

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590746

研究課題名（和文） 大量 SNP データの血縁関係判定への応用

研究課題名（英文） Kinship analysis based on massive SNP genotype data

研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA MOTOKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90213686

研究成果の概要（和文）：血縁関係判定の目的に、STR 多型 15 座位を解析する系が採用されてきたが、同胞関係でも有意の結果を得ることは容易でない。そこで、マイクロアレイ技術を用いた大量 SNP データから血縁関係を証明することを試みた。SNP においては、全解析座位における IBD の割合を基にした判定指数が適当で、連鎖不平衡値と稀アレル頻度の条件を設定した。非血縁者と分離するために必要な最小座位数は、同胞間で 500、第二度近親で数千程度と推定した。

研究成果の概要（英文）：The multiplex system of 15 STR loci has been employed in kinship analysis, but its power is insufficient even for sibship. The microarray technique allows us to obtain massive SNP genotype data. As indices for the evaluation based on SNP, the proportion of identical-by-decent (IBD) numbers was preferable, in which linkage disequilibrium and minor allele frequency were conditioned. The minimum number to separate kinship from unrelated pairs was estimated to be approximately 500 and several thousands of SNPs for siblings and the second degree, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：親子鑑定・DNA 多型・SNP・マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 鑑定においては、ゲノム上の単純な配列の繰り返し回数の相違である short tandem repeat (STR) を解析するシステムが一般に採用されている。複数の STR 座位を解析する検査法では、血痕などを用いた個人同定や親子間での肯定確率計算には十分に有効であるが、同胞関係でも 3 割程度は有意の

肯定確率を得ることは困難とされている。さらに、叔父叔母や従兄弟等遠縁関係となるとさらに判定は難しくなる。

(2) 一方で、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) は、対立遺伝子 (アレル) が 2 種類しかなく、遺伝子頻度が高いものが含まれる分だけ、STR 解析で利用されている個々の座位における尤度比から肯定確

率を計算する方法では不利となり、個人識別や親子鑑定にはあまり利用されてこなかった。一方で、マイクロアレイ法の技術革新に伴い、チップ上で数万箇所に及ぶ SNP を一度に検出することが可能となってきた。この膨大な情報量を DNA 鑑定に適用すると、血縁関係判定の精度向上が期待される。

2. 研究の目的

DNA 鑑定の導入は法医学鑑定や科学捜査を変革し、PCR 反応を利用したフラグメント解析は標準化され、個人同定・親子鑑定に威力を発揮している。本研究においては、一般的に利用されている STR15 座位を一度に増幅するマルチプレックス系につき、血縁関係、特に同胞関係の判定がどの程度まで有意にできるのかをまず再検討する。その際に、二者間で共有されるアリル数から評価する IBS (Identical-by-state) 法と従来法を比較検討してみる。

次に、血縁関係のある DNA 検体につき、実際にマイクロアレイ解析から、チップ上で SNP 型判定を実施する。得られた大量の SNP 型情報を、どのような方法や解析アルゴリズムで評価すれば、有意な血縁関係判定に結び付けられるのかについて、さらに検討を加えてゆくことを目的としている。

3. 研究の方法

まず、STR 解析結果を IBS 法に基づいて血縁関係判定を行った時の限界を探る実験系である。AmpF0STR Identifiler システム (Applied Biosystems 社) について、血縁者・非血縁者間で 15 座位における IBS アリル数の分布を理論的に算出し、実際例と比較した。任意の二者間における IBS アリルの出現確率 (z_i) については、親子・同胞・第二血族及び非血縁者の数式に対し、報告されている日本人集団の各座位の遺伝子頻度を基に計算した。15 座位をまとめた時の IBS アリル数 (I_i) の予想される分布は、15 の z_i 値の組合せから算出した。二者間における遺伝子型の組合せは、報告されている日本人集団の遺伝子頻度からシミュレーションで親子・同胞・非血縁関係につき各々 1 万組を作成した。さらに、当教室において解析した各血縁関係の計 97 組の型判定結果も併用し、シミュレーションデータを検証した。

次に、マイクロアレイ法による SNP 型判定を実施した。定法により抽出した DNA を制限酵素分解、断片にアダプターを接続し PCR 増幅を行い前処理する。Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 assay kit (Affymetrix 社) を用い、チップ上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる。専用機器にてスキャンし、Affymetrix Genomeconsole ソフトにて各検体の遺伝子型を判定した。gPLINK アルゴリズム

(<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) を使用し、マイナーアリル頻度 (MAF) および連鎖不均衡値 (r^2) 値の域値を設定し、SNP の選定を行った。取捨選択された SNP データを基に、血縁者間および非血縁者間を仮定した時の IBD 値の割合 (Θ) として得るとともに、IBD 値から算出される π 値 ($\pi = \Theta_{IBD=2} + 0.5 * \Theta_{IBD=1}$) を算出し、血縁関係判定に適用してみた。実際にマイクロアレイ解析を実施した検体としては、親子 7 件、同胞 13 件、第二血族 4 件、いっこ 2 件である。

本研究は、東海大学医学部医の倫理委員会の承認を得て実施されており、唾液ないし口腔内細胞の検体採取の際には、被験者より書面による同意を得て、血縁関係のみ確認可能な形で、連結不可能として使用した。

4. 研究成果

(1) STR マルチプレックス系の限界

遺伝子座につき 4 つ以上のアリルが存在する場合に、任意の二者間の遺伝子型組み合わせは 7 通りになるが、それぞれにつき、日本人の各遺伝子頻度を元に、親子・同胞・第二血族及び非血縁者間の出現確率を計算した。これら遺伝子型の組み合わせを、0・1・2 個のアリルを共有する 3 通りの場合にさらにまとめ、IBS アリルの出現確率 (z_i) を各座位について計算した。この値とヘテロ接合度 (H) とは強く相関し、3 次回帰曲線に表すことができた。

IBS 法においては、親子・同胞等の血縁関係を前提とした時の z_i 値を非血縁者の値で割ったものを尤度比 (LR) とする。IBS1 アリルの場合に、LR 値は 1 前後の数値を示すのに対し、IBS2 アリルの場合には、2.5~10.6 の値をとり、例えば、TPOX と D2S1338 では 4 倍程度の相違があり、座位のヘテロ接合度に大きく影響される。

次に、15 座位をまとめた時の IBS アリル数 (I_i) の期待値を計算したものが図 1 である。親子間では、減数分裂時の突然変異を考慮しない時には、IBS0 アリルはなく、1 アリル共有座位数 (I_1) は平均で 11.7 座位、2 アリル共有座位数 (I_2) は 3.3 座位と予想される。同胞間では、 I_0 の平均値は 1.6 座位であるが、IBS0 アリル数がゼロの場合、すなわち親子間のように非共有を含まない場合が 2 割近くあることになる。一方で、非血縁者間における I_0 は 1.6 座位で、 I_2 も 1.3 座位程度は認められると予想される。図 1 の IBS1 にあるとおり、血縁者間および非血縁者間を問わず、 I_1 に大差はなく、血縁関係判定上最も有効な指数は I_2 数といえる。実際例について別途解析を実施したところ、ほぼ同様の結果となり、シミュレーションデータによる解析に問題がないことを確認した。

Identifiler システムに含まれる STR15 座

位を複合した時の肯定確率に関しては、親子間では、全例で有意の数値を得られるが、同胞間においては、一般法で31%、IBS法で43%が、事前確立を0.5とした時にHummelの基準を満たさなかった。すなわち、同胞関係の確認すら、このシステムでは不十分と判断せざるをえない。これを克服するためには、解析座位数を増やす必要があるが、同じ染色体上にある場合に連鎖関係を考慮せねばならず、同胞のみならず、さらに遠縁の関係を考えた時に、STR解析による血縁関係判定には限界があると言わざるをえない。

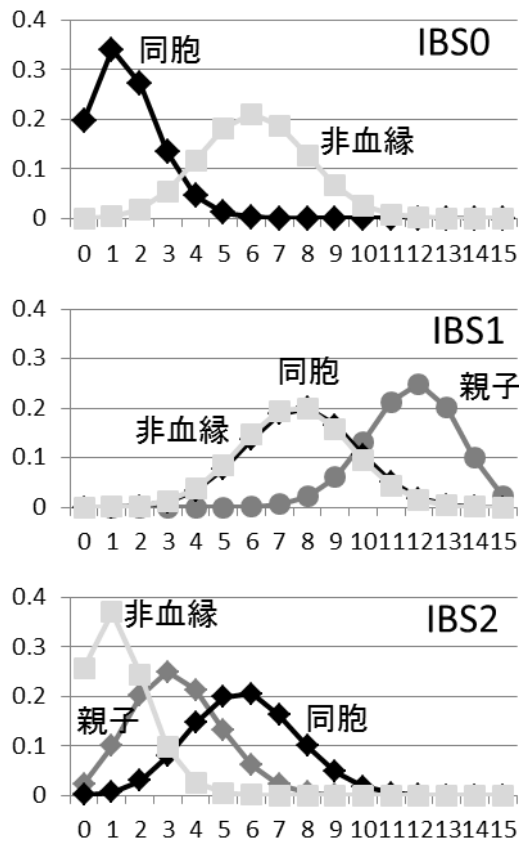


図1 IBSアレル数 (I_i) (横軸) の出現頻度

尤度比から肯定確率を計算する上では、従来法は十分に有効な方法であるが、欠点として、稀な対立遺伝子の存在が異常な高値を与えたり、変異型の場合に取り扱いに困ることがあげられる。IBS法では、LR値はヘテロ接合度に依存し、稀アレルや変異型に影響されない長所がある。さらに、従来法では集団内の遺伝子頻度のデータがないとLR値は算出できないが、異なる民族集団間でもヘテロ接合度に顕著な相違はない場合が多く、民族集団の遺伝子頻度が不明な場合でも影響は少ない。稀アレルを含んだ事例や他の民族を含む事例における血縁関係判定の際には有効と考えられる。

(2) 大量 SNP データ解析

現行法の限界に対し、マイクロレイ解析から得られる SNP データを利用して血縁関係を証明してゆく方法を展開した。マイクロレイ解析では、検体の前処理に時間がかかるが、手技は確立されており、実際のチップ上での判定率は平均 97%で、3%程度が判定不能と棄却されたのみであった。また、同じ検体につき複数回解析を実施した時の再現性は99%程度と高いものがあり、信頼性は十分に確保できると判断した。

血縁関係を評価する指数としては、STR解析では座位ごとに二者間での遺伝子型の出現頻度を血縁者と非血縁者で計算し尤度比を求める。しかし、SNPではアレルが二つであることから、遺伝子頻度の高いアレルの場合に、非血縁者の方が共有する確率が高くなるという欠点がある。従って、個々の座位で尤度比を求めることにあまり意味はなく、全体のIBD値の割合 (Θ) を指標とするのが適当と考えた。表1は、各血縁関係で期待される Θ 値を示す。 Θ 値ではパラメーターが2ヶとなること、親子関係は従来法で容易に解析でき同胞以下が問題となることから、 π 値 ($\pi = \Theta_{IBD2} + 0.5 \times \Theta_{IBD1}$) を設定すると、同胞間では0.5、半同胞・祖父母・伯父叔母といった第二度近親では0.25、いとこ間では0.125と異なる数値が期待できる。

表1 血縁関係における Θ 値と π 値

血縁関係	Θ_{IBD0}	Θ_{IBD1}	Θ_{IBD2}	π
一卵性双生児	0	0	1	1
親子	0	1	0	0.50
同胞	0.25	0.50	0.25	0.50
第二度近親	0.50	0.50	0	0.25
第三度近親	0.75	0.25	0	0.125

連鎖不均衡値 (r^2) に関しては、個々の SNP 間の r^2 を実測することは困難なので、共通した平均的な仮想値を設定することとなり、 r^2 値は0.2程度が適当であった。MAFに関しては、0.01程度のもので含むとばらつきが大きくなり、 $MAF > 0.05$ と設定した。ちなみに、 $MAF > 0.2$ と設定した時に、SNPは1.1万個程度まで制限される。

親子間における SNP データでは、MAF と r^2 値の影響は受けず、IBD値は安定した。同胞間においては、 $MAF > 0.2$ 、 $r^2 = 0.2$ と設定した時に Θ 値は正規分布に最も近づき、 π 値の実測値は 0.505 ± 0.023 となった。一方で、非血縁間においては、 π 値としては0.05程度が期待されるが、同じ条件下で実際値は 0.077 ± 0.021 となった。同胞間のものとは完全な分離が確認できるが、一部に0.1を超え、いとこ間における期待値0.125に相当するものも含まれた。

最後に、どの程度の数の SNP を解析すれば、

非血縁者と十分な分離ができるのか最少座位数を検討した。同胞で5百~1千座位、第二度近親で数千座位程度となり、祖父孫といった第二度近親関係の判定までは、今回のシステムでも十分に対応可能と結論付けられた。ただし、いとこといった第三度近親に関しては、非血縁者と第二度近親から有意に分離することは数万のSNPデータをもってしても容易ではないと考えられた。今後は、ヘテロ接合度が高く人種間で変動の少ないSNP座位を具体的に選定してゆく必要がある。さらに、実際には連鎖関係のない異なる染色体間でも r^2 値を設定しており、解析条件の設定を工夫することも有効と考えている。

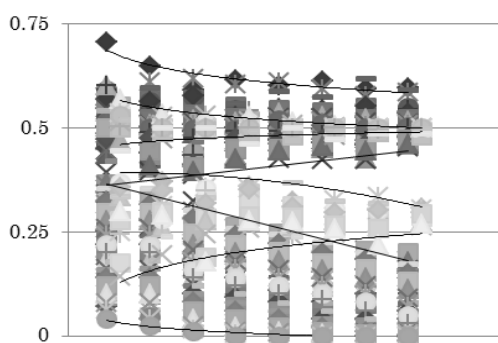


図2 血縁者と非血縁者の π 値による分離

今回の検討では、DNAチップを用いた大量SNPデータに基づく二者間の血縁関係評価の可能性を探った。同胞関係や第二度近親は確実に判定が可能と判断されたが、実用性についてさらに検討を加えてゆきたい。今回の解析では、マイクログラムオーダーのDNA量が必要であったが、法医領域で出会う微量資料や陳旧性資料に対する有効性の検討は重要な課題となるであろう。

平成23年3月に発生した東日本大震災では、2万人に及ぶ犠牲者があり、身元確認が重要な作業となった。この時には、従来からのSTR15座位解析やミトコンドリア配列で対応した様子である。血縁関係を証明して間接的に個人を同定してゆく方法は、中国残留孤児帰国の際に初めて用いられたが、安易に生物学的血縁関係を調べることは望ましくないと批判もある。しかし、他に方法がないのも現実である。今般の不安定な世界情勢を見るにつけ、確実な血縁関係解析法を社会として確立し保有しておく必要性は高いと考えている。

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9件)

- ① Tamura T, Osawa M, Kimura R, Inaoka Y, Tanaka S, Satoh F, Sato I. Evaluation of the allele-sharing approach, known as the IBS method, in kinship analysis. J Forensic Leg Med, 査読有、in press.
- ② 田村友紀, 木村亮介, 稲岡斉彦, 田中佐知, 佐藤文子, 佐藤至, 大澤資樹. IBS値に基づく血縁関係解析法の実用性. DNA多型、査読無 2011; 19: 179-184.
- ③ 稲岡斉彦, 田嶋敦, 田村友紀, 田中佐知, 佐藤文子, 筒井健太, 佐藤至, 大澤資樹. DNAチップを用いたSNP解析による二者間の血縁関係判定. DNA多型、査読無 2011; 19: 164-168.
- ④ Inaoka Y, Tajima A, Tamura T, Satoh F, Osawa M. Kinship analysis based on SNP data from microarray assay. Forensic Sci Int: Genetics 査読無 2011; 3 (1), e275-e276.
- ⑤ Tamura T, Osawa M, Inaoka Y, Tanaka S, Satoh F, Nakamura T. Re-evaluation of the identical-by-state method in pairwise kinship inference. Forensic Sci Int: Genetics 査読無 2011; 3 (1), e244-e245.
- ⑥ Osawa M, Inaoka Y, Hasegawa I, Satoh F. Postmortem molecular analysis to SIDS victims. Forensic Sci Int: Genetics 査読無 2011; 3 (1), e263-e264.
- ⑦ 大澤資樹, 田村友紀, 木村亮介, 稲岡斉彦, 早田慈, 長谷川巖, 佐藤文子, 佐藤至: IdentifilerシステムでのIBS法による血縁関係解析. DNA多型、査読無 2010; 18: 152-156.
- ⑧ Kimura R, Yamaguchi T, Takeda M, Kondo O, Toma T, Haneji K, Hanihara T, Matsukusa H, Kawamura S, Maki K, Osawa M, Ishida H, Oota H. A common variation in EDAR is a genetic determinant of shovel-shaped incisors. Am J Hum Genet 査読有、2009; 85(4):528-535.
- ⑨ 木村亮介, 大澤資樹: 集団頻度情報を用いないゲノムワイドなSNPタイピングによる親縁係数の推定. DNA多型、査読無 2009; 17: 14-17.

[学会発表] (計11件)

- ① Osawa M, Inaoka Y, Hasegawa I, Satoh F. Postmortem molecular analysis to SIDS victims. 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2011.8.31, the University of Vienna, Vienna, Austria.
- ② Inaoka Y, Tajima A, Tamura T, Satoh F, Osawa M. Kinship analysis based on SNP data from microarray assay. 24th World

- Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2011.8.30, the University of Vienna, Vienna, Austria.
- ③ Tamura T, Osawa M, Inaoka Y, Tanaka S, Satoh F, Nakamura T. Re-evaluation of the identical-by-state method in pairwise kinship inference. 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2011.8.30, the University of Vienna, Vienna, Austria.
- ④ 稲岡 齊彦, 筒井健太, 中西亜由美, 坪井秋男, 瀬戸良久, 長谷川巖, 佐藤文子, 大澤資樹. ABO 式血液型における DNA 検査による遺伝子型判定法の比較. 日本 DNA 多型学会第 20 回学術集会, 2011.12.1, はまぎんホール (横浜市).
- ⑤ Osawa M. Postmortem molecular analysis of sudden deaths from unknown causes. (Session 4: Functional Genomics and DNA Typing Analysis) BIT's 1st Annual World Congress of Forensics, 2010.10.23, Dalian Bayshore Hotel, Dalian, China.
- ⑥ 大澤資樹, 田村友紀, 木村亮介, 稲岡 齊彦, 田中佐知, 早田慈, 長谷川巖, 佐藤文子, 佐藤至. STR 多型解析からの二者間血縁関係判定における IBS 評価法. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010.10.28, 大宮ソニックシティ (さいたま市).
- ⑦ 田村友紀, 木村亮介, 稲岡 齊彦, 田中佐知, 佐藤文子, 佐藤至, 大澤資樹. IBS 値に基づく血縁関係解析法の実用性. 日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会, 2010.11.18, 三島市民文化会館 (三島市).
- ⑧ Osawa M, Kimura R, Tamura T, Soda M, Satoh F, Hasegawa I, Sato I: Evaluation of the IBS method in relationship analysis from short tandem repeat data. The American Society of Human Genetics 59th annual meeting. 2009.10.22; Hawaii Convention Center, Honolulu, USA.
- ⑨ Kimura R, Yamaguchi Y, Maki K, Takeda M, Kondo O, Hanihara T, Osawa M, Ihida H, Kawamura S, Oota H: A nonsynonymous SNP in EDAR is associated with tooth shoveling. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting. 2009.10.22; Hawaii Convention Center, Honolulu, USA.
- ⑩ 大澤資樹, 田村友紀, 木村亮介, 稲岡 齊彦, 早田慈, 長谷川巖, 佐藤文子, 佐藤至. Identifiler システムでの IBS 法による血縁関係解析. 日本 DNA 多型学会第 18 回学術集会, 2009.10.28, 久留米大学医学部筑水会館 (久留米市).
- ⑪ 田村友紀, 大澤資樹, 田村佐和, 木村亮介, 稲岡 齊彦, 早田慈, 山本佳世, 石割敦也, 鈴木隆徳, 佐藤至: 個人識別におけ

る AmpF1STR Identifiler Kit を用いた STR 解析の有用性. 日本法科学技術学会第 15 回学術集会, 2009.11.12, ホテルフロラ シオン青山 (東京都).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA MOTOKI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 90213686

(2) 研究分担者

木村 亮介 (KIMURA RYOUSUKE)
琉球大学・亜熱帯島嶼科学超域研究推進機構・特命准教授
研究者番号: 00453712

(3) 連携研究者

稲岡 齊彦 (INAOKA YOSHIHIKO)
東海大学・医学部・助教
研究者番号: 50564689