

令和元年6月3日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26293162

研究課題名(和文) 年齢及び身体的特徴の推定による法医学的プロファイリング法の開発

研究課題名(英文) Development of forensic profiling system for prediction of physical features

研究代表者

飯田 礼子 (Iida, Reiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：40139788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、血液などから、その試料が由来する人物の年齢・身長などを推定する方法の開発である。本研究の成果を以下に示す。

年齢推定の指標となる生体分子(M-LPHなど)についてRNAレベルでの定量法を確立した。年齢依存性発現生体分子M-LPHの機能を明らかにするため、M-LPHタンパク質と相互作用する分子を検索し、H2AXなどの分子を同定した。また、M-LPHがミトコンドリアDNA損傷に伴うミトコンドリア機能不全を抑制することを明らかにした。身長との相関が予想されるDNA遺伝的多型の簡便な検査法を確立した。本分析法は身体的特徴の推定指標のスクリーニングに有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、DNA検査法の発展より個人識別(ご遺体が誰であるか、また、血液、体液、臓器などが誰に由来するかを決定すること)の精度は飛躍的に向上した。しかし、比較すべき対象が入手できない未知の検査試料に関しての個人識別は困難を伴い、有用な情報となりうる年齢・身体的特徴などの推定法は未だ確立していない。本研究では年齢や身長の推定に有用な指標のスクリーニングと、指標となる生体分子の定量法の開発および生理的機能の解析を実施した。本研究の進展により、今後、法医学的試料から該当者の年齢や身長の推定が可能となっていくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was the development of novel methods for estimation of age and for screening of trait-related CNVs. Consequently, the following results were obtained: (1) Methods for the determination of age-related biomolecules such as M-LPH at the RNA levels were developed. (2) Proteins that interact with M-LPH (H2AX etc.) were identified and it was suggested that M-LPH is involved in the maintenance of mtDNA and protects cells from mitochondrial dysfunction. (3) A simple method for screening of trait-related CNVs, which is useful for forensic casework, was developed.

研究分野：法医学

キーワード：社会医学 生体分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昨今の犯罪の悪質・巧妙化に伴い、法医鑑識科学分野における被疑者や被害者などを特定するための個人識別精度の向上が要請されている。近年、分子生物学の進歩に立脚した DNA 多型検査 証拠試料の DNA 型と関係者 (被疑者) 試料の DNA 型の異同識別 による個人識別精度は飛躍的に向上した。しかし、血液、体液や組織などから、年齢や身体的特徴を推定するマーカーについては、アスパラギン酸のラセミ化やテロメア長の短縮などを指標とする年齢推定法や目や髪の色を決定する SNP などが散見されるに過ぎず、これらの指標によって年齢や身体的特徴を絞り込むには精度が極めて不十分である。報告者はこれまで、年齢依存性発現生体分子の研究に取り組み、年齢依存性発現パターンを示す未知の生体分子 (M-LPH、Rhith など) を見出した。これらの分子を年齢推定マーカーとして使用すれば、法医学的試料から該当者の年齢幅の推定を行うことは十分可能と考えられる。一方、身体的特徴に相関する DNA マーカーについては、日本人の眼・毛髪・皮膚の色を特徴付ける SNP の集団遺伝学的解析を実施した。このような従前の研究基盤に基づき、年齢推定マーカー及び身体的特徴推定マーカーを用いた profiling を着想し本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を達成できるよう研究を推進した。

- (1) **年齢推定マーカーの法医学的実用化**: 従前の研究において同定した年齢依存性発現生体分子について検出・定量法を確立し、年齢推定マーカーとしての有用性について検討する。
- (2) **年齢依存性発現生体分子の病態生理学的機能の解明**: これまでにおよび新規に見出した年齢依存性生体分子の生理的機能や加齢・老化・疾患との関連を解明する。
- (3) **身体的特徴推定マーカーの開発と法医学的実用化の検証**: 身体的特徴の間に相関が予測される DNA 多型のうち、一塩基多型 (SNP) とコピー数多型マーカー (CNV) に焦点を絞って判定法を確立し、集団遺伝学調査、形質との相関性解析を実施し有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 年齢依存性発現生体分子 mRNA の Real-time PCR による定量

年齢依存性発現生体分子 (M-LPH および Rhith) の mRNA の定量は、TaqMan プローブ法により行った。また、M-LPH の 2 種のバリエーションの mRNA の個別定量には、SYBR Green I 法を使用した。

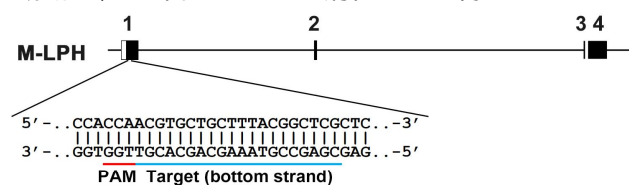
#### (2) M-LPH と相互作用する生体分子の精製・同定および細胞内局在解析

ヒト M-LPH 発現細胞株 (乳ガン細胞 MDA-MB-453 および正常腎上皮細胞 HK-2) の細胞溶解液を材料とし、Dynabeads Co-Immunoprecipitation kit (Invitrogen) を用いた免疫沈降によって M-LPH と相互作用する分子を分離・精製した。精製サンプルをポリアクリルアミド電気泳動で分離後、銀染色を施した上でそれぞれのバンドを切断し、ゲル内トリプシン消化により得られたペプチドを LC-MS/MS 解析に供した。細胞内局在の解析には共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

#### (3) CRISPR-Cas9 技術による M-LPH

##### ノックアウト HepG2 細胞の作製

CRISPR-Cas9 の発現ベクターは、M-LPH 遺伝子 exon 1 内の 20 塩基を標的とするオリゴ DNA を pX459 (Addgene



WT	5'...CCACCAACG-TGCTGCTTTACGGCTCGCTC...3'
KO	clone 1 5'...CCACCAACG T TGCTGCTTTACGGCTCGCTC...3'
	clone 2 5'...CCACCAACG T TGCTGCTTTACGGCTCGCTC...3'

図 1 CRISPR-Cas9 技術による M-LPH ノックアウト細胞の作製

plasmid ID: 48139) に挿入して作製した (図1)。アリル内への塩基の挿入は、目的領域を含むゲノム領域の塩基配列解析によって確認し、タンパク質レベルでの発現消失はWestern blot により確認した。

#### (4) mtDNA損傷 およびミトコンドリア機能の解析

mtDNA 損傷はReal-time PCRにより既報 (Iida et al., Free Radic Biol Med, 87:336-345, 2015) に従って解析した。ミトコンドリア膜電位の変化は Cell Meter JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay kit (ATT Bioquest) により検出した。細胞内活性酸素の検出は、DCF-DA法およびMitSOX染色法により行った。

#### (5) DNA 試料

DNA 試料は、島根大学医学部倫理委員会の承認 (No. 1678) を得て解剖時に採取した日本人男女の心臓血より QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) を用いて抽出した。

#### (6) キメラプラスミドベクターの作製

ゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅した *ZNF80*, *LTBP1*, *ETV6* および *NEDD4L* 遺伝子特異的な配列を、pcDNA2.1 vector (Invitrogen) にそれぞれ挿入した (pcDNA2.1/*ZNF80*, pcDNA2.1/*LTBP1*, pcDNA2.1/*ETV6*, pcDNA2.1/*NEDD4L* と表す)。さらに、*ZNF80* 特異的な配列および目的CNV (*LTBP1*, *ETV6*, *NEDD4L*) に特異的な配列をそれぞれ1コピーずつ含むキメラプラスミド (*LTBP1*-*ZNF80*, *ETV6*-*ZNF80*, *NEDD4L*-*ZNF80*) をHortonらの方法 (Gene 77, 61-68, 1989) にしたがって作製した。

#### (7) CNV解析法

Q-PCRは、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。各 CNVの解析に用いる *ZNF80* および目的CNV遺伝子の検量線は、(6) で得たキメラプラスミドの希釈列を鋳型とした定量的PCRによりそれぞれ作成した。2倍体あたりのCNVコピー数は式 [目的CNVの増幅産物量 / *ZNF80*の増幅産物量 × 2] によって算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 年齢推定マーカーの定量

初めに、当初の計画に従って年齢依存性発現分子のタンパクレベルでの定量 (ELISA法) を試みたが抗体の特異性が低く、いずれも満足のいく結果が得られなかった。そこで、M-LPH およびRhithのそれぞれについて、Real-time PCR (TaqManプローブ法) を用いたRNAレベルでの定量法を開発した。また、M-LPHには2種類のバリエーション (M-LPH1、M-LPH2) が存在し、局在や生理的機能が異なることが予測されるが、前出のTaqManプローブ法では両バリエーションとも検出対象となることから、個別の解析が不可能であった。そこで、個々のバリエーションの定量法 (SYBR Green法) をそれぞれ確立した。この定量法により、培養細胞における2種類のバリエーションの発現を分析したところ、各バリエーションの分布は培養細胞ごとに異なることが示された (図2)。

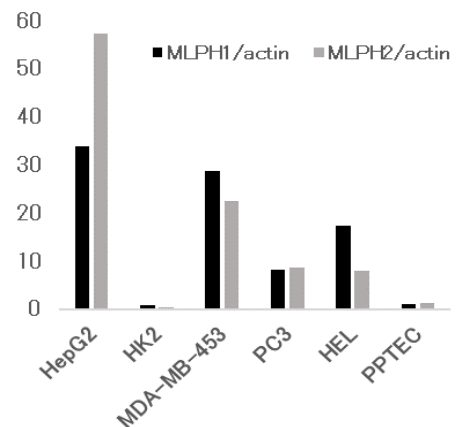


図2 M-LPH バリエーションの各種培養細胞における分布

#### (2) 年齢依存性発現生体分子の病態生理学的機能の解明

##### ◆ M-LPH と相互作用する生体分子の同定

免疫沈降法およびLC-MS/MSを利用してM-LPHと相互作用する分子の同定を試みた。その結果、H2A histone family, member X (H2AX)、ribosomal protein S14 (RPS14)、ribosomal protein S3 (RPS3) およびB-cell receptor-associated protein 31 (Bap31) の4つの分子が同定され

た。H2AX および RPS3 は DNA の損傷や修復との関連が報告されているタンパク質である。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察や細胞構成要素の分画などにより、M-LPH は主として細胞核に局在し、その他、ミトコンドリアの一部や細胞質にも局在していることが示された。ミトコンドリアに局在する M-LPH は点状に分布し、mitochondrial transcription factor A (TFAM) やミトコンドリア DNA の一部と共局在していることから、M-LPH はミトコンドリア核様体あるいはその近傍に局在するものと考えられた。

#### ◆ M-LPH の発現抑制と mtDNA 損傷

ヒト培養細胞(HK-2)に電子伝達系の阻害剤であるアンチマイシン A (AMA) 処理を施すと、ミトコンドリアに局在する M-LPH の foci が顕著に増加した。これらの foci は DNA 修復関連酵素 DNA polymerase および DNA ligase 3 と共局在していた。また、RNAi により 発現を抑制した細胞では、mtDNA 損傷の増加や mtDNA がコードする遺伝子の発現減少が認められ、対照細胞 に比べて AMA 処理後の活性酸素の増加やミトコンドリア膜電位の低下がより顕著であった(図3)。したがって、M-LPH は mtDNA 損傷に伴うミトコンドリア機能不全を抑制する機能を持つことが示唆された。

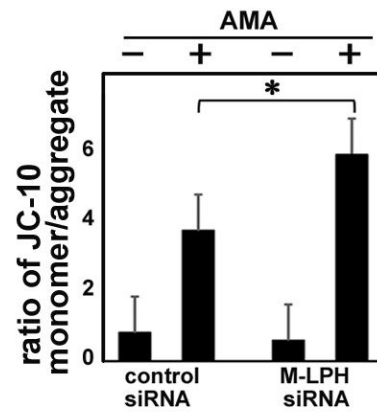


図3 M-LPH の抑制は AMA によるミトコンドリア膜電位低下を促進する

#### ◆ M-LPH ノックアウト細胞の作製

M-LPHの生理的機能をより明確にするために、ヒト乳癌およびヒト肝臓ガン細胞(MDA-MB-453およびHepG2)について、M-LPH 遺伝子を標的としたCRISPR-Cas9システムによるゲノム編集(遺伝子ノックアウト)を試みた。その結果、ヘテロ変異型(M-LPH+/-)のMDA-MB-453細胞、さらに、ホモ変異型(M-LPH-/-)のHepG2細胞をそれぞれ得ることができた。M-LPH 変異型細胞はいずれも野生型細胞に比べて増殖速度が明らかに低下していた(図4)。M-LPHの生理的機能をより明確にするため、M-LPH遺伝子ノックアウト肝臓細胞(HepG2, M-LPH-/-)を用いて、野生型細胞(HepG2, M-LPH+/+)との比較解析を行い、以下のような結果を得た。

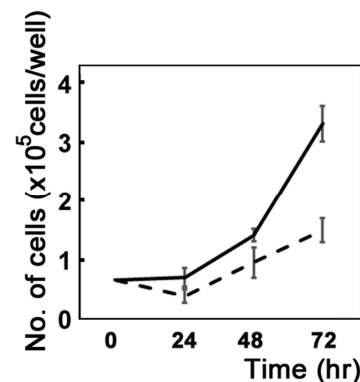


図4 M-LPH遺伝子ノックアウトによる増殖速度の低下(HepG2)

ノックアウト細胞ではDNA損傷マーカー(-H2AX、8-OHdG)の明らかな増加が認められた(図5)。したがって、M-LPHは核DNAおよびミトコンドリアDNA(mtDNA)の維持に関与することが示唆された。

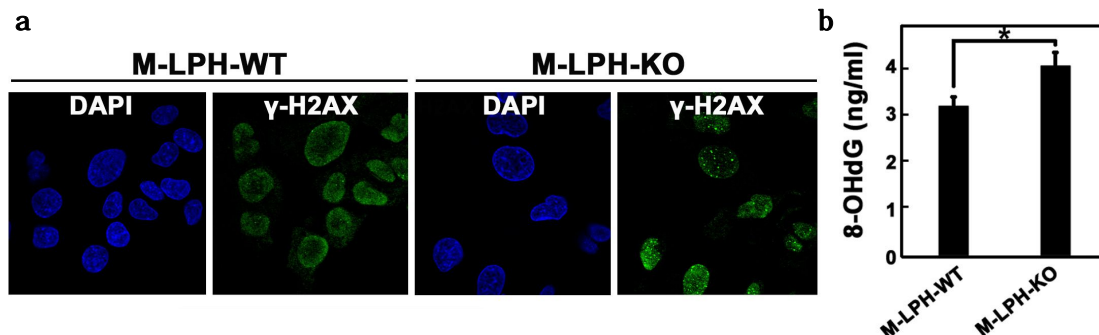


図5 M-LPH遺伝子ノックアウトによるDNA損傷マーカー(a: -H2AX、b: 8-OHdG)の増加

ノックアウト細胞ではmtDNA損傷の増加が認められた一方、mtDNAにコードされた遺伝子の発現量(mRNA量)、細胞内活性酸素量、ATPレベル、ミトコンドリア膜電位などに変化は認められなかった。したがって、ノックアウト細胞ではミトコンドリア機能が維持されていると考えられた。

ノックアウト細胞ではmtDNAコピー数が約1.7倍まで増加していた(図6)。このことから、mtDNA損傷により引き起こされるミトコンドリア機能の低下の阻止にはmtDNAコピー数の増加が関与していると考えられた。

### (3) 身体的特徴推定マーカーの開発と検証

今回開発したReal-time PCRによるCNV解析において、リファレンス遺伝子*ZNF80*とそれぞれの目的CNVの増幅効率に大きな相違は無かったことから、適切な正規化と正確な定量が十分可能と考えられた。そこで、約100名の日本人男女のDNAを用いて、身長との相関が予想される*ZNF80*、*LTBP1*、*ETV6*および*NEDD4L*遺伝子のCNVについてのCNV型判定を実施した。しかしながら、いずれも身長とコピー数との間に有意な相関は認められなかったことから、より大きな集団での検討が必要である。また、本法はCNVのスクリーニング法として十分有用であることが示され、新たなCNVのスクリーニングを実施する必要があると考えられた。

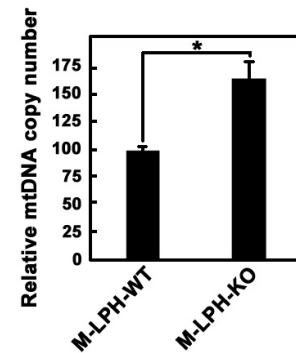


図6 M-LPH遺伝子ノックアウトによるmtDNAコピー数の増加

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, K. Yamada, Y. Takinami, H. Takeshita, R. Iida, T. Yasuda. Low genetic heterogeneity of copy number variations (CNVs) in the genes encoding the human deoxyribonucleases 1-like 3 and II potentially relevant to autoimmunity. *PLoS ONE*, 14, e0215479, 2019, 査読あり  
DOI: 10.1371/journal.pone.0215479
2. M. Ueki, H. Takeshita, J. Fujihara, K. Kimura, R. Iida, T. Yasuda. Analysis of CNV (copy number variation) in the *NEDD4L* gene potentially implicated in body height in Japanese population. *Legal Med.*, 37, 83-85, 2019, 査読有  
DOI: 10.1016/j.legalmed
3. R. Iida, M. Ueki, T. Yasuda. Knockout of Mpv17-like Protein (M-LPH) Gene in Human Hepatoma Cells Results in Impairment of mtDNA Integrity through Reduction of TFAM, OGG1 and LIG3 at the Protein Levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 6956414, 2018, 査読有  
DOI: 10.1155/2018/6956414
4. M. Ueki, H. Takeshita, N. Utsunomiya, T. Chino, N. Oyama, M. Hasegawa, K. Kimura, J. Fujihara, R. Iida, T. Yasuda. Survey of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding human deoxyribonuclease I-like 2 producing loss of function potentially implicated in the pathogenesis of parakeratosis. *PLoS ONE*, 12, e0175083, 2017, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0175083
5. M. Ueki, H. Takeshita, J. Fujihara, K. Kimura, R. Iida, T. Yasuda. Simple screening method for CNV copy number variations associated with physical feature. *Legal Med.*,

25, 71-74, 2017, 査読有

DOI: 10.1016/j.legalmed.2017.01.006

6. M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, R. Iida, H. Takeshita, T. Yasuda. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the human deoxyribonuclease (DNase) family potentially relevant to autoimmunity. *Immunol. Invest.*, 45, 406-419, 2016, 査読有

DOI: 10.3109/08820139.2016.1157813

7. R. Iida, M. Ueki, T. Yasuda. Identification of interacting partners of human Mpv17-like protein with a mitigating effect of mitochondrial dysfunction through mtDNA damage. *Free Radical Biol. Med.*, 87, 336-345, 2015, 査読有

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.008

8. J. Fujihara, T. Yasuda, R. Iida, M. Ueki, R. Sano, Y. Kominato, K. Kimura, H. Takeshita. Global analysis of genetic variations in a 56-bp variable number of tandem repeat polymorphisms within the human deoxyribonuclease I gene. *Legal Med.*, 17, 283-286, 2015, 査読有

DOI: 10.1016/j.legalmed.2015.01.005

9. M. Ueki, K. Kimura, J. Fujihara, H. Takeshita, R. Iida, T. Yasuda. Identification of functional SNPs potentially served as a genetic risk factor for the pathogenesis of parakeratosis in the gene encoding human deoxyribonuclease I-like 2 (1L2) implicated in terminal differentiation of keratinocytes. *Gene*, 561, 15-22, 2015, 査読有

DOI: 10.1016/j.gene.2015.01.006

#### 〔学会発表〕(計8件)

1. 飯田 礼子、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり、安田 年博. 定量的 real-time PCR を用いた簡便な CNV 解析法の応用 NEDD4L 遺伝子. 第 27 回日本 DNA 多型学会学術集会. 2018.
2. 飯田 礼子、安田 年博、植木 美鈴、竹下 治男. ミトコンドリア DNA 維持における Mpv17-like protein の役割. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018.
3. T. Yasuda, R. Iida, M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, K. Yamada, H. Takeshita. Survey of copy number variations (CNVs) associated with body height. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. 2018.
4. 飯田 礼子、安田 年博、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり. 法医学的個人識別に有用な CNV のスクリーニング. 第 25 回日本 DNA 多型学会学術集会. 2016.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究協力者

研究協力者氏名：植木 美鈴

ローマ字氏名：(UEKI, misuzu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。