

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860472

研究課題名(和文) DNAメチル化パターンを指標とした各種体液証明法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for body fluid identification based on DNA methylation.

研究代表者

渡邊 賢 (Watanabe, Ken)

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号：20532047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：精液特異的脱メチル化サイトDACT1及び血液特異的メチル化サイトcg06379435について、MethylLight法による定量的メチル化解析法を確立した。本検査法による多検体試料の解析結果から、閾値となるメチル化率を設定し、陳旧斑痕を解析したところ、いずれも正確に精液及び血液証明が行われた。リアルタイムPCRをベースとした本検査法は、バイサルファイト変換後、PCR反応液調製の1ステップのみで検査可能であることから、簡便でコンタミネーションリスクの低い、実務により適した検査法であるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed MethylLight methods (quantitative real-time methylation-specific PCR) for quantitating the semen-specifically unmethylated region, DACT1 and the blood-specifically methylated region, cg06379435. The threshold methylation ratios for semen or blood identification were set by analyzing DNA from various body fluid samples using these methods. The use of these thresholds accurately identified semen or blood from other samples including highly aged semen and blood stains. Because a realtime PCR-based method requires no substantial work beyond preparing the PCR reaction mixture, simple and quick analysis may be realized with a reduced risk of contamination. Therefore, we suggest that these methods are more suited to forensic work.

研究分野：法医生物学

キーワード：物体検査 人体液斑の同定 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

血痕、精液斑などの事件現場から採取された体液試料の鑑定は、DNA 型検査技術の発達にともない、今日の科学捜査を行う上で必要不可欠なものひとつとなっている。DNA 型による個人の同定に先立って行われる体液種証明は、解析した試料がどの体液種由来のものであるのか明らかにするという点から、その事件における犯罪事実を裏付けるうえで重要な検査項目であり、これまでに血清学的手法や生体酵素反応などを利用した様々な体液種証明法が確立されている。近年、新たな検査法として、組織特異的な DNA メチル化可変領域を指標とした、体液種証明法の確立が試みられている (Frumkin et al, Forensic Sci Int Genet. 2011, Lee et al, Int J Legal Med. 2011)。これらの報告では、体液種特異的なメチル化パターンを示す CpG サイト (脊椎動物で DNA メチル化が起きるシトシンとグアニンが隣り合う場所) が複数同定されており、特に精液マーカーについては極めて特異性が高く、その有効性が示されていた。

我々は、前研究課題 (JSPS 科研費: 課題番号 24790650) において、精液特異的脱メチル化領域を用いた精液証明法について、実務への応用を目指しさらなる検証を行ってきた。精液特異的脱メチル化領域の一つである DACT1 遺伝子領域 (Lee et al, Int J Legal Med. 2011) について、代表的なメチル化検査法であるバイサルファイトシーケンス法により検証を行ったところ、陳旧化した試料においても精液斑では脱メチル化、血痕ではメチル化といったように、メチル化状態が安定的に保存されていることを明らかにし、法科学的試料への応用可能性を示す結果が得られていた。

2. 研究の目的

DNA のメチル化を指標とした体液証明法は、これまでの検査法とは異なり、抽出した DNA そのものから体液種を証明する方法であるため、DNA 型検査と試料を共有でき、効率的な鑑定が可能となる。さらに、DNA は比較的安定な分子であることから、陳旧化による分解などにより従来のタンパク質を指標とした検査法では体液証明ができない試料でも検査できる可能性があり、有効な検査法となることが期待される。一方で、バイサルファイトシーケンス法は、煩雑なクローニング作業が必要であり、コンタミネーションの危険性等もあることから、実務を想定したより簡便な検査法の確立が必要であると考えられた。

そこで本研究では、DNA メチル化を指標とした体液証明について、前研究課題において検証を行った精液特異的脱メチル化サイト及び近年の網羅的解析により同定された血液特異的メチル化サイトについて、実務に応用可能な検査法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においても引き続き、精液特異的脱メチル化領域の一つである DACT1 遺伝子領域における複数の CpG サイトを解析対象とした。さらに近年の網羅的 DNA メチル化解析により明らかとなった血液特異的メチル化サイト cg06379435 (Park JL et al., Forensic Sci Int Genet. 2014, Lee HY et al., Forensic Sci Int Genet. 2015) 及びその近傍の CpG サイトについても、解析対象とした。

実務への応用を想定した検出系としては、MethyLight 法と呼ばれる、TaqMan プローブ及びリアルタイム PCR を用いた定量的メチル化解析法を採用した (Eads et al., Nucleic Acids Res. 2000, Zeschnigk et al., Nucleic Acids Res. 2004)。この方法は、バイサルファイト変換により、非メチル化シトシンをウラシルに変換した鋳型 DNA を用いて、特定の CpG サイトに対して設計したメチル化検出プロローブ及び非メチル化検出プロローブにより、それぞれメチル化あるいは非メチル化 DNA を検出する方法である (Fig.1)。各蛍光プロローブについて、リアルタイム PCR で得られた蛍光強度閾値を超えた PCR サイクル数 (Ct 値) を計測し、これらの値を元に各試料のメチル化率を Fig.1 に示した数式で算出した。

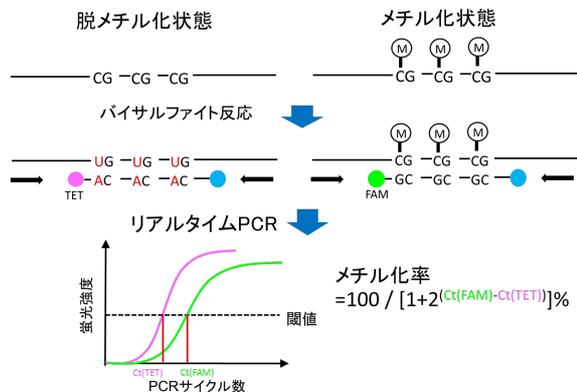


Fig.1 MethyLight 法によるメチル化率の定量

4. 研究成果

精液特異的脱メチル化領域 DACT1 について、MethyLight 法の確立及び検証を行った。DACT1 遺伝子領域の 3 個の CpG サイトに対応する 1 組の蛍光標識プロローブペア (メチル化検出プロローブ: FAM 標識, 脱メチル化検出プロローブ: TET 標識)、プライマー及びリアルタイム PCR 装置を用いて、当該 CpG サイトのメチル化率が既知の試料 (0, 30, 50, 70, 100%) を解析した。算出された Ct 値をもとに、メチル化率を計算したところ、おおむね予測された値が算出され、本検出系による定量的解析が可能であることが確認された。

血液特異的 DNA メチル化サイトとして報告されていた cg06379435 についても、近傍の CpG サイトと合わせて、3 個の CpG サイトに

対応する1組の蛍光標識プローブペア (FAM 及び TET 標識) 及びプライマーを設計した。DACT1 検出系と同様、当該領域のメチル化率が既知の試料 (0, 10, 30, 50, 70, 90%) を用いて、検出系の定量性を確認することができた。

さらに、各種体液 (血液 22 検体、精液 14 検体、唾液 15 検体、膣液 7 検体) から抽出した DNA を用いて、それぞれの検出系で解析を行ったところ、DACT1 検出系では精液特異的な脱メチル化状態、cg06379435 検出系では血液特異的な高メチル化状態が確認され、過去の知見と同様の結果となった。これらの結果を基に、精液及び血液の判定閾値となるメチル化率を設定した (Fig.2)。

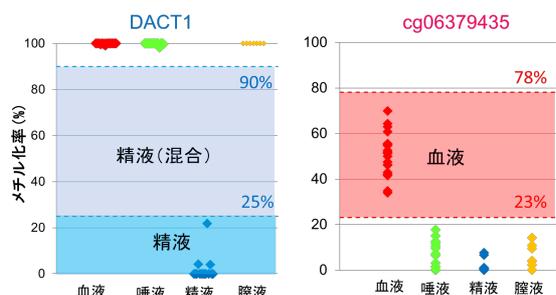


Fig.2 各検出系の体液特異性の検証及び閾値の設定

続いて、設定した測定条件における検出感度を検証するため、両検出系について、それぞれ精液 DNA 及び血液 DNA 希釈液 (10, 3, 1, 0.3, 0.1 ng) を用いて解析を行った。その結果、両検査法ともに 1ng の DNA から精液及び血液の証明が可能であった。

さらに、他体液種試料の混合の影響を検証するため、血液 DNA と精液 DNA を様々な割合で混合し、どの程度まで精液及び血液証明が可能か予備的な検討を行った。この検討に際し、上述の多検体解析において、DACT1 は他の体液でほぼ完全にメチル化されていたため、混合精液判定用の閾値を設定した (Fig.2)。その結果、DACT1 では、精液 DNA と血液 DNA が 20:80 で混合した試料からも精液証明が可能であった。一方、cg06379435 検出系については、精液 DNA と血液 DNA が 50:50 で混合した試料混合した試料からも、血液証明が不可能となり、実務における混合試料からの検出が困難となる場合も想定された (Table1)。

Table1 混合 DNA の解析結果

DNA混合比率(%)		メチル化率(%)		精液判定	血液判定
精液	血液	DACT1	cg06379435		
0	100	99.8	58.6	-	+
20	80	69.1	39.5	+(混合)	+
50	50	29.9	21.8	+(混合)	-
80	20	8.3	9.0	+	-
0	100	2.2	1.5	+	-

最後に、設定した判定閾値を用いて、陳旧試料 (血痕 6 試料、唾液斑 3 試料、精液斑 4 試料) を解析したところ、29 年経過した精液斑及び血痕を含め、いずれの試料も正確に精液判定及び血液判定が行うことができた (Table2)。また、解析を行った 29 年経過陳旧精液斑については、比較のため、従来の精液検査 (SM テスト試薬による酸性ホスファターゼ試験及びバエッキー染色法による精子検査) を行った。その結果、一部の試料については、酸性ホスファターゼ活性が認められず、尾部を伴う完全な形の精子が観察されないものがあった。

Table2 陳旧斑痕の解析結果

試料	保存条件	DACT1 メチル化率(%)	精液証明	cg06379435 メチル化率(%)	血液証明
血痕	室温 4か月	100.0	-	49.2	+
血痕	室温 2年	100.0	-	55.0	+
血痕	室温 4年	99.9	-	37.2	+
血痕	4°C 12年	100.0	-	44.8	+
血痕	室温 29年	100.0	-	66.3	+
血痕	室温 29年	100.0	-	60.3	+
唾液斑	室温 4か月	100.0	-	0.5	-
唾液斑	室温 2年	100.0	-	7.7	-
唾液斑	4°C 6年	99.5	-	11.9	-
精液斑	室温 3年	0.0	+	0.0	-
精液斑	4°C 10年	0.0	+	0.1	-
精液斑	室温 29年	1.8	+	0.0	-
精液斑	室温 29年	0.0	+	0.2	-

以上の結果から、本検査法は、新たな体液証明法として実務に応用可能であることが示唆された。リアルタイム PCR をベースとした本検査法は、バイサルファイト変換後、PCR 反応液調製の 1 ステップのみで検査可能である。従って、バイサルファイトシーケンズ法等の他のメチル化定量法と比較して、簡便でコンタミネーションリスクの低い、実務により適した検査法であるものと考えられる。

また、陳旧精液斑の解析結果から、メチル化を指標とした検査法は、従来の検査法と比較しても陳旧に強く、再鑑定試料等の高度に陳旧化した試料に対して有用な検査法となる可能性が示唆された。一方で、血液については、混合試料からの検出を想定した場合は、より特異性の高いマーカー領域を探索する必要性があるものと考えられた。今後、より網羅性の高い全ゲノムメチル化解析等により、唾液、膣液等の他の体液も含め、有効なマーカー領域の探索を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Watanabe K, Akutsu T, Takamura A, Sakurada K. Evaluation of a blood-specific DNA methylated region and trial for allele-specific blood identification from mixed body fluid DNA. Leg Med. 査読有 22:49-53. 2016

2. Watanabe K, Akutsu T, Sakurada K. Development of a Real-Time PCR-Based Method for Analyzing Semen-Specific Unmethylated DNA Regions and Methylation Status in Aged Body Fluid Stains. J Forensic Sci. 査読有 61 Suppl 1:S208-S212, 2016

[学会発表](計4件)

1. 渡邊賢, 阿久津智子, 櫻田宏一. リアルタイム PCR を用いた DNA 脱メチル化部位を指標とする精液証明法の確立. 第 83 回日本法医学会学術関東地方集会, 東京 (2014.11.8.)

2. 渡邊賢, 阿久津智子, 櫻田宏一. リアルタイム PCR を用いた精液特異的 DNA 脱メチル化部位の定量的解析法の確立. 第 99 次日本法医学会学術全国集会, 高知 (2015.6.12.)

3. 渡邊賢, 阿久津智子, 高村彩里, 櫻田宏一. 血液特異的 DNA メチル化部位を指標としたリアルタイム PCR による血液証明法の検討. 第 85 回日本法医学会学術関東地方集会, 神奈川 (2016.10.29.)

4. Ken Watanabe, Ayari Takamura, Tomoko Akutsu. Development and Evaluation of Real-time PCR Methods for DNA Methylation-based identification of Semen and Blood. AAFS 69th Annual Scientific Meeting. 米国 (ニューオーリンズ)(2017.2.15.)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 賢 (WATANABE, Ken)

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号: 20532047