

研究成果報告書の概要

講座等名	法医学講座	事業推進者名	赤根 敦
所属部門	代謝部門		
分担研究課題	次世代シーケンサーを用いた法遺伝学研究		
キーワード	次世代シーケンサー, 法遺伝学		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5名		
<p>研究組織 (本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割)</p> <p>赤根 敦 (教授): 研究の統括</p> <p>橋谷田真樹 (准教授): 研究計画の立案, 遂行</p> <p>松本智寛 (講師): データの収集および解析</p> <p>眞鍋 翔 (助教): データの収集および解析</p> <p>大林将弘 (技術員): データの収集および解析</p>			
<p>研究成果の概要 (令和元 (2019)・令和2 (2020) 年度の研究成果について)</p> <p>2019年</p> <p>1. メチル化解析による死亡時年齢の推定</p> <p>DNA からその由来となる人物の年齢を推定することができれば, それは法医実務上極めて有力な情報となる. そこで, 次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化解析による, DNA から由来人物の年齢推定を行う実証実験を行なった. 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 DNA を試料とし, バイサルファイト処理後, 次世代シーケンサー Ion PGM System(Thermo Fisher Scientific)を用いてメチル化解析を行なった. ターゲットとした遺伝子は, Clorf1, CCDC10, ELOVL2, FHL2, SLC6A4, TRIM59, KLF14, F5, ASPA, PDE4C の計 10 遺伝子である. 得られたシーケンス結果から各 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ところ, 各部位において修正済決定係数 (adjR2) はかなりの幅を持って観察された. そのため, 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した結果, 修正済決定係数は 0.949 (標準偏差 6.04) となり, DNA からある程度は正確な年齢推定が可能であることが判明した.</p> <p>2. 染色体上マーカーにおける変異解析の一例</p> <p>ある DNA 型鑑定において Yfiler (Thermo Fisher Scientific)による Y-STR 解析を行ったところ, DYS385 a/b 座位にて 11, 12, 15 繰り返ししの 3 本のピークが観察された. コンタミネーションの可能性が低いと思われたため, PowerPlex Y23 (Promega)を用いて Y-STR 型の確認を行ったところ, 同様に 11, 12, 15 型の 3 本のピークが観察された. プライマーの位置を変えても同じ結果が得られたことから, この試料は DYS385a/b 座位において 3 種の繰り返し配列を持つ変異型であると結論づけた. 確認のために, 次世代シーケンサーを用いた Fusion Method によるシーケンスを行ったところ, 繰り返し配列である [GAAA] の 11, 12, 15 回繰り返し配列が確認された. 3 種の繰り返し配列は確認できたが, それがどのように配置されているのか, または 11-12 と 11-15 などのように Y 染色体のモザイクなのかは不明である. それを決定するためにはより広い領域をシーケンスして確認する必要がある.</p> <p>2020年</p> <p>3. 日本人における次世代シーケンサーを用いた Y 染色体上 SNP 解析</p> <p>Y 染色体は男性特有のものであり, そのマーカーは暴行・強姦事件における男性の識別に非常に有効である. また, Y 染色体は父系遺伝であることから世界レベルで見ると地域性を持つことが知られている. Y 染色体の SNP を解析することで決定される「型」を Y ハプログループ (Y haplogroup) と呼び, 大きく分けて A~Z のタイプに分かれ, さらにその下流に A1, A1a のようにサブタイプが多数存在している. 今回は, 次世代シーケンサーを用いて男性 1 検体当たり 859SNP を解析し, 日本人における詳細な Y ハプログループのデータベースを作成することが目的</p>			

である。当教室に保管されているヒト DNA のうち 179 名の男性 DNA を選別し、試料とした。なおこの研究は当大学倫理委員会の承認を受けている (#2016704)。オランダ、ロッテルダムのエラスムスメディカルセンターに所属する Arwin Ralf 博士より提供を受けたプライマーセットを用いて、Y 染色体上に存在する 859SNP 領域を増幅した。次世代シーケンサー GeneStudio S5 System を用いてシーケンス後、Plug-in ソフトウェア (Yleaf) にて型判定を行なったところ、日本人 179 名のハプログループ解析の結果は、タイプ O (53%) が最も多く、次にタイプ D (34%) が多い結果となった。サブタイプも細かく分類することができ、計 28 種ものハプログループが同定され、個人識別に有用なデータベースを構築することができた。

4. DNA メチル化解析を中心とした心臓突然死診断への多角的アプローチ

法医実務では、剖検所見からのみでの死因判断に苦慮する事例が稀ならず存在する。このような場合”molecular autopsy”が有効ではあるが、これはあくまでもリスクファクターとして捉えられている。そこで新たな判断基準として心筋のメチル化解析を試みた。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 (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 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。Molecular autopsy は Ion AmpliSeq Cardiovascular Research Panel および Ion PGM System (ThermoFisher Scientific) を用いて 404 遺伝子、10430 SNPs の解析を行った。さらにそれぞれの心筋中隔を試料として、Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit および iSCAN system (Illumina) により全ゲノム上 86 万のメチル化サイトの解析を行い、最初の乳幼児突然死 3 例群とそれぞれ死因が異なる例との間でメチル化率の比較を行った。Molecular autopsy では、乳幼児突然死例で心臓突然死例に関連があるとされる SCN5A, KCNQ1, MYBPC3 等の遺伝子に変異がそれぞれに観察され、いずれもリスクを保持していることが判明した。さらに 3 例の乳幼児突然死例群と他の死因群での心筋のメチル化率の増減を比較したところ、心筋炎例では HLA に関連するサイトのメチル化率に違いが観察された。また、若年性例との比較ではエイジングに関連があるサイトに違いが見られ、メチル化率の変異は病的な状況を反映しているようであった。全ての例間で ATP10A 遺伝子の変化が観察されたが、これが新たな判断基準となるためにはさらなる解析が必要である。

5. ある親子鑑定例に見られた D19S433 座位におけるサイレントアレル。

擬父、母、子の定型的なある親子鑑定例において STR 解析を行ったところ、D19S433 座位において母-子関係が否定された。互いに別なタイプのホモ型を示したのである。他の 20 STR 座位では親子関係が否定されず、ミトコンドリア DNA にも矛盾が見られなかったため、これはプライマーが付く配列に変異を持ったためそのアレルが増幅されない、いわゆるサイレントアレルであろうと思われた。そこで D19S433 座位のプライマーを新たに設計・合成し、再解析を行ったところ、母、子ともにヘテロ型であることが確認され、その型は父 14, 15, 母 13, 16.2, 子 13, 14 であった。そこでサイレントアレル「13」を次世代シーケンサー GeneStudio S5 System によりシーケンスを行なった結果、Globalfiler で増幅されなかったアレル「13」は、繰り返し配列の 32 塩基下流に G>A の変異があり、この変異のためキットのプライマーが付着しなかったと思われた。

結論として、遺伝病である遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子は両親から受け継いだものではなく、*De Novo* の変異であることが確認された。