

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19477

研究課題名（和文）人工核酸LNAを用いた日本人集団における高感度メチル化解析と年齢推定への応用

研究課題名（英文）DNA methylation-based forensic age prediction in Japanese populations using locked nucleic acid.

研究代表者

磯崎 翔太郎（Isozaki, Shotaro）

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：60834504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔粘膜細胞から抽出したDNAのメチル化率を一塩基伸長反応を用いて測定することで、平均絶対偏差(MAD)=4.88歳の精度を有する日本人集団の法医学的年齢推定式を算出した。また、Primerに人工核酸LNAを導入することで感度を高めることに成功し、より高感度な年齢推定法を開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、微量な試料からのDNAメチル化率に基づく年齢推定法として法医実務へ利用可能である。また、次世代シーケンサーやパイロシーケンサーを必要とせず、コストパフォーマンスに優れた方法でありその有用性は高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the forensic age estimation method of the Japanese population by measuring the methylation rate of DNA using a single-base extension reaction. In addition, we succeeded in increasing the sensitivity by introducing Locked Nucleic Acid (LNA) into each primers.

研究分野：法医学

キーワード：Locked Nucleic Acid

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。

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト DNA 鑑定は、犯罪現場の遺留試料や身元不明死体の特定などに有効であり、反復配列 (STR) が用いられる。また、個人を特定する手法に加えて、塩基配列の違いに基づいた毛髪などの色の識別や、DNA のメチル化解析による年齢推定が注目されている (図 1)。このような分析は、血痕や精液斑などから該当者の絞り込みや排除に有用である。しかしながら、これらの研究は諸外国からの報告が多く、日本人集団を対象とした報告はきわめて少ない。

メチル化解析では、DNA のバイサルファイト処理と PCR 増幅が一般的であり、非メチル化シトシンをチミンへと変換する (図 2)。この原理に基づいた検出方法として、高解像度融解法や一塩基伸長反応などがあり、DNA メチル化率解析による年齢推定法が近年開発されてきた (Hong et al. Forensic Sci Int Genet 2017, Hamano et al. 2016 Legal Med)。しかしながら、これらの手法は検出感度が低い点が問題であった。

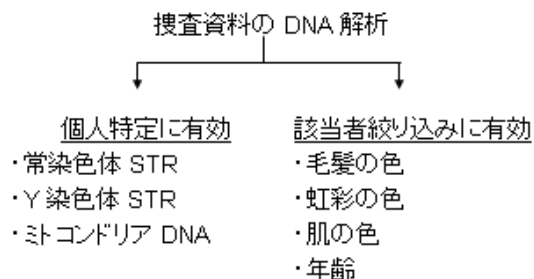


図 1 DNA 解析の種類

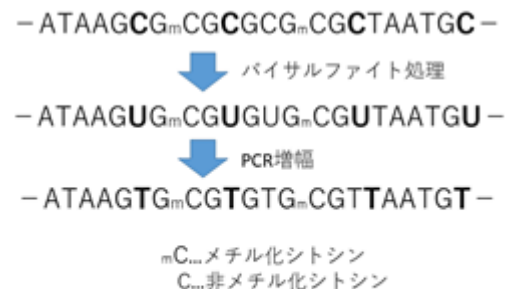


図 2: バイサルファイト処理による非メチル化シトシンの変化

### 2. 研究の目的

#### (1) 一塩基伸長反応を用いたメチル化解析による日本人集団の年齢推定

日本人集団の口腔内細胞から抽出した DNA をバイサルファイト処理し、一塩基伸長反応によりメチル化率を測定する。測定したメチル化率と試料の実年齢とを比較検討し、日本人集団における年齢推定法を開発する。

#### (2) LNA を用いた微量試料からの高感度メチル化解析法の開発

(1)の年齢推定法に対して、プライマー内の DNA を熱安定性に優れた LNA へと置換することで、微量 DNA からの年齢推定法を開発する。また、LNA 導入部位の違いや検出方法による影響を検討し、効果的な LNA 導入法を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 一塩基伸長反応を用いたメチル化解析による日本人集団の年齢推定

##### ①日本人集団からの DNA 抽出

旭川医科大学倫理委員会の承認を得た上で、70 名の日本人ボランティアの口腔粘膜から DNA を採取した。抽出には QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を製造元のプロトコールに従って使用した。抽出した DNA は Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。

##### ②Bisulfite 処理

①で抽出した DNA150ng を EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit (Qiagen) を用いて Bisulfite 処理を行った。処理後 Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 15 μL を用いて溶出した。

##### ③PCR 増幅

②で bisulfite 処理した DNA10ng を鋳型として、解析対象の 7 領域 (PTPN7, SST, CNGA3, KLF14, TSSK6, TBR1, SLC12A5) を増幅するプライマーを設計し、Multiplex PCR を ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。実施後、エキソヌクレアーゼとアルカリホスファターゼを用いて増幅産物の精製を行った。

##### ④一塩基伸長反応

③で得られた増幅産物 1 μL に対し、SNaPshot Multiplex Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて一塩基伸長反応を実施した。

##### ⑤検出と解析

④で得られた反応産物を 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いてフラグメント解析を実施し、GeneMapper software 5 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析を実施した。各 CpG 領域のメチル化率は、グアニンの蛍光強度をグアニンとアデニンの蛍光強度の和で除することにより算出した。算出した各アレルのメチル化率と実年齢について重回帰分析を行い、年齢推定式を算出した。

## (2)LNA を用いた微量試料からの高感度メチル化解析法の開発

### ①GpG 領域の Singleplex PCR における最適な LNA 導入塩基数の決定

先行研究 (Y. Hamano et al, Legal Medicine (2016)) において法医学的年齢推定に有用とされた 2 領域 (ELOVL2 及び FHL2) の CpG 配列を増幅対象とし、各 Primer の塩基配列のうち、1, 2, 5 塩基の LNA で置換した Primer を設計した。Bisulfite 処理後の 50%メチル化 DNA (EpiTect Control DNA) (Qiagen) 1ng を鋳型として各 Primer を用いて ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を実施し、Ct 値を比較した (n=3)。

### ②LNA 導入 Primer を用いた Multiplex PCR と SBE 法によるメチル化解析

(1) で用いた一塩基伸長反応を用いたメチル化年齢推定法について、Multiplex PCR 実施時の Primer に人工核酸 LNA を導入した Primer を作成した。Bisulfite 処理後の 0%または 100%のメチル化 DNA 5ng (EpiTect Control DNA (Qiagen)) を鋳型とし、Multiplex PCR を LNA 導入及び未導入の Primer を用いて行い、引き続き一塩基伸長反応、フラグメント解析を実施した。実施後に各フラグメントのピーク高を LNA 導入 Primer を用いた場合と未導入の Primer を用いた場合とで比較し、増幅効率の改善効果を判定した。

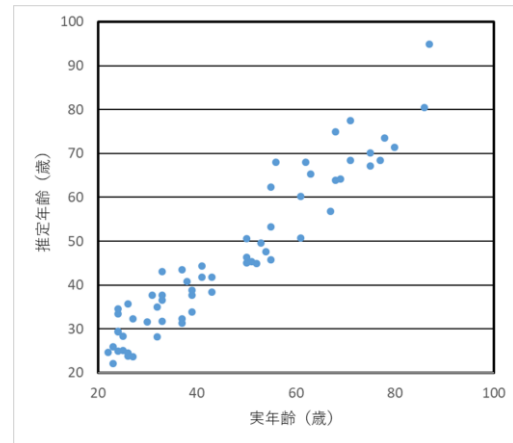
## 4. 研究成果

### (1) 一塩基伸長反応を用いたメチル化解析による日本人集団の年齢推定

重回帰分析により、下記の年齢推定式を得た。

推定年齢 (歳) =  $-32.54$  (PTPN7) +  $84.43$  (SST) +  $33.15$  (CNGA3) +  $60.21$  (KLF14) +  $19.75$  (TSSK6) +  $54.67$  (TBR1) +  $27.22$  (SLC12A5) +  $16.57$  ※  
括弧内はメチル化率

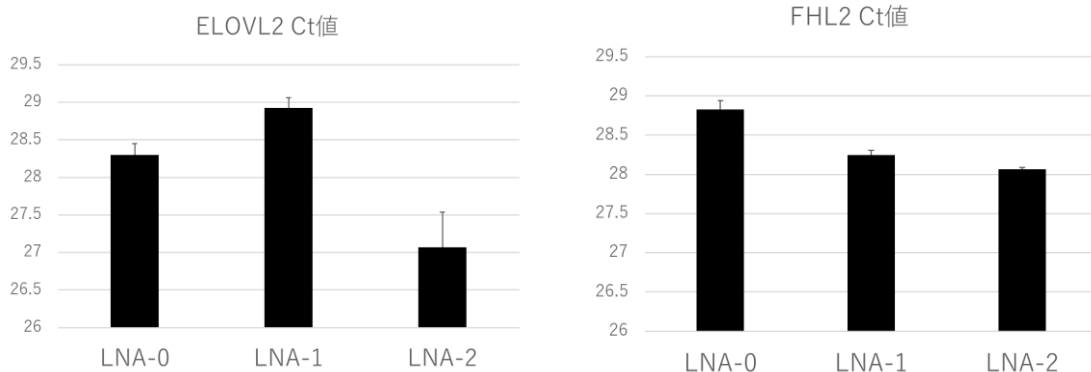
上記を式を用いた場合、平均絶対偏差 (MAD) = 4.88 歳の精度で年齢を推定することができた (右図)。



## (2)LNA を用いた微量試料からの高感度メチル化解析法の開発

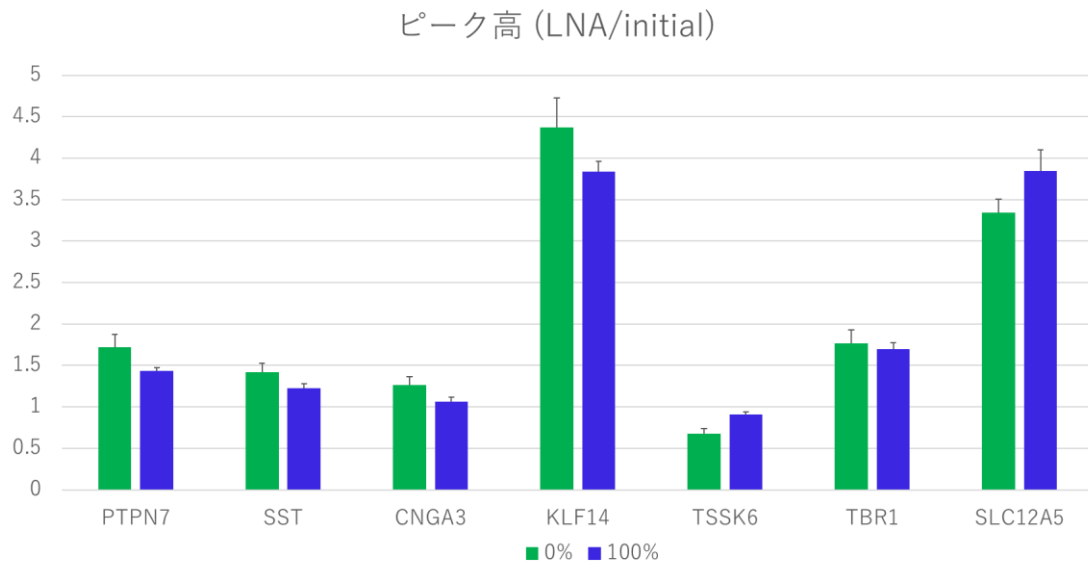
### ①GpG 領域の Singleplex PCR における最適な LNA 導入塩基数の決定

1, 2, 5 塩基の LNA で置換した Primer を設計し、リアルタイム PCR で増幅すると、5 塩基置換の場合は検出することができなかった。1 塩基置換の場合は FHL2 領域では Ct 値の低下を認めたが、ELOVL2 領域では Ct 値が上昇した。2 塩基置換の場合は双方の領域とも Ct 値の低下を認めた (下図)。従って LNA の最適導入塩基数を 2 塩基とした。



②LNA 導入 Primer を用いた Multiplex PCR と SBE 法によるメチル化解析

LNA を 2 塩基導入した Primer を用いて Multiplex PCR を行い、未導入 Primer で増幅した場合と比較したところ、解析 7 領域のうち、TSSK6 を除く 6 領域でピーク高の増高が認められた (下図)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Konishi Hiroaki, Isozaki Shotaro, Kashima Shin, Moriiichi Kentaro, Ichikawa Satoshi, Yamamoto Kazuki, Yamamura Chikage, Ando Katsuyoshi, Ueno Nobuhiro, Akutsu Hiroaki, Ogawa Naoki, Fujiya Mikihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Probiotic <i>Aspergillus oryzae</i> produces anti-tumor mediator and exerts anti-tumor effects in pancreatic cancer through the p38 MAPK signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90707-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takauji Shuhei, Tanaka Hiroki, Hayakawa Mineji, Horioka Kie, Isozaki Shotaro, Konishi Hiroaki	4. 巻 587
2. 論文標題 Soluble thrombomodulin ameliorates aberrant hemostasis after rewarming in a rat accidental hypothermia model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.086	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 該当する
1. 著者名 Tanaka Hiroki, Horioka Kie, Hasebe Takumu, Sawada Koji, Nakajima Shunsuke, Konishi Hiroaki, Isozaki Shotaro, Goto Masanori, Fujii Yumiko, Kamikokura Yuki, Ogawa Katsuhiro, Nishikawa Yuji	4. 巻 150
2. 論文標題 Treatment of hepatocellular carcinoma with autologous platelets encapsulating sorafenib or lenvatinib: A novel therapy exploiting tumor platelet interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1640~1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33915	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 該当する
1. 著者名 Isozaki Shotaro, Tanaka Hiroki, Horioka Kie, Konishi Hiroaki, Kashima Shin, Takauji Shuhei, Fujiya Mikihiro, Druid Henrik	4. 巻 1868
2. 論文標題 Hypoxia-induced nuclear translocation of $\beta$ -catenin in the healing process of frostbite	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166385~166385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2022.166385	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 該当する

1. 著者名 Horioka Kie, Tanaka Hiroki, Isozaki Shotaro, Konishi Hiroaki, Addo Lynda, Takauji Shuhei, Druid Henrik	4. 巻 526
2. 論文標題 Low temperature induces von-willebrand factor expression via increased early growth response 1 transcriptional activity in splenic sinusoidal endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 239 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.073	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 該当する

1. 著者名 Horioka Kie, Tanaka Hiroki, Isozaki Shotaro, Konishi Hiroaki, Addo Lynda, Takauji Shuhei, Druid Henrik	4. 巻 195
2. 論文標題 Rewarming from accidental hypothermia enhances whole blood clotting properties in a murine model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2020.07.022	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 該当する

1. 著者名 Takauji Shuhei, Konishi Hiroaki, Fujiya Mikihiro, Ueno Nobuhiro, Tanaka Hiroki, Sato Hiroki, Isozaki Shotaro, Kashima Shin, Moriichi Kentaro, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu	4. 巻 1
2. 論文標題 Polyphosphate, Derived from Lactobacillus brevis, Modulates the Intestinal Microbiome and Attenuates Acute Pancreatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06747-9	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 該当する

1. 著者名 Murakami Yuki, Fujiya Mikihiro, Konishi Hiroaki, Isozaki Shotaro, Sugiyama Yuya, Kobayashi Yu, Sasaki Takahiro, Kunogi Takehito, Takahashi Keitaro, Ando Katsuyoshi, Ueno Nobuhiro, Kashima Shin, Moriichi Kentaro, Tanabe Hiroki, Okumura Toshikatsu	4. 巻 44
2. 論文標題 The Optimal Dose of Tacrolimus in Combination Therapy with an Anti-TNF Antibody in a Mouse Colitis Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 564 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Isozaki Shotaro, Konishi Hiroaki, Fujiya Mikihiro, Tanaka Hiroki, Murakami Yuki, Kashima Shin, Ando Katsuyoshi, Ueno Nobuhiro, Moriichi Kentaro, Okumura Toshikatsu	4. 巻 2021
2. 論文標題 Probiotic-Derived Polyphosphate Accelerates Intestinal Epithelia Wound Healing through Inducing Platelet-Derived Mediators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/5582943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 磯崎翔太郎
2. 発表標題 人工核酸導入Primerを用いた高感度メチル化解析と法医学的年齢推定
3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shotaro Isozaki, Hiroki Tanaka, Kie Horioka, Hiroaki Konishi, Shin Kashima, Henrik Druid
2. 発表標題 The assessment of cutaneous epithelium hypoxia in the murine frostbite model
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯崎翔太郎、藤谷幹浩、小西弘晃、田中宏樹、村上雄紀、杉山雄哉、安藤勝祥、上野伸展、後藤拓磨、嘉島 伸、高氏修平、盛一健太郎、田邊裕貴、水上裕輔、奥村利勝
2. 発表標題 乳酸菌由来長鎖ポリリン酸は血小板活性化を介して腸管上皮の創傷治癒を促進する
3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shotaro Isozaki, Hiroki Tanaka, Kie Horioka, Hiroaki Konishi, Shin Kashima, Henrik Druid
2. 発表標題 The activation of Wnt signaling in the murine frostbite model
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 Shotaro Isozaki, Mikihiro Fujiya, Hiroaki Konishi et al.
2. 発表標題 PROBIOTIC-DERIVED POLYPHOSPHATE IMPROVES DAMAGED INTESTINAL EPITHELIA THROUGH INDUCING PLATELET-DERIVED CELL GROWTH MOLECULES
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯崎翔太郎, 小西弘晃
2. 発表標題 Primerへの人工核酸LNA導入によるCpG Islandにおける増幅効率改善効果の検討
3. 学会等名 第88回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血小板凝集剤	発明者 藤谷幹浩, 小西弘晃, 田中宏樹, 磯崎翔太郎, 大町佳宏, 尾川直	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-1319	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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			
スウェーデン	カロリンスカ研究所			