

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09910

研究課題名(和文) DNAメチル化を指標としたアジア系の年齢推定法の開発と展開

研究課題名(英文) Development of Asian age prediction method based on DNA methylation

研究代表者

岡 広子(Oka, Hiroko)

広島大学・医系科学研究科(歯)・特任講師

研究者番号：60452588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：災害や犯罪の犠牲者、あるいは試料の年齢推定は身元確認や犯罪捜査できわめて重要である。本研究ではリアルタイムPCR法によるDNAメチル化スコアを用い、形態的に類似しているアジア系の人々で共通の口腔内試料(歯、唾液)から年齢推定法の開発を目指して検討を行った。その結果、特に高解像度融解曲線分析によるDNAメチル化スコアを指標とする年齢推定を行うにあたっては、唾液検体のターゲット(既報A、B)および歯牙検体(既報A、C)は有用な年齢推定指標なること、メチル化スコアを用いた年齢推定にはアジア系の人々の間であっても国籍等のポピュレーションの影響を反映した補正が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化を指標とした年齢推定は、その精度の報告がなされる一方で検証に用いられた検体の人種については注目している報告はみられなかった。

唾液及び歯牙検体を用いた本研究の結果、DNAメチル化による年齢推定は形態学的に類似しているアジア系の人々の間であっても国籍等その集団ごとに補正が必要であることが示唆された。また、歯根最表層のDNAメチル化スコアと年齢との関連が示され、これまで粉碎により大きく損なわれていた歯牙検体の概形維持が可能となったことから遺族感情や人類学分野の資料保存の面においても意義ある成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The Age estimation of disaster victims, crime victims, or sample materials are extremely important on identification and criminal investigations. In this study, we examined the age estimation methods using the DNA methylation score by real-time PCR with oral samples (teeth, saliva) for the development the common methods among Asian people who are morphologically similar.

As results, it is revealed that the saliva sample targets (reported A and B) and tooth samples (reported A and C) are useful age estimation indexes, especially when performing age estimation using the DNA methylation score as an index by high-resolution melting curve analysis. In addition, it was suggested that age estimation using methylation scores requires corrections that reflect the effects of population such as nationality, even among Asians.

研究分野：法歯学

キーワード：年齢推定 メチル化 口腔内試料

## 1. 研究開始当初の背景

災害や犯罪の犠牲者、あるいは試料の年齢推定は身元確認や犯罪捜査できわめて重要である。法医学分野で利用されている年齢推定法は、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。

同じ地域に住む人は形態学的に類似点が多いことが知られる一方で、生化学的年齢推定については相違について検証がほとんどなされていない。近年の災害や犯罪はグローバル化しており、対象者も多様化している。平成 20 年代後半において訪日外国人旅行者および日本国内の在留外国人数は年々増加しており、その大多数はアジア出身者であった。多地域出身の旅行者・生活者の混在が否定できない今日、年齢推定における生化学的指標の信頼性の根拠の確立は喫緊の課題である。

エピジェネティックな変化は、遺伝的要因 (Bell et al, 2011) と環境因子 (Feil and Fraga, 2011) の両方の影響を反映していると考えられ、人種間で異なることが示されている (Barfield et al, 2014)。その中でも、DNA メチル化は近年、年齢推定にも用いることが可能との報告がされ、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。唾液や歯についても、DNA メチル化が年齢推定に有用であるとの報告がなされている。その一方で、年齢推定や年代推定に関連した DNA メチル化の遺伝的な差異についての検証が未だほとんどなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、アジア系の人々で使用可能な高精度で実用的な DNA メチル化による年齢推定法の開発を目的とし、唾液および歯牙検体の DNA メチル化に注目して以下の 3 点を研究目標とした。

1. 唾液および歯牙検体の年齢推定指標としての DNA メチル化のターゲットを抽出する。
2. 唾液および歯牙検体のリアルタイム PCR を用いた DNA メチル化を指標とする年齢推定法を開発し精度を検証する。
3. 日本人年齢推定モデルのアジア多地域出身者の年齢推定への応用を検証し、考究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液および歯牙検体の年齢推定指標として DNA メチル化のターゲットの決定

年齢推定について、唾液では ELOVL2 および EDARADD が、歯牙においては部位ごと ELOVL2、FHL2、PENK の CpG 領域の DNA メチル化が報告されていた。予備実験として、唾液採取から DNA 抽出までの経過時間が高解像度融解曲線分析によって得られるメチル化スコアに与える影響を検討したところ、-20 保存では 3 か月の間に大きな変化が認められないのに対し 4 保存では 1 か月のうちにメチル化スコアが変動することが明らかとなった。そのため、本研究においては採取後 DNA 抽出まで -20 で保存した唾液検体を用いることとした。さらに、歯牙についてはセメント質および歯髄の成分がほかの部位よりも年齢推定に適しているとの報告 (Higgins et al., 2015; Allentoft et al., 2015; Malaver and Yunis, 2003) があった。そこで、採取しやすい歯根表面の DNA を検体として用いた。また、歯種間での歯根完成期の違いを考慮して最終的に歯牙検体を用いた本研究の検討には検体数が最も多く得られた日本人第三大臼歯 47 検体を用いた。

これら、唾液および歯根表面 (セメント質) 検体から DNA を抽出し、バイサルファイト処理後を行った。その後、唾液や血液検体で報告されている CqG ターゲットのプライマー (Hamano et al. 2016, 2017) およびその近傍に設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、メチル化感受性高解像度融解曲線分析によって得られるターゲット候補のメチル化スコアと年齢との関連を検証した。

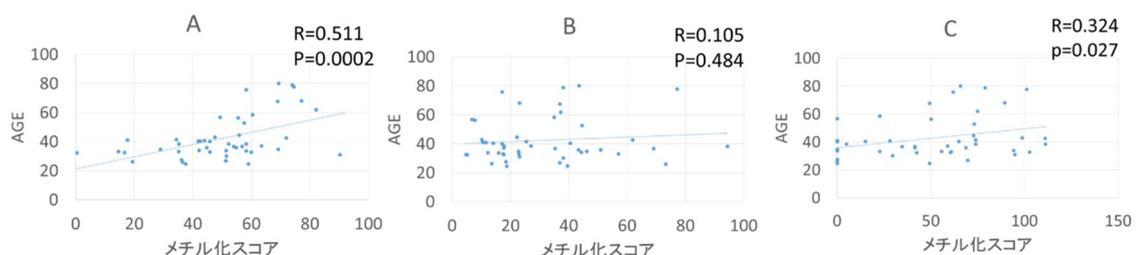
### (2) 年齢推定モデルのアジア多地域出身者の年齢推定への応用の検証

唾液検体 (日本人 28 名およびインドネシア人 32 名) DNA に対して安定してメチル化スコアが検出できた男・女) および国 (日本・インドネシア) を説明変数とし、実年齢を目的変数とする重回帰分析を行い、各変数の影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1)-1 日本人第三大臼歯の DNA メチル化スコアと実年齢

図 1. メチル化スコアと実年齢の関連 (上下顎第三大臼歯)



唾液や血液において年齢との関連が報告されている既報のターゲット A ( $R=0.511$ ,  $p=0.0002$ ) および C ( $R=0.324$ ,  $p=0.027$ ) において、第三大臼歯歯根尖表面 DNA と実年齢に正の相関関係が認められた (図 1)。しかしながら、上下顎に分けた検討では、ターゲット A は上下顎それぞれのメチル化スコアと実年齢に相関関係が認められる一方で、ターゲット C については相関関係が認められなかった (表 1)。性別 (男・女)、位置 (上顎・下顎)、プライマー (A・C) を目的変数とした解析でも、プライマー A がターゲットとするメチル化のスコアが実年齢に有意な影響を与えていることが明らかとなった (表 2)。

### (1) -2 日本人唾液の DNA メチル化スコアと実年齢

日本人検体のみでまず検討を行ったところ、唾液や血液検体で実年齢との関連が報告されていたターゲット A および B において、実年齢とメチル化スコアに相関が認められた。

### (2) 日本人とインドネシア人の唾液メチル化スコアと実年齢の関連

日本人とインドネシア人唾液検体の DNA メチル化スコアを用いた重回帰分析の結果、ターゲット A ( $P=0.000$ ) および B ( $P=0.000$ ) に加えて検体提供者の国籍 ( $P=0.001$ ) も実年齢に有意な影響を与えていることが明らかとなった (表 3)。

本研究で唾液検体を用いて検討を行ったところ、メチル化スコアによる年齢推定においては国籍 (日本・インドネシア) も有意な影響を与えていた。今回ターゲットとしている部位についての高解像度融解曲線分析で得られたメチル化スコアを用いた年齢推定式を異なるポピュレーションに適用するには国籍等を考慮した何らかの補正が必要であることが示唆された。また、予備実験で明らかとなったように、唾液検体は採取後の保存状態によってメチル化スコアが変化するため、年齢推定に用いるには解析対象とする検体の保存状態も考慮する必要性が改めて示唆された。

第三大臼歯検体を用いた検討では唾液検体や血液検体で実年齢との関連が確認されたにターゲット B の領域で年齢との関連が検出できなかった。また、ターゲット C においても相関は弱かった。メチル化は臓器や組織によりその変化や変化する領域が異なることが知られている。今回はこれら唾液や血液検体で年齢との関連が報告されている CqG ターゲットのプライマーだけではなく歯において実年齢との関連が報告されている CqG ターゲットを含むプライマーについても複数設定してリアルタイム PCR の高解像度融解曲線分析を行ったものの、設計したプライマーで得たメチル化スコアと実年齢との関連については明らかにすることができなかった。本研究期間中に他の研究グループから類似のターゲットに対して通常のリアルタイム PCR (CT 法) によって歯牙検体から得られたメチル化スコアと実年齢の関連について報告がなされていることから、標的とする遺伝子自体は妥当であったと考えられる。高解像度融解曲線分析を用いてメチル化解析する場合、プライマーの設計や実験条件などを今後検討していく必要があると考えられた。

以上のことから、リアルタイム PCR の高解像度融解曲線分析を用いて DNA メチル化を指標とする年齢推定を行うにあたり、1. プライマー設計などの調整が今後必要であるものの唾液検体のターゲット (既報 A、B) および歯牙検体 (既報 A、C) は有用な年齢推定指標なること、2. メチル化スコアを用いた年齢推定にはアジア人の間であっても国籍等のポピュレーションの影響を反映した補正が必要であることが示唆された。

表 1. メチル化スコアと実年齢の相関係数 (上顎・下顎別)

	A	B	C
上顎第三大臼歯 N=32	R=0.459 P=0.008	R=-0.0214 P=0.907	R=0.285 P=0.114
下顎第三大臼歯 N=15	R=0.657 P=0.008	R=0.333 P=0.226	R=0.423 P=0.116

表 2. 年齢を目的変数とした重回帰分析の結果 (上下第三大臼歯)

$R(2)=0.323$   $p=0.005$

	95%信頼区間 下限	95%信頼区間 上限	標準誤差	P値
A	0.209	0.759	0.136	0.001***
B	-0.323	0.100	0.105	0.294
C	-0.116	0.172	0.071	0.696
性別	-11.935	4.880	4.163	0.402
上下	-15.047	4.161	4.755	0.259

表 3. 年齢を目的変数とした重回帰分析の結果 (唾液)

$R(2)=0.350$   $p=0.000$

	95%信頼区間 下限	95%信頼区間 上限	標準誤差	P値
A	0.186	0.585	0.100	0.000***
B	-0.550	-0.171	0.094	0.000***
国籍	-18.977	-5.292	3.414	0.001***
性別	-9.640	5.034	3.661	0.532

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4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 DNAメチル化を指標としたアジア系の年齢推定に向けた検討 - 日本人とインドネシア人の唾液試料の比較 -
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 岡 広子
2. 発表標題 歯のDNAメチル化を指標とした高解像度融解曲線分析による年齢推定に向けた検討 - 第2報
3. 学会等名 日本法歯科医学会第14回学術大会
4. 発表年 2020年

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高解像度融解曲線分析による年齢推定に向けた検討
3. 学会等名 日本法歯科医学会第13回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡広子
2. 発表標題 DNAメチル化を指標としたアジア系の年齢推定法開発に向けた検討
3. 学会等名 日本法歯科医学会第12回学術大会
4. 発表年 2018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)	
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)	

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