been detected in specific populations, such as in Sardinia and Japan where carrier frequencies as high as 1:150 have been observed for specific variants.^{2 13} Possible founder mutations have also been reported in India, Pakistan, Turkey and the Netherlands.^{14 15} Differences in WS presentations among various populations have also been reported. For example, Indian/Pakistani individuals with WS tend to have earlier onset of cataracts, at a median age of 20 years compared with 31 years in non-Indian individuals with WS.¹⁴

Established in 1988, the International Registry of Werner Syndrome at the University of Washington recruits individuals with suspected progeroid syndromes from all over the world for molecular diagnosis and further biological study. Potential therapeutic approaches are being sought out in collaboration with the Japanese Werner Consortium.^{8 16 17} As of November 2021, the Registry has enrolled 179 individuals with classical WS with documented biallelic causal variants and 9 individuals with classical WS presentations in which only a single heterozygous causal variant has been identified. Recently, targeted long-read sequencing (T-LRS) on the Oxford Nanopore Technologies (ONT) platform was used to clarify complex structural variants and identify missing variants in cases that remained unsolved despite a complete clinical evaluation.¹⁸ We hypothesised that T-LRS could identify a second pathogenic variant in the unsolved WS cases. Of the nine molecularly unsolved cases from eight pedigrees in the registry, we identified a second pathogenic variant in eight. A second pathogenic variant was not identified in one case with known skipping of exon 20, despite long-read sequencing and phasing, demonstrating the limitation of both T-LRS and currently available prediction algorithms used to interpret DNA variants.

MATERIALS AND METHODS

Recruitment of study participants, sample processing and standard sequencing analysis

Individuals are referred to the International Registry of Werner Syndrome at the University of Washington by physicians who suspect a diagnosis of WS. Biological samples collected from individuals suspected to have WS who consent to be enrolled in the study are shipped to the International Registry.

Blood and skin sample processing was performed as previously described.⁵ Briefly, participant blood samples were processed immediately on arrival for cryopreservation of primary cells and plasma, isolation of DNA and RNA and establishment of lymphoblastoid cell lines (LCLs) using Epstein-Barr virus. Depending on the year of referral, different methods of DNA and RNA sequencing were done (table 1). In some cases, Sanger sequencing of some exons was done, while in others, sequencing was done on an exome backbone.^{2 5 15 19} RT-PCR sequencing was performed on total RNA isolated from blood or LCLs. Western blot analysis was done using total protein isolated from LCLs. Detailed protocols for Sanger sequencing and western blot analyses have been previously described.^{2 5 19}

Targeted long-read sequencing of the WRN locus

T-LRS was performed using ReadFish²⁰ on an ONT GridION as previously described.¹⁸ Briefly, for each sample 1–2 µg of genomic DNA was sheared using a Covaris g-TUBE by centrifuging at 6000 rpm for 2 min then inverting and centrifuging at 6000 rpm again for 2 min. DNA was prepared for sequencing using the ONT Ligation Kit (SQK-LSK109) following the manufacturer’s instructions. Each library was loaded onto one or more R9.4.1 flow cells (FLO-MIN106D) and run for 72 hours with the goal of recovering at least 20× coverage per library (online supplemental table 1). For each sample, an approximately 3 Mbp region surrounding WRN was targeted along with two control regions (online supplemental table 2).

Long-read sequencing of RT-PCR products from individual SILV1010

To identify a second pathogenic variant in SILV1010, we performed overlapping RT-PCR of WRN mRNA using previously published primers.¹⁹ The RT-PCR product was prepared for ONT sequencing using the SQK-LSK109 ligation kit following the manufacturer’s instructions. A single library was loaded

Table 1 Targeted long-read sequencing (T-LRS) identified candidate pathogenic variants in eight of nine individuals with Werner syndrome (BIA1010 and BIA1020 are siblings)

Registry	Known variant (all heterozygous)	Additional workup	T-LRS result	Confirmation of T-LRS result
WV	RT-PCR: c.2773delG, p.A925fs	Western: no protein	c.3961C>T, p.R1321*	PCR+Sanger
BIA1010	Sanger: c.1105C>T, p.R369*	Western: no protein	c.3234-170A>G	RT-PCR
BIA1020	Sanger: c.1105C>T, p.R369*	Western: no protein	c.3234-170A>G	RT-PCR
PD1010	Exome sequencing: c.561A>G, p.K187*	Western: no protein	chr8:g.31135822_31474535delinsTCT	PCR+Sanger
CB4	Sanger: c.3139-1G>C, p.G1047fs	Western: no protein SNP array: normal	c.1982-297A>G	RT-PCR
CB6	Sanger: c.1105C>T, p.R369*	Western: no protein SNP array: normal	c.1982-297A>G	RT-PCR
FES	RT-PCR: c.1165delA, p.R389fs	Western: no protein	c.2103_2104delAC, p.Leu702fs	PCR+Sanger
SILV1010	Sanger: c.2665C>T, p.R889*	Western: ~1% protein RT-PCR: skipping of exon 20	No second variant found	n/a
EN1010	Genome sequencing: c.2367_2368delAT, p.S790fs	None	c.839+1309T>G	Exon trap (figure 3)

n/a, not available.

onto a Nanopore R9.4.1 Flongle flow cell (FLO-FLG001) and sequenced for 24 hours. Reads were aligned to GRCh38 using minimap2.²¹

Data analysis

Fast5 files were base called using the high accuracy model in Guppy 4.0.11 (ONT). Given no second candidate pathogenic variant was identified in SILV1010, it was re-base called using the superior model in Guppy 5.0.7 (ONT). For all samples, all FASTQ reads were aligned to GRCh38 using minimap2.²¹ Single-nucleotide and insertion/deletion variants (SNVs and indels) were called with Medaka (ONT), which was also used for phasing. Variant calling and phasing were redone using Guppy 5 data for SILV1010 using Clair3.²² Structural variants were identified using Sniffles,²³ SVIM²⁴ and CuteSV.²⁵ VEP V.103.1²⁶ was used to annotate VCF files produced by Guppy or Medaka and add splice predictions from SpliceAI,²⁷ CADD V.1.8 scores²⁸ and population allele frequency from the gnomAD V.2.1.1 genomes file.²⁹ Aligned reads were visualised using integrative genomics viewer.³⁰ Analysis was performed by filtering the VCF file by allele frequency and examining variants absent from population databases or those with allele frequencies <1%.

Exon trapping assay

The 1.8 kbp region that spans intron 7 to intron 8 (c.724-167 to c.839+1553) was amplified from genomic DNA of individual EN1010 and subcloned into the multicloning sites of the pSPL3 vector^{31,32} linearized with EcoRI and PstI, using the NEBuilder HiFi DNA assembly cloning kit (catalogue# E5520, New England Biolabs) to generate pSPL3-EN1010-Wt and pSPL3-EN1010-Mut. These constructs were transfected to immortalised control human fibroblasts, 82-6hTERT, using FuGENE 6 (catalogue# E2693, Promega). After 48 hours, total RNA was isolated and reverse-transcribed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (catalogue# 4368814, Thermo Fisher Scientific). RT-PCR was done using primers: SD6 (5'-TCTGAGT-CACCTGGACAACC-3'), SA2 (5'-ATCTCAGTGGTATTTG

TGAGC-3') and one designed from WRN exon 8, J20 (5'-CTGA GGAAGTGATGGATCTGG-3').

RESULTS

Individuals sequenced in this report

Seven of the nine individuals with a single heterozygous variant in WRN have been previously described.² All nine individuals were referred to the Registry with a clinical diagnosis of WS (table 2), two of which are newly described below. Variants in WRN were initially identified by Sanger sequencing of coding exons, which, over time, was gradually replaced by clinical exome or genome sequencing. A western blot analysis for WRN was done in cases for which material was available. RT-PCR and SNP arrays were also used in selected cases.^{2,5,15}

Individual EN1010 is a man in his 50s born to non-consanguineous parents with a birth weight of 2.7 kg. He began to experience signs of premature ageing in his 20s with greying hair. He underwent bilateral cataract surgery in his early 30s and was subsequently diagnosed with hypothyroidism and type 2 diabetes mellitus in his 30s. He was diagnosed with hypogonadism and a prolactinoma in his 40s. His other medical history includes cardiac atherosclerosis, valve insufficiency and tinnitus.

On physical examination, his body mass index (BMI) was 20.2 kg/m², height of 168 cm (Z-score -1.2) and weight of 57 kg (Z-score of -1.34). He had a mildly elevated blood pressure (148/62) and appeared progeroid, with grey hair, vocal cord atrophy, tight, atrophic skin with a waxy appearance and ulcers of the right heel and left metatarsal. His limbs were thin and notable for cold fingers, reduced subcutaneous fat, muscle atrophy and flat feet. Dual-energy X-ray absorptiometry scan revealed osteoporosis, osteosclerosis of the fingers and toes and soft tissue calcification. He had elevated liver enzymes with hepatic steatosis observed on abdominal MRI.

His family history includes two unaffected siblings: a sister in her 40s who is 160 cm tall (Z-score -0.5) and a brother in his 50s who is 170 cm tall (Z-score -0.92); each has one child. The father is in his 80s; his height is 180 cm (Z-score 0.48). The

Table 2 Clinical signs of Werner syndrome in seven previously reported cases

Registry#	EN1010	PD1010	BIA1010	BIA1020	SILV1010	CB4	WV
Age at evaluation (years)	42	42	45	38	68	40s	40
Cardinal signs							
Cataracts	Y	Y	Y	Y	Y*	Y	Y
Skin and facial feature	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y
Short stature	N	Y	Y	Y	N	Y	Y
Greying or loss of hair	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Parental consanguinity or affected sibs	N	N	Y	Y	Y	N	NA
Further signs and symptoms							
Diabetes mellitus	N	Y	Y	Y	Y	Y	N
Hypogonadism	N	NA	Y	Y	NA	NA	Y
Osteoporosis	Y	Y	Y	Y	NA	NA	Y
Osteosclerosis	N	NA	Y	NA	NA	NA	NA
Soft tissue calcification	N	N	Y	Y	Y	Y	Y
Atherosclerosis	N	NA	Y	NA	NA	Y	NA
Neoplasms	N	NA	Y	NA	Y	N	NA
Voice change	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Flat feet	N	N	Y	Y	Y	Y	NA
Werner syndrome diagnostic criteria	Possible	Possible	Definite	Definite	Possible	Probable	Probable

*Unilateral cataract.

N, no; NA, not available; Y, yes.

mother is in her 70s; her height is 160 cm (Z-score -0.5) and she has hypothyroidism and a pacemaker. Although he lacked short stature, this individual had three cardinal signs of WS (cataracts, dermatological pathology and premature greying) as well as additional clinical features, including type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis; thus, this individual met criteria for possible diagnosis of WS diagnosis.³ Genome sequencing revealed a novel heterozygous *WRN* variant, c.2367_2368delAT, in exon 20, which results in the truncation of the *WRN* protein, p.Ser790fs (table 1). A second pathogenic variant was not reported.

Individual PD1010 is a South Asian man in his 40s born to non-consanguineous parents who was diagnosed with Addison disease in his teens, hypothyroidism and type 2 diabetes mellitus in his 20s (which later became insulin-dependent) and bilateral cataracts requiring surgery in his 30's. On physical examination, his BMI was 17.8 kg/m², height was 150 cm (Z-score -3.54) and weight was 40 kg (Z-score -4.3). He had a progeroid appearance, with sparse grey hair, a high-pitched squeaky voice and atrophic, thin skin. His limbs were thin, with loss of subcutaneous fat, muscle wasting and ulcers at both elbows. He had no siblings.

Exome sequencing revealed a heterozygous variant in exon 6 of *WRN*, c.561A>G (table 1). This synonymous variant is a known founder mutation seen in individuals of Indian or Pakistani descent and has been shown to activate a cryptic splice site in exon 6, resulting in p.Lys187fs.¹⁴ A second pathogenic variant was not identified by exome sequencing. Western blot analysis of protein from LCLs showed no detectable *WRN* protein, confirming the diagnosis of WS.

Detection of deep intronic splice variants by T-LRS

We performed T-LRS on eight of the nine molecularly unsolved cases with an average depth of coverage of $20\times$ (figure 1A, online supplemental table 1). In all eight sequenced cases, the known pathogenic variant was identified. In four of the eight sequenced cases, T-LRS identified an intronic variant predicted by SpliceAI²⁷ to alter splicing (figure 2, table 1, online supplemental table 3). One individual was not sequenced because a splice variant was found in his affected brother (BIA1010 and BIA1020). In all four cases, phasing predicted that the intronic splice variant is on a different haplotype than the previously identified pathogenic variant.

Individuals BIA1010 and BIA1020 were affected siblings from Poland carrying a heterozygous c.1105C>T, p.Arg369*, a known founder variant, accounting for approximately 20% of the mutant alleles in our registry.² T-LRS revealed a heterozygous c.3234-170A>G in intron 26, which was predicted by SpliceAI to create a cryptic splice acceptor site (AA→AG). RT-PCR of the region including exons 25 and 26 showed two abnormal transcripts, one with a 69 bp insertion (r.3233_3234ins69) and the other with a 169 bp insertion (r.3233_3234ins169) between exons 25 and 26 (online supplemental figure 1). Both cryptic exons started at c.3234-169, as predicted by in silico analysis. Within the family, PCR and Sanger sequencing confirmed that the two variants were from the parents: c.3234-170A>G was transmitted from the mother (BIA1040) and c.1105C>T from the father (BIA1050).

In two unrelated Japanese individuals with WS, CB4 and CB6, T-LRS detected a c.1982-297A>G in intron 17. In silico analysis

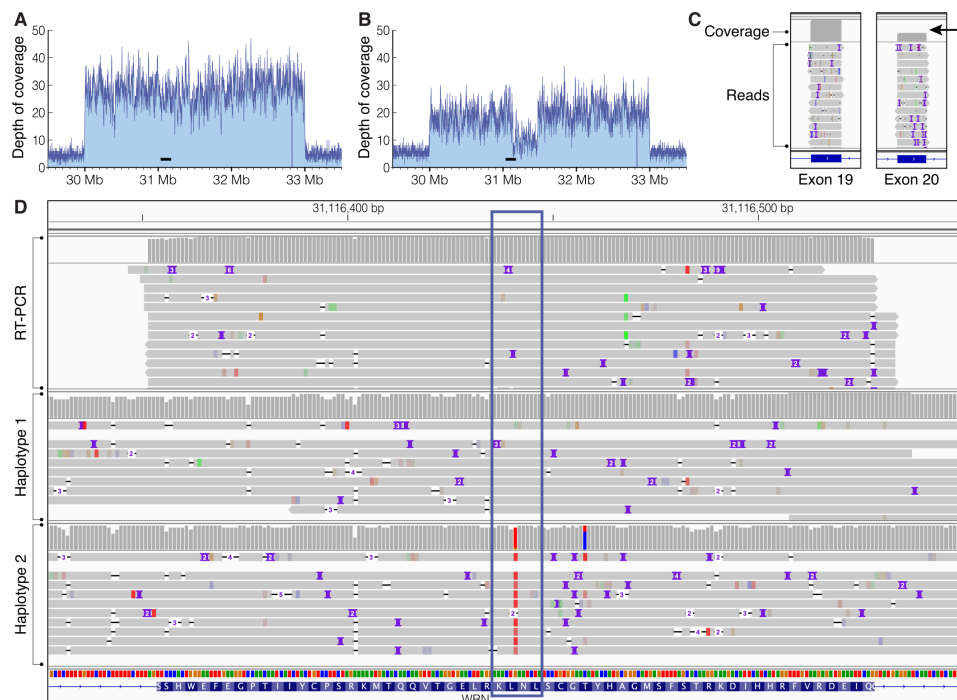


Figure 1 Targeted long-read sequencing (T-LRS) was used to identify missing variants. (A) T-LRS was used to target an approximately 3 Mbp region around *WRN*. Data shown for individual WV. Increased coverage (y-axis) represents the target region, decreased coverage represents background. The position of *WRN* is represented by the horizontal black bar around 31 Mbp (GRCh38). (B) T-LRS revealed a 339 kbp deletion in individual PD1010 that began within *WRN*. (C) Long-read sequencing of RT-PCR products from individual SIV1010 confirmed the absence of exon 20 in approximately half of the reads (arrow). Please see online supplemental figure 3 for an integrative genomics viewer screenshot of exons 19–21 that shows how reads are linked and that approximately half of reads skip of exon 20. (D) Long-read sequencing revealed RT-PCR products from individual SIV1010 did not carry the T allele present on haplotype 2 within exon 20, confirming that splicing was altered on haplotype 2. The previously known pathogenic variant (table 1) was predicted to be located on haplotype 1. No second pathogenic variant was identified in this individual.

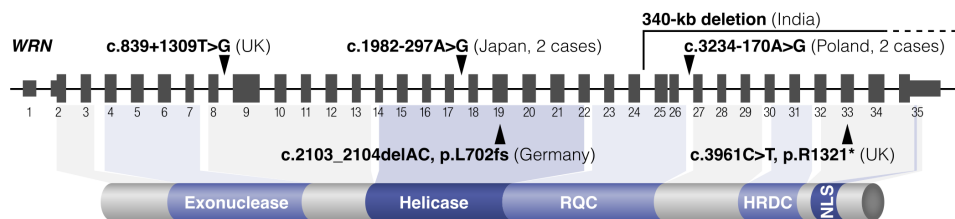


Figure 2 Diagram of *WRN* and the location of variants identified in this study. Pathogenic variants found in this study are shown with respect to the 35 exons within *WRN*. Functional domains of *WRN* proteins are shown below the corresponding exons. Those functional domains are the exonuclease and helicase domains, RecQ helicase conserved region (RQC), helicase RNaseD C-terminal conserved region (HRDC) and the nuclear localisation signal (NLS).

predicted that this substitution activates the adjacent GT to be the cryptic splice donor (A|GT→G|GT). RT-PCR sequencing revealed the presence of the corresponding 73 bp cryptic exon between exons 17 and 18 (r.1981_1982ins73) in CB6. RT-PCR was not done for individual CB4 because there was insufficient remaining mRNA.

For individual EN1010, T-LRS detected a c.839+1309T>G in intron 8, along with the previously identified c.2367_2368delAT in exon 20. This intron 8 variant has a CADD of 9.3 and SpliceAI predicts it creates a new donor site (T|GT→G|GT) with a score of 0.73. Unfortunately, we were unable to amplify RT-PCR products directly from the individuals materials or establish an immortalised cell line from the individual sample. We, therefore, performed exon trapping to test whether this variant altered splicing and generated a cryptic exon. Using the pSPL3 system,³¹ we observed that RT-PCR of the wildtype construct (pSPL3-EN1010-Wt) gave a single band with the expected exon 8 splicing, while the construct with the c.839+1309T>G variant (pSPL3-EN1010-Mut) gave an RT-PCR product with a 171 bp insertion following exon 8 (r.839_840ins171) (figure 3). This insertion is predicted to cause premature termination of the *WRN* protein at position 280 (p.Arg280SerfsTer9).

T-LRS identified a previously unknown large deletion and missense variants

T-LRS of individual PD1010 revealed a 338 715 bp deletion that began within *WRN* and included exons 25 through 35 (figures 1B

and 2). PCR and Sanger sequencing of the predicted junction confirmed the deletion as chr8:g.31,135,822_31,474,535delinsTCT (online supplemental figure 2). Encouraged by the efficacy of T-LRS, two archived cases, individuals WV and FES, were then re-examined.³³ Western blot analysis of these cases showed no *WRN* protein, and RT-PCR in the mid-1990s revealed a single heterozygous variant in both cases.¹⁹ T-LRS identified a heterozygous pathogenic coding variant, c.3961C>T, p.Arg1321*, in exon 33 of individual WV, and c.2103_2104delAC, p.Leu702fs, in exon 19 of individual FES (figure 2). In all three cases, phasing predicted that the previously known pathogenic variant was on a different haplotype than the newly identified second variant. That we identified variants in coding sequence in these cases was not surprising as they were enrolled in the registry prior to the availability of PCR and Sanger sequencing.

T-LRS failed to identify a pathogenic variant in a case with known exon skipping

Individual SILV1010, a man from the USA whose presentation and phenotype is consistent with possible WS, was found to have a pathogenic heterozygous c.2665C>T, p.Arg889* in exon 22. Western blot analysis on lymphoblastoid cells demonstrated 1% *WRN* protein expression, consistent with WS. RT-PCR of material from a LCL derived from the affected individual showed heterozygous skipping of exon 20 (r.2274_2448del175) (figure 1C).² T-LRS of DNA from this individual detected the previously identified c.2665C>T, which was predicted to be on haplotype 1 (figure 1D), and a second variant (c.1269+36A>G)

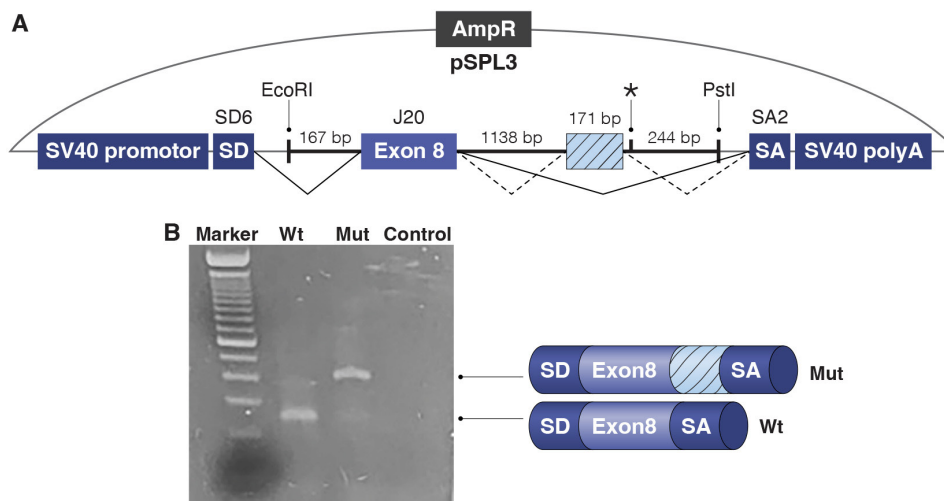


Figure 3 Exon trapping of the EN1010 variant. (A) The pSPL3 vector contains splice donor (SD) and splice acceptor (SA) exons and functional introns, with transcription beginning following the SV40 promoter and ending at the poly(A) site. The wildtype (Wt) construct, pSPL3-EN1010-Wt, and the mutant (Mut) construct, pSPL3-EN1010-Mut, contain the 1.8 kbp fragment derived from EN1010, with the c.839+1309T>G variant at the asterisk (*). (B) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products shows the larger amplicon in the Mut compared with Wt due to the 171 bp cryptic insertion.

located in the ninth intron predicted by SpliceAI to affect splicing by creating a new donor site with a score of 0.45 and loss of a donor site at c.1269 with a score of 0.12. However, we did not detect splice alteration involving exon 9, intron 9 or exon 10 in LCLs from the affected individual, nor did we find pathological significance linked to this variant in literature or databases. Thus, we felt this variant did not explain skipping of exon 20 in this individual. Because exon 20 contained a heterozygous c.2361G>T, we performed WGS of RT-PCR products on an ONT Flongle and found that approximately half of reads skipped exon 20 (online supplemental figure 3) and that those RT-PCR products which contained exon 20 were homozygous for the reference allele G and did not contain the T allele that was predicted to be located on haplotype 2 (figure 1D). A single SNV on haplotype 2 with an allele frequency <1% and absent from population databases was found in either intron 19 or 20 (c.2273+155A>G). Unfortunately, this variant is not computationally predicted to alter splicing. Thus, sequencing of RT-PCR products did not reveal a clear potentially pathogenic variant, and this case remains unsolved at the molecular level.

DISCUSSION

Here, we show that computational selection of specific genomic regions for sequencing using adaptive sampling on the ONT platform can be used to identify disease-causing variants in a cohort of individuals with WS. Different approaches for T-LRS have been described using both PCR and CRISPR/Cas-based methods.^{34–36} PCR-based methods allow for targeting by over-enrichment of target regions but remove epigenetic information from the target and are limited by the length of the fragment that can be reliably amplified by PCR. CRISPR/Cas-based methods work by first dephosphorylation of genomic DNA, then exposing new phosphorylation sites with targeted double-stranded breaks where sequencing libraries then anneal. The advantage of the CRISPR/Cas method is that epigenetic information is preserved while segments up to about 200 kbp can be targeted. The drawback is that multiple regions must be targeted if one wants to target several megabase pairs of genomic space, and recovery of large fragments may require gel-based separation of cut DNA fragments. In both cases, fragments can be sequenced on either an ONT or PacBio platform.

Recently, adaptive sampling on the ONT platform was shown to be an effective method to evaluate known structural variants and missing variant cases.¹⁸ This method works by computationally selecting DNA molecules for sequencing.²⁰ There are several advantages of adaptive sampling over CRISPR/Cas and PCR-based methods, including broader flexibility in selecting target sites, ability to target a larger amount of genomic space and simpler library preparation steps without the need for DNA fragment isolation by pulse-field gel if large segments are targeted. However, ONT sequencing has a higher per-read error rate than PacBio high-fidelity (HiFi) sequencing because each DNA molecule is read only one time by ONT instead of multiple times as with PacBio HiFi.³⁷ This error is most apparent in homopolymers, meaning that certain classes of variants are more likely to be missed by ONT sequencing.

Using adaptive sampling, we identified a second pathogenic variant (including missense, deep intronic splice and structural variants) in eight of nine individuals clinically diagnosed with WS and a single known pathogenic variant identified by prior testing. While all eight variants identified using T-LRS would likely also have been identified by short-read genome sequencing (WGS) and focused analysis of *WRN* there may be a

cost advantage of T-LRS over short-read WGS in missing variant cases such as these. Each individual was sequenced on a single ONT R9.4.1 flowcell after a single library preparation, representing a materials cost of approximately US\$600 per sample which is cost competitive with short-read WGS today. Exome sequencing, on the other hand, would likely identify the two missense variants but may have difficulty identifying the large deletion in individual PD1010 and would be unable to identify deep intronic variants because those regions are not typically targeted for capture or enrichment.^{38 39}

The major advantage of our approach over short-read WGS is the ability to resolve repetitive regions and phase samples for which parental samples may not be available. *WRN* contains two 1400 bp segmental duplications involving exons 10 and 11 as well as surrounding intronic sequence that are approximately 95% similar. Prior work using PCR to identify pathogenic indels and nonsense variants in exons 10 and 11 depended on a single-nucleotide difference between these two regions to design region-specific primers.² Thus, there is a technical advantage of T-LRS over short-read WGS to cover such regions.⁴⁰ Furthermore, unlike short-read WGS, T-LRS is able to more easily phase variants in the absence of parental samples for segregation, representing an additional advantage of T-LRS over short-read WGS. Thus, a strong argument exists for T-LRS the next best test for individuals with non-diagnostic clinical testing and either a compelling phenotype for a specific disorder or a single known variant in a gene associated with the suspected disorder.

That four of the missing variants identified in our study were splice variants demonstrate how difficult these can be to detect in the laboratory. Here, in silico analysis allowed us to identify candidate splice variants and allowed for targeted evaluation in our unsolved cases. Interestingly, the highest reported heterozygote frequency for a pathogenic WS variant is a deep intronic splice variant, c.2089-3024A>G, r.2089_2273del85 found in approximately 1:120 individuals in Sardinia.^{13 19}

Despite advances in the ability of computational prediction algorithms to identify intronic variants that may alter splicing, it is still necessary to confirm the pathogenicity of these variants in the laboratory. When material from an affected individual is unavailable, CRISPR may be used to generate a cell line containing the candidate variants. Intronic regions, however, generally contain repetitive sequence that makes CRISPR mutagenesis more challenging. Therefore, in this case we used exon trapping as an alternative approach to validate the candidate variant identified in individual EN1010.^{31 32} Although exon trapping has been widely used for this purpose, there is a formal possibility that natural introns and exons may have an unknown influence on cryptic splicing.

Worldwide, WS is thought to be clinically underdiagnosed because many of the symptoms are relatively non-specific and may be viewed as common age-related diseases. We believe that additional genetic testing, including long-read sequencing, will lead to an increased rate of diagnosis for individuals with WS. This increased diagnostic rate and awareness will help drive interest in research and development of therapeutics, thereby benefiting all individuals affected by this disorder.

Author affiliations

¹Department of Pediatrics, Division of Genetic Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA

²Department of Genome Sciences, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington, USA

³Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA

⁴Department of Medical Genetics, National Institute for Health Research Cambridge Biomedical Research Centre, University of Cambridge, Cambridge, UK

⁵Department of Medicine, Jawaharlal Institute of Postgraduate Medical Education and Research, Puducherry, India

⁶Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁷Department of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, International University of Health and Welfare, Otawara, Japan

⁸Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Seattle, Washington, USA

⁹Department of Medicine, Division of Medical Genetics, University of Washington, Seattle, Washington, USA

Twitter Danny E. Miller @danrdanny

Acknowledgements We thank A. Miller for help with figure preparation and editorial assistance and T. Brown for editorial assistance. We wish to thank Dr Anna Stears, National Severe Insulin Resistance Service, Addenbrookes Hospital, Cambridge, UK.

Contributors Conception: DEM, JO; data curation: DEM, JO; formal analysis: DEM, LL, MG, JO; funding acquisition: DEM, GMM, EEE, JO; investigation: DEM, LL, MG, RK-P, MT, DA, KY, HK, YM, AT-W, MT, AV; methodology: DEM; supervision: DEM, GMM, EEE, JO; writing—original draft: DEM, FMH, JO; writing—review and editing: DEM, EEE, FMH, JO. DEM and JO accepted full responsibility for the finished work and/or the conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish. All authors reviewed the final manuscript.

Funding This work was in part supported by the US National Institutes of Health (NIH) grants R01CA210916 (GMM/JO) and R01MH101221 (EEE), a Catalytic Collaborations Grant from the Brotman Baty Institute for Precision Medicine (DEM/EEE), a Trainee Award from the Brotman Baty Institute for Precision Medicine (DEM), JP20H00524 from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI (KY) and JPMH21FC1016 from the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan (KY). MT is supported by the NIHR Cambridge BRC. Analysis of the sequence data was supported by NHGRI grants U01 HG011744 and UM1 HG006493 (University of Washington Center for Rare Disease Research). EEE is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute. This article is subject to HHMI's Open Access to Publications policy. HHMI lab heads have previously granted a non-exclusive CC BY 4.0 license to the public and a sublicensable license to HHMI in their research articles. Pursuant to those licenses, the author-accepted manuscript of this article can be made freely available under a CC BY 4.0 license immediately on publication.

Competing interests DEM has received travel support from Oxford Nanopore Technologies (ONT) to speak on their behalf. DEM is a paid consultant for and holds stock options in MyOme. DEM and EEE are engaged in a research agreement with ONT. EEE is a scientific advisory board (SAB) member of Variant Bio, Inc.

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval Research participants were referred to the International Registry of Werner Syndrome by referring physicians. Individuals or their legal representative signed informed consent for the molecular and cell biological studies, publication of the results and deposition of data. Studies were performed in accordance with the Declaration of Helsinki protocol and were approved by the institutional review board (IRB) at the University of Washington, Seattle, Washington. Study number is STU00000233 and is approved through 16 October 2022. Participants gave informed consent to participate in the study before taking part.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available on reasonable request. Data that support the findings of this study are available on request from the corresponding authors.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 Unported (CC BY 4.0) license, which permits others to copy, redistribute, remix, transform and build upon this work for any purpose, provided the original work is properly cited, a link to the licence is given, and indication of whether changes were made. See: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

ORCID iD

Danny E. Miller <http://orcid.org/0000-0001-6096-8601>

REFERENCES

- Martin GM, Hisama FM, Oshima J. Review of how genetic research on segmental progeroid syndromes has documented genomic instability as a hallmark of aging but let us now Pursue *Antigeroid* syndromes! *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2021;76:253–9.
- Yokote K, Chanprasert S, Lee L, Eirich K, Takemoto M, Watanabe A, Koizumi N, Lessel D, Mori T, Hisama FM, Ladd PD, Angle B, Baris H, Cefle K, Palanduz S, Ozturk S, Chateau A, Deguchi K, Easwar TKM, Federico A, Fox A, Grebe TA, Hay B, Nampoothiri S, Seiter K, Streeten E, Piña-Aguilar RE, Poke G, Poot M, Posmyk R, Martin GM, Kubisch C, Schindler D, Oshima J. Wrn mutation update: mutation spectrum, patient registries, and translational prospects. *Hum Mutat* 2017;38:7–15.
- Oshima J, Martin GM, Hisama FM. Werner syndrome. GeneReviews. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1514/> [Accessed 13 May 2021].
- Oshima J, Sidorova JM, Monnat RJ. Werner syndrome: clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Ageing Res Rev* 2017;33:105–14.
- Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, Poot M, Rubin CD, Chen D-F, Yang C-C, Juch H, Dorn T, Spiegel R, Oral EA, Abid M, Battisti C, Lucci-Cordisco E, Neri G, Steed EH, Kidd A, Isley W, Showalter D, Vittone JL, Konstantinow A, Ring J, Meyer P, Wenger SL, von Herbay A, Wollina U, Schuelke M, Huizenga CR, Leistriz DF, Martin GM, Mian IS, Oshima J. The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Hum Mutat* 2006;27:558–67.
- Goto M, Ishikawa Y, Sugimoto M, Furuichi Y. Werner syndrome: a changing pattern of clinical manifestations in Japan (1917–2008). *Biosci Trends* 2013;7:13–22.
- 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* 2013;13:475–81.
- Fang EF, Hou Y, Lautrup S, Jensen MB, Yang B, SenGupta T, Caponio D, Khezri R, Demarest TG, Aman Y, Figueroa D, Morevati M, Lee H-J, Kato H, Kassahun H, Lee J-H, Filippelli D, Okur MN, Mangerich A, Croteau DL, Maezawa Y, Lyssiotis CA, Tao J, Yokote K, Rusten TE, Mattson MP, Jasper H, Nilsen H, Bohr VA. NAD⁺ augmentation restores mitophagy and limits accelerated aging in Werner syndrome. *Nat Commun* 2019;10:5284.
- Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin GM, Poot M, Nanda I, Dittrich M, Müller T, Haaf T. Epigenetic signatures of Werner syndrome occur early in life and are distinct from normal epigenetic aging processes. *Aging Cell* 2019;18:e12995.
- Chan EM, Shibue T, McFarland JM, Gaeta B, Ghandi M, Dumont N, Gonzalez A, McPartlan JS, Li T, Zhang Y, Bin Liu J, Lazaro J-B, Gu P, Piatt CG, Apfel A, Ali SO, Deasy R, Kesula P, Ng RWS, Roberts EA, Reznichenko E, Leung L, Alimova M, Schenone M, Islam M, Maruvka YE, Liu Y, Roper J, Raghavan S, Giannakis M, Tseng Y-Y, Nagel ZD, D'Andrea A, Root DE, Boehm JS, Getz G, Chang S, Golub TR, Tsherniak A, Vazquez F, Bass AJ. Wrn helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. *Nature* 2019;568:551–6.
- Mojumdar A. Mutations in conserved functional domains of human RecQ helicases are associated with diseases and cancer: a review. *Biophys Chem* 2020;265:106433.
- Tadokoro T, Rybanska-Spaeder I, Kulikowicz T, Dawut L, Oshima J, Croteau DL, Bohr VA. Functional deficit associated with a missense Werner syndrome mutation. *DNA Repair* 2013;12:414–21.
- Masala MV, Scapaticci S, Olivieri C, Pirodda C, Montesu MA, Cuccuru MA, Pruneddu S, Danesino C, Cerimele D. Epidemiology and clinical aspects of Werner's syndrome in North Sardinia: description of a cluster. *European J Dermatology Ejd* 2007;17:213–6.
- Saha B, Lessel D, Nampoothiri S, Rao AS, Hisama FM, Peter D, Bennett C, Nürnberg G, Nürnberg P, Martin GM, Kubisch C, Oshima J. Ethnic-Specific WRN mutations in South Asian Werner syndrome patients: potential founder effect in patients with Indian or Pakistani ancestry. *Mol Genet Genomic Med* 2013;1:7–14.
- Friedrich K, Lee L, Leistriz DF, Nürnberg G, Saha B, Hisama FM, Eymann DK, Lessel D, Nürnberg P, Li C, Garcia-F-Villalta MJ, Kets CM, Schmidtke J, Cruz VT, Van den Akker PC, Boak J, Peter D, Compoginis G, Cefle K, Ozturk S, López N, Wessel T, Poot M, Ippel PF, Groff-Kellermann B, Hoehn H, Martin GM, Kubisch C, Oshima J. Wrn mutations in Werner syndrome patients: genomic rearrangements, unusual intronic mutations and ethnic-specific alterations. *Hum Genet* 2010;128:103–11.
- Koshizaka M, Maezawa Y, Maeda Y, Shoji M, Kato H, Kaneko H, Ishikawa T, Kinoshita D, Kobayashi K, Kawashima J, Sekiguchi A, Motegi S-I, Nakagami H, Yamada Y, Tsukamoto S, Taniguchi A, Sugimoto K, Shoda Y, Hashimoto K, Yoshimura T, Suzuki D, Kuzuya M, Takemoto M, Yokote K. Time gap between the onset and diagnosis in Werner syndrome: a nationwide survey and the 2020 registry in Japan. *Aging* 2020;12:24940–56.
- Takemoto M, Yokote K. Preface to management guideline for Werner syndrome 2020. *Geriatr Gerontol Int* 2021;21:131–2.
- Miller DE, Sulovari A, Wang T, Loucks H, Hoekzema K, Munson KM, Lewis AP, Fuerte EPA, Paschal CR, Walsh T, Thies J, Bennett JT, Glass I, Dipple KM, Patterson K, Bonkowski ES, Nelson Z, Squire A, Sikes M, Beckman E, Bennett RL, Earl D, Lee W, Allikmets R, Perlman SJ, Chow P, Hing AV, Wenger TL, Adam MP, Sun A, Lam C, Chang I, Zou X, Austin SL, Huggins E, Safi A, Iyengar AK, Reddy TE, Majoros WH, Allen AS, Crawford GE, Kishnani PS, King M-C, Cherry T, Chong JX, Bamshad MJ, Nickerson DA,

- Mefford HC, Doherty D, Eichler EE, University of Washington Center for Mendelian Genomics. Targeted long-read sequencing identifies missing disease-causing variation. *Am J Hum Genet* 2021;108:1436–49.
- 19 Oshima J, Yu CE, Piussan C, Klein G, Jabkowski J, Balci S, Miki T, Nakura J, Ogihara T, Ellis J, Smith M, Melaragno MI, Fraccaro M, Scappaticci S, Matthews J, Ouais S, Jarzebowicz A, Schellenberg GD, Martin GM. Homozygous and compound heterozygous mutations at the Werner syndrome locus. *Hum Mol Genet* 1996;5:1909–13.
- 20 Payne A, Holmes N, Clarke T, Munro R, Debebe BJ, Loose M. Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes. *Nat Biotechnol* 2020:1–9.
- 21 Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 2018;34:3094–100.
- 22 Luo R, Wong C-L, Wong Y-S, Tang C-I, Liu C-M, Leung C-M, Lam T-W. Exploring the limit of using a deep neural network on pileup data for germline variant calling. *Nat Mach Intell* 2020;2:220–7.
- 23 Sedlazeck FJ, Rescheneder P, Smolka M, Fang H, Nattestad M, von Haeseler A, Schatz MC. Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat Methods* 2018;15:461–8.
- 24 Heller D, Vingron M. SVIM: structural variant identification using mapped long reads. *Bioinformatics* 2019;35:btz041:2907–15.
- 25 Jiang T, Liu Y, Jiang Y, Li J, Gao Y, Cui Z, Liu Y, Liu B, Wang Y. Long-read-based human genomic structural variation detection with cuteSV, 2020. Available: <https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13059-020-02107-y>
- 26 McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, Flicek P, Cunningham F. The Ensembl variant effect predictor. *Genome Biol* 2016;17:122.
- 27 Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, Chow ED, Kanterakis E, Gao H, Kia A, Batzoglu S, Sanders SJ, Farh KK-H. Predicting splicing from primary sequence with deep learning. *Cell* 2019;176:e24:535–48.
- 28 Rentsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. Cadd: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D886–94.
- 29 Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria AH, Minikel EV, Weisburd B, Lek M, Ware JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferreira S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME, Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG, Salinas CAA, Ahmad T, Albert CM, Ardissino D, Atzmon G, Barnard J, Beaugerie L, Benjamin EJ, Boehnke M, Bonnycastle LL, Bottinger EP, Bowden DW, Bown MJ, Chambers JC, Chan JC, Chasman D, Cho J, Chung MK, Cohen B, Correa A, Dabelea D, Darbar D, Duggirala R, Dupuis J, Ellinor PT, Elosua R, Erdmann J, Esko T, Färkkilä M, Florez J, Franke A, Getz G, Glaser B, Glatt SJ, Goldstein D, Gonzalez C, Groop L, Haiman C, Hanis C, Harms M, Hiltunen M, Holi MM, Hultman CM, Kallela M, Kaprio J, Kathiresan S, Kim B-J, Kim YJ, Kirov G, Koener J, Koskinen S, Krumholz HM, Kugathasan S, Kwak SH, Laakso M, Lehtimäki T, Loos RJF, Lubitz SA, Ma RCW MDG, Marrugat J, Mattila KM, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Meigs JB, Melander O, Metspalu A, Nilsson PM, O'Donovan MC, Ongur D, Orozco L, Owen MJ, Palmer CNA, Palotie A, Park KS, Pato C, Pulver AE, Rahman N, Remes AM, Rioux JD, Ripatti S, Roden DM, Saleheen D, Salomaa V, Samani NJ, Scharf J, Schunkert H, Shoemaker MB, Sklar P, Soininen H, Sokol H, Spector T, Sullivan PF, Suvisaari J, Tai ES, Teo YY, Tiinamäija T, Tsuang M, Turner D, Tusie-Luna T, Vartiainen E, Ware JS, Watkins H, Weersma RK, Wessman M, Wilson JG, Xavier RJ, Neale BM, Daly MJ, Genome Aggregation Database Consortium. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581:434–43.
- 30 Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;14:178–92.
- 31 Church DM, Stotler CJ, Rutter JL, Murrell JR, Trofatter JA, Buckler AJ. Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nat Genet* 1994;6:98–105.
- 32 Wang X, Zhao X, Wang X, Yao J, Zhang F, Lang Y, Tuffery-Giraud S, Bottillo I, Shao L. Two novel HOGA1 splicing mutations identified in a Chinese patient with primary hyperoxaluria type 3. *Am J Nephrol* 2015;42:78–84.
- 33 Gibbs DD. Werner's Syndrome ('Progeria of the Adult'). *Proc R Soc Med* 1967;60:135–6.
- 34 Gilpatrick T, Lee I, Graham JE, Raimondeau E, Bowen R, Heron A, Downs B, Sukumar S, Sedlazeck FJ, Timp W. Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nat Biotechnol* 2020:1–6.
- 35 Walsh T, Casadei S, Munson KM, Eng M, Mandell JB, Gulsuner S, King M-C. CRISPR-Cas9/long-read sequencing approach to identify cryptic mutations in *BRCA1* and other tumour suppressor genes. *J Med Genet* 2021;58:850–852.
- 36 Yamaguchi K, Kasajima R, Takane K, Hatakeyama S, Shimizu E, Yamaguchi R, Katayama K, Arai M, Ishioka C, Iwama T, Kaneko S, Matsubara N, Moriya Y, Nomizu T, Sugano K, Tamura K, Tomita N, Yoshida T, Sugihara K, Nakamura Y, Miyano S, Imoto S, Furukawa Y, Ikenoue T. Application of targeted nanopore sequencing for the screening and determination of structural variants in patients with Lynch syndrome. *J Hum Genet* 2021;66:1053–60.
- 37 Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-Read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet* 2020:1–18.
- 38 Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics* 2016;15:374–84.
- 39 Harel T, Lupski JR. Genomic disorders 20 years on—mechanisms for clinical manifestations. *Clin Genet* 2018;93:439–49.
- 40 Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 2002;297:1003–7.

令和5年3月29日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人千葉大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中山 俊憲

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究院・教授

(氏名・フリガナ) 横手 幸太郎・ヨコテ コウタロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	千葉大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月15日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国際医療福祉大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 鈴木 康裕

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
- 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・主任教授
(氏名・フリガナ) 竹本 稔 (タケモト ミノル)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 大学院医学系研究科長

氏 名 熊ノ郷 淳

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学系研究科・寄附講座教授

(氏名・フリガナ) 中神 啓徳・ナカガミ ヒロノリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人千葉大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中山 俊憲

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究院・准教授
(氏名・フリガナ) 窪田吉孝・クボタヨシタカ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月10日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立成育医療研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 五十嵐 隆

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
- 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 遺伝診療センター遺伝診療科・診療部長
(氏名・フリガナ) 小崎 里華・ユサキ リカ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人群馬大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 石崎 泰樹

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学系研究科・教授

(氏名・フリガナ) 茂木 精一郎・モテギ セイイチロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	群馬大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年2月22日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人千葉大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中山 俊憲

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部附属病院・准教授

(氏名・フリガナ) 谷口 俊文・タニグチ トシブミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月10日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人大分大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 北野 正剛

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部小児科学講座・教授

(氏名・フリガナ) 井原 健二・イハラ ケンジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大分大学医学部	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 岐阜県総合医療センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 桑原 尚志

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 小児療育内科 ・部長

(氏名・フリガナ) 金子 英雄・カネコ ヒデオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	岐阜県総合医療センター	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: 委員会への報告)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人東海国立大学機構

所属研究機関長 職 名 名古屋大学医学部附属病院長

氏 名 小 寺 泰 弘

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 早老症のビデンス集積を通じて診療の質と患者QOLを向上する全国研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 名古屋大学医学部附属病院老年内科・助教
(氏名・フリガナ) 渡邊一久・ワタナベカズヒサ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	名古屋大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 公立大学法人奈良県立医科大学

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 細井 裕司

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・准教授

(氏名・フリガナ) 谷口 晃・タニグチ アキラ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 佐賀大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 児玉 浩明

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部 小児科 教授

(氏名・フリガナ) 松尾 宗明 (マツオ ムネアキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月29日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人千葉大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中山 俊憲

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
- 研究課題名 早老症のエビデンス集積を通じて診療の質と患者 QOL を向上する全国研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究院・特任教授
(氏名・フリガナ) 忍足俊幸・オシタリトシユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。