

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10253

研究課題名（和文）硬組織のエピジェネティックな加齢変化の評価と年齢推定への応用

研究課題名（英文）Evaluation of epigenetic aging changes in hard tissues and its application on age estimation

研究代表者

岡 広子（Oka, Hiroko）

広島大学・医系科学研究科（歯）・主任特任学術研究員

研究者番号：60452588

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、硬組織構成細胞の石灰化と関連するメチル化ターゲットを抽出して実際の硬組織検体での実年齢との関連を検証し、硬組織微量検体からの年齢推定法の構築を目的とした。歯根周囲由来のセメント芽細胞株を用いた検討では、細胞の増殖と分化にDNAメチル化が関与していること、石灰化により様々なDNAメチル化が変化することを示した。また、抜去歯を用いた検討では、実年齢と相関するDNAメチル化ターゲットを抽出した。年齢を目的変数とし、抽出したメチル化ターゲット（生化学的指標）と歯槽骨吸収の有無（形態学的指標）を説明変数とした回帰式を得た。得られた式は、生活習慣（喫煙、コーヒー摂取）の影響を受けていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根周囲から得た微量なDNAから、リアルタイムPCRを用いて得られるFHL2メチル化スコアを年齢推定への応用の可能性が示された。また、今回ターゲットとした歯根周囲のDNAメチル化部位は喫煙やコーヒーの日常摂取の影響を受けていないことが明らかとなった。身元不明の腐敗遺体や白骨であっても、顎骨に植立された状態であれば分析対象となる歯を支持する歯槽骨吸収の程度もエックス線撮影や肉眼で非破壊的に評価可能である。微量の試料採取と非破壊的検査による本研究のアプローチは、遺族感情に寄り添い資料保存も可能となる年齢推定法への展開に大きく寄与するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to explore DNA methylation targets associated with calcification of hard tissue constituent cells and verify their association with chronological age in real hard tissue. In addition, the study aimed to develop novel age estimation methods from hard tissue using real-time PCR. Using a cementoblast like cell line, we showed that proliferation and differentiation of the cementoblast like cells were regulated various DNA methylation targets. In extracted tooth specimens, there are positive correlation between a DNA methylation targets and chronological age. A regression equation was obtained using age as the objective variable, and the presence or absence of alveolar bone resorption (morphological index) and the extracted methylation targets (biochemical index) as the explanatory variable. The equations obtained were not influenced by lifestyle habits (smoking, daily coffee consumption).

研究分野：法歯学、社会歯学

キーワード：硬組織 メチル化 年齢推定 歯

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

年齢は身元確認(個人識別)の候補者の絞り込みに対する有効性が高いだけでなく、国内外の法律の適用(成人・未成年)の上でも重要な要素である。年齢推定法は、形態学的年齢推定法と生化学的年齢推定法に大別される。形態学的年齢推定法が個人差による誤差が大きく影響するのに比べ、生化学的年齢推定法は狭い幅で年齢推定が可能とされている。近年、年齢推定の生化学的指標の一つとして、より安定した CpG 領域のシトシンのメチル化が組織特異的な年齢のマーカーとして知られるようになった。一方で、エピジェネティックな変化が実際のどのような組織状態を反映したのかという検証は未だほとんどなされていない。

様々な組織で DNA メチル化と年齢との関連が報告されてきた FHL2 は、それ自身の発現変化と硬組織の分化との関連も報告されている。年齢推定の上で有用な歯や骨といった硬組織の形態学的年齢指標として用いられる歯髄腔の狭窄、歯根のセメント質の肥厚や頭蓋骨の縫合閉鎖は構成細胞の分化・石灰化によるものである。しかしながら、「実際の硬組織の形態学的加齢変化と DNA メチル化の関連」および「石灰化に関連する生化学的指標とヒトの実年齢との関連」を検証した報告はこれまでみられなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、硬組織構成細胞の石灰化と関連するメチル化ターゲットを抽出して実際の硬組織検体での実年齢との関連を検証し、リアルタイム PCR を用いた硬組織微量検体からの年齢推定法の構築を目指す。

### 3. 研究の方法

1) 硬組織構成細胞の石灰化に関連する DNA メチル化ターゲットの抽出  
石灰化能を有する歯根周囲由来の細胞株(セメント芽細胞様株: HCM)を用いて石灰化誘導培養を行いメチル化アレイで変化を検証した。石灰化誘導により変化するものを候補ターゲットとした。

2) 硬組織検体を用いたメチル化の測定と実年齢との関連の検証  
20歳代から80歳代の第三大臼歯の抜去歯61検体を用いて検討を行った。1)の培養細胞において確認された DNA メチル化ターゲットをリアルタイム PCR を用いて測定し実年齢との関連を検証した。

3) 硬組織検体の石灰化状況と DNA メチル化スコアの比較  
エックス線撮影画像を計測して歯検体の石灰化状況(セメント質の肥厚、歯髄腔の狭窄)を評価し、DNA メチル化スコアとの関連を検証した。

4) 硬組織の石灰化と関連するメチル化ターゲットからの年齢推定法の検討  
歯検体についてリアルタイム PCR で得た DNA メチル化スコア、石灰化状況と実年齢について、抜歯時の歯槽骨吸収の程度、喫煙習慣を含めて統計的手法により解析し、年齢推定の有効性について検討した。

### 4. 研究成果

1) 硬組織構成細胞の石灰化に関連する DNA メチル化ターゲットの抽出  
HCM はメチル化阻害薬(5-Aza)添加により、増殖と石灰化が抑制された(図1、図2)。石灰化誘導による DNA メチル化の変化を検証したところ、FHL2 を含め複数のターゲットが抽出された。メチル化アレイは各条件1検体であったため、検証検体数を増やしてリアルタイム PCR で PCR CT 法および高解像度融解曲線分析のプライマーを設定し DNA メチル化を測定したが、明らかに有意な差を認めなかった。

図1. メチル化阻害の細胞数への影響

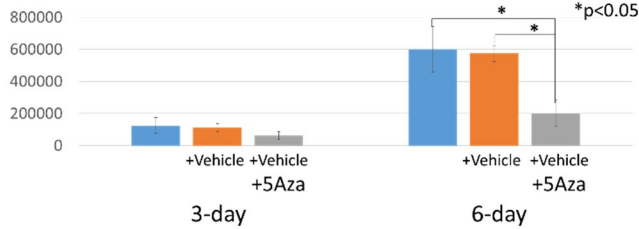
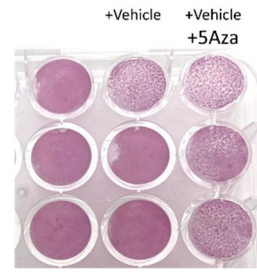


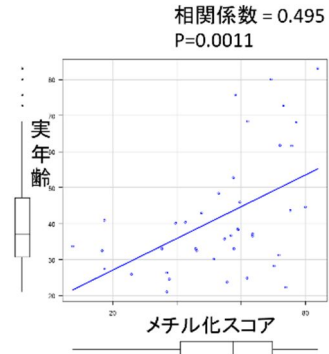
図2. メチル化阻害の石灰化への影響



2) 硬組織検体を用いたメチル化の測定と実年齢との関連の検証

抜去歯検体について、FHL2 メチル化スコアと実年齢に相関を認めた(図3)。唾液等の検体で年齢との相関が報告されていたEDARADDのメチル化は設定した部位では実年齢との相関を認めなかった。一方で、歯槽骨吸収の著しい検体のメチル化スコアは同年齢のものとは比べて大きくずれる傾向が認められた。

図3. FHL2メチル化スコアと実年齢の相関



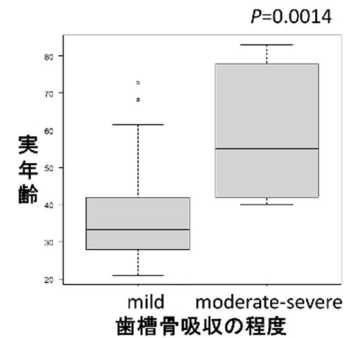
3) 硬組織検体の石灰化状況と DNA メチル化スコアの比較

予備検討の段階で、抜去歯検体のセメント質の肥厚とメチル化スコアに関連は認められなかった。また、今回検証に用いた第三大臼歯検体では歯髓形態が複雑で二次元画像から適切な歯髓腔の状態を評価することが困難な歯が多数存在したため、狭窄については評価対象から除外することとした。

4) 硬組織の石灰化と関連するメチル化ターゲットからの年齢推定法の検討

抜去歯検体について、加齢変化の一つとしても知られる歯槽骨吸収程度は「軽度(mild)」「中等度~高度(moderate-severe)」群間で年齢に有意な差を認めた(図4)。年齢と生活習慣(喫煙の有無、コーヒー摂取習慣の有無)の影響を検討したところ、コーヒー摂取習慣有無で年齢に有意な差を認めた(P=0.009)。

図4. 歯槽骨吸収の有無と実年齢



今回ターゲットとしたFHL2メチル化について、メチル化スコアは「歯槽骨吸収」「喫煙習慣」「コーヒーの摂取習慣」の有無による差を認めなかった。

そこで年齢を目的変数、年齢との相関を認めたFHL2のメチル化スコアおよび年齢に有意な差を認めた歯槽骨吸収の有無を説明変数とした重回帰分析を行い、それぞれの説明変数についてP=0.01以下となる回帰式(P<0.0001)を得た。サンプル検体を用いて絶対平均誤差を算出したところ9.6であった。

以上のことから、歯根周囲から抽出したDNAを用いて、リアルタイムPCRの高解像度融解曲線分析により算出するFHL2メチル化スコアを年齢推定への応用が可能であることが示された。また、今回ターゲットとした歯根周囲のDNAメチル化部位は喫煙やコーヒーの日常摂取の影響を受けていないことが明らかとなった。

本研究では、「年齢と相関するDNAメチル化ターゲット」と「実際の硬組織の形態学的加齢変化」として最終的に歯槽骨吸収の程度を加えた推定式を示した。身元不明の腐敗遺体や白骨であっても、顎骨に植立された状態であれば分析対象となる歯を支持する歯槽骨吸収の程度も評価可能である。これまで解析試料を得るために粉碎や切断が必要が多く本来の形態を著しく損なっていた硬組織の検証であるが、微量検体を用いたリアルタイムPCRと非破壊検査で得られる指標を用いた本研究の方法および成果は遺族感情へも配慮した上で客観的な年齢推定への展開に寄与するものである。

本研究の結果を腐敗や白骨化などを想定した長期の経過を経た事案で検証を行うことで貢献が期待できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroko Oka, Maretaningtias Dwi Ariani, Tomohiko Akazaki, Mutsumi Miyauchi, Masae Kitagawa	4. 巻 56
2. 論文標題 Some tips on age estimation using DNA methylation in saliva samples as an index across the Japanese and Indonesian ethnicities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 102042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102042.	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡 広子
2. 発表標題 歯のDNAメチル化を指標とした年齢推定に向けた検討 - 歯根の石灰化に与えるメチル化の影響 -
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡 広子
2. 発表標題 口腔から得られる検体のDNAメチル化を指標とした年齢推定にむけて
3. 学会等名 第65回日本歯科基礎医学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	北川 雅恵 (Kitagawa Masae)  (10403627)	広島大学・病院(歯)・助教  (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	宮内 睦美  (Miyachi Mutsumi)  (50169265)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	
研究分担者	加藤 文紀  (Kato Fuminori)  (70452589)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教    (15401)	

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
---------	---------