

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15401

研究課題名(和文) マイクロRNA解析と確率的評価法を組み合わせた新規体液識別法の開発

研究課題名(英文) A new method for body fluid identification by analyzing microRNA and probabilistic interpretation

研究代表者

玉木 敬二 (Tamaki, Keiji)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90217175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA鑑定における体液検査は犯行現場に遺された証拠を評価するために重要である。我々は提供の同意が得られた血液、唾液、精液、膣分泌液、表皮から、miRNAを用いた検査法の開発を目指した。血液ではmiR-144-3pやmiR-451a-5p、精液ではmiR-888-5pやmiR-891a-5pが特異的に発現していることを明らかにした。唾液や膣分泌液はmiR-203aとmiR-1260bの発現量を二次判別分析に用いることで、正しく判定することができた。また本法が法実務に応用できるかを検証するべく無精子症や精子無力症の精液、卵胞期や黄体期の膣分泌液を調べると、これらの個人差の影響はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In forensic casework, body fluid identification (BFID) plays a prominent role for the reconstruction of criminal activity. We aimed to establish a novel BFID method based on microRNA expression, and collected venous blood, saliva, semen, vaginal secretion, and skin. We revealed that venous blood and semen could be identified by using of miR-144-3p and miR-451a-5p for blood, and miR-888-5p and miR-891a-5p for semen, and that saliva and vaginal secretion could be discriminated by quadratic discriminant analysis by using the expression of miR-203a and miR-1260b. Furthermore, for the investigation of the effect of individual characteristics on our BFID method in sexual cases, we examined these microRNA in infertile semen and vaginal secretion at the follicular and luteal phases. These microRNA can be also detected in infertile semen and vaginal secretion at the both phases. Therefore, our BFID method will be applicable in actual forensic casework.

研究分野：法医学

キーワード：DNA多型学 マイクロRNA 体液識別

1. 研究開始当初の背景

犯行現場試料から検出される DNA は犯行状況に関わったとされる個人の特定に非常に有用である。近年、その検出された DNA が本当に犯行の関与者に由来するのかが問題視されており、同一試料から犯行状況の推定に役立てられるメッセンジャー RNA (mRNA)を用いた体液識別法が DNA による個人識別の法廷での証拠価値を向上すると考えられている。しかしながら、mRNA は DNA に比較して容易に変性してしまうことから一般に劣化していることの多い犯行現場試料では検出が困難となりうる。その一方で、mRNA より低分子のマイクロ RNA (miRNA)は mRNA と同様体液特異的に検出され、一般に劣化に強いとされる。そのため miRNA の発現量を用いると高精度な体液識別法の発展が期待される。

2. 研究の目的

法医鑑定実務で扱われることの多い血液、唾液、精液、膣分泌液、皮膚表面を拭った Touch sample 中の miRNA の発現量を利用した新たな体液識別法を開発するという目的のために以下を実施した。

(1) 体液中に一様に多く発現している reference RNA を探索する。

(2) 各体液で発現特異性の高い miRNA を調査する。

(3) miRNA の発現量を用いた体液の定量的識別モデルを開発する。

(4) UV 照射により劣化した試料における miRNA の検出レベルの変化を検討する。

(5) 無精子症や精子無力症の精液や採取時期の異なる膣分泌液における miRNA の発現量の違いによる影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 体液中に一様に多く発現している reference RNA を探索する。

京都大学医の倫理委員会の承認の下、提供の同意が得られた血液、唾液、精液、膣分泌液、Touch sample を採取した。各体液から抽出した RNA 総量を定量し、5.0 ng/ μ L に希釈した。先行研究で報告のある 7 種類の RNA に加え、

体液以外の臓器などで比較的多く発現している RNA を 4 種類選択し、定量 PCR により発現量を調べた。発現の安定性を調べる目的で NormFinder と BestKeeper というソフトウェアを用いて体液間及び個人間での RNA の発現のばらつきを調べた。また、2 種類あるいは 3 種類の RNA を組み合わせた場合の発現の安定性を調べ、最適な reference RNA と最適な RNA の組み合わせを決定した。

(2) 各体液で発現特異性の高い miRNA を調査する。

各体液で 3 種類ずつの識別マーカーとなる miRNA を選択し、その発現量を定量 PCR により調べた。発現量は最適な reference RNA の組み合わせを用いて補正し、発現特異性の高いもの、発現量が相対的に多いものを識別マーカーとして選択した。

(3) miRNA の発現量を用いた定量的識別モデルを開発する。

定性的な識別の困難な体液に関しては数学的モデルを用いて評価した。複数の miRNA の発現量を用いる場合には、二次判別分析用いた体液識別を試みた。

(4) UV 照射により劣化した試料における miRNA の検出レベルの変化を検討する。

事前の検討で 8 Watt の UVC を 16 分間照射すると RNA の電気泳動図に大きな変化が観察された。そのため抽出した RNA に UV を 16 分間直接照射して検出量の変化を調べた。

(5) 無精子症や精子無力症の精液や採取時期の異なる膣分泌液における miRNA の発現量の違いによる影響を検討する。

我々の開発した体液識別法が法医鑑定実務に応用可能かを検討する目的で精液は健常精液の他に無精子症精液及び精子無力症精液を収集した。膣分泌液は採取時期を黄体期と卵胞期に分けて収集した。このような個人差のある試料について発現特異性の高いと判断された miRNA と発現量が相対的に多いと判断された miRNA の発現量を調べ、精液や膣分泌液を同定する際の影響がないかを検討

した。

4. 研究成果

(1) 体液中に一様に多く発現している reference RNA を探索する。

今回用いた reference RNA 11 種類の中で 5S-rRNA がいずれの体液においても最も発現していた。各体液での安定性をみると、NormFinder は miR-103a-5p、miR-484、miR-92a-3p が、BestKeeper は 5S-rRNA、U6-snRNA、SNORD38B が安定に発現していることを示した。これらを総合的に判断すると、5S-rRNA が最適な reference RNA であると判断された。また、複数の reference RNA を組み合わせる方が、一般に安定した定量値が得られることが知られている。そこで我々は 2 種類及び 3 種類の reference RNA を組み合わせた場合についても検討した。2 種類組み合わせた場合には 5S-rRNA と miR-92a-3p、5S-rRNA と miR-484 を用いることで reference RNA による標的 RNA の発現量の補正精度が向上すると考えられた。さらに、3 種類組み合わせた場合には 5S-rRNA と miR-92a-3p と miR-484 を用いることが最適であると判断された。

以上のことから体液中の miRNA の発現量を補正するための最適な reference RNA は 5S-rRNA であり、これに miR-92a-3p や miR-484 を組み合わせることで高精度な発現量の補正が可能になると考えられた。

(2) 各体液で発現特異性の高い miRNA を調査する。

各体液で識別マーカーとなりうる miRNA の発現量を調べたところ、血液では miR-144-3p や miR-451a-5p、精液では miR-888-5p や miR-891a-5p が特異的に発現していた。これらの miRNA は他の体液中での発現量はそれぞれ血液や精液に比べ顕著に低く、検出されるか否かといった定性的な識別に役立つと考えられた。唾液では miR-203a や miR-205、腔分泌液では miR-1260b が高発現であった。しかしながら他の体液においても検出されたことから定性的な識別は困難と判断した。Touch sample は今回用いた miRNA では識別することが困難であった。

従って、血液と精液は定性的な識別が可能であり、唾液と腔分泌液は定量値を用いた識別法の開発が必要と判断した。Touch sample は由来する細胞成分の再検討が必要と考えられた。

(3) miRNA の発現量を用いた定量的識別モデルを開発する。

唾液と腔分泌液は定性的な識別が困難であったため、発現量を用いた定量的な識別モデルを用いて唾液と腔分泌液の識別が可能かを検討した。miR-203a と miR-1260b の発現量を用いて二次判別分析を行うと一部の腔分泌液の試料を除き殆どの体液を識別することが出来た。

以上のことから、4 種類の miRNA を用いることで血液、精液、唾液、腔分泌液を識別することが可能になった。

(4) UV 照射により劣化した試料における miRNA の検出レベルの変化を検討する。

UV 照射により RNA は分解することが知られている。今回用いた miRNA はその配列によって UV への反応性が異なることが示された。血液では miR-451a-5p、精液では miR-891a-5p、唾液では miR-203a が他の識別マーカーに比べ分解しにくいと判断された。

但し、実際の法医実務で扱われる試料の劣化の原因は微生物などに由来する RNase が主体とされることが多い。従って、より実際に劣化した試料について miRNA の検出限界を検討する必要があると考えられた。

(5) 無精子症や精子無力症の精液や採取時期の異なる腔分泌液における miRNA の発現量の違いによる影響を検討する。

本法が法医実務に応用できるかを検証するべく無精子症や精子無力症の精液、卵胞期や黄体期の腔分泌液について、4 種類の miRNA の発現量の個人差の影響を調べた。その結果、精液の性状の違いや腔分泌液の採取時期の違いはこれらの miRNA の発現量に影響はみられないと判断された。

従って、本研究で明らかにした 6 種類の miRNA と reference RNA を用いることで法医

実務に応用の期待される体液識別法を開発することが出来た。

5. 研究課題と今後の方向性

本研究では6種類のmiRNAを用いることで血液、唾液、精液、膣分泌液を識別することができた。但し、唾液や膣分泌液は定性的な識別が困難であったことから数学的モデルを立てて判定を試みた。このモデルの妥当性は今後試料を追加して検討する必要がある。

また、法医鑑定実務への応用に向けて、複数種類の体液が混合した場合、試料を実際に劣化させた場合などの検討が要求される。本法は現状、唾液、精液、膣分泌液が混合した場合の識別が困難である。そのため体液試料が混合した場合の検討を試みる予定である。また、今回UV照射により劣化させたRNAからmiRNAの検出を試みたが、実際の法医実務で扱われる試料の劣化の原因は環境中に存在する微生物などが主体である。そのため今回選択した識別マーカーが環境中でどの程度保存されるかを検討する必要があると考えられる。従って、今後は本法が実際の法医鑑定実務に応用するに向けた検討を実施する予定である。

6. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Hamano Y, Tamaki K. Effect of the absence of spermatozoa on microRNA-based semen identification. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 査読有. 2017. e238-240. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.099>

藤本駿太郎, 真鍋翔, 森本千恵, ジェマイル・レイラ, 尾関宗孝, 宮尾昌, 玉木敬二. マイクロRNAの定量的解析による体液の識別判定法の検討. *DNA 多型*. 査読有. 2017. 25(1):117-122.

藤本駿太郎, 真鍋翔, 石田季子, ジェマイル・レイラ, 尾関宗孝, 宮尾昌, 玉木敬二.

PowerPlex Fusion 22 ローカスを用いた混合試料の関与人数の推定と尤度比算出の精度について. *DNA 多型*. 査読有. 2016. 24(1):244-248.

〔学会発表〕(計 6 件)

Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Hamano Y, Tamaki K. Effect of the absence of spermatozoa on microRNA based semen identification. 27th Congress of the International Society for Forensic Genetics. Abstracts. 2017; p339, Seoul, Korea.

Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Hamano Y, Tamaki K. Novel body fluid identification system using microRNAs in five forensically relevant body fluids. The 101th Congress of the Japanese Society of Legal Medicine. Abstracts. 2017; p105, Gifu, Japan.

藤本駿太郎, 真鍋 翔, 森本千恵, 尾関宗孝, 玉木敬二. RIN による体液試料の劣化程度の評価の有効性. 日本DNA多型学会第26回学術集会. 講演要旨集. 2017; p95, 東京.

藤本駿太郎, 真鍋 翔, 森本千恵, 濱野悠也, 玉木敬二. RT-qPCR を用いた体液識別における低分子 reference RNA の評価. 第23回日本法科学技術学会. 講演要旨集. 2017; p22, 東京.

藤本駿太郎, 真鍋 翔, 森本千恵, ジェマイル・レイラ, 尾関宗孝, 宮尾 昌, 玉木敬二. マイクロRNAの定量的解析による体液の識別判定法の検討. 日本DNA多型学会第25回学術集会. 講演要旨集. 2016; p55, 柏.

藤本駿太郎, 真鍋 翔, 森本千恵, 川合千裕, 尾関宗孝, 玉木敬二. 参照者の血縁者の型を利用したDNA混合試料の解釈について. 第63回日本法医学会学術近畿地方集会. 講演要旨集. 2016; p13, 大阪.

7. 研究組織

(1) 研究代表者

玉木 敬二 (TAMAKI, Keiji)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90217175