

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

「高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明」に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 茂人

平成16 (2004) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

「高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明」

森本茂人

II. 分担研究報告

1. 高齢者肺炎易発症性に対するアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害薬の抑制効果に対するアンジオテンシンⅠ変換酵素遺伝子多型の影響の検討
森本茂人
2. 高齢者循環器疾患の易発症性に関する遺伝的負荷の解明
勝谷友宏
2. 肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者における肺サーファクタント蛋白A遺伝子状の1塩基多型に関する研究
奥野良信
4. 高齢者骨粗鬆症の易発症性に対する遺伝的負荷の解明
覚道健一
5. 高齢者痴呆の遺伝的危険因子としての遺伝子多型の解析
(高齢者神経疾患)
中橋 毅

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明

主任研究者 森本茂人 金沢医科大学老年病学・教授

研究要旨：高齢者における疾患の頻発には、加齢に伴う環境因子による障害蓄積とともに、それぞれの個体の遺伝的易発症性が重要である。成年者においては生活習慣病の発症を中心にこれらの遺伝的負荷は解明されつつあるが、高齢者におけるこれら疾患の遺伝的負荷に関する研究は行われていない。本研究においては、高齢者の肺炎、心不全、脳梗塞、脳内出血、非冬季肺炎、インフルエンザ後肺炎、骨粗鬆症に対する遺伝的負荷につき解明を進めている。

分担研究者

勝谷友宏・大阪大学加齢医学・講師

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・課長

覚道健一・和歌山県立医科大学第二病理学・教授

中橋 毅・金沢医科大学老年病学・講師

A. 研究目的

成人期の高血圧、虚血性心疾患、脳血管障害、糖尿病などの生活習慣病に対する疾患感受性遺伝子の検討は多数なされており、欧米においてはこれらの疾患の遺伝子治療の試みも行われているに至っている。一方、脳・心血管疾患、肺炎を含む高齢者疾患の遺伝的負荷の解明は進んでいない。さらに我が国においては欧米の先進諸外国とことなり、寝たきり状態が極めて高率に発症するが、寝たきりの発生そのものに対する遺伝的負荷の検討は皆無である。本研究においては我が国におけるこれらの高齢者疾患の遺伝的負荷に関し、若年者で報告されている上記既報の遺伝的危険因子の関与を検討するとともに、肺炎に対してはアンジオテンシン変換酵素、キマーゼなど咳嗽反射関連因子遺伝子多型の関与について、また寝たきりについては寝たきりに陥った直接原因疾患につき調査

し、それぞれの疾患群に於ける寝たきりの易発症性に対する遺伝的負荷についても検討を行う。本研究により得られる成果は、特定の遺伝子多型検索により各高齢者疾患発症の危険性が高い例に対し発症前の予防措置の方策を提示しえ、また早期の治療体制を整えうることから、長寿先進国である我が国および高齢化が進行する世界各国の老年者の健康・福祉の増進に資する。

B. 研究方法

関連施設老人病院受診例のうち研究計画に同意得た 4000 例を目標とした症例を対象に高齢者疾患の前向きコホート調査を行う。調査対象老年期肺疾患は、①虚血性心疾患、②心不全、③脳梗塞、④脳内出血、⑤非冬季肺炎、⑥インフルエンザ後肺炎、さらには⑦高齢者の寝たきり状態とする。

（「疫学研究に関する倫理指針」（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号）等の指針、及び本学、関連施設で定めた倫理規定を遵守して行う。）

【調査項目】 対象例全例の年齢、性、血圧、入院期間、日常生活動作（移動能については寝たきり例、端座位可能例、車椅子移動可能例、歩行可能例に分類）、知的機能（Mini-Mental State による）などの他に、各高齢者疾患の既知の危険因子とし

て、脳心血管疾患発症の既往歴、過去・現在の喫煙歴、高血圧 (>140/90 mmHg)、糖尿病の有無 (血糖値 >126 mg/dl)、腎機能障害の有無 (血清 Cr 値 >2 mg/dl)、栄養状態 (身長、体重、BMI、血清アルブミン値、血清コレステロール値による) についても同時に調査する。また投薬内容 (ステロイド、降圧薬、制酸薬等) の調査も行う。

検索対象遺伝子は、レニン・アンジオテンシン系の遺伝子多型として知られるアンジオテンシン I 変換酵素遺伝子には第 16 intron に約 300 bp の挿入 (I) / 欠失 (D) (insertion/deletion) の多型、アンジオテンシノーゲン遺伝子 M235T および T+31C 多型、レニン遺伝子 Mbo I 多型、アンジオテンシン II 1 型受容体遺伝子 A1166C 多型、 β 2 受容体遺伝子 Arg16Gly および Gln26Glu 多型、メチレンテトラアルデヒド葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子 C677T、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)2 遺伝子多型、低比重リポ蛋白受容体遺伝子 C1773T、エンドセリン遺伝子多型、アデュシン遺伝子 Gly460 Trp 多型、アポ蛋白 E 遺伝子多型、およびヒトキマーゼ遺伝子多型とする。これらの検討は「ヒトゲノム研究に関する共通指針 (案)」検討委員会の原案を遵守して行い、倫理的に何ら問題となるものではない。

C. 研究結果

1. 高齢者肺炎

高齢者肺炎 131 例、対照例 524 例の高齢入院患者において、アンジオテンシン変換酵素阻害薬投与は、アンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の DD 型において特に抑制効果が高いことを明らかにした。

2. 高血圧の関与遺伝子

日本人に多い食塩感受性高血圧に対しては、アンジオテンシノーゲン遺伝子 T+31 多型、 α アデュシン遺伝子 Trp460 多型が関与すること、また血管攣縮性高血圧に対しては eNOS 遺伝子 T894 多型が

関与することを明らかにした。

3. 高齢者インフルエンザ感染

高齢者インフルエンザ後肺炎の重篤化に肺サーファクタント蛋白 A 遺伝子多型の関与の可能性を明らかにした。

4. 骨粗鬆症

高齢者骨粗鬆症に対するアドレノメデュリンの役割につき精査し、破骨細胞の形成能に関与することを明らかにした。

5. 神経疾患

アルツハイマー型老年期痴呆に、口腔粘膜タウ蛋白のリン酸化様式が上皮細胞と神経細胞で同様の分布を示すことを確認し、口腔粘膜の同蛋白リン酸化の評価がアルツハイマー型老年期痴呆の早期診断に役立つ可能性を明らかにした。

D. 結論

世界最長寿国であり、また生活習慣、遺伝的背景が欧米とは異なる我が国において、これら高齢者疾患に対する遺伝的負荷を明らかにすることは、これら疾患に対する遺伝的高負荷群に対しては環境因子の調整、早期からの診断、治療の開始などにより、これら高齢者疾患本研究は我が国高齢者の健康な老後の実現に寄与し、老人の世紀である 21 世紀の我が国および世界各国の福祉と安寧に資する。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. T. Ogihara, S. Morimoto, M. Matsumoto, K. Okaishi, et al Guidelines for treatment of hypertension in the elderly -2002 revised version- *Hypertens Res.* 26:1-36, 2003.
2. H. Hattori, M. Matsumoto, S. Morimoto, K.

- Iawi, H. Tsuchiya, E. Miyauchi, M. Takasaki, T. Nakahashi, K. Okaishi, H. Murai, Y. Nishimura, M. Owari, K. Nomura, S. Kato, L. KONG, . Effects of low-dose quetiapine on psychotic symptoms in elderly patients with physical illnesses: Report of eight cases. *PSYCHOGERIATRICS* 3:39-44, 2003
3. Nampei A., Hashimoto J., Hayashida K., Tsuboi H., Shi K., Miyashita H., Yamada T., Matsukawa N., Matsumoto M., Morimoto S., Ogiwara T., Ochi T., Yoshikawa H. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Min Metab* 22(3), in press, 2004.
 - 4 森本茂人, 岡石幸也, 中橋 毅, 岩井邦充, 松本正幸. 高血圧: エビデンスからみた診療 II. 治療 3. 高齢者高血圧の治療。日内会誌 92:234-242, 2003.
 5. 岡石幸也, 森本茂人, 松本正幸. 特集: 早期高血圧-重要性とその管理治療上の留意点 早期高血圧-血圧管理の必要性和臨床的意義、今月の治療 11:101-104, 2003.
 6. 岩井邦充, 森本茂人, 松本正幸. 老年医学と性差 身体機能の性差 1. 循環器系。Geriat. Med. 41:779-782, 2003.
 7. 松本正幸, 岩井邦充, 森本茂人. 高齢者の主要疾患の診断と治療 虚血性心疾患。Medicina 40:1672-1673, 2003.
 8. 森本茂人, 岡石幸也, 中橋 毅, 松本正幸. 高齢者の大腿骨頸部骨折の防止策。Clinical Calcium 13:52-57, 2003.
 9. 大黒正志, 森本茂人, 松本正幸. 高齢者と薬輸液療法。JIM 13:963-967, 2003.
 10. 中橋 毅, 松本正幸, 森本茂人. 超音波イメージング法。日本臨床 61 (増刊) :398-403, 2003.
 11. 中橋 毅, 森本茂人, 松本正幸. 高齢者の代謝異常: 脱水。総合臨床 52:2164-2169, 2003.
- H. 知的財産権の出現、登録状況
なし。

厚生科学研究費補助金（厚生労働省長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高齢者肺炎易発症性に対するアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害薬の抑制効果に対する
アンジオテンシンⅠ変換酵素遺伝子多型の影響の検討

分担研究者 森本茂人 金沢医科大学老年病学教授

アンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害薬の ACE 遺伝子欠失（D）挿入（I）多型別の高齢者肺炎抑制効果につき case (131 例)-control (524 例) 試験にて検討した。アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害薬の高齢者肺炎発症抑制効果につき、寝たきり状態、糖尿病、低アルブミン血症、肺疾患既往、および ACE 遺伝子多型で補正した後も、高齢者肺炎に対する有意の抑制効果を示し、この効果は ACE 遺伝子 DD 型で特に顕著であった。本研究の成果は高齢者肺炎に対する ACE 阻害薬のテーラーメイド医療に資する。

A. 研究目的

高齢者における肺炎の多発には、加齢に伴う咳・嚥下反射の低下による顕性・不顕性の誤嚥が要因となっている。われわれはこれまでにアンジオテンシンⅠ変換酵素（以下 ACE）阻害薬が高齢者における肺炎発症を抑制することを報告した。この機序として ACE はアンジオテンシンⅠからアンジオテンシンⅡへの生成を促進させる以外に、咳反射・嚥下反射に重要なブラジキニン、サブスタンス P の分解をも司ることから、ACE 阻害薬はおそらく気道におけるこれらの反射に関与する両ペプチドの量を増加させ、高齢者における肺炎発症を抑制すると考えられる。さらに我々は、ACE 遺伝子多型のうち、欠失型（DD 型）ではその他挿入型を含む ID 型+II 型に比し有意に肺炎発症が増加することを報告した。

本研究においては ACE 阻害薬の肺炎抑制効果につき、ACE 遺伝子多型ごとの抑制効果につき明らかにし、高齢者における肺炎発症に対する ACE 阻害薬投与につき、テーラーメイド医療の確立を目指す。

B. 研究方法、

- 1) 対象例：対象例は長期療養型老年病院例で遺伝子多型解析に同意を得、入所中に肺炎を発症した高齢者およびそれぞれの肺炎例に対し年齢（±2 歳以内）および性を一致させた 1: 4 例の対照例である。入院時既に肺炎を発症している例、他疾患による重症例、経管栄養例、手術後肺炎例、ステロイド投与例、腎不全（血清クレアチニン値 ≥ 2.0 mg/dl）は除外した。
- 2) 肺炎の診断：肺炎の診断は胸部 X 線写真および呼吸困難などの臨床症状により、CDC 基準に基づき診断した。
- 3) ACE 遺伝子挿入（I）、欠失（D）多型：ACE 遺伝子の I/D 多型は PCR 法により求めた。
- 4) 調査項目：高齢者肺炎発症の既知の危険因子である痴呆、寝たきり状態、脳血管障害、虚血性心疾患、慢性心不全、高血圧、低栄養（血清アルブミン値 < 3.0 g/dl）、糖尿病、肺疾患の既往につき調査した。

4) 統計解析：肺炎群および対照群におけるそれぞれの調査項目単独の有意差についてはカイニ乗テスト、Mann-Whitney の U テストにより検定した。それぞれの項目において有意差水準 0.2 未満の項目全て、および性、年齢を肺炎発症に対する従属変数とした多重ロジスティック解析に潜在的交絡因子として取り込んだ。また ACE 遺伝子多型については、DD 型と ID+II 型に分類し、それぞれの群におけるロジスティック回帰分析を行った。

(「疫学研究に関する倫理指針」(平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号) 等の指針、及び本学、関連施設で定めた倫理規定を遵守して行った。)

C. 研究結果

1) 肺炎例・対照例：同老人病棟における 1 年間の肺炎発症は 131 例 (男 30 例、女 101 例、平均年齢 82.5±8.3 歳) であり、39 例が死亡した。この 131 例に対して計 524 例 (男 120 例、女 404 例、平均年齢 82.7±8.1 歳) の性・年齢適合対照例を無作為に抽出し、計 655 例 (男性 150 例；平均年齢 79 歳、女性 505 例；平均年齢 84 歳) を対象とした。

2) 肺炎に対する有意関与因子：単項目解析で肺炎例および対照例間で有意差水準 $p < 0.2$ を示した項目のうち、肺炎例で多い項目は寝たきり状態、糖尿病、低アルブミン血症、肺疾患既往、ACE 遺伝子 DD 型であり、また肺炎例で少ない項目は ACE 阻害薬投与であった (表 1)。

3) 肺炎発症に対する ACE 阻害薬投与の独立関与性：性、年齢、寝たきり状態、糖尿病、低アルブミン血症、肺疾患既往、ACE 遺伝子 DD 型、ACE 阻害薬投与を全て交絡因子として、肺炎発症に対する独立関与性を検討した。降圧薬非投与群に比し、ACE 阻害薬投与群では、他の交絡因子の補正後も、肺炎発症は有意 ($p=0.015$) に低下しており、肺炎発症の相対危険率は 0.46 倍 (95%信頼区間 0.24-0.89 倍) であった。一方、ACE 遺伝子 DD 型は ID+II 型に比

表 1. 高齢者肺炎例および非肺炎例における臨床背景因子の比較

	肺炎例 n=131	非肺炎例 n=524
臨床背景因子		
平均年齢 歳	82.5±8.3	82.7±8.1
男/女 n	30/101	120/404
合併症 n(%)		
痴呆	75 (57)	326 (62)
寝たきり	76 (58)	207 (40) ****
脳卒中	45 (34)	173 (33)
虚血心	25 (19)	105 (20)
心不全	8 (6)	51 (10)
低アルブミン	30 (23)	83 (16) **
糖尿病	17 (13)	48 (9) *
肺疾患既往	46 (35)	108 (21) ***
遺伝子多型 n(%)		
ACE 遺伝子 DD	41 (31)	72 (14) ****
降圧薬		
ACE 阻害薬	15 (12)	100 (19) ***
Ca 拮抗薬	35 (27)	126 (24)

* $p < 0.2$, ** $p < 0.1$, *** $p < 0.05$, **** $p < 0.01$

表 2. 肺炎発症に対する各因子の独立関与性

因子	OR	95%信頼区間	p 値
ACE 遺伝子 DD	3.7	(2.0-5.7)	0.000
肺疾患既往	2.3	(1.4-3.8)	0.001
寝たきり	1.9	(1.2-3.0)	0.004
ACE 阻害薬	0.46	(0.24-0.89)	0.015
糖尿病	1.7	(0.8-3.3)	0.152
低アルブミン	1.7	(0.7-2.1)	0.471

し他の交絡因子の補正後も肺炎発症は有意 ($p < 0.001$) に上昇しており、肺炎発症の相対危険率は 3.4 倍 (95%信頼区間 2.0-5.7 倍) であった (表 2)。

4) 肺炎発症に対するACE遺伝子多型別のACE阻害薬の関与: Mantel extension 解析によるACE遺伝子多型別のACE阻害薬の肺炎発症に対する効果は、ACE遺伝子ID+II型では有意ではないものの、ACE遺伝子DD型では有意の低下を認めた(表3)。

表3。ACE遺伝子多型別のACE阻害薬の肺炎抑制効果

	n	OR	95%信頼区間	p値
ACE遺伝子				
DD	25	0.05	(0.00-0.57)	0.003
ID+II	90	0.54	(0.25-1.18)	0.104

4) 肺炎死亡に型では対するACE阻害薬の関与:39例の肺炎死亡群と非肺炎群の間に、ACE阻害薬投与の頻度に有意差は無かった。

D. 考察

高齢者肺炎の特徴は誤嚥性肺炎が極めて多いことであり、また重篤化し易いことから高齢者、特に要介護老人における最重要治療対象疾患の1つである。本症の治療は主に発症後の抗生物質の経静脈投与によるが、しばしば難治性で死に至る。また、治療が奏功する場合に於いても、抗生物質の頻回投与は高齢者の腎機能低下を加速する危険性をはらむとともに、メチシリン耐性ブドウ球菌に代表される耐性菌を作るなど医原性疾患をも発生させているのが現状である。高齢者肺炎の最重要要因は高齢者における咳反射の低下であり、この機作改善を目指した治療・予防法の検討は皆無である。

一方、ACE阻害薬は降圧薬として既に広く高血圧治療に用いられている。またACE阻害薬は降圧降下が緩やかなことから高齢者においても医原性の梗塞性疾患を惹起することが少ないこと、組織ACEを阻害し心肥大、動脈硬化を退縮させる作用を合わ

せ持つこと、さらに軽度腎機能障害の進行を遅らせることなどの付加的効果をも合わせ持つことが知られている。

一方、ACE遺伝子DD型においては、ID+II型に比し肺炎が有意に高率に発症することを報告している。

今回の検討により、肺疾患既往、寝たきり、糖尿病、低アルブミン血症、および上記のACE遺伝子多型などの既知の危険因子の影響を補正した後も、ACE阻害薬投与を受けている高齢者では肺炎発症率が、降圧薬非投与高齢者に比し約半数に低下することが明らかとなった。さらに、ACE遺伝子多型別では特にDD型における効果が顕著であった。

ACEはアンジオテンシンIからアンジオテンシンIIへの生成を触媒するのみならず、咳反射・嚥下反射に重要であるブラジキニン、サブスタンスPの分解をも司り、ACE遺伝子DD型においてはその活性は高いことが知られている。ACE阻害薬は特にACE活性が高く気道におけるこれらの咳反射・嚥下反射に重要なこれらペプチドの量の低下が推測されるDD型においてこれらペプチドの量を増加させ、高齢者における肺炎発症を予防したと考えられる。

今回のケース・コントロールスタディで得られた成果が、将来、より大規模なコホートスタディで確認されることが望まれるとともに、ACE阻害薬の高齢者肺炎発症予防の詳細な機序解明が待たれる。

2. 結論

ACE阻害薬は本邦において高齢者高血圧に最も頻用される降圧薬の一つであるが、本薬剤の副作用として知られる空咳の発現は、おそらく咳反射、嚥下反射の亢進を介して、高齢者肺炎の発症を抑制すると考えられ、高齢者高血圧例に対する本薬剤の副次作用として注目される。

E. 結論

虚弱高齢者における睡眠時無呼吸は虚血性能病変と密接な関与を有する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. T. Ogihara, S. Morimoto, M. Matsumoto, K. Okaishi, et al Guidelines for treatment of hypertension in the elderly -2002 revised version- *Hypertens Res.* 26:1-36, 2003.
2. H. Hattori, M. Matsumoto, S. Morimoto, K. Iwami, H. Tsuchiya, E. Miyauchi, M. Takasaki, T. Nakahashi, K. Okaishi, H. Murai, Y. Nishimura, M. Owari, K. Nomura, S. Kato, L. KONG., Effects of low-dose quetiapine on psychotic symptoms in elderly patients with physical illnesses:Report of eight cases. *PSYCHOGERIATRICS* 3:39-44, 2003
3. Nampei A., Hashimoto J., Hayashida K., Tsuboi H., Shi K., Miyashita H., Yamada T., Matsukawa N., Matsumoto M., Morimoto S., Ogihara T., Ochi T., Yoshikawa H. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Min Metab* 22(3), in press, 2004.
- 4 森本茂人, 岡石幸也, 中橋 毅, 岩井邦充, 松本正幸. 高血圧：エビデンスからみた診療 II. 治療 3. 高齢者高血圧の治療。日内会誌 92:234-242, 2003.
5. 岡石幸也, 森本茂人, 松本正幸。特集：早期高血圧-重要性とその管理治療上の留意点 早期高血圧-血圧管理の必要性和臨床的意義、今月の治療 11:101-104, 2003.
6. 岩井邦充, 森本茂人, 松本正幸。老年医学と性差 身体機能の性差 1. 循環器系。Geriat. Med. 41:779-782, 2003.
7. 松本正幸, 岩井邦充, 森本茂人。高齢者の主要疾患の診断と治療 虚血性心疾患。Medicina 40:1672-1673, 2003.
8. 森本茂人, 岡石幸也, 中橋 毅, 松本正幸。高齢者の大腿骨頸部骨折の防止策。Clinical Calcium 13:52-57, 2003.
9. 大黒正志, 森本茂人, 松本正幸。高齢者と薬 輸液療法。J I M 13:963-967, 2003.
10. 中橋 毅, 松本正幸, 森本茂人。超音波イメージング法。日本臨床 61(増刊):398-403, 2003.
11. 中橋 毅, 森本茂人, 松本正幸。高齢者の代謝異常：脱水。総合臨床 52:2164-2169, 2003.

H. 知的財産権の出現、登録状況

なし。

高齢者疾患の易発症性に関する遺伝的負荷の解明

分担研究者 勝谷友宏 大阪大学大学院医学系研究科加齢医学講座講師

研究要旨：高齢者の心疾患、上位を占め、早期治療・予防は厚生労働行政の重要な課題となる。本研究では、高齢者の循環器疾患罹患リスクを高める疾患感受性遺伝子解析を行い、日本人に特徴的な体質を検討した。その結果、代表的な4つの高血圧感受性遺伝子の食塩感受性リスクアリル頻度が日本人で高いことや、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）遺伝子多型が高齢者の収縮期高血圧リスクとなり、認知機能障害を惹起することが判明した。減塩や抗酸化を図ることは高齢者に対する効果的介入と考えられる。

A. 研究目的

高齢者において、循環器疾患の発症は、寝たきり等の重篤な病態を招くだけでなく、QOL(quality of life)の著しい低下を招く。循環器疾患発症予防のためには、個人の体質にあった個別の施策を勧告することが厚生労働行政において重要と考える。本研究では代表的な疾患感受性遺伝子解析を通じて、遺伝子多型別の有効な指導法を検討した。

B. 研究方法

大迫研究（東北大学臨床薬学との共同研究）参加者ならびに大阪大学医学部附属病院老年・高血圧内科受診者を対象とし、インフォームドコンセント受理後M、感受性遺伝子解析を実施した。高齢者循環器疾患リスク遺伝子として、アンジオテンシノーゲン遺伝子の *T+31C* 多型 (*AGT/T+31C*)、 α アデュシン遺伝子の *Gly460Trp* 多型 (*ADD/Gly460Trp*)、アルドステロン合成酵素遺伝子の *C-344T* 多型 (*CYP11B2/C-344T*)、G蛋白 β 3サブユニット遺伝子の *C825T* 多型 (*GNB3/C825T*) の4つを検討した。また内皮機能障害との関連が示唆される内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子の *Glu298Asp* 多型 (*eNOS/G894T*) の検討も行った。遺伝子型はTaqMan PCR法を用いて決定し、統計学的解析は JMP4.0 (SAS Inc.)を用いて行った。

（倫理面への配慮）ヒトゲノム解析倫理指針に基づき研究計画を大阪大学および東北大学倫理委員会に提出し、承認後、対象者から文書でインフォームドコンセントを受理し、採血を実施した

C. 研究結果

食塩感受性高血圧の候補遺伝子とされる4つの感受性遺伝多型子の日本人一般集団における頻度は、*AGT/T235* アリルが81%（白人では45%）、*ADD1/Trp460* アリルが57%（白人では15%）、*CYP11B2/T-344* アリルが69%（白人では50%）、*GNB3/T825* アリルが52%（白人では25%）と全て有意に ($p < 0.01$) に高値であった。一方、大迫研究の高齢者（65才以上）において、

eNOS/T894 アリル保有者の収縮期血圧は 138.8mmHg と GG 型 (134.3mmHg) よりも有意 ($p < 0.034$) に低く、脈圧 ($p < 0.025$)、高血圧罹患 ($p < 0.05$) とも有意な関連を示した。さらに、*eNOS/T894* アリル保有者の MMSE スコアも有意 ($p < 0.01$) に低く、同多型と認知機能低下との関連も示唆された。

D. 考察

大迫研究で non-dipper 型血圧日内変動と *AGT/C+31* アリルが関連を示したこと (*Am J Hypertens* 2002)、また *ADD/Trp460* が食塩感受性と関連の深い低レニン性高血圧と相関を示したこと (*J Hypertens* 2002)、G 蛋白 β 3サブユニットが Na-H ATPase と関連することとも考え合わせると、日本人において代表的な4つの食塩感受性遺伝子リスクアリルが高頻度であることは、高齢者疾患の易発症性改善のための施策として、減塩が有効であることをあらためて示す結果といえる。一方、血管攣縮性高血圧や虚血性心疾患易発症性や内皮機能との関連が深い *eNOS/T894* アリル保有が、高齢者の収縮期高血圧、認知機能障害と関連が深いことが示唆された。ビタミンEやCなどの抗酸化薬の長期投与の意義については統一した見解は得られていないが、生活習慣病発症の初期段階における酸化ストレス減弱が、高齢者疾患の生活習慣病を予防する可能性が考えられた。

E. 結論

疾患感受性遺伝子多型を活用した生活指導が、高齢者の易疾患性を改善する可能性が示唆された。

G. 研究発表

論文発表

1. Katsuya T. *et al.*, *Hypertens Res* 26: 521-525, 2003.
2. Katsuya T. *et al.*, *Geriatr Gerontol Int* 3: 150-153, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし。

肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者における
肺サーファクタント蛋白A遺伝子上の1塩基多型に関する研究

分担研究者：奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所感染症部長

肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者より得られたDNAよりPCR法により肺サーファクタント蛋白Aをコードする遺伝子のエクソン1、2領域を含むDNA断片を増幅させた後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、重症肺炎発症と肺サーファクタント蛋白A遺伝子多型の相関性の解析を行った。23例の肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者における肺サーファクタント蛋白A遺伝子エクソン1、2領域の1塩基多型の頻度を比較した結果、アレール出現頻度と高齢者インフルエンザ患者における重症化の間に相関がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

ウイルスなどの病原微生物の侵入に対する感染防御機構には、感染後数時間以内に働く生来備わった自然免疫 (innate immunity) と、感染数日後から働く獲得免疫 (adaptive immunity) がある。これらのうち獲得免疫は、特異的な異物認識とその記憶に特徴がある。一方、自然免疫に関わるタンパク質は常に体内に存在しており、それらが感染微生物の表面に表現された分子パターン (Pathogen-Associated Molecular Patterns、PAMPs) を認識する。ウイルス上のヘマグルチニン等の糖蛋白質、グラム陰性菌のリポ多糖、グラム陽性菌のペプチドグリカンやリポテイコ酸、真菌の β -グルカン等の上に存在する分子がPAMPsである。自然免疫を担う因子として本研究の目的であるコレクチンをはじめとしてリゾチーム、補体、インターフェロン、上皮系細胞や組織マクロファージなどがある。上皮細胞は物理的バリアーとしてのみならず、サイトカインの産生で自然免疫に関わっている。組織マクロファージはToll-like receptor (TLR) をはじめとする多数の表面レセプターによって、微生物を認識し、迅速に貪食、排除を行うとともに炎症性サイトカインを産生し、自然免疫の一翼を担っている。自然免疫のなかで、感染数時間後に誘導される応答は早期誘導反応 (primitive response) と呼ばれている。早期誘導反応には、補体や、炎症性サイトカインで血管外遊走を誘導された好中球やマクロファージ、さらにナチュラルキラー細胞、 $\gamma\delta$ 型T細胞、上皮間Tリンパ球、CD5陽性B細胞などが関与する。それら自身は持続する免疫にはつながらず、食細胞などによる本来の自然免疫と獲得免疫との橋渡しの役割を担うと考えられている。

コレクチンファミリーの一員である肺サーファクタント蛋白A (SP-A) は、その糖鎖結合活性により微生物に作用し、抑制的に働くことが知られている。一方で、食細胞内で生存しうる結核菌などの細胞内寄生性病原体に対しては、感染を助長することも報告されている。これらのこと

から、SP-A は肺感染症の発症または制御において重要な役割を果たしていると考えられる。このような SP-A をコードする遺伝子上の 1 塩基多型 (SNPs) と高齢者における呼吸器感染症の重症化の間には何らかの相関性が見られる可能性が考えられた。そこで本研究では肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者における SP-A をコードする遺伝子上の特に重要と考えられるコラーゲン領域における SNPs の解析を行った。

B. 方法

対照

平成 13 年 (2001)、大阪府下の某病院における肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者 23 例について解析を行なった。

SP-A 遺伝子コラーゲンドメインをコードする領域を含む DNA 領域の増幅と配列決定

ヒトゲノムを鋳型として SP-A 遺伝子コラーゲンドメインをコードする領域を含む DNA 領域の増幅を行った。SP-A 遺伝子はヒト染色体上に 2 種存在するためそれぞれを別個に増幅させるため、2 種の遺伝子で異なった配列を示す領域と共通な配列を示す領域にプライマーを設定した (表 1)。これらを用いて PCR により SP-A 遺伝子のコラーゲンドメインをコードする領域を含む DNA 断片を増幅させた (図 1)。LA PCR 反応には LA PCR Kit ver 2.1 (タカラバイオ(株)社) を用いて、1 μ l ゲノムサンプル、0.5 μ l LA Taq polymerase、5 μ l 10 x buffer、0.25 mM dNTP、0.25 mM $MgCl_2$ 、0.02 mM primer を含む 50 μ l の反応液を調整し、PCR thermal cycler personal (タカラバイオ(株)社) を用いて、反応条件は 98 $^{\circ}C$ 1 分 (98 $^{\circ}C$ 5 秒、57 $^{\circ}C$ 10 秒、72 $^{\circ}C$ 60 秒) x 35 サイクルで行った。PCR 産物は、エタノール沈殿後、沈殿物を 70%エタノールで洗浄し、これを滅菌精製水に溶解後、1%アガロースゲル電気泳動にて展開し、目的バンドをゲルから切り出した。切り出したゲルを -135 $^{\circ}C$ で 15 分間凍結後、15000 rpm で 10 分間遠心して、DNA を上清に回収し、以降の実験に用いた。塩基配列は、得られた DNA 断片を鋳型とし、hSP-A1FR2 あるいは hSP-A1FR2 と hSP-A seq1、hSP-A seq2、hSP-A seq3、(表 1) をプライマーに用いることで決定した。図 2 に PCR により増幅される領域の塩基配列の比較を示す。シーケンス決定反応は、DNA Sequencing Kit Big Dye terminator V3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction (アプライドバイオシステムズジャパン(株)社) を用いて、付属のマニュアルに従い実施した。反応には PCR thermal cycler personal (タカラバイオ(株)社) を用い、反応物は、滅菌水 15 μ l、2 M NaOAc 3 μ l、エタノール 50 μ l を加えよく攪拌した後、10000 rpm で 5 分間遠心し、得られた沈殿物を 70%エタノールで洗浄後、5 分間風乾し、20 μ l TSR (Template Suppression Reagent; アプライドバイオシステムズジャパン(株)社) で溶解した。溶解したサンプルを 94 $^{\circ}C$ 、2 分間処理し、4 $^{\circ}C$ で急冷後、ABI310 ジェネティックアナライザー (アプライドバイオシステムズジャパン(株)社) により塩基配列を決定した。

C. 結果

図3に PCR による増幅産物の電気泳動パターンを示す。今回用いたプライマーペアにより約760塩基対付近に特異的DNA断片の増幅が確認された。得られたDNA断片を鋳型として塩基配列を決定した結果検出されたSP-A1遺伝子コラーゲンドメインコード領域に存在するSNPsを図4に示す。図中の塩基配列番号は開始コドンATGのAを1とした時の番号であり、アミノ酸配列番号は開始メチオニンを1としたものである。SP-A2遺伝子についても同様な解析を現在行っているが完結していないために本報告書には記載していない。SP-A1遺伝子コラーゲンドメインコード領域には5種類のSNPが見い出された。これらのうち2種類はエクソン1に、1種類はエクソン2に、残りの2種類はイントロン領域に見い出された。エクソン領域に見い出されたSNPsのうちC117TとA500Gは同義置換であり、アミノ酸置換を伴うものではなかった。一方、G148CのSNPではロイシンからバリンへのアミノ酸置換が見られた。

表2に今回分析した肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるSP-A遺伝子コラーゲンドメインをコードする領域を含むDNA領域のアレルの出現頻度を対照群と比較した結果を示す。

今回の研究では対照群の解析を行っていないため、対照群のデータはSaxena et al. J. Allergy Clin Immunol 111: 1001- 1007 (2003)より引用した。比較の結果、肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるSP-A遺伝子コラーゲンドメインをコードする領域を含むDNA領域のアレルの出現頻度において対照群のそれとの間に差異が見られる傾向にあるものが2種存在した。117番目の塩基がCである頻度が肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者において0.85であるのに対して、対照群では0.71であった。また、148番目の塩基がCである頻度が肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者において0.63であるのに対して、対照群では0.57であった。また、今回の研究で500番目、651番目に見い出されたSNPsは対照群では報告されていない新しいものである可能性が示唆された。

D. 考察

今回の研究でSP-A遺伝子コラーゲンドメインをコードする領域を含むDNA領域のアレルの出現頻度と高齢者インフルエンザ患者における重症化の間に相関がある可能性が示唆された。しかしながら今回の研究で解析した検体は数的に十分なものとは言えない。さらに検体数を増やしてSP-A1遺伝子について解析を進めるとともに、SP-A2遺伝子の解析も進めてゆく必要があるものと考えられる。また、対照群として肺炎を発症しなかった高齢者インフルエンザ患者におけるSP-A遺伝子コラーゲンドメインをコードする領域の解析も行う必要があるものと考えられる。

E. 研究発表

1. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K., and Hamada, S. Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *J. Virol.* 77:4104-4112. 2003.
2. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., Okuno, Y. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the “Loop”. *J. Gen. Virol.* 84:769 -773. 2003.
3. 奥野良信：インフルエンザの疫学、サーベイランス（国内）。最新医学、59：42－47、2004
4. 奥野良信：インフルエンザ（分担執筆）。感染症診療・投薬ガイド、p. 160－166、総合臨床、2003
5. 奥野良信：インフルエンザの歴史と展望。治療、85：3139－3144、2003
6. 奥野良信：次のパンデミックの予測とその対策。大阪保険医雑誌、442：9－13、2003
7. 奥野良信：インフルエンザの治療：アマンタジン。総合臨床、52(10)：2797－2801、2003
8. 奥野良信：インフルエンザの検査とワクチン。臨床病理、51(3)：268－273、2003

F. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
 - 2) 実用新案登録 なし
- その他 なし

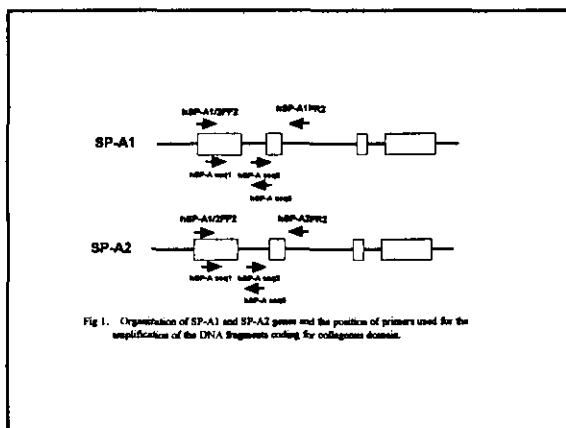


Fig. 1. Organization of SP-A1 and SP-A2 genes and the position of primers used for the amplification of the DNA fragments coding for collagenase domain.

Table 1. Primers used for the amplification and sequencing the DNA fragments coding for collagenase domain of SP-A1 and SP-A2 genes

Name of primer	Nucleotide sequence	target
hSP-A1ZFF2	GACTGGACCCAGGACATGTGC	SP-A1Z
hSP-A1FR2	AGCTTCTCCCTCAAGTTCATCC	SP-A1
hSP-A2FR2	GCTTCTCCCTCAAGTTCATCC	SP-A2
hSP-A seq1	CAATGCTCTGACCTCTGATCC	SP-A1Z
hSP-A seq2	CAATGCTCTGACCTCTGATCC	SP-A1Z
hSP-A seq3	GCCACTATGAGAGCACTCTCC	SP-A1Z

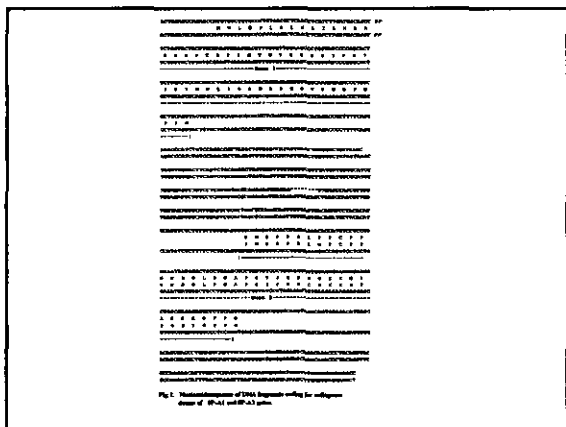


Fig. 2. Multiple alignment of DNA fragments coding for collagenase domain of SP-A1 and SP-A2 genes.

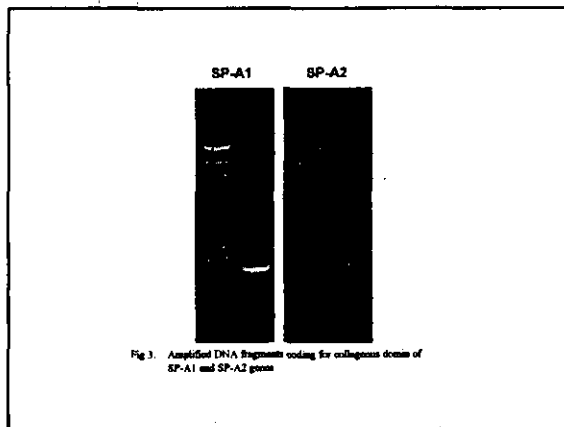


Fig. 3. Amplified DNA fragments coding for collagenase domain of SP-A1 and SP-A2 genes.

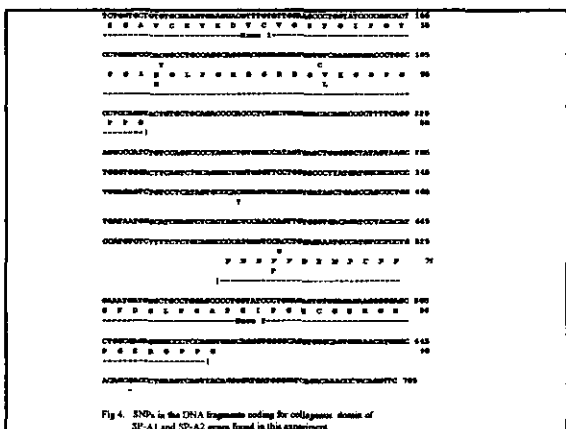


Fig. 4. SNPs in the DNA fragments coding for collagenase domain of SP-A1 and SP-A2 genes found in this assignment.

Table 2. Frequency of C117T, G148C, C372T and A300G of SP-A1 gene.

Allele		Allele frequencies	
		This work n = 23	control* n = 7
117C/T	C	20	10
	T	7	4
148G/C	C	20	6
	G	17	6
372C/T	C	37	11
	T	9	3
800A/G	A	37	ND
	G	9	ND
981A/del	G	20	ND
	del	16	ND

*Savran et al. J. Allergy Clin Immunol 111: 1001-1007 (2003)

厚生科学研究費補助金（厚生労働省長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明

分担研究者 覚道 健一 和歌山県立医科大学第二病理学教室教授

我々は昨年度、破骨細胞がアドレノメデュリン(ADM)またはアミリンと結合することを示唆する結果を得た。本研究では、in vitro において破骨細胞の形成能に対するADMの影響について調べた。その結果 ADM 10^{-12} および 10^{-10} Mの実験区では無処理区と比較して破骨細胞様細胞形成の数に違いは見られなかったが、ADM 10^{-8} Mの実験区で破骨細胞様細胞形成の低下が見られた。この結果よりADMが破骨細胞に作用して破骨細胞の形成を抑制することが明らかとなった。マウスにADM 投与した場合、骨量の増加が見られることが報告されていることからADMは骨において骨芽細胞の増殖や破骨細胞形成を調節することにより、骨量を調節している可能性が示唆された。さらにADMが骨粗鬆症治療の標的分子となる可能性を示した。

A. 研究目的

高齢者において骨粗鬆症は深刻な社会問題である。破骨細胞は骨吸収において重要な役割を果たしている。破骨細胞の細胞表面にはカルシトニンレセプター(CTR)が多量に存在しており、破骨細胞の活性はカルシトニン(CT)により抑制されることが報告されている。カルシトニン類似ペプチドとして、calcitonin gene-related peptide, amylin, adrenomedullin が同定され、多様な作用を発揮することが報告されている。我々は昨年度、高齢者骨粗鬆症における内分泌因子の遺伝的負荷の解明を目的に、破骨細胞における CT ファミリーの発現を培養破骨細胞を用いレーザー照射によるマイクロダイセクション(Laser capture microdissection, LCM)・RT-PCR 法により破骨細胞がカルシトニン(CT)以外にアドレノメデュリン(ADM)またはアミリンと結合して何らかの影響を受けていることが予測された。アドレノメデュリンは降圧物質として知られており、また骨芽細胞の増殖における局所調節因子であることが報告されているが、破骨細胞における機能は不明である。そこで、破骨細胞の形成能に対する ADM の影響について明らかにした。

B. 研究方法

In vitro における破骨細胞の誘導

10-14 週令の C57BL/6 雄マウス (Charles Liver, Sagamihara, Japan)を用い、大腿骨および骨から脛骨髄細胞を採取しさらに脾臓より脾細胞を回収した。これらの骨髄細胞と脾細胞を 10^{-8} M ビタミンD、1%ペニシリン・ストレプトマイシンおよび10%牛胎児血清を含む alpha-modified

Eagle's 培地にて Lab-Tek スライドチャンバー(Nalge Nunc Int. Co., Naperville, USA)上で共存培養を行った。5%CO₂, 37℃下にて10日間培養することにより破骨細胞様細胞を得た。

動物実験は、和歌山県立医科大学における動物実験に関する指針に従った。

アドレノメヂュリン (ADM) 処理

培養開始時に ADM (Calbiochem, CA, USA)を 0, 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ M の4種類の濃度で各々培養液に添加した。培養4日目にADMを含む新鮮培地にて培地交換を行った。培養10日目にTRAP染色(酒石酸耐性酸性ホスファターゼ、tartrate-resistant acid phosphatase)を行い破骨細胞様細胞および破骨細胞様細胞の1細胞あたりの細胞核の計測を行った。TRAP染色陽性かつ細胞核が3核以上の細胞を破骨細胞様細胞とした。これらの実験は、実験を独立して3回行った。

C. 研究結果

ADM 10⁻¹² および10⁻¹⁰ Mの実験区では無処理区と比較して破骨細胞様細胞形成の数に違いは見られなかったが、ADM 10⁻⁸ Mの実験区で破骨細胞様細胞形成

D. 考察

今回の結果より、1細胞あたりの細胞核の数については、各実験区で差が見られなかったことにより、ADMの抑制作用は破骨細胞形成の初期に起こっていることが推測された。マウスにADMを投与した場合、骨量の増加が見られることが報告されている(Cornish J. et al., J. Endocrin, 170, 251-257, 2001)。この報告と我々の結果より、ADMは骨において骨芽細胞の増殖や破骨細胞形成を調節することにより、骨量を調節している可能性が示唆された。昨年度の報告で、破骨細胞においてADM同様カルシトニンファミリーであるアミリンの存在も示唆された。アミリンはCTと同様に破骨細胞の形成を抑制することが報告されている。

E. 結論

ADMが破骨細胞に作用して破骨細胞の形成を抑制することが明らかとなった。カルシトニンファミリーに属すADMやアミリンが骨粗鬆症の治療薬として有用であることが期待された。今後は、これらの物質の骨での詳細な作用メカニズムの解明が望まれる。さらにADMやアミリンの遺伝的負荷が骨粗鬆症発症因子の一つとなることも予想される。

G. 研究発表

1. Wang X, Nakamura M, Mori I, Takeda K, Nakamura Y, Utsunomiya H, Yoshimura G, Sakurai T, Kakudo K. Calcitonin receptor gene and breast cancer: quantitative analysis with laser capture microdissection. *Breast Cancer Res Treat.* 83(2):109-117, 2004

2. Ozaki T, Tabuse K, Tsuji T, Nakamura Y, Kakudo K, Mori I. Microwave cell death: Enzyme histochemical evaluation for metastatic carcinoma of the liver. *Pathol Int.* 53(12): 837-845, 2003
3. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status, and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1;9(14):5313-5317, 2003
4. Ozaki T, Mori I, Nakamura M, Utsunomiya H, Tabuse K, Kakudo K. Microwave cell death: Immunohistochemical and enzyme histochemical evaluation. *Pathol Int.* 53(10):686-692, 2003
5. Mori I, Miyauchi A, Kuma S, Tang W, Kakudo K. Thyroid nodular lesion: analysis of cancer risk based on Kuma Hospital experience. *Pathol Int.* 53(9):579-583, 2003
6. Tang W, Nakamura Y, Zuo H, Yasuoka H, Yang Q, Wang X, Nakamura M, Mori I, Miyauchi A, Kakudo K. Differentiation, proliferation and retinoid receptor status of papillary carcinoma of the thyroid. *Pathol Int.* Apr;53(4):204-213, 2003
7. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res.* Feb;9(2):716-721, 2003
8. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Tsukiyama A, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol.* Apr;16(4):309-314, 2003

G. 知的財産権の出現、登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明（高齢者神経疾患）

分担研究者 中橋 毅 金沢医科大学講師

研究要旨

日本における高齢者の QOL を著しく阻害しているアルツハイマー病に対する発症予測・治療効果判定に有用な分子生物学的な指標は数少ないが、口腔粘膜などにおけるタウ蛋白の発現様式は将来、非侵襲的で簡便なアルツハイマー病診断の指標と期待されている。これまでに上皮細胞のタウ蛋白の発現が神経細胞との相同性があることを mRNA レベルで明らかにしてきたが、本研究では口腔粘膜におけるタウ蛋白のリン酸化の様式が上皮細胞と神経細胞でも同様の分布を示すことを確認し、アルツハイマー病患者における口腔粘膜タウ蛋白含有量が亢進していることが確認された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) は高齢社会となった現在の日本においては高齢者の QOL を脅かす疾患であり、治療法の確立とともに早期診断、あるいは発症予測の方法を確立し、発症早期、あるいは発症前から対処すべき疾患である。アルツハイマー病の病理学的定義となっている老人斑形成にはアミロイド前駆体蛋白、プリセニリン I、プリセリニン II の遺伝子の変異が β アミロイドの産生の亢進をもたらすためであることがわかってきている。同様に脳脊髄液中のタウ蛋白の分画が AD 発症と関連していることも明らかとなりつつあるが、これらは脳組織内の変化であるため、臨床的な診断に限界がある。本研究では非侵襲的なアルツハイマー病診断法を確立することを目的として口腔粘膜上皮のタウ蛋白発現様式や発現量を詳細に検討した。これまでのヒト上皮細胞において発現するタウ蛋白の神経細胞由来のタウ蛋白との相同性について検討してきた結果、少なくとも 1 種類以上の神経細胞由来のタウ蛋白と同じ isoform のタウ蛋白と非神経細胞に見られる第 6 エクソンを

含む isoform の発現が上皮細胞で認められることが明らかとなった。今年度はこれらの口腔粘膜上皮におけるタウ蛋白の発現と AD との相関について検討した。

B. 研究方法

アルツハイマー病 (AD 群) 40 例、脳血管性痴呆 (VD 群) 31 例、パーキンソン病 (PD 群) 10 例および 65 歳以上の高齢対照例 (OC 群) 26 例、65 歳未満の若年対照例 (YC 群) 31 例から口腔粘膜を採取し、ELISA 法にてタウ蛋白の含有量を測定した。AD および VD の診断には National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Strokes-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS - ADRDA) の Alzheimer 病の臨床診断基準および International Workshop of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINCDS

- AIREN)の脳血管性痴呆の臨床診断基準を使用した。またヒト粘膜上皮組織として剖検例よりえられた食道粘膜上皮をホルマリン固定後パラフィン包埋し、タウ蛋白の発現様式およびリン酸化の詳細について検討した。

(倫理面への配慮)

口腔粘膜の採取については、一回の非侵襲的操作による口腔粘膜採取によって得られたサンプルについてタウ蛋白を測定し、AD 診断を目的とした研究のみに使用することを説明し、個人情報はずべて匿名とすること条件として同意が得られた場合に採取した。また、一部の若年対象例においては非侵襲的に採取した口腔粘膜から mRNA を抽出し、そこに発現しているタウ mRNA の定量を行うことについても同意を得たうえで採取した。

C. 研究結果

各群の年齢(歳)は AD 群、VD 群、PD 群、YC 群、OC 群でそれぞれ、 74.8 ± 7.7 歳、 78.5 ± 7.6 歳、 77.8 ± 4.5 歳、 28.5 ± 8.8 歳、 74.0 ± 5.0 であり、口腔粘膜におけるタウ蛋白含有量($\text{pg}/\mu\text{g protein}$)は 0.81 ± 0.65 、 0.39 ± 0.27 、 0.35 ± 0.12 、 0.47 ± 0.24 、 0.46 ± 0.31 であった。AD 群におけるタウ蛋白含有量は X 二乗検定にて他のいずれの群に対しても有意に高値であった(いずれも $P < 0.05$ 、図 1)。タウ蛋白の mRNA の発現について若年対象例の口腔粘膜から Total RNA を抽出し、RT-PCR により数種類のタウ蛋白 mRNA 増幅を試みたが、RT-PCR をもってしても感度以下となる場合が多く、統計的な定量は困難であった。食道粘膜上皮を用いた免疫組織化学的検討にはタウ蛋白を認識する 2 種類の抗体 (BT2、

AT270) が用いられた。非リン酸化タウ蛋白に対する抗体である BT2 は食道上皮においては神経細胞同様に細胞体に強く発現が見られ、核は BT2 では染色されなかった。これに対しリン酸化タウ蛋白に対する抗体である AT270 は粘膜上皮組織でも神経細胞同様に細胞核に発現が認められた(図 2)。このように AD 群では口腔粘膜上皮におけるタウ蛋白発現が亢進しており、その発現様式も mRNA レベルおよび蛋白レベルのいずれにおいても神経細胞のタウ蛋白発現様式と高い相同性を有していることが確認された。

D. 考察

AD 症例における口腔粘膜のタウ蛋白含有量は、若年対照群や高齢対照群に比べて亢進していることが明らかとなった。これまでの検討では粘膜上皮細胞には神経細胞で見られない第 6 エクソンを有する isoform が発現している可能性がみられたが、蛋白レベルでの定量では AD との相関が認められた。さらに痴呆性疾患群の間でも疾患特異性が見られ、AD では VD や PD に比較しても口腔粘膜のタウ蛋白含有量が亢進していることが明らかとなった。このことから、口腔粘膜の蛋白定量は AD の非侵襲的診断法として有用となる可能性が示唆された。今後は病期によって口腔粘膜タウ蛋白含有量がどのように推移するかを検討することで早期診断の方法としての可能性を探る必要があると思われる。より選択的な isoform の定量法の確立のため対照群の一部で RT-PCR によるタウ蛋白の mRNA の定量を試みたが、鋳型となる mRNA 量が極端に少なく、定量は困難であった。この原因としては擦過による口腔粘膜の採取では細胞核が