

	す み ひろかず
氏 名	鷺見博和
学 位	博士(医学)
学位記番号	新大博(医)第1675号
学位授与の日付	平成17年 5月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Applicability of the parentally imprinted allele (PIA) typing of a VNTR upstream the <i>H19</i> gene to forensic samples of different tissues (<i>H19</i> 遺伝子の上流にある VNTR でのインプリント機構を利用した父母識別(PIA)タイピング法の各種組織由来の法医学的サンプルへの応用)
論文審査委員	主査 教授 木南 凌 副査 教授 山内 春夫 副査 教授 五十嵐 道弘

博士論文の要旨

【はじめに】

現在法医学では、個人識別の手段として VNTR や STR を非常に多く用いている。これらの方法は大変有用ではあるが、それだけでは父親と母親のどちら由来のバンドかを区別することはできない。我々はこれまでに、メチル化によってインプリントを受けている、ヒトの *H19* 遺伝子の 5' 側に存在する VNTR 座のローカスで、このインプリント機構を利用して父親由来のアリルのみを検出する PIA タイピング法を開発した。この方法では、DNA をまずメチル化にセンシティブな *Hha* I 酵素によって消化し、消化物を希釈後第1段階の PCR をすることで、メチル化された父親由来の *H19* アリルだけが増幅される。次にこの増幅産物を元に VNTR タイピングを行うと、父由来の対立遺伝子が何型かが決定される。この方法によって、血液サンプルから父親由来のアリルの遺伝子型を検出することができた。

しかし、法医学実務においては、血液サンプルを得ることのできない事例も多い。また、この VNTR の近傍に存在するウィルムス腫瘍遺伝子やインシュリン様増殖因子に関連して、それらのメチル化が、発生の途中やある種の疾病において体内で異なる調節を受けるといった報告もある。したがって、法医学鑑定で応用するためには、血液以外の他の組織由来の DNA で、この PIA 法が利用可能かどうか検討する必要がある。

そこで今回、死後 2～11 時間の法医学解剖 3 例で、大脳や骨格筋や皮膚など 15 種類の異なる組織から DNA を抽出し、この方法が応用可能かどうかを調べた。また、この方法を 2 例の個人識別についても実際に応用して検討した。

【試料と方法】

法医解剖試料のうち、1例目では、血液、大脳、小脳、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋、心臓（心尖部と房室の筋肉）、前立腺、子宮、卵巣、皮膚の12種類の試料を得た。2例目では、血液、大脳、小脳、心臓（心尖部と房室の筋肉）、前立腺、精巣、大動脈の8種類の試料、3例目では、血液、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、骨格筋、精巣、皮膚の8種類の試料を得た。また、個人識別への応用では、1例では大腿の筋肉から、もう1例では骨髄から試料を得た。この個人識別では家族からも書面による同意を得た上で、末梢血を採取した。これらの試料から、フェノールクロロフォルム法でDNAを抽出した。PIA法は、血液で行ってきた方法から1段階目のPCR増幅産物の精製手順を省略し、その他は以前のとおりに行った。

【結果および考察】

検出方法で、PCR増幅産物の精製を省略したが、これまでと同様の結果が得られることが確認され、PIA法がより単純で時間のかからないものとなった。法医解剖3例での、大脳や骨格筋や皮膚といった15種類の組織からのDNAを用いたPIAタイピングでは、いずれも父の対立遺伝子に由来するアリルのみのバンドが得られた。これらの結果は、それらの組織DNAでのH19部位のメチル化状態が、血液DNAと同一であることを示した。

さらに、個人識別の事例への応用も有用であった。1例目は自動車内から発見された焼死体の大腿部の筋肉からDNAを抽出し、擬母、姉、兄との間で血縁関係を調べた。それぞれ遺伝子型は、死者が9/10、母が7/10、姉、兄は7/7であった。死者の父親由来のアリルが10であれば、母との親子関係は否定されたが、PIAタイピングの結果、死者の父親由来のアリルが9であり、死者と母、姉、兄との血縁関係は否定されず、父の遺伝子型は7/9と考えられた。2例目は堤防工事の現場から発見された屍蟻化した遺体の骨髄からDNAを抽出し、擬父母との間で血縁関係を調べた。それぞれ遺伝子型は、死者が7/10、父が7/9、母は7/10であった。死者のアリル7が母親由来であれば父との親子関係は否定されたが、PIAタイピングの結果このアリル7が父親由来であり、アリル10が母由来と考えられた。

JinnoらやFrevelらによって、H19の近傍で、組織特異的や腫瘍特異的といったメチル化の報告があるが、今回の15種類の組織からの結果では、そのような違いは全く認められなかった。これは法医実務においてこの方法を用いるうえで有用な結果であった。また、この方法で対象としているVNTR近傍には、血液試料でSNPハプロタイプの報告があることから、SNPハプロタイプ分析にも各組織由来のDNAで応用可能であろうことが示唆される。

審査結果の要旨

申請者らはこれまでに、父親由来のアリルのみを検出するPIAタイピング法を血液サンプルで開発した。これは、メチル化によってインプリントを受けているH19遺伝子の5'側に存在するVNTRを利用したものである。本法はDNAをメチル化感受性のHhaI酵素によって消化した後に第1段階のPCRをすることで、父親由来のアリルだけを増幅し、次にこれ

を元に VNTR タイピングを行い、父由来の型を決定するというものである。

しかし、これらの結果は血液試料から得られたもので、法医実務では血液試料を得ることのできない事例も多い。しかも、この遺伝子のメチル化が、胎児組織やがん組織では異なるという報告もある。したがって、法医鑑定で応用するためには、他の組織由来の DNA でも、この PIA 法が利用可能かどうか検討する必要がある。そこで、申請者らは法医解剖 3 例で脳や骨格筋や皮膚など 15 種類の異なる組織から DNA を抽出し、この方法が利用可能かどうかを調べ、さらに 2 例の個人識別についても応用している。また、PIA 法の簡略化も試みている。

検出方法での DNA 精製を省略した簡略化法でも同様の結果が得られ、より単純で時間のかからない方法であることを示している。15 種類の組織 DNA を用いた PIA タイピングでは、いずれもメチル化状態が血液 DNA と同一であることを示している。個人識別の事例への応用も、焼死体の大腿部の筋肉及び、屍蠟化した遺体の骨髄で検査し、いずれも死者と関係者との血縁関係は否定されず効果的であったことを示している。この VNTR の近傍で胚組織特異的や腫瘍特異的といったメチル化の報告があるが、今回の 15 種類の組織からの結果では、そのような違いは認められないことを示し、法医実務において本法の有用性を明らかにしている。

以上の成果を示したところに博士論文としての価値を認める。