

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790642

研究課題名(和文) CNV測定原理を応用した法医試料における女性由来証明法の構築

研究課題名(英文) A novel method for sex determination by detecting the number of X-chromosomes

研究代表者

中西 宏明 (NAKANISHI, HIROAKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90392274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：現在、DNAを用いた性別判定において、女性の判別はY染色体が検出されないことによる間接的なものであるため、女性由来を積極的に判別できる手法が必要である。そこで、Copy Number Variation(CNV:遺伝子のコピー数の変異)を検出する手法を応用し、X染色体のコピー数解析による性別判定法の検討を行った。その結果、男女各20名から抽出したDNAの約1ngを鋳型量として検査したところ、すべて正確に判定できた。また、鋳型DNA量が0.2ngまで正確に判定可能であった。従って、CNV検査法を用いてX染色体数を検査することにより、女性を積極的に証明できる性別検査が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Current methods, based on the detection of the Y-chromosome, can directly identify an unknown sample as male, but female gender is determined indirectly, by not detecting the Y-chromosome. Therefore, we developed a novel sex determination method by analyzing the number of X-chromosomes using a copy number variation (CNV) detection technique (the comparative Ct method). In this study, we designed a primer set using the amelogenin-X gene without the CNV region as the target to determine the X-chromosome copy number. All DNA samples from participants (20 males, 20 females) were evaluated correctly using this method with 1-ng template DNA. A minimum of 0.2-ng template DNA was found to be necessary for accurate sex determination with this method. Thus, we successfully developed a method of sex determination based on the number of X-chromosomes. Our novel method will be useful in forensic practice for sex determination.

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：法医鑑定学

キーワード：法医性別判定 X染色体 CNV検査法

1. 研究開始当初の背景

DNA 型検査は、その識別力から犯罪の立証に欠かせないツールになっており、数多くの事件を解決に導いてきた。また、身元不明死体の身元判明作業も DNA 型検査 (個人識別・親子鑑定等) で容易にできるようになり、東日本大震災犠牲者の身元確認作業にも適用されている。

しかしながら、犯罪現場に遺留されている証拠物件に付着する血液・体液等の試料や、死体から採取できる試料は、DNA が分解してしまっていたり、抽出できる DNA 量が微量であったりすることが多い。その場合、市販キットによる DNA 型検査では、判定できる DNA 型のうち、一部の DNA 型しか検出できないときもある。

一般的に DNA 型判定用の市販キットでは、性染色体検出による性別判定もでき、鋳型 DNA 量が少なくても、X 染色体と Y 染色体ともに検出されているときは男性由来であると推測できる。しかしながら、X 染色体しか検出されなかった場合、女性由来なのか、鋳型 DNA が少ない、あるいは分解しているため Y 染色体が検出されなかったかを明確に判断するのは困難である。つまり、鋳型 DNA の質と量によっては、「Y 染色体がない = 女性由来である」とは言えないため、性別判定ができないことになる。

これまで Y 染色体を検出する手法は数多く報告されてきており、性別判定用キットも市販され、検査試料が男性由来であることは容易に判別できるようになった。しかし、上記の理由で、これらの方法は女性由来を積極的に判別できる手法とは言えない。また、女性由来を積極的に証明する方法は、いまだ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、女性を積極的に証明できる方法を構築することにある。そこで注目したのは、疾患感受性との関連が研究されている Copy Number Variation (CNV : 遺伝子のコピー数の変異) を検出する手法である。この手法を応用して、犯罪遺留試料や死体試料の X 染色体のコピー数を検査することで、X 染色体の数から女性由来 (X 染色体が 2 本であることを) を証明し、法医鑑定や身元不明死体のプロフィールづくりに応用することのできる方法を確立する。

具体的な目的として、CNV を検出する手法を応用して、X 染色体の数を判別できるかを明らかにする。どのくらいの鋳型 DNA 量まで、X 染色体の数を正確に判別できるかを明らかにする。市販の STR 型判定キットとの相関性を明らかにする (市販の STR 型判定キットによるアメロゲニン型の判定において、男性由来なのに Y 染色体が検出できなくなる鋳型 DNA 量で、本法での性別判定はどのように判定されるかを評価し、相関を明らかにする)。

3. 研究の方法

(1) 検体

検体は口内上皮細胞を用いた。既知の疾患がない、40 人の健常な日本の成人 (男性 20 人、女性 20 人) から採取した。すべての検体は、EasiCollect (GE Healthcare) 付属のワットマン FTA カードで採取した。インフォームドコンセントは、検体を提供したすべての参加者から得られた。また、濃度既知の DNA として Human Genomic DNA Male と Human Genomic DNA Female (プロメガ) を使用した。

なお、本研究は、埼玉医科大学 (No.674) の倫理委員会の承認を得て実験を行った。

(2) DNA 抽出と定量

DNA 抽出と精製は EZ1 Investigator キット (Qiagen) を使用し、50 μ L の水で溶出した。また、DNA の定量は、Quantifiler Duo DNA Quantitation Kit (Life Technologies) を使用した。

(3) リアルタイム PCR

X 染色体遺伝子のうち、CNV 領域のないアメロゲニン遺伝子領域 (GeneBank 登録番号 M55418.1) を目標領域とした。プライマーは、Life Technologies のウェブサイトから GeneAssist Copy Number Assay Workflow Builder ソフトウェアを使用して設計した。プライマーによる増幅配列は、BLAST ソフトウェアにより、目標領域と相補的であることを確認した。プライマー配列は、

Forward:

5' -GCTTGCCTCTGCTGAAATATTAGTG-3' (FAM 標識)

Reverse: 5' - CTCATGCATTCGCTGTTCTG-3'

Prove:

5' -ACTAAGTGGTATAGGAGAGACTCC-3' (NFQ-MG B 標識)

である。

リアルタイム PCR は、20 μ L の Reaction Mix で行い、その組成は、2 \times TaqMan Genotyping PCR Master Mix、20 \times Work stock- TaqMan Copy Number Assay (目標領域に設定されるオリゴヌクレオチドプライマー)、20 \times TaqMan Copy Number Reference Assay (リボヌクレアーゼ P (RNase P) 領域に設定されるオリゴヌクレオチドプライマー) と鋳型 DNA とした。

PCR は、7500 の Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いた。PCR 条件は、95 で 10 分ののち、95 で 15 秒、60 で 1 分の 40 サイクルで行った。

(4) X 染色体数の算出

X 染色体のコピー数は、比較 Ct (Ct) 法を使用した。つまり、目的配列 (X 染色体) と参照配列 (RNase P) の間の Ct 差 (Δ Ct) を求め、検体の Ct 値を、2 つの X 染色体を持つキャリアレーター検体 (20ng の女性の DNA) と比較する。X 染色体のコピー数は、キャリアレーター検体が女性の DNA の場合、下記で求めた値の 2 倍になる。

計算式は以下の通りである。

・ $CT = (\text{目標配列の } CT \text{ 値}) - (\text{参照配列の } CT \text{ 値})$

・ $CT = (\text{試験検体の } CT \text{ 値}) - (\text{キャリアブレイター検体の } CT \text{ 値})$

・ $\text{コピー数} = 2^{-CT}$

コピー数は、CopyCaller ソフトウェア(版 2.0; LifeTechnologies) を使用して、自動的に算出される。ソフトウェアの設定は、Threshold 値を 0.2 とした。Threshold 値は、増幅曲線による交差が閾値サイクル(ct)を定義する線である。Ct 値が 37 以下にあったとき、X 染色体のコピー数が正確に測定されたので、ソフトウェアの Ct 値設定は 37 とした。また、1 回の検査で、同じサンプルを 4 回繰り返し検査して Copy number を算出した。

男性か女性かの判別は、4 回繰り返しのデータを基に有意水準 0.01 で t 検定を行い、コピー数 2 で棄却されずコピー数 1 で棄却されるものを女性(コピー数 2)、コピー数 1 で棄却されずコピー数 2 で棄却されるものを男性(コピー数 1)とした。

(5)STR 型判定

STR 型判定は、AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit(LifeTechnologies) を使用した。キャピラリー電気泳動は、ABI 3130xl Genetic Analyzer(LifeTechnologies) を使用し、解析は、GeneMapper ID ソフトウェア(LifeTechnologies) を用いた。また、検出されたピークのうち、150RFU より大きいものを陽性とした。

(6)法医学試料への応用

紫外線放射により DNA を分解し、模擬法医学検体とした。DNA に 0.2J および 0.4J の紫外線を照射し、それらの DNA の X 染色体数判定と STR 型判定に関して正常な DNA と比較した。

4. 研究成果

比較 Ct 方法では、各プライマーの PCR 増幅効率、等しくなければならない。そこで、様々な濃度のテンプレート DNA を用いて、アメロゲニン-X プライマーと RNase P プライマーの PCR 増幅効率を調査したところ、増幅効率はほぼ等しかった。したがって、X 染色体の数は、設計したアメロゲニン-X プライマーセットを用いたこの方法で、正確に測定することができると考えられた。

20 人の男性、20 人の女性から抽出した DNA の 1ng を用いて、本法による性別判定を実施したところ、すべてサンプルにおいて正しく判定された(図 1)。

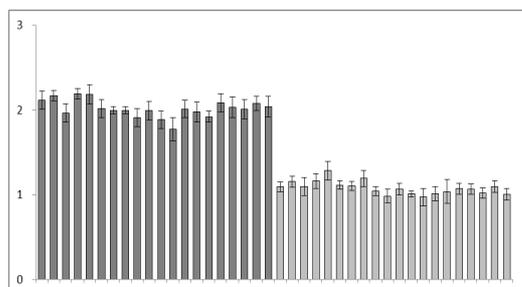


図 1:男女各 20 人の DNA について鑄型 DNA 量 1ng を用いた結果(灰色:女性、薄い灰色:男性)

次に、正確に性別が判定できるのに必要とされる鑄型 DNA の最小量を、男性と女性の DNA を用いて評価した。評価は、3 回行い、3 回すべてで正しい性別が判定できた濃度を求めた。その結果、0.2ng 以上の鑄型 DNA を用いれば、正確に性別を判定できると考えられた(図 2)。

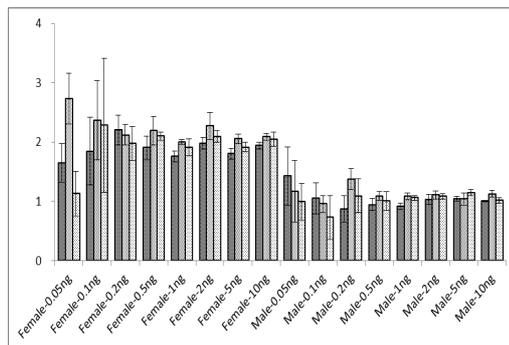


図 2:様々な鑄型 DNA 量を用いた時の結果(各鑄型量につき 3 回検査を実施)

コピー数は相対的な量から算出されるため、比較の Ct 方法は低い鑄型 DNA の場合、正しく判定されない場合がある。その場合、本法は性の決定ツールとしては、補助的な役割を果たすことになると考えられた。

模擬法医学試料を用いた検討では、男性のアメロゲニン-Y は、0.2J の紫外線照射で STR 分析によって検出されず、アメロゲニン-X も-Y も 0.4J の紫外線照射で検出されなかった。また、女性の DNA において、アメロゲニン-X は、0.4J の紫外線照射で STR 分析によって検出されなかった。対照的に、本法では、男性および女性の DNA のどちらにおいても、0.4J の紫外線照射後でも正しく性別が判定された(図 3)。

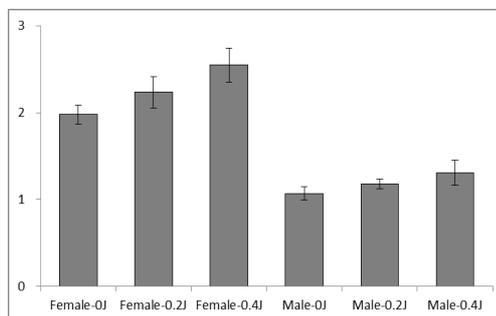


図 3:分解試料を本法に応用した時の結果

このように、この方法は、STR 分析に不向きである断片化した DNA でさえも性の決定を

容易にするといえる。これは、設計したアメリロゲニン-X プライマーセットの増幅産物が STR 判定キットの増幅産物(100 bp~)より短い(71 bp)ため、断片化した DNA でも X 染色体を検出することができたと考えられる。

なお、これらの増幅産物の大きさは、アガロースゲル電気泳動法によって確認し、特異性は、BigDye Direct Cycle Sequencing キット(LifeTechnologies)を用いたダイレクトシーケンスによって確認した。

一方、若干の症例において、検体が男性の場合でも、アメリロゲニン-Y は STR 分析によって検出されないときがある。今回、アメリロゲニン-Y が DYS458 欠失により STR 分析で検出することができなかった実際の法医学症例において、本法を使用してみた。その結果、正しく男性(X 染色体のコピー数が 1)と判定できた。プライマー結合部位の欠失によるアメリロゲニン-Y のドロップアウトなどの突然変異は、性別による人物誤認につながる可能性がある。本法は、増幅領域が X 染色体に置かれるので、Y 染色体上で欠失が認められる場合でも、正確に性を決定することができるため、このようなケースでは、非常に役立つものと考えられる。

本研究により、X 染色体のコピー数に基づく性の決定の方法を開発できた。そして、本法は、直接的に女性の性を決定することができる。また、STR 分析キットによる性の決定が難しい検体の場合(分解試料や Y 染色体上に欠失がある試料)でも、本法を用いることにより、正確に性別を判定できた。したがって、本法は、法医学分野における性の決定ツールとして有効であることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中西宏明、猩々英紀、大森毅、原正昭、高田綾、安達登、齋藤一之: Copy Number Variation 検出法を応用した性別判定 : 第 97 次日本法医学会全国学術集会(札幌)2013.6

Hiroaki Nakanishi, Hideki Shojo, Takeshi Ohmori, Masaaki Hara, Noboru Adachi, Aya Takada, Kazuyuki Saito: Sex determination using the copy number variation detection method: The 11th Indo Pacific Association of Law, Medicine and Science Congress (Kuala Lumpur) 2013.10

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中西 宏明(NAKANISHI HIROAKI)

順天堂大学 医学部 准教授

研究者番号 : 90392274

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし