(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5814119号
(P5814119)

(45)発行日　平成27年11月17日(2015.11.17)　(24)登録日　平成27年10月2日(2015.10.2)

(51)Int.Cl.			FI		
C12Q 1/68		(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA
G01N 33/53		(2006.01)	G01N	33/53	M
C12N 15/09		(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 16　(全 43 頁)

(21)出願番号　特願2011-523071 (P2011-523071)
(86)(22)出願日　平成21年8月10日 (2009.8.10)
(65)公表番号　特表2011-530312 (P2011-530312A)
(43)公表日　平成23年12月22日 (2011.12.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/053307
(87)国際公開番号　WO2010/019519
(87)国際公開日　平成22年2月18日 (2010.2.18)
審査請求日　平成24年8月9日 (2012.8.9)
(31)優先権主張番号　61/087,722
(32)優先日　平成20年8月10日 (2008.8.10)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　511036015
クアキニ　メディカル　センター
ＫＵＡＫＩＮＩ　ＭＥＤＩＣＡＬ　ＣＥＮＴＥＲ
アメリカ合衆国　ハワイ州　９６８１７
ホノルル　ノース　クアキニ　ストリート　３４７
(74)代理人　100147485
弁理士　杉村　憲司
(74)代理人　100119530
弁理士　冨田　和幸
(74)代理人　100144266
弁理士　鈴木　一寿

最終頁に続く

(54)【発明の名称】健康的な老化および長寿を予測および促進するＦＯＸＯ３Ａの多型およびハプロタイプを使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒト対象の組織サンプルにおける長寿に関する要因を検出する方法であって、

前記ヒト対象が遺伝子座／多型ｒｓ２８０２２９２の「Ｇ」対立遺伝子の少なくとも１つを染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０１５２１１に有するかどうかを、前記ヒト対象の組織サンプルで決定する工程；

前記ヒト対象が遺伝子座／多型ｒｓ２７６４２６４の「Ｃ」対立遺伝子の少なくとも１つを染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０４１１５４に有するかどうかを、前記ヒト対象の組織サンプルで決定する工程；および

前記ヒト対象が遺伝子座／多型ｒｓ１３２１７７９５の「Ｃ」対立遺伝子の少なくとも１つを染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０８０７９１に有するかどうかを、前記ヒト対象の組織サンプルで決定する工程；

からなる群より選択される、いずれかの工程を備えた、方法。

【請求項２】

長寿とは、少なくともさらに１５年間生存し、前記要因はさらに加齢と関連のある少なくとも１つの慢性疾患から独立している要因を含有する、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

加齢と関連のある少なくとも１つの慢性疾患は、糖尿病、冠状動脈疾患および癌からなる群から選択される、請求項２に記載の方法。

【請求項４】

ヒト対象の組織サンプルにおける長寿に関する要因を検出する方法であって、前記ヒト対象が「ＧＣＣ」ハプロタイプを有するかどうかを前記ヒト対象の前記組織サンプルで決定する工程を含み、「ＧＣＣ」ハプロタイプはＦＯＸＯ３Ａ遺伝子においてそれぞれ遺伝子座／多型ｒｓ２８０２２９２、ｒｓ２７６４２６４およびｒｓ１３２１７７９５である方法。

【請求項５】

染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０１５２１１における遺伝子座／多型ｒｓ２８０２２９２の「Ｇ」対立遺伝子；染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０８０７９１における遺伝子座／多型ｒｓ１３２１７７９５の「Ｃ」対立遺伝子；および染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０４１１５４における遺伝子座／多型ｒｓ２７６４２６４の「Ｃ」対立遺伝子からなる群から選択される第一の標的核酸配列の位置にハイブリッドを形成する十分な長さの第一の核酸であって、前記第一の標的核酸配列の前記位置、または前記第一の標的核酸配列相補体とハイブリッドを形成する前記第一の核酸を含む、請求項１の方法に用いるための核酸試薬。

【請求項６】

染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０１５２１１における遺伝子座／多型ｒｓ２８０２２９２の「Ｇ」対立遺伝子；染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０８０７９１における遺伝子座／多型ｒｓ１３２１７７９５の「Ｃ」対立遺伝子；および染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０４１１５４における遺伝子座／多型ｒｓ２７６４２６４の「Ｃ」対立遺伝子からなる群から選択される第一の標的核酸配列の位置にハイブリッドを形成する十分な長さの第一の核酸であって、前記第一の標的核酸配列の前記位置、または前記第一の標的核酸配列相補体とハイブリッドを形成する前記第一の核酸を、１つ以上の容器内に含有するものおよび使用説明書を含む、請求項１の方法に用いるためのキット。

【請求項７】

ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子座ハプロタイプの少なくとも１つの対立遺伝子の５’および３’にハイブリダイズする、５’および３’のオリゴヌクレオチドを包含し、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子座ハプロタイプの対立遺伝子は、染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０１５２１１における遺伝子座／多型ｒｓ２８０２２９２の「Ｇ」対立遺伝子、染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０８０７９１における遺伝子座／多型ｒｓ１３２１７７９５の「Ｃ」対立遺伝子、および染色体６中のＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の位置１０９０４１１５４における遺伝子座／多型ｒｓ２７６４２６４の「Ｃ」対立遺伝子からなる群より選択される、１以上のオリゴヌクレオチドを備えた、請求項１の方法に用いるためのキット。

【請求項８】

前記オリゴヌクレオチドは、２５～２５００塩基対離れてハイブリダイズする、請求項７に記載のキット。

【請求項９】

前記オリゴヌクレオチドは、１００～５００塩基対離れてハイブリダイズする、請求項７に記載のキット。

【請求項１０】

前記オリゴヌクレオチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．２～９に記載のヌクレオチド配列を包含する、請求項７に記載のキット。

【請求項１１】

前記オリゴヌクレオチドが、天然および／または合成組成物であるか；標識されたオリゴヌクレオチドである、請求項７に記載のキット。

【請求項１２】

ＤＮＡサンプリング試薬をさらに含む、請求項７に記載のキット。

【請求項１３】

前記ＤＮＡサンプリング試薬が、ＤＮＡ精製試薬；ＰＣＲ試薬；および対立遺伝子検出試薬から選択される、請求項１２に記載のキット。

【請求項１４】
前記検出が、
ａ）細胞サンプルから核酸サンプルを分離する工程；
ｂ）対立遺伝子のハイブリッド形成および増幅が生じる条件下に基づいて、ＦＯＸＯ３Ａハプロタイプの少なくとも１つの対立遺伝子に５’および３’を特異的にハイブリッド形成する少なくとも１つのプライマーと、核酸サンプルを接触させる工程；および
ｃ）対立遺伝子検出方法による増幅産物を検出する工程
を含有する、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
少なくとも１つのプライマーは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯＳ．５～８からなる群から選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
ヒト対象の死亡、加齢関係の疾患または将来的な身体機能の予想を助けるための、危険率の計算における「ＧＣＣ」ＦＯＸＯ３Ａハプロタイプの有無の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、診断において予測し、または、治療計画および関与において健康的な老化および長寿を促進するために、ＦＯＸＯ３Ａの多型およびハロタイプを使用する方法に関する。
【０００２】
関連出願の説明
本出願は、本願明細書に引用した２００８年８月１０日に出願した米国特許出願公開第６１／０８７，７２２号明細書に、部分的に基づき、その利益を要求する。
【０００３】
連邦支援の研究または開発に関する記載
本発明を、アメリカ国立老化研究所からの１　Ｒ０１　ＡＧ０２７０６０－０１　（Ｄｅｆｉｎｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｈｅａｌｔｈｙ　Ａｇｉｎｇ　Ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ）の研究費で、政府支援のもと行った。更なる資金提供は、国立心臓肺臓血液学会からの契約書Ｎ０１－ＨＣ－０５１０２、国立老化研究所からの契約書Ｎ０１－ＡＧ４－２１４９および研究費５　Ｕ０１　ＡＧ０１９３４９－０５およびＫ０８　ＡＧ２２７８８－０２に基づいて、米国政府の支援によって提供された。米国政府は、本発明における特定の権利を有する。更なる支援は、ハワイコミュニティー財団からの研究費２００４－０４６３に基づいて行われた。
【背景技術】
【０００４】
ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子は、明瞭なフォークヘッドドメインによって特徴づけられるフォークヘッド型転写因子に属する。この遺伝子は、細胞死に必要な遺伝子の発現によって、アポトーシスの誘因として機能するらしい。この遺伝子とＭＬＬ遺伝子の転座は、二次急性白血病と関連する。同じタンパク質をコードする選択的なスプライスされた転写変異体を観測した。
【０００５】
ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子は、ＤＡＦ－１６のヒト相同体の１つであり、モデル生物であるシノラブディスエレガンスで寿命を延ばすと記載されていた遺伝子である（Ｍｕｒｐｈｙ　ＣＴ　（２００６）Ｔｈｅ　ｓｅａｒｃｈ　ｆｏｒ　ＤＡＦ－１６／ＦＯＸＯ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ｔａｒｇｅｔｓ：　ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ　ａｎｄ　ｄｉｓｃｏｖｅｒｉｅｓ．　Ｅｘｐ　Ｇｅｒｏｎｔｏｌ　４１　：９１０－９２１）　ａｎｄ　Ｄ．　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ．　（Ｇｉａｎｎａｋｏｕ　ＭＥ　ｅｔ　ａｌ．　（２００７）　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ａｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｄＦＯＸＯ　ｏｎ　ａｄｕｌｔ　ｍｏｒｔａｌｉｔｙ　ｉｎ　Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ．　Ａｇｉｎｇ　Ｃｅｌｌ

６：４２９－４３８）。

【０００６】

ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子は、ヒト染色体６ｑ２１の位置１０８，９８７，７１９から１０９１１２６６４（ＮＣＢＩ　ｖｅｒ．３６）までに配置され、選択的に発現できる４つのエクソンから構成され、同じタンパク質を生じる（異型＃１は、ファイルＮＭ　００１４５５．３に記載され；異型＃２は、ファイルＮＭ　２０１５５９．２に記載される）。ＦＯＸＯ３Ａタンパク質は、アミノ酸６７３から構成され、７１，２７７Ｄａサイズである。ＦＯＸＯ３Ａのアミノ酸配列は、ＮＣＢＩでファイル「ＮＰ　９６３８５３」によって規定され、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１として同定し、以下の通りである：

【０００７】

MAEAPASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASPAKPSGETAADSMIP
EEEDDEDDEDGGGRAGSAMAIGGGGGSGTLGSGLLLEDSARVLAPGGQDPGSGPAT
AAGGLSGGTQALLQPQQPLPPPQPGAAGGSGQPRKCSSRRNAWGNLSYADLITRAIE
SSPDKRLTLSQIYEWMVRCVPYFKDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRVQNEG
TGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSNKYTKSRGRAAKKKAALQTAPESAD
DSPSQLSKWPGSPTSRSSDELDAWTDFRSRTNSNASTVSGRLSPIMASTELDEVQDD
DAPLSPMLYSSSASLSPSVSKPCTVELPRLTDMAGTMNLNDGLTENLMDDLLDNITL
PPSQPSPTGGLMQRSSSFPYTTKGSGLGSPTSSFNSTVFGPSSLNSLRQSPMQTIQENK
PATFSSMSHYGNQTLQDLLTSDSLSHSDVMMTQSDPLMSQASTAVSAQNSRRNVML
RNDPMMSFAAQPNQGSLVNQNLLHHQHQTQGALGGSRALSNSVSNMGLSESSSLGS
AKHQQQSPVSQSMQTLSDSLSGSSLYSTSANLPVMGHEKFPSDLDLDMFNGSLECD
MESIIRSELMDADGLDFNFDSLISTQNVVGLNVGNFTGAKQASSQSWVPG

【０００８】

ＦＯＸＯ３Ａは、ＹＷＨＡＢ／１４－３－３－ｂｅｔａおよびＹＷＨＡＺ／１４－３－３－ｚｅｔａ、ＵｎｉＰｒｏｔ：ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）と相互作用し、細胞質の分泌で必要である。酸化性ストレスに応じて、ＳＴＫと相互作用し、ＹＷＨＡＢ／１４－３－３βとの相互作用を妨害して、核移動に導く。ＦＯＸＯ３Ａの細胞内局在は、細胞質およびサイトソルである。それは、酸化ストレスに応じておよび生存因子の欠損で、核に移行する。生存因子、ＩＧＦ－１が存在する場合において、ＦＯＸＯ３Ａは、Ｔｈｒ－３２およびＳｅｒ－２５３でＡＫＴ１／ＰＫＢによってリン酸化される。それからこのリン酸化された形態は、１４－３－３タンパク質と相互作用し、細胞質にて保持される。生存因子の脱離は脱リン酸化を誘導し、脱リン酸化されたタンパク質が、標的遺伝子の転写を誘導する場合には核への移行を促進し、アポトーシスを誘発する。ＡＫＴ１／ＰＫＢは、直接Ｓｅｒ－３１５をリン酸化するようではないが、それはこの残基でリン酸化を誘発する他のキナーゼを活性化することができる。ＦＯＸＯ３Ａは、ＳＴＫ４によってＳｅｒ－２０９に酸化性ストレスに応じてリン酸化され、ＹＷＨＡＢ／１４－３－３－βおよび核移行からの脱離を導く。

【０００９】

ヒトの寿命は、多くの決定因子を有する複雑な表現型である。食事、物理的活動、健康習慣および社会心理的因子を含む非遺伝的な因子が重要である一方、ヒト寿命において最高５０％の変異が遺伝子の相違点によって説明される可能性がある[１－５]。いくつかの研究は、平均的なヒトの寿命において、約２５％の変異を示唆することをできるが、例外的な生存者の多くの人において、寿命に対する遺伝的貢献は非常に高い可能性がある。例えば、９０歳代および１００歳代の家系調査では、兄弟間の相対的危険度は複雑な表現型へ

の潜在的遺伝子の寄与を評価する一般的な方法[6]で、特に高く、家系発端者の年齢の増加と共に増大することを示した[7~10]。しかしながら、ヒトにおける「長寿に関連する」遺伝子候補の研究は、以下「長寿遺伝子」といい、一般的に期待はずれである。ほとんどの複製は、ＡｐｏＥ遺伝子を除いて、集団全体に観測されなかった。

【００１０】

対照的に、老化のモデル生物において、いくつかの強力な遺伝子の発見があった[11~13]。例えば、単一の遺伝子の変異体は、モデル生物における寿命で、特にインスリン／ＩＧＦ－１（ＩＩＳ）シグナル経路の一部と考えられる遺伝子[14~18]で、実質的な相違を生じることができる。

【００１１】

ＳＩＲ２活性を向上させるか、またはインスリン／ＩＧＦ－１シグナルを減少させる突然変異は、ＤＡＦ－１６／ＦＯＸＯタンパク質を活性することによって、シノラブディスエレガンスの寿命を共に上昇させる[19、20]。哺乳類の細胞において、Ｓｉｒ２相同体物である「ＳＩＲＴ１」は、ストレスへの細胞反応を含む、寿命に影響するいくつかの下流転写現象に影響を及ぼしている。ＳＩＲＴ１は、これを、ＦＯＸＯ（フォークヘッドボックス転写）因子、ＩＩＳ経路でセンサーとして機能し、いくつかの哺乳類において寿命の調節因子ともなるタンパク質のファミリーを調整することによって達成する[17]。

【００１２】

哺乳類（および他の種）における、遺伝子ノックアウトモデルは、同様にＩＩＳ仮説を支持する。例えば、脂肪細胞に特異的なインスリン受容体ノックアウトのマウス（ＦＩＲＫＯ）は、脂肪の質量、加齢に関連した肥満に対する予防を減少し、寿命を延長する。ＩＩＳ経路における多くの他の突然変異体は、マウスにおいて長寿に影響を与えると考えられる。これらは、ＩＧＦ－１受容体[22]、ＩＲＳ－１[22]、ＩＲＳ－２[23]、ＰＡＰＰ－Ａ[24]の突然変異体およびエイムス矮小マウス突然変異を含む。

【００１３】

インスリンシグナルの基本的な分子経路は、酵母、ハエ、虫、齧歯動物およびヒトに示される証拠があるように、進化にわたって保存されている。虫における前記経路の重要な調節因子は、転写制御因子ＤＡＦ－１６（異常なＤＡｕｅｒ形成１６）であり、シノラブディスエレガンスにもたらされる広範な寿命延長に、インスリン／ＩＧＦ－１シグナルを阻害することに必要である。多くの因子は、ｄａｆ－１６に依存した方法、例えばＡＭＰキナーゼ[26]、１４－３－３のタンパク質[27]、ｌｉｎ－４マイクロＲＮＡ[28]および熱ショック因子において、シノラブディスエレガンスの寿命を延ばすと考えられる。いくつかの種のＤＡＦ－１６の相同体は、老化表現型および長寿に関連していた[30]。例えば、ストレス応答Ｊｕｎアミノ末端キナーゼ（ＪＮＫ）経路は、ＦＯＸＯが必要であると考え、ショウジョウバエの寿命を延長し[31]、ハエがｄＦＯＸＯ、ＤＡＦ－１６オーソログを過剰に発現しているとき、それは寿命を顕著に上昇することができる[32]。ＤＡＦ－１６／ＦＯＸＯでの前記多様な配列シグナルの著しい収束は、このタンパク質が、老化および長寿に影響を与えるシグナルネットワークにおいて、重要で、進化的に保存されている「ノード」であることを示唆する。

【００１４】

ＤＡＦ－１６のヒトの相同体は、４つのＦＯＸＯ：ＦＯＸＯ１、ＦＯＸＯ３Ａ、ＦＯＸＯ４およびＦＯＸＯ６を含有する。従って、ＦＯＸＯの単一の塩基多型（ＳＮＰ）形態における、一般的な、野生の変異体および関連した遺伝子は、ヒトの長寿に影響する可能性があることを仮定することを試みる。「ＦＯＸＯ３」は、ＦＯＸＯ３Ｂが染色体１７上の偽遺伝子であるため、「Ｆ０Ｘ０３Ａ」と同義である。

【００１５】

これは興味深い仮説である。インスリン、ＦＯＸＯ、酸化性ストレスとヒトの寿命との間の関係は、酸化ストレスが、好ましい一般的に考えられる加齢のメカニズムであるため、特に関連性がある。１９５６年以来、加齢の遊離基説は、加齢がＤＮＡ、反応性酸素分子の累積的な照射によって細胞および組織に損傷を部分的に生じることを仮定し、普遍的

にまだ受け入れられないにも関わらず、有効な証拠が長年にわたって蓄積した[３４，３５]。従って、ＦＯＸＯは、潜在的な分岐点または橋かけを、インスリンシグナル、遊離基とヒトの老化／寿命との間で提供することができる。

【００１６】

Ｓｕｈ　ｅｔ　ａｌによる関連性のある最近の報告[３８]を含むヒトの寿命で、ＩＩＳ経路における、いくつかの従来の研究と関連のある遺伝子があり[３６、３７]、機能的に重要なＩＧＦ－Ｉ受容体の突然変異体と特別な寿命とを関連するが、ＦＯＸＯ遺伝子およびヒト寿命の間の関連性の発表報告は全く見当たらなかった。従来の研究は、ＦＯＸＯ遺伝子と、４年の生存率、脳卒中の危険性[３９]および早発閉経[４０]を含む他の老化表現型との関連が明らかになった。

【００１７】

しかしながら、ヒトの寿命は、疾患特定の危険性ならびに個々の加齢の割合を包含する複雑な表現型である。その遺伝子の先例の研究は、困難である。寿命の研究は、小さい遺伝子影響によるサイズ、人為的な層化産物、人口異質、長寿研究の参加者の充分な人数の不足および他の課題[３、４，４１]によって影響される。従って、ヒトの寿命への遺伝子寄与の可能性を、ＩＩＳシグナルに関連する遺伝子から評価するために、加齢表現型としてよく特徴付けられる人の多く、均質な長寿の集団を選択し、ＩＩＳ経路に関連のある５つの候補の寿命遺伝子のコホート内症例対照研究(nested case-control study)を実行した。前記遺伝子は、加齢表現型の従来の関連物に基づいて、主に加齢の遺伝子ノックアウト、トランスジェニック、突然変異および他のモデル生物から選択された[３、４、１４～１７、３６，４２]。優先順位は、インスリン感受性およびグルコース（エネルギー）ホメオスタシスに関連する遺伝子で行った。

【００１８】

集団の急激な老化は、慢性疾患の罹患率および障害を増大することにより、先例のない難題を社会にもたらすであろう。ヒトが齢をとる方法に関して、広く影響することができる生物学的経路を包含する、加齢のメカニズムの良好な理解は、加齢に関連した疾患および障害への低下で重要な意味を有する。ヒトの寿命で多くの生物学的に信頼できる遺伝子候補があるが、１つの発見のみが、ＡｐｏＥ遺伝子のものより、今まで多くの集団において広く繰り返されてきた。前記遺伝子は、加齢表現型、特に心血管疾患および認知症、例えば長く健康な寿命を達成する能力に影響するようなものに広く達成した。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１９】

ヒトの加齢表現型および寿命への広く達成した遺伝子を発見する際の課題は、ヒトにおける研究を実施する前、モデル生物を使用して先見的で潜在的な候補を同定することに役立つことができることを示唆する。従って、ヒトのインスリン／ＩＧＦ－１シグナル経路および／または配列に基づく酸化ストレス反応システムおよび／または加齢のモデル生物または従来のヒト研究で機能的相同性の中で、いくつかの候補遺伝子の研究するために選択する。前記シグナル経路からヒトの候補遺伝子のリストを構成し、日本人の集団の約１０％以上の頻度にて発生する前記候補遺伝子において変異体を評価した。限られた資源のため、３つのＳＮＰのみを、分析でそれぞれの遺伝子から選択した。ＳＮＰを、可能であれば、それぞれの遺伝子の最大範囲を提供するために、連鎖不平衡（ＬＤ）で領域から選択した。

【００２０】

一般的に、本発明は、ＦＯＸＯ３Ａ「ＧＣＣ」ハプロタイプ（例えば、ＦＯＸＯ３Ａハロタイプは増加した寿命と関連があり、本明細書において更に１５年以上生存するヒトの対象の可能性として規定する）を検出する組成物および方法を提供する。好ましい実施形態において、検出されたＦＯＸＯ３Ａハプロタイプは、長く生きる増加した可能性または減少した可能性のいずれかと関連するが、本発明は、長い寿命の増加も減少の可能性と関連がなくおよび／または加齢に関連した疾患（例えば、「正常」または「ｗｔ」の遺伝子

型）の危険性を最少にするＦＯＸＯ３Ａハプロタイプを検出する物質および方法を必然的に包含する。加齢に関連した疾患とは、疾患冠動脈疾患（ＣＨＤ）であり、冠状動脈疾患、脳卒中、癌、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、他の慢性的な肺疾患、パーキンソン病、糖尿病、肥満、認知症（一般的な認識機能）、虚弱（歩行能力）もしくは他の加齢と関連性の疾患、または身体および／または認識障害と規定する。またヒトの肥満との関連性が存在する。

【００２１】

「ＧＣＣ」ハプロタイプは、何十キロベースのＤＮＡを包含する。この領域における他のＳＮＰは、本願明細書で記載される３つのＳＮＰを有する連鎖不平衡を示す。更なるＳＮＰが、同様に寿命および健康的な老化に関連のあるこのＧＣＣハロタイプで同定され、予測される加齢と関連する疾患に実用的であることができると予期される。「ＧＣＣハロタイプ」は、特別な長寿および／または健康的な加齢の予測へと導く“機能的な変異体”であることを最終的に見出すＤＮＡ変性の他の種の代用物として、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の範囲または隣接したいずれかでもたらすことができる。前記他の変性は、転移、複製、欠失の形態であることができ、例えば“ＬＯＣ１００１３０９６６”といった依然知られていない他の遺伝子または転写物を含有することができる。ＬＯＣ１００１３０９６６は、ｍｉｆ２のＳＭＴ３制御因子３ホモログ２と同類であり、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子のエクソン２の範囲内であることが同定され、“ＧＣＣ”ハロタイプ内である。ＬＯＣ１００１３０９６６に関するＤＮＡ配列は、ＧｅｎＢａｎｋ取得のＩＤ＃「ＸＭ　００　１７２５５１９」として記載され、ＬＯＣ１００１３０９６６の予想アミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋファイル「ＸＰ　００　１７２５５７１」として記載されている。

【００２２】

ハプロタイプ分析を使用して、患者が積極的な健康または疾患の予防／治療介入によって利益があるものを潜在的に予測することができる。ハプロタイプ分析は、キットの様式で提供することができる。危険性の測定は、このような情報を、疾患、障害もしくは死亡の可能性の評価、またはヒトがどれほど生存または無病生存であるかを確定する目的に使用することができる。前記情報は患者、健康保険会社、長期介護保険会社および医師または他の医療供給者への、多少の指導を患者の長期ニーズとして提供するために重要である。医薬を、加齢に関連した健康または疾患に影響を与えるために、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の作用の改善、ＦＯＸＯ３Ａタンパク質および／または他のタンパク質との相互作用の細胞局在の改善、遺伝子によって産出されるタンパク質の量または種類の改善するものを開発することができる。

【００２３】

マウスにおいて相同配列は、早期卵巣機能不全と関連することができる。Ｃａｓｔｒｉｌｌｏｎ　ＤＨ，　Ｍｉａｏ　Ｌ，　Ｋｏｌｌｉｐａｒａ　Ｒ，　Ｈｏｒｎｅｒ　ＪＷ，　ＤｅＰｉｎｈｏ　ＲＡ．　Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｏｖａｒｉａｎ　ｆｏｌｌｉｃｌｅ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｉｎ　ｍｉｃｅ　ｂｙ　ｔｈｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ　Ｆｏｘｏ３ａ．　Ｓｃｉｅｎｃｅ．　２００３　Ｊｕｌ　１１；３０１（５６３０）：２１５－８。その結果、同類のハプロタイプ分析は、獣医学的応用に実用的であることができる。

【００２４】

更なる本発明の特徴は、以下の記載から、例えば添付した図面および表を参照して、明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】表１０に記載のプライマーおよび条件を使用してＦＯＸＯ３Ａ　Ｇ／Ｔ変異体を検出するＡＲＭＳ－ＰＣＲ定量法の結果を示す図である。

【図２】表１０に記載のプライマーを使用してＦＯＸＯ３ＡのＧ／Ｔ変異体を検出するＡＲＭＳ－ＰＣＲ分析の模式的に概略を示す図である。

【００２６】

以下の表は、本明細書の一部である：

表１：ＨＨＰ／ＨＡＡＳ　Ｃｏｈｏｒｔの１９９１－９３における基本特性（ｎ＝３，７４１）

表２：ケースコントロール状態による基本特性

表３：ケースおよびコントロールにおけるヒトの寿命およびＭＡＦの候補遺伝子

表４：ケースコントロール状況によるＦＯＸＯ３Ａ３遺伝子型

表５：基準での遺伝子型集団間の健康状況の相違点

表６：ＦＯＸ０３Ａ遺伝子型によるインスリン感受性表現型

表７：ＦＯＸＯ３Ａ３遺伝子型に関する加齢に関連した表現型の優位性

表８：最高到達年齢による遺伝子型分布

表９：ｒｓ２８０２２９２　Ｇ－Ｔ多型の同定のためのプライマー

表１０：ｒｓ２８０２２９２　Ｇ－Ｔ多型の同定のためのＰＣＲ条件

【発明を実施するための形態】

【００２７】

Ａ．ハワイでの寿命の研究

調査集団

コホート内症例対照研究は、ハワイ寿命調査の一部で、ホノルル心臓計画（ＨＨＰ）およびホノルルアジア加齢研究（ＨＡＡＳ）の当初の集団から集められた健康的な加齢の配属されたコホート研究として実施された。ＨＨＰは、１９６５年に開始した日系米国人８，００６人の中での、心血管疾患の集団に基づく潜在的な調査である。ＨＨＰ参加者は、正式な連絡先を持ち、１９００年から１９１９年の間に生まれ、オアフ島に１９６５年に居住していた９，８７７人の男性から募った。

【００２８】

試験参加者は、日本、通常日本の西部および南部からの両親を有し（中央領域またはさらに西部および南部から９４％）；全体の４９％は、親の出身が広島および山口の隣接した県からである[６１、６２]。大半の参加者はハワイ生まれ（８８％）であるが、対立遺伝子頻度のケースコントロール条件の混絡の理論的な可能性が、地理的起点による。従って、特定の分析、ケースおよびコントロールに関して、親の出身の県によって、条件付きロジスティック回帰モデルを使用して、階層化した。分析は、データセットにおける、集団階層化で全く証拠を示さなかった（資料未記載）。

【００２９】

ＨＨＰコホートの補充、設計および方法を、詳細に他で概説する[６２]。簡潔に、調査登録時（１９６５～１９６８）、参加者は、４５～６８までの歳であった（平均年齢５４歳）。ＨＨＰの開始から、冠動脈疾患および脳卒中の発生の進行、ならびに全ての原因による死亡率に関する情報が、地方新聞（英語および日本語）の死亡記事の観測および退院記録の査察から得られた[６１]。１９９１～１９９３年検査における追跡調査は、５人のみが死亡情報をたどることができなかったことが分かった[６３]。

【００３０】

現在の調査に関する全ての参加者は、２００７年８月までに更新された調査参加者の記録から導いた。ＨＨＰ（１９９１－１９９３）の試験４から達成された表現型データおよび血液サンプルは、ホノルルアジア加齢研究（ＨＡＡＳ）の開始と一致し、コホート内症例対照研究のための基礎調査として使用された。ＨＡＡＳは、高齢者における神経変性疾患、認識機能および他の加齢表現型の調査のためのＨＨＰの展開として開始された。[６４]参加者は、試験４での７１～９３歳の３，７４１人（平均年齢７７．９±４．７歳）、最初のＨＨＰの約半数を含有する[６４]。

【００３１】

現在のコホート内症例対照研究に関して、「ケース」（寿命表現型）を、１９１０年アメリカ出生コホートの特異的生存率の少なくとも上位１％（最小９５歳）を募集時期から生存した全てのＨＨＰ参加者として規定した。２００７年８月時点にて、少なくとも９５歳まで生存した合計２１３人の個人を調査した。１７６人のこれら個人が死亡し（平均年

齢９７．５歳、ＳＤ２．１；範囲９５～１０６歳）、３７人が依然生存している（平均年齢９８．７歳、ＳＤ２．１；範囲９７～１０６歳）。

【００３２】

コントロールは、中年男性で、１９１０年のアメリカ出生コホートの特異的生存に関する平均死亡年齢の間近に死亡したＨＨＰ／ＨＡＡＳコホートからの４０２人からなる。症例を達成するために：約１：２のコントロール比率において、８１歳までに死亡したコントロールに関するＨＨＰ／ＨＡＡＳ調査集団をサンプルとして採取した。コントロール集団における死亡平均年齢は、７８．５歳であった（ＳＤ１．８、範囲７３～８１歳）。これはアメリカの男性集団より若干高いが、ハワイにおける日系米国人の男性の高い平均寿命に合致し、最後の報告で白人男性より３．５年長かった[６７]。全てのケースおよびコントロールは、家系が主に日本の中央西部を出身とする日本人人種である[６１、６２]。

【００３３】

方法は、組織のガイドラインに従って実行され、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　Ｂｏａｒｄ　ｏｆ　Ｋｕａｋｉｎｉ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒによって承認された。書面に基づくインフォームドコンセントを、参加者が同意を提供することができない場合、全ての試験参加者または家族代表者から得た。

【００３４】

遺伝子型

３つのＳＮＰを５つの候補遺伝子の各々から選択する。モデル生物において、加齢経路で影響を十分に記載された遺伝子を選択する。全ての遺伝子を、図１を参照するように、ＩＩＳ経路に仮定的な関連、ならびにエネルギー恒常性、グルコースおよび／または脂質代謝に潜在的な関連に基づいて選択した。ＳＮＰを、ＨａｐＭａｐまたはＪＳＮＰデータベースに報告された、それらの少数の対立遺伝子頻度に基づいて選択した（ｓｎｐ．ｉｍｓ．ｕ－ｔｏｋｙｏ．ａｃ．ｊｐ）。

【００３５】

総細胞ＤＮＡを、ＰｕｒｅＧｅｎｅシステム（Ｇｅｎｔｒａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｉｎｃ．）を使用して分離し、ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ染色（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，　Ｅｕｇｅｎｅ，　ＯＲ）を使用して定量化し、候補遺伝子からＳＮＰは、対立遺伝子識別分析を使用して遺伝子型を求めた。ＴａｑＭａｎ（登録商標）（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｉｎｃ．）試薬をＡＢＩから購入し、ＳＮＰを頻度≧～０．１で日本人集団において選択した（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｐｒｏｊｅｃｔｓ／ＳＮＰ／）。ＰＣＲは、Ｔａｑ　Ｇｏｌｄ（Ｐｅｒｋｉｎ　－Ｅｌｍｅｒ，　Ｃｏｒｐ）およびＴａｑ　Ｍａｎ（登録商標）分析でＰＣＲ産物の検出を使用し、１つの対立遺伝子および他の対立遺伝子に対してＶＩＣラベルされたプローブで６－ＦＡＭラベルされたＦＲＥＴプローブを使用し、分析の検出を向上させるために副溝結合（ＭＧＢ）クエンチャーを使用して、標準の条件下にて増幅した。ＰＣＲ産物を、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　７０００　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍで測定した。

【００３６】

遺伝子型データを、統合されたデータベースシステムによって管理した（ＭＳ　Ｅｘｃｅｌ，　Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ，　Ｉｎｃ）。それぞれの遺伝子型プレート上の全ての正のコントロールを、同様に一貫して評価した。陽性マーカーをハーディワインベルグ平衡からの偏差で検出した。細胞頻度は９８％を超えた。

【００３７】

統計学的分析

ＳＮＰを、ハーディワインベルグ平衡からの偏差で評価した。ピアソンカイ２乗検定を使用して、ソフトウエアプログラムＳｔａｔＸａｃｔ[６８]を用いて同様の遺伝子型頻度に対するケースおよびコントロールを比較した。関連の強度評価するために、確率比率をＳＡＳ[６９]のロジスティック回帰モデルを使用して評価した。一般化線形モデル（ＧＬＭ）および共分散分析（ＡＮＣＯＶＡ）を更に使用して、健康な試験参加者の比率をＦＯＸＯ

３Ａの遺伝子型によって比較した。ケースおよびコントロールにおける加齢表現型の分析のためには、連続変数の分布を比較するスチューデントｔ検定、および比例変数でのカイ二乗である。

【００３８】

結果

１９９１～１９９３の調査でＨＨＰ／ＨＡＡＳ調査集団の基本的特徴を表１に示す。平均年齢は、７７．９歳であり、集団の１００％は男性および日本人人種であった。生物学的特徴、公衆衛生状態、疾病の罹患および基本的な状態を示す。

【００３９】

【表１】

表１．1991～93におけるHHP/HAASコホートの基本的特徴　(n=3, 741)

基礎調査における変数（1991-93）	平均±標準偏差	最小値－最大値
生物学的特性		
年齢(y)	77.88 ± 4.69	71　93
肥満度指数 (BMI) kg/m2	23.43 ± 3.16	12.25 - 39.34
胴/尻 比	0.94 ± 0.06	0.73 - 1.27
総コレステロール (mg/dl)*	189.73 ± 33.16	81 – 382
トリグリセリドレベル (mg/dl)*	148.96 ± 93.85	32 – 1369
HDL (mg/dl)*	50.94 ± 13.36	20 – 129
グルコース (mg/dl)*	113.03 ± 29.4	44 – 399
インスリン (mIU/L)*	16.82 ± 32.48	1.5 – 1164
一般健康状態		
自己報告「良くない」健康 (%)	32.88	--
罹患率		
CHD (%)	19.38	--
脳卒中 (%)	4.73	--
癌 (%)	13.84	--
糖尿病 (%)	58.11	--
物理的および認知機能		
下半身（歩行困難）(%)	20.47	--
上半身（kg 握力）	30.09 ± 6.88	0　55
認知スコア (CASI)	82.24 ± 16.37	0-100

*空腹時の値

【００４０】

前記１９９１～９３年の基本的集団から、「長寿」のケースとして２００７年までに９５歳以上生存した全ての参加者を選択した（ｎ＝２１３）。その後「平均的な」生存率のコントロールとして８１歳以前に死亡した全ての参加者を選択した（ｎ＝４０２）。ケースおよびコントロールの基本特徴を表２に示す。生物学的特徴において、高齢者のケースは、比較的老年で、脂肪が少なく（低い腰周り：尻周りの比率）、低いトリグリセリド（ボーダーライン）、低いグルコース、低いインスリンレベルおよび高いＦＯＸＯ３Ａ３対立遺伝子の傾向を、基礎調査で有する。ケースはまた、自己評価による健康、ならびに心血管疾患（ＣＨＤおよび脳卒中）および癌の低い傾向を改善した。機能的に、彼等は十分に歩行できるようであるが、低い握力を有した。認識スコアに関する有意差は存在しなかった。

【００４１】

【表２－１】

表２．　ケースコントロール状態による基本的特徴

基礎調査における変数 (1991-93)	平均生存者の表現型 (平均到達年齢 78.5y)		長寿表現型 (平均到達年齢 97.9y)*		
	平均±標準偏差	最小値-最大値	平均±標準偏差	最小値-最大値	P†
生物学的‡					
基礎調査における年齢 (y)	74.63 ± 2.05	71 – 79	85.62 ± 3.12	80 - 93	<.0001
肥満度指数 (BMI) kg/m^2	23.4 ± 3.17	15.89 - 32.33	23.0 ± 2.91	15.4 - 31.1	0.1272
胴/尻 比	0.95 ± 0.06	0.78 – 1.15	0.93 ± 0.06	0.73 – 1.07	0.0008
総コレステロール (mg/dl)	187.96 = 34.6	98 – 303	185.36 ± 32.16	95 - 304	0.3680
HDL (mg/dl)	50.82 ± 14.17	21 – 129	51.29 ± 13.54	27 - 100	0.6911
トリグリセリド (mg/dl)	154.72 ± 118.72	46 – 1369	140.32 ± 82.23	38 - 649	0.1178
トリグリセリド対数§	4.88 ± 0.51	3.83 – 7.22	4.81 ± 0.50	3.64 – 6.48	0.0965
グルコース (mg/dl)	117.83 = 35.9	69 – 323	108.98 ± 22.55	77 - 298	0.0012
インスリン (mIU/L)	25.54 ± 82.89	3.3 – 1164	13.8 ± 11.39	1.5 - 104	0.0421
インスリン対数§	2.69 ± 0.74	1.19 – 7.06	2.44 ± 0.58	0.41 – 4.64	<0.0001
FOXO3A3 MAF (rs2802292)	0.255	--	0.371	--	<0.0001
一般健康状態					
自己報告「良くない」健康 %	41.92	--	31.07	--	0.0163

【表２－２】

表2. ケースコントロール状態による基本的特徴（続き）

罹患率					
CHD (%)	26.37	--	7.55	--	<0.0001
脳卒中 (%)	7.46	--	3.3	--	0.0394
癌 (%)	20.15	--	13.68	--	0.0468
糖尿病 (%)	60.55	--	59.81	--	0.8587
物理的/認知機能					
下半身（歩行困難）	30.59	--	16.83	--	0.0002
上半身（握力）	29.85 ± 7.54	0 − 47	26.37 ± 5.53	8 − 45	<0.0001
認知スコア (CASI)¶	80.96 ± 19.48	0 − 100	78.54 ± 13.85	12 − 98	0.1088

*2007年8月までに95歳の年齢に達したDNAサンプル(生存および死亡)を有する全てのHHP/HAAS参加者と考えられる症例(長寿表現型)からなる:集団1:生存、n=37、平均年齢98.7、範囲97～106歳；集団2:死亡、n=166、平均死亡年齢97.5、範囲95～106y)；†連続変数によるスチューデントのｔ検定および分類変数のためのカイ二乗からのp値；‡空腹時の値；§正規分布でない値に実施した対数変換；¶CASI(認知能力検査法)[43]

【００４２】

５つの遺伝子を調査した（ＡＤＩＰＯＱ、ＦＯＸＯ１Ａ、ＦＯＸＯ３Ａ、ＳＩＲＴ１、およびＣＯＱ７）。ケースおよびコントロールに関して、少数の対立遺伝子頻度および他の関連する遺伝子情報を表３に示す。しかしながら、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子型のみが、ｐ＜０．０５の初期カットオフ値を使用して寿命と関連した。

【００４３】

【表３】

表3. ケースおよびコントロールにおけるヒト長寿のための候補遺伝子およびMAF

遺伝子名	シンボル	SNP ID#	変数名	劣性対立遺伝子の頻度(ＭＡＦ) ケース	コントロール	P*
†アディポ, C1Q, CDC	ADIPOQ	rs1063539	ADIPOQ_1	0.297	0.263	0.20
		rs182052	ADIPOQ_2	0.455	0.493	0.22
		rs266729	ADIPOQ_3	0.195	0.239	0.08
フォークヘッドボックスO1A	FOXO1A	rs2755209	FOXO1A1	0.272	0.291	0.48
		rs2721069	FOXO1A2	0.293	0.307	0.62
		rs2755213	FOXO1A3	0.350	0.358	0.77
フォークヘッドボックスO3A	FOXO3A	rs2764264	FOXO3A1	0.347	0.248	0.0002
		rs13217795	FOXO3A2	0.340	0.248	0.0006
		rs2802292	FOXO3A3	0.371	0.255	<0.0001
サーチュイン1	SIRT1	rs7069102	SIRT1_1	0.185	0.181	0.84
		rs10823112	SIRT1_2	0.337	0.360	0.44
		rs1885472	SIRT1_3	0.188	0.179	0.71
コエンザイムQ7	COQ7	rs8051232	COQ7_1	0.147	0.150	0.90
		rs11074359	COQ7_2	0.153	0.171	0.43
		rs7192898	COQ7_3	0.162	0.170	0.73

*カイ二乗検定でのケースおよびコントロールの間のMAFの比較;
†脂肪細胞、C1Qおよびコラーゲンの領域を含んでいること

【００４４】

変異体“ｒｓ２７６４２６４”を、以下に“ｒｓ　１２５２４４９１”として規定する。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．２として同定されたＳＮＰ　ｒｓ２７６４２６４（“ＦＯＸＯ３Ａ１”）のＤＮＡ配列は、以下である：

【００４５】

TATTTCACTGGCCAGGACCTCCAATACATTGTTGAATAGCAGTGGTGAAAGCAGA
GATCCTTACCATTTTTCTCATCTTAAGGGGAAAGCATTCAGTCTTTCACTGTTAAG
TATCATGTTAGGTGTAAGTTTGTCACATATTTCCTTTATCAGGCTGAGGTAGTTTT
CTCTATTCCTATGTGTTGAGTAGTTTTTGTTTTTTAAATTATGAGTGGATATTGAA
TTTTGTCAGATGCTTTTTCCTCACCTGTTGAGAAGATCAGATGGTTTTTCTTTTTC
AGTCTTTTAATATGATGAAATACATTGACTGATTTGCAATGTTAAACCAACCTTA
CATTCCTGGGATAAATCCCACCTGGTCTTGATATGTTACCATGAGATTCAAGTAG
CTAAAATTTTGTTAAGGATTTTTGTGTCTGTCTTCATGAGGAATATTGATCTATAC
ATTTCTTATAATATCTTTGCCTGTTTTTGGTACCAGGGTAATGGTGGTCTTATAA
(C/T)
ATGAGTTGGA AAGTGTTCCC TGTTCTGCTC TGGTAGCACT GTAGTATCTC
TTCCTTAAATGTTTGGTAGAATTCAACGGCAGTTAAGCCATCAGAGCCTGGAGTT
TTTTTGTGTGTGAGGAAATGTTTAACTGCTAATTCAATTTATTTCATAGATACAAT
GCTGTTGGCTTGTCTGTTTCTTCTTGAATGAGTTTTGGTAGTCTGTGTCTTTTAAG
GAATTTGCCCATTTTATTTAAGTTGTCTAATTTATGGGCATAAAGTCATTTATAAT
GTTCTCTTATTATCCTTTTAATAGATATATCATCTGTAGTGATTTCATTTTCATTCC
TGATGTTGATAATTTGTCTTAACTCCCTTTCCCCCTCATTCCTTATCTGTTTAGTGC
CTTGCAATTTCATTGATCTTTTAAACGAATTAACATTTGCTTCCACTGACTTTTCC
CCCGTTACTTTTATGTTTTTACTTCCATTGATTTTTTTTTTCTCTTTTAATCTTTTA

【００４６】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．３として同定されたＳＮＰ　ｒｓｌ３２１７７９５（“ＦＯＸＯ３Ａ２”）のＤＮＡ配列は、以下である：

【００４７】

CACCACCACCCACTAGACAAATTGCTTAACCTTTCTGCACCTCAGTTTCCTCCTGA
CAGGCTTGTTTAGAAAATAAAATGAGATCAAATTTGTCAAGCACAGAGCATTGG
CCCTGGTAGGCACCACATACATGAATTTCCTTCAGATTGTAGGTGAAGTAGACTT
GATTTGGGATTTCTCTTGTTACCTAGGTGCTTGTGTAGAGGAGACTTTAGAACCA
GAATGTGTTATTTGTGGTTTTGAGTGTGCCTGGGACTCTGAGCCAACTGAATTAC
CAAGTAATGGGGGCCCCATGGCATC
(C/T)
CATGACAGGTGGAGAGCCGGCTCTTCACCCTGGATGGACCTGAAATGCCTGCTA
AGGCCTTGCTCCACCGAGTAGCACACACCCTATCAGTTTGCCCTTCTTTCCATCTC
TTATTCTAGAGACCTTAAAGCCTACTTGTTGGTATATATTTTCAGGTTTTTGGAAA
TTGGGCTGTTTAATTGAAGTTAATACCAGTGATGAGACTTTTCAACCTGAGAACA
ACCTAGATGCTACTTCACATTTTGCAGTGGAAGCTTACTTCCATCTTCACTCATGT
AGGACATTCTTTGGTCTCAATGT

【００４８】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．４として同定されたＳＮＰ　ｒｓ２８０２２９２（“ＦＯＸＯ３

Ａ３”）のＤＮＡ配列は、以下である：

【００４９】

TGAAGCAGGGCATCAGGGAATGGGAGTTGGTGAGGAAATTACATTAACATTTAT
TGAGCACCATTCTCACTATAAACCTGAACGTAAATATTATTATTATTATTATT
ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTTTAGTAGAGATGAGGCCTTGCTGTGT
TGCCTAGACTGGTCTTGAACTCCTGGGCTCAAGCAATCCTCTCACCTTGGCCTCTC
AAAGTGCCTCTCAAAGGTGTGAGCCACCATGCCCAGCCTATTCGTTTTTAATTTC
TGAAGAAACTGAGGCTAACAGCTGGGTCTGGCCCATGACTGGTTCAGTTGGTATT
TGGTGGACCAAGTTGACCAAGCTCACCCAGCTTCTGAGTGACAGAGTGAATATA
AACCCAGCCTGCTCACTCCATTTCCTAGTTTTCTCACCTCTACCAGGGTCTCTGTT
GCTCACAAGAGCTCAGGGCTGGGA
(G/T)
AAGCCTCTGTGTGACAGATGAAGGGGTCCTGCTGCTCTCTAGGGAAGAATCGGT
CCCAAATTGCTCAAGGGAGTAAGGTGGTTTCGTTGAGGAGCATCAGCTAGGGGG
ATTGATGGGAATAGGTGTCAGGCAGCCAGTGGAAATTTTGTGTGCCCACCTGTGG
CACATGTATTATGCAAATTCATGCAAAAATATATATA

【００５０】

「ＧＣＣハプロタイプ」は、ＳＮＰ　ｒｓ２７６４２６４、ｒｓ１３２１７７９５およびｒｓ２８０２２９２を使用して記載することができ、遺伝子型の以下の組み合わせを含む対立遺伝子である：

【００５１】

【表４】

rs2764264	rs13217795	rs2802292
“C”	“C”	“G”

【００５２】

これらの変異体を、染色体の最上部（遺伝子地図において低いヌクレオチド位置）から最下部（遺伝子地図において高いヌクレオチド位置）まで観測するとき、ＮＣＢＩ命名法によると「ＧＣＣハプロタイプ」を、ＳＮＰｒｓ２８０２２９２、ｒｓ２７６４２６４およびｒｓｌ３２１７７９５を使用して記載することができ、以下の遺伝子型の組み合わせを含有する対立遺伝子である：

【００５３】

【表５】

SNP ID #	rs2802292	rs2764264	rs13217795
表３からのＳＮＰ変数名	FOXO3A3	FOXO3A1	FOXO3A2
染色体６ヌクレオチドの位置	109015211	109041154	109080791
ＳＮＰ 対立遺伝子	“G”	“C”	“C”

【００５４】

上記のデータは、Ｄａｔａｂａｓｅ ｏｆ Ｓｉｎｇｌｅ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｓ （ｄｂＳＮＰ）．Ｂｅｔｈｅｓｄａ （ＭＤ）：Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．（ｄｂＳＮＰ Ｂｕｉｌｄ ＩＤ：１２９，ＮＣＢＩ ｇｅｎｏｍｅ ｂｕｉｌｄ ３６．３）からである。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＳＮＰ／^{70}から入手可能である。

【００５５】

ＦＯＸＯ３ Ａ３の遺伝子頻度をケースおよびコントロールの間で比較する更なる調査は、ピアソンのカイ二乗統計の置換分布を用いて、正確なｐ値０．００００９で、非常に重要な相違点を示した。これらの結果を表４に示す。この研究において、それぞれの対立遺伝子内に５箇所の遺伝子座と３つのＳＮＰが存在するため（表３）、多重比較に関するボンフェローニ補正は、１５×０．００００９＝０．００１３５の補正されたｐ値を生じた。ＦＯＸＯ３Ａの３ＳＮＰの間で高い関連性のＬＤのため、ＦＯＸＯ３Ａ３のＳＮＰのみに関して、更に調査した（ｒｓ２８０２２９２）。ケースおよびコントロールの間でＦＯＸＯ３Ａ３に関する対立遺伝子の同型劣性（ｈｏｍｏｚｙｇｏｕｓ ｍｉｎｏｒ）対同型優性（ｈｏｍｏｚｙｇｏｕｓ ｍａｊｏｒ）の確立比率（ＯＲ）は、２．７５（９５％ＣＩ：１．５１－５．０２、ｐ＝０．０００７）であり、ケースおよびコントロールの間で異型対同系の優性対立遺伝子は、１．９１（９５％ＣＩ：１．３４－２．７２、ｐ＝０．０００３）であった。これらの結果は、寿命に関して相加効果を示唆する。

【００５６】

【表６】

表４．　ケースコントロール状態の FOXO 3A3 遺伝子型

	FOXO 3A3 Genotype (rs 2802292)		
ケースコントロール状態	TT	TG	GG
平均生存者の表現型*	223 (55%)	153 (38%)	26 (6%)
長寿表現型†	81 (38%)	106 (50 %)	26 (12 %)
ピアソン直接検定のｐ値‡	0.000091		
ボンフェローニ調整後のｐ値	0.00135		

* コントロール低下したn=402「平均生存」からの対象の数値および%（平均達成年齢78.5歳）

†n=213「長命」ケースからの対象の数値および%（平均達成年齢97.9歳）

‡直接ピアソンカイ二乗検定から遺伝子型頻度のケースおよびコントロールにおける比較

【００５７】

若い年齢で長寿表現型についてさらに理解するために、Ｗｉｌｌｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）の健康な生存者の定義を用いて３つのＦＯＸＯ３Ａ遺伝子型群のそれぞれに関する基礎調査（１９９１）にて、健康である人の比率を比較した。相違点は、非常に重要であった（表５）。１つ以上のＧ対立遺伝子を有する人々は、優性（ＴＴ）対立遺伝子に関して同型である人々より、正常にて健康であるようである。劣性対立遺伝子に関して同型な人の約７５％は、優性対立遺伝子に関して同型な人々の約５７％のみに対して、基礎調査にて健康的である。ケースコントロール状態を調整した後も、相違点は依然わずかながら重要であった。これは、長期生存者（ケース）およびコントロールの部類の範囲内で、対立遺伝子と健康状態の関連性が存続することを示唆する。

【００５８】

【表７】

表５．基準での遺伝子型集団間の健康状況の相違点

	基準にて健康 %*			ｐへの傾向	
	優性の相同	非相同	劣性の相同	未調整	ケースコントロール状態の調整
FOXO3A1	57.41	69.48	75.51	0.01	0.065
FOXO3A2	57.37	69.35	77.08	0.01	0.035
FOXO3A3	57.89	68.34	75.00	0.02	0.097

* 「健康」とは、６つの主な慢性疾患(ＣＨＤ；脳卒中、癌、ＰＤ、ＣＯＰＤ、および治療された２型ＤＭ；高度な物理的機能(1/2マイル歩行することができる)および高度な認識機能(ＣＡＳＩスコア＞７４)は存在しないと規定する

【００５９】

インスリン感受性、寿命の潜在的な中間の表現型、および遺伝子型の間の関係があるか

どうかを評価するため、空腹時インスリン、グルコース、ＨＯＭＡおよび遺伝子型の間の関係を試験した（表６）。非正規分布変数のため、対数変換を正規分布に使用した。優位な関係がインスリン、インスリンの対数、ＨＯＭＡおよび遺伝子型に存在する。同型Ｇ対立遺伝子は、コントロールのみにおいてであるが、インスリン、インスリンの対数およびＨＯＭＡスコアの顕著な低下と関連している。

【００６０】

【表８】

表６．FOXO3A 遺伝子型によるインスリン感受性表現型

	FOXO3A 遺伝子型 (rs 2802292)			P*
	TT	TG	GG	
空腹時グルコース (mg/dl)				
平均生存	118.4+34.0	117.4+38.0	115.9+40.1	0.80
長命	108.3+20.7	109.1+23.7	110.5+24.1	0.73
空腹時インスリン (mIU/L)				
平均生存	23.7+81.2	30.4+91.9	13.2+5.9	0.004
長命	13.5+9.0	14.1+13.4	13.3+9.3	0.77
空腹時インスリンの対数 (mIU/L)				
平均生存	2.68+0.67	2.73+0.85	2.47+0.48	0.03
長命	2.45+0.55	2.43+0.61	2.44+0.52	0.99
HOMA IR スコア				
平均生存	9.1+53.0	10.0+32.2	3.8+2.4	0.03
長命	3.7+2.8	4.0+4.3	3.6+2.2	0.55

* ケースおよびコントロール範囲内のＧＧ遺伝子型およびほかの集団の間の平均値の比較のスチューデントのｔ検定によるｐ値

【００６１】

同様に、いくつかの慢性疾患およびＦＯＸＯ３Ａ遺伝子型の生涯有病率の間の関係に関して試験参加者にて調査した（表７）。

【００６２】

【表９】

表７．FOXO3A3 遺伝子型に関する加齢関連の表現型の病率

	FOXO3A3 遺伝子型					FOXO3A3 遺伝子型			
	TT	TG	GG	p		TT	TG	GG	p
CHD 病率 (%)					癌の病率 (%)				
平均生存	32.3	18.3	23.1	0.010	平均生存	22.4	18.3	11.5	0.326
長命	7.4	7.6	7.7	0.998	長命	17.3	12.4	7.7	0.400
全て	25.7	14.0	15.4	0.002	全て	21.1	15.9	9.6	0.075
脳卒中の病率 (%)					糖尿病の病率 (%)				
平均生存	6.7	8.5	7.7	0.813	平均生存	60.6	62.3	50.0	0.498
長命	4.9	1.9	3.8	0.510	長命	57.5	64.1	50.0	0.368
全て	6.3	5.8	5.8	0.974	全て	59.8	63.0	50.0	0.212

ＧＧ遺伝子型を平均生存コントロール(n=402)、長命ケース(n=213)および全ての対象(n=615)である他の遺伝子型の頻度と比較したカイ二乗検定に基づくｐ値

【００６３】

優位な保護関係が、ＣＨＤの有病率に関する同型Ｇ対立遺伝子、並びに癌および認識機能に関する境界関係で同型接合性が明らかになった。最後に、統合した全ての参加者（ケースおよびコントロール）において最高到達年齢によって、ＦＯＸＯ３Ａ３劣性対立遺伝子頻度（ＭＡＦ）分布を評価した。ＭＡＦは、以前のケースコントロール分析によって予測したように、年齢と共に著しく上昇した（表８）。

【００６４】

【表１０】

表８.　最高到達年齢による遺伝子型分布

死亡年齢（歳）*	N	FOXO3A3のMAF
72-74	17	0.21
75-79	277	0.25
80-81	108	0.26
95-99	185	0.37
100-106	28	0.39

*37「長命」ケースは依然として生存している；平均年齢98.7y（範囲97-106）

【００６５】

５つの候補遺伝子の分析は、１つの遺伝子が、潜在的なヒト長寿遺伝子であるＦＯＸＯ３Ａに関して、他の遺伝子より明確に卓越していることを示した。前記遺伝子が、ヒトの寿命に重要でありえることが、いくつかの証拠によって支持されている。第一に、コホート内症例対照分析において、前記遺伝子内における変異体は、寿命と強く関連している。ケースおよびコントロールの間のＦＯＸＯ３Ａ３の対立遺伝子の同型劣性（ｈｏｍｏｚｙｇｏｕｓ　ｍｉｎｏｒ）対立遺伝子の同型優性（ｈｏｍｏｚｙｇｏｕｓ　ｍａｊｏｒ）であるオッズ比（ＯＲ）は、２．７５（９５％ＣＩ：１．５１－５．０２、ｐ＝０．０００７）であり、ケースおよびコントロールの間の異型対同系の優性でのＯＲは、１．９１（９５％ＣＩ：１．３４－２．７２、ｐ＝０．０００３）であった。これらの結果は、寿命におけるＦＯＸＯ３Ａ３　Ｇ対立遺伝子の相加効果を示唆する（即ち、Ｇ対立遺伝子の２つのコピーは、約２倍の保護作用を与えた）。一貫して、劣性対立遺伝子頻度は、７０歳代から１００歳代までの年代の試験参加者の年齢と共に、著しく上昇した（表８）。

【００６６】

第二に、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子において評価された全３つのＳＮＰは、密接した連鎖不均衡（ＬＤ）であり、長寿表現型と強い相関関係があった。これは、調査結果が可能性によるものでないことを示す。第三に、１つ以上の劣勢（Ｇ）対立遺伝子を有する人は、同型優性（ＴＴ）対立遺伝子での人と比較して、約１５年前の基礎調査にてより健康である可能性があった。劣性対立遺伝子に関して同型な人の約７５％は、優性（ＴＴ）対立遺伝子に関して同型な人々約５７％のみに対して、基礎調査にて健康的である（表５）。

【００６７】

実際に、基礎調査は、ケースが、平均して１１歳老年であるにも関わらず、ケースがコントロールより顕著に健康的であることを示唆した。ケースは、ＣＨＤ、脳卒中および癌の低下した有病率を含有する著しく少ない加齢関連疾患を有する。同様に、彼等は優れた自己評価で健康的であり、低い歩行障害を含む、高い身体機能を一般的に有した。興味深いことに、コントロールより１０歳を超える年にも関わらず、長寿のケースは同様のレベルの認識機能を有した。これは、個々が主な臨床疾患および障害を人生の末期まで何とか遅らせるか、回避する場合に、「健康的な加齢」の表現型の存在を支持する。ケースで観測された健康的な加齢表現型は、彼等の年齢に適合する出生コホート[４６～４８]および１００歳以上の子孫と比較した若い年代で、１００歳以上の人々において報告された健康的な加齢表現型に類似する[４９]。同様に長命のケースは、若い年代で比較的高いインスリン感受性と、低い腰周りと尻周りの比率、低いグルコースレベル、低いインスリンレベルお

よび低いＨＯＭＡ値である代謝プロフィールを有する。いくつかの表現型が、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子型において変異体と関連した。

【００６８】

意外にも、ケースおよびコントロールの間で糖尿病の有病率で優位な違いは全く存在しなかった。しかしながら、ケースはコントロールより１０歳を超えて、糖尿病は年齢と共に顕著に増加するため、それは糖尿病の有病率が非常に独特でないことに注目すべきである。実際に、ケースおよびコントロールの両方は、高い糖尿病の有病率（約６０％）を、比較的低いＢＭＩに関わらず有した。２型糖尿病が、日本人において比較的低いＢＭＩで高い有病率の傾向がある理由は、完全には解明されていない[５０]。しかしながら、白人および黒人より低いＢＭＩでアジア人において、高い内臓脂肪を有する日本人（多少の他のアジア人）で、代謝の相違点が存在する可能性がある[５１、５２]。実際には、日本国ガイドラインが、このような集団の違いを反映し、日本人の肥満をＢＭＩ２５とみなす。ＨＨＰ／ＨＡＡＳコホートにおける糖尿病の高い有病率への他の原因要因は、全ての参加者を、いくつかの異なった臨床試験、および更に可能性がある検出するいくつかの事前検査で糖尿病を試験する事実を包含する。

【００６９】

当然、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子型は、血漿インスリンレベル並びにＣＨＤ、癌および２型糖尿病の有病率に著しい関連があった。これは、細胞増殖、アポトーシスおよび代謝を包含する多様な生理的機能で、インスリンおよびインスリン様成長因子の効果のメディエーターとしてのＦＯＸＯでの知られている役割と一致する。シノラブディスエレガンスおよびショウジョウバエにおける遺伝学の研究は、ＦＯＸＯタンパク質が、代謝および寿命を調節するインスリン様シグナルの従来の標的であることを示した。哺乳類細胞における更なる研究は、ＦＯＸＯタンパク質が、タンパク質キナーゼの標的であり、細胞周期の進行に影響し、生体外において酸化ストレスに対する抵抗を制御することを示した[５４]。生体内研究は、ＦＯＸＯが、インスリンに反応して肝臓グルコース産物を転換し、他の代謝活性を媒介することを示した。これは、ＦＯＸＯタンパク質が、インスリン効果を代謝で媒介して、ヒトの寿命に影響することができるという根拠を支援する。

【００７０】

概して、根拠の全体は、ＦＯＸＯ３Ａの潜在的役割を、ヒトの健康、加齢および寿命で支持する。インスリン感受性、ＣＨＤ、癌、２型糖尿病および寿命を含有する多様な長寿表現型と、ＦＯＸＯとの関連は、「ゲートキーパー」の役割を、ＩＩＳ経路において示唆する。ＦＯＸＯ３Ａがヒトの老化に影響する重要な下流のメカニズムは、酸化ストレスの修正によるーかねてのヒトの老化に関する仮説であるが、これに対する直接的な証拠は現在研究中で全くない。しかしながら、ＦＯＸＯ遺伝子が、シノラブディスエレガンスＤＡＦ－１６の、最も密接なヒトの相同物であり、細胞を酸化ストレスから保護するため、これはヒトの加齢の変化に対して優れた作用のメカニズムである。シノラブディスエレガンスにおいて、ＤＡＦ－１６は、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ２）の発現を増加させ、これは他の「加齢防止」効果の中で、過酸化物を比較的低い損傷で過酸化物に転換し、遊離基に対して有力な内因性保護作用がある。生体内研究は、ＤＮＡ、タンパク質および他の組織における酸化障害が、年齢と共に蓄積し、カロリー的に制限された食事を、齧歯動物[５６]およびヒト[５７]に供給することが、この障害を暖和することを示した。

【００７１】

ＦＯＸＯが明らかに寿命と関連している一方、インスリン感受性で遺伝子型の強い効果は、ケースには観測されず、コントロールであった。しかしながら、ＧＧ遺伝子型は、同様に低血漿インスリンレベルをケースおよびコントロールの両方において示し、遺伝子型の調節作用とインスリンレベルで両方の群において一致する。ケースが比較的強いインスリン感受性を示すため、それらの遺伝子型に関わらず、それらはインスリン感受性をＦＯＸＯ以外に維持する複数のメカニズムを有することを推測する傾向がある。これは、大半の長寿遺伝子が適度または小さい効果サイズを有する仮説と一致した。小さいサンプル数

が、ケースにおける相違点を検出する能力を制限することがまた可能である。一方では、突然変異をＩＲＳ－１[58]またはＩＲＳ－２[23]のいずれでもたらす長命のマウスは、実際インスリン抵抗性であるため、インスリン感受性は比較的長い寿命を与えることができるＩＩＳ経路における突然変異で、必要条件でない。

【００７２】

しかしながら、シノラブディスエレガンスにおいて、単独で寿命に小さい影響を有することができるいくつかの遺伝子が、転写調節“マスター遺伝子”ＤＡＦ－１６[59]によって影響することに留意する関連性がある。さもなくば検出が困難な可能性があるＦＯＸＯ３Ａにおけるわずかな差異が、論理的にＤＮＡ結合、タンパク質間相互作用、細胞周期進行、アポトーシスおよび代謝に関するいくつかの下流遺伝子を修飾される。このように、ＦＯＸＯ３Ａによる小さい改良する効果が、加齢表現型および寿命に、大きく付加的下流効果を潜在的に有する。

【００７３】

裏づけになる証拠は、ヒトの加齢および寿命において、インスリンシグナルの役割が集積し始めたが、これらの効果を媒介する可能性がある遺伝子は知られていない。従来の研究は、長命のイタリア[36]、日本[37，42]、ドイツ[60]およびアシュケナージユダヤ人[38]の民族において、いくつかの加齢表現型と結びついて、インスリン－ＩＧＦ－１シグナル経路から一塩基多型（ＳＮＰｓ）の過多または過少の発現を見出した。これらの発見のいくつかが、小さい効果サイズおよび重要でない統計的優位性によって制限される一方、Ｓｕｈ　ｅｔ　ａｌ．[38]の研究は、同様にＩＧＦ－１受容体において機能的に重要な突然変異が、多少の長命のヒト、例えば１００歳以上のヒトに存在することを示した。

【００７４】

今日までに、ヒトにおけるＦＯＸＯ遺伝子および加齢の表現型に関しては、ほとんど研究がされていない。二つの最近の研究は、ＦＯＸＯ遺伝子が更なる詳細な調査に値することを示唆する。第一に、年配のオランダ人の男性および女性の長期に渡る研究は、ＦＯＸＯ１Ａハプロタイプが４年の生存率を予測し、ＦＯＸＯ３Ａハプロタイプが、脳卒中の危険性を予測したことを明らかにした[39]。第二に、フラミンガム研究は、ゲノムの広範囲にわたる分析において、ＦＯＸＯ３Ａ　ＳＮＰが、女性において正常な閉経期で、年齢と強い関連性があることを見出した（ｐ＝０．００００３）。しかしながら、オランダの調査結果は、多重比較を相当して、両方の研究が複製を必要とするとき、統計学的に有意でなかった。本研究は、ＦＯＸＯ３Ａの関連性をヒトの寿命およびインスリン感受性に関して支持し、拡張する。

【００７５】

現在の研究の主な利点の１つは、それがコホート内症例対照設計を使用することである。この調査設計は、ケースおよびコントロールを、進行中のコホート研究から長期に渡って収集したデータで選択する。従って、関連のあるいくつかの表現型（例えば、疾病の罹患、健康状態、機能）を、参加者がリコールバイアスし難いデータを作成する比較的若いときに、直接的な臨床検診によって得た。リコールバイアスは、調査結果が過去の事象を覚えることが困難なため正確でなく、高齢者にとっては大きな問題となる可能性がある。

【００７６】

実際、比較的高齢の加齢を示唆する表現型の証拠を見出した特別な生存者の調査、例えば１００歳以上の人は、重大なリコールバイアスを潜在的に被るおそれがある。即ち、高齢の参加者は、彼らの過去の病歴および彼らの過去の機能状態を、正確に思い出すことができない。しかしながら、現在の調査において、主な疾患は死亡率および罹病率の受託者に解決され、身体および認識機能の能力に基づく測定を自己評価の補充に使用され、証拠はこのような健康な加齢の表現型にて観測された。これは従来の遡及研究に潜在的な支持を与える。

【００７７】

いくつかの他の長所が、この調査に存在する。第一に、分析で選択された候補遺伝子は、仮説に基づく基準に基づいて選択された。即ち、様々な方法を試用する加齢のモデル生

物、特にノックアウトの研究は、ＩＩＳ経路が加齢および寿命に重要であることを示した。多くの機能が、進化的に保存されていると考えられる。第二に、調査結果は強力で、著しく重要であり、いくつかの隣接したＳＮＡＰをＦＯＸＯ３Ａ遺伝子内に含有する。第三に、調査結果は生物学的に妥当で、従来の調査結果を老化動物モデルにて支持し、また制限された従来のヒトの研究をも支持する。第四に、寿命とケースコントロールの関係性は、コホート内症例対照分析を高度な事象の頻度（死亡率）で、検証の長期間を使用して検出した。第五に、ＨＨＰコホートは、高度に同種のコホートであり、研究の参加者において人口層化を全く検出されなかった。

【００７８】

可能性のある欠点は、ケースおよびコントロールが、１１歳の平均年齢の違いがあるため、誕生コホートを交絡因子として除くことができないことである。しかし、これは、参加者の間に最高１９歳の違いが誕生年にあったため、疑わしい。同様に、部分分析は、ケースおよびコントロールにおいて、教育および職業（資料未記載）の違いが全く存在しないことを明らかにした。さらに、それは、９５歳以上生存して、従って長寿の表現型を得る可能性のある基準にて年上である参加者であった。大抵のコホートの効果は、健康な利点を比較的若いコホートで示す。他の可能性のある欠点は、本研究を１つの集団のみで実施し、従って他の集団において、その総括を評価するために繰り返すべきである。

【００７９】

要約すると、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子内の一般的で、正常な遺伝子変異体は、ヒトの寿命と密接して関連したことを見出した。保護対立遺伝子の有病率が、年齢と共に著しく上昇した。長命のケースは、同様に癌および心血管疾患の低下した有病率、優れた自己報告の健康、高い機能状態を含有する健康的な加齢と関連のあるいくつかの付加的な表現型をおそらく保持し、それらが高いインスリン感受性のいくつかの生物学的マーカーの示唆を基礎調査にて示した。最後に、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子内の特定の変異体は、同様にインスリン感受性、寿命の推定の中間表現型を含有するこれら加齢表現型のいくつかと関連した。

【００８０】

Ｂ．対立遺伝子の患者（ヒトおよびヒト以外）の検出

多くの方法が、特定の対立遺伝子を、多型遺伝子座で検出するために利用できる。特異的な多型対立遺伝子の検出のための好適な方法は、多型の分子性質に部分的に依存するだろう。例えば、多型遺伝子座の様々な対立遺伝子形状は、ＤＮＡの一塩基対と異なる可能性がある。このような一塩基多型（またはＳＮＰ）は、全ての知られている多型の８０％程を含有する遺伝子変異体の主な要因であり、ヒトゲノムにおけるそれらの濃度は平均１／１，０００塩基対と推定する。ＳＮＰは最も頻繁な２対立遺伝子である－２つの形態のみで生じる（しかしＤＮＡにて生じる４つの異なるヌクレオチド塩基に対応するＳＮＰの最大４つの異なった形状が、理論的に可能である）。それにもかかわらず、ＳＮＰは他の多形体より突然変異的に安定していて、それらがマーカーおよび未知の変異体の間の連鎖不均衡を使用して、病原性突然変異体をマップする関連性の研究に適合できる。さらにＳＮＰは二つの対立遺伝子のみを通常有するため、それらは長時間の測定よりはむしろ単純なプラス／マイナス分析によって遺伝子型を同定することができ、それらが自動的に従わせる。

【００８１】

種々の方法が、特定の一塩基多型の対立遺伝子の存在を個々に検出するために利用可能である。本分野の促進は、正確、簡単および安価で大規模なＳＮＰ遺伝子型を同定で提供される。つい最近、例えば、いくつかの新技術は、ダイナミックアレルスペシフィックハイブリダイゼーション法（ＤＡＳＨ）、ミクロプレートアレイ対角ゲル電気泳動（ＭＡＤＧＥ）、パイロシークエンス法、オリゴヌクレオチド特異的ライゲーション、ＴａｑＭａｎシステム並びに様々なＤＮＡ「チップ」技術、例えばＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＳＮＰチップを含有するものが記載された。これらの方法は、標的遺伝子領域の増幅を、通常ＰＣＲによって必要とする。さらに他の新しく開発された方法は、小さいシグナル分子の生成に基づく侵入切断（ｉｎｖａｓｉｖｅ　ｃｌｅａｖａｇｅ）の後に、質量分析または固定

されたパッドロックプローブおよびローリングサークル増幅によって小さいシグナル分子の生成に基づき、最終的にＰＣＲの必要性を排除することがある。特異的な一塩基多型を検出する当業者に知られたいくつかの方法を以下に要約する。本発明の方法は、全ての利用可能な方法を包含することを理解される。

【００８２】

いくつかの方法は、一塩基多型の分析法を容易にするため、開発された。一の実施形態において、一塩基多型を、例えばＭｕｎｄｙ，Ｃ．Ｒ．（米国特許第４，６５６，１２７号明細書）に開示されたような、特異的なエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチドを使用して検出することができる。この方法によると、多型サイトの３’周辺の対立遺伝子に相補的なプライマーは、特定の動物またはヒトから得られた標的分子にハイブリッド形成することを許容する。標的分子での多型部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチド誘導体に相補的であるヌクレオチドを含む場合、その誘導体をハイブリッド形成したプライマーの末端に組む込まれる。前記組み込みが、エキソヌクレアーゼに対して抵抗性のプライマーを与え、それによってそれの検出を可能にする。サンプルのエキソヌクレアーゼ抵抗性誘導体の同定が知られているため、プライマーはヌクレオチドが標的分子の多型部位に存在するエキソヌクレアーゼの曝露に抵抗性になった結果は、反応において使用されるヌクレオチド誘導体のものに相補的であった。この方法は、それが大量の無関係の配列データの測定を必要としない利点がある。

【００８３】

本発明の他の実施形態において、溶液に基づく方法を、多型サイトのヌクレオチドの同一性の同定を決定するために使用する。Ｃｏｈｅｎ， Ｄ． ｅｔ ａｌ．（仏国特許発明第２，６５０，８４０号明細書；国際公開第９１／０２０８７号）。米国特許第４，６５６，１２７号明細書のＭｕｎｄｙの方法のように、プライマーは多型サイトの３’周辺の対立遺伝子の配列に相補的であるものを用いた。この方法は、そのサイトのヌクレオチドの同一性を、ラベルされたジデオキシヌクレオチド誘導体を使用して決定し、多型のヌクレオチドに相補的な場合は、プライマーの末端に組み込まれる。

【００８４】

遺伝子ビット分析（Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｂｉｔ Ａｎａｌｙｓｉｓ）またはＧＢＡ^{ＴＭ}として知られている代わりの方法が、Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ ｅｔ ａｌ．に記載されている（国際公開第９２／１５７１２号）。Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ． ｅｔ ａｌ．の方法は、ラベルを付けられたターミネータと、多型サイトの３’配列に相補的なおよびプライマーとの混合物を使用する。従って組み込まれてラベルを付けられたターミネータは、評価される標的分子の多型サイトに存在するヌクレオチドおよびその相補物によって決定される。Ｃｏｈｎ ｅｔ ａｌ．（仏国特許発明第２，６５０，８４０号明細書；国際公開第９１／０２０８７号）の方法とは対照的に、Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ． ｅｔ ａｌ．の方法は、好ましくは異質の相分析であり、プライマーまたは標的分子を固体相に固定する。

【００８５】

近年では、ＤＮＡにおいて多型サイトの分析のためのいくつかのプライマーによって誘導されたヌクレオチドの組込方法を記載した（Ｋｏｍｈｅｒ， Ｊ． Ｓ． ｅｔ ａｌ．， Ｎｕｃｌ． Ａｃｉｄｓ． Ｒｅｓ．１７：７７７９－７７８４（１９８９）； Ｓｏｋｏｌｏｖ， Ｂ． Ｐ．， Ｎｕｃｌ． Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：３６７１（１９９０）； Ｓｙｖａｎｅｎ， Ａ．－Ｃ， ｅｔ ａｌ．， Ｇｅｎｏｍｉｃｓ８：６８４－６９２（１９９０）； Ｋｕｐｐｕｓｗａｍｙ， Ｍ． Ｎ． ｅｔ ａｌ．， Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． （Ｕ．Ｓ．Ａ．）８８：１１４３－１１４７（１９９１）； Ｐｒｅｚａｎｔ， Ｔ． Ｒ． ｅｔ ａｌ．， Ｈｕｍ． Ｍｕｔａｔ． １：１５９－１６４（１９９２）； Ｕｇｏｚｚｏｌｉ， Ｌ． ｅｔ ａｌ．， ＧＡＴＡ ９：１０７－１１２（１９９２）； Ｎｙｒｅｎ， Ｐ． ｅｔ ａｌ．， Ａｎａｌ． Ｂｉｏｃｈｅｍ． ２０８：１７１－１７５（１９９３）。これらの方法は、これら全てがラベルされたデオキシヌクレオチドの組み合わせに依存して、多型サイトで塩基間を区別する点でＧＢＡ^{ＴＭ}と異なる。このようなフォーマットにおい

て、シグナルは組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同じヌクレオチドの流れを生じる多型は、流れの長さと比例するシグナルを生じることができる（Ｓｙｖａｎｅｎ，　Ａ．　－Ｃ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｍｅｒ．　Ｊ．　Ｈｕｍ．　Ｇｅｎｅｔ．５２：４６－５９（１９９３））。

【００８６】

タンパク質翻訳の早い終結を引き起こす突然変異体に関して、プロテイントランケーションテスト（ＰＴＴ）は、効率的な診断方法を提供する（Ｒｏｅｓｔ，　ｅｔ．　ａｌ．，　（１９９３）　Ｈｕｍ．　ＭｏＩ　Ｇｅｎｅｔ．　２：１７１９－２１；　ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｌｕｉｊｔ，　ｅｔ．　ａｌ．，　（１９９４）　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　２０：１－４）。ＰＴＴに関して、ＲＮＡは利用可能な組織から最初に分離、逆転写され、関連する断片をＰＣＲによって増幅された。その後、逆転写ＰＣＲの生成物を、ネステッドＰＣＲ増幅により、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含有するプライマーおよび真核生物の翻訳を開始する配列と共に使用された。関連領域の増幅後、プライマー内に組み込まれた固有のモチーフは、一連の生体外におけるＰＣＲ産物の転写および翻訳を可能にする。翻訳の生産物のドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、短縮型ポリペプチドの出現は、翻訳の早い終結の原因となる突然変異の存在を示す。この技術の多様化において、ＤＮＡ（ＲＮＡに対して）を、関連のある標的領域が単一のエクソンに由来するとき、ＰＣＲの鋳型として使用する。

【００８７】

あらゆる細胞種または組織を利用して、本明細書に記載の診断における使用で核酸サンプルを得ることができる。好ましい実施形態において、ＤＮＡサンプルを、既知の技術（例えば、静脈穿刺）によって得られる体液、例えば血液または唾液から得る。選択的に、核酸試験を乾式サンプルで実施することができる（例えば、髪の毛または皮膚）。ＲＮＡまたはタンパク質を使用するとき、用いることができる細胞または組織は、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子を発現する必要がある。

【００８８】

診断法をまた、生検または切除から得られる患者の組織の（固定および／または凍結されている）組織断片で、核酸精製が全く必要とすることないようにその場にて直接実施することができる。核酸試薬を、プローブおよび／またはプライマーとして、前記その場の方法で使用することができる（例えば、Ｎｕｏｖｏ，　Ｇ．　Ｊ．，　１９９２，　ＰＣＲ　ｉｎ　ｓｉｔｕ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ：　ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ａｎｄ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，　Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎ．Ｙ．参照）。

【００８９】

一つの核酸配列の検出で主に焦点を合わせる方法に加えて、プロフィールをまたこのような検出方式において評価することができる。指紋プロフィールを、例えばディファレンシャルディスプレイ法、ノーザン分析および／またはＲＴ－ＰＣＲを利用することによって生成することができる。

【００９０】

好適な検出方法は、ＦＯＸＯ３Ａハプロタイプの少なくとも一つの対立遺伝子の重なり合った領域のプローブを使用し、約５、１０、２０、２５または３０ヌクレオチドを突然変異または多型の領域付近にて有する対立遺伝子特異的なハイブリダイゼーション形成である。本発明の好ましい実施形態において、他の対立遺伝子変異体に特異的にハイブリッド形成することができるいくつかのプローブが、固相担体、例えば「チップ」（最高約２５０，０００オリゴヌクレオチドを適用することができる）に付着される。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィーを含む様々な工程によって固体支持体に結合することができる。オリゴヌクレオチドを含有するこれらのチップを用いる突然変異検出分析は、また「ＤＮＡプローブアレイ」といい、例えばｉｎ　Ｃｒｏｎｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）　Ｈｕｍａｎ　Ｍｕｔａｔｉｏｎ７：２４４に記載される。一実施形態において、チップは遺伝子の多型領域の少なくとも１つの、全ての対立遺伝子変異体を含有する。その後固相担体を、テスト核酸と接触させ、特定のプローブに対するハイブリッド形成を検出する。

従って、一つ以上の遺伝子の多くの対立遺伝子の変異体の同定は、単純なハイブリッド実験で同定することができる。

【００９１】

これらの技術は、また核酸の増幅する工程を分析前に含有することができる。増幅技術は、当業者に知られ、クローニング、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、対立遺伝子特異的増幅法（ＡＳＡ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、自己持続型の核反応（Ｇｕａｔｅｌｌｉ，　Ｊ．　Ｃ．　ｅｔ　ａｌ．，　１９９０，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８７：１８７４－１８７８）、転写増幅システム（Ｋｗｏｈ，　Ｄ．　Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．，　１９８９，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８６：１１７３－１１７７）、およびＱβレプリカーゼを含有するが、これらに制限されない。

【００９２】

増幅産物は様々な方法によって検出することができ、これはサイズ分析、サイズ分析後の制限分解作用による切断、反応生成物の特異的タグを付けられたオリゴヌクレオチドプライマーの検出、対立遺伝子の特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）ハイブリッド形成、対立遺伝子の特異的５’エキソヌクレアーゼ検出、塩基配列決定、ハイブリッド形成等を含有する。

【００９３】

ＰＣＲに基づく検出手段は、同時に複数の標識の多重増幅を含有することができる。例えば、サイズにおいて重なり合わず、同時に分析することができるＰＣＲ産物を生成するＰＣＲプライマーを選択することは、よく知られた技術である。選択的に、特異的にラベルして、従ってそれぞれ特異的に検出することができるプライマーと、異なった標識を増幅することが可能である。当然、ハイブリッド形成に基づく検出方法は、複数のＰＣＲ産物の異なった検出をサンプルにおいて可能とする。他の技術では、複数の標識の多数の分析を可能にする従来技術で知られている。

【００９４】

単に例証となる実施形態において、前記方法は、（ｉ）細胞サンプルを患者（唾液、頬の内側の粘膜、血液、その他の体液または成分）から収集する工程と、（ｉｉ）核酸（ゲノム、ｍＲＮＡまたはその両方）をサンプルの細胞から分離する工程と、（ｉｉｉ）核酸サンプルと、ＦＯＸＯ３Ａハプロタイプの少なくとも１つの対立遺伝子の５’および３’に、対立遺伝子のハイブリッド形成および増幅を生じるような条件下において、特異的にハイブリッド形成する一つ以上のプライマーを接触させる工程と、（ｉｖ）増幅産物を検出する工程とを含有する。これらの検出方法は、このような分子が比較的低い数で存在する場合、核酸分子の検出に特に実用的である。

【００９５】

対象となる分析の好ましい実施形態において、ＦＯＸＯ３Ａハプロタイプの対立遺伝子を、制限酵素切断パターンにおける変化によって同定する。例えば、サンプルおよびコントロールのＤＮＡを分離し、（任意に）増幅し、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼで切断し、断片の長さのサイズを、ゲル電気泳動によって決定する。

【００９６】

さらにもう一つの実施形態において、従来技術で知られる様々な塩基配列決定反応のいずれかを、対立遺伝子配列に直接使用することができる。例示的な塩基配列決定反応は、Ｍａｘｉｍ　ａｎｄ　Ｇｉｌｂｅｒｔ　（（１９７７）　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ７４：５６０）　ｏｒ　Ｓａｎｇｅｒ　（Ｓａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ　（１９７７）　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　７４：５４６３）によって開発された技術に基づくものを含有する。自動塩基配列決定の様々な方法のいずれかは、質量分析による塩基配列決定を含有する（例えば、国際公開第９４／１６１０１号参考；Ｃｏｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ａｄｖ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ３６：１２７－１６２；およびＧｒｉｆｆｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ａｐｐｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ３８：１４７－１５９）対象分析（例えば、Ｂｉｏｔｅｃｈ

ｎｉｑｕｅｓ（１９９５）１９：４４８参考）を実行するときに、使用することができることを、同様に予測される。特定の実施形態で、１、２または３の核酸塩基のみの発生を、配列反応において決定擦る必要があることが、当業者に明らかであるだろう。例えば、Ａトラック等を、１つの核酸のみを検出する場合に、実施することができる。

【００９７】

更なる実施形態において、切断剤からの保護を使用して、ＲＮＡ／ＲＮＡ、ＲＮＡ／ＤＮＡまたはＤＮＡ／ＤＮＡのヘテロ２本鎖に基づくミスマッチ塩基を検出することができる（Ｍｙｅｒｓ，　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３０：１２４２）。一般的に、従来技術の「ミスマッチ切断」は、野生型対立遺伝子をサンプルに含む（ラベルされた）ＲＮＡまたはＤＮＡにハイブリッド形成することによって、ヘテロ二本鎖の形成を提供することによって開始する。二本鎖デュプレックスを、例えばコントロールおよびサンプル鎖の間の塩基対ミスマッチのために存在するデュプレックスの一本鎖領域を切断する薬剤で処理する。例えば、ＲＮＡ／ＤＮＡデュプレックスを、ＳＩヌクレアーゼで処理してミスマッチ領域を酵素で切断するＲＮａｓｅおよびＤＮＡ／ＤＮＡハイブリッドで処理することができる。他の実施形態において、ＤＮＡ／ＤＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡデュプレックスのいずれかを、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムおよびピペリジンで処理して、ミスマッチ領域を切断することができる。その後ミスマッチ領域の切断後、結果として生じる物質を、サイズによって変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、突然変異サイトを断定する。例えば、Ｃｏｔｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ８５：４３９７；およびＳａｌｅｅｂａ　ｅｔ　ａｌ（１９９２）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：２８６－２９５参考。好ましい実施形態において、コントロールＤＮＡまたはＲＮＡを、検出のためにラベルすることができる。

【００９８】

さらに別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、ミスマッチ塩基対を二重鎖ＤＮＡにて認識する１つ以上のタンパク質（「ＤＮＡミスマッチ修復」酵素と称す）を使用する。例えば、大腸菌のｍｕｔＹ酵素は、ＡをＧ／Ａミスマッチで切断し、ＨｅＬａ細胞からチミジンＤＮＡグリコシラーゼはＴをＧ／Ｔミスマッチで切断する（Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ　１５：１６５７－１６６２）。例示的実施形態の記載のように、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子座ハプロタイプの対立遺伝子に基づくプローブは、テスト細胞からｃＤＮＡまたは他のＤＮＡ産物にハイブリッドを形成する。デュプレックスを、ＤＮＡミスマッチ修復酵素で処理し、切断生成物は、必要である場合、それを電気泳動プロトコール等から検出することができる。例えば、米国特許第５，４５９，０３９号明細書を参照とし、本明細書において、完全に引用したものとする。

【００９９】

他の実施形態において、電気泳動移動度の違いを使用して、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子座の対立遺伝子を同定するだろう。例えば、一本鎖高次構造多型（ＳＳＣＰ）を使用して、電気泳動移動度における、突然変異体および野生型核酸の間の相違を検出することができる（Ｏｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ８６：２７６６、またＣｏｔｔｏｎ（１９９３）Ｍｕｔａｔ　Ｒｅｓ２８５：１２５－１４４参考；　ａｎｄ　Ｈａｙａｓｈｉ（１９９２）Ｇｅｎｅｔ　Ａｎａｌ　Ｔｅｃｈ　Ａｐｐｌ９：７３－７９）。サンプルおよびコントロールＦＯＸＯ３Ａ遺伝子座の対立遺伝子の一本鎖ＤＮＡ断片を、変性し、復元を可能にした。一本鎖核酸の２次構造は、配列により異なり、電気泳動移動度における結果として生じる変性は、一塩基の変化さえ検出することが可能である。ＤＮＡ断片を、ラベルされたプローブで、ラベルするか検出することができる。分析の感度はＲＮＡを使用することによって向上することができ、２次構造が、配列の変異に比較的感度がある。好ましい実施形態において、対象となる方法は、ヘテロ二本鎖分析を利用して、電気泳動移動度の変化に基づいて、二重鎖ヘテロ二本鎖分子を分離する（Ｋｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ７：５）。

【０１００】
　さらにもう一つの実施形態において、変性剤の濃度勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける対立遺伝子の変動を、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（ＤＧＧＥ）を使用して分析した（Ｍｙｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ３１３：４９５）。ＤＧＧＥを分析方法として使用するとき、ＤＮＡはそれが例えばＰＣＲで高い融解のＧＣに富んだＤＮＡの約４０ｂｐのＧＣクランプを添加することによって完全に変性しないことを確実にするために修飾するだろう。更なる実施形態において、温度勾配を、変性剤の勾配の代わりに使用して、対象およびサンプルのＤＮＡの移動度における相違を同定することができる（Ｒｏｓｅｎｂａｕｍ　ａｎｄ　Ｒｅｉｓｓｎｅｒ（１９８７）Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｃｈｅｍ２６５：１２７５３）。

【０１０１】
　対立遺伝子の検出する他の技術の例は、選択的なオリゴヌクレオチドハイブリッド形成、選択的な増幅または選択的なプライマー伸長を含有するが、これらに制限されない。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーを、既知の突然変異またはヌクレオチド（例えば、対立遺伝子変異体）の相違を中央に配置し、その後、完全に一致を発見するときのみにハイブリッド形成を可能にする状態で標的ＤＮＡにハイブリッド形成することで調整することができる（Ｓａｉｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２４：１６３）；Ｓａｉｋｉ　ｅｔ　ａｌ（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８６：６２３０）。このような対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドのハイブリッド形成技術を使用して、オリゴヌクレオチドが、ＰＣＲ増幅された標的ＤＮＡにハイブリッド形成したとき１つの突然変異または多型態領域について１つの反応を、またはオリゴヌクレオチドが、ハイブリッド膜に付着し、ラベルされた標的ＤＮＡにハイブリッド形成したとき数々の異なった突然変異または多型体の領域を試験する。

【０１０２】
　選択的に、対立遺伝子特異的な増幅技術は、選択的なＰＣＲ増幅に依存し、本発明と共に使用することができる。特異的な増幅のために使用されるオリゴヌクオチドは、（増幅が異なったハイブリッド形成に依存するために）分子の中心における関連のある突然変異または多型領域（Ｇｉｂｂｓ　ｅｔ　ａｌ　（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１７：２４３７－２４４８）、または適切な条件に基づいて、ミスマッチがポリメラーゼの伸長を防止または減少することができる場合に１つのプライマーの３’の最終末端で担持することができる（Ｐｒｏｓｓｎｅｒ（１９９３）Ｔｉｂｔｅｃｈ１１：２３８）。さらに、新規な制限酵素サイトを突然変異の領域に導入して切断に基づく検出を生成することが望ましい（Ｇａｓｐａｒｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ（１９９２）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｂｅｓ６：１）。特定の実施形態において、増幅が同様に増幅でＴａｑリガーゼを使用して実施することができることが予想される（Ｂａｒａｎｙ（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ８８：１８９）。そのような場合、ライゲーションは、完全な一致が、５’配列の３’末端に存在し、増幅の有無を調べることによって、特定のサイトにて既知の突然変異の存在を検出することが可能となる場合のみに生じる。

【０１０３】
　他の実施形態において、対立遺伝子変異体の同定を、例えば米国特許第４，９９８，６１７号明細書およびＬａｎｄｅｇｒｅｎ，Ｕ．ｅｔ　ａｌ．（（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４１　：１０７７－１０８０）に記載されたように、オリゴヌクレオチドのライゲーション分析（ＯＬＡ）を使用して実施する。ＯＬＡプロトコールは、標的の一本鎖の接触配列にハイブリッド形成することができるように設計される２つのオリゴヌクレオチドを使用する。オリゴヌクレオチドの１つは、分離標識、例えばビオチン化で結合し、他は検出が可能なようにラベルされる。正確な相補的配列が、標的分子に見出す場合、オリゴヌクレオチドが、それらの末端が隣接するようにハイブリッドを形成し、ライゲーション基質を生成する。その後ライゲーションは、ラベルされたオリゴヌクレオチドがアビジンまたは他のビオチンリガンドを使用して回復されることを可能にする。Ｎｉｃｋｅ

ｒｓｏｎ，　Ｄ．　Ａ．　ｅｔ　ａｌ．は、ＰＣＲおよびＯＬＡの性質を組み合わせる核酸検出分析を記載する（Ｎｉｃｋｅｒｓｏｎ，　Ｄ．　Ａ．　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ８７：８９２３－２７）。この方法において、ＰＣＲを使用して、標的ＤＮＡの指数関数的増幅を達成し、その後ＯＬＡを用いて検出される。

【０１０４】

このＯＬＡ方法に基づくいくつかの技術が開発され、ＦＯＸＯ３ａ遺伝子座ハプロタイプの対立遺伝子を検出するために使用することができる。例えば、米国特許第５，５９３，８２６号明細書は、３’アミノ基を有するオリゴヌクレオチドおよび５’リン酸化オリゴヌクレオチドを使用して、アミド亜リン酸エステル結合を有する結合体を形成するＯＬＡを開示する。Ｔｏｂｅ　ｅｔ　ａｌ．（（１９９６）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ２４：３７２８）に記載のＯＬＡの他の変異体において、ＰＣＲと組み合わせたＯＬＡは、２つの対立遺伝子の分類化を、一つのマイクロタイターウェルにて可能にする。それぞれの対立遺伝子を固有のハプテン、即ちジゴキシゲニンおよびフルオレセインでマークすることによって、それぞれのＯＬＡ反応を、異なった酵素レポーター、アルカリホスファターゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼでラベルされたハプテン特異的な抗体を使用することによって検出することができる。このシステムは、２つの異なる色の製造を導くハイスループットフォーマットを使用する２つの対立遺伝子の検出を可能にする。

【０１０５】

本発明の他の実施形態は、近い将来における長命の可能性、または健康または診断の介入の必要性を検出するためのキットを対象とする。このキットは、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子座のハプロタイプの少なくとも１つの対立遺伝子に５’および３’をハイブリッド形成する５’および３’オリゴヌクレオチドを含む、一つ以上のオリゴヌクレオチドを含有することができる。ＰＣＲ増幅オリゴヌクレオチドは、その後の分析で適切なサイズのＰＣＲ産物を生成するために、２５から２５００の独自の塩基対の間、好ましくは約１００から５００の独自の塩基とハイブリッドを形成する必要がある。

【０１０６】

特に好ましいプライマーは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．２～９に記載のヌクレオチド配列を含有する。これら遺伝子においてヒトの多型の検出のために適切なプライマーを、従来技術において既知であるこの配列情報および通常の技術を使用して、プライマー配列の設計および最適化のために容易に設計することができる。上記プライマー配列の最適な設計を、例えば、市販のプライマー選択プログラム、例えばＰｒｉｍｅｒ２．１、Ｐｒｉｍｅｒ３またはＧｅｎｅＦｉｓｈｅｒの使用によって達成することができる。

【０１０７】

「ＧＣＣハプロタイプ」の検出のための簡単な方法の例は、関連のある特異的なヌクレオチドを増幅し、段落[００８１]に記載のものと同様に対立遺伝子特異的なプライマーの使用を含む。この方法は、オリゴヌクレオチドプライマーが、それらの３’末端にて完全にアニールして、ＤＮＡポリメラーゼがこれらプライマーをＰＣＲ時に伸長する必要がある事実を利用する。特異的なＤＮＡの点相違のみと一致するオリゴヌクレオチドプライマーを設計することによって、ｒｓ２８０２２９２多型にて見られるようなものーＴ種対立遺伝子に結合しないプライマーーこのようなプライマーは多型体対立遺伝子と区別することができる。コントロール反応を（ＡＲＭＳ：ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ　ｍｕｔａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ）のような同じチューブ内で設定し、所定のサンプルからの生成物の生成の欠如が、分析を確かめる「Ｇ」変異体の欠損よりむしろ、ＰＣＲ反応の失敗によるように単純でないことを確実にすることが必要である。

【０１０８】

このために使用されるオリゴヌクレオチドは、フォワードアウター（「ｒｓ２８０２２９２＿ＦＯ」）で、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．５として同定される５’－ＧＡＡＡＣＴＧＡＧＧＣＴＡＡＣＡＧＣＴＧＧＧＴＣＴＧＧＣＣＣ－３’、リバースアウター（「ｒｓ２８０２２９２＿ＲＯ」）で、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．６として同定される５’－ＡＧＣＴＧＡＴ

ＧＣＴＣＣＴＣＡＡＣＧＡＡＡＣＣＡＣＣＴＴＡＣ－３’、リバースＧ特異的（「ｒｓ２８０２２９２＿ＲＧ」）で、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．７として同定される５’－ＧＧＡＣＣＣＣＴＴＣＡＴＣＴＧＴＣＡＣＡＣＡＧＡＧＧＣＴＣＣ－３’、フォワード特異的（「ｒｓ２８０２２９２＿ＦＴ」）で、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８として同定される５’－ＣＴＧＴＴＧＣＴＣＡＣＡＡＧＡＧＣＴＣＡＧＧＧＣＴＧＧＧｃＴ－３’を含み、最後の２つのプライマーにおいて、下線の引かれた末端塩基は、Ｇ－Ｔの相違のサイトでアニールし、３’末端から２番目のｂｐ（小文字）は、対立遺伝子の特異性を最大限にするために意図的にミスマッチされる。この例証における４つのプライマーを、表Ｎｏ．９に記載する。

【０１０９】

【表１１】

表９．rs2802292 G-T 多型を固定するためのプライマー

プライマー	配列
フォワードアウター “rs2802292_FO”	5'-GAAACTGAGGCTAACAGCTGGGTCTGGCCC-3'
リバースアウター “rs2802292_RO”	5'-AGCTGATGCTCCTCAACGAAACCACCTTAC-3'
リバースG 特異的 “rs2802292_RG”	5'-GGACCCCTTCATCTGTCACACAGAGGCTcC-3'
フォワードT 特異的 “rs2802292_FT”	5'-CTGTTGCTCACAAGAGCTCAGGGCTGGGcT-3'

表９は、出現の順において、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯＳ５～８を開示する。

【０１１０】

プライマーおよびＧ／Ｔ変異体を示すＰＣＲ産物のＤＮＡ配列（ソースＧｅｎｂａｎｋ　ＡＬ３９１６４６．１２）は、以下の通りである：

【０１１１】

SEQ ID No.9 として同定される

GAAACTGAGGCTAACAGCTGGGTCTGGCCCATGACTGGTTCAGTTGGTATTTGGT
GGACCAAGTTGACCAAGCTCACCCAGCTTCTGAGTGACAGAGTGAATATAAACC
CAGCCTGCTCACTCCATTTCCTAGTTTTCTCACCTCTACCAGGGTCT*CTGTTGCTCA*
*CAAGAGCTCAGGGCTGGGA(T/G)AAGCCTCTGTGTGACAGATGAAGGGGTCC*TGCTG
CTCTCTAGGGAAGAATCGGTCCCAAATTGCTCAAGGGAGTAAGGTGGTTTCGTTG
AGGAGCATCAGCT

【０１１２】

このように発生した増幅物をアガロースゲルで分離したとき、Ｇタイププライマーは１８６ｂｐ生成物を発生することを示すことができ、Ｔタイププライマーは１３２ｂｐ生成物を生じる。アウトサイドプライマーは、反応が正確に進んだことを保証するために、全

ての反応で存在すべき２８８ｂｐ生成物を生成する。

【０１１３】

例示的な、増幅の試薬および条件を、表１０に示す。

【０１１４】

【表１２】

表10. rs2802292 多型の同定のためのPCR条件

試薬	最終濃度	供給メーカー
AmpliTaq Gold PCR Buffer	1 X	Perkin-Elmer
dNTPs	200 μM	Perkin-Elmer
$MgCl_2$	1.5 mM	Perkin-Elmer
"rs2802292_FO"	1.0 μM	上記参照
"rs2802292_FI"	1.0 μM	上記参照
"rs2802292_RG"	0.5 μM	上記参照
"rs2802292_FT"	0.5 μM	上記参照
"AmpliTaq Gold"	0.6 U	Perkin-Elmer
ヒト DNA	5-10 ng/μL	
H_2O	容量まで	

PCR条件は、15分94℃の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃30秒の30サイクルの後、最終インキュベーション72℃7分。実施例の示された結果をMJ Researchモデル「PTC200」サーモサイクラーと実施した。

【０１１５】

増幅された断片は、図１に示すような３％アガロースゲルに分離することができる。図１はＡＲＭＳ－ＰＣＲ定量分析の結果を示し、上記のプライマーおよび条件を使用してＦＯＸＯ３Ａ　Ｇ／Ｔ変異体を検出する。レーン１は「Ｔ」対立遺伝子（１３２ｂｐ）の対象となる同型を示す；レーン２および３は、「Ｇ」対立遺伝子（１８６ｂｐ）に同型である対象を示す；レーン４および５は、「Ｔ」および「Ｇ」の対立遺伝子（１３２＋１８６ｂｐ）に異型である対象を示し、Ｍは１００ｂｐＤＮＡラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｐａｉｓｌｅｙ，　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）である。

【０１１６】

要約すると、図２は分析の模式的な概略を示す。プライマー「ｒｓ２８０２２９２＿ＦＯ」および「ｒｓ２８０２２９２＿ＲＯ」は、多型体遺伝子座ｒｓ２８０２２９２の隣接し、コントロール２８８ｂｐバンドを全ての場合にて発生する。プライマー「ｒｓ２８０２２９２＿ＯＦ」および「ｒｓ２８０２２９２＿ＲＧ」は、１８６ｂｐのＧ特異的生成物を発生し、プライマー「ｒｓ２８０２２９２＿ＦＴ」および「ｒｓ２８０２２９２＿ＯＲ」は、１３２ｂｐのＴ特異的生成物を発生する。

【０１１７】

キットの使用のために、オリゴヌクレオチドは様々な天然および／または合成の組成物のいずれか、例えば合成オリゴヌクレオチド、制限断片、ｃＤＮＡ、合成ペプチド核酸（ＰＮＡ）等であることができる。分析キットおよび方法は、同様にラベルされたオリゴヌクレオチドを使用して、分析において同定を容易にすることを可能にすることができる。用いることができるラベルの例は、放射性同位元素識別、酵素、蛍光化合物、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、磁性部位、金属結合部位、抗原または抗体の部位等を含

有する。

【０１１８】

キットは、任意に、またＤＮＡサンプリング試薬を含有することができる。ＤＮＡサンプリング試薬は当業者によく知られる一つであり、基質、例えば濾紙、ＡｍｐｌｉＣａｒｄ^{TM}（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄ，　Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄ，　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＳlＯ　２　Ｊ　Ｆ；　Ｔａｒｌｏｗ，　Ｊ　Ｗ，　ｅｔ　ａｌ，　Ｊ　ｏｆ　Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１０３：３８７－３８９（１９９４））等；ＤＮＡ精製試薬、例えばＮｕｃｌｅｏｎ^{TM}キット、リシスバッファー、タンパク質分解酵素溶液等；ＰＣＲ試薬、例えば反応バッファー、熱安定性ポリメラーゼ、ｄＮＴＰ等；および対立遺伝子検出試薬、例えばＨｉｎｆＩ制限酵素、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド、乾燥血痕からのネステッドＰＣＲのための縮重オリゴヌクレオチドプライマーを含有するが、これらに限定されない。

【０１１９】

Ｃ．薬理ゲノミクス

特定の対立遺伝子の知識は、特定の疾患または状態の進行する感受性と関連し、特定の疾患または状態に関与する他の遺伝子異常に関する情報と単独または組み合わせては、「薬理ゲノミクス」の目標である個々の遺伝子プロフィールに従う予防または治療のカスタム化を可能とする。従って、健康的な加齢で個々のＦＯＸＯ３Ａプロフィールと集団的プロフィールの比較は、特定の患者または患者集団で安全且つ効果的であると期待する薬物もしくは他の治療療法の選択または設計を可能とする（即ち、同じ遺伝子の変性を有する患者の一群）。

【０１２０】

本発明に記載の特定の対立遺伝子の知識を使用して、細胞の性質の違いを細胞培養および組織システムにて観測し、細胞または組織培養システムに添加された化学的または生物学的薬剤への細胞の反応を測定することができる。細胞性質および反応の相違点を遺伝子型間で比較して、健康を改善または寿命を延ばす要求のため実施することができる薬物または他の薬理的物質を同定するか、または遺伝子もしくは遺伝子発現で毒性または潜在的な効果で新規化合物を試験することができる。

【０１２１】

さらに標的集団に対する可能性は、最も高い臨床利点を示すことを期待して、遺伝子プロフィールに基づいて：１）既にマークされた薬物の再配置；２）臨床開発が安全性または効率性の制限の結果として中断され、患者のサブグループに特有である候補薬の救済；および３）候補治療および比較的最適な薬物のラベリングで、急速な、比較的費用が高くない開発を可能とすることができる（すなわち、薬剤の様々な服用量の効果を、原因となる突然変異で測定することは、有効量の最適化に実用的である）。

【０１２２】

特定の治療薬で個々の治療は、長寿と関連のある遺伝子の発現レベルを測定することによって観測することができる。発現レベルを、タンパク質（例えば、ＦＯＸＯ３Ａ）、ｍＲＮＡおよび／または転写レベルを同定することによって、測定することができる。その後検出されるレベルに依存して、治療療法を、維持または調整することができる（増幅量を増加または減少）。好ましい実施形態において、対象を薬剤で治療する効果は以下の工程を含有する：（ｉ）薬剤を投与する前に前投与サンプルを対象から得る；（ｉｉ）タンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡのレベルまたは量を前投与サンプルにおいて検出する；（ｉｉｉ）治療薬の投与後、１つ以上の投与後のサンプルを対象から得る；（ｉｖ）タンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを、投与後のサンプルにおいて検出する；（ｖ）前投与サンプルにおけるタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルと、投与後のサンプルにおける対応するタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡを、それぞれ比較する；（ｉｖ）薬剤の投与を対象に応じて変更する。

【０１２３】

対象の細胞をまた、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子以外の遺伝子発現のレベルを検出するため治療的の投与前後で得て、治療が有害である可能性がある遺伝子の発現を増加または減少しないことを確認することができる。これは、例えば転写プロファイルの方法を使用して実施することができる。従って、生体内において治療に露出された細胞からのｍＲＮＡ、治療に露出されていない同じ種類の細胞のｍＲＮＡは、逆転写され、多くの遺伝子からのＤＮＡを含むチップにハイブリッド形成することができ、この結果、治療で処理または未処理の細胞の遺伝子の発現を比較する。

【０１２４】

「ＧＣＣ」ハプロタイプを、危険率の算出において、死亡および年齢に関連する疾患（心臓病、脳卒中、癌、ＣＯＰＤまたはその他慢性の肺疾患、パーキンソン病、糖尿病および認知症）および将来的な身体機能（歩行能力、認識機能）の予測の補助に使用することができる。この情報は、市民、医師、健康管理会社および保険会社にとって関心があるものである。既知の危険性算出の例は、Ｐｅｒｌｓ、米国特許出願公開第２００７／０１１８３９８Ａ１号明細書、２００７年5月２４日に公開されたシステムおよび方法を含有し、本明細書において完全に引用する。危険率の算出を、例えば医師局にて、携帯端末またはオンラインにて提供することができる。人がどれくらい生存するかを予想するのに興味がある個人、健康介護専門家、保険会社、健康管理組織は、コンピューターに男／女の遺伝子型を入力して、老化関連の疾患の危険性のスコア、健康的な残余寿命の年数および残余寿命の合計年数を得ることができる。

【０１２５】

特定のスコアに基づいて、医師または保険専門家は、上記疾患および死亡、特にＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の比較的保護的でない変異を有するヒトで、健康的な生活または危険性の減少に関して、患者に知らせることができる。いくつかの例示的な選択肢は、食物の選択（例えば、赤ワイン、大豆製品およびＦＯＸＯ３Ａ遺伝子の活性に影響を及ぼすことができる化合物を含む他の食品）、または強い危険性要因の改善、例えば体重減少または増加の身体活性に関するアドバイスを含む。

【０１２６】

ＦＯＸＯ３Ａおよび特にＧＣＣハプロタイプの健康な老化および長寿の予測手段の同定は、実用的な生物学および標的の有望な情報源を、製薬のスクリーンおよび試験に提供する。例えば、一つは、ＦＯＸＯ３Ａ遺伝子によって年齢関連疾患を減少で予期される健康的利益のために産出される遺伝子産物またはタンパク質もしくは他の活性化合物を利用することができる。遺伝子産物を利用する方法は、製薬技術において知られている摂取、注射、経皮的投与および他の方法を含有する。化合物をスクリーンして、ＦＯＸＯ３Ａ、特にＧＣＣハプロタイプによって産出される遺伝子産物の種類、活性または量に影響するものを見つけることができる。

【０１２７】

本発明は、年齢関連性疾患の予防または治療するＦＯＸＯ３Ａの調製方法を含有する。本発明はまた、ＦＯＸＯ３Ａが例えば年齢に関連のある疾患または対象において寿命の向上と関連する疾患または状態を治療または予防する方法を含有する。本明細書において使用される「対象」とは、ヒトまたはヒトでない動物とする。「ヒトでない動物」という用語は、哺乳類、人間以外の霊長類（特に比較的高度な霊長類）のような全ての脊髄動物、ウマ、ウシ、バイソン、バッファロ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ニワトリ、カモおよびガチョウのような飼育哺乳類、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモットのようなペット、齧歯動物、爬虫類および実験動物を含有する。好ましい実施形態において、対象はヒトである。他の実施形態において、対象は、疾患モデルとして適切な実験動物または遺伝形質転換動物である。調整および治療の方法は、Ｇｅｅｓａｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．の２００７年5月１０日に公開された米国特許出願公開第２００７／０１０５１０９Ａl号明細書において当業者に知られ、完全に本明細書に引用する。

【０１２８】

本発明によって教示した対立遺伝子の変異体の配列または遺伝子産物の、多くの他の診

断および治療への使用は、当業者に明らかであるだろう。小分子スクリーン、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子二本鎖ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の使用を含有するいくつかの例が、当業者に明らかである。ＦＯＸＯ活性に関する診断および治療の使用を開発するいくつかの方法は、Ｇｏｌｄｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．の２００６年3月３０日に公開された米国特許出願公開第２００６／００６９０４９　Ａ１号明細書に記載され、関連する経路にはＴｉｓｓｅｎｂａｕｍ　ｅｔ　ａｌ．の２００６年１１月３０日に公開された米国特許出願公開第２００６／０２７２０３９号明細書に関係があり、共に完全に本明細書に引用する。

【０１２９】

前述の明細書を、当業者が本発明を実施することを可能にするため、充分であると考慮する。当業者は、単に通常の方法を用いて、多くの本発明の特定の実施形態と均等物を理解するか、または同定することができる。これら均等物は、添付の特許請求項に含有することを意図する。実際に、本明細書に示しまたは記載されるものに加えて本発明の様々な修正は、前述の記載から当業者に明らかになり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【０１３０】

本文に記載されていない参考文献

１．Ｈｅｒｓｋｉｎｄ AM ｅｔ ａｌ．（１９９６）．Ｔｈｅ ｈｅｒｉｔａｂｉｌｉｔｙ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｌｏｎｇｅｖｉｔｙ：ａ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ−ｂａｓｅｄ ｓｔｕｄｙ ｏｆ ２８７２ Ｄａｎｉｓｈ ｔｗｉｎ ｐａｉｒｓ ｂｏｒｎ １８７０−１９００．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ ９７：３１９−３２３．

２．Ｙａｓｈｉｎ AI，Ｉａｃｈｉｎｅ IA，Ｈａｒｒｉｓ JR（１９９９）Ｈａｌｆ ｏｆ ｖａｒｉａｔｉｏｎ ｉｎ ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ ｔｏ ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ｉｓ ｇｅｎｅｔｉｃ：ｆｉｎｄｉｎｇｓ ｆｒｏｍ Ｓｗｅｄｉｓｈ ｔｗｉｎ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｄａｔａ．Ｂｅｈａｖ Ｇｅｎｅｔ ２９：１１−１９．

３．Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ K，Ｊｏｈｎｓｏｎ TE，Ｖａｕｐｅｌ JW（２００６）Ｔｈｅ ｑｕｅｓｔ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｎｔｓ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｌｏｎｇｅｖｉｔｙ：ｃｈａｌｌｅｎｇｅｓ ａｎｄ ｉｎｓｉｇｈｔｓ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ ７：４３６−４４８．

４．Ｗｉｌｌｃｏｘ DC，Ｗｉｌｌｃｏｘ BJ，Ｈｓｕｅｈ WC，Ｓｕｚｕｋｉ M（２００６）Ｇｅｎｅｔｉｃ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｎｔｓ ｏｆ ｅｘｃｅｐｔｉｏｎａｌ ｈｕｍａｎ ｌｏｎｇｅｖｉｔｙ：ｉｎｓｉｇｈｔｓ ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｏｋｉｎａｗａ Ｃｅｎｔｅｎａｒｉａｎ Ｓｔｕｄｙ．ＡＧＥ ２８：３１３−３３２．

５．Ｂｉｓｈｏｐ NA，Ｇｕａｒｅｎｔｅ L（２００７）Ｇｅｎｅｔｉｃ ｌｉｎｋｓ ｂｅｔｗｅｅｎ ｄｉｅｔ ａｎｄ ｌｉｆｅｓｐａｎ：ｓｈａｒｅｄ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ｆｒｏｍ ｙｅａｓｔ ｔｏ ｈｕｍａｎｓ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ ８：８３５−８４４．

６．Ｒｉｓｃｈ N，Ｚｈａｎｇ H（１９９５）Ｅｘｔｒｅｍｅ ｄｉｓｃｏｒｄａｎｔ ｓｉｂ ｐａｉｒｓ ｆｏｒ ｍａｐｐｉｎｇ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ｔｒａｉｔ ｌｏｃｉ ｉｎ ｈｕｍａｎｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６８：１５８４−１５８９．

７．Ｇｕｎｄｍｕｎｄｓｓｏｎ H ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｌｏｎｇｅｖｉｔｙ ｉｎ Ｉｃｅｌａｎｄ．Ｅｕｒ Ｊ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ ８：７４３−７４９．

８．Ｋｅｒｂｅｒ RA，Ｏ′Ｂｒｉｅｎ E，Ｓｍｉｔｈ KR，Ｃａｗｔｈｏｎ RM（２００１）Ｆａｍｉｌｉａｌ ｅｘｃｅｓｓ ｌｏｎｇｅｖｉｔｙ ｉｎ Ｕｔａｈ ｇｅｎｅａｌｏｇｉｅｓ．Ｊ Ｇｅｒｏｎｔｏｌ Ａ Ｂｉｏｌ Ｓｃｉ ＭｅｄＳｃｉ ５６：Ｂ１３０−Ｂ１３９．

９．Ｐｅｒｌｓ TT ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｌｉｆｅ− ｌｏｎｇ ｓｕｓ

tained mortality advantage of siblings of centenarians. Proc Natl Acad Sci USA 99:8442−8447.
10. Willcox BJ, Willcox DC, He Q, Curb JD, Suzuki M (2006) Siblings of Okinawan centenarians exhibit lifelong mortality advantages. J Gerontol A Biol Med Sci 61:345− 354.
11. Partridge L (2007) Some highlights of research on aging with invertebrates, 2006−2007. Aging Cell 6:595−598.
12. Ghazi A, Henis−Korenblit S, Kenyon C (2007) Regulation of Caenorhabditis elegans lifespan by a proteasomal E3 ligase complex. Proc Natl Acad Sci USA 104:5947−5952.
13. Bartke A (2008) New findings in gene knockout, mutant and transgenic mice. Exp Gerontol 43:11 −14.
14. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C (1997) daf−16: An HNF−3/forkhead family member that can function to double the life−span of Caenorhabditis elegans. Science
278:1319−1322.
15. Brunet A et al. (2004) Stress−dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRTl deacetylase. Science 303:2011−2015.
16. Kenyon C, Murphy CT (2006) Enrichment of regulatory motifs upstream of predicted DAF−16 targets. Nat Genet 38:397−398.
17. van der Horst A, Burgering BM (2007) Stressing the role of FOXO proteins in lifespan and disease. Nat Rev MoI Cell Biol 8:440−450.
18. Russell SJ, Kahn CR (2007) Endocrine regulation of ageing. Nat Rev MoI Cell Biol 8:681−691.
19. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD (2006) The biochemistry of Sirtuins. Ann Rev Biochem 75:435−465.
20. Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir −2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. Nature 410:227−230.
21. Blvher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. Science

299:572−574.
22. Bartke A (2008) Impact of reduced insulin−like growth factor− 1 ／insulin signaling on aging in mammals: novel findings. Aging Cell 7:285−290.
23. White MF (2003) Insulin signaling in health and disease. Science 302:1710−1711. 24. Conover CA, Bale LK (2007) Loss of pregnancy −associated plasma protein A extends lifespan in mice. Aging Cell 6:727−729.
25. Curran SP, Ruvkun G (2007) Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability. PLoS Genet 3:e56.
26. Greer EL et al. (2007) An AMPK−FOXO pathway mediates the extension of lifespan induced by a novel method of dietary restriction in C. elegans. Curr Biol 17:1646− 1656.
27. Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L (2006) C. elegans SIR−2.1 interacts with 14−3−3 proteins to activate DAF−16 and extend life span. Cell 125:1165− 1177.
28. Boehm M, Slack F (2005) A developmental timing MicroRNA and its target regulate life span in C. elegans. Science 310:1954−1957.
29. Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C (2003) Regulation of aging and age−related disease by DAF−16 and heat−shock factor. Science 300:1142−1145.
30. Murphy CT (2006) The search for DAF−16／FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. Exp Gerontol 41 :910−921.
31. Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005) JNK extends lifespan and limits growth by
antagonizing cellular and organism −wide responses to insulin signaling. Cell 121 :115− 125.
32. Giannakou ME et al. (2007) Dynamics of the action of dFOXO on adult mortality in Drosophila. Aging Cell 6:429438.
33. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 11 :298−300.
34. Beckman KB, Ames BN (1998) The free

radical theory of aging matures. Physiol Rev 78:547−581.
35. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M (2007) Effects of antioxidant supplementation on the aging process. Clin Interv Aging 2:377−387.
36. Bonafe M et al. (2003) Polymorphic variants of IGF−I receptor and phosphoinositide 3− kinase genes affect IGF−I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. J Clin Endocrinol Metab 88:3299−3304.
37. Kojima et al. (2004) Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin−like growth factor 1 signaling pathways. Exp Gerontol 39:1595−1598.
38. Suh Y et al. (2008) Functionally significant insulin−like growth factor I receptor mutations in centenarians. Proc Natl Acad Sci USA 105:3438−3439.
39. Kuningas M et al. (2007) Haplotypes in the human FOXOIa and FOXO3a genes: impact on disease and mortality at old age. Eur J Hum Genet 15:294−301.
40. Lunetta KL et al. (2007) Genetic correlates of longevity and selected age−related phenotypes: a genome −wide association study in the Framingham Study. BMC Med Genet 8 Supple 1 : S13.
41. Nebel A et al. (2005) No association between microsomal triglyceride transfer protein (MTP) haplotype and longevity in humans. Proc Natl Acad Sci USA 102:7906−7909.
42. Arai Y et al. (2001) Serum insulin like growth factor 1 (IGF−I) in centenarians: implication of IGF− 1 as a turnover protein. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 56A:M79−M82.
43. Teng EL et al. (1994) The Cognitive Abilities Screening Instrument (CASI): a practical test for cross−cultural epidemiological studies of dementia. Int Psychogeriatr 6:45−58.
44. Willcox BJ et al. (2006) Midlife risk factors and survival in men. JAMA 296:2343−2350.

45. Kramarow E, Lubitz J, Lentzner H, Gorina Y (2007) Trends in the health of older Americans, 1970－2005. Health AfJ (Millwood) 26：1417－1425.
46. Evert J, Lawler E, Bogan H, Perls T (2003) Morbidity profiles of centenarians：survivors, delayers, and escapers. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 58：232－237.
47. Bernstein AM et al. (2004) First autopsy study of an Okinawan centenarian：absence of many age－related diseases. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 59：1195－ 1199.
48. Willcox DC et al. (2007) Aging gracefully：a retrospective analysis of functional status in Okinawan centenarians. Am J Geriatr Psychiatry 15：252－256.
49. Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, Perls TT (2004) Cardiovascular disease delay in centenarian offspring. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 59：385－389.
50. Rodriguez BL et al. (2002) The A.D.A and W.H.O. classifications for diabetes：their impact on diabetes prevalence and total and cardiovascular disease mortality in elderly Japanese －American men. Diabetes Care 25：951－955.
51. McNeely MJ, Boyko EJ (2004) Type 2 diabetes prevalence in Asian Americans：results of a national health survey. Diabetes Care 27：66－69.
52. Fujimoto WY et al. (1995) Susceptibility to development of central adiposity among populations. Obes Res 3Suppl2：179S－186S.
53. Examination Committee of Criteria for Obesity Disease′ in Japan, et al. (2002). New criteria for Obesity disease′ in Japan. Circ J 66：987－992.
54. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. Trends Endocrinol Metab 16：183－189.
55. Kops JG et al. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature 419：316－321.
56. Youngman LD, Park JY, Ames BN (1992) Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of pr

otein or calories. Proc Natl Acad Sci USA 89:9112- 9116.
57. Heilbronn LK et al. (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. JAMA 295:1539-1548.
58. Selman C et al. (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. FJffi´´5 J22:807-818.
59. Murphy CT et al. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans. Nature 424:277-283.
60. Kuningas M et al. (2007) SIRTl gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85- plus study. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 62:960-965.
61. Kagan A. Ed (1996) The Honolulu Heart Program: An Epidemiological Study of Coronary Heart Disease and Stroke (Harwood Academic Publishers, the Netherlands).
62. Worth RM, Kagan A (1970) Ascertainment of men of Japanese ancestry in Hawaii through World War II Selective Service registration. J Chronic Dis 23:389-397.
63. Rodriguez BL, Curb JD (1998) Cardiovascular risk factors in the elderly: the Honolulu Heart Program. Cardiovasc Risk Factors 8:99- 103.
64. White L, et al. (1996) Prevalence of dementia in Japanese- American men living in Hawaii: the Honolulu- Asia Aging Study. JAMA 276:955-960.
65. National Institutes of Health (NIH): U.S. Department of Health and Human Services, NIH, National Institute on Aging (2001) Report of the National Institute on Aging Advisory Panel on Exceptional Longevity (APEL). NIH Pub 01-4951 (NIH, Washington, DC).
66. Arias E (2006) United States life tables, 2003 (National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD), vol. 54, no. 14.
67. Nordyke EC, Lee R, Gardner RW (1984) A profile of Hawaii´s elderly populatio

n. Papers East W_1 est Popul Inst 91 :13−14.
68. Mehta C, Patel N (2001) StatXact 5 (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA).
69. SAS Institute, Inc. (1990) SAS／STAT user´s guide, version 6 (SAS Institute, Cary, NC).
70. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res. 2001 Jan 1;29(1):308−11.)

【図１】

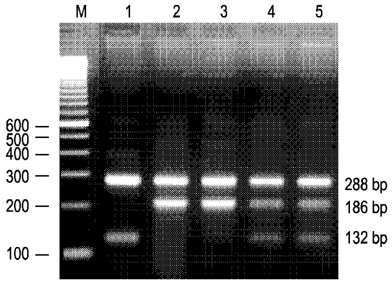

FIG. 1

【図２】

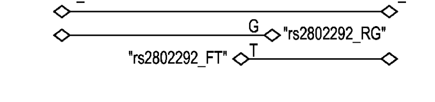

FIG. 2

【配列表】
0005814119000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　ティモシー　エイチソン　ドンロン
アメリカ合衆国　ハワイ州　９６８２１　ホノルル　ヘマ　プレイス　３５０
(72)発明者　ブラッドリー　ジョン　ウィルコックス
アメリカ合衆国　ハワイ州　９６８１３　ホノルル　プロスペクト　ストリート　８
(72)発明者　デイビット　ジェイ　カーブ
アメリカ合衆国　ハワイ州　９６８１７　ホノルル　エイチピーエム　ノース　クアキニ　ストリート　３４７

審査官　荒木　英則

(56)参考文献　特開２００８－１２０７２６（ＪＰ，Ａ）
Obesity,Vol.14,No.2(2006)p.188-193
Eur.J.Hum.Genet.,Vol.15(2007)p.294-301
Database dbSNP Short Genetic Variations [online],Submitted SNP(ss) Details: ss98422453, RefSNP(rs#): rs2802292,First entry to dbSNP: Mar.31,2008, Retrieved on Feb.14,2014, ＵＲＬ, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=98422453
Database dbSNP Short Genetic Variations [online],Submitted SNP(ss) Details: ss98422470, RefSNP(rs#): rs13217795,First entry to dbSNP: Mar.31,2008, Retrieved on Feb.14,2014, ＵＲＬ, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=98422470
Database dbSNP Short Genetic Variations [online],Submitted SNP(ss) Details: ss98422460, RefSNP(rs#): rs2764264,First entry to dbSNP: Mar.31,2008, Retrieved on Feb.14,2014, ＵＲＬ, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=98422460
BMC Med.Genet.,Vol.8(Suppl.1)(2007)S13
Annu.Rev.Med.,Vol.56(2005)p.193-212

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｑ　　１／００－　１／６８
Ｇ０１Ｎ　３３／００－３３／５３
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）

patsnap

专利名称(译)	使用FOXO 3A多态性和单倍型预测和促进健康衰老和长寿的方法		
公开(公告)号	JP5814119B2	公开(公告)日	2015-11-17
申请号	JP2011523071	申请日	2009-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	KUAKINI医仙		
申请(专利权)人(译)	Kuakini医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	Kuakini医疗中心		
[标]发明人	ティモシーエイチソンドンロン ブラッドリージョンウィルコックス デイビットジェイカーブ		
发明人	ティモシー エイチソン ドンロン ブラッドリー ジョン ウィルコックス デイビット ジェイ カーブ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6876 C12Q1/6883 C12Q2535/125 C12Q2600/106 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M C12N15/00.A		
代理人(译)	杉村健二 铃木 一寿		
优先权	61/087722 2008-08-10 US		
其他公开文献	JP2011530312A5 JP2011530312A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了与鉴定和使用来自FOXO3A基因的遗传信息有关的方法和组合物，其可用于确定和增加个体长寿的可能性并在衰老期间保持身体和认知功能，以及用于确定和降低个体的可能性。发展心血管，代谢或年龄相关疾病，包括冠状动脉（心脏）疾病，中风，癌症，慢性肺病，糖尿病，帕金森病和痴呆症。

(21)出願番号 特願2011-523071 (P2011-523071)
(86)(22)出願日 平成21年8月10日 (2009.8.10)
(65)公表番号 特表2011-530312 (P2011-530312A)
(43)公表日 平成23年12月22日 (2011.12.22)
(86)国際出願番号 PCT/US2009/053307
(87)国際公開番号 WO2010/019519
(87)国際公開日 平成22年2月18日 (2010.2.18)
審査請求日 平成24年8月9日 (2012.8.9)
(31)優先権主張番号 61/087,722
(32)優先日 平成20年8月10日 (2008.8.10)
(33)優先権主張国 米国 (US)

(73)特許権者 511036015
クアキニ メディカル センター
KUAKINI MEDICAL CENTER
アメリカ合衆国 ハワイ州 96817
ホノルル ノース クアキニ ストリート 347
(74)代理人 100147485
弁理士 杉村 憲司
(74)代理人 100119530
弁理士 冨田 和幸
(74)代理人 100144266
弁理士 鈴木 一寿

最終頁に続く