

厚生労働科学研究補助金

長寿科学総合研究事業

平成16年度 総括研究報告書

高齢者疾患病理における遺伝素因の解明

平成17年3月

主任研究者 白澤卓二

(東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ 参事研究員)

目次

I. 総括・分担研究報告

1. 高齢者疾患病理における遺伝素因のモデル解析 白澤卓二
東京都老人総合研究所
1. 哺乳類におけるインスリンシグナルと寿命制御機構・・・・・・・・・・ 1
清水孝彦、馬場智規、白澤卓二 東京都老人総合研究所
2. clk-1 欠損マウスの生体リズムに対する CoQ10 の関与・・・・・・・・・・ 9
高橋真由美 清水孝彦 白澤卓二 東京都老人総合研究所
3. 組織特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイリング・・・・・・・・ 12
内山 智・野尻英俊・清水孝彦・白澤卓二 東京都老人総合研究所
2. 「高齢者疾患病理における遺伝素因の解明」に関する研究・・・・・・・・ 16
沢辺元司 東京都老人医療センター
3. 高齢者における大腸腺腫と p53 コドン 72 多型に関する研究・・・・・・・・ 20
新井 富生 東京都老人医療センター
4. 骨量決定遺伝子に関する検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
細井孝之 東京都老人医療センター
5. 高齢者疾患における寿命老化制御遺伝子の多型解析・・・・・・・・ 27
村松正明 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

哺乳類におけるインスリンシグナルと寿命制御機構

研究分担者 清水孝彦、馬場智規、白澤卓二

東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ

研究要旨

線虫の長寿変異体 *daf-2* の長寿命変異と相同の変異をインスリン受容体遺伝子に導入したノックインマウス（インスリン受容体変異マウス）を作製した。インスリン受容体変異マウスは、雌雄ともに酸化ストレス耐性能が亢進していたが、雌でより強い耐性を示した。さらに、抗酸化酵素である MnSOD の活性および mRNA の発現が雌雄共に増強し、雌でより顕著であった。エストロゲン投与実験と卵巣摘出実験を行ったところ、エストロゲンがインスリン受容体変異マウスの抗酸化防御機構を調節していることが判明した。また、インスリン受容体変異マウスに対して食餌制限を行うと酸化ストレス耐性能が増強した。これらの結果は、哺乳類において、インスリン受容体を介したインスリンシグナルが酸化ストレス耐性を制御していることを示した。また、インスリン、エストロゲン及び食餌制限の3つのシグナルが協調して長寿命シグナルを調節していることを示した。

A. 研究目的

フリーラジカルによる酸化ストレスは老化の一因と考えられている。モデル動物を用いた遺伝学的解析から、長寿命変異体が単離され、変異体の多くで酸化ストレス耐性能が増強していることが明らかとなった。線虫の長寿変異体 *daf-2* の分子生物学的解析の結果、インスリン受容体/インスリン様成長因子1受容体遺伝子に長寿命遺伝子変異が発見された。さらに *daf-2* 線虫はインスリン様シグナル伝達の異常により、MnSOD の発現が増大していた。一方、哺乳類においては、インスリン様成長因子1受容体欠損ヘテロ

接合体マウスで酸化ストレス耐性と寿命延長が報告された。このマウスは雌で寿命の延長を示し、インスリン様成長因子1シグナルが、性差によって調節されていることを示唆した。本研究の目的は、哺乳類においてインスリンシグナルが酸化ストレス耐性能を増強し、寿命が延長するのかを検討することである。これまでに我々は、*daf-2* 線虫の長寿命変異と相同の変異を持つインスリン受容体ノックインマウスの作製に成功している。このマウスはインスリン受容体タンパク質 1195 番目のプロリン残基がロイシン残基に置換している。これまでの実験

結果から、インスリン受容体変異ホモ接合体マウス ($I\text{r}^{\text{P1195L/P1195L}}$) は、生後約 48 時間以内に成長障害と糖尿病性ケトアシド-シスで死亡することが判明し、インスリン受容体欠損マウス ($I\text{r}^{-/-}$) と同じ表現型を示した。ヘテロ接合体マウス ($I\text{r}^{\text{P1195L/wt}}$) は、インスリン受容体のチロシンキナーゼ活性が約 20%に低下し (図 1)、インスリン抵抗性を示すが糖尿病は発生せず、いわば前糖尿病状態のまま健康に生存することを明らかにしている (未発表データ)。

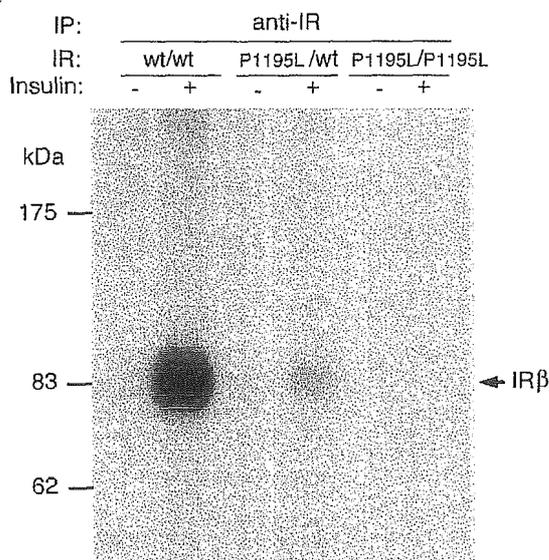


図 1 インスリン受容体タンパク質の自己リン酸化能

野生型マウス、インスリン受容体変異ヘテロ接合体マウス、およびインスリン受容体変異ホモ接合体マウスの新生仔肝臓から抽出したインスリン受容体にインスリン刺激を加え、自己リン酸化能を調べた。抗インスリン受容体抗体による免疫沈降物のオートラジオグラム。

本研究では、インスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能を調べ、長

寿命形質を検討した。またその耐性が性ホルモンや食餌制限によって、どのように調節されるのかについて明らかにした。

B. 研究方法

酸化ストレス (高濃度酸素負荷およびパラコート投与)

4 ヶ月齢マウスに対して酸化ストレス耐性能について検討した。酸化ストレスとして、80%濃度酸素負荷を行った。マウスを 80%酸素濃度チャンバー内で飼育し 12 時間毎に生存を確認し比較検討した。また、化学的な酸化ストレスとして、パラコート (70mg/kg/体重) を腹腔内に投与し、2 時間毎に生存を確認した。

MnSOD 活性および mRNA の発現

4 ヶ月齢マウスの肝臓を 2mM EDTA, 2mM EGTA, 2mM PMSF, および 4 $\mu\text{g/ml}$ ロイペチンを含んだ PBS (pH7.4) でホモゲナイズしてサンプルとし、競合インヒビションアッセイで MnSOD、Cu/ZnSOD 活性を測定した。また、mRNA の発現レベルを調べるため RT-PCR を行った。4 ヶ月齢マウスの肝臓から抽出した RNA を逆転写反応させ、cDNA を合成した。MnSOD、Cu/ZnSOD および GAPDH の特異的プライマーを用いて PCR を行った。

卵巣摘出術およびエストロゲン投与

3 ヶ月齢雌マウスに対して腹腔麻酔下 (ネンプタール 40mg/kg 体重) に腹部正中切開にて、卵巣摘出術を施行した。また、3 ヶ月齢雄マウスに対して 17 β -エストラジオール (20mg/kg/週; Sigma 社製) を 1 週間に 1 度ずつ 4 週間にわたって皮下注射した。

体重および臓器別重量測定

臓器特異的に重量変化が無いが検討するために、傍性線脂肪、肝臓、腎臓、心臓、脳を摘出しそれぞれ重量を測定した。測定値は野生型マウスの重量を 100%にしてそれに対して変異マウスの割合で計算した。

食餌制限

インスリン受容体変異マウスにカロリー制限を行った。マウスは4ヶ月齢から食餌を自由摂取量（自由食群）の60%に制限された。

C. 結果と考察

1、インスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能

4ヶ月齢マウスを80%酸素濃度チャンバー内で飼育し、酸化ストレス耐性能を調べた。その結果、インスリン受容体変異マウスは野生型マウスより有意に生存日数の延長を示した。マウスの半数が生存していた日数（50%生存日数）を比較するとインスリン受容体変異雌マウスは8日に対して野生型 ($I_r^{wt/wt}$) 雌マウス6日で、33.3%長く生存していた（図2A）。一方、雄ではインスリン受容体変異マウスが6.5日に対して、野生型マウスは5.5日で、18.8%長く生存した（図2B）。

次にパラコートを腹腔内に投与し、薬剤による酸化ストレス耐性能を調べた。その結果、雌のインスリン受容体変異マウス、野生型マウスともに処理後48時間より死亡し始めた。しかし、72時間以降はインスリン受容体変異マウスが野生型マウスより多く生存していた（図2C）。雄でも同様の傾向を示したが、その差は雌ほどではなかった（図2D）。

これらの結果から、インスリン受容

体変異マウスは雌雄ともに、高酸素負荷による酸化ストレス耐性に加えて、パラコートに対する酸化ストレスにも耐性を持つことが明らかとなった。さらに、酸化ストレスに対する耐性には雌雄差があることが判明し、性ホルモンの関与が示唆された。

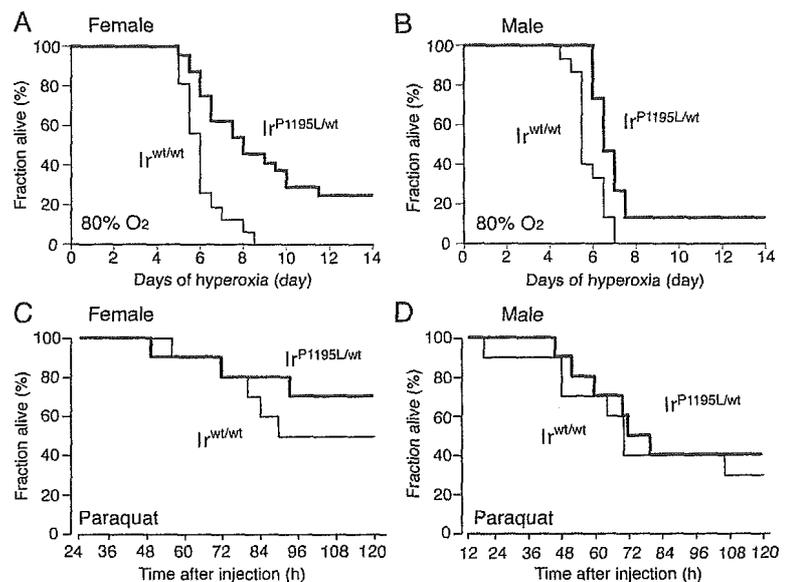


図2 80%酸素負荷実験およびパラコート投与実験
インスリン受容体変異マウスは野生型マウスより酸化ストレス耐性能を獲得し、その傾向は雌でより顕著であった。

2、インスリン受容体変異マウスにおけるMnSOD活性、および遺伝子発現の亢進

酸化ストレス耐性能を獲得したインスリン受容体変異マウスではインスリンシグナル伝達の異常により、抗酸化酵素の発現が亢進している可能性が考えられた。そこで、4ヶ月齢マウスの肝臓組織におけるMnSODとCu/ZnSOD活性およびmRNAの発現を調べた（図3）。その結果、インスリン受容体変異雌マウスの肝臓組織におけるMnSOD活性は野生型に比べて有意

に 39.9% 上昇していた (図 3 A)。インスリン受容体変異雄マウスの MnSOD 活性も野生型マウスに比べて、上昇する傾向にあった (図 3 B)。また、RT-PCR 解析の結果、MnSOD の mRNA の発現も、雌雄ともにインスリン受容体変異マウスで亢進していた (図 3 E)。さらに肺組織においても、MnSOD mRNA の発現亢進が認められた (データは示さない)。一方、Cu/ZnSOD の活性及び発現は雌雄ともに遺伝子型間に差は見られなかった (図 3 C, 3 D)。

していることから、寿命が延長する可能性が期待される。

3、エストロゲンは酸化ストレス耐性を増強する

インスリン受容体変異マウスにおいて酸化ストレス耐性能、および MnSOD 活性に性差を認めたので性ホルモンの影響を調べた。3 ヶ月齢のインスリン受容体変異雌マウスの卵巣を摘出し、4 週間後に、80% 酸素負荷実験および MnSOD の活性測定を行った。

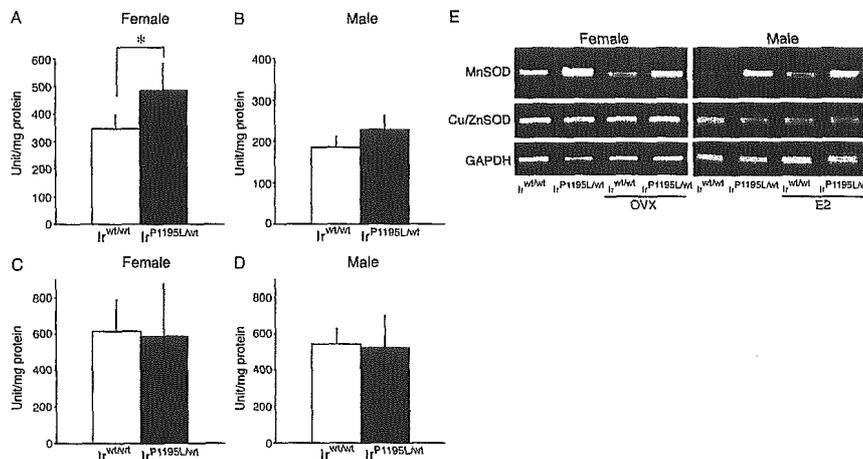


図 3 MnSOD および Cu/ZnSOD 活性および mRNA 発現解析 (A, B) MnSOD 活性はインスリン受容体変異マウスで上昇し、その傾向は雌でより顕著であった。(C, D) Cu/ZnSOD 活性の上昇は認めなかった。(E) RT-PCR による mRNA レベルの遺伝子発現解析。OVX: 卵巣摘出、E2: エストロゲン投与。* P<0.05

線虫やショウジョウバエのインスリン受容体/インスリン様成長因子 1 受容体変異体では SOD 活性が上昇することが報告されている。また Cu/ZnSOD、または MnSOD を運動神経で強制発現させたトランスジェニックショウジョウバエは、寿命が 30-40% 延長することが報告されており、MnSOD の増加が寿命延長に関わっていることが示唆されている。インスリン受容体変異マウスでも MnSOD 活性および発現が増加

その結果、卵巣摘出によって、インスリン受容体変異マウスは、50% 生存日数が 8 日から 6.5 日へ 18.8% 短縮した (図 4 A)。野生型マウスも、50% 生存日数が 6 日から 5.5 日へ 8.3% 短縮したが、インスリン受容体変異マウスほどの短縮は認めなかった (図 4 C)。また、MnSOD 活性は卵巣摘出によ

って野生型マウスは 15.9% 減少、インスリン受容体変異マウスは 20.1% 減少した (図 5 A)。さらに卵巣摘出によって、MnSOD mRNA 量が減少することから、MnSOD の発現は転写レ

ベルで制御されていることが判明した (図 3 E)。

Strehlow らは、マウスの卵巣を摘出すると MnSOD 活性が低下し、さらにエストロゲンを投与すると再度 MnSOD 活性は元のレベルに戻ることを報告している。そこで、性ホルモンの中でエストロゲンに注目し、3 ヶ月齢の雄マウスにエストロゲン (20mg/kg/week) を計 4 回投与し、80% 酸素負荷実験お

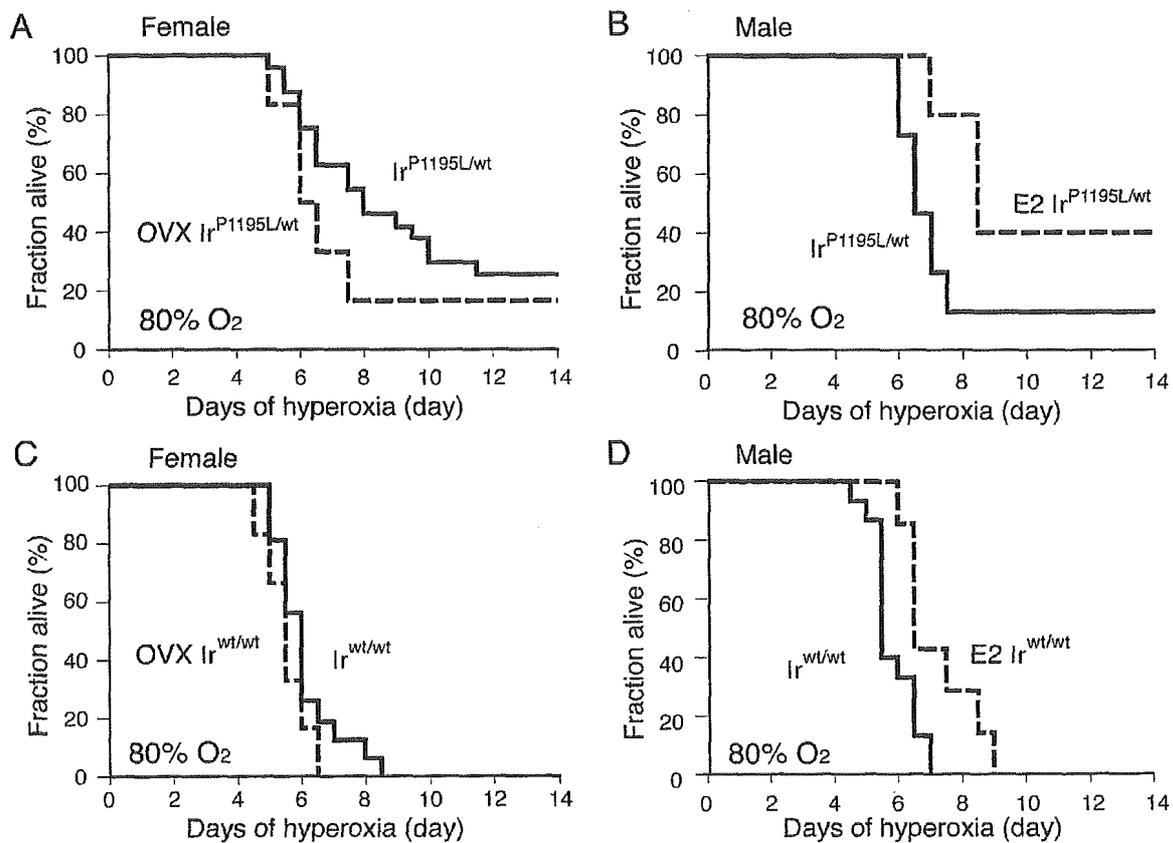


図4 エストロゲンは酸化ストレス耐性能を増強する

(A, C) 卵巣摘出雌マウスにおける80%酸素負荷実験。(B, D) エストロゲン投与した雄マウスにおける80%酸素負荷実験。OVX: 卵巣摘出、E2: エストロゲン投与。

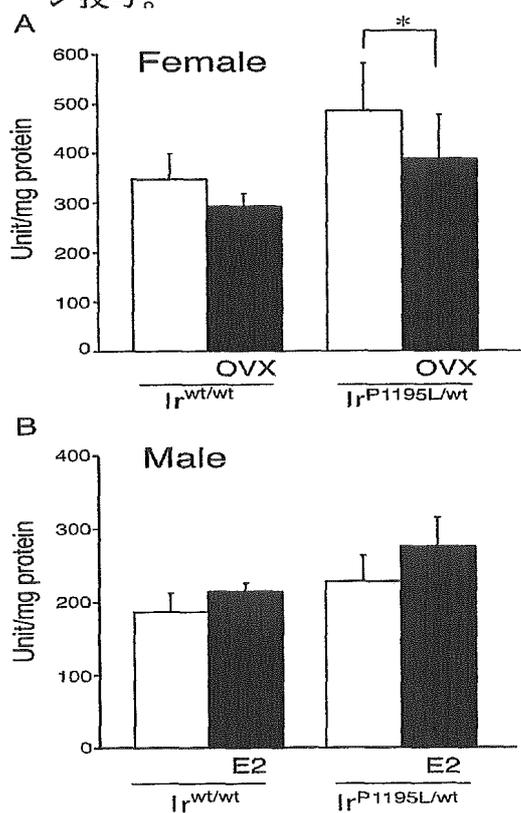


図5 エストロゲンはインスリン受容体変異マウスにおいて酸化ストレス耐性能を増強する

A, 卵巣摘出雌マウスにおけるMnSOD活性。B, エストロゲン投与した雄マウスにおけるMnSOD活性。* $P < 0.05$

よびMnSOD活性を測定した。その結果、エストロゲン投与により、50%生存日数がインスリン受容体変異マウスでは6.5日から8.5日へ30.8%延長、野生型マウスでは5.5日から6.5日へ18.2%延長した(図4B, 4D)。またMnSOD活性はエストロゲン投与により、野生型マウスで10.8%増加、インスリン受容体変異マウスでは20.6%増加した(図5B)。RT-PCR解析より、エストロゲン投与により、インスリン受容体変異マウスが野生型マウスより大きかった。このことは、エストロゲンが、インスリン受容体変異マウスでより大きな影響を及ぼしていることを示し、エストロゲンが直接的、もしくは間接的にインスリンシグナルに作用することで酸化ストレス耐性を増強することが示唆された。

4、カロリー制限によるインスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能

哺乳類においてカロリー制限は脂肪量低下による体重減、寿命延長、および酸化ストレス耐性の亢進をもたらすことが広く知られている。しかし、その分子メカニズムについては、不明な点が多い。一方、脂肪特異的インスリン受容体欠損マウスでは、食餌摂取量が正常にもかかわらず脂肪が減少し、寿命が延長する。この脂肪減少が寿命延長に有利に働いていると考えられている。インスリン受容体変異マウスは酸化ストレス耐性能が亢進し、脂肪細胞でもインスリンシグナルが変化しているので、体重減少の有無や食餌摂取量について検討した。その結果、食餌量は雌雄共に野生型マウスと比較して変わらなかったが(未発表データ)、雌雄共に体重が有意に減少していた(図6A, 6B)。各臓器を摘出

トロゲン投与によるMnSOD mRNAの発現亢進が確認された(図3E)。

これらの結果から、エストロゲンがインスリン受容体変異マウスの酸化防御機構における性差を規定していることが判明した。興味深いことに高酸素負荷に対する50%生存日数およびMnSOD活性の増加率が、いずれも、重量を比較すると、脂肪が有意に減少していた(図6A, 6B)。他の臓器重量に明らかな差は認めなかったため、脂肪量の低下が体重減をもたらしたことが判明した。そこで、インスリン受容体変異マウスの脂肪減少とカロリー制限の間にどのような関係があるかを調べるため、インスリン受容体変異マウスに食餌制限を行った。食餌制限群は4ヶ月齢から食餌を自由摂取量(自由食群)の65%に制限し、約40週間食餌制限を行った。その結果、自由食群の野生型マウスより、食餌制限群の野生型マウスで約40-60%脂肪が有意に減少していた(図6A, 6B)。さらにインスリン受容体変異マウスでも、自由食群の野生型マウスと比較すると約80-90%も脂肪が減少していた(図6A, 6B)。他臓器も食餌制限によって重量の減少を認めたが、脂肪ほどの減少は認めなかった。

さらに、興味深いことに80%酸素負荷実験では、食餌制限した野生型マウスは酸化ストレス耐性能が増加し、自由食群のインスリン受容体変異マウスと同程度まで生存した(図6C, 6D)。また、食餌制限したインスリン受容体変異マウスは、自由食群の変異マウスよりもさらに生存日数が延長した(図6C)。このことから、インスリンシグナルの低下と食餌制限は、お互いが相加的に脂肪減少と酸化ストレ

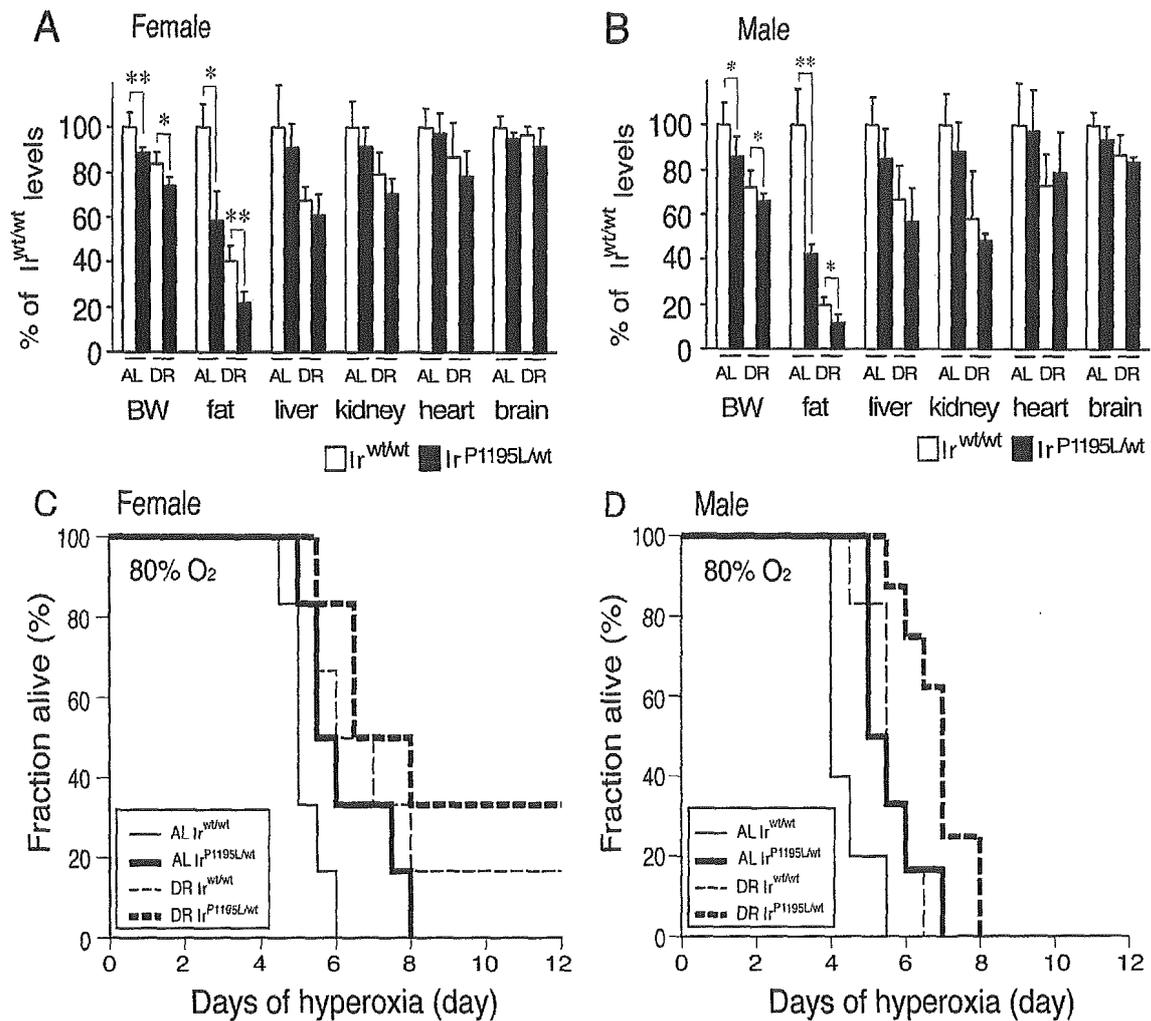


図6 カロリー制限は相加的にインスリン受容体変異マウスの酸化ストレス耐性能を増強する

(A, B) 自由食群 (AL) と食餌制限群 (DR) の体重と主要臓器重量の比較。(A) 雌、(B) 雄。(C, D) 食餌制限による80%酸素負荷生存曲線。(C) 雌、(D) 雄。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ス耐性能を増強させていることが示唆された。

D. 結論

本研究から、哺乳類においてインスリン様成長因子1シグナルだけでなく、インスリンシグナルも抗酸化防御機構を調節し、長寿命形質を制御することが明らかになった。哺乳類において

は、インスリンシグナルの伝達異常はインスリン抵抗性をもたらす糖尿病発症の要因となりうる。そのため、長寿命シグナルとしてのインスリンシグナルの存在は懷疑的に考えられていた。これまでの一連の研究は、インスリンシグナルの欠損は致死に至るが、シグナル伝達の減衰が長寿形質を示すことを明らかにした。また性ホルモンがインスリンシグナルに直接的、または間接的に作用し、長寿形質を増強することから、性ホルモンが寿命制御の一翼を担っていることが強く示唆された。女性が男性よりも長命な要因を説明する一助になると期待される。さらに、食餌制限はインスリンシグナルや性差とは独立したメカニズムで寿命を制御していることが示唆され、遺伝的要因だけでなく、環境要因によって寿命が制御できることを示唆した。

E. 研究発表

1、論文発表

T. Baba, T. Shimizu, Y. Suzuki, M. Ogawara, K. Isono, H. Koseki, H. Kurosawa, T. Shirasawa. Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate the longevity signals to enhance

the resistance to oxidative stress in mice. *J. Biol. Chem.* In press.

2、学会発表

清水孝彦、馬場智規、小河原 緑、白澤卓二

インスリンシグナルとエストロゲンシグナルの酸化ストレス耐性機構.

日本基礎老化学会第27回大会、東京、2004.

T. Shimizu, T. Baba, T. Shirasawa
Insulin signaling and resistance for oxidative stress in mice.

2004 Annual Congress of Korean Society of Gerontology and the 4th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon, Korea. 2004.

馬場智規、清水孝彦、小河原緑、黒澤尚、白澤卓二：インスリン、エストロゲン及び食餌シグナルは協調してマウスの長寿命シグナルを調節している。第27回日本分子生物学会、神戸、2004.

F. 知的所有権の取得

なし

clk-1 欠損マウスの生体リズムに対する CoQ10 の関与

高橋真由美 清水孝彦 白澤卓二

東京都老人総合研究所 分子老化研究グループ

研究要旨 寿命関連遺伝子 clk-1 の欠損マウスではウルトラディアンリズム(細胞分裂速度、心臓の拍動リズム)の遅延が見られる。clk-1 欠損マウスでは CLK-1 により産生されるユビキノン(CoQ)がない為リズムの遅れは CoQ の欠損に起因すると考えられた。そこでウルトラディアンリズムに対する CoQ の影響を検討した。

初代培養したホモマウス由来細胞は、野生型やヘテロ型マウス由来細胞に比べ細胞増殖速度が遅かったが、CoQ10 の添加により野生型やヘテロ型に匹敵するほどに増殖能が回復した。また器官培養したホモマウス胎児の心臓は、野生型やヘテロ型に比べ拍動リズムが遅かったが、CoQ10 投与により拍動リズムの遅れは完全にレスキューされた。さらに CoQ の作用がミトコンドリア機能を介しているか調べるためミトコンドリアの膜電位を測定したところ、野生型の約 60%であったホモマウス由来細胞のミトコンドリア膜電位が CoQ10 添加により有意に上昇することが示された。以上の結果から、マウスのウルトラディアンリズムの調節にはミトコンドリア機能を介した CoQ の関与が示唆された。

A. 研究目的

寿命関連遺伝子 clk-1 の欠損マウスには、線虫同様、初期発生の遅延と 24 時間以内の生体リズムであるウルトラディアンリズム(細胞分裂速度、心臓の拍動リズム)の遅延が見られた。clk-1 の遺伝子産物がミトコンドリアの電子伝達体であるユビキノン(CoQ)の合成酵素であることから、ウルトラディアンリズムの遅れは CoQ の欠損に起因する可能性が考えられた。そこでウルトラディアンリズムに対する CoQ の影響を検討した。

B. 研究方法

胎生 10.5 日目のマウス胎児を酵素処理して細胞に解離し、10%FBS 添加培地で培養した。胎児の遺伝子型は

卵黄囊を用いた PCR により決定した。

細胞増殖は、DNA の定量と細胞への BrdU の取り込みにより測定した。

一方、胎生 10.5 日目のマウス胎児から取り出した心臓は 10%FBS 添加培地で 4 日間器官培養し、実体顕微鏡下で 1 分間の拍動数を測定した。

CoQ の効果は細胞培養には 25 μ M、器官培養には 150 μ M の CoQ10 を培養開始時より培地に添加することによって検討した。

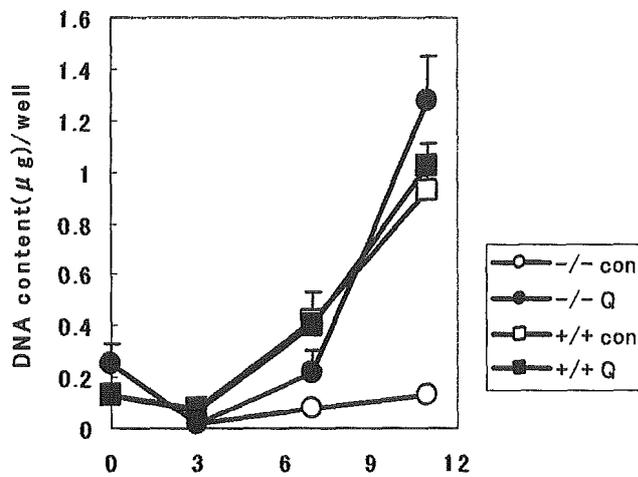
ミトコンドリアの膜電位の測定は、胎生 10.5 日の胎児の解離細胞を 50 μ M CoQ10 を添加した無血清培地で 4 時間培養した後、JC-1 で蛍光染色し共焦点顕微鏡を用いて 580 nm(赤色蛍光,膜電位 > 190mV) と 530 nm(緑色蛍光,膜電位 < 100mV) の蛍

光強度を測定し両者の比(580/530)を求めた。

C. 研究結果

E10.5 日目の *clk-1* 欠損マウス由来 (ホモ) 細胞は野生型マウス由来細胞に比べ、著しい増殖遅延が認められたが、 $25 \mu\text{M}$ CoQ10 の添加により完全

図1 細胞増殖に対するCoQの効果

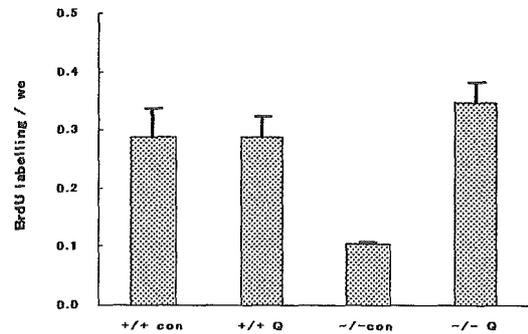


にレスキューされ、野生型の細胞と同等の細胞増殖を示した(図 1)。

ホモマウスにおける増殖の遅れが、細胞分裂頻度の低下によるかを確認するため、培養 4 日目に細胞への BrdU の取り込みを測定した。その結果ホモ細胞への BrdU の取り込みは野生型細胞に比べ有意に低く、ホモ細胞の増殖遅延は細胞分裂頻度の低下に由来することが明らかとなった。また細胞分裂の遅れも培養液への CoQ 添加により完全にレスキューされることがわかった(図 2)。

ウルトラディアンリズムのひとつである心臓の拍動リズムに対する CoQ の効果を検討した結果、ホモマウスの心拍リズムの遅れは、 $150 \mu\text{M}$ の

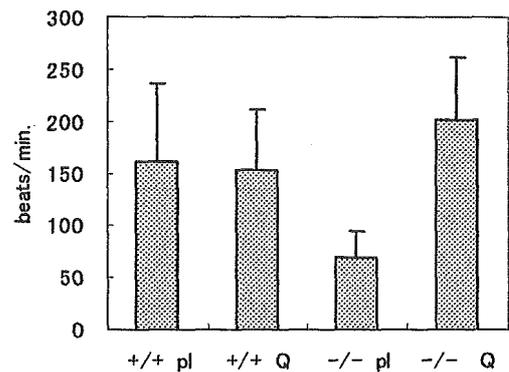
図2 細胞分裂に対するCoQの効果



CoQ10 により完全にレスキューされた(図 3)。

これらウルトラディアンリズム

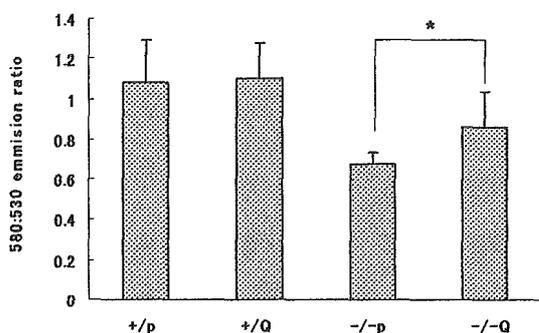
図3心臓の拍動リズムに対するCoQの効果



の遅延に対する CoQ の作用がミトコンドリア機能を介しているか調べるため、ミトコンドリアの膜電位を測定した。無血清培地中の細胞を JC-1 染色し、580 : 530nm の蛍光強度の比を測定した結果、ホモ細胞の膜電位は野生型細胞の約 60% に低下していた。この時、 $50 \mu\text{M}$ MCoQ10 に 4 時間曝露した結果、ホモ細胞のミトコンドリア膜電位は有意に上昇することがわかった(図 4)。

図4 ミトコンドリア膜電位に対する CoQ

の効果



D. 考察

clk-1 遺伝子はミトコンドリア電子伝達体であるユビキノロン (CoQ) の合成酵素であり、clk-1 欠損マウスではユビキノロンが全く合成されないため、clk-1 欠損マウスで見られた生体リズム遅延が CoQ の欠損による可能性が考えられた。

野生型に比べ著しい遅れが見られたホモ細胞の細胞増殖速度、細胞分裂頻度、心臓の拍動リズムが CoQ10 添加によりほぼ完全にレスキュー可能であったことから、生体リズムの調節にユビキノロンが関与していることが、強く示唆された。さらに、ミトコンドリア膜電位の測定結果は、CoQ10 によりホモ細胞の膜電位が有意に上昇することを示しており、CoQ はミトコンドリアの機能を介してウルトラディアンリズム調節している可能性が示唆された。

E. 結論

マウスのウルトラディアンリズムの調節にはミトコンドリア機能を介して CoQ が関与する可能性が示唆され

た。

F. 学会発表

1. 高橋真由美、中井大輔、野尻英俊、森泉栄子、白沢卓二：哺乳動物における clk-1 遺伝子のアポトーシスと生体リズムへの関与、日本基礎老化学会第 27 回大会

2. 高橋真由美、清水孝彦、森泉栄子、白沢卓二：ユビキノロン (CoQ10) は clk-1 欠損マウスにおけるウルトラディアンリズムを完全にレスキューする、日本分子生物学会第 27 回大会

内山 智・野尻英俊・清水孝彦・白澤卓二

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所

研究要旨

本研究では老化や活性酸素を原因とする様々な疾患に関与する遺伝子群を明らかにすることを目的とし、組織特異的 Mn スーパーオキシドジスムターゼ (MnSOD) 欠損マウスの遺伝子発現を解析した。心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイル解析の結果、心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの心臓では発現量が 2 倍以上増加していた遺伝子は 419 遺伝子、発現量が 1/2 以下に減少していた遺伝子は 118 遺伝子であった。また、遺伝子発現量が変動した遺伝子群には既知の心疾患関連遺伝子が含まれていた。本研究結果は組織特異的 MnSOD 欠損マウスが疾患モデルマウスとして有用であることを示しており、組織特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイル解析することは、SNP 解析の候補遺伝子を選抜するための有用な手段となることを示している。また、種々の肝疾患ではその発症に活性酸素が関与すると考えられていることから、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスの肝臓の病態の組織学的および生化学的な解析を行った。その結果、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスの肝臓組織では脂質の蓄積が確認され、Cu/ZnSOD が活性酸素の除去に中心的な役割を担っていることが示唆された。

A. 研究目的

活性酸素による分子レベルでの傷害の蓄積は、老化や様々な疾患の主要な原因の一つであると考えられている。ミトコンドリアのマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (MnSOD) は活性酸素種の一つであるスーパーオキシドを処理する酵素である。本研究では組織特異的 MnSOD 欠損マウス (Fig. 1) の遺伝子発現を解析することにより、老化や活性酸素を原因とする様々な疾患に関与する遺伝子群を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. 心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイルの解析

16 週齢の心筋特異的 MnSOD 欠損マウスおよび

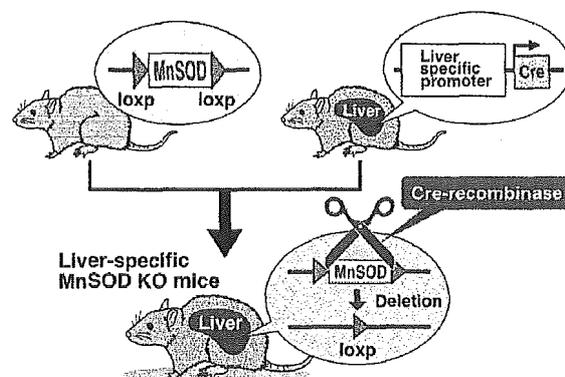


Fig. 1. 組織特異的 MnSOD 欠損マウス

野生型マウスの心臓から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析用サンプルを調製した。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析には Affimetrix 社製の MOE430 2.0 を使用した。得られたデータの統計処理は GeneSpring 6.0 を用いて行った。

2. 肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスおよび

Cu/ZnSOD 欠損マウスの病態解析

8 週齢の肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス、Cu/ZnSOD 欠損マウス、これらのマウスの交配により作製した二重欠損マウスの肝臓トリグリセライド量およびコレステロール量、血清 ALT 活性および血清トリグリセライド量、肝臓重量を測定し、野生型マウスと比較した。

3. 高脂肪食投与が肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスおよび Cu/ZnSOD 欠損マウスに与える影響

野生型マウス、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス、Cu/ZnSOD 欠損マウス、二重欠損マウスに対して、高脂肪食を生後 4 週目から 4 週間投与し、病理学的解析および血清トリグリセライド濃度等の生化学的解析を行った。高脂肪食として重量比で 20% のラードを含むマウス用飼料を用いた。この飼料に含まれる脂肪はカロリー比では 38% であり、米国での脂肪分の平均摂取量とほぼ同程度である。

C. 結果と考察

1. 心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイルの解析

心筋特異的 MnSOD 欠損マウスについてその遺伝子発現プロファイルを解析した。当研究室における解析では、心筋特異的 MnSOD 欠損マウスは生後半年以内に拡張型心筋症を伴い死亡することが明らかにされている。また、組織学的および生化学的解析から、繊維化の進行や SDH 活性の低下などが観察され、さらに電子顕微鏡による観察ではミトコンドリアの形態異常が確認されている。

野生型マウスと比較して、心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの心臓において発現量が 2 倍以上増加していた遺伝子は 419 遺伝子であった。発現量が増加していた遺伝子は主に細胞の成長や維持、接着分子、器官形成に関連する遺伝子群であった。

これらの遺伝子群の発現量増加は心筋の繊維化の進展を反映しているかもしれない。また、心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの心臓において発現量が 1/2 以下に減少していた遺伝子は 118 遺伝子であり、uncoupling protein 3 や fructose biphosphatase 2 などが含まれていた。発現量の変動した遺伝子の中から選択した 5 種類の遺伝子について RT-PCR により発現量の確認を行ったところ、DNA マイクロアレイの結果と一致した。また、遺伝子発現量が増加した遺伝子には ATP-binding cassette, sub-family C, member 9 (Abcc9) や angiotensin converting enzyme (Ace), actin alpha 1 などの心疾患との関連が既に報告されている遺伝子が含まれていた。これらの結果は組織特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイルを解析することが、SNP 解析の候補遺伝子を選抜するための有用な手段となることを示唆している。

2. 肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスおよび Cu/ZnSOD 欠損マウスの病態解析

非アルコール性脂肪肝炎などの肝疾患ではその発症に活性酸素が関与すると考えられている。筆者らは既に Cu/ZnSOD 欠損マウスの肝臓、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスと Cu/ZnSOD 欠損マウスの交配により作製した二重欠損マウスの肝臓において脂肪の蓄積が促進していることを OilRed O 染色および肝組織中のトリグリセライド量の定量により確認している。そこで本研究では遺伝子発現プロファイル解析の前段階として、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスと Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスの病態の組織学的および生化学的解析を行った。

肝臓重量について測定した結果、野生型マウスと肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスでは肝臓重量が

それぞれ体重の $4.1 \pm 0.4\%$ 、 $4.2 \pm 0.4\%$ であり有意差はみられなかったが、Cu/ZnSOD 欠損マウスでは $5.0 \pm 0.4\%$ 、二重欠損マウスでは 5.5 ± 0.6 であり、野生型マウスの肝臓重量と比較すると有意に重くなっていることが明らかとなった ($p < 0.001$)。また、肝機能障害のマーカーである血清 ALT 活性を測定した結果、野生型マウスと肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスの ALT 活性はそれぞれ 8.3 ± 5.1 IU/L と 7.8 ± 3.6 IU/L であり有意な差はみられなかったが、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスの ALT 活性はそれぞれ 34.4 ± 27.0 IU/L、 26.0 ± 15.5 IU/L であり、野生型マウスの ALT 活性と比較すると有意に活性が高かった ($p < 0.01$)。これらの結果は、Cu/ZnSOD が肝臓においてスーパーオキシドの処理に重要な働き担っていることを示している。次に肝臓中に含まれるトリグリセライド量を測定した結果、野生型マウス (10.5 ± 3.2 mg/g liver) および肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス (13.7 ± 4.3 mg/g liver) では有意な差は認められなかった。一方、Cu/ZnSOD 欠損マウスの肝臓トリグリセライド含量は 17.1 ± 5.2 、二重欠損マウスの 24.6 ± 10.1 であり、野生型と比較して有意に肝臓のトリグリセライド含量が増加していることが示された ($p < 0.01$)。また、肝臓組織中のコレステロール含量はトリグリセライド含量の結果と同様の傾向を示した (データは示さない)。一方、血清中のトリグリセライド量は野生型マウス (67.7 ± 13.0 mg/dl)、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス (78.0 ± 13.9 mg/dl)、Cu/ZnSOD 欠損マウス (67.2 ± 13.5 mg/dl)、二重欠損マウス (62.4 ± 11.6 mg/dl) のいずれの genotype 間においても有意差は認められなかった。また、これらのマウスに Triton WR1339 処理を行い、肝臓からのトリグリセライドの分泌速度の測定した結果、

Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスでは肝臓からのトリグリセライドの分泌量が顕著に低下していることが示された。これらの結果は肝細胞内の SOD、特に Cu/ZnSOD の欠損が、肝臓における脂質代謝に影響を及ぼすことを示している。

肝臓での脂肪の蓄積の原因が肝臓から血中へのリポプロテインの分泌量の低下であることが示唆されたことから、肝臓からのリポプロテインの分泌に重要な働きを担っているアポリポプロテイン B100 の血漿中での含量をイムノブロットングにより解析した。その結果、野生型マウスおよび肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスではアポリポプロテイン B100 は検出されたが、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスではその含量が減少していることが確認された。このことから、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスでは、肝臓でのアポリポプロテイン B100 の発現量の低下、もしくは分解が促進していることが示唆された。そこでアポリポプロテイン B100 の肝臓からの分泌に関与しているミクロソームトリグリセリド転送蛋白質量をイムノプロットにより解析したところ、野生型マウス、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス、Cu/ZnSOD 欠損マウス、二重欠損マウスのいずれにおいても発現量に差は認められなかった。今後は肝臓でのアポリポプロテイン B の発現量をタンパク質レベル、mRNA レベルで検討するとともに、アポリポプロテイン B の合成・分泌に関与していると考えられている Grp78/BiP、ER-60、ubiquitin、PDI 等の発現量をタンパク質レベル、mRNA レベルで検討することが必要である。

3. 高脂肪食投与が肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスおよび Cu/ZnSOD 欠損マウスに与える影響

肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスへのストレスの負荷による非アルコール性脂肪肝炎、肝硬変、肝細胞癌等の肝疾患モデルマウスの確立を目的として以下の実験を行った。

高脂肪食投与後のマウスの肝臓内のトリグリセライド量を測定した結果、野生型マウスおよび肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスではそれぞれトリグリセライド含量は 9.4 ± 2.6 mg/g liver、 10.7 ± 2.3 mg/g liver であり、通常食マウスのトリグリセライド含量と同程度の値であった。一方、Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウスでは高脂肪食投与後のトリグリセライド含量は、それぞれ 33.4 ± 10.7 mg/g liver、 44.7 ± 10.3 mg/g liver であり、それぞれ通常食飼育下よりもトリグリセライド含量が平均値で 16.3 mg/g liver、20.1 mg/g liver 増加していた。また Cu/ZnSOD 欠損マウスおよび二重欠損マウス肝臓組織を Oil Red O 染色により解析した結果、通常食投与下では大部分の脂肪滴が小滴性であったのに対し、高脂肪食投与後においては多数の大滴性の脂肪滴が観察されるようになり、肝臓への脂肪の蓄積が亢進していることが示された。また、アザン染色により解析した結果、いずれのマウスにおいても肝臓の繊維化は観察されなかった。今後は食餌中の脂肪含量の増加、四塩化炭素等の肝障害を引き起こす薬剤の投与、抗フルクトース食投与等により肝障害を誘発したモデルマウスを作製し、そのモデルマウスの遺伝子発現プロファイルを解析していく予定である。

D. 結論

心筋特異的 MnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイルの解析の結果、本モデルマウスにおいて既知の心疾患関連遺伝子の遺伝子発現量が有意

に変動していることが明らかとなった。このことは本モデルマウスが病態モデルマウスとして非常に有用であることを示している。今後はヒト検体を対象として本年度の解析結果より得られた遺伝子群の SNP 解析を行っていくことが必要である。また、肝臓においては Cu/ZnSOD が活性酸素の除去に中心的な役割を担っていることが示唆された。今後は肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスおよび Cu/ZnSOD 欠損マウスの遺伝子発現プロファイルについて DNA マイクロアレイを用いて検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Nojiri H., Shimizu T, Tachibana T, Ishikawa H., Ohta Y., Sami M., Kurosawa H., Kahn R., Takuji Shirasawa T. Oxidative stress confers heart failure in aging heart with mitochondrial respiratory dysfunction in mice. (投稿中)

2. 学会発表

1. 内山 智、清水孝彦、白澤卓二 酸化ストレスにより発症する脂肪肝モデルマウスの解析 第 27 回分子生物学会、神戸、2004
2. 野尻英俊、清水孝彦、黒澤尚、白澤卓二 筋肉特異的 MnSOD 欠損マウスの解析 第 27 回分子生物学会、神戸、2004
3. 内山 智、清水孝彦、白澤卓二 酸化ストレスにより発症する脂肪肝モデルマウスの解析 日本農芸化学会 2005 年度大会、札幌、2005

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

「高齢者疾患病理における遺伝素因の解明」に関する研究

分担研究者 沢辺元司 東京都老人医療センター剖検病理科医長

研究要旨

老年病には複数の遺伝的素因と生活習慣の相互作用により発症するものが多く疾患関連遺伝子を同定することが老年病の予防法・治療法の確立に有用である。我々は疾患関連遺伝子を同定するために高齢者剖検症例を用いて老年病と疾患関連遺伝子の遺伝子多型の関連について順次解析を進めてきた。この研究を更に推進するために新たに老年病剖検データベース（GEAD）を開発した。GEADは平均年齢80歳の高齢者連続剖検例1,650例（男性, 901例, 女性749例）を用いて作成されており、臨床診断（老年病26疾患）、飲酒歴、喫煙歴、CDR、病理所見（720項目）、肺気腫度、動脈硬化度、遺伝子多型データなどの項目が含まれる。GEADは対象が病理解剖由来の詳細な医学情報と遺伝子多型データを含むユニークなデータベースであり遺伝子多型解析に特化した基盤データベースである。またこれらのデータの一部は老年病SNPデータベース（JG-SNP）としてインターネット上で公開されている（<http://www.tmg.h.metro.tokyo.jp/jg-snp/japanese/top.html>）。遺伝子多型データベースとしてはdbSNP、J SNPをはじめとして複数のデータベースがインターネット上で公開されているが、疾患との関係で公開されているものはない。我々は2003年4月にGEADを構築し、JG-SNPをインターネット公開開始したが、その後、臨床病理データ、遺伝子多型データを追加しさらに十分な解析を加えたので報告する。

A. 研究目的

高齢者人口が増大し続ける今日、高齢者に多発する疾患の予防と治療の必要性が増している。これらの疾患の多くは遺伝的素因と外的因子との相互作用のもとに発症すると考えられている。老人医療センターは日本で最も多くの病理解剖を行う施設の一つであり1973年より7,500例以上の症例を剖検しており、その臨床病理学的所見を病理解剖データベース「ANATOMY」に登録してきた。我々はこのデータベースをもとに老年病と疾患関連遺伝子の遺伝子多型の関連を検討してきており、既にapoE, PON1, ESR1の遺伝子多型とアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連を報告した（#1-4）。疾患関連遺伝子の遺伝子多型研究においては豊富で正確な臨床病理学的情報が何よりも不可欠である。本研究は病理解剖症例から得られた臨床病理情報データ、疾患関連遺伝子の遺伝子多型データを含むデータベース化を構築し十分な解析を加え内容を充実させることを目的とした。更に得られた情報をweb上で公開し広く医学研究ならびに医療の進歩に寄与することとした。

現在インターネット上で公開されている遺伝子多型関連のデータベースは複数存在する。例えば米国NCBIが管理しているdbSNP（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>）、東京大学医科学研究所ヒト

ゲノム解析センターで開発された日本人SNPデータベース（JSNP：<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>）がある。2005年3月の時点でdbSNPでは505万、JSNPでは19.5万件と膨大な数のSNPが登録されており、またJSNPでは約半数のSNPについてアレル頻度が公開されている。しかし、それらのデータベースやその他のデータベースではSNPとその表現型である個人差あるいは病気などの情報は全く含まれていない。

我々の構築した「老年病剖検データベース」（GEAD）の最も大きな特徴は病理解剖材料により検討された詳細な医学情報を含む点にあり、以下の特長を有する：

1. 病理診断は以前より最終診断とされており、臨床診断に比べてはるかに高精度の診断が可能である。
2. 病理解剖では全身の臓器を採取し、くまなく検索するため臨床診断のついていない、例えば潜伏癌の症例が多数含まれている。
3. 対象症例は平均年齢が80歳とほぼ日本人の平均寿命に匹敵する高齢者集団である。従って超高齢者でのみ発症する一部の老年病を除いて、生涯で発症しうる可能性のある病気はほとんど発症していると推定される。
4. 90歳以上の対象例を多数含み、長寿関連遺

伝子の同定が可能である。

このGEADをもとに、インターネット公開用データベース、「老年病SNPデータベース (JG-SNP)」を科学技術振興機構 (JST) と共同開発し2003年4月より運用しており、既に内容を報告している (#5, 7)。

B. 研究方法

(1). 対象

対象は東京都老人医療センターにおける病理解剖例1,650例である。男901例, 女749例よりなり平均年齢は男79歳, 女82歳である。センターにおける平均剖検率は35.7%である。

(2). DNAの調整・保存

剖検時に腎皮質, 肝, 心室心筋 (左室側壁), 食道粘膜, 大脳皮質 (後頭極) の5臓器より小片を採取し-80度で凍結保存している。また死亡前1週間前の血清も75%の症例において凍結保存されている。遺伝子解析に用いるDNAは腎皮質よりPhenol-chloroform法により抽出し凍結保存している。

(3). ハードウェア・ソフトウェア構成

GEADはスタンドアローンのWindows 2000 NTサーバー内に設置しOracle8i Workgroup Server for Windows NT R8.1.6をデータベースアプリケーションとして用いた。また統計解析にはSAS system for Windows V8を用いた。

(4). 倫理的配慮

病理解剖時に検体を「遺伝子研究を含む医学研究に用いる」旨の病理解剖承諾書を遺族より得ている。日本においては死体解剖保存法により病理解剖検体を医学研究, 医学教育に用いることが認められている。GEADは匿名化機能を有しており患者IDに対し発行された匿名化IDで情報が管理されている。個々の遺伝子多型研究およびJG-SNPの公開について東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1). データベース構成

このデータベースの対象は老人医療センターの病理解剖症例という特定の集団であり, その母数も1,650例と多くない。従って個人を特定しやすい状況にあり, また疾患情報や遺伝情報などの最も機密性の高い個人情報を含んでいる。そこで個人情報漏洩を防止する最大限の努力が必要となりインターネット公開用データベース, 「老年病SNPデータベース」, を別に設置することになった。データベース構成を図1に示す。

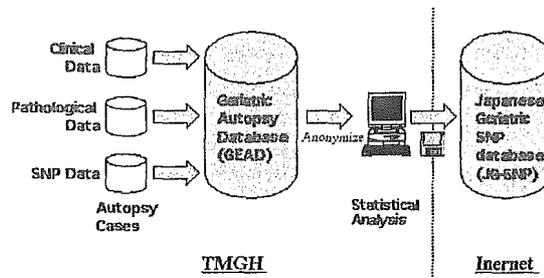


図1. データベース構成

(2). 老年病剖検データベース (GEAD)

GEADの対象は1,650件の病理解剖症例であり, 内容としては以下の項目が含まれている:

1. 患者情報: 性別, 死亡時年齢, 剖検までの死後時間, 死亡日, 生年月日
2. 臨床情報: 老年病26疾患の有無, CDR, 喫煙歴, 飲酒歴. 老年病26疾患としては以下の疾患・病態が含まれる: 虚血性心疾患, 心房細動, 変性性弁膜症, 高血圧症, 動脈瘤, 閉塞性動脈硬化症, 痴呆症, 脳血管障害, パーキンソン病, 糖尿病, 高脂血症, 低栄養, 骨粗鬆症, 変形性骨関節症, 誤嚥, 慢性閉塞性肺疾患, 特発性間質性肺炎, 尿路感染, 前立腺肥大症, 褥瘡, 肺癌, 胃癌, 大腸癌, 造血器系悪性腫瘍, 白内障, 緑内障
3. 病理所見: 全身の病理学的所見で720項目よりなる。ここで用いたコード表は高齢者剖検例に見られる高頻度の病理解剖所見を独自にコード化したものであり, 半定量的に評価した値を入力した。8血管の粥状硬化度 (左右の血管別硬化度を含む), 冠状動脈狭窄度, 臓器重量, 体腔液の容量も含まれている。
4. 遺伝子多型データ: 現在ACE, PON1など12遺伝子, 38遺伝子多型データである。

(3). 老年病SNPデータベース (JG-SNP)

JG-SNPの項目として以下が含まれている:

1. 臨床診断: 上記老年病26疾患の有無
2. 病理診断: 動脈硬化症, 胃潰瘍, 肺炎, 胆石症, 尿路感染症, 7臓器の癌 (肺癌, 胃癌, 大腸癌, 肝癌, 腎癌, 前立腺癌, 甲状腺癌) の12疾患の有無
3. 遺伝子多型データ: ACE, PON1など12遺伝子, 38遺伝子多型データである。
4. またこのホームページでは老年病の特徴, 遺伝子多型の概説, 各疾患に関する説明, 検討した遺伝子多型に関する情報, 倫理的配慮, 共同研究の呼びかけなどが掲示されている。

JG-SNPの主な機能として以下が挙げられる:

1. 臨床診断, 病理診断の有無による遺伝子多型の分布をデータベースとして検索可能であり, 得られた検索結果をCSVファイルとしてダウンロード可能である.
2. 特定した遺伝子多型に対応した臨床診断, 病理診断の有無をデータベースとして検索できる.
3. 検索時には性別, 年齢階級を特定して検索可能である.
4. 個人の特定を防止し, 個人情報を守るために特定の疾患の特定のSNPに該当する症例が1例の場合は該当症例が表示されない仕組みになっており, その症例は総計表からはずさされている.

JG-SNPのホームページのURLは以下に示すものであり, JG-SNPのホームページのトップ画面を図2に示す.

日本語版: <http://www.tmgh.metro.tokyo.jp/jg-snp/japanese/top.html>

英語版: http://www.tmgh.metro.tokyo.jp/jg-snp/english/E_top.html

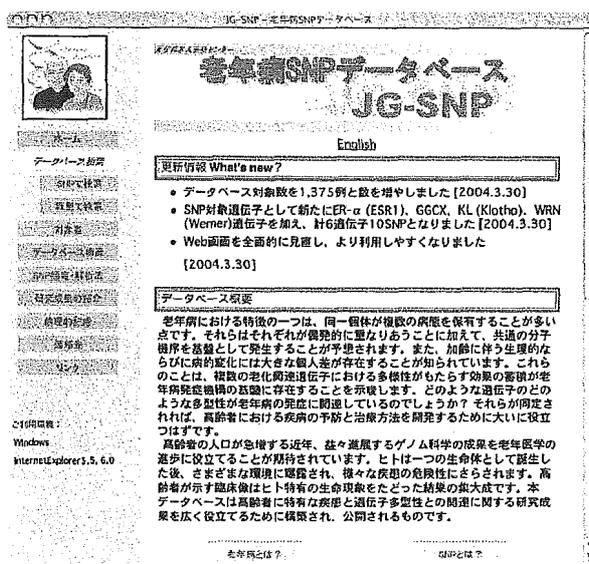


図2. JG-SNPの日本語トップ画面

D. 考察

我々は老年病の遺伝子多型研究に特化した臨床病理データベースを構築した. このデータベースでは全ての臨床病理学的情報がコード化, 定量化, 半定量化されており統計解析が容易となっている. また, 研究対象を病理解剖症例に限定し, 症例数は多くないものの, 他では得られない病理データ, 例えば動脈硬化度, 肺気腫度, ラテント癌などのデータを含んでいる. 遺伝子多型研究では対象となる症例での対象疾患の特徴を十分に解析していることが前提となる. 動脈硬化度に関しては半定量的評価方法を確立しており(#6), 特に性差, 年齢との関係については学会報告した(#8).

これらの研究成果の社会還元を目的として我々のデータをweb上で公開した. このデータベース(JG-SNP)では老年病や遺伝子多型に興味のある一般の方から, 医学関係者, 生物学関係者, 遺伝子多型研究者まで広い範囲の方々を利用対象となる. 一般の方々では老年病における遺伝子多型の意義について理解が容易なように十分な説明が示されている. また個々の老年病についても簡単な説明が加えられており内容を知ることが出来る. 医学関係者にとっては老年病の背景となる疾患関連遺伝子の種類や遺伝子多型研究の現状を知ることができる. 生物学関係者にとっては老年病に関する知識を得ることができ, 遺伝子多型研究の現状を知ることができる. 遺伝子多型研究者にとってこのデータベースの持つ意義は最も高い. 特に研究者にとって関心のある疾患関連遺伝子のSNPについて研究者自身のデータと比較することが可能でかつ対象疾患における頻度分布を知ることができる.

老年病SNPデータベースとして以下の活用法が考えられる:

1. 老化・老年病関連遺伝子のSNP頻度情報を得ることが出来る.
2. 老化・老年病関連遺伝子のSNPに対して老年病との相関解析(患者-対照研究)が可能である.
3. 特定の疾患に関して逆に登録済みの老化・老年病関連遺伝子のSNP頻度を知ることが出来る.
4. 特定の老年病と候補遺伝子SNPとの関連が特定できればその病因, 発生病理の解明につながり, ひいては老年病の予防, 治療が可能となる.

E. 結論

分子生物学, 分子遺伝学の進歩により膨大なゲノム情報や遺伝子多型情報をインターネット上で得ることが出来るようになりその情報の管理, 解析技術も急速に進歩している. 一方表現型全体はGenomeと対比してPhenomeと呼ばれるが, しかしPhenomeとして何を選択するかについては現在さかんに論議されている. Phenomeの内容としては医学研究推進の立場から医学情報が主に選ばれている. 我々の構築した臨床病理・遺伝子多型データベース(GEAD)は, 遺伝子多型研究に特化したデータベースであり臨床診断, 病理所見, 遺伝子多型データを登録している. GEADは病理解剖例を対象とするため症例数に厳しい制限が加わる. そこで症例数を増加するとともに, 詳細な半定量的病理学的所見を加え, 詳細な分析を加えた. さらには研究成