



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on melatonin alterations and brain acetylcholine lesions in sleep disorders in Cockayne syndrome
Author(s)	大越, 優美
Description	配架番号 : 1687
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6978号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6978
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61678
Type	doctoral thesis
File Information	Yumi_Okoshi.pdf



学位論文

Studies on melatonin alterations and brain
acetylcholine lesions in sleep disorders in
Cockayne syndrome

(コケイン症候群の睡眠障害におけるメラトニン代謝
と脳内アセチルコリン病変に関する研究)

2016 年 3 月

北海道大学

大越 優美

学位論文

Studies on melatonin alterations and brain
acetylcholine lesions in sleep disorders in
Cockayne syndrome

(コケイン症候群の睡眠障害におけるメラトニン代謝
と脳内アセチルコリン病変に関する研究)

2016 年 3 月

北海道大学

大越 優美

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	10 頁
方法	12 頁
結果	18 頁
考察	23 頁
結論	26 頁
謝辞	28 頁
引用文献	29 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Yumi Okoshi, Naoyuki Tanuma, Rie Miyata, Masaharu Hayashi.
Melatonin alterations and brain acetylcholine lesions in sleep disorders
in Cockayne syndrome
Brain & Development, 36: 907-914 (2014)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Yumi Okoshi, Naoyuki Tanuma, Rie Miyata, Masaharu Hayashi.
Melatonin alterations and brain acetylcholine lesions in sleep disorders
in Cockayne syndrome
International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases :
Disorders of DNA Damage Response –Bench to Bedside-
2014 年 3 月 5 日～ 7 日・神戸

緒言

(1) コケイン症候群の概要

コケイン症候群 (Cockayne syndrome; CS) は、紫外線や化学物質などで傷害を受けた DNA 構成塩基を除去修復する機構が遺伝的に欠損しているため、DNA 修復が正常に行われず、進行性に中枢神経、末梢神経、多臓器が障害される希少疾患である¹。1936 年に Cockayne が最初に報告した²。1977 年、Sugarman らは、臨床所見を 8 つの大症状と 7 つの小症状に分類した診断基準を提案した³ (表 1)。この診断基準は、罹患器官別の記載ではないなどの欠点はあるが、CS の多岐にわたる症状を簡潔にまとめているため汎用されてきた。

表 1 Sugarman らの診断基準

大症状	小症状
低身長 精神運動発達遅滞 小頭症 小脳失調 網膜色素変性症 感音性難聴 早発老化現象 (特異的顔貌) 脳内石灰化	日光過敏 脊椎後弯 関節拘縮 視神経萎縮 齲歯 大きく冷たい手足 性腺機能低下

Sugarman らは大症状・小症状の重み付けはおこなっていない。
大症状の数項目に伴って小症状が認められる場合 CS を想定すると定義した。

1992 年に Nance と Berry は CS140 症例を詳細に検討し、発症年齢と臨床的重症度から 3 型に分類した⁴。I 型は古典型といわれ、もっとも頻度が高く CS の約 8 割を占める。新生児期や乳児期早期には症状は分かり難く 2 歳以降に CS 特有の症状が顕性化する。II 型は重症型であり、胎児期あるいは新生児期に症状が顕性化し多くの患者は 6~7 歳頃に死亡する。III 型は遅発型で CS の中でもっとも頻度が少なく、また、発症時期が成人期と遅く病勢の進行も緩徐である。CS の典型である I 型の患者は、皮下脂肪の減少を伴った体重増加不良や精神運動発達遅滞など CS 特有の症状が幼児期に顕性化し、特異的顔貌 (落ちくぼんだ目、尖った鼻、齲歯) を呈するようになる (図 1)。皮膚の日光過敏症も特徴的

所見だが皮膚癌を発生することはない。他にも、視覚障害、感音性難聴、小脳失調、関節拘縮、末梢神経障害など多彩な症状を合併する。2015 年久保田らは、日本における CS 患者の総括的な調査から、Sugarman らの診断基準の内、低身長、精神運動発達遅滞、日光過敏、特異的顔貌、難聴、関節拘縮、脳内石灰化の 7 つの症状は、CS I 型患者の 90%で幼児期に顕性化すると報告している⁵。また、Sugarman らの診断基準には入っていないが腎不全の合併有無が生命予後に大きく影響すると報告している⁵。このように罹患臓器や症状が多岐にわたることが CS の臨床的特徴である。さらに、CS に睡眠障害、体温調節障害が合併することが最近明らかにされてきた^{6,7,8}。しかしながらこれらの多彩な臨床症状の発症機序は未だ十分解明されていない。臨床的にこれらの多彩な症状に対応するために、CS は小児科・内科・皮膚科・眼科・耳鼻科・リハビリテーション科・整形外科・泌尿器科など多科が協力して診療にあたるべき疾患である。久保田らの報告では日本での発症率は 100 万出生あたり 2.77 人であり現在日本では、約 70 人から 100 人の患者数が推定されている。

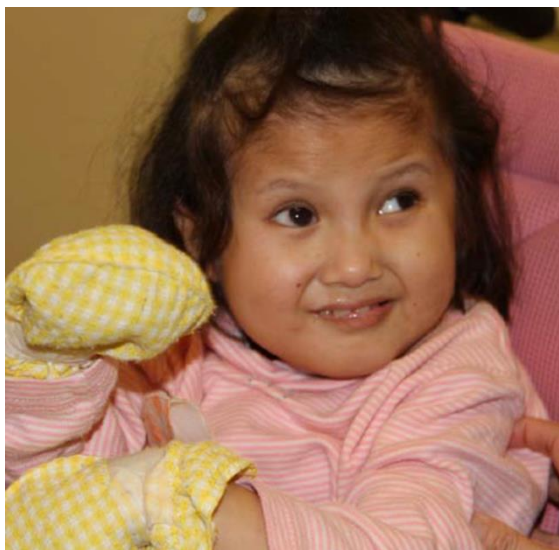


図 1 CS I 型 8 歳女児

成育医療センター 久保田 雅也先生及び患者親権者の許諾を得て、文献 5 より引用 低身長、精神運動発達遅滞、特異的顔貌を認める。

(2) コケイン症候群の遺伝的背景

CS は臨床的観点から分類される方法の他に生化学的観点から、紫外線や化学物質などによる DNA 損傷をヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair ; NER) 機構を用いて修復することができない疾患・遺伝性光線過敏症に分類することができる。細胞には紫外線などで DNA が損傷を受けた際、DNA 損傷を修復し遺伝情報を維持する NER 機構がある。NER には転写と共役した

(transcription-coupled repair; TCR)機構と全ゲノム(global genomic repair; GGR)機構の2つ: TCR-NER と GGR-NER がある。CS では、TCR-NER が選択的に障害されている。活発に転写されている遺伝子はより正確にすばやく修復される必要があるという点で、TCR-NER は正しい遺伝情報の保持のために非常に重要な機構である⁹。

CS の遺伝形式は常染色体劣性遺伝である。CS は遺伝学的に Cockayne syndrome type A; CSA (MIM 216400) と Cockayne syndrome type B; CSB (MIM 133540) に大別される。各々の原因遺伝子は、CSA は *ERCC8* (Excision Repair Cross-Complementation Group 8) (MIM 609412)、CSB は *ERCC6* (Excision Repair Cross-Complementation Group 6) (MIM 609413) である。CS が CSA と CSB に分けられることは、細胞融合法による遺伝的相補性試験によって明らかにされた^{10,11}。この内、CSB が CS 全体の 80% を占める。*ERCC6* は染色体 10q11 に位置し、*ERCC6* 遺伝子産物は 1493 個のアミノ酸から成る 168kDa のタンパク質である。このタンパク質は DNA 損傷部位を認識し損傷部位で停止した RNA 合成酵素を修復するための因子を補充する際に必要であり転写の再開に必須である。一方 *ERCC8* は染色体 5q12-13 に位置し、*ERCC8* の遺伝子産物は 396 個のアミノ酸から成る 44kDa のタンパク質である。このタンパク質は CSB をユビキチン化する際に必要であり転写再開に必須である¹²。CSA と CSB で臨床症状に差は認められず、臨床型と原因遺伝子の関連は不明である。

CS と同じく DNA 損傷を NER によって修復することができない遺伝性光線過敏症に分類されるもうひとつの代表的疾患に色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) がある。XP の遺伝形式も常染色体劣性遺伝であり、現在まで XP-A から XP-G と XP-V (バリエーション型) の 8 相補性群が確認されている¹。日本人 XP 患者の約 50% は重症型である XP-A 群であり進行性で多彩な神経症状を合併する。次に多いのは XP-V 群であり、XP-A 群と XP-V 群で患者の 80% を占める。XP の臨床的特徴は乳幼児期から非常に強い日光過敏症を呈することである。適切な遮光をしなければ幼児期から皮膚癌を発症する。高率に皮膚癌を発症することは CS との相違点である。重症型である XPA の患者は乳幼児期から精神発達遅滞を合併し、歩行開始の遅れ言語の遅れなどが顕性化しこれらの症状は進行性である。また羞明や結膜炎などの眼症状を乳児期から、聴力障害を 7 歳頃から合併する¹³。Rapin らは臨床的に XP と CS 両方の特徴を持つ色素性乾皮症 - コケイン症候群 (XP-CS) を報告した¹⁴。XP-CS では、XPB、XPD、XPG の原因遺伝子である、*ERCC3*、*ERCC2*、*ERCC5* の変異がある¹⁴。このように CS と XP の遺伝型と臨床型の関係は複雑であり、CS と XP は病態と臨床症状に共通部分を持つことだけではなく遺伝学的にも関係の深い疾患である。

CS と XP の表現型と原因遺伝子を簡潔にまとめた（表 2）。

表 2 CS と XP の表現型と原因遺伝子

染色体	表現型	表現型のMIM	原因遺伝子	遺伝子座のMIM
5q12.1	CSA	216400	<i>ERCC8</i>	609412
10q11.23	CSB	133540	<i>ERCC6</i>	609413
9q22.23	XPA	278700	<i>XPA</i>	611153
2q14.3	XPB	610651	<i>ERCC3</i>	133510
3q25.1	XPC	278720	<i>XPC</i>	613208
19q13.32	XPB	278730	<i>ERCC2</i>	126340
11q11.2	XPE	278740	<i>DDB2</i>	600811
16q13.12	XPB	278760	<i>ERCC4</i>	133520
13q33.1	XPG	278780	<i>ERCC5</i>	133530
6q21.1	XPV	278750	<i>POLH</i>	603968

(3) CS の診断方法

臨床的に CS が疑われた場合、患者皮膚由来培養線維芽細胞を用いて以下の検査を行い確定診断へと導く。

① DNA 修復試験

紫外線照射後の不定期 DNA 合成能測定 (unscheduled DNA synthesis; UDS) と紫外線照射後の RNA 合成能測定 (recovery of RNA synthesis; RRS) がある。UDS は患者細胞に紫外線を照射後、³H チミジンの核内への取り込みをオートラジオグラフィで検出する。これはヌクレオチド除去修復の中で全ゲノム修復を意味しており、この系が維持されている CS 細胞では UDS は正常である。RRS では、患者細胞に紫外線照射後、³H ウリジンの核内への取り込みをオートラジオグラフィで検出する。CS 細胞は、ヌクレオチド除去修復のうち転写共役修復系に異常があるため、³H ウリジンの取り込みは低下する。

②紫外線感受性試験

種々の線量で紫外線を照射した CS 患者細胞のコロニー形成能を評価する方法である。CS 患者は紫外線に極めて高感受性であり低線量でもコロニー形成能が低下する。

③相補性試験

従来は細胞融合法が用いられていたが、現在は迅速性、簡便性、感度などに優れたプラスミド宿主細胞回復能を指標にした CS 相補性試験が一般的である。

④遺伝子検査

CS では、遺伝型・表現型の関連性が明確ではなく遺伝子検査は必須ではない。CS 遺伝子変異にホットスポットがないため、CSA あるいは CSB 全エクソンの直接シーケンスを実施する。

⑤最終診断

種々の臨床所見と以上述べた検査結果をふまえて最終診断をおこなう。

もっとも重要なのは臨床所見であり、前述したように CS の典型的な症状は幼児期に顕性化してくるため、小児科医の役割は重要である。

(4) 睡眠障害と体温調節障害

CS など脳障害のある患者では、睡眠障害と体温調節障害を合併することがすでに報告されており^{6,7,8}、患者だけではなく、患者家族の生活の質を大きく低下させる一因となっている。しかしながら、脳障害のある患者に睡眠障害と体温調節障害が合併する原因は、現在までほとんど解明されていない。

体温は、脳・心臓・肝臓などの重要臓器が存在する体の中心部温度である深部体温と末梢皮膚温に 2 大別される¹⁵。この内、深部体温は環境温が変化しても容易に変動しないように自律神経系によって調節されており、成人ヒトでは代謝活動に最適な 37℃に保たれている。末梢皮膚温は環境温に左右され、また深部体温を一定にするため変動する。体温調節の最高位中枢は、視索前野/前視床下部 (preoptic area/ anterior hypothalamus ; PO/AH) であり、延髄、脊髓、腹部内臓、皮膚などの生体各所にある温度受容器から情報を受け取っている。また PO/AH 自体も温度感受性を有する。生体において重要な温度感受性部位は、深部体温モニターとしての PO/AH と環境温モニターとしての末梢皮膚温である。生体では生命活動に必要な酸化過程によって常に熱が発生しているが、熱は主に体表面の皮膚から物理的に失われる。熱産生量と熱放散量が平衡を保ったときに深部体温は一定となる。また、体温は早朝に最低体温となりその後上昇し日中は高く保たれた後、夜間は低下する概日リズムを形成している¹⁶。その変動幅は狭く 0.5~1℃程度である。深部体温のリズム位相は視床下部にある視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus ; SCN) の概日リズム位相を反映している。SCN は自律神経系のリズム中枢と考えられており、末梢血管など全身の自律神経系効果器官にリズム信号を送っている。交感神経系が活発な昼間には血管は収縮し、副交感神経系が優位になる夜間には血管は拡張する。末梢血管が拡張し放熱量が増えることで深部体温は低下する。

一方、睡眠・覚醒調整の最高位中枢も視床下部にある SCN である。SCN には睡眠・覚醒の調節を担う神経核群が存在しフィードバック回路を形成している。SCN からこれらの神経核群に概日リズムが入力され、24 時間周期の睡眠・覚醒リズムが形成される。ヒトをはじめ哺乳類は、SCN が昼夜の明暗サイクル

に同調して概日リズムを形成している。このように SCN は、体温調節や睡眠・覚醒調節をおこなっているが、他にも神経活動、ホルモン分泌、免疫能、血圧など生体の様々な概日リズムを調整し、生命活動に影響を与えている。睡眠・覚醒調整には SCN だけではなく、マイネルト基底核 (basal nucleus of Meynert; NbM) と脚橋被蓋核 (pedunculo pontine tegmental nucleus; PPN) の関与も重要である。また液性因子として松果体から分泌されるメラトニンが重要である。

(5) 睡眠障害とメラトニン

現代人にとって不眠症は大きな問題となっており、40%以上の人々が睡眠の問題を有していると言われている¹⁷。メラトニンが睡眠に影響していることは、1958 年に Lerner によって初めて報告され¹⁸。その後 2005 年に臨床実験でメラトニンの睡眠作用が確定された¹⁹。メラトニンはヒトを含めた全ての脊椎動物において松果体で合成される。メラトニンの前駆物質はセロトニンである。セロトニンはアリルアルキルアミン N-アセチルトランスフェラーゼ (arylalkylamine N-acetyltransferase; AANAT) 酵素によりアセチル化され N-アセチルセロトニン (N-acetylserotonin) となり²⁰、N-acetylserotonin はヒドロキシインドール O-メチルトランスフェラーゼ (hydroxyindole O-methyltransferase; HIOMT) 酵素によりメラトニンに変換される。メラトニン産生は昼間に低く夜間に高いが、その調整も視床下部の SCN でおこなわれている²¹。ゆえに SCN は脳内時計とも称されるが、SCN を制御しているのは光刺激である。光刺激が SCN とメラトニン合成にどのように関係しているかは最近 10 年間でしだいに明らかになってきた²²。網膜上には視覚に関与する視細胞 (桿体、錐体) の他に光受容体があり、内因性光感受性網膜神経節細胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cell; ipRGC) といわれている。ipRGC はメラノプシンという光受容物質を含んでおり、ipRGC からの軸索突起は網膜視床下部路を通じて SCN に到達し、さらに視床下部の室傍核 (paraventricular nucleus ; PVN)、胸髄中間質外側部 (intermediolateral cell column; ILCC)、上頸神経節 (superior cervical ganglion; SCG) とシナプスを介して松果体に到達する。セロトニンからメラトニンへの変換は、前述したように AANAT 酵素活性に依存しているが、SCN から松果体に至る一連の神経路は抑制ニューロンを介しているため、SCN 活性が光刺激によって駆動されている日中は AANAT 活性が抑制されメラトニン合成は低下する。逆に夜間は AANAT 活性が亢進しメラトニン合成が促進される。このように光刺激は視覚活動の他に概日リズムにも重要な役割を果たしている。また、メラトニンは睡眠及び概日リズム調整の他にも血管運動のコントロールや抗酸化能も有している

多機能物質である。

メラトニンは主に肝臓で代謝される。メラトニン C6 部位が水酸化され、6-サルファトキシメラトニン (6-sulphatoxymelatonin; 6-SM) として尿中に排泄される²³。メラトニンの解析は、血清中や唾液中のメラトニン濃度の直接測定や尿中メラトニン代謝産物、尿中 6-SM 測定で評価されてきた²⁴。一般にメラトニン分泌は年齢と共に低下し、夜間のピークは失われる²⁵。これまで、自閉症や注意欠陥多動性障害 (attention-deficit hyperactivity disorder; ADHD) など様々な発達障害の患者で尿中 6-SM が測定されているがその結果は一定ではない^{26,27,28}。また、林らは重症心身障害児・者における尿中メラトニン代謝産物をエライザ法 (enzyme-linked immunosorbent analysis; ELISA) で測定し、重症者ではメラトニン代謝が障害されていることを報告した²⁵。現代社会においては、夜間の人工的な光や夜間勤務の必要性などが体内時計の機能を変化させる要因のひとつになっており、健常者もメラトニン欠乏を来している可能性がある。

(6) CS の病理所見

CS 患者の剖検では末梢神経、中枢神経の両方に様々な病理学的所見が報告されている。網膜色素変性、視神経萎縮、脳重量低下、斑状の髄鞘脱落、白質容量の減少、基底核石灰化、神経脱落とグリオーシスを伴った小脳萎縮などである^{29,30}。林らは病態に共通部分を持つ疾患である XP-A の剖検脳で、NbM と PPN におけるアセチルコリンニューロン (acetylcholine neurons; AchNs) の選択的減少を見出し報告している^{31,32}。今回、CS 患者の剖検脳で、NbM と PPN の AchNs についてはじめて検討をおこなった。

(7) コケイン症候群の社会的背景

平成 26 年 5 月に、「難病の患者に対する医療等に関する法律―難病法」が制定された。この中で、難病は、「発症の機構が明らかでなく、かつ、治療方法が確立していない希少な疾病であって、当該疾病にかかることにより長期にわたり療養を必要とすることとなるものをいう」と定義された。さらに、難病の中から、患者数が本邦の中で一定人数に達しないこと (人口の 0.1% 程度以下)、客観的な診断基準が確立していること、良質かつ適切な医療の確保を図る必要性が高い疾病を、「指定難病」と定義し、医療費助成の対象とした³³。平成 26 年の段階では、コケイン症候群は指定難病に認定されなかったが、翌平成 27 年 5 月、厚生科学審議会疾病対策部会で 196 疾患が追加承認された際に指定難病に認定された。日本における現在の指定難病の対象疾病数は 306 に増えたが、ヨーロッパでは約 6000 の希少疾患が登録されており、まだ不十分であると考えら

れる。難病法と同時に児童福祉法も一部改訂され、「改定児童福祉法」が成立し、平成 27 年 1 月 1 日から新たな義務的経費に基づく小児慢性特定疾病対策事業が施行された³⁴。コケイン症候群は平成 26 年 7 月にはすでに小児慢性特定疾患の認定を受けているが、さらに、平成 27 年 7 月からは、障害者総合支援法の対象疾病に加えられた。日本コケイン症候群ネットワークは CS 患者とその家族をサポートする目的で 1996 年に設立された CS 患者とその家族の会であり、今回の指定難病認定の際も要望書提出などの活動をおこなった。患者と家族が孤立しないようさまざまな相談窓口となり、また CS の社会的認知度上昇に向けた活動をおこなっている。このように徐々に福利厚生は整ってきているが、患者数の少なさや疾患認知度が社会的に低いことから、CS 患者とその家族にはいまだ多くの社会的制約がある。

(8) 本研究の意義

今回、CS 患者における睡眠障害の病態を解明するために、先ず睡眠障害に関するアンケート調査を日本コケイン症候群ネットワークを通じて行い、実態調査を行った。次に、CS 患者の早朝尿検体を用いてメラトニン代謝産物である 6-SM を ELISA 法で測定した。さらに、CS 症例の剖検脳で視床下部・NbM・PPN の免疫組織化学的検討を行った。その結果、CS 患者は睡眠障害を合併しており、CS 患者はメラトニン代謝が異常であること、CS 患者の脳内における AchNs が選択的に減少していることが明らかになり、これらの所見が CS 患者の睡眠障害に関係している可能性が見出された。CS は臨床的な多彩さに加え、学術的にも未知の領域が多く解明すべき点が数多く残っている疾患である。CS 患者における睡眠障害の病態を探ることは、CS 患者や他の脳障害患者とその家族の生活の質を大きく低下させている睡眠障害に対する治療法を考案できる可能性があり、重要な研究であると考え。また現代社会における健常者が抱える睡眠の問題や概日リズムの乱れに対しても、解決の糸口となり得る重要な研究であると考え。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

AANAT:	arylalkylamine N-acetyltransferase
AchE:	acetylcholinesterase
AchNs:	acetylcholine neurons
ADHD:	attention-deficit hyperactivity disorder
CD:	calbindin-D28K
Cre:	creatinine
CS:	Cockayne syndrome
CSA:	Cockayne syndrome type A
CSB:	Cockayne syndrome type B
DRPLA:	dentatorubral-pallidoluysian atrophy
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent analysis
ERCC6:	Excision Repair Cross-Complementation Group 6
ERCC8:	Excision Repair Cross-Complementation Group 8
GFAP:	glial acidic fibrillary protein
GGR:	global genomic repair
HIOMT:	hydroxyindole O-methyltransferase
ILCC:	Intermediolateral cell column
ipRGC:	intrinsically photosensitive retinal ganglion cell
MAP 2:	microtubule-associated protein 2
NbM:	basal nucleus of Meynert
NER:	nucleotide excision repair
OxA:	orexin A
PO/AH:	preoptic area/ anterior hypothalamus
PPN:	pedunculopontine tegmental nucleus
PVN:	paraventricular nucleus
RRS:	recovery of RNA synthesis
SCG:	superior cervical ganglion
SCN:	suprachiasmatic nucleus
SD:	standard deviation
6-SM:	6-sulphatoxymelatonin
TCR:	transcription-coupled repair
TH:	tyrosine hydroxylase

UDS: unscheduled DNA synthesis

VP: vasopressin

XP: xeroderma pigmentosum

方法

対象と方法

1) アンケート調査

日本コケイン症候群ネットワークの協力を得て、CS 患者 10 家族に対し紙ベースでのアンケート調査を行った。アンケートは、現在の運動能力、視力障害・聴力障害の有無、睡眠障害・体温調節障害の有無など 13 項目の質問から構成し、個人情報保護の観点から、氏名は全て匿名化し個人特定ができないように配慮した。アンケート用紙は、日本コケイン症候群ネットワークを通じて患者家族に郵送した。実際のアンケート用紙を下記に示した。倫理的配慮に関しては後述する。

コケイン症候群の睡眠に関するアンケート

コケイン症候群では、時に睡眠の問題が見られ生活の質に影響を及ぼすことがあります。その実情は十分検討されていません。今回、厚生労働省の班会議を通じて睡眠に関するアンケート調査を行うことにしました。

ご協力いただけても不利になることはありませんし、個人情報には十分留意致します。また、本調査で得られた結果はコケイン症候群の診療・研究にのみ用い、その他の目的に使用することはありません。

以下の設問に対して、あてはまる項目に○をお付けいただくとともに、「その他」への記載をお願いします。

1) お子さんの年齢 () 歳 男性 ・ 女性

2) 現在の運動機能（複数回答可）

独歩 介助歩行 ずりばい 座位 ねがえり 自力での移動不可能

3) コミュニケーション

会話が可能 単語のみ 感情表現のみ 明らかな表情の表出がみられない

4) 聴力障害

なし 軽度 重度（ 補聴器使用 あり なし ）

5) 視覚障害

なし 軽度 ほとんど見えない

6) 身体的問題（複数回答可）

腎障害： なし 軽度 重度（ 透析治療なし 腹膜透析中

血液透析中	()
医療的ケア：	なし 経管栄養 導尿 気管切開 その他 ()
7) 睡眠の問題はありますか？	
いいえ	* 8) 以下にお進み下さい
はい	(複数回答可)
日中眠気が強い なかなか眠れない 中途覚醒が多い (回/夜) 早朝覚醒が多い 起こすのが大変 その他 ()	
8) 入眠時間 (平均で結構です)	() 時頃 ~ () 時頃 *時刻は 24 時間制で表記下さい
9) 起床時間 (平均で結構です)	() 時頃 ~ () 時頃 *時刻は 24 時間制で表記下さい
10) 昼寝の回数 (平均で結構です)	() 回 ~ () 回 *ない場合は 0 回でお願いします
11) 睡眠の問題に対して薬の服用を含む何らかの対処をされていますか	
いいえ はい (内容：	()
12) 体温調節の問題はありますか？	
いいえ	* 13) にお進み下さい
はい	(複数回答可)
低体温 (いつも 時々) 風邪でなくてもよく熱発する 体温が激しく上下する その他 ()	
13) その他、お気づきの点があれば自由にご記載下さい	

2) 尿中 6-sulphatoxymelatonin (6-SM) の測定

早朝尿は夜間に分泌されたメラトニンを反映している²⁴ため、尿中 6-SM の測定は早朝尿を用いた。他院でフォロー中の 9 人の CS 患者 (年齢は 4 歳から 31 歳) から 11 の尿検体を採取した。8 人の XP-A 患者 (年齢は 7 歳から 29 歳) から 8 検体を採取した。8 人の XP-A 患者は、睡眠障害、体温調節障害ともに認めなかった。尿検体を採取した 9 人の CS 患者の一部は、アンケート調査での CS 患者と一致していたが、アンケート調査の匿名性から厳密に一致させることはできなかった。また、慢性疾患に罹患していず睡眠障害も有していない、年齢を一致させた健常者 9 人から尿検体を採取し正常コントロールとした。CS の患者プロフィールを表に示した (表 3)。

表 3 尿検体を採取した CS 患者プロフィール

症例	年齢/性別	運動能力	臨床型	遺伝子型	睡眠障害	体温調節障害
1	4歳/男性	不明	I	検査未	不明	不明
2	4歳/男性	不明	I	CSB	無し	無し
3	6歳/女性	不明	I	CSB	有り	有り
4	8歳/女性	介助歩行	I	検査未	有り	無し
5	10歳/男性	不明	I	検査未	不明	不明
6	11歳/女性	介助歩行	I	検査未	有り	無し
7	21歳/男性	不明	I	CSB	有り	有り
8	31歳/女性	車いす	III	不明	有り	無し
9	31歳/女性	車いす	III	不明	有り	無し

日本ではCS遺伝子診断が一般的ではない。遺伝子型が確定されているのは3名である。睡眠障害は情報が得られた7名中6名の患者で認められた。

尿中 6-SM 測定には GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA, USA) の ELISA 法測定キットを用いた。結果は、同時に同検体で測定した尿中クレアチニン値で補正した。補正後の測定値は、平均値と標準偏差で示した。データ解析には、Stat Flex statistical program, version 6 (Aretech Co., Ltd., Osaka, Japan) 統計ソフトを用いた³⁵。CS、XP-A、コントロール間の3群比較にはノンパラメトリック検定である Kruskal-Wallis test を用いた。また、それぞれ2群間の比較には、Mann-Whitney U-test を用いた。

3) 剖検脳の免疫組織化学的検討

臨床症状ならびに患者細胞での DNA 修復試験、紫外線感受性試験により、CS と確定診断された4症例（年齢7歳から35歳）の剖検脳を用いた。これら4症例は、アンケート調査をおこなった10名のCS患者ならびに尿検体を採取した9名のCS患者とは一致していない。また、中枢神経系に何ら病変を持たない6例（年齢4ヶ月から38歳）の剖検脳をコントロールとした。剖検した4症例のプロフィールを表に示した（表4）。

表 4 剖検 4 症例のプロフィール

症例	年齢/性別	睡眠障害	体温調節障害	死因
1	7歳/女性	無し	低体温	肺炎
2	18歳/男性	無し	低体温	喘息重責発作
3	18歳/男性	無し	低体温	腎不全
4	35歳/女性	入眠困難	高体温	悪性症候群

CS の剖検 4 症例は、アンケート調査をおこなった 10 名の CS 患者ならびに尿検体を採取した 9 名の CS 患者とは一致していない。睡眠障害を 1 例で体温調節障害を全例で認めた。

ホルマリン固定された冠状断の脳標本を部位ごとに切離し、パラフィン包埋した。視床下部を含む間脳と PPN を含む中脳下部において、厚さ 6 μ m の連続切片を作成した。avidin-biotin-immunoperoxidase complex method (DAB 発色) 法による免疫組織化学染色 (ニチレイバイオサイエンス社製シンプルステイン MAX-PO (M) キット) を用い、一次抗体には、マウスモノクローナル抗体を使用して行った。パラフィン包埋された検体をキシレンで脱パラフィン化した。内因性ペルオキシダーゼ活性を 0.3%過酸化水素加メタノールに 30 分間浸透で抑制し、標識抗体の非特異的吸着を防ぐために、ウサギ血清と室温で 10 分間反応させた。その後、それぞれの抗原に対するマウスモノクローナル抗体を 4℃で 2 日間反応させた。ついで、アビジン標識抗マウス抗体 (ビオチン化ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体) と 37℃20 分間反応させた。ビオチン、DAB を室温で添加し発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。抗原提示のない箇所では、抗原抗体反応がおこらず染色性がないことをあらかじめすべての検体で確認した。

本研究の解析では、微小管結合タンパク質 2 (microtubule associated protein 2; MAP2)、グリア線維性酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein; GFAP)、アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholine esterase; AChE)、チロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase; TH)、カルビンディン D 28k (calbindin D 28k; CD)、バソプレッシン (vasopressin; VP)、オレキシン A (orexinA; OxA) に対する抗体を免疫組織化学染色における 2 次抗体として用いた。

MAP2 は神経細胞、樹状突起に存在する微小管結合タンパク質であり、神経細胞のマーカーである。GFAP はアストロサイトの細胞体および突起に存在する中間径フィラメントタンパク質である。AChE はアセチルコリン分解酵素で AChE 含有細胞を特異的に同定するためコリン作動性神経のマーカーである。TH はチロシンから L-dopa を合成する酵素で TH 含有細胞を特異的に同定するためドパミン作動性神経のマーカーである。CD はカルシウム結合タンパク質で成熟神経細胞、樹状突起、軸索を特異的に同定し GABA 系介在神経のマーカーである。VP は バソプレッシン含有細胞を特異的に同定する。OxA は睡眠覚醒調整にも影響を与えるオレキシン含有神経細胞を特異的に同定する。各々の 2 次抗体の詳細と稀釈倍率を以下に示した。

MAP2; EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA. 1:100

GFAP; Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan. 1:1

AchE; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA. 1:250

TH; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA. 1:400

CD; Leica Microsystems Ltd., Milton Keynes, UK. 1:100

VP; Biomeda Corporation, Foster City, CA, USA. 1:100

OxA; Nuclea Diasnostic Laboratories LLC, Cambridge, MA, USA. 1:100

4) 剖検脳の免疫組織化学的検討

視床下部の視索上核、室傍核、腹内側核の神経細胞に対して、TH 染色を行った。また視床下部外側で VP 染色、腹内側核で OxA 染色をおこなった。

NbM の位置は淡蒼球腹側の CD に対する染色性で同定した。AchE 陽性の神経細胞数を目視的にカウントした。PPN はすでに報告があるように³²、中脳下部における上小脳脚吻側と内側毛帯背外側の位置で同定した。PPN は比較的大型の神経細胞で構成される緻密部 (pars compacta) と緻密部よりも広範囲に及ぶ分散部 (pars dissipata) に分かれる。緻密部において、MAP2, AchE, TH, CD 陽性の神経細胞数を 2 連続切片で正確に核小体が同定されたときのみ神経細胞と同定し、カウントした。また、MAP2 陽性細胞に対する AchE, TH, CD 陽性の細胞数をそれぞれカウントし、比率 (%) を求めた。すべてのデータは平均値と標準偏差で示し、統計学的解析には Stat Flex statistical program version 6 を用いた³⁵。CS 剖検脳とコントロール剖検脳での 2 群間のデータ解析には、Mann-Whitney U-test を用いた。

5) 倫理的配慮

アンケート調査、尿中 6-SM 測定、剖検脳を用いた免疫組織化学的検討を含む本研究のすべてにおいて、患者家族からインフォームドコンセントを得た。また、本研究は、東京都医学総合研究所倫理審査委員会の承認を受けて行った。

結果

1) アンケート調査結果

アンケートは送付した 10 人の CS 患者家族全員から回答を得た。結果を表 5 に示した。運動機能としては患者全員が移動可能だった。患者 4 を除く 9 人に聴覚障害があり、白内障や網膜色素変性症のために 10 人全員が視覚障害を有していた。睡眠障害は、日中の眠気や中途覚醒、熟眠障害 など 6 人の患者に認められた。起床時間と就寝時間のずれが患者 3 と 7 に認められた。表には示していないが、患者 8 には、睡眠薬服用の既往があるが効果はなかった。低体温、高体温、変温性の体温調節障害は 7 人の患者に認められ、そのうちの 5 人は末梢循環障害を合併していた。患者 2, 3, 7, 8 は睡眠障害と体温調節障害の両方を合併していた。患者 9, 10 でみられた熟眠障害は、不穏・興奮による頻回の覚醒を意味していた。

表 5 アンケート調査結果

症例	年齢/性別	運動能力	感覚障害		起床時間	就寝時間	午睡 (回数/日)	睡眠障害	体温調節 障害	末梢循環 障害
			聴覚	視覚						
1	4歳/男性	介助歩行	1+	1+	6:00-7:00	19:00-21:00	1	無し	無し	無し
2	5歳/女性	介助歩行	2+	1+	6:00-7:00	20:00-21:00	1	日中の眠気	低体温	有り
3	6歳/女性	介助歩行	2+	1+	7:00-10:00	20:00-21:00	1-2	覚醒困難	高体温	無し
4	7歳/男性	介助歩行	(-)	1+	6:00-7:00	21:00-22:00	1	無し	変温性	有り
5	9歳/男性	はいはい	2+	1+	6:00-7:00	21:00-22:00	1	無し	変温性	有り
6	10歳/女性	はいはい	2+	1+	7:00-8:00	23:00-0:00	1	無し	低体温	有り
7	12歳/女性	いざり	2+	1+	4:00-9:00	23:00-3:00	1	入眠・覚醒困難	変温性	有り
8	21歳/男性	車いす	2+	1+	6:00-8:00	20:00-22:00	0-1	中途覚醒	変温性	無し
9	31歳/女性	車いす	1+	1+	7:00-8:00	19:00-20:00	0-1	熟眠障害	無し	無し
10	31歳/女性	車いす	1+	1+	7:00-8:00	19:00-20:00	1	熟眠障害	無し	無し

表中の、(-) は無し 1+は有り を示している。

聴覚障害では、1+は、補聴器を使用すれば聴こえるレベル、2+は補聴器を使用しても聴こえないレベルを示している。

2) 尿中 6-SM 測定結果

コントロールの尿中 6-SM は、 103.2 ± 83.4 ng/mg Cre (平均値±標準偏差) であったのに対し、CS 患者では、 15.7 ± 8.5 ng/mg Cre と極めて低値だった。XP-A 患者では、 56.7 ± 89.6 ng/mg Cre だった。Kruskal-Wallis test でコントロール、CS、XP-A 間の 3 群間に統計学的有意差があることを確認した ($p=0.001279$)。次に各々 2 群間での統計学的有意差を Mann-Whitney U-test

で検定し、CS 患者の尿中 6-SM 値はコントロール群に比べて有意に低値であることを確認した($P<0.001$)。XP-A 患者の尿中 6-SM 値も低値であったが、値のばらつきが大きいため XP-A とコントロールとの間に有意差は認められなかった。

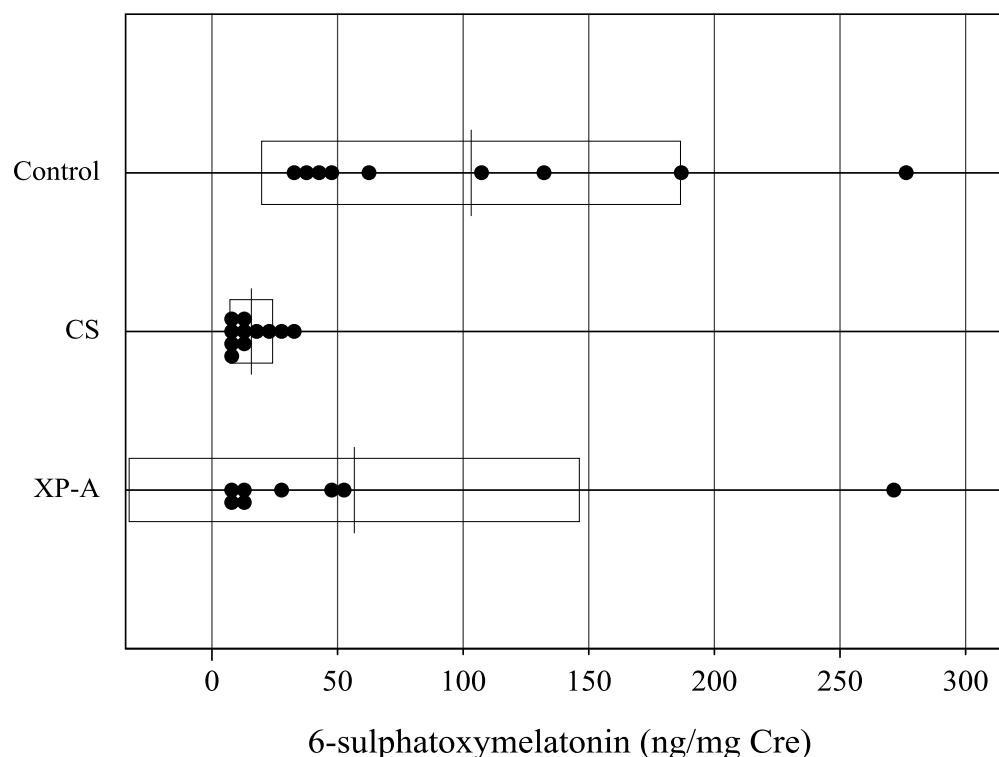


図 2 コントロール、CS、XP-A における尿中 6-SM 結果

垂直線は平均値を示し、四角は正負の標準偏差幅を示している。
CS で有意な低値が認められた。

3) 剖検脳での免疫組織化学的検討

睡眠障害と体温調節障害の有無に関わらず、剖検した CS の 4 症例全例で、TH 陽性の神経細胞が視床下部の視索上核、室傍核、腹内側核で同定された (表 6、図 2A)。また、視床下部外側で VP 陽性の神経細胞が 2 症例で、腹内側核で OxA 陽性の神経細胞が 3 症例で同定された (表 6、図 2B)。免疫染色陽性神経細胞数は一定ではなく減少している例もあった。重度の脳萎縮のために、SCN と松果体は 4 症例全例で同定できなかった。視床下部核が比較的保たれている

のに対し NbM では、AchNs 総数は、コントロールでは 91.7 ± 25.7 個だったが、CS 症例ではまったく同定できず、統計学的に有意に減少していた ($P < 0.01$)。

表 6 視床下部における免疫組織化学的検討

症例	年齢/性別	脳重量	TH陽性神経細胞		VP陽性細胞	OxA陽性細胞
			視索上核/室傍核	腹内側核	視床下部外側	腹内側核
1	7歳/女性	260g	2+	1+	1+	2+
2	18歳/男性	400g	2+	1+	1+	1+
3	18歳/男性	414g	1+	1+	n/A	(-)
4	35歳/女性	810g	2+	1+	n/A	1+

2+、1+、(-) はそれぞれ 免疫染色陽性の神経細胞数が、多数である、少数である、同定されない を示している。n/A : not assessed

A

B

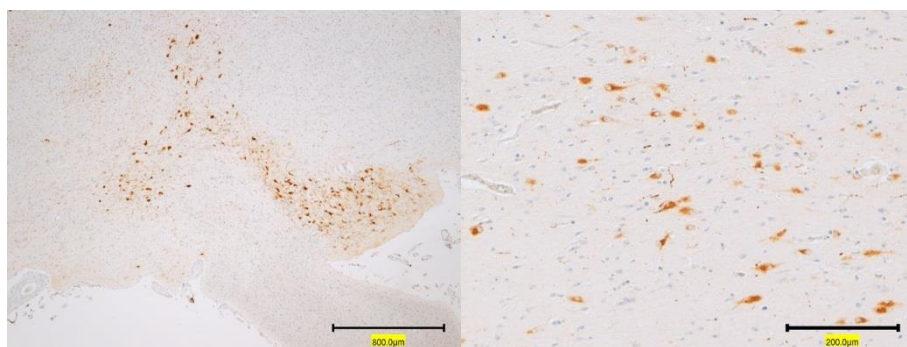


図 2 視床下部における免疫組織化学染色

A は、18 歳の CS 男性剖検例（表 4、6 の 症例 2）である。視索上核に、TH 陽性の神経細胞を多数認める。 Bar=800μm。

B は、7 歳の CS 女性剖検例（表 4、6 の 症例 1）である。腹内側核に OxA 陽性の神経細胞を認める。 Bar=200μm。

一方、PPN では、MAP2 陽性の神経細胞数は、CS 症例ではコントロールの約半数であり有意に減少していた ($p < 0.01$)（表 7）。また、GFAP 陽性のアストロサイトが軽度増加していた（図 3A）。AchN 陽性の AchNs の総数と比率 (%)

は CS 症例で有意に減少していた ($p<0.01$) (表 7)。一方、TH と CD 陽性の神経細胞は、比較的良好に保たれていた (表 7 図 3B)。

表 7 PPN における定量的解析

免疫組織染色	コントロール (平均 (標準偏差))	コケイン症候群 (平均 (標準偏差))	マン・ホイットニ検定 (p 値)
Microtubule associated protein 2	243 (41)	124 (27)	<0.01
Acetylcholine esterase	68 (16)	1 (1)	<0.01
(%)	29 (9)	1 (1)	<0.01
Tyrosine hydroxylase	25 (13)	19 (5)	ns
(%)	10 (5)	15 (5)	ns
Calbindin-D28K	27 (17)	19 (7)	ns
(%)	11 (6)	16 (4)	ns

CS では MAP2 陽性の神経細胞数はコントロールの約半数であり有意に減少していた。AchN 陽性の AchNs の総数と比率 (%) は CS 症例で有意に減少していた。ns: not significant

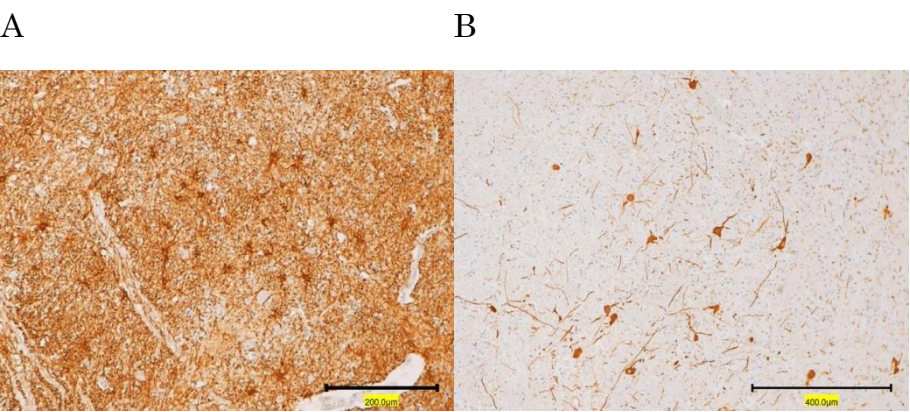


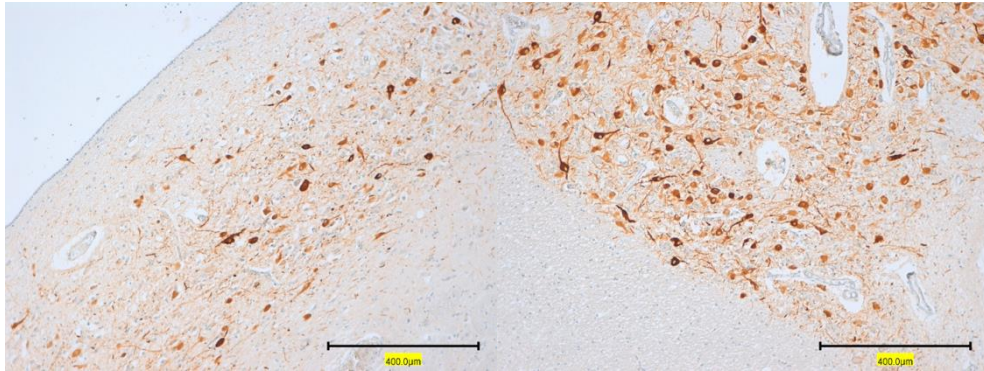
図 3 CS 剖検脳 PPN における免疫組織化学染色

A は、18 歳の CS 男性剖検例 (表 4、6 の症例 2) である。GFAP 陽性のアストロサイトが増加している Bar=200 μ m。
B は、18 歳の CS 男性剖検例 (表 4、6 の症例 3) である。TH 陽性の神経細胞が比較的良好に保たれている Bar=400 μ m。

図 4 は、29 歳男性コントロール剖検脳視床下部における免疫組織化学染色である。TH 陽性神経細胞を室傍核、視索上核に多数認め、視床下部に接して CD 陽性神経細胞をマイネルト核に多数認めた。

A

B



C

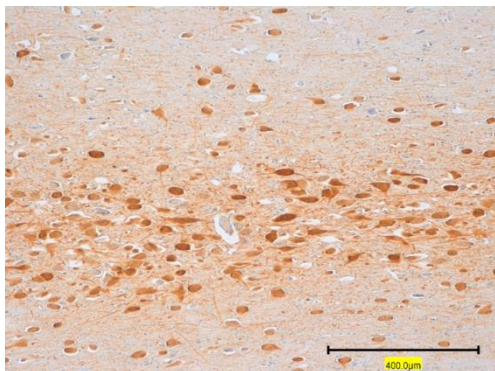


図 4 29 歳男性コントロール剖検脳視床下部における免疫組織化学染色

AB TH 陽性の神経細胞が多数存在する Bar=400μm

A 室傍核 B 視索上核

C CD 陽性の神経細胞が多数存在する

C マイネルト核

Bar=400μm

考察

コケイン症候群患者の睡眠障害と体温調節障害については、これまで総括的に検討されたことはなく、本研究が初めての報告である。

睡眠障害の病態を解明するために、先ず、日本コケイン症候群ネットワークを通じて CS 患者家族に対し紙ベースでのアンケート調査を行った。アンケート調査の結果、回答が得られた 10 人中、半数以上の 6 人の患者で睡眠覚醒リズムのずれ、頻回の夜間覚醒、日中の眠気などの睡眠障害があることが明らかになった。睡眠障害を有するこれらの CS 患者の運動機能は一定ではなく、また全員に聴覚障害と視覚障害があったことから、睡眠障害と運動機能障害・聴覚障害・視力障害との関係は明確にはできなかった。さらに、7 人の CS 患者に体温調節障害（低体温・変温症・高体温）が認められ、体温調節障害と末梢循環障害を合併している例もあった。4 人の CS 患者では睡眠障害と体温調節障害を合併していた。以上のアンケート調査結果から、睡眠障害と体温調節障害は、CS 患者における主要な健康上の問題と捉えるべきである、と考えられた。

早朝尿中 6-SM の測定結果では、尿中 6-SM 分泌は CS 患者ではコントロールに比べて有意に低下していた。XP-A 患者も低下していたが、コントロールとの間で有意差はなかった。メラトニンは睡眠覚醒リズム、神経内分泌、体温調整など、ヒトの概日リズムに非常に重要な役割を有している。メラトニン分泌の異常は様々な睡眠障害に関係しており、就寝時間と起床時間のずれ、睡眠中の頻回覚醒などが報告されているが³⁶、CS 患者 3、7、8 では同症状が認められた。患者 9、10 でみられた不穏・興奮も睡眠中の頻回の覚醒を反映していると考えられる。CS 患者で明らかになった尿中 6-SM 分泌低下は、アンケート調査で明らかになった CS 患者では睡眠障害があるという臨床所見と一致した。XP-A 患者は尿中 6-SM の低下が CS ほど顕著ではなかったが、XP-A 患者は睡眠障害が CS ほど重度ではない。このことも尿中 6-SM 値が臨床所見と一致していることを示していると考えられる。メラトニン分泌は年齢とともに徐々に低下するため²⁵、CS 患者での尿中 6-SM の顕著な低下は早老症の徴候であるとも考えられるが、Hutchinson-Gilford 早老症候群や Werner's 症候群のような他の早老症では、睡眠障害の報告はほとんどない³⁷。最近、尿中 6-SM 分泌は自閉性障害や多動性障害などの小児期の発達障害患者でも検討されている^{26,27,28}が、その結果は一定ではない。今回の研究では、尿の 24 時間にわたるサンプリングは行っていない。今後、尿中 6-SM 分泌の日内変動を検討することは、CS 患者におけるメラトニン代謝の障害を解明するため重要であると考えられる。また、今回、重度の脳萎縮のため同定することができなかった視交叉上核と松果体を詳細に病理学的に検討することは、メラトニン代謝がなぜ障害されているのか

を解明するために非常に重要であると考えられる。

今回、CS と確定診断された 4 剖検脳と中枢神経系に何ら病理学的変化のない 6 剖検脳をコントロールとして、免疫組織化学的検討をおこなった。コントロール脳では TH 陽性の神経細胞を室傍核、視索上核に多数認め、視床下部に接して CD 陽性の神経細胞を NbM に多数認めた。一方 CS 剖検脳では、NbM における AchNs が顕著に減少していた。NbM に接している視床下部核は神経細胞数の減少が部分的に認められたが比較的保たれていた。NbM における選択的な AchNs の顕著な減少は、PPN でも同様に見出された。

中枢神経系において、AchNs は大きく 2 系統に分かれる。ひとつは NbM を含む前脳基底部細胞群であり、もうひとつは中脳下部に位置する PPN を中心とする細胞群である。NbM における AchNs は、大脳皮質と上行性及び下行性のつながりがあり知的発達に関係しているが、同時に睡眠・覚醒系における覚醒系ニューロンとして非常に重要である。PPN はコリン作動性神経と非コリン作動性神経を含んでおり、PPN も基底核、橋、脊髄と、上行性及び下行性のつながりがある。PPN から視床への上行性線維は、視床皮質リズムのトリガーとなっている。また、PPN からの下行性線維は、直接的に橋や内側網様体とつながり、筋緊張やロコモーションを調整している³⁸。PPN は、パーキンソン病や進行性核上性麻痺・multiple system atrophy などのパーキンソン病関連疾患における歩行異常に関係しており³⁹、最近では、PPN は、パーキンソン病の姿勢反射障害や歩行障害などいわゆる軸症状の治療に対するターゲットとなり得ると提唱されている⁴⁰。一方で PPN における AchNs は、NbM 同様に覚醒系ニューロンとして重要であり、レム睡眠中も活発に神経活動をおこないレム睡眠の発現を誘導していると考えられている。

これまでさまざまな発達期脳で、NbM や PPN における AchNs について検討されてきた。周産期障害脳では、AchNs の割合が減少している一方で、代償性にカテコラミン細胞の割合が増加していた⁴¹。Prader-Willi 症候群の患者では、PPN における AchNs は減少していたが、NbM における AchNs は比較的保たれていた⁴²。West 症候群の既往がある患者では、神経細胞数と AchNs は減少していたが、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（dentatorubralpallidoluysian atrophy: DRPLA）の患者では、AchNs の細胞数も比率（%）も減少していた⁴³。今回の分析では、CS 患者では、XP-A 患者と同様に²⁹NbM と PPN の両方で AchNs の減少を認めた。AchNs と対照的に、TH 陽性のカテコラミン細胞は、CS 患者で比較的保たれていた（図 3B、表 7）。前述したように、PPN は覚醒や REM 睡眠の調整に重要な役割を担っているため^{44,45}、PPN で AchNs が選択的に減少していることも、CS 患者の睡眠障害に関係している可能性がある。さらに、CS 患者の知的障害や、筋緊張の異常にも関係している可能性がある。

メラトニンは、自閉性障害や脳性麻痺などさまざまな発達障害の小児の概リズムを調整するために使用されてきた。メラトニンで睡眠障害が改善する例もあり、また副作用の報告はほとんどない^{46,47}。CS患者で、尿中メラトニンが減少していたことから、メラトニンを投与することでCS患者の睡眠障害が改善する可能性がある。最近では、アルツハイマー病の治療に使用されているAchEの選択的阻害剤であるドネペジルがダウン症候群の患者で試されており⁴⁸、ドネペジル投与後にダウン症候群患者における認知障害や生活レベルが改善した報告がある⁴⁹。また、5人の自閉性障害患者のREM睡眠を改善したという報告もある⁵⁰。睡眠障害には複雑な病因が関係しており、単にメラトニン代謝の異常やAchNsの選択的な減少が主要な病因であると結論付けるのは難しい。しかしながら、CS患者ではNbMとPPNにおけるAchNsが選択的に減少しているという事実は、ドネペジルがCS患者の睡眠障害に対する治療薬になる可能性がある。

結論

① 本研究で得られた新知見

- 本研究は、CS 患者の睡眠障害について包括的に検討したはじめての報告である。
- CS 患者へのアンケート調査の結果から、半数以上の患者で睡眠障害と体温調節障害が認められ、これらは CS 患者における主要な健康上の問題と捉えるべきであることがわかった。
- CS 患者の早朝尿中 6-SM は著しく低値であり、CS 患者ではメラトニン代謝異常があることがわかった。この所見は夜間の頻回覚醒などの臨床所見と一致していた。
- CS 剖検脳での視床下部神経細胞は比較的保たれていたが、正常コントロールに比べて減少している例もあった。
- CS 剖検脳での NbM と PPN における選択的な AchNs の減少は極めて特徴的な所見だった。

② 新知見の意義

- CS は非常に稀な疾患であり、現在まで患者の生活の質に踏み込んだ調査・評価は行われていないのが現状である。アンケート調査の結果から、患者とその家族が抱える睡眠障害、体温調節障害など、より具体的な問題を明らかにすることができた。
- 尿中 6-SM は今まで様々な脳障害患者で測定されているが、今回 CS 患者での測定をはじめて行った。早朝尿中 6-SM が極めて低値であったことから、CS 患者の睡眠障害に対してメラトニン投与による治療の可能性が考えられる。
- CS の視床下部および NbM と PPN における病理学的検討を今回はじめて行った。視床下部の神経細胞が比較的保たれているのに対し、NbM と PPN における AchNs の選択的で顕著な減少をはじめて確認できた。今後、CS 患者の睡眠障害に対してドネペジルを用いての治療の可能性が考えられる。

③ 本研究で得られた新知見の今後の展開

- CS 患者の睡眠障害をより詳細に解析するためには、睡眠構造の解析が必要である。今回は施行していないが、睡眠ポリグラフを行う必要がある。
- 尿中 6-SM を 1 点だけではなく 24 時間周期で測定し CS 患者の尿中 6-SM 分泌の日内変動を明らかにし、メラトニンの代謝動態をより明確にする必要がある。
- 松果体、視交叉上核の神経放射線学的及び病理学的検討を行う必要がある。
- 視床下部のさらに詳細な病理学的検討を行う必要がある。
- NbM・PPN 以外での脳内 AchNs 病変の有無を調べる必要がある。

④ 今後の課題

CS は非常に稀な疾患あり患者数も少ない。しかしながら、症状や罹患臓器は多岐にわたり、医学的見地、医療的見地からも解決すべき問題が多く残っている。本研究では CS 患者の睡眠障害の病態を検討した。研究課題は残っているがメラトニンやドネペジルを睡眠障害に対する治療に活用できる可能性が見出された。CS 患者と家族の生活向上の一助になり得ると考える。

謝辞

本論文を作成する機会を与えて下さり、御指導下さいました、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野教授・有賀 正先生に深く深謝致します。

研究計画から論文作成まで御指導頂きました、東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野 林 雅晴先生に深く感謝致します。また、アンケート調査に協力して下さいった Cokayne 症候群の患者様、御家族の皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Kraemer, K. H. *et al.* Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype–phenotype relationship. *Neurosci.* 145, 1388-1396 (2007).
2. Cockayne, E. A. Dwarfism with retinal atrophy and deafness. *Arch Dis Child.* 11, 1-8 (1936).
3. Sugarman, G.I., Landing, B. H. & Reed, W. B. Cockayne syndrome: Clinical study of two patients and neuropathologic findings in one. *Clin Pediatr.* 16, 225-232 (1997).
4. Nance, M. A. & Berry, S. A. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet.* 42, 68-84 (1992).
5. Kubota, M. *et al.* Nationwide survey of Cockayne syndrome in Japan: its incidence, clinical course and prognosis. *Pediatr. Int.* 57, 339-347 (2015).
6. Okawa, M., Takahashi, K. & Sasaki, H. Disturbance of circadian rhythms in severely brain-damaged patients correlated with CT findings. *J Neurol.* 233, 274-282 (1986).
7. Shinozaki, M., Inoue, Y., Ishizaki, A. & Sasaki, H. Circadian rhythm disturbances

- in neurological patients with chronic hypothermia. *Prog Clin Biol Res.* 341A, 213-221 (1990).
8. Hayashi, M., Inoue, Y., Iwakawa, Y. & Sasaki, H. REM sleep abnormalities in severe athetoid cerebral palsy. *Brain Dev.* 12, 494-497 (1990).
 9. Venema, J. *et al.* The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87, 4704-4711 (1990).
 10. Mallery, D.L. *et al.* Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. *Am J Hum Genet.* 62, 77-85 (1998).
 11. Henning, K. A. *et al.* The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 82, 555-564 (1995).
 12. Aamann, M.D., Muftuoglu, M., Bohr, V.A., & Stevnsner, T. Multiple interaction partners for Cockayne syndrome proteins: implications for genome and transcriptome maintenance. *Mech Ageing Dev.* 134, 212-224 (2013).
 13. 清水 宏, 光線過敏症. あたらしい皮膚科学, 中山書店, 日本, 2011, 200-201.
 14. Rapin, I. *et al.* Cockayne syndrome in adults: review with clinical and pathologic

- study of a new case. *J Child Neurol.* 21, 991-1006 (2006).
15. 柴崎 治. 体温の調節システム. *小児内科* 46, 305-309 (2014).
16. 本間 研一. 体温と睡眠の概日リズム. *日本臨床* 71, 2077-2081 (2013).
17. Van Someren, E.J. Circadian and sleep disturbances in the elderly. *Exp Gerontol.* 35, 1229-1237 (2000).
18. Lerner, A.B. *et al.* Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 80, 2587 (1958).
19. Zhdanova, I.V. Melatonin as a hypnotic. *Sleep Med Rev.* 9, 51-65 (2005).
20. Axelrod, J. The pineal gland: A neuronal transducer. *Science* 184, 1341-1348 (1974).
21. Moore, R. Y. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res.* 73, 125-130 (1996).
22. Reiter, R. J., Tan, D.X. & Fuentes-Broto, L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res.* 181, 127-151 (2010).
23. Cardinali, D.P. & Pevet, P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev.* 2, 175-190 (1998).
24. Benloucif, S. *et al.* Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med.* 4, 66-69 (2008).

25. Hayashi, M. *et al.* The combined pathological, physiological and pharmacological examinations are useful to evaluate the hypothalamic and circadian rhythm disturbances in developmental brain disorders. In, *Neuropathology: new research.* (Almeirao, E., Honrado, T., eds.) Nova Science Publishers, New York, 2012, pp. 113-124.
26. Mulder, E. J. *et al.* Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid, serotonin and 6-sulphatoxymelatonin in normoserotonemic and hyperserotonemic autistic individuals. *Neuropsychobiology* 61, 27-32 (2010).
27. Tordjman, S. *et al.* Day and nighttime excretion of 6-sulphatoxymelatonin in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1990-1997 (2012).
28. Molina-Calballo, A. *et al.* Methylphenidate effects on blood serotonin and melatonin levels may help to synchronise biological rhythms in children with ADHD. *J Psychiatr Res.* 47, 377-383 (2013).
29. Itoh, M. *et al.* Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders. *Brain Dev.* 21, 326-333 (1999).
30. Weidenheim, K.M., Dickson, D.W. & Rapin, I. Neuropathology of Cockayne syndrome: evidence for impaired development, premature aging, and

- neurodegeneration. *Mech Ageing Dev.* 130, 619-636 (2009).
31. Hirai, Y. *et al.* Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res.* 601, 171-178 (2006).
32. Hayashi, M., Ohto, T., Shioda, K. & Fukatsu, R. Lesions of cortical GABAergic interneurons and acetylcholine neurons in xeroderma pigmentosum group A. *Brain Dev.* 34, 287-292 (2012).
33. 葛原 茂樹. わが国の 新しい難病対策の歴史と新たな難病対策. 日本医師会雑誌 144, 1140-1145 (2015).
34. 大澤 真木子. わが国における小児慢性特定疾病とは. 日本医師会雑誌 144, 1160-1163 (2015).
35. Ogawa, M. *et al.* Ritodrine should be carefully administered during antenatal glucocorticoid therapy even in nondiabetic pregnancies. *ISRN Obstet Gynecol.* 2013, 120735 (2013).
36. Diethelm, K. *et al.* Longitudinal associations between endogenous melatonin production and reported sleep duration from childhood to early adulthood. *Horm Res Paediatr.* 74, 390-398 (2010).
37. Coppede, F. Premature aging syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 724, 317-321 (2012).

38. Benarroch, E.E. Pedunclopontine nucleus: functional organization and clinical implications. *Neurology* 80, 1148-1155 (2013).
39. Fling, B.W. *et al.* Asymmetric pedunclopontine network connectivity in parkinsonian patients with freezing of gait. *Brain* 136, 2405-2418 (2013).
40. Tykocki, T., Mandat, T. & Nauman, P. Pedunclopontine nucleus deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Arch Med Sci.* 7, 555-564 (2011).
41. Anzai, Y., Hayashi, M., Ohya, T. & Yokota, S. The pedunclopontine nucleus in developmental disorders of the basal ganglia. *Neuropathology.* 28, 258-263 (2008).
42. Hayashi, M., Miyata, R. & Tanuma, N. Decrease in acetylcholinergic neurons in the pedunclopontine tegmental nucleus in a patient with Prader-Willi syndrome. *Neuropathology* 31, 280-285 (2011).
43. Hayashi, M. *et al.* Lesion of acetylcholine neurons in refractory epilepsy. *ISRN Neurol.* 2012, 404263 (2012).
44. Peppe, A. *et al.* Deep brain stimulation of pedunclopontine tegmental nucleus: role in sleep modulation in advanced Parkinson disease patients one-year follow-up. *Sleep* 35, 1637-1642 (2012).
45. Xi, M. *et al.* The amygdala and the pedunclopontine tegmental nucleus: interactions controlling active (rapid eye movement) sleep. *Exp Neurol.* 238, 44-51

- (2012).
46. Rossignol, D. A. & Frye, R. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 53, 783-792 (2011).
47. Galland, B.C, Elder, D.E. & Taylor, B. J. Interventions with a sleep outcome for children with cerebral palsy or a post-traumatic brain injury: a systematic review. *Sleep Med Rev.* 16, 561-573 (2012).
48. Kishnani, P.S. *et al.* The efficacy, safety, and tolerability of donepezil for the treatment of young adults with Down syndrome. *Am J Med Genet A.* 149A, 1641-1654 (2009).
49. Kondoh, T. *et al.* Donepezil significantly improves abilities in daily lives of female Down syndrome patients with severe cognitive impairment: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Psychiatry Med.* 41, 71-89 (2011).
50. Buckley, A.W. *et al.* An open label trial of donepezil for enhancement of rapid eye movement sleep in young children with autism spectrum disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 21, 353-357 (2011).