

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09270

研究課題名(和文)ゲノムプロファイリング法及びラマン分光法による年齢推定法の開発

研究課題名(英文)Age estimation by Genome profiling method and Raman spectroscopy

研究代表者

池谷 博(Hiroshi, Ikegaya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30292874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：司法解剖体を用い、皮膚のラマン分光法や画像による解析、ゲノムプロファイリング(GP)法によるDNAメチル化解析、各種生化学マーカー、臓器重量、骨密度、口腔内所見等と年齢との相関を解析した。これらの中で、T3、T4と甲状腺の重量、骨密度、皮膚画像解析結果、ヒトの肝臓のポリアミン代謝酵素活性、ヒトの前立腺の重量や前立腺特異抗原、DNAのメチル化などが年齢と相関していることが分かった。特にGP法によるDNAのメチル化や皮膚のラマン分光による解析では非常に高い相関を認めた。歯牙の喪失歯数等の口腔内所見が年齢との有意な相関を認めることも分かった。すべての結果は論文公表中または投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、年齢推定のための様々な客観的指標が得られた。

身元不明死体が世界的に増加し、社会問題になっている一方、法医学の専門家が非常に少なく従来の古典的な方法で年齢を推定することは容易ではない。身元判明の重要な情報である年齢を、客観的かつ簡単に、専門的知識無しに推定できるこれらの方法は、迅速な身元解明に役立つと確信する。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether (1) Skin analysis by Raman spectroscopy and photo image, (2) DNA methylation analysis by the genome profiling (GP) method, (3) various biochemical markers, (4) organ weights, (5) bone density, and (6) intraoral findings, etc. correlate with age. Among these results, (1) T3, T4 and thyroid weight, (2) bone density, (3) skin image analysis results, (4) human liver polyamine metabolizing enzyme activity, (5) human prostate weight and prostate-specific antigen correlated with ages. In particular, a very high correlation was found in the skin analysis by Raman spectroscopy and epigenome analysis by Genome Profiling method. A significant correlation with age was also found in the number of missing teeth. All of results are currently being published or submitted.

研究分野：法医学

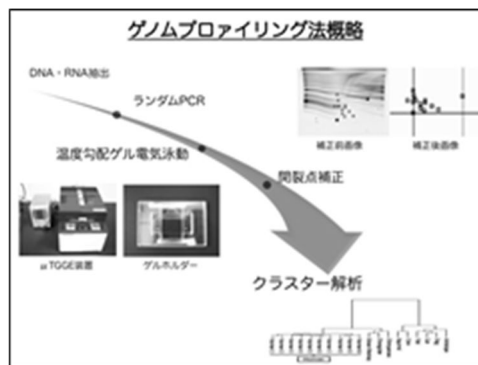
キーワード：年齢 バイオマーカー 骨密度 皮膚 ラマン ゲノムプロファイリング エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロファイリング法は、1997年に西垣らにより生物工学で開発された方法であり、ランダムPCRによって試料に含まれる巨大なゲノムDNAの一部を増幅する。これは統計学でのランダムサンプリングに相当する。増幅されたDNA断片をゲルの上部に横一線に載せて電場をかけて上から下に電気泳動する(温度勾配ゲル電気泳動:μTGGE)。このとき左右に温度勾配をかけることで右図右上のような複雑なバンドパターンが現れる。DNAの局所融解温度は理論的に予測できること(Poland, Biololmers. 1974)から、様々な増幅されたDNA断片の塩基配列に特有の温度で開裂した座標点(Spiddos)を、塩基配列が予めわかっている内部参照試料を用いて補正し、規格化する(Biyani&Nishigaki, Electrophoresis. 2001)。このようにして得られたSpiddos座標はゲノム固有の普遍的な値となり、生物間の比較に用いられている。

これまでに研究者は、ヒトとその他の動物種を分けることができるばかりか、予め様々な動物種の泳動データを持っていれば、動物種特有のSpiddosの出現と、Spiddos座標のクラスター解析によって試料に含まれる動物種を推定することができることを明らかにした(Suwa, Ikegaya, et al. Legal Med(Tokyo).2012)。また、各種体液の検出がゲノムプロファイリング法で可能であることを示した(Takasaka, Ikegaya et al. Legal Med(Tokyo).2011; Hirata, Ikegaya et al. JAFST. 2012)。さらに本研究の前の基盤研究(C)において、ウイルスや細菌種の違いをも識別することが可能であることを明らかにし、人の尿中のウイルス検出に成功したり(Hirata, Ikegaya et al. The Open J Virol. 2016)、微生物の証明により溺死の診断ができることを確認した(Idota, Ikegaya et al. J. Forensic Sci. 2017)。

身元不明死体の増加が世界的に問題になっている法医学の分野における身元不明死体等の個人識別において、年齢推定は極めて重要であるが、残念ながら簡易かつ安価でありながら高精度で客観的な推定法はあまり良く知られていない。ゲノムプロファイリング法は、実験的にはDNAの1塩基の違いを描出することも可能なほど感度が高く、高感度の変異原性解析にも利用されており(Kumari et al. J Biochem. 2014)、近の研究では、植物において桜の木においてでは幹から枝葉へとゲノムが変化していることや、シロイヌナズナの葉が根元から葉先へと年輪と同じように規則正しく加齢によってゲノムが変化していることなどがわかってきた。そこで、人を含む哺乳類においても同様に加齢によってゲノムが変化していることが確認でき、それにより年齢推定ができるのではないかと考えられた。



一方、大規模災害時などの身元不明死体の捜査においては、以上のようなゲノム解析によるアプローチにはある程度の知識と技術も要求される。そこで、だれでも簡単に現場で年齢が推定できる方法がないかと考え、ラマン分光法に着目した。

物質に光を照射すると、光と物質の相互作用により反射、屈折、吸収などのほかに散乱と呼ばれる現象が起こる。散乱光の中の分子振動によって入射光とは異なる波長に散乱されるラマン散乱光が、分子の固有振動数になっていることから、物質の種類と質の同定や定量を行うことができる。このことを利用して、皮膚の炭素窒素結合や炭素水素結合等に特

異的な反射光を分析し、脂質，コラーゲン，タンパクなどの絶対量や比率を解析し，近似式を実際の年齢（暦年齢）との値から近似式を推定することにより，年齢推定が可能になると考えられ，5 例の皮膚を用いて予備実験を行ったところ，右図のような脂質の結晶化とタンパク質の断片化が年齢と相関している可能性が示唆された(Pezzotti, Ikegaya et al. Biomedical Opt. 2015).

## 2．研究の目的

本研究の第 1 の目的として，ア)ゲノムプロファイリング法を用いた年齢推定を検討する。ゲノムプロファイリング法が全ゲノムのランダムサンプリングによる網羅的な解析ができる利点を利用して，エピゲノムの変化で年齢を推定できるかどうかを検討する。

第 2 の目的として，イ)ラマン分光法を用いて，解剖時に採取された多数のヒト皮膚検体の脂質の結晶化とタンパク質の断片化の比率を測定し，暦年齢との相関を詳細に検討する。その他の目的として，ウ)様々な年齢との相関が疑われるバイオマーカーや，臓器の計測値について，並びに視覚的皮膚年齢解析マイクロスコープによる皮膚画像データを収集・解析し，暦年齢との相関を検討する。

以上の方法の利点・欠点を比較検討し，実務応用の可能性を探る。以上の知見を特許申請するとともに，検視・検案の現場で用いることができるように測定装置の小型化の実現を目的とする。

## 3．研究の方法

ア)ゲノムゲノムプロファイリング法を用いた年齢推定について

司法解剖体から採取された血液検体を収集し，DNA を抽出する。その後ランダム PCR -  $\mu$ TGGE 法を行ったものとバイサルファイト法を用いないでランダム PCR -  $\mu$ TGGE 法を行ったものについて，PaSS を求め，両者の比較から DNA のメチル化の比率を網羅的に算出し，エピゲノムの変化により年齢を推定できるかどうかを明らかにした。

イ)ラマン分光法による年齢推定について

司法解剖体の腹部の皮膚を採取し，ラマン分光法によって，脂質の結晶化とタンパク質の断片化の比率を測定する。測定された各計測値と暦年齢との相関を解析した。

ウ)その他の皮膚画像解析とバイオマーカーや臓器の計測値による年齢推定について

解剖時に皮膚の画像を採取し，皮膚画像データの解析値と暦年齢との相関を解析した。さらに同時に計測された口腔内所見や，肝臓や生殖器の大きさ，重量などの各種臓器の重量，大きさや骨密度などの各種計測値と，血液生化学データ（甲状腺ホルモンや，前立腺得意抗原，ポリアミン代謝酵素など）と暦年齢との相関を解析した。以上の様々な方法の間での利点・欠点を検討し，実務応用の可能性を探った。

また，皮膚画像解析については，スマートフォンを用いた測定機器の小型化を検討した。

## 4．研究成果

#### ア) ゲノムゲノムプロファイリング法を用いた年齢推定について

ゲノムプロファイリング法によって全ゲノムをランダムに増幅させ、 $\mu$ TGGE を行った結果、加齢によって DNA の特定のローカスだけでなく、全ゲノムにおいてメチル化が増加することが確認され、 $r=0.92$  と強い相関を認めた。以上の結果を現在論文として投稿中である。

#### イ) ラマン分光法による年齢推定について

脂質の結晶化とタンパク質の断片化の割合について 132 例の症例で検討したが、タンパク質の断片化の方が相関が高く ( $r=0.88$ )、男女比や BMI などにも影響を受けなかったことから、タンパク質の断片化を用いて年齢推定ができると報告した (Miyamori, Ikegaya et al., 2021)

#### ウ) その他の皮膚画像解析とバイオマーカーや臓器の計測値による年齢推定について

皮膚画像の解析を行ったところ、露光部の赤みと非露光部の肌理が相関していることが分かったが、最も相関しているものでも年齢が推定できるほど高いものではなかった ( $R^2=0.306$ )。

甲状腺ホルモンである T3, T4、および甲状腺重量について検討したところ、加齢により低下することが分かったが、その相関は非常に弱いものであった ( $r=0.50$ ) (Miyamori, Ikegaya et al. Rom J Legal Med. 2018)。

骨密度は、年齢により低下し、相関は比較的強いものであった ( $r=-0.55$ ) (Ichioka, Ikegaya et al. Diagnosis. 2020)。

前立腺得意抗原に関しては、年齢とともに上昇したが、その相関は比較的弱いものであった ( $r=0.32$ )。また、前立腺の重量についても弱い相関を認めた ( $r=0.28$ ) (Tsuboi, Ikegaya et al. SAGE Open Med. 2020)。そこで男性生殖器についての計測値を検討したところ、年齢との相関は認めるものもあったが、それほど高いものは認められず (Suzuki, Ikegaya et al. Int J Urol. 2019; Takeshima, Ikegaya et al. IJPPP. 2021)、むしろ年齢よりは、すでに胎生期に大きさが決まっていることが示唆された (Ikegaya et al. Basic Clin Androl. 2021)。

また、肝臓のポリアミン代謝酵素と年齢にとの相関については、オルニチンジカルボキシラーゼ ( $r = -0.59$ ) とスペルミンオキシダーゼ ( $r = 0.71$ ) が比較的強い相関を認めた (Uemura, Ikegaya et al. Heliyon. 2020)。

口腔内所見については、喪失歯数が年齢と相関していることが明らかになった ( $r=0.61$ ) (論文投稿中)。

以上の様々な検討をした結果、DNA のメチル化が最も年齢との相関が高く、次いで皮膚のラマン分光法による解析、3 番目に肝臓のスペルミンオキシダーゼの相関が高かった。その他の方法に関しては、それほど高いものではなかった。実務利用を考え、現在死体の発見現場等で簡単に測定を可能とすることのできる皮膚画像解析法について、スマートフォンを利用したアタッチメントの開発とアプリの開発を行っている。また、今後光学機器ではあるが、ハンドヘルド版のラマン分光測定装置を用いた肌年齢の解析を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suzuki Motofumi、Ikegaya Hiroshi、Idota Nozomi、Kawai Taketo、Sato Yusuke、Kume Haruki	4. 巻 26
2. 論文標題 Penile size and stretched rate in a Japanese male population: A cross sectional cadaveric study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 936～937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14052	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 Tsuboi Hajime、Yokota Isao、Miyamori Daisuke、Akasaka Yoshihisa、Yamada Ayumu、Ikegaya Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Age estimation based on visual parameters of the skin of cadavers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Skin Research and Technology	6. 最初と最後の頁 532～537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/srt.12683	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 -
1. 著者名 Takeshima Y、Suzuki M、Ikegaya H、Idota N、Kawai T、Sato Y、Kume H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Share A cross-sectional cadaveric study of the correlation between genital organ measurements, serum testosterone, and serum prostate-specific antigen levels in Japanese male subjects.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Physiol Pathological Pharmacol	6. 最初と最後の頁 36-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Ikegaya Hiroshi、Suzuki Motofumi、Kondou Hiroki、Kawai Taketo、Sato Yusuke、Kitamura Tadaichi、Kume Haruki	4. 巻 31
2. 論文標題 Nose size indicates maximum penile length	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Basic and Clinical Andrology	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12610-021-00121-z	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 -

1. 著者名 Uemura Takeshi, Akasaka Yoshihisa, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Correlation of polyamines, acrolein-conjugated lysine and polyamine metabolic enzyme levels with age in human liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05031 ~ e05031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05031	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 -

1. 著者名 Ichioka Hiroaki, Miyamori Daisuke, Ishikawa Noboru, Bandou Risa, Idota Nozomi, Kondou Hiroki, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Estimation of Cadaveric Age by Ultrasonography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 499 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10070499	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 -

1. 著者名 Miyamori Daisuke, Uemura Takeshi, Zhu Wenliang, Fujikawa Kei, Nakaya Takaaki, Teramukai Satoshi, Pezzotti Giuseppe, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 A Raman algorithm to estimate human age from protein structural variations in autopsy skin samples: a protein biological clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85371-7	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坪井 創, 池谷 博
2. 発表標題 ラマン分光法を用いた死体皮膚からの年齢推定
3. 学会等名 日本法科学技術学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷 博
2. 発表標題 皮膚の視覚的パラメータを用いた年齢推定
3. 学会等名 日本抗加齢医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂東 李紗, 市岡 宏顕, 熊谷 歩, 池谷 博
2. 発表標題 剖検体の口腔内所見の利用 (第2報)
3. 学会等名 日本法歯科医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 基文, 池谷 博, 井戸田 望, 川合 剛人, 佐藤 悠佑, 久米 春喜
2. 発表標題 日本人男性における陰茎長と陰茎伸長率
3. 学会等名 日本泌尿器科学会東部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井 創, 横田 勲, 高相 真鈴, 池谷 博
2. 発表標題 皮膚の視覚的パラメータを用いた死体の年齢推定
3. 学会等名 日本法科学技術学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Ikegaya, Marin Takaso, Daisuke Miyamori
2. 発表標題 Relationship between blood thyroglobulin value and cervical compression
3. 学会等名 Nordic Conference on Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂東李紗,市岡宏顕,熊谷 渉,池谷 博
2. 発表標題 演題剖検体の口腔内所見の利用(第1報) ~ 歯科疾患実態調査との差異 ~
3. 学会等名 日本法歯科医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池谷 博、櫻田 宏一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 金芳堂	5. 総ページ数 151
3. 書名 あたらしい検案・解剖マニュアル	

〔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
---------	---------