

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09281

研究課題名(和文)生前ストレス・年齢・体液を解析する法医メチレーションパネルの開発

研究課題名(英文) Development of the forensic methylation panel to estimate the physical stress, age and body fluid type

研究代表者

橋谷田 真樹 (HASHIYADA, Masaki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40374938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児の突然死例において、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドなメチル化解析によりATP10A遺伝子の関連が示唆された。さらに、ゲノムDNAの8遺伝子(ELOVL2, CCDC10, C1orf1, FHL2, ASPA, F5, KLF14, PDE4C)のメチル化部位16箇所を解析することにより、 ± 6 歳の精度で由来者の年齢推定が可能となった。そしてこれらを一度に解析することが可能なDNAメチル化解析系が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死因の判断が困難な乳幼児の突然死例において、メチル化解析により新たなバイオマーカーとなり得るATP10A遺伝子の関連が示唆され、今後の研究が期待される。また、現場に残された生体試料から由来者の年齢推定が ± 6 歳の精度で可能となり、犯罪捜査において非常に有用な方法が確立された。このように本研究の成果は、即座に法医実務に応用可能なものであり、メチル化解析の応用は今後さらなる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The association of the ATP10A gene was suggested by genome-wide methylation analysis in the case of sudden infant death. Furthermore, methylation analysis of 16 CpG sites of 8 genes (ELOVL2, CCDC10, C1orf1, FHL2, ASPA, F5, KLF14, PDE4C) could estimate the age of the donor within ± 6 years. Finally, the "Methylation Panel" which could analyze these at once was established.

研究分野：法医遺伝学

キーワード：メチル化解析 年齢推定 心臓突然死

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーが普及するようになり、メチル化解析に大きな変化が訪れた。それは、「DNA メチル化率」が計測できるようになったことである。これまでのサンガー法によるメチル化解析は、メチル化部位がメチル化されているか？否か？の判断しかできなかった。しかし、次世代シーケンサーを用いることで、メチル化部位がどの程度メチル化されているかその割合を観測することが可能となったのである。同じメチル化部位においても、一分子ごとにメチル化の状態は違っており、その一分子ごとのデータを次世代シーケンサーのみが検出できるからである。この新しいメチル化解析のツールを法医学的に応用するには何が適しているかを考えた時、真っ先に浮かんだのが、ストレスマーカーの探索である。法医実務においては、致死的不整脈や興奮性せん妄など、形態的にそのエビデンスが現れない病態に直面することが稀ではない。そのような場合、「精神的や身体的なストレスが契機となり、交感神経系の異常興奮が生じ、その結果、血圧や心拍の上昇による心負荷の亢進などにより、重篤なポンプ不全や不整脈が生じ、突然死がもたれられた可能性がある」と説明されることが多い。このように生前のストレス状態を遺体から推測することができれば、死因判断の一助となり、それが法医ストレスマーカーとなる。これまでに、mRNA や microRNA 等の研究も行ってきたが、確実なものはまだ見いだせていない。そこで、「DNA メチル化率」による生前のストレス状態を判断できるストレスマーカーの探索を計画した。さらに、メチル化解析は、ゲノムからの年齢推定や体液同定にも応用されている報告があることから、それらを一度に解析できる方法等が確立できれば大いに有用であると思われる。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いた新たなメチル化解析の法医学的応用が本研究のテーマである。応用の具体的な例としては、ストレスマーカーの探索、年齢推定、体液同定となる。

哺乳類のゲノムは、5'-CpG-3'配列のシトシンの5位がメチル化修飾を受けることがある。通常、遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドが修飾されることで、遺伝子発現が抑制され、ゲノムインプリンティング、X染色体不活化などの様々な生体现象が引き起こされている。メチル化と疾患の関係は特にガンや生活習慣病、精神疾患などで広く研究されており、心臓疾患とメチル化に関する報告も多い。そこで、剖検によっても死因診断となる情報が乏しい心臓突然死例などにおいて、メチル化を指標として生前のストレス状態を定量評価できるような、いわゆる法医ストレスマーカーの探索を行うこととした。これは、当初ラットを用いた動物実験を計画していたが、実際の剖検例において心筋の網羅的メチル化解析を行うこととした。さらに、DNA のメチル化は、その DNA を有しているヒトの年齢をある程度推定可能であるとの報告もある。これは海外のものであり、日本人でも同様な結果が得られるのか、追試を行うとともにさらなる精度の向上を求めてマーカーとなる遺伝子の新たな模索を行う。また、現場に残された癩痕等の検査も法医実務の重要な案件となる。まずは、ヒトか否かの人獣識別を行うが、ヒトだと判明した後はその癩痕は、唾液なのか、血液なのか、体液なのかを決定することが重要になる。犯罪成立条件や被疑者の告白の正当性を確認するためである。この体液痕の同意にもメチル化が指標になるとの報告があった。これら全てがメチル化解析の結果得られるものであるならば、次世代シーケンサーを用いて一度に解析可能ではないかと考えた。従って、ストレスマーカー、年齢推定、体液同定を行えるメチル化座位が確定したところで、全ての座位を同時に増幅できるマルチプレックス PCR 用プライマーを設計・合成、次世代シーケンサーでの解析系を構築し、いわゆる「法医メチレーションパネル」を完成させることが目的となる。

3. 研究の方法

(1) ストレスマーカーの探索としてゲノムワイドなメチル化解析

当講座にて解剖に付された突然死例のうち、3例の乳幼児突然死例(SID)(4M男児,4M女児,20M男児)と心筋炎1例(2M),窒息1例(1M),ダウン症候群1例(2M),そして若年性突然死(SUD)1例(15歳)の7例に加え、比較対象として脳内出血1例(57歳)の解析を行った。それぞれの心筋中隔を試料としてゲノムを抽出後、EZ-DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH)にてバイサルファイト処理を行った。全ゲノムを増幅後、酵素により全ゲノムを断片化し、Infinium MethylationEPIC BeadChip にハイブリさせ標識反応を行い、iSCAN system (Illumina)により蛍光色素のスキャンした。DNA のメチル化定量は GenomeStudio FrameWork ver.2011.1 および Methylation Module ver.1.9.0 ソフトウェアを使用して行い、全ゲノム上 86 万のメチル化サイトの情報を用いて、最初の乳幼児突然死 3 例群とそれぞれ死因が異なる 5 例との間でメチル化率の比較を行った。

(2) DNA メチル化解析による死亡時年齢の推定

当講座にて解剖に付され、死亡時年齢が判明しておりかつ外因死と診断された 40 症例(男性 25 名,女性 15 名,年齢 0-89 歳)の血液から DNA を抽出し、試料とした。EpiTect Fast DNA Bisulfite

Kit (QIAGEN)を用いてバイサルファイト処理を行った。ターゲットとした遺伝子は、C1orf1, CCDC10, ELOVL2, FHL2, SLC6A4, TRIM59, KLF14, F5, ASPA, PDE4C の計 10 遺伝子である。バイサルファイト後の配列に特有のプライマーを設計し、増幅を行った。次世代シーケンサー Ion PGM System(Thermo Fisher Scientific)を使用するため、専用のライブラリを作成し、テンプレートの調整を行った。得られたシーケンスデータを Plug-in: Methylation Analysis Amplicon にてメチル化定量解析を行った。さらに各 CpG 部位におけるメチル化率を算出し、回帰分析にてメチル化率と実年齢の相関関係を、さらに選択された複数のメチル化部位による重回帰分析によって推定年齢を検討した。

(3) メチル化解析による体液同定

既報(<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147973>)に従い、血液および唾液を識別可能な CpG 部位、血液：cg26285698, および cg03363565, 唾液：cg21597595, および cg15227982 を解析できるプライマーを設計した。剖検試料を用いて、前述の年齢推定と同じ機器・ソフトウェアを使用して解析を行った。

4. 研究成果

(1) ストレスマーカーの探索としてゲノムワイドなメチル化解析

SID と他の死因との間でのメチル化率を比較し、メチル化レベルが大幅に増加および減少している 50 の CpG サイトからなる 5 つのヒートマップを得ることができた。また、表 1 にそれぞれ上昇した 10 部位および減少した 10 部位を示した。遺伝子やそれに関連する病態的な情報はメチル化データベース「EWAS Atlas」(<https://bigd.big.ac.cn/ewas/index>)からのものである。SID vs 心筋炎では、心筋炎例において HLA 遺伝子関連部位のメチル化レベルが最も高く変化しており、これが心筋炎に関連している可能性があることが示唆された。SID vs 窒息では、メチル化レベルが著しく変化した部位は見られなかった。SID vs ダウン症候群では、IQGAP2, LMX1B, MSRA, PTPRN2, および DENND3 などのダウン症候群関連遺伝子においてメチル化レベルの大幅な増加または減少が見られた。SID と SUD では、メチル化レベルが大きく変化したすべての遺伝子は加齢に関連しているものであり、年齢差を反映している結果であると思われる。その他の比較結果では、加齢に関連する遺伝子が目立っていた ATP10A 遺伝子は、SID vs SUD を除くすべての比較結果で検出された ATP10A 遺伝子は ATPase クラス V タイプ 10A 酵素をコードし、喘息や慢性閉塞性肺疾患などのいくつかの疾患に関連しているとされている。この遺伝子のメチル化レベルは、データベースの情報によれば喫煙や大気汚染の影響を受けるとされているが、関連性を確認す

表 1. メチル化レベルが上昇した上位 10 位と減少した下位 10 位の CpG サイトと染色体および遺伝子名

比較例	SID vs 心筋炎			SID vs 窒息			SID vs ダウン症		
	TargetID	Chr	Gene_Name	TargetID	Chr	Gene_Name	TargetID	Chr	Gene_Name
Increase	cg26181139	6	HLA-C/HLA-C	cg24184919	3		cg16235707	5	IQGAP2
	cg04665049	14	HEATR4	cg09501102	9		cg10788927	21	COL6A1
	cg10788927	21	COL6A1	cg16032134	15	ATP10A	cg01978703	17	ABR
	cg00540295	9	FAM69B	cg15396877	1		cg06746449	12	
	cg14293999	14		cg08986950	5	ERAP1	cg27281836	11	FOLH1
	cg16032134	15	ATP10A	cg23622129	1		cg01127608	9	LMX1B
	cg14889167	5	FSTL4	cg09916840	16		cg16032134	15	ATP10A
	cg09501102	9		cg07336544	10	KCNMA1	cg22237495	1	
	cg11089291	11	PLEKHA7	cg18346634	1	OPRD1	cg03544800	1	DNTTIP2
	cg06282596	10	SORBS1	cg06082520	3	RSRC1	cg26077133	8	MSRA
Decrease	cg04083966	1	MYBPH	cg03071582	6		cg05210213	10	
	cg21234082	9	DAB2IP	cg15518264	2	NMS	cg12745536	7	PTPRN2
	cg18689402	3	ITPR1	cg18021992	20	ITPA	cg07895205	1	BCAR3
	cg14243991	2	ANO2	cg08514194	21	KRTAP12-4	cg20285224	22	ATPL1S
	cg01157718	6		cg25192647	6	PARK2	cg04083966	1	MYBPH
	cg00913770	5	TBCA	cg04054322	9		cg10224997	6	
	cg10121097	12	PRH1	cg10360725	8		cg03568595	20	
	cg21212401	9	EXD3	cg14457452	9	CDK5RAP2	cg11307715	8	DENND3
	cg19364778	15		cg03237181	2	STEAP3	cg00913770	5	TBCA
	cg10713875	19		cg20865618	7		cg04737440	2	

比較例	SID vs SUD[15yr]			SID vs 脳内出血		
	TargetID	Chr	Gene_Name	TargetID	Chr	Gene_Name
Increase	cg26077133	8	MSRA	cg01724587	4	IGFBP7-AS1
	cg12657416	9	FAM69B	cg21886864	11	ODZ4
	cg14293999	14		cg21598489	2	
	cg11013605	3		cg25388939	7	LOC646762
	cg19154950	1		cg00449715	7	CRYGN
	cg04399443	9		cg08867430	X	WWC3
	cg16343465	6		cg15909443	5	
	cg02909399	10	CACNB2	cg08514194	21	KRTAP12-4
	cg11128983	5	CPLX2	cg19384241	2	
	cg08856318	10	C10orf10	cg15366524	14	
Decrease	cg14152141	1		cg00939409	20	EYA2:EYA2
	cg15329552	15		cg05248234	17	FSCN2
	cg11835544	7	PTPRN2	cg27114706	12	
	cg18975548	11		cg16032134	15	ATP10A
	cg01157718	6		cg22237495	1	
	cg13072209	6	SLC22A23	cg01740135	X	PPP1R2P9
	cg00869309	19	ZNF835	cg21046080	12	GPR133
	cg05006879	12	CELA1	cg12074150	2	
	cg17248267	2	FEZ2	cg24184919	3	
	cg05125667	10	CHST3	cg25285484	16	ZNF597

るにはより多くの情報が必要である。ATP10A 遺伝子におけるメチル化レベルの変化は、SID vs SUD で観察されないことから、突然死と何らかの関連があるのでないだろうかと推察される。遺伝子のメチル化率の増加は、遺伝子発現の抑制を意味するが、それはメチル化の位置によって変化することから、遺伝子発現については他の実験方法で確認する必要がある。

(2) DNA メチル化解析による死亡時年齢の推定

解析した遺伝子領域にはそれぞれ 1～5 のメチル化部位が存在するが、メチル化率と実年齢の相関関係を見たところ、年齢の上昇に伴いメチル化率の増加する部位、逆に減少する部位が観察された。それらは年齢と正または負の相関を持ち、年齢推定には向いている部位だといえる。また、既報では相関があるとされていた部位で全く相関が見られなかったものもあった。各部位において修正済決定係数 ($adjR^2$) はかなりの幅を持って観察されたため、決定係数が 0.5 以上の部位を選択し、実年齢と推定年齢の相関関係を検討することとした。その結果、8 遺伝子、16 箇所のメチル化部位の解析結果から修正済決定係数 0.949 (標準偏差 6.04) が得られ (図 1)、 ± 6 歳での推定が可能であることが示された。今回の実証実験では、外因死のみの症例であるが、その他の死因や死後経過時間との関連も調査し、精度の向上を図りたい。

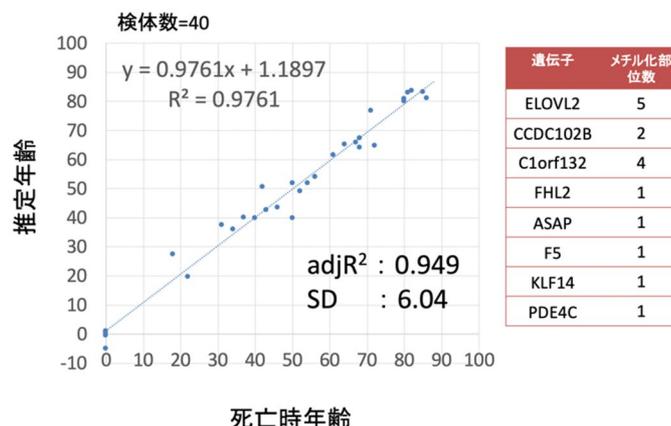


図 1 .Excel による重回帰分析の結果

(3) メチル化解析による体液同定

バイサルファイト処理後の増幅効率が非常に悪く、極めて微量なライブラリしか調整できなかった。そのためシーケンスデータも十分ではなく、得られたリード数は非常に少なく、血液、および唾液を識別できるほどの十分な結果が得られなかった。これは最初のプライマー設計に問題があったためだと思われる。メチル化解析において、Ion PGM System は 200bp の長さまでしかシーケンスを行えない制限がある。そのため非常に短い領域を増幅することになり、遺伝子全体をカバーするにはいくつもの増幅領域を設定しなければならない。バイサルファイト処理された並列はシトシンやチミンが複数並ぶ配列になり、増幅させるためのプライマー作成が非常に困難であった。そのため十分な増幅産物が得られず、さらに、プライマーダイマーの生成、非特異的な増幅などが発生し、増幅の段階でのエラーが多数発生してしまった。残念ながら、研究期間中にプライマーの再設計、その後の再解析までは及ばなかった。

最終的に、年齢推定に有効な 8 遺伝子 (ELOVL2, CCDC10, C1orf1, FHL2, ASPA, F5, KLF14, PDE4C)、および突然死に関連があると思われる ATP10A 遺伝子のメチル化解析を行うための実験系、いわゆる法医メチレーションパネルを確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tsuji S, Suruda C, Hashiyada M, Kimata T, Yamanouchi S, Kitao T, Kino J, Akane A, Kaneko K.	4. 巻 47(3)
2. 論文標題 Gut Microbiota Dysbiosis in Children with Relapsing Idiopathic Nephrotic Syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American journal of nephrology	6. 最初と最後の頁 164-170
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 橋谷田真樹, 大林将弘, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝, 大内 司, 舟山真人.	4. 巻 26(1)
2. 論文標題 165 SNPsを用いた日本人を含む人種間の集団遺伝学解析 - 第2報 -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 174-177
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 Hashiyada Masaki, Adachi Noboru, Akane Atsushi, Matsumoto Tomohiro, Yoshimura Sumitaka	4. 巻 6
2. 論文標題 The detailed examination of the human ancient mitochondrial DNA using the Ion PGM? System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Forensic Science International Genetics Supplement series	6. 最初と最後の頁 e156 ~ e158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.061	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 橋谷田真樹, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝, 大内 司, 舟山真人	4. 巻 vol.25
2. 論文標題 HID-Ion AmpliSeq™ Ancestry Panel による日本人SNPデータベースの構築	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 p154~p156
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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hashiyada M.
2. 発表標題 Ancestry informative SNPs and mtDNA analysis using the Ion PGM System.
3. 学会等名 Human Identification Solutions (HIDS) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashiyada M, Obayashi M, Matsumoto T, Yoshimura S, Akane A.
2. 発表標題 Age estimation based on DNA methylation analysis using blood samples.
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 Kobayashi M, Hashiyada M, Takeshita H, Mori S, Akane A, Fukunaga T, Mizukami H
2. 発表標題 Identification of cardiac disease associated gene in sudden cardiac death using massively parallel sequencing
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 Matsumoto T, Hashiyada M, Yoshimura S, Obayashi M, Akane A
2. 発表標題 Application of a monolithic silica monoSpin C18 cartridge to postmortem drug analysis in tandem liquid chromatography/mass spectrometry
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 Obayashi M, Yoshimura S, Hashiyada M, Matsumoto T, Akane A
2. 発表標題 The distribution in the river and on the river-bed around Kansai Medical University
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 大林将弘, 橋谷田真樹, 松本智寛, 吉村澄孝, 赤根 敦
2. 発表標題 次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析と死亡時年齢との相関
3. 学会等名 日本DNA多型学会第27回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋谷田真樹, Runa Daniel, 赤根 敦, 松本智寛, 大林将弘, 吉村澄孝
2. 発表標題 新たなAncestry informative SNP markers kitの開発
3. 学会等名 第65日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Hashiyada, Noboru Adachi, Atsushi Akane, Tomohiro Matsumoto, Sumitada Yoshimura .
2. 発表標題 The detailed examination of the human ancient mitochondrial DNA using the Ion PGMTM System
3. 学会等名 27th Congress of the International Society for Forensic Genetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Hashiyada
2. 発表標題 Various sequencing technologies, including NGS in forensic DNA profiling
3. 学会等名 DNA sequencing technologies and their application in practice (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋谷田 真樹, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝磨
2. 発表標題 突然死例におけるmolecular autopsyの検討とその意義 - 第2報 -
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋谷田真樹, 大林将弘, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝
2. 発表標題 Ancestry informative markers (AIMs) による日本人を含む集団遺伝学的解析
3. 学会等名 第64回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋谷田真樹, 大林将弘, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝
2. 発表標題 165SNPsを用いた日本人を含む人種間の集団遺伝学解析 -第2報-
3. 学会等名 日本DNA多型学会第26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
--	---------------------------	-----------------------	----