

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09284

研究課題名（和文）メチル化DNAを指標とした体液特異的ジェノタイピング法の開発

研究課題名（英文）Development of a DNA methylation-based body fluid-specific genotyping method

研究代表者

渡邊 賢（Watanabe, Ken）

科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官

研究者番号：20532047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、精液や血液といった体液種特異的にメチル化（あるいは脱メチル化）されるCpGとDNA多型部位が近接している領域を用いた、体液種特異的ジェノタイピング法の確立を目指した。まず、網羅的メチル化解析のデータから、精液、血液、唾液特異的ジェノタイピングに用いる候補領域を多数同定した。さらに、候補領域の一部について、実際の混合体液試料でメチル化状態及び近傍のSNP部位を同時検出することで、各体液特異的ジェノタイピングが可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

混合体液試料が現場資料として多く得られる一方で、これらを分離して各体液のDNA型のみ検査する方法については、物理的に互いの分離が可能な一部の混合体液試料を除いては、実務において有効な検査法はほとんど確立されていない。DNAの状態で混合しているものから、個別の体液DNAを検出する本検査法は、資料の陳旧化によって、物理的分離が困難な場合においても適用可能と考えられ、極めて有効なアプローチとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a body fluid type-specific genotyping method using each body fluid-specifically (un)methylated CpGs and their neighboring SNPs. We first identified various candidate regions for semen-, blood-, or saliva-specific genotyping using the genome-wide methylation data. We finally demonstrated that the simultaneous detection of methylation status and SNPs in several candidate regions could identify each body fluid-specific SNP type from body fluid mixture samples.

研究分野：法生物学

キーワード：物体検査 人体液斑の同定 DNAメチル化 DNA多型

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

事件現場から採取された体液資料に対しては、通常、犯罪事実を裏付ける目的で体液種識別検査が行われる。近年、新たな検査法として、組織特異的な DNA メチル化領域を指標とした、体液種識別法の確立が試みられている。この方法では、血液、精液、唾液、膣液といった体液種で特異的なメチル化パターン傾向を示す CpG サイト（脊椎動物で DNA メチル化が起きるシトシンとグアニンが隣り合う場所）について、それぞれのメチル化率を定量解析することで、資料の体液種の識別を行う。我々も、本検査法の実務導入を目指し、精液及び血液特異的マーカーの検証を行い、その有用性を確認してきた。その中で、血液特異的メチル化サイト cg06379435 について、近傍の一塩基多型 (SNP) 部位である rs7359943 のアリルの違い (A/G) を元に、混合試料からアリル特異的な血液証明が可能であることを示した。このように、体液種特異的メチル化サイトの近傍に DNA 多型部位がある場合、混合試料の解析時に有用な情報となり、他の体液検査法にはない、DNA メチル化を指標とした検査法のメリットの一つと考えられた。

### 2. 研究の目的

我々は、この体液特異的メチル化マーカーと近傍の DNA 多型部位を組み合わせるアプローチについて、より体液種特異性の高いメチル化領域を用いることで、混合体液 DNA から体液種特異的ジェノタイピングにも応用できる可能性があると考えた (図 1 参照)。

精液特異的メチル化サイト 多型部位

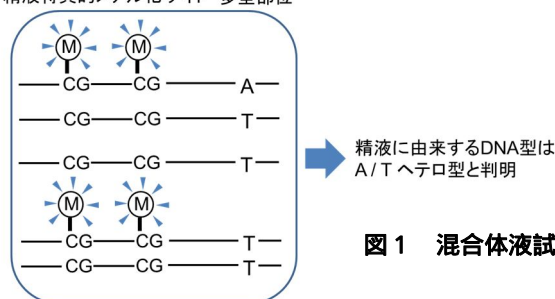


図 1 混合体液試料からの体液特異的 DNA 型検査のイメージ図

混合体液試料が現場から多く得られる一方で、これらを分離して DNA 型検査をする方法については、物理的に互いを分離可能な混合体液試料を除いては、これまでのところ、有効な検査法はほとんど報告されておらず、本検査法が確立されれば、極めて有効なアプローチとなることが期待できる。しかしながら、体液特異性が高く、かつ近傍に有効な DNA 多型部位が存在する領域はほとんど報告されておらず、個人識別能力の高い検査法とするには、さらなるマーカー領域の探索が必須であった。そこで、本研究では、網羅的メチル化解析によるマーカー領域の同定を行い、混合体液 DNA から各体液特異的ジェノタイピング法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 精液特異的ジェノタイピング法の検討

報告されていた CpG マーカーの中で、精液に特異的なメチル化サイトは、数も多くいずれも特異性が極めて高かったことから、本コンセプトの実現可能性が高いと考えられたため、まず、精液特異的ジェノタイピング法の検討から行った。スクリーニングのため、NCBIGEO に登録されていた、Human Methylation 450 (イルミナ) で各種体液由来 DNA について網羅的メチル化解析を行ったデータセット (GSE59509) を用いた。このデータを解析し、Human Methylation450 搭載の約 48 万 CpG の中から、精液でほぼ完全にメチル化、精液以外でほぼ完全に脱メチル化、あるいは精液でほぼ完全に脱メチル化、精液以外でほぼ完全にメチル化している CpG サイトを探索した。さらに、これらの中から、NCBI dbSNP における Minor Allele Frequency (MAF) 値が 0.2 以上となる SNP が近傍に存在する CpG を探索した。

同定した候補の中から、5 つの CpG を選択し、周辺の約 200bp の領域に含まれる CpG について、実際に精液特異的なメチル化状態が観察されるか、検証を行った。精液特異性の検証のため、各種体液 DNA について、PyroMarkQ24 Advanced を用いたパイロシーケンスによりメチル化率の定量を行った。

さらに、5 つの候補領域の中で、特に精液特異性が高かった 3 領域について、Methylation-Specific PCR (MSP) とパイロシーケンスを組み合わせた検出系により、混合試料からの精液特異的 SNP タイピングが可能か、検証を行った。

#### (2) 血液及び唾液特異的ジェノタイピング法の検討

精液以外の体液種については、報告されていたメチル化マーカーの数は少なく、より網羅性の高いスクリーニングを行う必要があると考えられた。そこで、Human Methylation 450 の後継キ

ットである Infinium Methylation EPIC を用いて、血液、精液、唾液、膣液のプール化 DNA 試料について、約 90 万か所の CpG におけるメチル化率の解析を行った。このデータから、血液または唾液において 30%以上のメチル化率、血液または唾液以外の 3 種の体液種において、10%以下のメチル化率を示す、血液及び唾液特異的メチル化 CpG を探索した。唾液については、唾液で 70%以下のメチル化率、唾液以外の体液種で 90%以上のメチル化となる、唾液特異的脱メチル化 CpG の探索も行った。さらに同定した候補 CpG の中から、近傍に MAF 値 0.2 以上の SNP が存在する CpG を探索した。

同定した候補の中から、血液特異的な 5 つの CpG、唾液特異的な 4 つの CpG を選択し、周辺の約 300bp の領域に含まれる CpG について、実際に特異的なメチル化状態が観察されるか、次世代シーケンス (MiSeq) を用いた Targeted Bisulfite Sequencing (TBS)によるメチル化定量解析を行った。

最後に、これらの領域を用いた血液または唾液特異的 SNP タイピングが可能か、混合体液 DNA を用いて、次世代シーケンスによる TBS を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 精液特異的ジェノタイピング法の検討

スクリーニングの結果、100 以上の CpG が候補として得られた。そのうちの 5 か所の CpG の周辺領域について、精液、血液、唾液、膣液 DNA 各 5-6 検体を用いて、パイロシーケンスによるメチル化定量解析を行った。その結果、2 領域における精液特異的脱メチル化、3 領域における精液特異的なメチル化が観察され、網羅的メチル化解析と矛盾の無い結果となった。

続いて、精液特異的ジェノタイピングを行うため、より特異性の高かった精液特異的脱メチル化 2 領域、精液特異的メチル化 1 領域について、MSP とパイロシーケンスを組み合わせた解析法を確立した。この方法は、精液 DNA 特異的なメチル化 (あるいは脱メチル化) を検出するプライマーで SNP 部位を含めて増幅後、パイロシーケンスによる SNP 解析を行うものであり (図 2)、混合体液資料から精液 DNA の SNP を選択的に解析することが可能となる。

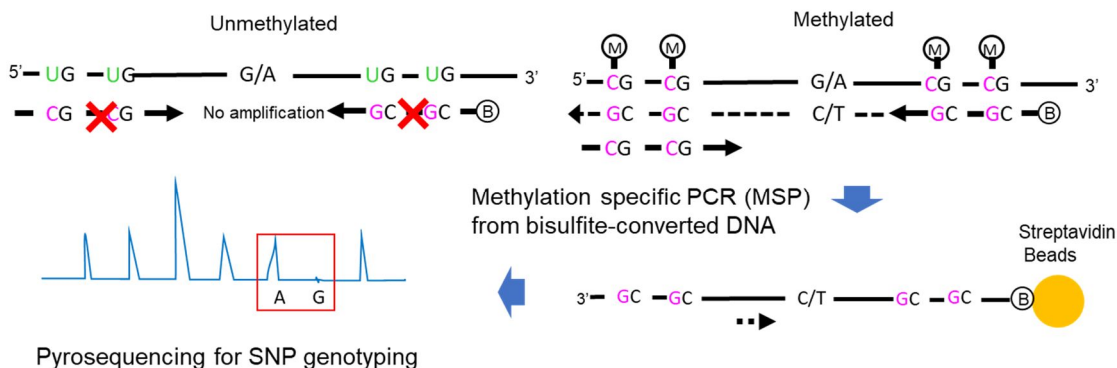


図 2 MSP-Pyrosequencing 法による精液特異的 SNP 検出

さらに、精液 DNA と血液 DNA の 1:1 混合溶液 (20ng) を調製し、3 領域について、本検査法を用いて解析を行った。その結果、いずれも精液 DNA 由来の SNP が正しく判定され、検出系の妥当性が確認された。

最後に、実際の体液混合斑痕に適用できることを示すため、精液・唾液混合溶液 (混合比 1:1 及び 1:4) を斑痕化したものを用意し、3 領域の解析を行った。その結果、いずれも精液試料由来の SNP が正しく判定され、実務への適用が可能であることが示唆された。

##### (2) 血液特異的ジェノタイピング法の検討

スクリーニングの結果、血液特異的ジェノタイピングの候補 CpG が 46 か所、唾液特異的ジェノタイピングの候補 CpG が 18 か所同定された。そのうちの 5 か所の血液特異的メチル化 CpG の周辺領域と、1 か所の唾液特異的メチル化 CpG の周辺領域、3 か所の唾液特異的脱メチル化 CpG の周辺領域について、血液、唾液、精液、膣液 DNA 各 9-12 検体を用いて、次世代シーケンスを用いた TBS によるメチル化定量解析を行った。その結果、唾液マーカー候補の 1 領域を除いて、おおよそ血液または唾液特異的なメチル化状態を示した。一方で、解析したほとんどの領域で、全ての CpG で特異的なメチル化状態を示したわけではなく、不均一なメチル化状態が確認された。MSP を行う場合、通常 Forward 及び Reverse 側で合わせて 4 個以上の CpG サイトが必要となるため、これらの領域を用いて血液及び唾液特異的ジェノタイピングを行う場合、精液と同様の MSP-Pyrosequencing 法による検出は困難であると考えられた。そこで、特異性の検証を行った次世代シーケンスによる TBS を用いて、血液及び唾液特異的ジェノタイピングを試みることにした (図 3)。

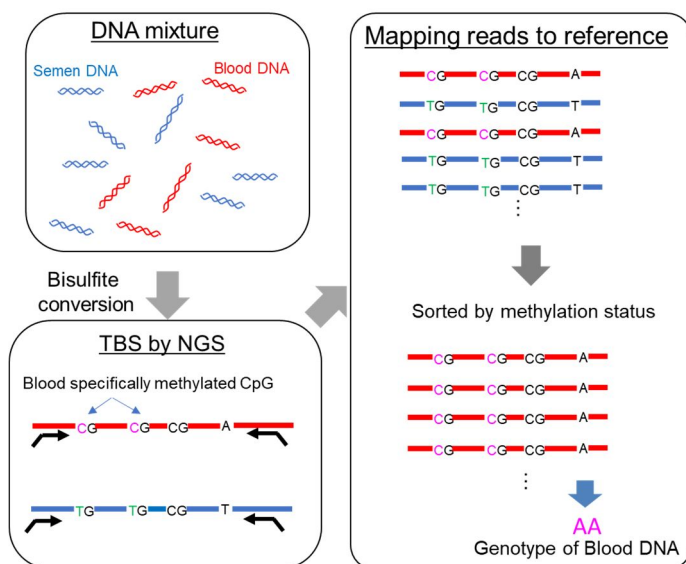


図3 Targeted bisulfite sequencing による  
血液特異的ジェノタイピング法

血液及び精液 DNA の 1:1 の混合試料ならびに唾液及び膣液 DNA の 1:1 の混合試料 20ng を調製し、血液 - 精液混合 DNA については、血液特異的ジェノタイピング用の 5 領域のうち特に特異性が高かった 3 領域、唾液 - 膣液混合 DNA については、唾液特異的 SNP タイピング用の 3 領域について、次世代シーケンスによる TBS を行った。さらに、血液あるいは唾液特異的なメチル化状態を示したリードのみ SNP アリルを解析したところ、いずれの領域についても、血液及び唾液由来の SNP タイプが推定可能であった。以上の結果から、これらの領域を用いることで、混合体液試料からの血液及び唾液特異的 SNP タイピングが可能であることが示唆された。

### (3) 本研究の総括

本研究の結果から、各体液に特異的なメチル化状態を示し、かつ DNA 多型部位が近傍に位置する部位を用いることで、混合体液試料から、物理的な分離を行うことなく、それぞれの体液由来 DNA のジェノタイピングが可能であることが示唆された。今回解析を行ったのは多くの候補領域の一部であり、さらに残された領域を検証し、高度マルチプレックス化することで、より個人識別精度の高い検査法とすることが可能であるものと考えられる。

一方で、各マーカー部位の特異性、特に血液あるいは唾液マーカーについて、標的体液種以外の一部の体液種サンプルにおいてわずかにメチル化(あるいは脱メチル化)が見られた。したがって、実際の混合比率未知の資料への適用に際しては、さらに注意深く検討をしていく必要があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Ken, Akutsu Tomoko	4. 巻 42
2. 論文標題 Evaluation of a co-extraction kit for mRNA, miRNA and DNA methylation-based body fluid identification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101630 ~ 101630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2019.101630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ken Watanabe, Kei Taniguchi, Tomoko Akutsu	4. 巻 37
2. 論文標題 Development of a DNA methylation-based semen-specific SNP typing method: A new approach for genotyping from a mixture of body fluids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Genetics	6. 最初と最後の頁 227 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsigen.2018.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡邊 賢、谷口 慶、阿久津智子
2. 発表標題 DNAメチル化部位を用いた体液混合血液試料からの血液特異的SNP解析法の検討
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken Watanabe, Kei Taniguchi, Tomoko Akutsu
2. 発表標題 Screening for CpG sites adjacent to common SNPs for blood-specific genotyping from mixed body fluid samples
3. 学会等名 The 28th Congress of International Society for Forensic Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Watanabe、Kei Taniguchi、Ayari Takamura、Tomoko Akutsu
2. 発表標題 Identification of CpG sites adjacent to common SNPs for semen-specific genotyping
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊賢、高村彩里、阿久津智子
2. 発表標題 MethyLight法によるDNAメチル化を指標とした精液及び血液証明法の検討
3. 学会等名 日本法科学技術学会第23回学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------