

が、アポEの遺伝子型についてはほとんど唯一と言っていいくらいの人種でも…

香川 特にアルツハイマー病との関係が出るのですね。

広瀬 アポEはいろいろな役割をしていますが、認知症とかコレステロール濃度に関係があります。それで寿命に関係があるのではないかとということで、1994年に(Nat Genet 6: 29-31, 1994)にフランスのグループが初めて投稿して以来、何度も追試で確認されています。

香川 アポEという呼び方をしているので血清中の脂質だと思っていましたが、あれはオリゴデンドログリアから脳が外傷を受けたりしたときに修復のために出てくるものだったのですね。『Nature』の論文によると、アポE4は活性酸素を防ぐ力が弱い。一方、アポE2は活性酸素を消す力が強く、同時に神経細胞を培養してみると神経細胞の保護も良いと報告されています。ですから、活性酸素を防いでいけば、仮にアポE4を持っている人でも結構脳は侵されないのではないかと思います。そのへんの解明はまだまだですね。事実、アポE4/E4の人は70代で50%くらいは認知症になっていますし、アポE2が入っている人はそれよりずっと遅いですね。

広瀬 10年くらい差があると言われていません。

香川 しかし、先ほどおっしゃったように90代でも認知症になっていないアポE4/E4の人もいるわけですよ。

広瀬 そうですね。

香川 一般の日本人はアポE3/E3が圧倒的に多いわけですね。たまたま私の母も98歳まで生存したのですが、アポEは3/3でした。アポE3/E3は見ていると、認知能が落ちてくるのが90歳くらいでしょうか。でも、環境で随分変えられるのではないかと強く思いました。

広瀬 100歳の方の認知機能にどのような因子が関係するかということですが、やはり栄養状態が非常に大事だろうということが1つあります。それからまだ網羅的には研究していない

のですが、遺伝子ですとアポE以外にもMTHFRの多型がアポE4と同じくらいの強さで効いているようです。

香川 メチレンテトラヒドロ葉酸の還元酵素ですね。女子栄養大学に栄養クリニックという小さい外来を持っています。そこでは、来られる方が全員この遺伝子の検査を希望されます。この遺伝子のTT多型は日本人の大体15~17%で、この場合明らかに認知症になりやすく、また脳梗塞も起こしやすいというデータが出ています。それで、私のところではTT多型の方には特別に栄養指導をしています。今度の栄養素の改訂では少し上がりましたが、日本では葉酸の推奨量は240μg/日です。米国は400μg/日で、もう6年も前からパン、米、シリアルなどには葉酸を強制的に加えています。そのために心筋梗塞がかなり減ったというデータが出ています。これによって認知症も減ってきているとは思いますが、まだ詳しいデータは出ていません。日本ではなかなかそこまでできないですね。

それで浴風会の大友先生と一緒に調べたところ、認知症の人はTT型が多く、ホモシステインのレベルが平均して25μmol/Lぐらいいあります。

広瀬 それは高いですね。

香川 普通の人でも高齢になると高くなりますが、10のオーダーですよ。

広瀬 私たちもホモシステインを100歳の方で測りましたが、やはり15μmol/Lくらいでした。ホモシステインで層別化してその影響を見たのですが、認知機能とはあまり関係なく、これは言われていることですが、凝固活性と結構関係がありました。

香川 そうかもしれませんね。

百寿者ではやはり認知症が私が一番問題だと思うのですが、100歳を超えてくると認知症の割合が非常に増えてきませんか。どこで認知症として線を引くかというのはなかなか問題ですけれども…

広瀬 難しいですね。

香川 Mini Mental State Examination (MMSE) で仮に得点を 24 点で切ったとして、何割くらいでしょうか。

広瀬 まず MMSE が本当に適した検査かどうかということが1つあります。次に、カットオフのポイントをどうするかということも大変大きな問題です。そこで私たちは、MMSE に Clinical Dementia Rating (CDR) を組み合わせています。

香川 CDR もいいですね。

広瀬 MMSE ですと目や耳が悪い方はできないことがあります。CDR は観察的なことなので結構診断ができます。0 が正常、0.5 が認知症の疑いということになると思います。CDR の 0.5 が MMSE ではどのくらいなのかと言うと、大体 18 点になります。ただ一般的に、認知症と言われている方は MMSE が 20 点を切っています。私たちの結果で 20 点を切ったとしますと、男性では 1/3 くらいが 20 点以上ですが、女性ですと 20 以上は 1 割くらいしかおりません [Journal of Gerontology Med Sci (印刷中)].

香川 女性のほうがどうしても認知症が多いですね。

広瀬 多いですね。

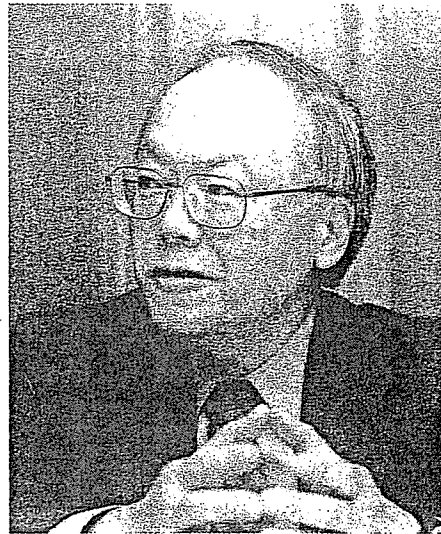
香川 この頃は MRI が盛んですから…。女性の海馬は平均して男性より容積は小さいですね。

広瀬 はい。15 人くらいの 100 歳の方の MRI を撮って、その体積の計算をしようかと思っただけですけども、まだ全然データにできていません。ただ、ざっと見た範囲では 100 歳の方でも非常に萎縮が少なく、小さな脳梗塞の跡のないような方が結構おられるのが驚きですね。

香川 それもぜひこれから参考にしたいですね。しかし、これからのことになりましたが、認知症のない長寿は可能なのでしょうか。

— 100 寿者になるためには —

広瀬 ごく最近私たちが論文にまとめたので



広瀬 先生

広瀬 信義 (ひろせ のぶよし)
 1948年 栃木県生まれ
 1973年 慶應義塾大学医学部 卒業
 1973年 同 内科教室 研修医
 1975年 済生会宇都宮病院 出張
 1977年 慶應義塾大学医学部内科学老人内科 入局
 1978年 名古屋大学理学部 留学
 1981年 慶應義塾大学医学部 助手
 1987年 米国シンシナチ大学薬理学教室 留学
 1990年 慶應義塾大学医学部内科学老年科 助手
 1991年 同 講師
 2001年～ 同 内科 (老年内科) 講師
 2004年～ 同 診療部長

専門分野：血清脂質代謝異常症の診断と治療、動脈硬化成因の解析、高齢者医療、超高齢者調査

認定医、専門医：
内科認定医・指導医、老年医学専門医・指導医

すが、機能で 100 歳の方を分けてみました。認知障害がなく、自立していて視聴覚がいいような方、それから認知障害がなく自立しているけれども、少し目、耳が悪いというスーパー 100 歳 (super centenarian) の人は、全体の 20% くらいいます。男女の率で見ますと、男性の 100 歳の 3 割くらい、女性の方ですと 1 割くらいです [Journal of Gerontology Med Sci (印刷中)].

香川 先ほどの値と似ていますね。

広瀬 似ています。ところが、人数を数えると男女ともほぼ同数で差がありません。男女の

差が一番出るところは認知症で、寝たきりで介助が必要な方に女性が多いのです。これは、女性は長生きだけれども機能が低いということではなく、女性のほうが何か障害があっても生き延びられるということではないかと思えます。

香川 強いというところがあるのでしょうかね。

広瀬 男性ですと、多分何か障害があるとすぐ死んでしまうのではないのでしょうか。ですから、スーパー 100 歳は本当に性差によらないのではないかと私たちは考えています。

香川 それは面白いですね。でも、全体として先生も NHK のテレビ放送の中で、「皆さんが 100 歳になるのは仮に難しいとしても、百歳からいろいろ学ぶことがあって、そして血管の病気などいろいろなことに気をつければ successful aging である」とおっしゃっていましたね。やはり生活習慣病を防いでいくということは、長い目で見るとかなり…

広瀬 私たちもいつも考えていることなのですが、それでは「生活習慣病にならなければ 100 歳まで元気に生きていけるか」ということになりますと、そうはいかないような気がします。私たちの予想としては、ただ単に生活習慣病にならなかつたら元気に 100 歳までいくとは考えていません。

香川 ここは大事だと思いますね。

広瀬 「100 歳を超えるにはまた別の原理があるだろう」というのが、100 歳研究をしている私たちの考えなのです。その 1 つの考えは、米国のニューイングランド地方で 100 歳研究をしている Tom Perls という研究者が、100 歳到達者を ① 80 歳前に重大な病気になった人、この重大な病気というのは心筋梗塞とか脳梗塞とかです。② 80 歳から 100 歳の間で重大な病気になった人、③ 100 歳まで重大な病気にならなかった人の 3 群に分けて比率を出しています。私たちもこれと同じ方法で、東京の 100 歳到達者を分けてみますと、大体大きな病気にならなかった人が 20%。それから 80 歳から 100 歳の間で病気になった人が 50%。80 歳前に大きな病気をした人はその残りの 20% と

いうことになりました。各群の認知機能と ADL を比較しますと、どの群もほぼ同じでした。これらのことから考えてみると、寿命には関係があるかもしれないけれども、元気であるということには生活習慣病はあまり関係がないのではないかなと思います [J Gerontol (投稿中)]。

香川 それは面白いですね。また私の母のことで大変恐縮ですが、母は栄養に大変気をつけていて、食事もいつも日記をつけていました。母は 4 群点数法をやっていたものですから、亡くなるまで悪い検査項目は 1 つもなく、検査値に H とか L がつかないのです。亡くなる最後の記録でも異常はありませんでした。これは私の想像ですが、おそらくもう血管内皮細胞のテロメアが尽きてしまって、きっとボロボロになっていたのでしょうかね。それである日、脳出血により、たった 2 日で亡くなりました。ですから、そんなに厳格に生活習慣病を防いでいなくても、元気で 100 歳になる人というのは結構いるのですね。

広瀬 そうですね。おっしゃるとおりで、あまり言葉は良くないのですが、「楽々 100 歳」と「やっそこ 100 歳」というように、ようやく 100 歳までになれる人と、先生がおっしゃるようにそんなに節制しなくてもなれる人がいます。

香川 タバコを吸っていて 100 歳とか、そういう人もいたりしますからね。

広瀬 そういう方たちを見ていますと、やはり病気にならないような防御とか、障害が起こっても軽く抑えるような防御因子のようなものがあるのではないかと、私は考えています。それをうまく見つければ、長寿、抗老化につながれると思っています。その 1 つとして最近注目されてきたのはアディポネクチンで…

香川 東京大学の門脇 孝先生が、糖尿病になりやすい GG 多型を…

広瀬 後日発表されると思いますが、アディポネクチンの濃度を測定しました。女性の 100 歳の人と若い女性、これは女性に限ってです。

そうすると、アディポネクチンの濃度が 100 歳の方は倍くらい高いのです。反対にレクチンが低く、TNF α 、これはインスリン感受性を悪くする、抵抗性を増強するということが良くないと言われているのですが、それが高いのです。

香川 TNF α も高いのですか。

広瀬 はい。TNF α も高く、アディポネクチンも高い値でした。肥満の方ですとアディポネクチンが低く、TNF α が高いということがあります。それから痩せている人ですと TNF α が低くて、アディポネクチンが高いのは分かるのですが、100 歳の方は非常に特徴的で、アディポネクチンも高いし TNF α も高いのです。一応いろいろなパラメーターとアディポネクチンの濃度の相関を見てみますと、やはり言われているように CRP、それから HbA_{1c}、Eセレクトイン、これは内皮障害のマーカーなのですが、負の相関があります。ですから、アディポネクチンが高いということは抗炎症作用があるし、抗動脈硬化作用も内皮障害も抑えるような作用もあるだろうということが考えられます。しかし、なぜアディポネクチンが高いかという理由ですが、門脇先生たちのグループがアディポネクチンの DNA 多型を 11 種類くらい報告されています。私たちも多型と関係があるのではと思ひ、一応 DNA 多型をみてみましたが、残念ながら多型に差は出ませんでした。そうしますと、まだアディポネクチンの合成にどのようなものが影響するかというような研究はあまりされていないのですが、もしかすると、例えば食事からの脂肪酸の摂取か何かでアディポネクチンが上がる、そうするとより長生きになるのではないかなどと考えたりしています (GGI 6: 32-39, 2006)。

香川 最近、門脇先生たちが米国のグループと一緒に研究して、野菜・果物にオスモチンという物質があって、それをたくさん食べているとアディポネクチンがおそらく高くなるだろう、また、オスモチンがアディポネクチンの代わりに受容体と結合するという大変面白い仕事を出しておられます。ですから、本当に百寿者

が野菜をたくさん食べているかという問題になってくるわけです。そうすると、やはり元気な老人はそういうものの摂取が多いらしいですね。先生もご存じだと思いますが、自治医科大学神経内科の植木 彰先生は高齢者で元気な人を調べています。特に認知症を調べると、魚を食べ、野菜も食べる人はなかなか元気で、最初彼は遺伝子の違いに非常に興味を持って調べていました。確かにアポ E、MTHFR の遺伝子多型には差はあるのですが、それよりも生活の中の食事の影響が大きいと言っています。ですから、要素としてはさらに複雑だと思いますが、いかがでしょうか。

広瀬 植木先生と一緒に仕事をされている島根大学の橋本道男先生は脂肪酸がご専門で、いま 100 歳の人たちの脂肪酸組成を測定していただいています。それでは 100 歳の方の食事はどうか、それが長寿につながるのではないかということはよく言われるのですが、多分 100 歳の時点での食事というのはその方が若かった頃とまた違っているので、100 歳の時点の食事を調べてもあまり意味を持たないのではないかと私たちは考えているのです。

香川 確かに。

広瀬 ですから、その方たちが 30 年、40 年前、あるいはさらに前にどのようなものをきちんと食べていたかは誰にも分かりませんので、もし食事の影響をみるとすると、これから前向きにやっついていかないとだめなのだろうと思います。

香川 先生が最近報告された、「セロトニン輸送体遺伝子の LL 型は日本人には本来わずか数%と少ないにもかかわらず、百寿者に LL 型が多い」というのは非常に面白い話ですね。私は今まであまり精神科のことには詳しくなくて、しかも心理テストというものをあまり信用しませんでした。Hariri という人が、客観的に LL 型と S が入っている人たちとの有意差を示したのです。日本人の 7 割は SS 型の人です。以前この対談で同じ慶應大学の 大野 裕先生とお話しさせていただきましたが、大野先生とこ

のことでお話しされたことはありますか。

広瀬 私たちも大野先生からご教示いただきました。

香川 私もそうなのです。先生もご存じのように、LL型の方は自分自身でやるという要素がきっと多いのでしょうね。仮にLL型の人間は非常に積極的であって、SS型はどちらかと言うと消極的、受動的としますと、百寿者にLL型が総体的に多くなってきたというのはどのように解釈されますか。

広瀬 私たちがなぜそれをやっていたかということなのですが、100歳の方の性格がその他の年齢の方々と少し違うのです。これは男女でまた差があるのですが、女性ですと決められたことはきちんとやる性格、ちょうどSS型のような感じなのです。それで私たちは、NEOという診断方法で5つの成分に分けてみました。そういうのを見るとまた違うのですが、一言で言うと女性は「ゴッドマザー」みたいな感じです。一族の若い人の世話をちゃんとして、しつけもするし、その人を中心に家族が回っているという感じの方が多いですね。一方男性のほうはと言いますと、一匹狼(笑)。

香川 LL型というか、そうですね。

広瀬 我が道を行くという方が多いなと思いますね。

香川 あまり人のことを気にしないのですね。

広瀬 そうですね。

香川 SS型の方は絶えず周囲に気を遣っていますからね。LL型の方はそういうことがないからストレスは少ないらしいですよ(笑)。

広瀬 多型性と新奇性の関連について論文が出ました。そこで百寿者で調べてみました。

香川 私たちもデータを持っています。ドーパミンは白人と日本人では頻度が全然違いますね。

広瀬 新奇性が強い人は繰り返し構造の数が多ということでしたが、日本人では繰り返し構造の多い方はほとんどいないですね。私たちが測ったのですが出ませんでした。セロトニン輸送体の多型性については先生が先ほどおっ

しゃったように、神経症傾向が少ないとか、ストレスがあったとか、うつになりにくいとか、扁桃体の機能が違うとかいうことと関連するということだったので、測定してみますと女性だけで差が出て、男性では差は出ませんでした。女性はL型が多いということなのですが、ご存じのようにL型の頻度が非常に少ないので、文献からの値を集めて解析しないと有意差が出てきません。それでも9%から10%くらいで、一般の人では3%くらいですので、有意に違うということになります(Mech Ageing Dev 126: 1178-1184, 2005)。先生も論文にお書きになっておられますが、セロトニン輸送体とパーソナリティの関係というのは、メタアナリシスするとそんなに強くなく、いつも議論されています。

香川 そうですね。これにはいつも議論があって、測定法、テストの方法に少し問題があると思うのです。でもこれでやると有意差が出てきますので、functional imagingと言いますが、もう少し心理的なものの評価を改良していくともっと面白いデータが出ると思うのです。

広瀬 おっしゃるとおりです。私たちはパーソナリティを介してではないのではないかと考えて、認知機能とADLとアルブミンに注目しました。

香川 なるほど面白いですね。

広瀬 そうしますと、LL型でアルブミンの値が高いのです。これはなぜなのか、非常に不思議に思っています。ですからパーソナリティに影響する遺伝子は当然あるのだと思うのですが、それはパーソナリティだけではなく、また別のことにも多分影響していて…

香川 ええ、食事のとり方も影響してくる可能性があります。比較的高齢になっても「肉が好きだ」という元気な人がいます。東京都老人総合研究所の熊谷修先生がそういうことを長い間調べておられます。どういう人が認知症になりにくいかと言いますと、案外タンパク質を食べておられる人で、積極的な生き方と言いますか、こういうことを含め、食事で随分違うと

いう論文を公衆衛生学雑誌に出しておられます。しかし先ほど言いましたように、それ自体は食事と関係がなくても人間の行動を決めるのは精神で、それによって行動を変えていく、分かっているけれどもこれが難しいのですね。

広瀬 私も臨床をやっていますので、ライフスタイルを変えるのはものすごく大変ですね。そういうところで心理学の専門の方とかに入ってもらえるとすごくいいなと、いつも思っています。

行動がやはり長寿と関係があるだろうということは私も思っています。大野先生からお話があったかもしれませんが、大野先生も慶應の双子調査に関与されています。これは文学部の安藤寿康先生が主となってされている研究なのですが、私も行動と長寿の関係には興味があって、安藤先生とよくお話しします。私のような医者は、「病気になったか、ならないか」とか、「病気のリスクは」とか、「治療は」ということばかりに気がいってしましますが、「長寿」ということを考える場合、病気もさることながら「どうやって生きていくか」ということが非常に大きいのではないかと考えています。ですから、行動遺伝学の結果が長寿研究に応用できるのではないかなと思っています。

—B型人間は長生き？—

香川 そうですね。本当に新しい分野で、生活習慣が物事を決めていく因子としてとても大きいと思いますね。

先生の百寿者のご研究でB型の血液型の方が統計的に有意に多いということですが、これも面白いですね。ご存じのように日本人にはA型が多く、A型の人は後から日本に入ってきた稲作農耕の弥生系と言われています。一方、B型の人はそれ以前に日本に住み、狩猟採取をしていた縄文系と言われています。沖縄は圧倒的に100歳老人が多くおられます。沖縄は縄文系と言われておりますので、血液型はB型が優位なのです。全国的な調査以来30年を通して、沖縄や鹿児島などの南西日本に百寿者が統計的に

多いという事実があります。中部から関東にかけてはA型が多いですよ。それでは「B型という血液型が本当に長寿か」という話になると、私はよく言うのですが、有色人種の国家としてA型が多い国は日本だけですよ。

広瀬 そうですね。あとの国はB型ですね。

香川 パレオ・モンゴロイドの血液型はO型です。日本が世界一の長寿国と言われていましたが、すでにシンガポール、香港、それから南部の中国が越えているのです。そういうところはむしろB型が多いですね。ですから私は、血液型で見るときにほかの要素と交絡していて、それで次々とかう面白い結果と言いますか、予想外の結果が出てくるのではないかと思います。

広瀬 これをなぜ始めたかと言いますと、百寿者のお宅にお伺いすると、「うちのおじいちゃん（おばあちゃん）の血液型は何ですか」とたびたび聞かれるので、サービスで測ってみたのです。そうしますと「何かB型が多いな」ということで、その結果をまとめ論文にして専門誌に投稿したら、「これは一般向けの週刊誌用には非常に良いけれども、アカデミックなジャーナルにはふさわしくない」と言われました（笑）。そういうことだったのですが、その後さらにたくさんの対象群を集めて、ようやく載せてもらったのです。確かに、B型に代表されるような人種とかそういうことはあるのだろうと思うのですが、私たちがこの血液型の測定で言いたかったことは、長寿にはある遺伝子やあるタンパク質が大事だということがいろいろ研究が進むにつれて言われ始めておりますが、ABOの血液型は糖鎖によって決まります。ですから、私たちは糖鎖が大切だということをこれで強調したかったのです（Exp Gerontol 39: 1563-1565, 2004）。

香川 これも統計としてとっていくと大変面白いですね。

先生は長く百寿者の研究をなさっておられ、しかし、皆が100歳までの長寿というわけにはいかないと思うのです。その中で生活習慣病

に關係して、もちろん独立な面もあると思うのですが、長生きするために、先生はどういうことを皆さんに臨床医としてお勧めになりますか。これが今回の対談の「百寿者に学ぶ」というタイトルに最もふさわしいのではないかと思います。昔は遺伝子が同じであっても100歳まで生きられませんでしたが、今は100歳まで生きてくる人が多く、そこに至るまでにはいろいろ生活改善があったわけで、遺伝も大きな要因かもしれませんが、まだまだ多くの要因があると思うのですが、いかがでしょうか。

広瀬 先生のご質問の答えになるかどうか分かりませんが、私たちが100歳の方にお会いしたときに人生を振り返っていただくと、「良かった。でも今が一番良い」と言われる方が多いのです。私たちは研究者として100歳の方々を統計的にアルブミンがどうか、遺伝子がどうかということで見っていますが、100歳の方々は私たちの人生の大先輩になるわけです。その人たちは、1人1人が私たちの想像を絶する人生を過ごしてこられているわけで、非常に魅力的なお話ばかりなのです。そして、100歳の方々とお話ししていて一番印象に残るのは、やはり幸福感が高い方が多いのではないかということです。ですから、長生きだけでもあまり幸せでないのと、そこそこ平均寿命までいって幸せで死ぬのとどちらがいいのかということですね。私自身もその場になってみないと分かりませんが、やはり幸せでそこそこでいいのではないかということもあるのです。なぜ幸福感を感じるのかということなのですが、介護負担度などを見ていきますと、家族関係が非常にうまく作れているのではないかと思います。

香川 そういうことはありますね。

広瀬 100歳の方にお会いすると、非常に魅力的な方が多くて、やはり人間関係をうまく作ってこられた人が多いのではないかなということを感じます。そういったことは、高齢期になっても幸せであるということに非常に大事な意味を持つと思います。

それからもう1点、病気の面のことを考えてみますと、淡路島で最長寿の方にお会いしたときに、私は「どうしてこんなに長生きしたのですか」と、またバカな質問してしまいました。愚問なのですが、大体お会いした皆さんについて聞いてしまいます(笑)。そうしますと、ほとんどの人は「さあ、分からないね。気がついたら、なっていた」とおっしゃいますが、その最高齢の方はきっぱりと、「簡単なことですよ。病気にならなければいいのです」とおっしゃいました。その方の言いたかったことは、「病気にならないように自分自身で注意しろ」ということだと思うのです。ですから、タバコを吸わないようにするとか、体調が少しでも悪いと感じたら医療機関に行くとか、そのように自分の健康に注意することが大事だということだと思います。

生活習慣病について、すでに1970年頃に大規模臨床試験を行って、動脈硬化の危険因子を決めたMRFITなどがあります。その30年後にまたどういう状態かということ調べたところ、危険因子の少ない人は元気で長寿で、医療費も少ないという結果が、1999年に『JAMA』に出ました(JAMA 282: 2012-2018, 1999)。そういうことを考えますと、やはり生活習慣病のリスクを減らしていくことは長寿につながってくるのだと思います。ただ、それがexceptional longevity(例外的な長寿)という100歳までの長寿のようなレベルになると、おそらくまた別の原理が働いているのではないかと考えています。

一元気で長生き

香川 私が自治医大に来て4年目くらい、1976年にLeaf先生が初めて来られたとき、百寿者が多いということで沖縄に行く予定でしたが、まず栃木県の中を見ようということになりました。そのときに、当時の足尾銅山争議にかかわった100歳になる方がおられました。驚くべき足尾の鉍害でそれこそ人も住めないような状態だったそうなのですが、今はきれいな渡良瀬の

遊水池になっています。そこでそれに反対して戦った人たちがまだ少し残っており、その中にその 100 歳の方がおられました。その方は日露戦争にも出征しており、その戦争で負傷され、体の中に砲弾の破片が残っていました。30 年前の話ですのでその方はもう亡くなられましたが、日露戦争から帰ってきたら足尾銅山の鉱害で地獄の様相を呈していたということです。そして彼らは、当時の国家体制から見ると言ってみれば反乱ですよ。田中正造について戦って、足尾銅山に皆で押しかけたり、国に直訴したり、そのため彼も何回も投獄されたりしました。後に、太平洋戦争後の話になるのですが、彼は町長になりました。このような本当に想像を絶する激しい生活をして、一生を送ってきたわけです。私はその方のお話を聞いて、変な話ですがネズミの実験を思い出しました。遺伝子を侵すような放射線を当てるとネズミは寿命が短くなります。これはよく分かりますが、放射線ではなく、あちこちに傷をつけたり、病原菌にいろいろ感染させたりしても、それが治ると寿命は変わらないのだそうです。ですから、大もとの持って生まれたテロメアに関係しているのではないかと思うのです。私は割とテロメアを信用しているのです。私自身のテロメアを測ると、一般の人と同じで 6.5kb です。0.5kb 短くなるのに 10 年と言われてしますので、何ごともなければ私も 100 歳までいくわけですね (笑)。まあ、普通の人も皆そうですけれどもね (笑)。その方の話は Leaf 先生と一緒に書いた本の中に載っていますが、随分タフな方で、とにかく心身あらゆる苦勞をしているわけです。戦後、町長になられたのですが、戦後の政治は左右の激突で、決してストレスが少ない生活だったと思われぬのです。語弊があるかもしれませんが、逆に一般の主婦のようにあまりストレスのない人には、そのときの調査では百寿者はいませんでした。

広瀬 私たちはストレスコーピングということで、なるべくお伺いしたときは「どういうことが大変だったか」とか、「どういうことが楽



香川 先生

しかったか」とお聞きしているのですが、大体同じようなことで、「戦争の問題」や「家族と死に別れた」とか、そういうことが結構ストレスになっています。一般的に言われていますが、男性の場合、配偶者が先に亡くなるとすぐ亡くなってしまふことが多いのですが、女性は結構元気でやっているという傾向があります。

100 歳の人たちでもいろいろなご苦勞をしてこられた方もいるわけで、確かに少しストレスがかかったほうが長生きなのだということも言われています。私たちはデータを持っていませんが、ドイツのハイデルベルクのグループは「ストレスが少しかかっている人のほうが長生きだ」というデータを出しています。極端なストレスはだめだと思いますが、ただ年齢を重ねるうちにストレスの避け方をだんだん身につけてくるのではないかと思います。

香川 まさにそうだと思います。今朝、用があって聖路加国際病院にお伺いし、日野原重明先生とお話をしてきました。先生は毎朝 7 時半に神奈川県から病院へ出て来られます。私の伺った時間が 9 時半でしたが、もう面会者は 11 人目だったそうです。日野原先生は 94 歳におなりで、100 歳までお元気だと思います。そこでもストレスをいかに解消するかというお話をしておられました。文化勲章受章の直前までトルコに行っておられたそうですし、本誌で私と

対談された直後もネパールに行かれるということで、それも「重い荷物を担いでいく」とおっしゃっておられました。空港でも決してエスカレーターに乗らず、階段を上るそうです。以前のこの対談のときに、「私のエネルギーの安静時代代謝が1,255kcalです」と言いましたところ、日野原先生は「私は1,300kcalですよ」ということで、驚きました。百寿者やそれに近い年齢の方で、相当元気の良い人でも普通は1,000kcalを切っていますよ。ただ、日野原先生は私たちと同じくらいお食べになります。本当に驚くべきお元気さです。

広瀬 そうですね。最高で1,200kcalくらいですね。一般の方は60%くらいです(J Nutr Sci Vitaminol 49: 133-138, 2003)。

香川 日野原先生は総回診を週2回しているのだそうです。今日も回診の話をしておられました。94歳で超人的ですね。日野原先生は、ストレスを避けるというのではなく、どうやってストレスを処理するかというお話をこの対談でされました。しかし、そういう人が世の中にいるということは素晴らしいですね。先生は多くの高齢者の方々を見ておられますが、90歳も半ばになると、元気な方は少ないのではないですか。

広瀬 実は東京の100歳研究の仕事をしていまして、ひと通り調べていろいろな数字は出てきたのですが、次にどうしようかということを考えました。そこで、105歳以上の人はどういう状態だろうかと考えて、105歳以上の人の全国調査を始めたわけです。驚いたのは、105歳過ぎてもおお元気な方もおられます。ある105歳の女性の方をお伺いしたとき、初めは105歳の方の娘さんかなと思ったらご本人でした。新聞を読んでおられ、立ち居振る舞いもゆっくりしたところがなく、てきぱきしていて、あまりのお元気に「ええっ」と思いました。男性の方でも、これは大学の教授だった方ですが、その方も105歳のときにお伺いしたときも非常にしっかりしておられました。その方が100歳のときに私を誕生パーティーに招いてく

ださいました。ご自分のお弟子さんを集めて開かれたそのパーティーでスピーチされたのですが、何と1時間、メモなしで姿勢よく起立されたまま、ずっとスピーチをされました。そのスピーチの内容もきちんと筋が通っているのです。門下生の方たちは、「先生のレクチャーが始まった。すごいな」と言っておられました。その方が105歳になったときも、もちろんあまり外に出られなくなっていました。やはりかなりしっかりしておられました。ですから、そういうすごい方も20%くらいおられますが、やはり多くの方は先ほどお話ししたように認知症などの健康上の問題を抱えています。

香川 いま百寿者が26,000人の時代ですから、これからは30,000人にはなるでしょうね。特にこれから団塊の世代の人がその年代に達してくると、今の勢いでいくと、おそらく場合によると5万あるいは10万の人が100歳になるかもしれませんね。

広瀬 そうですね。ただ、これから第2次大戦の影響が出てきて、ある年代では少し落ちるかもしれません。

香川 それはちょうど私たちの年代かもしれませんね。私は終戦(1945年)が中学1年生で、ちょうど成長期でしたが、その前後から極端な食糧難でした。この年代の人には脳血管の障害が多いのです。ちょうど血管が発達するときにタンパク質が不足したので良くないという話もあって、私たちの年代はそういうところで短命かもしれませんね。また、いわゆる団塊の世代は日本の成長に合わせて大きくなってきた年代ですので、逆に過剰栄養が問題になり、ひよっとするともっと短命になってしまうかもしれません。でも、団塊の世代は人数が多いので百寿者の数は増えてくるでしょうね。

広瀬 ですから、やはり高齢化になったとき、個人が長生きするのに合わせて社会がどのように変わっていくかということを実際に考えないといけないと思います。今、アンチエイジングの研究が盛んになってきていますが、元気な高齢者が増えたときに社会としてどのように対処

していくかということまで考えていかないと、まずいことになるのではないのでしょうか。

香川 そうですね。国としても、内閣府に清家 篤 慶應義塾大学教授が委員長をなさっている高齢者対策の有識者会議というのがあります。私もその委員なのですが、「今後どのようになるのが良いのか」というご意見を皆さんから機会あるごとに伺っています。高齢化社会、それに加えて少子化ということもあり、元気な人は元気な人なりに活用していかないといけないと思います。少子化ということで大学も入学者が減って大変ですが、社会そのもので働く人、国を支える人が減ってくるので、将来の日本を考えると大変深刻な問題だと思います。こういうことを含め、元気な高齢者を少しでも活用したいという考えを出しているのです。

広瀬 そうですね。今、60歳とか65歳で定

年というのはすごく若いですよ。働きたいという人は働ければ…

香川 そうですね。100歳でも元気で活躍していただきたいと思います。今日は楽しいお話をお伺いしました。本当にありがとうございました。機会があれば、またぜひお聞かせください。

「元気に長生き」、これからの日本の高齢化社会を生きる私を含めて、ぜひこうありたいものです。高齢化社会、少子化と多くの問題を抱える日本ですが、先生のご研究の成果が少しでも明るい未来に生かされますよう切に願うものであります。これからもいろいろ先生に教えていただきたいと思います。長時間にわたり、本当にありがとうございました。

(とき：平成17年12月8日 ところ：東京 山の上ホテル)



Contribution of an affect-associated gene to human longevity: Prevalence of the long-allele genotype of the serotonin transporter-linked gene in Japanese centenarians

Yasuyuki Gondo ^{a,*}, Nobuyoshi Hirose ^b, Yasumichi Arai ^b, Ken Yamamura ^b,
Ken-ichirou Shimizu ^b, Michiyo Takayama ^b, Yoshinori Ebihara ^b,
Susumu Nakazawa ^b, Hiroki Inagaki ^a, Yukie Masui ^a, Koji Kitagawa ^c

^a Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

^b Department of Geriatric Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

^c Gumma Paz College, Gumma, Japan

Accepted 22 June 2005

Available online 10 August 2005

Abstract

Negative affect such as depression and anxiety has been reported to be associated with morbidity and mortality, and polymorphisms of the serotonin transporter (5HTT) gene may be associated with such affect disorders. Hypothesizing that 5HTT gene polymorphisms could influence human longevity via negative affect; we compared the polymorphic variation of the 5HTT gene between 265 Japanese centenarians and control subjects. In addition, we evaluated the relationships between the 5HTT genotype and the physical, cognitive, and biologic status of centenarians, as indicated by the Barthel Index, the Mini-Mental State Examination, and serum albumin concentration, respectively. The frequency of the *ll* genotype and the *l* allele was significantly greater in centenarians than in younger control subjects, particularly women. A significant effect of the 5HTT genotype on serum albumin concentration was observed in both sexes. Although, there was sex optionality, the *l* allele may carry a longevity advantage possibly through behavioral mechanisms.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Serotonin transporter gene-linked polymorphism region; Longevity; Centenarians; Gender difference; Serum albumin

1. Introduction

Recent progress in genome studies has indicated that gene polymorphisms contribute to human longevity. These polymorphisms are thought to influence longevity through several potential mechanisms including the immune system (Takata et al., 1987; Bonafe et al., 2001) and the metabolic system (Schachter et al., 1994; Geesaman et al., 2003). Although psychobehavioral systems are also important factors in longevity, little is known about them, and little interest has been paid to polymorphisms of candidate genes that might influence human behavior. Recently, relationships

between gene polymorphisms and human emotion, affect, or behavior have been reported (Lesch et al., 1996). We describe here an investigation of the contribution of the affect-related serotonin transporter (5-hydroxytryptamine, 5HTT) gene-linked polymorphism region (5HTT-LPR) to longevity in a cohort taken from the Japanese population.

The adverse impact of negative affect on health has been reported in many papers (Kiecolt-Glaser et al., 2002). Major depression or depressed mood has been associated with increased risk of myocardial infarction (Pratt et al., 1996), decreased physical function (Rantanen et al., 2000), and higher cancer risk (Penninx et al., 1998), as well as mortality (Herrmann et al., 1998). Anxiety has been linked to heart disease, including myocardial infarction (Eaker et al., 1992; Kawachi et al., 1994).

* Corresponding author. Tel.: +81 3 39643241; fax: +81 3 3574776.

E-mail address: ygondo@tmig.or.jp (Y. Gondo).

The 5HTT-LPR has been linked with negative affect and personality (Lesch et al., 1996). The two most common alleles are a 44-bp insertion (l allele) or deletion (s allele) in its promoter region. The s allele reduces the efficiency of transcription of the gene, resulting in decreased serotonin transporter expression and serotonin uptake by lymphoblasts (Lesch et al., 1996). Possession of the s allele has been associated with higher neuroticism, higher harm avoidance, and depression (Lesch et al., 1996), including geriatric depressive symptoms (Steffens et al., 2002). For healthy adults, the 5HTT showed strongest association to personality trait among personality-associated genes (Munafò et al., 2003).

A recent report has also indicated that gene-environment interactions exist in relation to the 5HTT gene polymorphism and an individual's emotional state. Decreased serotonergic function, which is associated with impulsiveness, aggressive behavior, and low sociality, is observed in rhesus monkeys with the s allele if they are not reared by their mothers (Bennett et al., 2002). In addition, in humans the susceptibility to becoming depressed after experiencing negative life events is higher in individuals with s alleles than in those with l alleles (Caspi et al., 2003). In women, carriers of the s allele tend to complain of psychological and somatic symptoms if they are not employed or have a chronic disease (Grabe et al., 2004). In a recent functional neuroimaging study it was reported that activation of the right amygdala in response to angry and fearful facial expressions was stronger in subjects with, than in those without the s alleles (Hariri et al., 2002).

The frequency of occurrence of the l/l genotype and l allele is far less common in Japanese people than in Caucasians (Nakamura et al., 1997; Arinami et al., 1999; Ishiguro et al., 1999; Ishikawa et al., 1999; Katsuragi et al., 1999; Kumakiri et al., 1999; Murakami et al., 1999; Kunugi et al., 2000; Umekage et al., 2003). The reported effects of 5HTT polymorphism on negative affect have not been consistent. While no relationship has been observed between this polymorphism and either bipolar affective disorder (Kunugi et al., 1997) or anxiety-related personality (Umekage et al., 2003), Murakami et al. (1999) and Katsuragi et al. (1999) reported an association with anxiety-related personality. Another study has also revealed an association with anxiety-related personality trait, but this finding could not be confirmed statistically because of the low number of l/l genotype subjects studied (Nakamura et al., 1997).

Negative influences of the l allele on health in Japanese people have also been reported. Possession of the l allele was correlated with the early onset of alcohol dependence (Ishiguro et al., 1999), habitual smoking (Ishikawa et al., 1999), and coronary heart disease among smokers (Arinami et al., 1999). However, these reports included either only men or only few women as participants. These inconstant results may be attributable not only to ethnic differences, but also to gender differences and to the small sample sizes used in these previous Japanese studies.

Even though the findings regarding the effect of 5HTT gene polymorphism on negative emotion or health in Japanese subjects are equivocal, they do suggest that it would be valuable to explore the influences of 5HTT on human health and mortality. We hypothesized that 5HTT gene polymorphism influences human longevity via a negative impact on the affective state as a result of stressful life experiences. The frequency of the l/l genotype and l allele would therefore be higher among long-lived individuals than in the younger population. We also hypothesized that if a particular gene polymorphism has a positive impact on longevity, the functional status, such as basic activities of daily living (ADL), or cognitive function among people who possess this genotype would be better maintained, even in the final stages of their life. In the study presented here, we compared the distribution of 5HTT polymorphisms in a large number of Japanese centenarians with that in younger control subjects. We also explored the effects of 5HTT polymorphisms on physical, cognitive, and biological function in the centenarians.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

2.1.1. Centenarian group

A total of 304 Japanese centenarians (66 men, 238 women) living in the 23 wards of metropolitan Tokyo participated in a survey in which they were visited by Tokyo Centenarian Study staff between July 2000 and May 2002. We randomly chose centenarians from the residential list and sent a letter inviting participation to 1194 centenarians, accounting for 66.9% of an estimated 1785 centenarians living in this area in the study period. Five hundred thirteen (43.0%) agreed to participation. Three hundred four represented 25.5% of the letter recipients, participated in the visit survey. Women outnumbered men in our sample by 1:3.5, which was not significantly different from the ratio for the total centenarian population in this area (1:3.9). Among our participants, 206 were living at home and 98 were institutionalized; eight of those living at home were living alone. A medical doctor, a psychologist, and a nurse conducted the survey in a visit to the centenarians' residences. After a medical checkup and blood sampling, the psychologist conducted cognitive assessment and psychological testing. The ADL were evaluated using the Barthel Index (Collin et al., 1988). Psychologists assessed cognitive function using the Mini-Mental State Examination (MMSE; Folstein et al., 1975) at the time of the visit. Anxiety-related personality traits were evaluated by NEO-FFI (Costa and McCrae, 1985) Japanese version (Shimonaka et al., 1997) answered by proxy who knows participants well. The Barthel Index and the MMSE are used commonly in centenarian studies to evaluate physical function and cognitive status, respectively. Serum albumin concentration

was measured as a biologic indicator of health status that has been linked to physical and cognitive function as well as the mortality risk of centenarians (Shimizu et al., 2001). Of the 304 participants, 265 (men 59, women 206) blood samples were suitable for analysis of DNA polymorphism. Table 1 details the characteristics of the centenarians studied.

2.1.2. Younger control subjects

Data for younger controls were derived from two sources. We recruited 225 adults (131 women, 94 men; mean age, 37.9 ± 11.5 years; range 19–67 years). They were recruited from the university students, co-medical personnel, and bank clerk as volunteers. However, the frequency of the l/l genotype among Japanese is low, precluding accurate estimation of genotype distribution based on the small sample size. Therefore, we combined our control 5HTT genotype distribution results with genotype distributions reported in previous studies of Japanese populations (Arinami et al., 1999; Ishiguro et al., 1999; Ishikawa et al., 1999; Katsuragi et al., 1999; Kumakiri et al., 1999; Murakami et al., 1999; Kunugi et al., 2000; Nakamura et al., 1997; Umekage et al., 2003). Participants' age range of those studies was 19–77 and they were composed of the volunteers of medical checkup patients, healthy general public and medical staff. The details of those participants were shown in Table 2.

The genotype distribution by gender is shown in Table 2. We compared our results in centenarians with genotype in this combined younger control group. Written informed consent was obtained from all participants or their families. The ethics committee of Keio University School of Medicine approved this study.

2.2. DNA polymorphism

Genomic DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells by phenol extraction. Polymorphisms of the 5HTT gene were determined by a polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, as previously described (Lesch et al., 1996).

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS software version 11.5J (SPSS, Japan). The χ^2 -test was performed to

Table 1
Mean (and S.D.) of background characteristics in centenarians

	Men	Women	Total
N	59	206	265
Mean age (years)	101.1 (1.8)	101.2 (1.8)	101.2 (1.8)
Physical and cognitive functions			
Barthel Index	61.9 (33.9)	42.0 (33.5)	46.4 (34.5)
MMSE	17.0 (8.3)	12.7 (8.3)	13.7 (8.2)
Albumin (g/dl)	3.7 (0.4)	3.6 (0.4)	3.6 (0.4)

MMSE, Mini-Mental State Examination.

Table 2
Distribution of serotonin transporter (5HTT) polymorphism in previous studies of Japanese subjects and our own non-centenarians

Authors	Men			Women			Combined			Participants characteristics		
	l/l	l/s	s/s	l/l	l/s	s/s	l/l	l/s	s/s	Sample	Mean age (S.D.)	Range
Arinami et al.	10 (4.5%)	64 (28.8%)	148 (66.7%)	—	—	—	—	—	—	Medical checkup patient	55.1(7.4)	47–77
Ishiguro et al.	—	—	—	—	—	—	8 (2.8%)	81 (27.9%)	201 (69.3%)	Healthy volunteers	51.7(8.2)	—
Ishikawa et al.	15 (3.9%)	104 (26.9%)	268 (69.3%)	—	—	—	—	—	—	Medical checkup patient	Group A 46.8(—) Group B 52.6(—)	37–59 46–65
Katsuragi et al.	—	—	—	—	—	—	4 (4.0%)	31 (30.7%)	66 (65.3%)	Medical stuffs	25.0(3.6)	—
Kumakiri et al.	—	—	—	—	—	—	11 (5.8%)	60 (31.4%)	120 (62.8%)	Medical stuffs	*144 were between 20–62	—
Murakami et al.	—	—	—	—	—	—	16 (4.0%)	159 (31.7%)	326 (65.1%)	Healthy volunteers	20 and 35	19–81
Kunugi et al.	—	—	—	—	—	—	15 (4.6%)	97 (29.8%)	214 (65.6%)	Medical stuffs and patients	Staff 32(14) patients 57(8)	—
Nakamura et al.	—	—	—	3 (1.6%)	55 (29.6%)	128 (68.8%)	—	—	—	College students	19.6(2.2)	—
Umekage et al.	2 (3.7%)	15 (27.8%)	37 (68.5%)	11 (5.8%)	55 (28.9%)	124 (65.3%)	13 (5.3%)	70 (28.7%)	161 (66.0%)	Medical stuffs	37.7(11.9)	—
Our sample	1 (1.1%)	30 (31.9%)	63 (67.0%)	6 (4.6%)	39 (29.8%)	86 (65.6%)	7 (3.1%)	69 (30.7%)	149 (66.2%)	University students co-medical personal bank clerk.	37.9(11.5)	19–67
Overall	28 (3.7%)	213 (28.1%)	516 (68.2%)	20 (3.9%)	149 (29.4%)	338 (66.7%)	74 (3.9%)	567 (30.2%)	1237 (65.9%)			

Table 3
Comparison of serotonin transporter genotype and allele frequency between centenarians and younger controls

	Men		Women		Combined	
	Centenarians	Young control	Centenarians	Young control	Centenarians	Young control
Genotype frequency						
l/l	3 (5.1%)	28 (3.7%)	19 (9.2%)	20 (3.9%)	22 (8.3%)	58 (4.2%)
l/s	22 (37.3%)	213 (28.1%)	61 (29.6%)	149 (29.4%)	83 (31.3%)	408 (29.6%)
s/s	34 (57.6%)	516 (68.2%)	126 (61.2%)	338 (66.7%)	160 (60.4%)	911 (66.2%)
χ^2 value						
l/l vs. l/s and s/s		0.3 n.s.		6.1*		7.8**
l/l and l/s vs. s/s		2.8 n.s.		2.5 n.s.		3.8 n.s.
Allele frequency						
L allele	28 (23.7%)	269 (17.8%)	99 (24.0%)	189 (18.6%)	127 (24.0%)	524 (19.0%)
S allele	90 (76.3%)	1245 (82.2%)	313 (76.0%)	825 (81.4%)	403 (76.0%)	2230 (81.0%)
χ^2 value		2.6 n.s.		5.3*		7.2**

* Indicates $p < 0.05$.

** Indicates $p < 0.01$.

evaluate distribution differences in genotype and allele frequency. Genotype \times sex analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate associations between 5HTT genotype, personality traits and Barthel Index, MMSE score, and serum albumin concentrations. Multiple comparisons were performed by the Tukey HSD method. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical power was calculated by Sample power version 2 (SPSS, Japan).

3. Results

3.1. Distribution and allele frequency of the 5HTT genotype

The distribution of genotype and allele frequency for 5HTT in centenarians and control subjects is presented in Table 3. The genotype distributions matched with expectations for a Hardy–Weinberg equilibrium, in younger control. The l/l genotype was uncommon in both centenarians (8.3%) and control subjects (3.9%). The distribution of genotypes between centenarians and young control was compared. Statistically significant difference was observed (l/l versus l/s and s/s, $\chi^2 = 7.8, p < 0.01$). When an analysis was performed according to gender, a significant distribution difference was

observed for women ($\chi^2 = 6.1, p < 0.05$) but not for men. However, significant difference was not observed between l allele-positive (l/l and l/s, combined) and s/s participants. The frequency of the l allele was significantly higher in centenarians (24.0% versus 19.0%; $\chi^2 = 7.1, p < 0.01$); this effect was observed only for women (24.0% versus 18.6%; $\chi^2 = 5.3, p < 0.05$). This null effect in men was not derived from low statistical power to detect a significant difference ($\alpha = 0.05$, power = 10%, 2-tailed) in this sample.

3.2. Association between the 5HTT genotype and physical, cognitive, and biological status

The effects of the 5HTT genotype on NEO-FFI, Barthel Index, MMSE, and serum albumin were analyzed in centenarians (Table 4). No significant effect of genotype was observed for Barthel Index or MMSE and any of NEO-FFI dimensions. A significant main effect of genotype was observed for serum albumin concentration ($F = 4.2, p < 0.05$). Further, multiple comparison indicated that serum albumin concentrations were higher in association with the l/l genotype than with the s/s genotype ($p < 0.01$). Neither a significant gender main effect nor a gender-genotype interaction was observed. We also conducted the same analysis on serum albumin concentration for our

Table 4
Mean and (S.D.) of NEO-FFI, Barthel Index, Mini-Mental State Examination and serum albumin concentration by 5HTT genotypes in centenarians

	Men			Women			Statistics
	l/l	l/s	s/s	l/l	l/s	s/s	
NEO-FFI dimensions							
Neuroticism	21.5 (6.4)	15.9 (8.8)	17.4 (5.8)	22.2 (6.4)	19.3 (6.2)	19.4 (5.8)	n.s.
Extraversion	23.0 (5.7)	26.7 (6.2)	25.8 (5.7)	27.9 (7.9)	27.0 (6.9)	26.0 (6.4)	n.s.
Openness	25.0 (4.2)	22.2 (6.1)	23.2 (6.0)	21.9 (4.4)	22.4 (5.0)	22.4 (4.8)	n.s.
Agreeableness	30.0 (0.0)	31.5 (6.4)	31.5 (8.1)	30.4 (7.8)	30.8 (7.8)	31.3 (7.8)	n.s.
Conscientiousness	35.5 (3.5)	32.3 (9.2)	33.9 (7.7)	31.7 (6.6)	31.4 (7.2)	31.8 (5.8)	n.s.
Barthel Index	73.3 (46.2)	73.3 (32.7)	73.3 (34.1)	48.7 (37.7)	44.9 (32.9)	39.5 (33.1)	Sex $p < 0.01$
MMSE	20.3 (5.5)	16.3 (8.7)	17.1 (8.4)	13.9 (8.5)	13.2 (7.7)	12.3 (8.1)	Sex $p < 0.05$.
Albumin (g/dl)	4.1 (0.2)	3.7 (0.4)	3.6 (0.4)	3.8 (0.4)	3.6 (0.4)	3.6 (0.4)	Genotype $p < 0.05$

younger control subjects. However, no significant effect of 5HTT genotype was observed (data not shown).

4. Discussion

The influence of 5HTT polymorphism on longevity in the Japanese population was investigated. We hypothesized that 5HTT polymorphism could mediate the human affective state, which influences health and longevity. First, we found a significant difference in genotype distribution and allele frequency for 5HTT polymorphism between centenarians and younger control subjects, particularly women. Second, we found a statistically significant but weak association between the 5HTT genotype and serum albumin concentration, which is a biological marker of health status among centenarians.

There is much psychological stress in human life. Centenarians living in Tokyo have experienced catastrophic life events including a catastrophic earthquake, two world wars, and personal life events such as bereavement resulting from the deaths of spouses and children. The negative impact of these life events on the affective state is thought to be greater in individuals with the *s* allele (Caspi et al., 2003; Grabe et al., 2004). We found that the distribution of both the *l/l* genotype and the *l* allele, which is a protective factor against stressful experiences, was higher in centenarians than in young control subjects. Even though we could not examine the actual responses to the stressful situations of centenarians during their long lives, this finding suggests that this affect-related gene polymorphism may have a positive impact upon human longevity. The mechanism is unknown but perhaps acts through immune (Takata et al., 1987; Bonafe et al., 2001) or metabolic pathways (Schachter et al., 1994; Geesaman et al., 2003) that are also linked to longevity.

However, no association was found between the 5HTT genotype and anxiety-related personality traits among the centenarians. Our previous report indicated that centenarians are more neurotic than young controls (Masui et al., 2002). This higher degree of neuroticism contributes to increased health-seeking behavior, such as frequently consulting a doctor (Jerram and Coleman, 1999), which is assumed to be a helpful coping mechanism for survival. Such a confounding factor might influence the null effect of 5HTT polymorphism on the behavioral aspect of centenarians. In addition, a recent functional neuroimaging study has shown that activation of the right amygdala, which processes angry and fearful facial expressions, was stronger in the *s*-allele-positive group than in the *s*-allele-negative group, even though there was no difference in anxiety-related personality traits between these groups (Hariri et al., 2002). According to this finding, we might hypothesize that even if we could find no difference in personality phenotype among the different genotypes, the biological response, is functioning and may contribute to survival.

The frequency of the *l/l* genotype and *l* allele was prominent only for female centenarians. We hypothesize

that this gender difference could be explained by the biological and lifestyle differences between men and women. Several studies have suggested the existence of gender-genotype interactions in the effects of the serotonergic system. Whole blood serotonin level is higher in men (Weiss et al., 2005). The rate of serotonin synthesis in the central spinal fluid is lower in women than in men (Nishizawa et al., 1997), and it has been reported that the effect of the 5HTT genotype on serotonin turnover differs between the genders (Williams et al., 2003). The effect of treatment with a serotonin reuptake inhibitor on emotional disorders is greater in women throughout the life cycle (Yonkers, 2003). A higher frequency of suicide attempts was reported only in women with the *s/s* genotype (Baca-Garcia et al., 2002). The higher ratio of the *l/l* genotype in women, theoretically results in increased sensitivity of their serotonergic system.

Lifestyle differences may also influence gender differences in genotype distribution. Several papers have reported adverse effects of the *l* allele on longevity. Relationships have been found in Japanese men between possession of the *l* allele and a smoking habit (Ishikawa et al., 1999), earlier onset of alcoholism (Ishiguro et al., 1999), and a higher prevalence of coronary heart disease among smokers (Arinami et al., 1999). Both alcohol drinking and smoking habits are more prevalent in men than in women in the Japanese population. The positive effect on survival of possessing the *l* allele might thus be obscured in men because of a lifestyle-genotype interaction.

A gender difference in the gene effect has been reported in several centenarian studies. Among Italian centenarians, an interferon- γ allele polymorphism difference was observed only in women (Lio et al., 2002a), while a $-1082G$ homozygosity difference was observed only in men (Lio et al., 2002b). The G allele at the $-174C/G$ locus, which influences plasma interleukin (IL)-6 concentration, was decreased only in male centenarians (Bonafe et al., 2001). These authors explained the gender difference in terms of hormonal regulation. With regard to the gender difference in the effect of 5HTT polymorphism, it was considered that this might be influenced by the difference of lifestyle and/or hormonal status, between men and women.

We were able to analyze the data from 25.2% of all recruited centenarians. This might have resulted in a selection bias such that those centenarians with low anxiety levels who possess the *l* allele and high ADL healthier centenarians tended to participate in this study. With regard to the anxiety level, because of the prevalence of dementia among our sample of centenarians (65% of all participants), in the majority of cases agreement to participate was obtained from a family member or by proxy, rather than from the centenarians themselves. Thus, it is unlikely that the anxiety level of the centenarians influenced the decision to participate. We also compared the NEO-FFI score between those mail-survey participants ($n = 209$) who did not agree to be visited by our research members and those

who did; no significant difference between the two groups was observed for any of the personality dimensions. Thus, we believe that the gene-related anxiety level did not influence participation in the study.

On the other hand, though the ADL level of whole participants of our study was deteriorated, Barthel Index score in visit survey participants (mean = 44.1, S.D. = 34.8) were significantly higher ($p < 0.01$) than in mail-survey participants (mean = 34.4, S.D. = 32.7). This implies that the healthier centenarians were likely to participate in our study. To avoid the sampling bias, non-invasive sampling method (e.g. postal buccal washes) will be need in future study. However, in terms of exploring the long live and healthy aging gene polymorphisms, the purpose of our study, observed result here could be situated as to find a clue of contribution of affect-associated gene to the longevity.

In terms of sampling bias, we also have to mention the young control data. Because of the low frequency of l/l genotype, and not population based standardized value, we used pooled values as control. This method has advantage to stabilized the scattered genotype distribution among small sample studies. However, we could not avoid the publication bias, that not all conducted data were published and difficult to control the participants back ground. Standardized distribution of 5HTT polymorphism in various age groups with representative sample must be compared to conform and replicate this finding.

We hypothesized that 5HTT gene polymorphism would influence not only longevity, but also functional status among centenarians. As expected, we found that l/l individuals exhibited a significant but slightly higher serum albumin concentration, which is a strong marker of physical function, cognitive function, and mortality in centenarians (Shimizu et al., 2001), than s/s individuals. The biological mechanism linking the gene polymorphism and serum albumin level has not yet been characterized.

Finally, the frequency of the l allele is low in the Japanese population, and the l/l genotype is relatively rare (about 5%, from our review of the literature). It is paradoxical that the frequency of the l/l genotype, which may contribute to longevity, is lower among ethnic groups with the longest average lifespan. However, serotonergic function may vary with both ethnicity and gender (Kunugi et al., 1997; Gelernter et al., 1998). The lifetime morbidity rate for affective disorders is lower in Asian populations than among Caucasians (Weissman et al., 1996). Some of this difference may be artifact due to differences in the way different cultures measure affective disorders. For example, despite a lower prevalence of affective disorders in Asia suicide among the elderly is markedly higher than in the U.S. and many Western countries (Rockett and Smith, 1989). Nevertheless, a positive effect of the l allele upon longevity or biological functions might not apply equally to all ethnic groups. In addition, we did not confirm any association between age and serum albumin concentration by multi-cohort or longitudinal study. Further study is required to

investigate these associations using a larger sample and different design, as well as to confirm the associations in different ethnic groups and genders.

Acknowledgments

We greatly appreciate the time and assistance provided by the centenarians and their family members. We could not have carried out this study without their kind cooperation.

This study was partly supported by a grant from the Japanese Ministry of Health and Welfare for the Scientific Research Project on Longevity, a grant for studying the sociomedical background of centenarians (Principal Investigator, Nobuyoshi Hirose), a grant from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture (No. 15730346, Yasuyuki Gondo), and aid for research from the Keio Health Consulting Center.

Reference

- Arinami, T., Ohtsuki, T., Yamakawa Kobayashi, K., Amemiya, H., Fujiwara, H., Kawata, K., Ishiguro, H., Hamaguchi, H., 1999. A synergistic effect of serotonin transporter gene polymorphism and smoking in association with CHD. *Thromb. Haemost.* 81, 853–856.
- Baca-Garcia, E., Vaquero, C., Diaz Sastre, C., Saiz Ruiz, J., Fernandez Piqueras, J., de Leon, J., 2002. A gender-specific association between the serotonin transporter gene and suicide attempts. *Neuropsychopharmacology* 26, 692–695.
- Bennett, A.J., Lesch, K.P., Heils, A., Long, J.C., Lorenz, J.G., Shoaf, S.E., Champoux, M., Suomi, S.J., Linnoila, M.V., Higley, J.D., 2002. Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function. *Mol. Psychiatry* 7, 118–122.
- Bonafe, M., Olivieri, F., Cavallone, L., Giovagnetti, S., Mayegiani, F., Cardelli, M., Pieri, C., Marra, M., Antonicelli, R., Lisa, R., Rizzo, M.R., Paolisso, G., Monti, D., Franceschi, C., 2001. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur. J. Immunol.* 31, 2357–2361.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386–389.
- Collin, C., Wade, D.T., Davies, S., Horne, V., 1988. The Barthel ADL Index: a reliability study. *Int. Disabil. Stud.* 10, 61–63.
- Costa P, McCrae R., 1985. The NEO Personality Inventory manual. Psychological Assessment Resources Odessa.
- Eaker, E.D., Pinsky, J., Castelli, W.P., 1992. Myocardial infarction and coronary death among women: psychosocial predictors from a 20-year follow-up of women in the Framingham Study. *Am. J. Epidemiol.* 135, 854–864.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. Mini-mental state A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 12, 189–198.
- Geesaman, B.J., Benson, E., Brewster, S.J., Kunkel, L.M., Blanche, H., Thomas, G., Perls, T.T., Daly, M.J., Puca, A.A., 2003. Haplotype-based identification of a microsomal transfer protein marker associated with the human lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14115–14120.
- Gelernter, J., Kranzler, H., Coccaro, E.F., Siever, L.J., New, A.S., 1998. Serotonin transporter protein gene polymorphism and personality measures in African American and European American subjects. *Am. J. Psychiatry* 155, 1332–1338.

- Grabe, H.J., Lange, M., Wolff, B., Volzke, H., Lucht, M., Freyberger, H.J., John, U., Cascorbi, I., 2004. Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden.
- Hariri, A.R., Mattay, V.S., Tessitore, A., Kolachana, B., Fera, F., Goldman, D., Egan, M.F., Weinberger, D.R., 2002. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science* 297, 400–403.
- Herrmann, C., Brand Driehorst, S., Kaminsky, B., Leibing, E., Staats, H., Ruger, U., 1998. Diagnostic groups and depressed mood as predictors of 22-month mortality in medical inpatients. *Psychosom. Med.* 60, 570–577.
- Ishiguro, H., Saito, T., Akazawa, S., Mitushio, H., Tada, K., Enomoto, M., Mifune, H., Toru, M., Shibuya, H., Arinami, T., 1999. Association between drinking-related antisocial behavior and a polymorphism in the serotonin transporter gene in a Japanese population. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 1281–1284.
- Ishikawa, H., Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Yamakawa Kobayashi, K., Endo, K., Lin, Y.L., Yanagi, H., Tsuchiya, S., Kawata, K., Hamaguchi, H., Arinami, T., 1999. Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking among Japanese males. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8, 831–833.
- Jerram, L., Coleman, G., 1999. The big five personality traits and reporting of health problems and health behavior in old age. *Br. J. Psychol.* 4, 181–192.
- Katsuragi, S., Kunugi, H., Sano, A., Tsutsumi, T., Isogawa, K., Nanko, S., Akiyoshi, J., 1999. Association between serotonin transporter gene polymorphism and anxiety-related traits. *Biol. Psychiatry* 45, 368–370.
- Kawachi, I., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Weiss, S.T., 1994. Symptoms of anxiety and risk of coronary heart disease The Normative Aging Study. *Circulation* 90, 2225–2229.
- Kiecolt-Glaser, J.K., McGuire, L., Robles, T.F., Glaser, R., 2002. Emotions, morbidity, and mortality: new perspectives from psychoneuroimmunology. *Annu. Rev. Psychol.* 53, 83–107.
- Kumakiri, C., Kodama, K., Shimizu, E., Yamanouchi, N., Okada, S., Noda, S., Okamoto, H., Sato, T., Shirasawa, H., 1999. Study of the association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and personality traits in a Japanese population. *Neurosci. Lett.* 263, 205–207.
- Kunugi, H., Hattori, M., Kato, T., Tatsumi, M., Sakai, T., Sasaki, T., Hirose, T., Nanko, S., 1997. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. *Mol. Psychiatry* 2, 457–462.
- Kunugi, H., Ueki, A., Otsuka, M., Isse, K., Hirasawa, H., Kato, N., Nabika, T., Kobayashi, S., Nanko, S., 2000. Alzheimer's disease and 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene: no evidence for an association. *Am. J. Med. Genet.* 96, 307–309.
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1527–1531.
- Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Bonafe, M., Franceschi, C., Olivieri, F., Colonna Romano, G., Candore, G., Caruso, C., 2002a. Allele frequencies of +874T->A single nucleotide polymorphism at the first intron of interferon-gamma gene in a group of Italian centenarians. *Exp. Gerontol.* 37, 315–319.
- Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Colonna Romano, G., Candore, G., Bonafe, M., Cavallone, L., Franceschi, C., Caruso, C., 2002b. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun.* 3, 30–33.
- Masui, Y., Gondo, Y., Inagaki, H., Kitagawa, K., Hirose, N., Arai, Y., Takayama, M., Ebihara, Y., Yamamura, K., Nakazawa, S., Shimizu, K., Konishi, K., Kanno, Y., Fujimori, J., 2002. The influence of personality traits on longevity and centenarians' ADL. In: The Gerontological Society of America's 55th Annual Scientific Meeting 11. pp. 23–26.
- Munafo, M.R., Clark, T.G., Moore, L.R., Payne, E., Walton, R., Flint, J., 2003. Genetic polymorphisms and personality in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 8, 471–484.
- Murakami, F., Shimomura, T., Kotani, K., Ikawa, S., Nanba, E., Adachi, K., 1999. Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 44, 15–17.
- Nakamura, T., Muramatsu, T., Ono, Y., Matsushita, S., Higuchi, S., Mizushima, H., Yoshimura, K., Kanba, S., Asai, M., 1997. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and anxiety-related traits in the Japanese. *Am. J. Med. Genet.* 74, 544–545.
- Nishizawa, S., Benkelfat, C., Young, S.N., Leyton, M., Mzengeza, S., de Montigny, C., Blier, P., Diksic, M., 1997. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5308–5313.
- Penninx, B.W., Guralnik, J.M., Pahor, M., Ferrucci, L., Cerhan, J.R., Wallace, R.B., Havlik, R.J., 1998. Chronically depressed mood and cancer risk in older persons. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1888–1893.
- Pratt, L.A., Ford, D.E., Crum, R.M., Armenian, H.K., Gallo, J.J., Eaton, W.W., 1996. Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction Prospective data from the Baltimore ECA follow-up. *Circulation* 94, 3123–3129.
- Rantanen, T., Penninx, B.W., Masaki, K., Lintunen, T., Foley, D., Guralnik, J.M., 2000. Depressed mood and body mass index as predictors of muscle strength decline in old men. *J. Am. Geriatr. Soc.* 48, 613–617.
- Rockett, I.R., Smith, G.S., 1989. Homicide, suicide, motor vehicle crash, and fall mortality: United States' experience in comparative perspective. *Am. J. Public Health* 79, 1396–1400.
- Schachter, F., Faure Delanef, L., Guenet, F., Rouger, H., Froguel, P., Lesueur Ginot, L., Cohen, D., 1994. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat. Genet.* 6, 29–32.
- Shimizu, K., Hirose, N., Arai, Y., Gondo, Y., Wakida, Y., 2001. Determinants of further survival in centenarians. *Geriatr. Gerontol. Int.* 1, 14–17.
- Shimonaka, Y., Nakazato, K., Gondo, Y., Takayama, M., 1997. Construction and factorial validity of the Japanese NEO-PI-R. *J. Pers.* 6, 138–147.
- Steffens, D.C., Svenson, I., Marchuk, D.A., Levy, R.M., Hays, J.C., Flint, E.P., Krishnan, K.R., Siegler, I.C., 2002. Allelic differences in the serotonin transporter-linked polymorphic region in geriatric depression. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 10, 185–191.
- Takata, H., Suzuki, M., Ishii, T., Sekiguchi, S., Iri, H., 1987. Influence of major histocompatibility complex region genes on human longevity among Okinawan-Japanese centenarians and nonagenarians. *Lancet* 2, 824–826.
- Umekage, T., Tochigi, M., Marui, T., Kato, C., Hibino, H., Otani, T., Kohda, K., Kato, N., Sasaki, T., 2003. Serotonin transporter-linked promoter region polymorphism and personality traits in a Japanese population. *Neurosci. Lett.* 337, 13–16.
- Weiss, L.A., Abney, M., Cook Jr., E.H., Ober, C., 2005. Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 33–41.
- Weissman, M.M., Bland, R.C., Canino, G.J., Faravelli, C., Greenwald, S., Hwu, H.G., Joyce, P.R., Karam, E.G., Lee, C.K., Lellouch, J., Lepine, J.P., Newman, S.C., Rubio Stipek, M., Wells, J.E., Wickramaratne, P.J., Wittchen, H., Yeh, E.K., 1996. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *J. Am. Med. Assoc.* 276, 293–299.
- Williams, R.B., Marchuk, D.A., Gadde, K.M., Barefoot, J.C., Grichnik, K., Helms, M.J., Kuhn, C.M., Lewis, J.G., Schanberg, S.M., Stafford Smith, M., Suarez, E.C., Clary, G.L., Svenson, I.K., Siegler, I.C., 2003. Serotonin-related gene polymorphisms and central nervous system serotonin function. *Neuropsychopharmacology* 28, 533–541.
- Yonkers, K.A., 2003. Special issues related to the treatment of depression in women. *J. Clin. Psychiatry* 64 (Suppl. 18), 8–13.

ARTICLE

A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects

Anna-Kaisa Niemi^{1,2}, Jukka S Moilanen^{1,2}, Masashi Tanaka³, Antti Hervonen⁴, Mikko Hurme⁵, Terho Lehtimäki⁶, Yasumichi Arai⁷, Nobuyoshi Hirose⁷ and Kari Majamaa^{*,1,2}

¹Department of Neurology, University of Oulu, Oulu, Finland; ²Clinical Research Center, Oulu University Hospital, Oulu, Finland; ³Department of Gene Therapy, Gifu International Institute of Biotechnology, Kakamigahara, Japan; ⁴Laboratory of Gerontology, Tampere School of Public Health, University of Tampere, Tampere, Finland; ⁵Department of Microbiology and Immunology, University of Tampere Medical School and Tampere University Hospital, Tampere, Finland; ⁶Department of Clinical Chemistry, Tampere University Hospital, Tampere, Finland; ⁷Department of Geriatric Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Mitochondrial DNA (mtDNA) coding region polymorphisms, as well as the 150T polymorphism in the noncoding region, have been associated with longevity. We have studied here the association of 150T with longevity further and assessed differences in this association between various mtDNA haplogroups. We analysed a sample of 321 very old subjects and 489 middle-aged controls from Finland and Japan. 150T was more frequent among the very old than among the controls in both the Finnish and Japanese subjects. Interestingly, the association was not similar in all haplogroups, and a stratified analysis revealed that two additional common polymorphisms, 489C and 10398G, modified the association between 150T and longevity. These findings suggest that longevity is partly determined by epistatic interactions involving these three mtDNA loci.

European Journal of Human Genetics (2005) 13, 166–170. doi:10.1038/sj.ejhg.5201308

Published online 13 October 2004

Keywords: mitochondrial DNA; longevity; control region; epistasis; association study; phylogenetic analysis; haplogroup

Introduction

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a maternally inherited genome that encodes 22 tRNAs, two rRNAs and 13 subunits of the respiratory chain complexes and ATP synthase. These complexes catalyse the reactions of oxidative phosphorylation that produce ATP and also contribute to oxygen free radicals, which are thought to play a role in the aging process.¹ Interestingly, longevity shows maternal

inheritance.² Uniparental inheritance and high mutation rate have led to mtDNA lineages (haplogroups), which are defined by ancient polymorphisms and characterized by considerable variation. The European population is almost exclusively distributed among the nine haplogroups designated as H, I, J, K, T, U, V, W and X, whereas haplogroups A, B, C, D, E, G and certain subclusters of macrohaplogroups M and N are characteristic to Asian populations, haplogroups A, B, C and D to native Americans and haplogroups L0, L1, L2 and L3 to African populations.^{3–5}

There is evidence that certain coding region polymorphisms specific to mtDNA haplogroups may be relevant for common diseases and traits.⁶ Longevity has been found to be associated with mtDNA coding region polymorphisms

*Correspondence: Professor K Majamaa, Department of Neurology, University of Oulu, PO Box 5000, FIN-90014 Oulu, Finland. Tel: +358 8 315 4526; Fax: +358 8 315 4544; E-mail: kari.majamaa@oulu.fi
 Received 6 May 2004; revised 19 August 2004; accepted 1 September 2004

such as 5178A (characterizing haplogroup D) in the Japanese⁷ and 9055A (characterizing haplogroup K) in the French⁸ and Irish,⁹ and mtDNA haplogroup J in the Italians¹⁰ and the Finns.¹¹ Furthermore, the 150T polymorphism within a 1.1 kb noncoding control region of mtDNA has been reported to be more prevalent in centenarians than in controls.¹² Interestingly, 150T is present in several haplogroups among the global population including haplogroups D and J.¹³ In this study we identified carriers of 150T among 810 very old subjects and middle-aged controls from Finland and Japan in order to examine the association of this polymorphism with longevity further. We also assessed the possibility that the association between 150T and longevity is modified by other control region sequence variation or haplogroup-specific coding region variation.

Subjects and methods

The group of very old subjects comprised 225 Finns (age 90 or 91 years) and 96 Japanese (age 100–104 years), and the middle-aged controls 393 Finns and 96 Japanese. The controls were from the same geographical regions as the very old subjects. The allele status at position 150 was determined by direct sequencing of the Japanese samples and by allele-specific amplification of the Finnish samples. DNA extracted from blood was amplified in the presence of an oligonucleotide containing an allele-specific Locked Nucleic Acid[®] (LNA) (Prologo LLC, Paris, France). Samples harbouring 150C could be amplified in the presence of a forward primer 5'-CTGTCTTTGATTCCTGCCTCATC (LNA underlined), and samples harbouring 150T in the presence of a forward primer 5'-CTGTCTTTGATTCCTGCCTCATC. Each sample was amplified in both reactions with 5'-CTGTAAAAGTGCATACCGCCAA as the reverse primer. The amplified 302-bp fragment was visualized by agarose gel electrophoresis. Sequencing of selected samples was used to verify the reliability of the results obtained by allele-specific amplification.

Established haplogroup-defining polymorphisms in the coding region were determined by direct sequencing or by restriction fragment analysis¹⁴ in the carriers of 150T in order to assign the samples to mtDNA haplogroups.^{3,4} The mtDNA control region spanning the nucleotides 16024–00576 was sequenced in the samples harbouring 150T.

One-tailed Fisher's exact test was used to assess the hypotheses that the frequency of 150T was higher and the frequencies of haplogroups harbouring 150T were higher among the very old subjects than among the controls. The frequencies of the very old subjects and the controls in each haplogroup were represented as 2 × 2 tables, and heterogeneity among these was evaluated by using RelRisk 2.33.¹⁵ Associations between alleles at polymorphic sites and longevity were measured by the χ^2 statistic. An estimate of the significance of the highest observed

chi-square (χ^2_{\max}) was determined in a randomization test, where the labels 'case' and 'control' were permuted 100 000 times and the global *P*-value was estimated by the proportion of permutation samples with χ^2_{\max} equal to or higher than that in the observed data.

Results

We found 65 very old subjects and 66 controls with 150T (Table 1), implying a significantly higher frequency among the very old than among the controls in both the Finns and the Japanese. The control region sequence was available for all 150T carriers, except for one U5 control subject who was therefore excluded from subsequent analyses. A total of 88 polymorphic sites were identified, and the strongest association to longevity among these control region sequences was found for 489C ($\chi^2 = 14.099$; permutation test: *P* = 0.00165). When the position 489 was excluded, a permutation test revealed that no other control region variants were significantly associated with longevity among the 150T carriers ($\chi^2_{\max} = 7.075$; permutation test: *P* = 0.126). A phylogenetic analysis then revealed that 150T and 489C were both present in subhaplogroups J2, D5 and M7b, whereas 150T, but not 489C, was present in T2, U5 and N9a (Figure 1). In addition, the coding region polymorphism 10398G was found to co-segregate with 489C.

A contingency table analysis of the frequencies of the very old subjects and the controls in subhaplogroups J2, D5, M7b, T2, U5 and N9a revealed a significant heterogeneity ($\chi^2 = 17.604$, *df* = 5, *P* = 0.0035). Subhaplogroups J2, D5 and M7b were more common among the very old, and the combined frequency of these subhaplogroups was significantly higher among the very old subjects than among the controls (Table 1).

Discussion

Secondary origins of heavy strand replication of mtDNA (nucleotide positions 146–151) are located in the vicinity of nucleotide position 150, and it has been suggested that 150T alters the location of the origin of heavy strand replication and that 150T is related to the regulation of mtDNA replication,¹² for instance by providing a replicative advantage to a genome that harbours the mutation. The proportion of 150T relative to 150C in fibroblasts has been found to increase with advanced age.¹² Other polymorphisms in this region could have a similar effect, and 152T>C and 195T>C have also been shown to accumulate in the fibroblasts of aged individuals¹⁶ and 189A>G in the muscle.¹⁷ We found that the majority of the samples belonging to J2 harboured at least four mutations close to the origins of replication of mtDNA, whereas similar pattern was not found for D5, M7b, N9a, T2, or U5. Therefore, polymorphisms near the origin of the

Table 1 Frequency of subjects with the 150T allele among the very old subjects and middle-aged controls

	Very old		Controls		P-value
	N	%	N	%	
<i>Finns and Japanese</i>					
All haplogroups	65	20.2	66	13.5	0.007*
Subhaplogroups J2, D5, M7b	22	6.9	5	1.0	7.8×10^{-6} *
Subhaplogroups T2, U5, N9a	37	11.5	56	11.5	0.53
Other haplogroups	6	1.8	5	1.0	0.24
<i>Finns</i>					
All haplogroups	46	20.4	57	14.5	0.037*
Subhaplogroup J2	8	3.6	3	0.8	0.015*
Subhaplogroup T2	1	0.4	4	1.0	0.90
Subhaplogroup U5	34	15.1	48	12.2	0.18
Other haplogroups	3	1.3	2	0.5	0.26
<i>Japanese</i>					
All haplogroups	19	19.8	9	9.4	0.032*
Subhaplogroup D5	7	7.3	1	1.0	0.032*
Subhaplogroup M7b	7	7.3	1	1.0	0.032*
Subhaplogroup N9a	2	2.1	4	4.2	0.89
Other haplogroups	3	3.1	3	3.1	0.66

Other haplogroups include G, M7a and B4 among very old Japanese subjects, G, B4 and D4 among the Japanese controls, H in two very old Finnish subjects, an undefined haplogroup in one very old Finnish subject and H and U in the Finnish controls. An asterisk denotes significance at the 95% confidence level ($P < 0.05$), unadjusted for multiple comparisons.

heavy strand replication could explain the association between longevity and subhaplogroup J2, but not the association between longevity and D5 and M7b.

150C>T polymorphism emerged separately in the early evolution of the European subhaplogroups J2, T2 and U5, and of the Asian subhaplogroups D5, M7b and N9a, but has only occasionally been noted elsewhere in the mtDNA phylogeny. Subhaplogroups D5 and M7b of the Japanese belong to mtDNA macrohaplogroup M, which has diverged from African haplogroup L3 and from macrohaplogroup N some 60 000 years ago.¹⁸ On the other hand, N9a of the Japanese and J2, T2 and U5 of the Finns belong to macrohaplogroup N. Most of the haplogroups in macrohaplogroup N harbour an ancient 10398G>A mutation, which alters the amino acid 114 in the MTND3 gene, but haplogroup J has experienced a back-mutation at this site resulting in the 10398G allele in common with macrohaplogroup M and, therefore, common with D5 and M7b. In addition, haplogroup J harbours the control region mutation 489T>C, which also occurred early in the evolution of macrohaplogroup M. Our data thus showed that 150T is associated with longevity in subhaplogroups

J2, D5 and M7b that harbour 10398G and 489C, but not in subhaplogroups T2, U5 and N9a that lack the latter two polymorphisms. The association between a combination of these three mtDNA variants and longevity provides the first epidemiological support for the assumption that the pathogenic or adaptive nature of a variant is influenced by interactions with other loci in mtDNA.¹⁹

Our previous study on Finnish nonagenarians has suggested an association between haplogroups J and U and longevity, respectively, and a negative association between haplogroup H and longevity.¹¹ The absence of 150T in haplogroup H coincides with the lower frequency of this haplogroup among the very old and, similarly, the higher frequency of haplogroup J among the very old coincides with the presence of 150T within haplogroup J2. However, there is discrepancy between the higher frequency of haplogroup U among the very old and the lack of association between 150T and longevity within subhaplogroup U5, suggesting that other yet unidentified polymorphisms in mtDNA contribute to the association between haplogroup U and longevity.

Longevity is a complex trait in which variation depends on epistatic interactions between several genetic loci and

Figure 1 Phylogenetic tree depicting the origin and evolution of mtDNA subhaplogroups harbouring 150C>T (M7b, D5, N9a, U5, T2 and J2). Polymorphisms detected in mtDNA control region spanning nucleotides 16024-00576 in the very old subjects and the controls are shown in normal font, and established haplogroup-defining polymorphisms^{3,4} are shown in italics. Letter suffixes indicate transversions. Insertions, deletions and repeat length polymorphisms are shown according to the recommended nomenclature. @= back-mutation; outgroup= the African reference sequence for human mtDNA (Genbank NC_001807.4, GI:17981852). The root of the phylogeny includes the transition at position 150, because the outgroup sequence coincidentally contains a parallel 150T allele. Each solid circle represents one very old subject and each open circle represents a control subject.