

- Chembiochem. 10, 287-295, 2008.
8. Masuda, Y., Uemura, S., Nakanishi, A., Ohashi, R., Takegoshi, K., Shimizu, T., Shirasawa, T. & Irie, K.: Verification of the C-terminal intramolecular beta-sheet in Aβ42 aggregates using solid-state NMR: implications for potent neurotoxicity through the formation of radicals. *Bioorg Med Chem Lett*. 18, 3206-3210, 2008.
9. Masuda, Y., Nakanishi, A., Ohashi, R., Takegoshi, K., Shimizu, T., Shirasawa, T. & Irie, K.: Verification of the intermolecular parallel beta-sheet in E22K-Aβ42 aggregates by solid-state NMR using rotational resonance: implications for the supramolecular arrangement of the toxic conformer of Aβ42. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72, 2170-2175, 2008.
10. Kim, J., Takahashi, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., Kajita, M., Kanayama, A. & Miyamoto, Y.: Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 129, 322-331, 2008.
11. Hashizume, K., Hirasawa, M., Imamura, Y., Noda, S., Shimizu, T., Shinoda, K., Kurihara, T., Noda, K., Ozawa, Y., Ishida, S., Miyake, Y., Shirasawa, T. & Tsubota, K.: Retinal Dysfunction and Progressive Retinal Cell Death in SOD1-Deficient Mice. *Am J Pathol*. 172, 1325-1331, 2008.
- ## 2.学会発表
1. 清水孝彦、白澤卓二. ミトコンドリアフリーラジカルと臓器障害. 第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 2. 川上 哲、松田瑛奈、金子孝夫、田原正一、白澤卓二、清水孝彦. 抗酸化剤投与による mitochondrial cardiomyopathy の予防と治療. 第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 3. 堀江哲郎、津田千鶴、石川 慎、野田義博、桑原宏朋、川上 哲、小澤裕介、吉田朋恵、白澤卓二、清水孝彦. 骨格筋特異的 Mn-SOD欠損マウスを用いた筋機能と活性酸素過剰解析. 第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 4. 稲垣 潤、池田泰隆、川上 哲、白澤卓二、清水孝彦. CuZn-SOD欠損マウスは加齢性皮膚炎を発症する. 第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 5. 池田泰隆、辻 晋司、佐藤 郎、石倉正治、白澤卓二、清水孝彦. ドーパミンニューロン細胞におけるアスタキサンチンのアポトーシス抑制機構. 第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 6. 砂川忠広、清水孝彦、近藤祐香、佐見

- 学、田頭素行、神田智正、白澤卓二。
- りんごポリフェノールの抗老化効果。第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
7. 下条洋輔、小坂邦男、野田義博、清水孝彦、白澤卓二。筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いたローズマリー成分による神経変性疾患予防効果の検討。第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 8. 辻 晋司、佐藤 郎、石倉正治、清水孝彦、白澤卓二。ドーパミンニューロン死に対するアスタキサンチンの*in vitro*抑制効果。第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 9. 金 周元、高橋眞由美、清水孝彦、白澤卓二、梶田昌志、金山淳宏、宮本有生。Lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* by an antioxidant, platinum nanoparticle. 第8回日本抗加齢医学会総会、東京国際フォーラム、2008.6.6-7.
 10. 佐々木徹、酒井政伸、清水孝彦、白澤卓二、田原正一、金子孝夫、小島周二。活性酸素の生成と制御のトポロジーに関する研究。日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008.6.12-13.
 11. 高橋眞由美、清水孝彦、森泉栄子、白澤卓二。CoQ10によるclk-1欠損マウスのミトコンドリア機能不全の回復。日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008.6.12-13.
 12. 村上一馬、増田裕一、森本 晃、宇野真弓、原 英之、清水孝彦、白澤卓二、入江一浩。アミロイドbペプチド(Aβ42)の病的コンホメーションの提唱。日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008.6.12-13.
 13. 川上 哲、松田瑛奈、金子孝夫、田原正一、砂川忠広、白澤卓二、清水孝彦。抗酸化剤投与によるMn-SOD欠損に起因する拡張型心筋症の予防と治療。日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008.6.12-13.
 14. 清水孝彦、堀江哲郎、桑原宏朋、津田千鶴、石川 慎、野田義博、川上 哲、白澤卓二。骨格筋の運動機能におけるMn-SODの役割。日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008.6.12-13.
 15. 金 周元、高橋眞由美、清水孝彦、白澤卓二、梶田昌志、金山淳宏、宮本有生。白金ナノ粒子の抗酸化能による線虫 *C. elegans* の寿命延長効果。日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008.6.12-13.
 16. 辻 晋司、佐藤 郎、石倉正治、清水孝彦、白澤卓二。Prevention of rotenone-induced apoptosis and DJ-1 oxidation by a potent antioxidant, Astaxanthin, in human dopaminergic neuroblastoma cells. 第31回日本神経科学大会、東京国際フォーラム、2008.7.9-11.
 17. Takahiko Shimizu Analysis of heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice. The Japan-Korea Joint

- Seminar: Toward the Establishment of Asian Aging Research and Education Center. 長崎ハウステンボス, 2008.9.4-9.6
18. 砂川忠広, 神田智正, 田頭素行, 佐見学, 清水孝彦, 白澤卓二. りんごポリフェノールによる老化抑制効果. 「果汁とアンチエイジング」第51回果汁技術研究発表会, ヤクルトホール, 2008.9.12.
 19. 辻 晋司, 佐藤 郎, 石倉正治, 清水孝彦, 白澤卓二. ロテノン誘発ドーパミンニューロン死とDJ-1の酸化型生成に対するアスタキサンチンの*in vitro* 抑制効果. 第4回アスタキサンチン研究会, 国立京都国際会館, 2008.9.18.
 20. 増田裕一, 上村 諭子, 大橋 竜太郎, 中西 梓, 竹腰 清乃理, 清水孝彦, 白澤卓二, 入江一浩. bアミロイド凝集体に存在する毒性コンホメーションの同定. 第27回日本認知症学会学術集会, 前橋, 2008.10.10-12.
 21. Yasutaka Ikeda, Shinji Tsuji, Akira Satoh, Masaharu Ishikura, Takuji Shirasawa, and Takahiko Shimizu. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 首都大学東京バイオコンファレンス 2008, 首都大学東京国際交流会館, 2008.10.23.
 22. Kazuma Murakami, Mayumi Uno, Y. Masuda, Takahiko Shimizu, Takuji Shirasawa, Kazuhiro Irie. Isomerization and/or racemization at Asp23 of A β 42 do not enhance its aggregation, neurotoxicity, and radical productivity *in vitro*. *The 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC*, November 15-19 (2008).
 23. Yasutaka Ikeda, Shinji Tsuji, Akira Satoh, Masaharu Ishikura, Takuji Shirasawa, and Takahiko Shimizu. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *The 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC*, November 15-19 (2008).
 24. Y. Masuda, S. Uemura, A. Nakanishi, R. Ohashi, K. Takegoshi, T. Shimizu, T. Shirasawa, and K. Irie. Verification of the C-terminal intramolecular b-sheet in A β 42 aggregates using solid-state NMR: Implications for potent neurotoxicity through the formation of radicals. *The 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC*, November 15-19 (2008).
 25. K. Irie, Y. Masuda, S. Nakanishi, R. Ohashi, K. Takegoshi, T. Shimizu, and T. Shirasawa. Verification of the intermolecular parallel β -sheet in E22K-A β 42 aggregates by solid-state NMR using rotational resonance: Implications for the supramolecular arrangement of the toxic conformer of A β 42. *The 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC*,

November 15-19 (2008).

26. 高橋真由美、清水孝彦、森泉栄子、白澤卓二. clk-1欠損によるマウス胎生致死の原因について. 第6回CoQ研究会、八王子、2009.1.30.
27. 野田義博、津田千鶴、堀江哲郎、清水孝彦. CuZn-SOD欠損マウスにおける生殖能力と酸化ストレスの関係. 日本実験動物技術者協会関東支部第34回懇話会、慶應義塾大学理工学部 矢上キャンパス、2009.3.7.
28. 清水孝彦、白澤卓二. Mn-SODコンディショナルノックアウトマウスを用いた抗老化研究. 第123回日本薬学会年会、国立京都国際会館、2009.3.26-28.
29. 宇野真弓、中川 優、清水孝彦、白澤卓二、入江一浩. 酸化型タキシフォリンのアミロイドβ凝集阻害活性. 日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009.3.27-29.
30. 村上一馬、宇野真弓、増田裕一、清水孝彦、白澤卓二、入江一浩. アミロイドbのAsp23における異性化あるいはラセミ化が凝集能および神経細胞毒性に及ぼす影響. 日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009.3.27-29.
31. 堀江哲郎、津田千鶴、石川 慎、野田義博、桑原宏朋、川上 哲、小澤裕介、白澤卓二、清水孝彦. 骨格筋特異的Mn-SOD欠損マウスの酸化ストレスによる運動能不全の解析. 日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009.3.27-29.
32. 野田義博、津田千鶴、堀江哲郎、清水孝彦. CuZn-SOD欠損マウスにおける不妊と酸化ストレスの関係. 日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009.3.27-29.
33. 津田千鶴、野田義博、小澤裕介、清水孝彦. 酸化ストレスによる骨密度低下のメカニズム解明. 日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009.3.27-29.

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし.

病理解剖コラボレーション（共同研究）事業運用要綱

（目的）

第1条 東京都老人医療センター（以下「センター」という）・東京都老人総合研究所（以下「研究所」という）は、病理解剖資料を利用し、臨床医学・基礎医学研究に役立てることを目的として病理解剖コラボレーション（共同研究）事業（以下「コラボ事業」という）を行う

（基本方針）

第2条 コラボ事業における業務の遂行にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年3月29日付け文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号）に基づき取り扱うことを基本とする。

2 資料の取り扱いにあたっては、究極の個人情報である遺伝情報に関するものがあることを踏まえ、人間の尊厳の保護と人権の尊重を前提として、業務の公共性、透明性が確保されなければならない。

3 コラボ事業においては、その社会的有益性を確認するとともに、個人の人権の保障を科学的又は社会的な利益に優先して行う。

（構成）

第3条 コラボ事業は、責任者（総括）、センター病理医（採取・病理学的診断・品質管理・資料提供及びデータベース作成）、技術員（試料凍結・保管・病理診断用標本作成）、事務官（事務及びデータベース管理）で構成する。

2 コラボ事業責任者は、センター剖検病理科部長をもって充てる。

（共同研究の申請・受付）

第4条 病理解剖資料の活用は無償とし、コラボ事業責任者を共同研究責任者とする共同研究ベースで行い、単なる資料提供組織とはしない。

2 病理解剖資料を利用した共同研究を希望する者は、大学、公的研究機関に所属する研究者でなければならない。

3 病理解剖資料を利用した共同研究を希望する者は、コラボ事業責任者へ研究計画書を申請しなければならない。

4 共同研究の前提として、死体解剖保存法、センター病理解剖承諾書を遵守するものとする。

（研究審査）

第5条 コラボ事業研究計画審査会は、コラボ事業責任者、センター病理研究計画審査担当医、センター病理担当副院長、研究所自然科学系副所長からなる。コラボ事業責任者は、審査委員による守秘義務下での書類審査により研究計画を持ち回り審議した上で、可否を決定する。但し、必要のあるときには臨時に

審査会を開催することができる。

(倫理委員会の承認)

第6条 共同研究は、研究面および臨床・病理性情報の使用に関してセンター倫理委員会の承認が必要である。さらに、共同研究者の所属する部門の長及び所属機関の倫理委員会の承認が必要である。

(個人情報の保護)

第7条 コラボ事業での研究に用いる資料(臨床病理性情報)の扱いは匿名化とし、個人情報外部に漏洩しないようにする。連結可能にするか、不可能にするかは研究の性格をもとに、センター倫理委員会の決定に委ねられる。

(資料の保管)

第8条 コラボ事業において、共同研究者の施設に移転した資料の管理責任は、死体解剖保存法18条の規定により、コラボ事業にあり、承認を受けた共同研究以外の用途に使用することは許されない。また、共同研究終了後、残った資料は、速やかに返却することを前提とし、不適切使用をもとに返還命令が出された場合は、共同研究者は直ちに応じなければならない。資料が共同研究者の施設に移転した場合、コラボ事業の管理責任を明らかにする目的で、定期的(半年毎)に資料利用状況と成果に関する調査を行うことが、資料移転の前提となる。

(知的所有権)

第9条 コラボ事業内の資料は、篤志によるもので、公共のドメインに属し、公共の福祉に貢献する目的の公的資源であるので、この資源を用いた共同研究で得られた知的資産の運用については、公的利益還元の見点のもと、コラボ事業責任者との協議を前提とする。

(広報活動)

第10条 コラボ事業は、文書、インターネット等を通じて、共同研究の公募を行い、内容、成果を報告、開示する。ただし、倫理上、知的財産上で問題がある場合はこの限りではない。

倫理問題審議申請書

平成20年 8月22日

東京都老人医療センター
倫理委員会委員長 殿

申請者
所 属 剖検病理科
職 部長
氏 名 沢辺 元司 印

受付番号 _____

1 審議事項	医療	医学研究	医学教育	その他
2 課題名 病理解剖コラボレーション(共同研究)事業の運用について				
3 実施責任者及び実施分担者				
(1) 実施責任者 所属 剖検病理科 職 部長 氏名 沢辺 元司				
(2) 分担者 (院内)			(3) 分担者 (院外)	
剖検病理科・齋藤祐子 臨床病理科・新井富生 老人総合研究所・老化ゲノムバイオマーカー・清水孝彦 老人総合研究所・プロテオーム解析・戸田年総 老人総合研究所・高齢者ブレインバンクプロジェクト・村山繁雄				
4 研究の概要				
(1) 目的 東京都老人医療センターでは、多数の病理解剖例を用いて、従来より老人医療センター内部、老人総合研究所および外部の大学・研究機関と多くの共同研究を行ってきた。中でも老人総合研究所との共同プロジェクトとして村山繁雄先生が構築された「高齢者ブレインバンク」はめざましい成果を上げている。脳、神経組織以外でも、「老年病 SNP データベース」を基盤とした活発な共同研究が行われているが、これまで脳、神経組織以外の組織を用いた共同研究については、個別に対応してきた。今後、共同研究をさらに拡大するためには、これを「病理解剖コラボレーション(共同研究)事業」として位置づけ、共同研究の公募、統一した対応、成果の報告などの体制を築く必要がある。				
(2) 内容 今回我々は、「高齢者ブレインバンク」に対応するものとして、高齢者ブレインバンク要綱を参考にして「病理解剖コラボレーション(共同研究)事業運用要綱」をまとめた。今後はこの要綱に従って、事業を運営していきたい。 研究成果をインターネット等を通じて、発表することは、患者のご遺族と病院の間での知識の共有・還元の見点から重要と思います。				
(3) 方法(面接、アンケート、検体の採取等具体的に記入のこと)				
面接、アンケート、検体の採取等は行われない。				

様式第1 (2)

(4) 対象者及び対象者数 原則的にはこれまでの病理解剖例全てが対象となり、今後の病理解剖例についても同様である
(5) 期間 倫理委員会承認後 ～
(6) 実施場所 病理部門
5 医学上の貢献度の予測 従来より病理解剖例を用いた多くの共同研究を、老人医療センター内部、老人総合研究所、外部の大学・研究機関と行ってきており、めざましい成果を上げている。これを「病理解剖コラボレーション（共同研究）事業」として位置づけ、諸体制を築けば、共同研究が、さらに広がり、老年医学・老化学の発展に役立つ。
6 倫理上の配慮 (1) 対象者の人権擁護 個別の共同研究に関しては、従来通り、老人医療センター倫理委員会などで、十分に審議を行い、亡くなら解剖された方、およびご遺族の人権が擁護されるようにする。 この事業はインターネットを通じて、共同研究の公募を行う予定である。その際には研究成果などを公表するが、解剖された方およびご遺族の個人情報が流出することはない。
(2) 対象者の不利益及び安全性 この共同研究事業により、対象者及びご遺族が不利益を被ることはない。
(3) 対象者への内容の説明と同意を得る方法（説明文書、同意書等がある場合は添付のこと） 現在の病理解剖承諾書には、病理解剖資料を用いて研究を行うことの承諾が得られている。
7 審議の緊急性及び特に審議を希望する点 特になし
8 会議の非公開を希望する場合の理由 特に希望しない
9 実施計画書 病理解剖コラボレーション（共同研究）事業運用要綱を添付します。
10 その他 特になし

平成20年9月30日

倫理問題審議結果通知書

申請者

沢辺 元司 殿

東京都老人医療センター倫理委員会

委員長 大田 雅嗣



受付番号 439

課 題 名 病理解剖コラボレーション（共同研究）事業の運用について

実施責任者 剖検病理科部長 沢辺 元司

先に申請のあった上記課題についての審議結果を下記のとおり通知する。

審 議 結 果	本委員会に申請された上記課題については、倫理的に問題はなく、一部申請分の訂正を確認し、承認とする。
------------------	---

プロテオーム研究に利用可能な病理解剖バイオリソースの品質管理に関する研究

分担研究者 戸田 年総 東京都老人総合研究所研究副部長

研究要旨

病理解剖バイオリソースを用いてプロテオーム研究を行なう際には、死後の変化の影響が大きい試料を排除する必要がある。本年度我々は、剖検髄液と生検髄液を詳細にプロテオーム解析し、指標となるタンパク質を探索した。その結果、生検髄液中には見られない細胞由来の成分が、一部の剖検髄液で高値を示すことがわかった。

A. 研究目的

プロテオーム研究に利用可能な病理解剖バイオリソースの品質を評価するための指標となるタンパク質を探索する。

B. 研究方法

剖検髄液と生検髄液のタンパク質を二次元電気泳動に基づくプロテオーム解析によって比較解析し、本来生検髄液中では検出されず、一部の剖検髄液で高値を示すものの中から、変性した脳組織に由来する成分を質量分析法によって同定する。

C. 研究結果

Albumin, Transferrin, α 1-AT, Apo-AI, Transthyretinなどの血液由来の主要なタンパク

質成分については、生検髄液と剖検髄液で共通して検出されるのに対し、ActinやPrx2などの変性組織に由来すると思われるタンパク質成分は生検髄液にはみられず、一部の剖検髄液で高値を示すことがわかった。

D. 考察

これらの脳組織由来のタンパク質が高値を示した髄液では、その他のタンパク質のパターンも生検髄液と大きく異なることから、死後の組織変化によるものである可能性が高い。

E. 結論

今後剖検髄液を用いたバイオマーカー探索を行なう場合には、ActinとPrx2のレベルに注目し、二次元電気泳動によってこれらのスボ

ットが高値に検出された試料については、解析から除外するなどの注意を払う必要があるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kubota K, Sato Y, Suzuki Y, Goto-Inoue N, Toda T, Suzuki M, Hisanaga S, Suzuki A, Endo T. "Analysis of Glycopeptides Using Lectin Affinity Chromatography with MALDI-TOF Mass Spectrometry." *Anal. Chem.*, 80 (10), 3693- 3698, 2008.

Toda T, Nakamura M, Yamada M, Nishine T, Torii T, Ikenaka K, Hashimoto R, Mori M. "Glycoproteomic analysis of abnormal N-glycosylation on the kappa chain of cryoglobulin in a patient of multiple myeloma." *J. Electrophoresis*, 53(1), 1-6, 2009.

2. 学会発表

Tosifusa Toda, Megumi Nakamura, Hiraku Morisawa, Machiko Iwamoto, Junpei Ohkata, Hajime Sato, Hiroshi Tanaka, Kazutomi Kanemaru "An approach to the quantitative analysis of free thiol levels in human CSF proteins by the method of 2-D gel fluoroimaging with using cyanine dyes a

nd fluorescent gel stain" MPSA2008 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis 2008年8月26-29日、札幌

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

なし

病理解剖バイオバンクの構築に関する研究

分担研究者 村山繁雄 東京都老人総合研究所 高齢者ブレインバンク 研究部長

研究要旨

病理解剖バイオバンクの中で、高齢者ブレインバンク (BBAR) は創設の段階より、国際的競争力を有するリソースの確立の段階に移行している。現在遺伝子発現解析に適するリソースが国際的に求められており、BBARにおいても、mRNA 品質についての検討を開始した。リボソーム RNA 16S/ 24S 比、RNA quality index と、死後時間及び、死亡より冷蔵庫に入るまでの時間 (cooling interval) との相関を検討したが、相関は認められず、死戦期の問題が重要とする、これまでの見解を支持する所見と考えられた。RNA 品位については、発現解析部位で、RNA 品質チェックを行った上で、検討を行うことが、現実的対応法と考えられる。

A. 研究目的

本研究の目的は、病理解剖バイオバンクの一貫として、既に確立している、高齢者ブレインバンクにおいて、ヒト老化に関わるゲノム研究のため、mRNA 発現解析が可能な死後脳バンクとしての、品質チェックを行うことである。

B. 研究方法

東京都老人医療センター開頭連続剖検例に対し、半脳を 7mm スライスの上、ドライアイスパウダーで迅速凍結後、超低温槽に保管する体制をしいた。この脳の前頭極を用いて total RNA を抽出し、リボソーム RNA 16S/ 24S 比、RNA quality index の両方を測

定して、品質を評価した。

本年度、ブレインバンクテクニシャンとして脳を凍結する技術者を、派遣ではあるが常勤化できたことを受け、凍結との時間差を最小限にする目的で、凍結システムを、これまでの、研究所建物二階神経病理研究室内ブレインバンク処理室(P2)より、センター地階剖検室内に移動した。

また、本年度 4 月、ニューヨークコロンビア大学ブレインバンクを見学し、開頭剖検脳が、氷の中に入れられるまでの時間が、クーリングインターバルとして記載されていること、この数値が RNA 品質のパラメーターとなるとの情報を得た。欧米のブレインバンクでは、他の施設で開頭剖検された脳が、宅急便で送られ、ブレインバンクで凍結することが行わ

れているためである。

これに相応するものとして、死亡時刻と、葬儀者のご遺体を受け取った時刻が、当施設医事課に記録として保存されているので、その間隔を、クーリングインターバルとして、当施設でも各症例について新たに算定した。当施設は、病棟の地下が霊安室・剖検室となっており、病棟から冷蔵庫までの時間が数分であり、葬儀社の受け取りからである。

(倫理面への配慮) 高齢者ブレインバンクの活動は、東京都老人総合研究所・東京都老人医療センター双方の、倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

凍結する場所の変更により、剖検開始より凍結終了までの時間はおよそ5分程度短縮された。

それ以外に、7mm に薄切された脳を重ね合わせて運搬することにより、いわゆるタッチアーチファクトが発生であろうと予測されるが、今後はその影響を考慮する必要がなくなった。

剖検室内で凍結することにより、mRNA の品質がどの程度改善するかについては、現在のところ症例数が少なく、有意の差は得られなかった。

RNA の品質について、9:00-17:00、月～土の体制をしいている高齢者ブレインバンクの脳が、24 時間 365 日剖検システムを引いている、新潟脳研究所の脳と比較して(図1)、どの程度劣るかの比較を行ったところ、むしろ優れているという結果を得た(図2)。

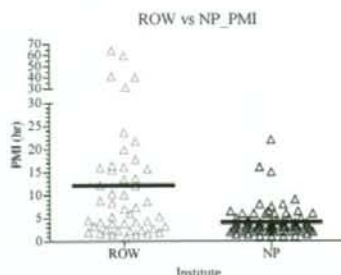


図1.当施設(ROW)と新潟脳研究所(NP)の死後時間の比較。

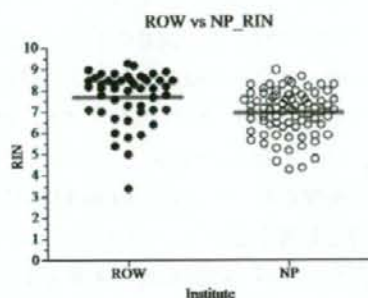


図2.RNA Integrity Number(RIN)の比較

死後時間の長い本施設の方が、短い新潟脳研よりRINは高い。

一方、RNA の品質と、死後時間、cooling interval とも、相関は認められなかった(図3, 4)。

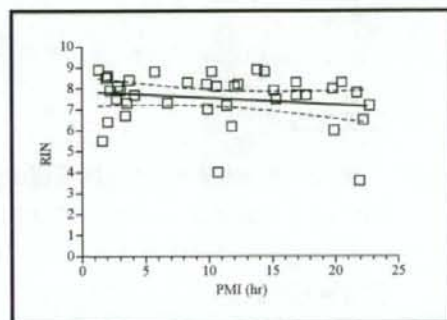


図3.死後時間(PMI)と前頭葉のRNA Integrity Number(RIN)。相関は全く認めら

れない。

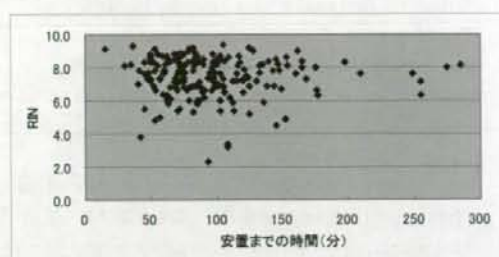


図 4.クーリングインターバル(安置までの時間)と、RNA Integrity Number(RIN)。相関は全くない。クーリングインターバルには、ほとんどの症例で、180 分以内である。

D. 考察

欧米のブレインバンクでは、ブレインバンクドクター、ブレインバンクテクニシャンがスタッフとして、脳の凍結・管理・保存を行うのが一般的である。今回派遣であったがブレインバンクテクニシャンを常勤化できたことにより、ブレインバンク凍結処理に関し、改善を行うことができた。次年度より研究所常勤化が承認されたため、さらに技術的発展が期待できる。

これにより、どの程度改善できるかは、現時点では明らかに出来なかったが、今後も改善点に対する見直しを継続する予定である。

当施設において、クーリングインターバルが非常に短いことが確認された。また、それをおそらく反映して、我々のブレインバンクの RNA 品質が、24 時間 365 日の体制を引いている施設よりも良いことが確認された。

これにより、高齢者ブレインバンク蓄積脳資源が、国際的にも十分通用する品質を持つことが明らかとなった。

一方、RNA の品質と、死後時間、クーリングインターバルともに、相関は得られなかった。米国アリゾナ州 Sun City Institute は、剖検脳を登録することでブレインバンクを構築しているが、死後時間の長い脳は、凍結保存しない方針をとっている。我々の得た結果は、彼らの方針を支持しない。

死後脳において、RNA 品質は、死戦期の状況に大きく依存することが知られている。Tomita らは、agonal factor として、これを数値化することを試みている。しかし、彼らは監察医務院の脳に対する検討であり、病院剖検例にその数値をあてはめると、著しく高くなってしまふ。また、当施設では遺体が解剖時ほぼ 4 度であるため、オランダブレインバンクで重視されている pH も、参考にならない。この点に関しては、次年度の課題としたい。

RNA の品質は、脳の解剖学的部位によって異なることが知られている。特に、虚血に弱い領域である海馬や皮質の谷の部分では、RNA 品質が悪いことが、ハーバード大学ブレインバンクよりの報告で知られている。これを受け、ニューヨークブレインバンクでは、頭頂葉の中大脳・後大脳動脈境界域における、リボソーム RNA 16S/ 24S 比を評価し、それが低い場合は mRNA 解析に向かないとしている。しかし、実際その部位で mRNA の解析に耐えなくても、前頭葉のような虚血に比較的強い部位では、十分に検討可能である可能性がある。mRNA 品質が、死後時間、クーリングインターバルと、施設内ではいずれも相関が得られない点よりは、現時点では解析する部位での RNA 品質に関わるデータを添えて、解析することが、現実的対応と思われる。

来年度、地方独立行政法人東京都健康長寿医療センターへの機構改革において、

これまでプロジェクトとしてしか存在しなかった、高齢者ブレインバンクが、機構として承認された。具体的には、病院部門、臨床研究部、高齢者バイオリソース部門、高齢者ブレインバンクとしての位置付けを得、研究所、老年病理研究チーム、神経病理(高齢者ブレインバンク)が責任を負うかたちでの、橋渡しを担う役割が明記された。これにより、システムの永続化が決定されたわけで、今後のさらなる発展が期待される。

E. 結論

高齢者ブレインバンクのシステム改善による、RNA 品質の改善の試みを述べた。

F. 研究発表

1. 論文発表(英文原著のみ)

1. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H: Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropath* 2008; 115: 561- 575
2. Hashimoto M, Kawasaki K, Suzuki M, Mitani K, Murayama S, Mishina M, Oda K, Kimura Y, Ishiwata K, Ishii K, Inoue K: Presynaptic and postsynaptic nigrostriatal dopaminergic functions in multiple system atrophy. *Neuroreport* 2008; 19: 145- 150
3. Tokumaru AM, Kakamura K, Terada H, Kobayashi O, Kanemaru K, Kato T, Murayama S, Yamakawa M, Mizuo M: Asymptomatic self-limiting diffuse white matter lesions in subacute to chronic stage of herpes simplex encephalitis. *The Neurology Journal* 2008; 21: 316-322
4. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, Murayama S: Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropath Exp Neurol* 2008; 67: 945-953
5. Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, Mitsui J,

Matsukawa T, Kishino A, Onodera O, Aoki M, Shimozawa N, Murayama S, Itoyama Y, Suzuki Y, Sobue G, Nishizawa M, Goto, J, Tsuji S: Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 1326-1332

6. Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S: The incidence and extent of Lewy- body related alpha-synucleinopathy in human aging olfactory bulb. *J Neuropath Exp Neurol* 2008; 67: 1072-1083 (2008 American Association for Neuropathologists, the Best Clinical and Pathological Paper: Moore Award)

2. 学会発表(国際学会のみ)

1. Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S: The incidence and extent of Lewy- body related alpha-synucleinopathy in human aging olfactory bulb. 2008 Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists, 2008.4. 8, SanDiego, U.S.A, *JNEN* 67: 443
2. Hatsuta H, Saito Y, Adachi T, Arai T, Sawabe M, Kuwano R, Mori H, Murayama S: Staging for Amyloid Angiopathy in Human Aging. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.15, Washington D.C., U.S.A.
3. Ishibashi K, Murayama S, Ishii K, Mizusawa H: Correlative study of MIBG cardiac scintigraphy and Dopamin pet scan in diagnosis of Parkinson disease. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.17, Washington D.C., U.S.A.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, <u>Sawabe M</u> , Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T	Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection	Arthritis Rheum	58	154-63	2008
<u>Arai T</u> , <u>Sawabe M</u> , Hosoi T, Tanaka N	Role of DNA repair systems in malignant tumor development in the elderly	Geriatr Gerontol Int	8	65-72	2008
Harihara S, Nakamura K, Fujiwara M, <u>Arai T</u> , <u>Sawabe M</u> , Takeuchi F, Takubo K	Markedly different clinical features in 2 diabetes mellitus patients with extremely high tissue levels of the mitochondrial DNA A3243G mutation	Gerontology	54	168-72	2008
Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, <u>Sawabe M</u> , Arimura T, Sato A, Lee BS, Ban JM, Yasunami M, Park JE, Izumi T, Kimura A	Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations	J Hum Genet	53	357-9	2008
Takei K, Ikeda S, <u>Arai T</u> , Tanaka N, Muramatsu M, <u>Sawabe M</u>	Lymphotoxin-alpha polymorphisms and presence of cancer in 1,536 consecutive autopsy cases	BMC Cancer	8	235	2008
Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, <u>Sawabe M</u> , <u>Arai T</u> , Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, <u>Murayama S</u>	Lewy body pathology involves cutaneous nerves	J Neuropathol Exp Neurol	67	945-53	2008
<u>Sawabe M</u> , Hamamatsu A, Chida K, <u>Arai T</u> , Harada K, Ozawa T, Tanaka N	Elderly patients with minimal common carotid atherosclerosis not infrequently have severe coronary atherosclerosis and myocardial infarction	Circ J	72	1946-52	2008
Fujimoto K, <u>Sawabe M</u> , Sasaki M, Kino K, <u>Arai T</u>	Undiagnosed cirrhosis occurs frequently in the elderly and requires periodic follow ups and medical treatments	Geriatr Gerontol Int	8	198-203	2008

Osajima Y, <u>Sawabe M</u> , Hashimoto R, Tsutsumi H, <u>Arai T</u> , Ohta M, Miyakoshi S	Analysis of multiple cancers in autopsy cases of elderly hematological malignancies	Rinsho Ketsueki	49	1599-603	2008
Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, Mitomi H, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, <u>Sawabe M</u> , Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S	Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage	Arthritis Rheum	58	3843-53	2008
Tokumaru AM, Kakamura K, Terada H, Kobayashi O, Kanemaru K, Kato T, <u>Murayama S</u> , Yamakawa M, Mizuo M	Asymptomatic self-limiting diffuse white matter lesions in subacute to chronic stage of herpes simplex encephalitis	The Neurology Journal	21	316-322	2008
Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Hatsuta H, Sakiyama Y, Kanemaru K, <u>Arai T</u> , <u>Sawabe M</u> , Tanaka N, Mochizuki H, Inoue K, <u>Murayama S</u>	Incidence and extent of Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging human olfactory bulb	J Neuropathol Exp Neurol	67	1072-83	2008

Regional Differences in Chondrocyte Metabolism in Osteoarthritis

A Detailed Analysis by Laser Capture Microdissection

Naoshi Fukui,¹ Yasuko Ikeda,¹ Toshiyuki Ohnuki,¹ Nobuho Tanaka,¹ Atsuhiko Hikita,¹ Hiroyuki Mitomi,¹ Toshihito Mori,¹ Takuo Juji,¹ Yozo Katsuragawa,² Seizo Yamamoto,³ Motoji Sawabe,³ Shoji Yamane,¹ Ryuji Suzuki,¹ Linda J. Sandell,⁴ and Takahiro Ochi¹

Objective. To determine the change in metabolic activity of chondrocytes in osteoarthritic (OA) cartilage, considering regional difference and degree of cartilage degeneration.

Methods. OA cartilage was obtained from knee joints with end-stage OA, at both macroscopically intact areas and areas with various degrees of cartilage degeneration. Control cartilage was obtained from age-matched donors. Using laser capture microdissection, cartilage samples were separated into superficial, middle, and deep zones, and gene expression was compared quantitatively in the respective zones between OA and control cartilage.

Results. In OA cartilage, gene expression changed markedly with the site. The expression of cartilage matrix genes was highly enhanced in macroscopically

intact areas, but the enhancement was less obvious in the degenerated areas, especially in the upper regions. In contrast, in those regions, the expression of type III collagen and fibronectin was most enhanced, suggesting that chondrocytes underwent a phenotypic change there. Within OA cartilage, the expression of cartilage matrix genes was significantly correlated with *SOX9* expression, but not with *SOX5* or *SOX6* expression. In OA cartilage, the strongest correlation was observed between the expression of type III collagen and fibronectin, suggesting the presence of a certain link(s) between their expression.

Conclusion. The results of this study revealed a comprehensive view of the metabolic change of the chondrocytes in OA cartilage. The change of gene expression profile was most obvious in the upper region of the degenerated cartilage. The altered gene expression at that region may be responsible for the loss of cartilage matrix associated with OA.

Dr. Fukui's work was supported by Grants-in-Aid from the Japan Society for the Promotion of Science (grants 15390467 and 18390424), the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (grant 200500734A), and the Uehara Memorial Foundation, Tokyo, Japan.

¹Naoshi Fukui, MD, PhD, Yasuko Ikeda, DVM, Toshiyuki Ohnuki, Nobuho Tanaka, BS, Atsuhiko Hikita, MD, PhD, Hiroyuki Mitomi, MD, PhD, Toshihito Mori, MD, Takuo Juji, MD, Shoji Yamane, PhD, Ryuji Suzuki, DVM, PhD, Takahiro Ochi, MD, PhD: National Hospital Organization Sagami Hospital, Sagami, Japan; ²Yozo Katsuragawa, MD: International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan; ³Seizo Yamamoto, MD, PhD, Motoji Sawabe, MD, PhD: Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo, Japan; ⁴Linda J. Sandell, PhD: Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.

Dr. Sandell has received honoraria (less than \$10,000) from GlaxoSmithKline.

Address correspondence and reprint requests to Naoshi Fukui, MD, PhD, Clinical Research Center, National Hospital Organization Sagami Hospital, Sakuradai 18-1, Sagami, Kanagawa 228-8522, Japan. E-mail: n-fukui@sagami-hosp.gr.jp.

Submitted for publication May 22, 2007; accepted in revised form September 14, 2007.

Osteoarthritis (OA) is a disease characterized by a progressive loss of cartilage matrix that often extends over a decade. During the long course of the disease, chondrocytes undergo obvious metabolic changes. A variety of changes are known to occur that have 2 distinctive aspects. First, the anabolic activity of chondrocytes is strongly enhanced in OA. Following the initial reports more than 4 decades ago (1), an increasing number of studies have shown that the expression of virtually all cartilage components is up-regulated in OA cartilage (2–13). The increased anabolism may be a repair response of the chondrocytes that counteracts the loss of cartilage matrix (2–4). Second, in OA, chondrocytes undergo phenotypic changes. Because of this,

chondrocytes in OA cartilage express matrix genes that are not expressed in normal cartilage, such as type I and type III collagens (5–10). Since the induction of these genes also occurs during the dedifferentiation of chondrocytes in vitro, the phenotypic changes in OA have an aspect resembling that of the dedifferentiation process (9). The phenotypic changes also show a characteristic of developmental reversal, since the expression of type IIA procollagen, a prechondrogenic splicing variant of the type II collagen gene, is observed in OA (11,12). In contrast, the presence of type X collagen in OA cartilage has persuaded investigators that chondrocytes are undergoing hypertrophic changes there (13,14).

Because of the diversity in gene expression, it is currently difficult to obtain a comprehensive idea of the metabolic changes in OA. This diversity may stem from a topographic variation of the pathology. Since cartilage pathology differs obviously from site to site within OA cartilage, it is likely that the metabolic changes in the chondrocytes also differ by areas related to that pathology (4,9,10,15). The regional differences of chondrocyte metabolism may be important to our understanding of the mechanism of disease progression. For example, a focal decline of the matrix synthesis in OA cartilage may play a critical role in the loss of cartilage matrix (3,4,9).

Conventionally, the regional differences of cellular metabolism in OA have been evaluated primarily by histologic methods, so the comparison among the areas has not been quantitative. Laser capture microdissection (LCM) is an innovative technology that enables the isolation of a specific area of tissue by its histologic features (16). Coupled with real-time polymerase chain reaction (PCR), the use of LCM allowed us to perform a quantitative evaluation of the multiple genes expressed in specific regions of OA cartilage. Thus, this study has revealed, for the first time, a comprehensive view of the changes in metabolic activity of chondrocytes in OA cartilage.

MATERIALS AND METHODS

Tissue procurement. This study was performed with the approval of the Human Ethics Review Committees of the participating institutions. For material collection, informed consent was obtained in writing from each subject or family of the donor. OA cartilage samples were obtained from 32 end-stage OA knee joints of 30 patients (mean age 70.3 years [range 56–88 years]) within 4 hours after surgery. The diagnosis of OA was based on the criteria for knee OA of the American College of Rheumatology (17). Control cartilage samples were obtained from 18 nonarthritic knee joints from 16 donors (mean age 82.3 years [range 67–89 years]) within 24 hours after death. The donors had no known history of joint

disease or serious trauma, and the normality of the joint was confirmed macroscopically at the time samples were obtained. Knee cartilage in aged donors usually undergoes some degeneration, even though the donors did not have any problems with the joints. Therefore, we obtained control cartilage samples from the knees even when the cartilage showed some signs of degeneration, as long as the degeneration was superficial and limited to small areas (<20% of total cartilage area). Control ligaments, bone tissues, and menisci were also harvested from these joints.

Laser capture microdissection. In each OA joint, cartilage tissues were harvested from 2–5 sites in femoral condyles showing various degrees of cartilage degeneration. In each control joint, cartilage samples were harvested from 2–4 sites in the weight-bearing areas of the femoral condyles. The cartilage samples were cut above the calcified zone, which was confirmed under a microscope at the time of laser microdissection. Immediately after harvest, the cartilage samples were embedded in OCT compound (Sakura Finetech, Tokyo, Japan), snap-frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C until used.

In preparation for LCM, 20–40- μm -thick frozen sections were cut from the cartilage tissues along a plane vertical to the joint surface. The sections were first treated with 0.5M EDTA (pH 8.0) for 3 minutes, dehydrated with graded concentrations of ethanol, and clarified with xylene. All reagents were prepared RNase-free, and the entire process was completed within 30 minutes to minimize RNA degradation.

Under an LCM device (PixCell II; Arcturus, Mountain View, CA), each frozen section was divided into cartilage zones based on its histologic features (18,19). Cartilage samples from preserved areas contained 3 zones (superficial, middle, and deep) and were separated into these respective zones. For the cartilage from degenerated areas, the number of zones in the section differed from 3 to 1, depending on the severity of the cartilage pathology. A section containing all 3 zones was separated into the 3 respective zones. When a superficial zone was lost to the disease, the section was divided into 2 zones, the middle and deep zones (Figure 1). If a section contained only a deep zone, it was used directly for RNA extraction without microdissection. At each tissue procurement, the appropriateness of zone isolation was confirmed under a microscope.

Analysis of gene expression. Immediately after LCM, RNA was extracted from the tissues using an RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) with routine use of DNase I (Qiagen). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using Sensiscript reverse transcriptase (Qiagen). Gene expression was evaluated quantitatively by real-time PCR on a LightCycler (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Gene-specific primers and probes were prepared (a list of primer and probe sequences is available at <http://www.hosp.go.jp/~sagami/rinken/crc/index.html>), and the process of PCR was monitored by either SYBR Green or hybridization probes. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) or LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probe (Roche Diagnostics) was used for PCR. The PCR protocol was as follows: 95°C for 10 minutes to activate *Taq* polymerase, then 40 cycles of 95°C for 10 seconds, melting temperature for the individual gene for 15 seconds (a list of melting temperatures for the individual genes is available at



Figure 1. Separation and acquisition of cartilage zone by laser capture microdissection (LCM). **A**, A tissue section was set on an LCM device, and a transparent plastic film was placed on the section. Cartilage zones were identified through the film. **B**, The zone of interest was fixed to the film by shooting with a laser. The area was shot multiple times until the entire zone was anchored to the film. Arrays of spots indicated by yellow arrowheads are the laser shot marks. **C**, After laser shooting, any unnecessary area of the section was removed, and only the zone of interest that had adhered to the film was obtained. Acquisition of a middle cartilage zone from a section containing middle and deep zones is shown. The superficial zone of this section was already lost to disease. Single and double asterisks indicate the top and bottom of the section, respectively. Transparent and bold black arcs indicated by blue arrowheads are the marks on the plastic film. (Original magnification $\times 2$.)

<http://www.hosp.go.jp/~sagami/rinken/crc/index.html>, and 72°C for 6 seconds.

The amount of specific cDNA was quantified with a standard curve based on the known amounts of PCR product. When SYBR Green I was used for monitoring, melting curves were routinely recorded to verify singularity of the product. A previous study showed that *GAPDH* is expressed at similar levels in chondrocytes in normal and OA cartilage (8). Consistently, the result of our preliminary experiment indicated that the expression of *GAPDH* and *ACTB* (a gene coding β -actin) was highly correlated in cartilage samples from OA and control knees. Thus, in this study, *GAPDH* was used as the internal standard for gene expression, and cDNA levels were expressed as the ratio of gene expression:*GAPDH* expression.

Statistical analysis. Pearson's correlation and paired *t*-tests were calculated with the SAS software package (SAS Institute, Cary, NC). For some data, statistical differences were determined by an analysis of variance followed by a Scheffe's post hoc test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Up-regulated expression of cartilage matrix molecules at different regional intensities in OA cartilage. In each OA joint, cartilage was harvested from femoral condyles, both from macroscopically intact areas and

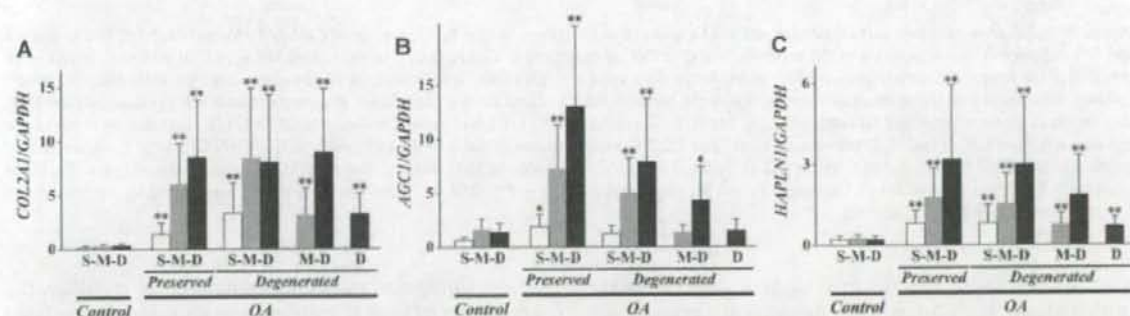


Figure 2. Expression of cartilage matrix genes in osteoarthritic (OA) and nonarthritic (control) cartilage. Cartilage samples obtained from nonarthritic knee joints and knee joints with end-stage OA were divided into superficial (S), middle (M), and deep (D) zones by laser capture microdissection, and expression of cartilage matrix genes was evaluated in the respective zones. In OA joints, cartilage samples were harvested from macroscopically intact areas (preserved) and areas with various degrees of cartilage degeneration (degenerated). The latter samples were divided into 3 groups (S-M-D, M-D, and D) according to the zones retained at the site. Expression of the genes coding type II collagen (*COL2A1*) (A), aggrecan (*AGC1*) (B), and link protein (*HAPLN1*) (C) is shown as ratios of the expression of *GAPDH*. Each bar represents the results from at least 16 samples. Values are the mean and SD. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$, versus the corresponding zone in control cartilage.