

200500293 B

厚生労働科学研究補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者疾患病理における遺伝素因の解明

平成16年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 白澤卓二

平成18年（2006年）3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

1. 心筋、骨格筋特異的 MnSOD 欠損マウスの解析・・・・・・・・・・ 1  
船越政史、野尻英俊、清水孝彦、白澤卓二  
東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー研究チーム
  2. 病理解剖例を用いた老年病関連遺伝子多型による関連解析・・・・・・・・ 5  
沢辺元司 東京都老人医療センター
  3. 高齢者消化管腫瘍に関連する遺伝子の多型解析・・・・・・・・ 12  
新井 富生 東京都老人医療センター
  4. 老年病発症における遺伝子多型の意義に関する研究・・・・・・・・ 17  
細井孝之 国立長寿医療センター先端医療部長
  5. 老人性疾患と遺伝子多型・・・・・・・・ 22  
村松正明 東京医科歯科大学
- 
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・ 24
  - III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・ 25

研究分担者 船越政史、野尻英俊、清水孝彦、白澤卓二

東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー研究チーム

### 研究要旨

老化の原因は、活性酸素によるタンパク質や DNA、脂質などの生体成分に酸化ストレスが蓄積することが主な原因であると考えられている。特に糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病などをはじめ加齢依存的に発症する疾患と活性酸素との関係が研究され議論を呼んでいる。MnSOD はミトコンドリアに局在し ATP の産生過程で漏れ出てくる活性酸素種の  $O_2$  を  $H_2O_2$  に変換する酵素である。我々は生体組織における  $O_2$  の影響を長期的に解析するために Cre-loxP system を用いて組織特異的に MnSOD を欠損するマウスを作成することに成功した。本研究では Muscle creatin kinase (MCK) プロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを心筋、骨格筋特異的に発現させることにより心筋、骨格筋特異的に MnSOD を欠損させるマウスを作製した。寿命や心機能解析、組織学的解析、および活性酸素種発生量や ATP 産生量などの生化学的解析を行い、心筋及び骨格筋内での MnSOD の役割、 $O_2$  の病理的意義を明らかにした。

### A 研究目的

心不全は罹患率 1 - 2 % と世界中で人類を苦しめている。しかしながら画期的治療法が確立していないのが現状で死因のトップを占めている。心不全のメカニズムは数多くの研究がなされており活性酸素が起因しているとの報告があるが結果が千差万別でありまとまった見解が未だに見出されていない。結果が一様でない理由の一つとして適したマウスモデルがないことが挙げられた。

活性酸素種を処理する酵素の欠損モデルは今までいくつか報告されているが細胞質に局在し活性酸素種の  $O_2$  を  $H_2O_2$  に変換する酵素 Cu/ZnSOD、 $H_2O_2$  を水に変換するカタラーゼやグルタチオンの欠損マウスは明白な形態異常を示さず、またミトコンドリアに局在し  $O_2$  を  $H_2O_2$  に変換する酵素 MnSOD のノックアウトマウスでは様々な異常により新生児期に死亡し解析が困難であった。そこで我々は心臓特異的に MnSOD を欠損させるマウスを作製しその形態を解析することで心筋内での活性酸素障害メカニズムの解明を目的とし実験を行った。

### B 研究方法

Cre-loxP system を用いて心筋、骨格筋特異的 MnSOD 欠損マウスを作製した。MnSOD 遺伝子を loxP 配列ではさんだマウスと心筋特異的に Cre 蛋白を発現する Muscle creatin kinase (MCK) プロモーター Cre トランスジェニックマウスを交配した。交配により生まれてきたホモマウスは DNA とタンパク質レベルで MnSOD が心筋特異的に欠損していることを確認した。マウスの解析は解剖学的、組織学的、生化学的に解析し、さらに遺伝子発現の変化を解析した。

### C 研究結果と考察

ホモマウスは 8-22 (平均 15.4) 週で死亡した。心臓は 8 週の時点で左室内径短縮率

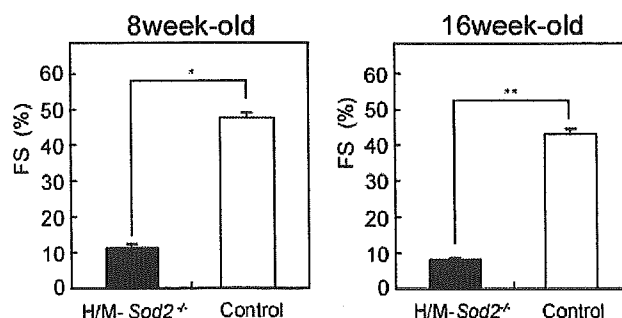


図1



図2

しく拡大し、肥大を伴わない拡張型心筋症を示した(図2)。この週齢の定常時一日運動量をランニングマシン走行距離で測定するとホモマウスの活動性は著しく低下していた。これらの結果より心筋特異的MnSOD欠損マウスは活動性低下を伴う進行性の拡張型心筋症を呈することが分かった。

組織学的所見として心筋細胞の不整配列、細胞の膨化、変性像、細胞辺縁の繊維化が明らかとなった。アポトーシスを検出するTUNEL染色(図3上)、ウェスタンブロッティングによる活性型カスパーゼ3発現の確認では明らかな差が認められず(図3下)、電子顕微鏡による核形態の観察においても、クロマチンの凝集などのアポトーシス様の変化は見られなかった。(図3中)。

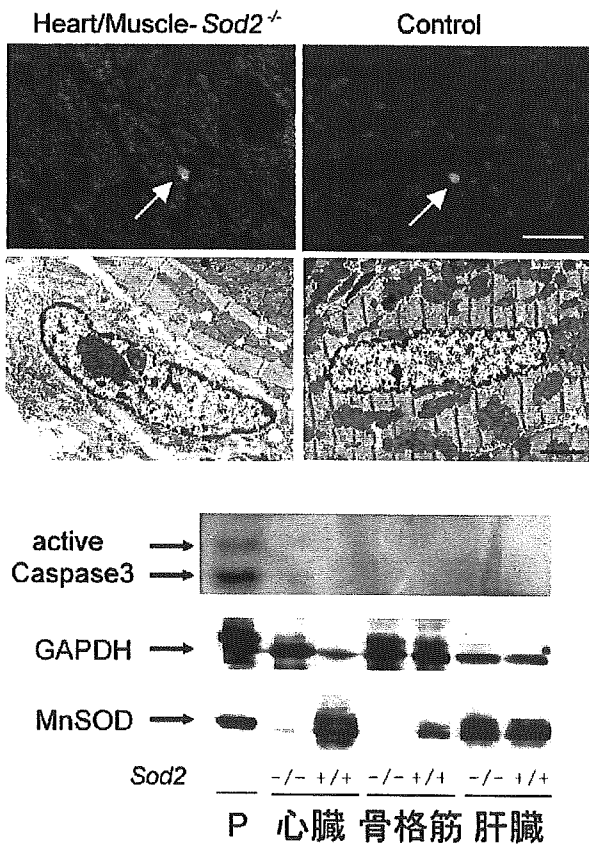


図3

電子顕微鏡ではミトコンドリアのサイズが小さくなり、数が増加していた。随所にミトコンドリアの変性、欠落した部分があり、クリステは中央に収束するような異

常構造を示していた(図4)。これらはミト

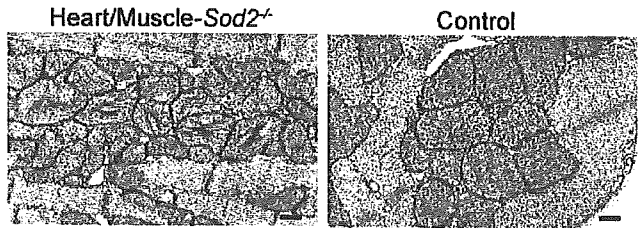


図4

コンドリア内での代謝異常、呼吸機能障害の存在を示唆するものと考え、心筋凍結切片による呼吸鎖酵素活性染色、心筋細胞から単離したミトコンドリアの呼吸酵素活性、ATP生産量の測定を行った。SDH(複合体II)活性は著しく低下しているのに対

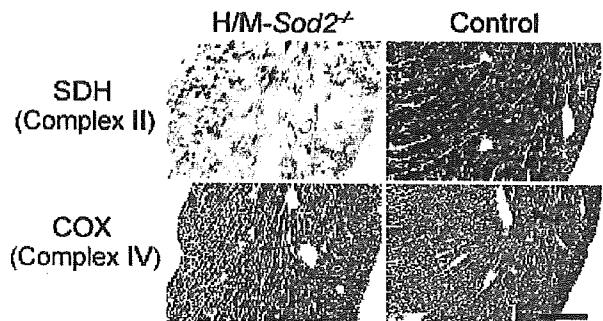


図5

しCOX(複合体IV)活性は変化なく選択的な呼吸機能障害が起こっていることが分

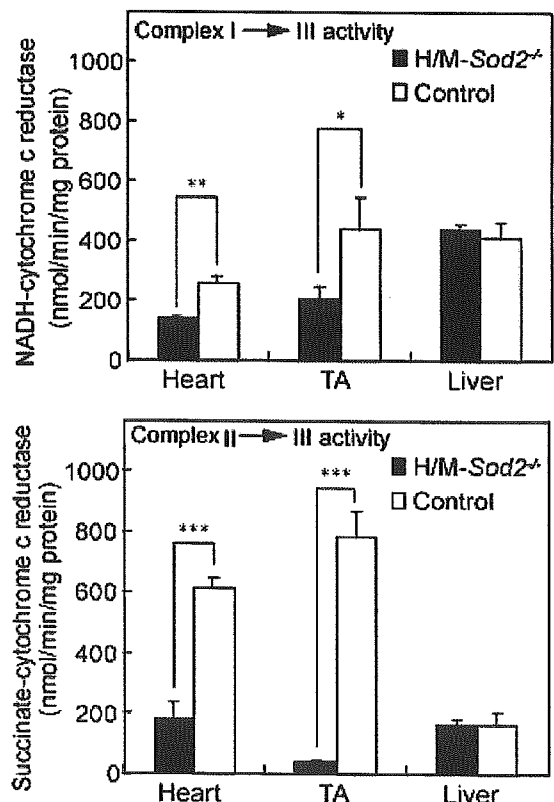


図6

かった (図 5)。呼吸鎖酵素活性を測定すると I→III 活性 (図 6 上)、II→III 活性 (図 6 下) とともに有意に低下していた。ATP 生産量はホモマウスの心臓で約 50% に減少していた (図 7)。

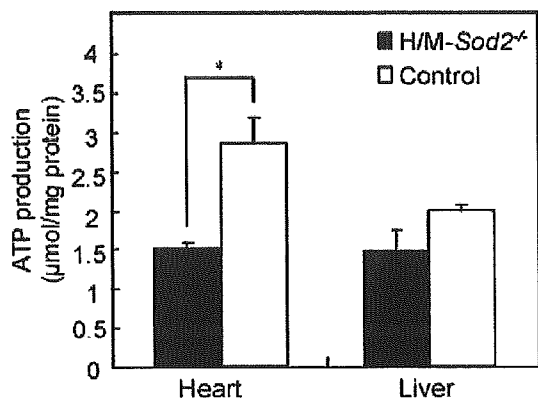


図7

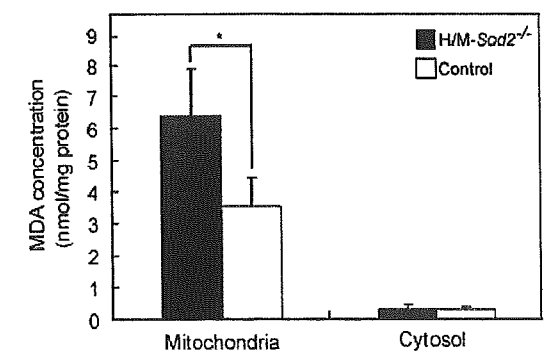
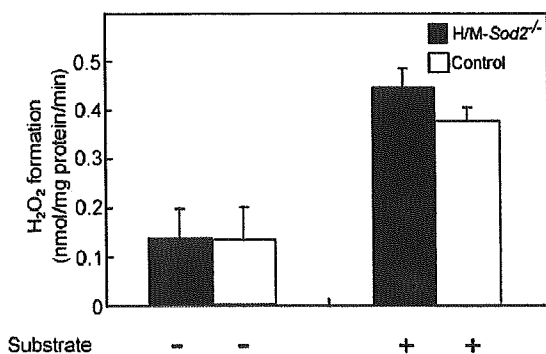
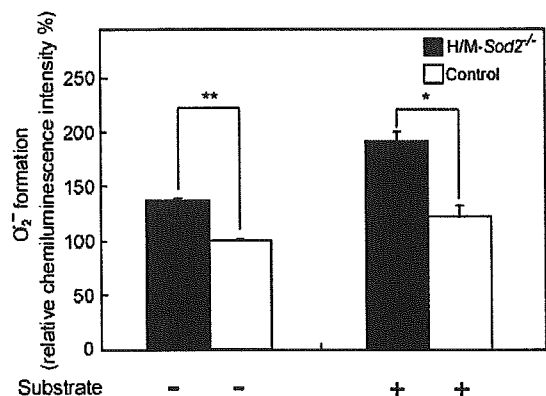


図8

また、ホモマウスの心臓において実際に ROS の発生に変化があるかを確認するために O<sub>2</sub><sup>-</sup> (図 8 上) と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (図 8 中) の測定を行なった。更に、ホモマウスの酸化ダメージの評価を行うために過酸化脂質 (MDA) 量 (図 8 下) を測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生量に有為な変化は無かったもののホモマウスでは O<sub>2</sub><sup>-</sup> 発生量が有為に増加して

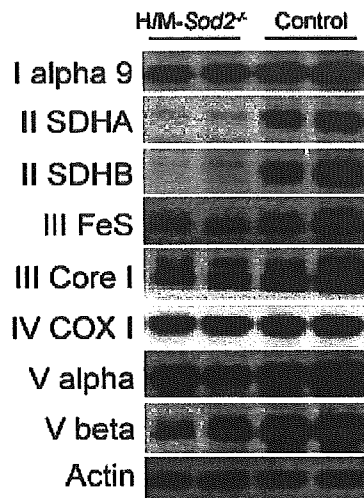


図9

いた。MDA 量は細胞質では有為な差が見られなかったものの、ミトコンドリアにおいて有為な増加が認められた。

更に我々はミトコンドリア呼吸鎖酵素活性低下の原因を解明するためにミトコンドリア呼吸鎖の構成要素をタンパク質レベルで確認した。ウェスタンブロットにて Complex I alpha 9、Complex II SDHA、SDHB、Complex III Core I、Complex IV COX I、Complex V alpha、beta をそれぞれ定量すると、Complex IV COX I を除いてタンパク量が有意に減少していたが構成成分によってタンパク質減少率には差があり、特に Complex II の構成要素である SDHA、SDHB の発現量が著しく低下していた (図 9)。

また、心筋から抽出した mRNA を用いてアフィメトリクス社のマイクロアレイを行い、遺伝子発現を解析した結果、発現レベルは両マウスで差は認められなかった。これらのことから、活性酸素による心筋細胞のミトコンドリア呼吸能の低下はタンパク質翻訳後修飾による変性、分解であることが判明した。さらにその低下したタン

パク質は代償的な補填がなされることはなく、このことが不可逆性の機能不全に陥り加齢性変化を引き起こすのではないかと考えた。

最後に我々はこのマウスを用いてレスキュー実験を行った。MnSOD 類似物質である MnTBAP 10  $\mu$ g/g (体重) を生後 8 週から毎日腹腔内投与し 4 週後の心筋の収縮力、強制運動耐久力、自発的活動性を測定した。すると全てに部分的な回復を認めた (図 10)。

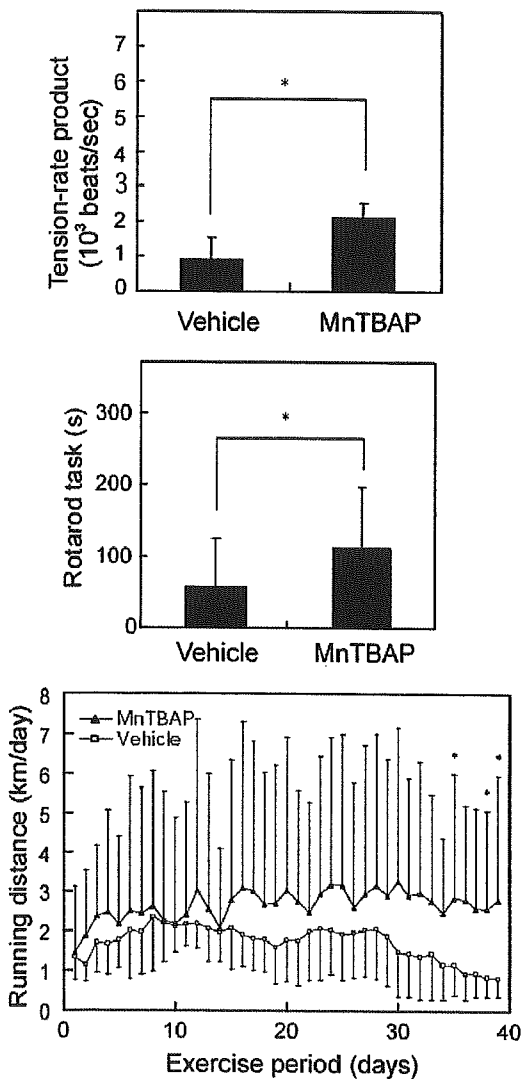


図10

これらの結果は MnTBAP のような抗酸化剤が治療に有用であることを示唆するとともに不可逆性変化であるためリスクの高い患者は早期からの投与が大事であるといえる。またこのマウスが治療効果判定のためのスクリーニングに役立つことを証明した。

## D 結論

心臓特異的 MnSOD 欠損マウスは心筋収縮力の低下、運動能力、活動性の低下を認め、拡張型心筋症を伴い生後半年以内に心不全で死亡した。このマウスの心臓から単離したミトコンドリアは呼吸鎖複合体の活性が低下し、ATP 生産量の減少と ROS 発生量の増加が認められた。心臓細胞はアポトーシス様の細胞死ではなく変性を起こしていた。アポトーシスが起きるためには ATP などのエネルギーが必要であるが、本マウスではミトコンドリア呼吸鎖複合体異常による ATP 生産能力の低下により組織内の ATP 量が少ないため、アポトーシスを起こせないものと思われた。翻訳後修飾によるミトコンドリア呼吸鎖複合体構成要素発現の欠損が心不全の主な原因であった。MnTBAP の投与は効果的であったが部分的なレスキューにとどまった。

今後は翻訳後修飾の具体的修飾部位、修飾後の処理される経路、酸化ダメージのターゲットと考えられるミトコンドリア DNA 変異など更なる解析を行う予定である。また、このマウスを用いた薬剤のスクリーニングは今後、心不全や加齢性心疾患治療の一助になると確信している。

## E 研究発表

### 学会発表

船越政史、野尻英俊、清水孝彦、白澤卓二  
心臓、骨格筋特異的 MnSOD 欠損マウスの解析、第 28 回日本分子生物学会、福岡ドーム、2005. 12.

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

研究課題: 病理解剖例を用いた老年病関連遺伝子多型による関連解析  
分担研究者 沢辺元司(東京都老人医療センター 剖検病理科部長)

研究要旨

高齢者疾患, 例えば, 粥状動脈硬化症, アルツハイマー病, パーキンソン病, 悪性腫瘍の発生には栄養, 喫煙, 飲酒, 化学物質といった環境要因と遺伝的要因が複雑に関与している. 本研究では高齢者疾患における遺伝的要因の解明のために, 遺伝子多型解析による疾患関連遺伝子の同定を試みた. 対象としては 1500 例以上に及ぶ連続病理解剖症例を用いた. 病理解剖症例を用いた理由としては: 病理診断は最も信頼できる診断である, 全身の所見が得られる, 診断の付いていないラテン癌などの情報が得られる点である.

最初に, 従来から登録してきた病理解剖データベースを元に, 遺伝子多型研究に特化した「老年病剖検データベース」を開発した. また研究成果を社会に還元する観点から「老年病SNPデータベース」を開発しインターネット公開した.

次に粥状動脈硬化症関連遺伝子の遺伝子多型と全身動脈の粥状硬化度の関連解析を行った. 対象遺伝子は粥状動脈硬化症関連の 44 遺伝子, 67SNP である. その結果, CYP1A1, TNF $\alpha$ , eNOS, MCP-1 が最も有力な候補遺伝子と考えられた.

更にアルツハイマー病, パーキンソン病, 瀰漫性レービー小体病などの神経変性疾患についても関連解析を行い, ER $\alpha$ , apoE,  $\alpha$ -synuclein などの遺伝子多型と有意な関係を認めた.

研究項目

1. 老年病剖検データベース(GEAD), 老年病SNPデータベース(JG-SNP)の開発
2. 粥状硬化症関連遺伝子多型の関連解析
3. 神経変性疾患などの遺伝子多型の関連解析

1. 老年病剖検データベース(GEAD), 老年病SNPデータベース(JG-SNP)の開発

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数年来, 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た. 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性データを含むデータベース

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(#1, 2, 13, 16)。

## 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 1,850 例である。男 1006 例、女 844 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 34.4%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 1,850 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。

### (2). 老年病剖検データベース(GEAD)

GEAD の対象は 1,850 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:心筋梗塞、左室肥大、変性性弁膜症、大動脈弁石灰化、僧帽弁輪石灰化、動脈瘤、大動脈解離、アルツハイマー病、脳出血、脳梗塞、パーキンソン病、糖尿病性腎症、肺癌、胃癌、大腸癌、肝癌、



前立腺癌, 急性白血病, 骨髄異形成症候群, 悪性リンパ腫など 42 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, ご遺族への説明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, 個人情報を保護す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 を以下に示す. データベース構成を図 1 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](http://www.tmgh.metro.tokyo.jp/jg-snp/english/E_top.html)

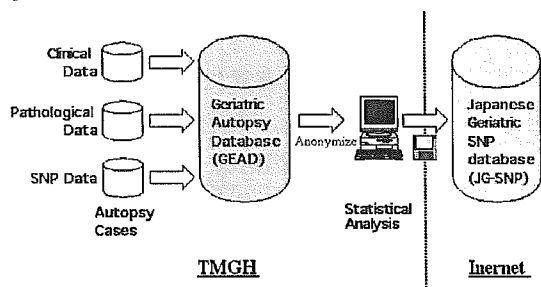


図 1. データベース構成

#### 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(#3), 特に性差, 加齢との関係について報告した(#4, 5, 14, 15). また病理解剖症例の標準臓器重量について解析を行い, 遺伝子多型研究の対象(例えば, 脳萎縮, 心肥大の指標)として使用できるようにした(#6).

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が利用対象となる. 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・生物関係者にとっては老年病に関する知識, 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. 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.

#### 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。さらには研究成果の社会還元の見地からデータベース(JG-SNP)をインターネット公開し内容を更新している。

## 2. 粥状硬化症関連遺伝子多型の関連解析

### A. 研究目的

粥状動脈硬化症は心筋梗塞、脳血管障害等の合併症を引き起こす老年医学上最重要疾患の一つである。剖検例を用いた病理学的検討では粥状動脈硬化症の程度は動脈系により異っているが、加齢と共に進行し、90歳代では性差が失われる(#4, 5, 14, 15)。また動脈系により高脂血症、高血圧、糖尿病、喫煙といった危険因子の寄与度が異なることも判明している(#20)。一方、粥状動脈硬化症は栄養、喫煙、運動といった外因と共に遺伝的要因が発症に関与し、その病理発生には数多くの細胞種、生体分子が関与している。今回、粥状動脈硬化症発生に強く関与する生体分子を特定するために候補遺伝子による遺伝子多型解析を行った。動脈系により危険因子が異なることから、有意な関連を示す共通した遺伝子多型と共に、動脈系に特有な遺伝子多型を想定して解析した

### B. 研究方法

対象症例は老年病SNPデータベース(JG-SNP)に登録済みの1,536例の連続剖検例である。男女比は1.1:1、平均年齢は80歳である。脳動脈、冠動脈、8動脈(総頸動脈、鎖骨下動脈、大動脈、脾動脈、上腸間膜動脈、総腸骨動脈、外腸骨動脈、大腿動脈)の粥状硬化度を肉眼的に半定量的に評価した。8動脈の粥状硬化度の平均値を病理学的粥状硬化指数(PAI)とした。対象となる一塩基多型(SNP)は炎症性サイトカイン等の44疾患関連遺伝子、67SNPである。SNP検索はLightTyper (Roche Diagnostics)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

医学研究の承諾書は剖検時に遺族より得ており、剖検例を医学研究に用いることは死体解剖保存法に基づいている。承諾書では「遺伝子研究を含む医学研究に使用する」事を明示してある。また東京都老人医療センター、東京医科歯科大学双方の倫理委員会において本研究の承諾を得ている。遺伝子多型解析においては連結可能匿名化番号で検体を管理し、

臨床病理情報、遺伝子多型情報は統計解析の責任者の元で初めてデータが統合され個人情報流出がないよう最大限の努力を行っている。

### C. 研究結果

変異型のアレル頻度が5%以上のSNPは26遺伝子、38SNP見つかった。38SNP中Angiotensinogen (AGT), CCR2, TNF $\alpha$ -308G/AはHardy-Weinberg平衡から乖離していたが、その他のSNPはH-W平衡に従っていた。粥状硬化度と変異アレルとが有意な関連を示す遺伝子多型を多数認めた。AGT,  $\beta$ 3-adrenergic receptor (ADRB3), CYP1A1, Elastin (ELN), eNOS (NOS3), ER $\alpha$  (ESR1), IL10, IL1 $\beta$ , MCP-1 (CCL2), MPO, p22phox (CYBA), p53, TNF $\alpha$ の12遺伝子で有意なSNPが同定された。このうち2カ所以上の血管で有意差が出たのはCYP1A1, TNF $\alpha$ であり、その他では1血管のみで有意であった。総頸動脈では $\beta$ 3-adrenergic receptor, TNF $\alpha$ で有意であった。脳動脈、冠動脈で有意なSNPは見つからなかったが、脳動脈ではAdiponectin (ACDC), eNOS, TGF $\beta$ , XRCC1で、冠動脈ではMCP-1で傾向( $p < 0.1$ )を認めた。大動脈ではeNOSが有意であった。PAIを指標とするとMCP-1で有意差( $p < 0.05$ ), eNOS, ER $\alpha$ , PON-1, TNF $\alpha$ で傾向( $p < 0.1$ )が認められた。またSNP解析過程でTNF $\alpha$ のプロモーター領域のSNPに従来報告されていないSNP, -856G>Aが存在し、LightTyperにより、一度に近接した2カ所のSNP解析が可能であった(#7)。

### D. 考察

本検討により粥状硬化症と有意に関連がある遺伝子多型をいくつか特定できた。解析内容は日本循環器学会総会において発表した(#18, 19)。PAIを指標とした時、全身の血管に共通した遺伝子多型としてMCP-1が同定された。MCP-1は単球遊走因子であり、その遺伝子多型がMCP-1の転写量、血清値に相関することが知られており、Framingham研究においてMCP-1多型と心筋梗塞との間に有意な関連が報告されている(Circulation, 2005)。また動脈系に特有な他のSNPも同定された。我々の同定した遺伝子多型が真に有意かどうかを確かめるためには、他の集団での検討、関連した遺伝子のSNP解析、ハプロタイプ解析が必要である。

## E. 結論

44 粥状動脈硬化症関連遺伝子の 67SNP を用いて粥状動脈硬化症の関連解析を行った。対象は東京都老人医療センターの 1,586 連続病理解剖症例である。関連解析により特定の動脈の粥状動脈硬化度と関連する遺伝子多型を同定することが出来た。特に CYP1A1, TNF $\alpha$ , eNOS, MCP-1 が有力な候補遺伝子と考えられた。

## 3. 神経変性疾患などの遺伝子多型の関連解析

### A. アルツハイマー病とエストロゲン受容体アルファの遺伝子多型(#8)

アルツハイマー病は高齢者の認知症をもたらす疾患として最も重要である。アルツハイマー病の原因はいまだ不明であるが、女性ホルモンであるエストロゲンが防御的に作用することが示唆されている。本研究では、エストロゲンが細胞に作用する時に標的となるエストロゲン受容体の遺伝子多型性がアルツハイマー病の発症に及ぼす影響を検討した。エストロゲン受容体にはアルファとベータがあるが本研究ではエストロゲン受容体アルファ(ER $\alpha$ )のイントロン1にある2つの制限酵素長多型性(RFLP)である PvuII (P または p) と XbaI (X または x) をタイピングした。これらの多型性とアルツハイマー病における病理所見である、神経原線維変化と老人斑との関連を解析した。その結果、PvuII の遺伝子多型が Braak の方法でステージングされた神経原線維変化のステージと関連しており、日本人男性において PvuII RFLP の P アレルを保有することがアルツハイマー病の危険因子であることが判明した。このことは特にアポリポ蛋白 $\epsilon$ 4 を持っていない場合により明らかであった。以上の結果はアルツハイマー病の遺伝的危険因子の一つを明らかにするとともに、本症の発症に女性ホルモンの作用が関与していることを示している。

### B. レヴィー小体病とアポリポ蛋白Eの遺伝子多型(#9)

レヴィー小体病はドーパミン作動性神経細胞の中にレヴィー小体が現れる病気であるが、パーキンソン病で脳幹にレヴィー小体が出るのに対し、レヴィー小体型痴呆では、大脳皮質にも多数出現する。レヴィー小体型痴呆はアルツハイマー病、脳血管性痴呆と

共に「3大認知症」と言われ、日本では認知症の約2割を占める多い疾患である。本研究ではレヴィー小体の出現分布とアポリポ蛋白E遺伝子多型との関係を1000例以上の連続剖検例を用いて検索し、アポリポ蛋白E遺伝子多型( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4)との関係を検討した。その結果 $\epsilon$ 4遺伝子型が、レヴィー小体病でもステージが上がると頻度が増すことが分かり、アルツハイマー病と類似点を持つことが明らかとなった。

### C. 嗜銀顆粒性痴呆とアポリポ蛋白Eの遺伝子多型(#10)

高齢者では異常にリン酸化されたタウ蛋白が脳に蓄積する疾患である「タウオパチー」の頻度が非常に高く、アルツハイマー病に匹敵する。さらに高齢者タウオパチーでは、嗜銀顆粒性痴呆が群を抜いて多い。本研究では、嗜銀顆粒の進展ステージ分類を世界ではじめて提唱し、それとアポリポ蛋白Eの多型との関係を調べた。その結果、本疾患では、アルツハイマー病や、レヴィー小体病と比較すると、ApoE4の頻度はむしろ低い傾向にあり、ApoE2の頻度が高い傾向があることが明らかとなった。

### D. 孤発性パーキンソン病と $\alpha$ シヌクレイン遺伝子多型(#11)

$\alpha$ シヌクレインはパーキンソン病の特徴的構造物であるレヴィー小体の主成分である。孤発性パーキンソン病の原因遺伝子を同定するために121候補遺伝子の268SNPを症例対象研究にて関連解析を行った。その結果 $\alpha$ シヌクレインのあるSNPが有意に関連していることが明らかになり、 $\alpha$ シヌクレイン遺伝子が孤発性パーキンソン病の疾患感受性遺伝子であることが判明した。

### E. 前立腺癌のホルモン療法とエストロゲン代謝酵素(COMT)の遺伝子多型(#12)

エストロゲンは前立腺組織の増殖と発症に関連するホルモンであり、エストロゲン代謝に関わる遺伝子の多型と前立腺癌の発症リスクに関する報告が近年多く発表されている。エストロゲン代謝酵素である Catechol-O-methyltransferase (COMT) のアミノ酸置換 (Val158Met) を伴う SNP では酵素活性が低下する。この SNP と前立腺癌の発症リスクとの関連、臨床癌と

潜在癌における多型分布, 前立腺癌に対する低用量低用量リン酸エストラムスチン療法の治療予後について検討した。その結果, 前立腺癌症例において野生型(Val)では有意に低容量低用量リン酸エストラムスチンの治療効果がすぐれている事が分かった。

#### 4. 研究発表

##### 1. 論文発表

- #1. Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Esaki Y, Nakahara K, Hosoi T, Orimo H, Takubo K, Murayama S, Tanaka N. Developments of geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). *Mech Ageing Dev* 125(8):547-52, 2004.
- #2. 沢辺元司. 老年病と遺伝子多型. *Emergency Care* 18: 10-19, 2005
- #3. Sawabe M, Takahashi R, Matsushita S, Ozawa T, Arai T, Hamamatsu A, Nakahara K, Chida K, Yamanouchi H, Murayama S, Tanaka N. Aortic pulse wave velocity and the degree of atherosclerosis in the elderly: a pathological study based on 304 autopsy cases. *Atherosclerosis* 179(2): 345-351, 2005
- #4. Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Hamamatsu A, Esaki Y, Nakahara K, Harada K, Chida K, Yamanouchi H, Ozawa T, Takubo K, Murayama S, Tanaka N. Sustained progression and loss of the gender-related difference in atherosclerosis in the very old: A pathological study of 1,074 consecutive autopsy cases. *Atherosclerosis*. (in press).
- #5. 沢辺元司, 小澤利男. 年齢, 性別, 部位別にみた動脈硬化の特徴. *クリニカ* 33(1): 7-13, 2006
- #6. Sawabe M, Saito M, Naka M, Kasahara I, Saito Y, Arai T, Hamamatsu A, Shirasawa T. Standard organ weights among elderly Japanese who died in the hospital, including 50 centenarians. *Pathology International*. (in press).
- #7. Song Y, Araki J, Zhang L, Froehlich T, Sawabe M, Arai T, Shirasawa T, Muramatsu M..

- Haplotyping of TNFalpha gene promoter using melting temperature analysis: detection of a novel -856(G/A) mutation. *Tissue Antigens*. 66(4). 284-90. 2005
- #8. Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, Saito Y, Nakahara K, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Yamanouchi H, Orimo H, Hosoi T. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 18(2):145-50.
- #9. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(7):742-9.
- #10. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Tanaka N, Kakuta Y, Yamanouchi H, Murayama S. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(9):911-8.
- #11. Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 15(7). 1151-8. 2006
- #12. Suzuki M, Mamun MR, Hara K, Ozeki T, Yamada Y, Kadowaki T, Honda H, Yanagihara Y, Ito YM, Kameyama S, Ohta N, Hosoi T, Arai T, Sawabe M, Takeuchi T, Takahashi S, Kitamura T. The Val158Met polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene is associated with the PSA-progression-free survival in prostate cancer patients treated with estramustine phosphate. *Eur Urol*. 48(5). 752-9. 2005

##### 2. 学会発表

- #13. Sawabe M, Arai T, Hosoi T, Takubo K, Tanaka N. Development and Application of Geriatric

Autopsy Database and Internet-Based Database of Japanese Single Nucleotide Polymorphisms for Geriatric Research (JG-SNP). Presented at 2005 Annual Meeting, The United States and Canadian Academy of Pathology, held at San Antonio, TX on February 28, 2005.

- #14. Sawabe M, Arai T, Hamamatsu A, Chida K, Tanaka N. Sustained progression and loss of gender-related difference of the atherosclerosis in the very old: A pathological study of 1,074 consecutive autopsy cases. Presented at 2005 Annual Meeting, The United States and Canadian Academy of Pathology, held at San Antonio, TX on March 1, 2005.
- #15. Sawabe M, Hamamatsu A, Harada K, Chida K, Nakahara K, Ozawa T, Sustained progression and loss of gender-related difference in atherosclerosis in the very old: a pathological study of 1,074 autopsy cases, 第 69 回日本循環器学会(横浜), 2005.3.20.
- #16. 沢辺元司, 笠原一郎, 新井冨生, 田久保海誉, 村山繁雄, 病理解剖症例を対象とした遺伝子多型データベース(老年病 SNP データベース, JG-SNP)のインターネット公開, 第 94 回日本病理学会総会(横浜), 2005.4.16.
- #17. 新井冨生, 沢辺元司, 細井孝之, 中原賢一, 金沢暁太郎, 笠原一郎, 本間尚子, 田久保海誉, 高齢者における大腸腺腫と p53 コドン 72 遺伝子多型との関連, 第 47 回日本老年医学会

(東京), 2005.6.16.

- #18. Oda K, Sawabe M, Tanaka N, Shirasawa T, Muramatsu M, The Associations between the Genetic Polymorphisms of Pro- and Anti-inflammatory Chemokine/Cytokines and the Atherosclerotic Degrees in the Japanese Elderly, 第 70 回日本循環器学会(名古屋), 2006.3.24.
- #19. Sawabe M, Oda K, Muramatsu M, Tanaka N, Shirasawa T, The Contributions of the Candidate Genes to Atherosclerosis are Not Uniform among the Arterial Systems, 第 70 回日本循環器学会(名古屋), 2006.3.24.
- #20. Naito T, Sawabe M, Hamamatsu A, Harada K, Chida K, Muramatsu M, Ozawa T, The Correlation between Serum Lipid Levels and Atherosclerotic Degrees is Different in Each Arterial System, 第 70 回日本循環器学会(名古屋), 2006.3.26.

#### 5. 知的財産の出願・登録状況

- 1. 特許取得  
なし
- 2. 実用新案登録  
なし
- 3. その他  
特になし.

高齢者消化管腫瘍に関連する遺伝子の多型解析

分担研究者 新井 富生 東京都老人医療センター・臨床病理科医長

研究要旨

【目的】加齢とともに悪性腫瘍の発生率は指数関数的に増加することが知られており、胃癌、大腸癌、肺癌が発生率、発生数の多い悪性腫瘍である。また、大腸腺腫はヒトで最も高頻度に発生する良性腫瘍の一つであり、加齢とともに増加傾向にあることが知られている。本研究は、高齢者消化管腫瘍（胃癌、大腸癌、大腸腺腫）の発生における遺伝素因の関与を明らかにする目的で、種々の遺伝子多型との関連を検討した。

【方法】約8年間の連続剖検1536例（男性826例、女性710例、年齢中央値80歳、分布46～104歳）対象に、病理組織学的に胃癌、大腸癌、大腸腺腫と確認できた病変の個数・部位、46種類の一塩基遺伝子多型、臨床病理データ（生活歴として、喫煙歴、飲酒歴を含む）を統計学的に解析した。

【結果】胃癌と関連のみられた遺伝子多型はTumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , -1031)、Trans-forming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$  1)、Estrogen receptor  $\alpha$ 、adiponectin (G276T)であり、そのオッズ比（マイナーアレルの寄与度）はそれぞれ1.51、1.55、0.65、1.89であった（いずれも $P < 0.05$ ）。十二指腸癌と関連のある遺伝子はendothelial nitric oxide synthetase (eNOS, -786と-922)で、オッズ比は9.20であった（ $P < 0.05$ ）。直腸癌と関連のある遺伝子はmethylenetetra-hydrofolate reductase (MTHFR)であり、オッズ比は0.27であった（ $P = 0.001$ ）。食道癌、結腸癌と関連のある遺伝子多型は見出されなかった。

大腸腺腫は1499例中1023例（68.3%）に認められた。男性70.8%（568/802）、女性65.3%（455/697）であり、男性の頻度の方が高かった。腺腫数は加齢に伴い有意に増加した（ $P < 0.05$ ）。大腸腺腫に関連のみられる遺伝子多型は、80歳未満では腺腫の有無、数、分布のいずれにもTNF $\alpha$ （-857C/T）との関連がみられた。また、80歳以上では、腺腫の有無にはABCA1(G/A)、腺腫の分布にはadiponectin (T45G)との関連がみられた。喫煙は大腸腺腫の発生に強く関連したが（ $P < 0.01$ ）、飲酒は関連がみられなかった。

【結論】癌原物質の代謝に関連する酵素や修復酵素関連の遺伝子と胃癌の関連について現在まで報告がある。しかし、高齢者群においては上記遺伝子多型と胃癌を始め消化管癌との関連性は認められなかった。一方、高齢者消化管癌と関連のみられた遺伝子は炎症、ホルモン受容体、葉酸・薬物代謝酵素に関連するものであり、高齢者の胃癌、十二指腸癌、直腸癌の発生機序は若年者と異なる可能性が示唆された。また、食道癌、結腸癌に関連する遺伝子多型は見出されず、エピジェネティックな現象や環境因子の関与が大きい可能性が示唆された。大腸腺腫は加齢に伴い増加したが、炎症に関連する遺伝子との関連がみられた。また、大腸腺腫の発生は喫煙と強い関連が認められ、環境因子の関与も示唆された。

A. 研究目的

加齢とともに悪性腫瘍の発生率は指数関数的に増加することが知られており、胃癌、大腸癌、肺癌が発生率、発生数の多い悪性腫瘍である。本研究の主な目的は、高齢者消化管癌（胃癌と大腸癌）の発生における、遺伝子多型の関与を明らかにすることである。

B. 研究方法

東京都老人医療センターで1995年1月～2003年3月の8年2カ月に剖検された1536例（男性826例、女性710例、年齢中央値80歳、分布46～104歳）対象とし

た。

胃癌、大腸癌、大腸腺腫に関しては、病理組織学的に診断できた病変の肉眼型、大きさ、発生部位を記載した。

遺伝子検索に関しては、剖検時採取した腎組織からDNAを抽出し、LightTyperにより一塩基遺伝子多型（SNP）を検出した。検討した一塩基遺伝子多型は、サイトカイン、成長因子、ホルモン受容体、代謝酵素、修復酵素に関連する44遺伝子（66 SNPs）である。

統計学的解析は、臨床病理データ（生活歴として、喫煙歴、飲酒歴を含む）と遺伝子多型を多重ロジステ

ック解析した。解析にあたり年齢、性、喫煙、飲酒で調整し、 $P < 0.05$ を有意と判定した。

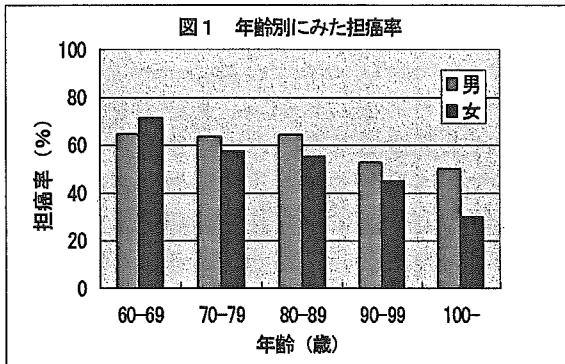
(倫理面への配慮) 剖検材料を研究に使用するに当たり、ご遺族から書面にて承諾を得た。また本研究は東京都老人医療センター倫理委員会で承認された。

### C. 研究結果

#### 1-1) 悪性腫瘍の出現頻度

1536例の剖検例のうち、悪性腫瘍を有するのは男性62%、女性55%であった。

年齢別にみた担癌率を図1に示す。このうち、食道癌18例(1.2%)、胃癌170例(11.1%)、十二指腸癌7例(0.5%)、結腸癌106例(6.9%)、直腸癌35例(2.3%)であった。



#### 1-2) 消化管癌に関連する遺伝子多型の解析

遺伝子多型の解析は1499例に可能であり、有意差のみられた遺伝子多型の結果を表1に示す。これらのデータは喫煙、飲酒、年齢で調整済みの値である。食道癌、結腸癌に関しては遺伝子多型による差異は認められなかった。

表1 消化管癌と関連のみられた遺伝子とそのオッズ比

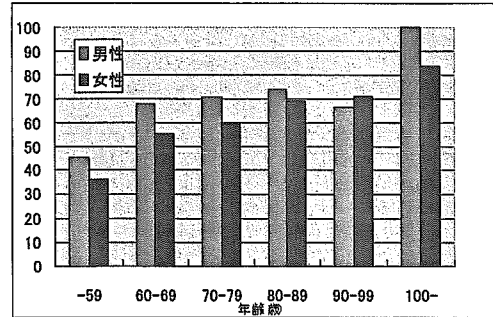
腫瘍	遺伝子	OR	95%IC	P値
胃癌	TNF $\alpha$ (-1031)	1.51	1.03-2.2	0.03
	TGF $\beta$ I	1.55	1	7
	ER $\alpha$	0.65	1.02-2.3	0.04
	Adiponectin(G276 T)	1.89	8	2
			0.45-1.9	0.02
		5	7	
		1.29-2.7	0.00	
		4	1	
直腸癌	MTHFR	0.27	0.12-0.6	0.00
			0	1
小腸癌	eNOS (-789)	9.20	1.31-64.	0.02
	eNOS (-922)	9.20	54	6
			1.31-64.	0.02
			47	5

OR, オッズ比 (マイナーアレルの寄与度を表す) ;  
95%IC, 95%信頼区間

TNF  $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; TGF  $\beta$  I, transforming growth factor  $\beta$  I; MTHFR, Methylene tetrahydrofolate reductase; eNOS, endothelial nitric oxide synthetase

2-1) 大腸腺腫の出現頻度  
大腸腺腫は1499例中1023例(68.3%)に認められた。男性70.8%(568/802)、女性65.3%(455/697)であり、男性の頻度の方が高かった(図2)。腺腫数は加齢に伴い有意に増加した( $P < 0.05$ )。

図2 年齢別、性別にみた大腸腺腫の出現頻度



#### 2-2) 大腸腺腫に関連する遺伝子多型の解析

大腸腺腫と喫煙の有無には強い線形の関連がみられた( $P=0.0016$ )。喫煙本数でカテゴリー化しても同様の関連がみられた( $P=0.0149$ )。飲酒については明らかな傾向は見られなかった。

大腸腺腫の有無(表2)、個数(表3)、分布型(表4)と関連する遺伝子多型とそのオッズ比を示す。

表2 大腸腺腫の有無と関連する遺伝子多型

年齢	遺伝子	OR	95%IC	P値
全体	TNF $\alpha$ (-857C/T)	0.7	0.56-0.	0.01
	ABCA1	2	93	0
		0.7	0.58-0.	0.02
		5	96	3
80歳未満	TNF $\alpha$ (-857C/T)	0.5	0.39-0.	0.00
		6	79	1
80歳以上	ABCA1	0.6	0.47-0.	0.02
	MRP4(Glu757Lys)	7	96	9
		1.5	1.03-2.	0.03
		0	13	5

OR, オッズ比 (マイナーアレルの寄与度を表す) ;  
95%IC, 95%信頼区間; TNF  $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  ; ABCA1, ATP-binding cassette, sub-family A, member 1; MRP4, multidrug resistant proteins 4

表3 大腸腺腫数と関連する遺伝子

年齢	遺伝子	OR	95%IC	P値
全体	TNF $\alpha$ (-857C/T)	0.7	0.59-0.	0.00
		4	93	9
	IL-1 $\beta$	1.2	1.03-1.	0.02
		9	62	7
80歳未満	TNF $\alpha$ (-857C/T)	0.5	0.41-0.	0.00
		7	79	1
80歳以上	MRP4 (Glu757Lys)	1.3	1.01-1.	0.04
	P22phox	7	87	4
	adiponectin (T45G)	1.4	1.01-2.	0.04
		6	10	2
	ELN	0.7	0.55-0.	0.03
		3	97	0
		1.3	1.02-1.	0.03
		7	83	7

OR, オッズ比 (マイナーアレルの寄与度を表す) ;  
95%IC, 95%信頼区間; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$   
; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$  ;MRP4, multidrug resistant  
proteins 4; ELN, elastin.

表4 大腸腺腫の分布と関連する遺伝子

年齢	遺伝子	P値
全体	TNF $\alpha$ (-857C/T)	0.0066
	adiponectin	0.0117
80歳未満	TNF $\alpha$ (-857C/T)	0.0026
	angiotensinogen	0.0347
80歳以上	adiponectin	0.0263
	p53	0.0464

TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$

大腸腺腫に関連のみられる遺伝子多型は、80歳未満では腺腫の有無、数、分布のいずれにもTNF $\alpha$  (-857C/T) との関連がみられた。また、80歳以上では、腺腫の有無にはABCA1 (G/A)、腺腫の分布にはadiponectin (T45G) との関連がみられた。

#### D. 考察

癌原物質の代謝に関連する酵素の遺伝子である cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), glutathione S-transferase (GST M1) や、修復酵素関連の遺伝子であるXRCC1 (Arg194Try), p53 codon 72 (C/G) の一塩基多型と胃癌の関連について現在まで報告がある。これらの報告は検索対象の年齢が本研究に比べ10歳以上若年である。高齢者群においては上記遺伝子多型と胃癌を始めとする消化管癌との関連性は認めら

れなかった。一方、高齢者消化管癌と関連のみられた遺伝子は炎症、ホルモン受容体、葉酸代謝酵素に関連するものであり、高齢者胃癌、十二指腸癌、直腸癌は若年者と異なることが示唆された。また、食道癌、結腸癌に関連する遺伝子多型は見出されず、遺伝子多型の関与は低いと推測される。高齢者結腸癌の発生に関して、我々は遺伝子のメチル化などのエピジェネティックな現象の増加を明らかにしており、結腸癌においては遺伝子多型の関与より、エピジェネティックな現象や環境因子の関与が大きい可能性が示唆された。

大腸腺腫はヒトで最も高頻度に発生する腫瘍の一つであり、その発生には K-ras, APC, p53 遺伝子の関与が知られている。また、これまで大腸腺腫に関連する遺伝子多型として、TGF $\beta$ 1, PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )、XRC C1 (x-ray repair cross-complementing group 1) などの報告がある。しかし、高齢者を対象とした本研究では上記遺伝子多型と大腸腺腫との関連性は乏しかった。高齢者における大腸腺腫は、発生頻度は高いものの若年者にみられる腺腫と比べ小さい異型の弱いものが多い。従って若年者の大腸腺腫発生と異なる可能性が考えられる。さらに、炎症に関連する遺伝子多型の関与がみられたことは、消炎鎮痛剤が大腸腫瘍の発生抑制に関係している事実を支持するデータと考えられた。

#### E. 結論

高齢者悪性腫瘍に関連する遺伝子は現在まで関連について報告された遺伝子とは異なる遺伝子であった。高齢者の悪性腫瘍は若年者と異なる臨床病理像を示すので、その発生機序や関連する遺伝子も異なる可能性が考えられた。また、喫煙、飲酒、食事などの環境因子の影響を受けやすい食道癌、結腸癌に関連する遺伝子多型は見出されなかったことは、これらの癌が環境因子による影響が大きいものと推測された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Arai T, Esaki Y, Sawabe M, Honma N, Nakamura K-I, Takubo K. Hypermethylation of hMLH1 promoter gene with absent hMLH1 expression in medullary-type poorly differentiated colorectal adenocarcinoma in the elderly. *Mod Pathol* 2004; 17: 172-179.
- 2) Arai T, Esaki Y, Inoshita N, Sawabe M, Kasahara I, Kuroiwa K, Honma N, Takubo K. Pathologic characteristics of gastric cancer in the elderly: a retrospective study of 994 surgical cases. *Gastric Cancer* 2004; 7: 154-159.



- 3) Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, Saito Y, Nakahara K, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Yamanouchi H, Orimo H, Hosoi T. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. *Dementia Geriatr Cogn Dis* 2004; 18:145-150.
- 4) Saito Y, Ruberu NN, Harada M, Arai T, Sawabe M, Nikuna N, Murayama S. *In situ* detection of apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 in archival human brain. *Neuroreport* 2004; 15: 1113-1115.
- 5) Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related  $\alpha$ -synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 742-749.
- 6) Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kakuta Y, Yamanouchi H, Murayama S. Staging of argyrophilic grain, an age-related tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 911-8.
- 7) Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Esaki Y, Nakahara K, Hosoi T, Orimo H, Takubo K, Murayama S, Tanaka N. Developments of geriatric autopsy database and internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). *Mech Ageing Develop* 2004; 125: 547-552.
- 8) Sawabe M, Takahashi R, Matsushita S, Ozawa T, Arai T, Hamamatsu A, Nakahara K, Chida K, Yamanouchi H, Murayama S, Tanaka N. Aortic pulse wave velocity and the degree of atherosclerosis in the elderly: a pathological study based on 304 autopsy cases. *Atherosclerosis*. 2005; 179: 345-351.
- 9) Takubo K, Izumiya-Shimomura N, Koiwai H, Honma N, Esaki Y, Yoshida T, Nakajima T, Sawabe M, Arai T. Detection of human papilloma virus infection of the cervix in very elderly women using the polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2919-2923.
- 10) Honma N, Takubo K, Akiyama F, Sawabe M, Arai T, Younes M, Kasumi F, Sakamoto G. Expression of GCDFP-15 and AR decreases in larger or node-positive apocrine carcinomas of the breast. *Histopathology* 2005; 47: 195-201.
- 11) Kanazawa K, Negishi S, Kishi K, Sawabe M, Arai T. Chronological trend of calorie intake and the incidence of epithelial neoplasms of the large intestine during the past 30 years in Japan. *Oncology* 2005; 69 (Suppl 1): 46-49.
- 12) Suzuki M, Manum MRI, Hara K, Ozeki T, Yamada Y, Kodowaki T, Honda H, Yanagihara Y, Ito YM, Kameyama S, Ohta N, Hosoi T, Arai T, Sawabe N, Takeuchi T, Takaharashi S, Kitamura T. The Val158Met polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene is associated with the PSA-progression-free survival in prostate cancer patients treated with estramustine phosphate. *Eur Urol* 2005; 48: 752-759.
- 13) Song Y, Araki J, Zhang L, Froehlich T, Sawabe M, Arai T, Shirasawa T, Muramatsu M. Haplotyping of TNFalpha gene promoter using melting temperature analysis: detection of a novel -856 (G/A) mutation. *Tissue Antigens* 2005; 66: 284-90.

## 2. 学会発表

- 1) 沢辺元司, 新井富生, 笠原一郎, 中原賢一, 細井孝之, 木下博之, 千田宏司, 折茂 肇, 小沢利男, 浜松晶彦. 病理学的に評価した動脈硬化度と疾患関連遺伝子の遺伝子多型. 第41回日本老年医学会学術集会 (千葉) 2004.6.17
- 2) 新井富生. 高齢者消化管癌の臨床病理学的、分子病理学的特徴. 第27回日本基礎老化学会 シンポジウム II 「老化と癌」 (東京) 2004.6.18
- 3) 新井富生. 高齢者消化管癌の臨床病理学的特徴とその分子機構. 第50回日本病理学会秋期特別総会 (名古屋) 2004.12.2
- 4) Sawabe M, Arai T, Hosoi T, Takubo K, Tanaka N. Development and application of geriatric autopsy database and internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). 94th Annual Meeting of United States and Canadian Academy of Pathology, San Antonio, Texas, 2005.2.26-3.4.
- 5) Sawabe M, Arai T, Hamamatsu A, Chida K, Tanaka N. Sustained progression and loss of gender-related difference of the arteriosclerosis in the very old: a pathological study of 1,074 consecutive autopsy cases. 94th Annual Meeting of United States and Canadian Academy of Pathology, San Antonio, Texas, 2005.2.26-3.4
- 6) 沢辺元司, 笠原一郎, 新井富生, 田久保海誉, 村山繁雄. 病理剖検症例を対象とした遺伝子多型データベース (老年病SNPデータベース、JG-SNP) のインターネット公開. 第94回日本病理学会総会 横浜 2005.4.16
- 7) 新井富生, 沢辺元司, 細井孝之, 金澤暁太郎, 中原賢一, 本間尚子, 田久保海誉. 高齢者における大腸腺腫とp53コドン72遺伝子多型との関連. 第47回日本老年医学会学術集会 (東京) 2005.6.16
- 8) 新井富生. DNA修復機構からみた高齢者悪性腫瘍の分子機構. 第47回日本老年医学会学術集会

(東京) 2005. 6. 17

- 9) 新井富生, 沢辺元司, 細井孝之, 金澤暁太郎, 中原賢一, 本間尚子, 田久保海誉, 村松正明, 田中紀子. 高齢者大腸腺腫とp53コドン72遺伝子多型との関連. 第63回大腸癌研究会 (東京) 2005. 7. 8
- 10) 竹内秀樹, 荒木淳吾, 新井富生, 村松正明. 融解曲線分析によるDNAメチル化タイピング法の検討. 第5回分子予防環境医学研究会 (東京) 2005. 11. 25
- 11) 新井富生, 沢辺元司, 笠原一郎, 白澤卓二, 本間

尚子, 田久保海誉. 高齢者における大腸腺腫数と種々の遺伝子一塩基多型との関連. 第95回日本病理学会総会 (東京) 2006. 4. 30 (予定)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
特になし。

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

老年病発症における遺伝子多型の意義に関する研究

分担研究者 細井孝之 国立長寿医療センター先端医療部長

研究要旨

老年病発症における遺伝的素因を候補遺伝子の多型性とくに遺伝子産物の蛋白質構造の多様性に結びつく codingSNP(cSNP) を用いた連関解析によって検討した。骨代謝において基幹的な役割を果たすと考えられる tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸の供給に主要な役割をはたす。本遺伝子については、日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。血中ホモシステイン濃度の高値はさまざまな加齢にともなって増加する疾患の基礎となることが知られている。血中ホモシステイン濃度規定因子のひとつであり、メチオニン代謝の key enzyme である methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)の遺伝子多型性と悪性腫瘍との関連を連続剖検例を用いて検討した。その結果、本遺伝子の多型性と悪性リンパ腫、ならびに直腸癌と間に有意な関連が認められた。

I.研究目的

多くの老年病の発症には遺伝的素因と環境因子(生活習慣因子)の両方がかかわっている。我々は本疾患の遺伝的素因を候補遺伝子の多型性と臨床的指標との連関解析をおこなうことによって明らかにしようしてきた。遺伝子多型性にはいくつかの種類があるが、我々はとくに single nucleotide polymorphisms (SNPs)について検討している。なかでも、regulatory SNP(rSNP)と codingSNP(cSNP)は臨床に直結する生物学的意義を持つ可能性がある。rSNP は遺伝子の転写調節領域にあるもので、この多型性は転写量の多様性を介して、発現される蛋白質量の差をもたらす可能性がある。また、遺伝子産物中のアミノ置換をもたらす。本研究では、2つの遺伝子を取りあげて、老年病発症との関連を検討した。その

一つは tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子である。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸供給において主要な役割をはたす。本遺伝子について、日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。もう一つは methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子である。MTHFR は葉酸代謝における key enzyme の一つであり、核酸代謝ならびホモシステイン代謝の中で重要な役割を果たす。MTHFR 遺伝子多型性は動脈硬化性病変や骨粗鬆症に基づく骨折との関連以外にも、悪性腫瘍を含むさまざまな老年病との関連が報告されている。今回は JG-SNP を用いて、MTHFR 遺伝子多型性と多種類の悪性腫瘍との関連を単一のデータベース上で検

討した。

## II. TNSALP に関する検討

### A. 方法

- ① TNSALP 遺伝子内の SNP 検索：変性 HPLC 法をもちいて TNSALP 遺伝子の 12 エクソンすべてについて SNPs の検索を行った。
- ② 対象：日本国内のある地域において、検診を目的に独歩で集合した高齢女性を対象とした。書面によるインフォームドコンセントを得たのち、DNA サンプルを目的とする採血を行った。
- ③ 骨量測定：骨量は dual energy X-ray absorptiometry (DXA) で前腕骨遠位端を測定した。
- ④ 遺伝子産物の酵素活性測定：TNSALP 遺伝子の多型性に対応する遺伝子産物を得るための発現ベクターを作成した。それぞれを COS 7 細胞に遺伝子導入し、発現させた後に形質膜分画を得た。このマイクロゾームを用いて alkaline phosphatase 活性を測定した。

### B. 結果

TNSALP 遺伝子のエクソン内について SNP 検索を行った結果、4 つの SNP が検出された(表 1)。このうちエクソン 7 のもの(787C>T)は 246 番目のアミノ酸である Tyr が His に置換する non-synonymous SNP であった。また、787C>T とエクソン 8 の 876A>G との間の連鎖不平衡係数は高く、完全に連鎖していることも明らかとなった(表 2)。787C>T の遺伝子型分布はにそれぞれのホモが全体の約 4 分の一を、ヘテロがほぼ半数を占めるかなり common な多型性である(図 1)。

高齢女性集団(平均 74 才)において前腕骨

の骨量と 787C/T 多型性との関連を検討したところ、この集団全体では、CC 群で骨量が高い傾向にあったが統計的に有意ではなかった(図 2)。ところが、この集団の平均年齢である 74 才を境に年齢で層別した上で解析すると、74 才以上の集団では遺伝子型間で有意な骨量の差が見出された( $p < 0.002$ )。これらのことから、この遺伝子多型性は後期高齢女性において影響を及ぼす遺伝的素因を反映していることが示唆された。

787C または 787T の TNSALP 遺伝子について発現ベクターを作成し、COS 7 細胞に遺伝子導入した。遺伝子発現を確認した後、それぞれの細胞から plasma membrane 分画を調製した。これを酵素サンプルとして TNSALP の酵素活性を測定した。その結果、それぞれのサンプルがもつ  $V_{max}$  には差がないものの、787C の、 $K_m$  値は 787T に比較して有意に低いことが分かった(表 3)。

### C. 考察

エクソン 7 の 787T/C SNP はいわゆる機能的な SNP であり、その酵素としての特性の差を通して、高齢女性の骨量における個人差をもたらしていることが示唆された。 $K_m$  値が低いことは、より少ない基質においても効率よく反応が触媒されることを意味する。今回の結果は高齢女性の骨代謝におけるリン酸代謝の重要性を示唆するものでもあり、骨粗鬆症の予防と治療を目指した今後の研究に対して一つの方向性をしめすものとする。

## III. MTHFR に関する検討

A. 方法：対象症例は老年病 SNP データベース(JG-SNP)に登録された 1536 例の連続剖