

論文の内容の要旨

氏名：小 方 彩 乃

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Age estimation based on DNA methylation in teeth using real-time methylation-specific PCR

（リアルタイムメチル化特異的 PCR 法を用いた歯由来 DNA のメチル化に基づく年齢推定）

年齢は身元不明遺体の個人を特定するために重要な情報の一つである。近年、遺伝子発現制御と関係のある DNA のメチル化レベルと年齢との間に高い相関があることが示され、新しい年齢推定法として注目されている。

パイロシーケンス法はこの分野で最もよく利用されているメチル化解析法であり、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）産物の塩基配列を直接検出することで、定量的な DNA メチル化データを高精度で得ることができる。しかし、この方法は解析に必要なパイロシーケンサーの普及率が低く、コストが高いなどの欠点がある。一方、real-time Methylation-specific PCR（RT-MSP）法は CpG 部位のメチル化状態を迅速に評価できるコストパフォーマンスの高い方法であり、従来のリアルタイム PCR 機器を用いて実施可能である。

複数のグループによるこれまでの解析で、elongation of very long chain fatty acids protein 2（ELOVL2）のメチル化レベルは年齢と強い相関を示しており、年齢推定の有望なマーカー候補とされている。また、ectodysplasin A receptor-associated death domain（EDARADD）は歯を試料としたメチル化解析による年齢推定法に用いられており、メチル化レベルは年齢と負の相関がある。これらを踏まえ、本研究では、RT-MSP 法を用いて ELOVL2 および EDARADD のメチル化レベルを測定し、年齢推定のための重回帰式を算出することを目的とした。

日本人（20～85 歳）より抜去し、研究室に保存されていた 121 歯を試料として用いた。このうち 99 歯は歯全体（象牙質、歯髄、セメント質）から、残る 22 歯は歯髄のみからゲノム DNA を抽出した。その後、DNA 抽出液のバイサルファイト処理を行い、RT-PCR のための試料とした。ELOVL2 および EDARADD の上流の CpG 部位にメチル化特異的プライマーを設計した。リファレンスプライマーにはヒトの Alu 配列を用いた。PCR は 45 サイクル行い、バイサルファイト変換後の DNA を増幅させた。アニーリング温度は、ELOVL2 が 55 °C、EDARADD が 60 °C であった。反応後、DNA の蛍光レベル（相対量）から、次式を用いて各遺伝子のメチル化率（PMR）を算出した。

$$\text{PMR (\%)} = \left\{ \frac{[(\text{標的遺伝子/Alu})\text{サンプルの蛍光レベル}]}{[(\text{標的遺伝子/Alu})100\% \text{メチル化ヒト DNA の蛍光レベル}] \right\} \times 100$$

得られた PMR と年齢との相関を調べ、回帰式を算出した。さらに、回帰式の絶対平均誤差（MAE）を求め、3 つの年齢群（若年層：20～34 歳、中年層：35～54 歳、高年齢層：55 歳以上）間における差異について検討した。つぎに、歯全体または歯髄に由来する ELOVL2 と EDARADD の PMR と年齢とから重回帰式をそれぞれ算出し、トレーニングサンプルを用いて MAE を算出した。一方、歯全体において得られた重回帰式は、40 歯のテストサンプルを用いた年齢推定精度の検証も併せて実施した。

解析の結果、ELOVL2 の PMR は年齢と強い正の相関を、EDARADD の PMR は年齢と負の相関を示した。それぞれの回帰式と決定係数（ R^2 ）は以下の通りであった。

$$\text{ELOVL2 : } Y = -0.0784X^2 + 3.3587X + 23.529 \quad (R^2=0.50)$$

$$\text{EDARADD : } Y = -13.91\ln(X) + 92.259 \quad (R^2=0.44)$$

各回帰式において、ELOVL2 の MAE は 9.59、EDARADD では 10.12 であった。また、各回帰式の年齢層別の MAE を比較した結果、ELOVL2 では、高年齢層で最大（12.67）、若年層で最小（8.02）となり、EDARADD では、高年齢層で最大（12.20）、中年層で最小（8.00）となった。いずれの年齢層間でも MAE に有意差は認められなかった。

ELOVL2 と EDARADD の PMR を用いた重回帰分析の結果、以下の年齢推定式が算出された。

$$Y = -0.041X_1^2 + 2.243X_1 - 10.815\ln(X_2) + 66.538 \quad (R^2 = 0.74; X_1: \text{ELOVL2 の PMR}, X_2: \text{EDARADD の PMR})$$

この回帰式の MAE はトレーニングサンプルで 6.69、テストサンプルで 8.28 であった。また、各年齢群の MAE は、若年層で 7.61、中年層で 7.48、高年齢層で 10.21 であり、いずれの群間においても有意

差は認められなかった。

歯髄に由来する ELOVL2 の PMR は年齢と強い正の相関を示したが、EDARADD の PMR は年齢と弱い負の相関を示した。算出された回帰式と R^2 は以下の通りであった。

$$\text{ELOVL2 : } Y = -0.1709X^2 + 5.6239X + 14.8 \quad (R^2 = 0.64)$$

$$\text{EDARADD : } Y = -18.04\ln(X) + 115.27 \quad (R^2 = 0.12)$$

また、これらの回帰式における MAE は ELOVL2 で 6.42、EDARADD では 11.42 であった。歯髄由来の ELOVL2 と EDARADD の PMR を用いた重回帰分析の結果、年齢推定式は以下のように算出され、この式における MAE は 5.86 であった。

$$Y = -0.162X_1^2 + 5.351X_1 - 11.847\ln(X_2) + 64.701 \quad (R^2 = 0.69, X_1: \text{ELOVL2 の PMR}, X_2: \text{EDARADD の PMR})$$

今回得られた年齢推定式において、試料の違いにより精度に大きな差はみられなかった。このことから、ELOVL2 と EDARADD 遺伝子の組み合わせにおいて、歯全体に由来する DNA を用いた年齢推定式は、歯髄由来の DNA を用いた年齢推定式と比較して劣っておらず、解析に要する時間が短いなどの理由から、より有益な方法であると考えられる。また、ELOVL2 および EDARADD のプライマーセットには、それぞれ 6 つの CpG が含まれていた。ELOVL2 では、6 つの CpG のうち 3 つが以前の研究で年齢推定解析に用いられており、この領域の有用性が示唆された。一方、EDARADD のプライマーに含まれる CpG はこれまでに年齢推定の解析に用いられておらず、今回の解析により、年齢推定に利用可能な領域であることが示唆された。

本研究から、ELOVL2 と EDARADD を標的としたメチル化特異的 PCR による年齢推定法は、どの年代においても均一の精度で年齢推定を行えること、また年齢推定のための DNA メチル化率の測定に、RT-MSP 法も利用可能であることが明らかとなった。本年齢推定法は、他の方法と比べ MAE がやや高く、精度が劣るものの、RT-MSP 法は従来のリアルタイム PCR 機器を用いて容易に実施することが可能である。このことから、本法は、多数の遺体の身元を短期間で分析する必要がある大規模災害時などの個人識別のスクリーニングに適していると考えられる。