

令和元年6月3日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15400

研究課題名(和文)「身体的特徴推定のためのCNVマルチマーカースystem」の開発

研究課題名(英文) Development of CNV multi-marker system for prediction of physical features

研究代表者

飯田 礼子 (Iida, Reiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：40139788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、身体的特徴との相関があるコピー数多型(CNV、特定のDNA領域のコピー数が個人で異なるような多型)の解析法を確立し、候補CNVについて、形質との相関の解析および遺伝学調査を実施し、その有用性を検討することである。本研究の結果、次のような成果が得られた。簡便かつコピー数既知のDNAを必要としない定量的PCRによる新規解析法を開発した。増幅産物の定量やプラスミド混合物を用いた模擬分析などにより、内部標準による適切な正規化と正確性が確認された。今回、身長との間に有意な相関を示すCNVを同定できなかったが、法医学的に有用なCNVのスクリーニングには十分役立つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、DNA検査法の発展より個人識別(ご遺体が誰であるか、また、血液、体液、臓器などが誰に由来するかを決定すること)の精度は飛躍的に向上した。しかし、比較すべき対象が入手できない未知の検査試料に関して、有力な情報の一つとなりうる年齢・身体的特徴などについて推定する方法は未だ確立していない。本研究では、身長などの身体的特徴の推定に有用なコピー数多型(CNV)のスクリーニング法を新たに開発することができた。本研究の発展により、将来、法医学的試料から身長・体重などの推定が可能になっていくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel method for screening of trait-related CNVs, to perform population study, and finally, to evaluate the applicability our method to forensic casework. Consequently, the following results were obtained: (1) A simple quantitative real-time PCR method for determination of copy number, without any requirement for reference DNA, was developed. (2) The validity of the new method was confirmed by quantification of amplicons using bioanalyzer and mock analysis. (3) Although, this time, no trait-related CNV was identified, our simple method appears to be a promising option for screening of trait-related CNVs.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 個人識別

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

昨今の犯罪の悪質・巧妙化に伴い、法医鑑識科学分野において、被疑者や被害者特定のための個人識別精度の向上が求められている。近年、分子生物学の進歩に立脚した DNA 多型の法医実務への導入により、個人識別精度の飛躍的向上がもたらされた。体液(血液、精液など)遺留品、組織などの検査は、法医鑑識科学的検査のうちで最も重要な部分を占め、犯罪捜査あるいは裁判において極めて大きな役割を演ずることが多く、高い精度と信頼性が求められる。しかし、近年、過去の冤罪事件が社会問題となり、科学的とされた当時の DNA 型鑑定への信頼が大きく揺らいでいる。このような社会的背景に鑑み、従来の DNA 型検査とは異なる原理に基づく新たな手法を確立し、複数の検査法の組み合わせによる鑑定を実施する必要がある。特に被疑者に関する情報が極めて少ない案件においては、年齢や身体的特徴が大きな手掛かりとなるが、推定法は未だ確立されていない。そこで本研究では、身体的特徴との相関する DNA 多型マーカーの開発を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

- (1) 身体的特徴との相関が予測される CNV のコピー数解析法の確立：データベースなどを利用して候補となる CNV を検索し、それぞれのコピー数解析法を確立する。
- (2) 各 CNV についての集団遺伝学調査および形質との相関性の解析：(1) で確立した解析法により、日本人における各 CNV のコピー数頻度分布の調査を行う。さらに身長・体重との相関解析を実施する。
- (3) 「身体的特徴推定マルチマーカーシステム」の構築と法医学的有用性の検討：相関の高い CNV を組み合わせたマルチマーカーシステムを構築し、その法医学的有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA試料

DNA試料は、島根大学医学部倫理委員会の承認 (No. 1678) を得て解剖時に採取した日本人男女の心臓血より QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) を用いて抽出した。

### (2) CNVの選定

身長との相関が予想される CNV (LTBP1、ETV-6、NEDD4L) を PubMed の利用により過去の文献から選出した。

### (3) キメラプラスミドベクターの作製

ゲノム DNA を鋳型として PCR 増幅した *ZNF80*、*LTBP1*、*ETV6* および *NEDD4L* 遺伝子特異的な配列を、pcDNA2.1 vector (Invitrogen) にそれぞれ挿入した (pcDNA2.1/*ZNF80*、pcDNA2.1/*LTBP1*、pcDNA2.1/*ETV6*、pcDNA2.1/*NEDD4L* と表す)。さらに、*ZNF80* 特異的な配列および目的 CNV (*LTBP1*、*ETV6*、*NEDD4L*) に特異的な配列をそれぞれ 1 コピーずつ含むキメラプラスミド (*LTBP1*-*ZNF80*、*ETV6*-*ZNF80*、*NEDD4L*-*ZNF80*) を Horton らの方法 (Gene 77, 61-68, 1989) にしたがって作製した。

### (4) 定量的 PCR (Q-PCR) による CNV 解析

定量的 PCR (Q-PCR) は、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。各 CNV の解析に用いる *ZNF80* および目的 CNV 遺伝子の検量線は、(2) で得たキメラプラスミドの希釈列を鋳型とした Q-PCR によりそれぞれ作成した。2 倍体あたりの CNV コピー数は式 [目的 CNV の増幅産物量 / *ZNF80* の増幅産物量 × 2] によって算出した。

### (5) Bioanalyzer による解析法

ゲノム DNA を鋳型とし、*ZNF80* および *NEDD4L* 遺伝子特異的な配列を AmpliTaq Gold 360 Master

Mixを用いて増幅した。増幅産物量はDNA 1000 Chipsを装着したAgilent 2100 Bioanalyzerによって定量した。

## (6) 分散解析

CNVと身長の間の特相はANOVA programを用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Q-PCR による CNV 解析法の確立

身体的特徴との相関が予測される 2 種の CNV (LTBP1、ETV6) について、目的 CNV 配列を含むキメラプラスミドの希釈列を鋳型として Q-PCR を行い、検量線を作成した。リファレンス遺伝子 *ZNF80* とそれぞれの目的 CNV の増幅効率に大きな相違は無かったことから、本法による適切な正規化と正確な定量が可能と考えられた (図 1)。さらに、Bioanalyzer による増幅産物の定量 (図 2) およびプラスミド混合物を用いた模擬分析 (図 3) を行い、算出コピー数が正確であることを確認した。

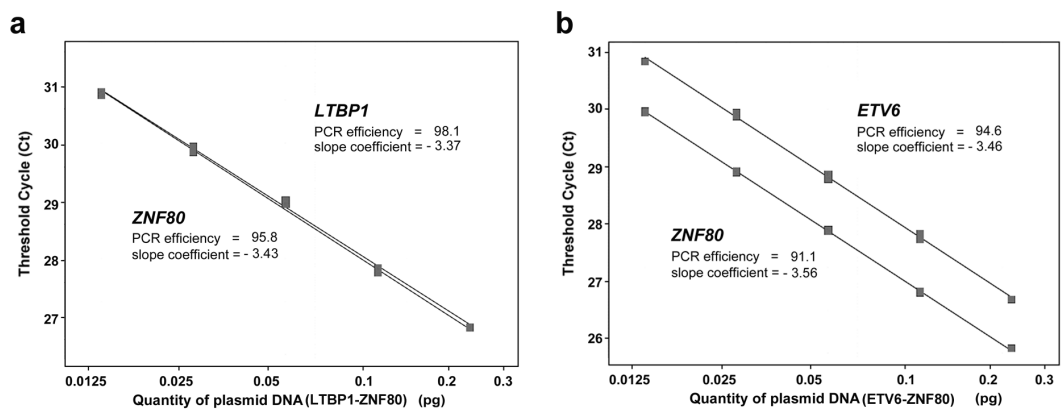


図 1 CNV 分析標準曲線の例 (a) LTBP1 (b) ETV6

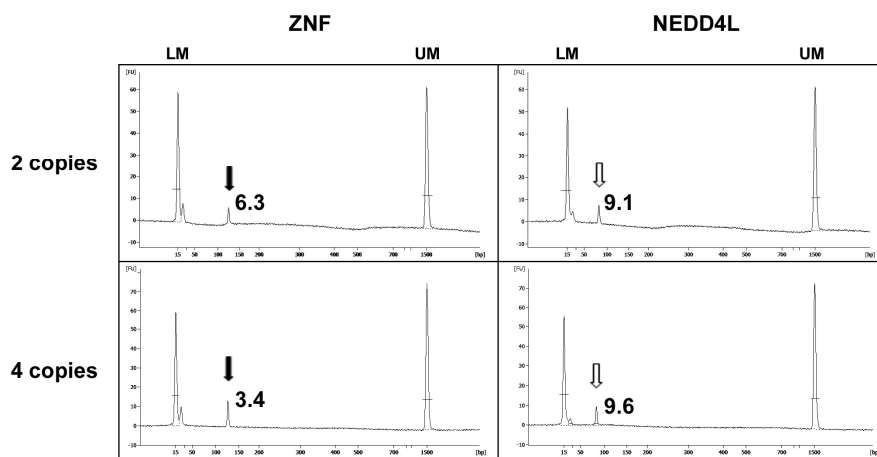


図 2 Bioanalyzer による増幅産物の定量 (NEDD4L)

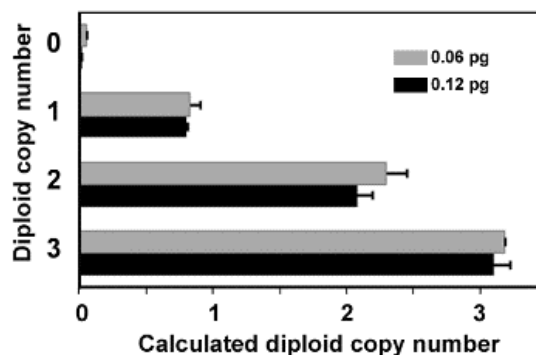


図 3 LTBP1 CNV の模擬分析

## (2) 各 CNV についての集団遺伝学調査および形質との相関性の解析

(1) で確立した方法を用いて日本人集団における *LTBP1*、*ETV6* および *NEDD4L* の CNV 型判定を行い、コピー数と身長との相関を解析した(図4)。しかしながら、一定の傾向は認められたものの、いずれの CNV においても有意な相関関係は確認できず、身長との間に有意な相関を示す CNV は同定できなかった。したがって、本法は法医学的に有用な CNV のスクリーニング法として十分有用であることが明らかになったが、さらにより大きな集団での解析や新たな CNV のスクリーニングを行う必要があると考えられた。

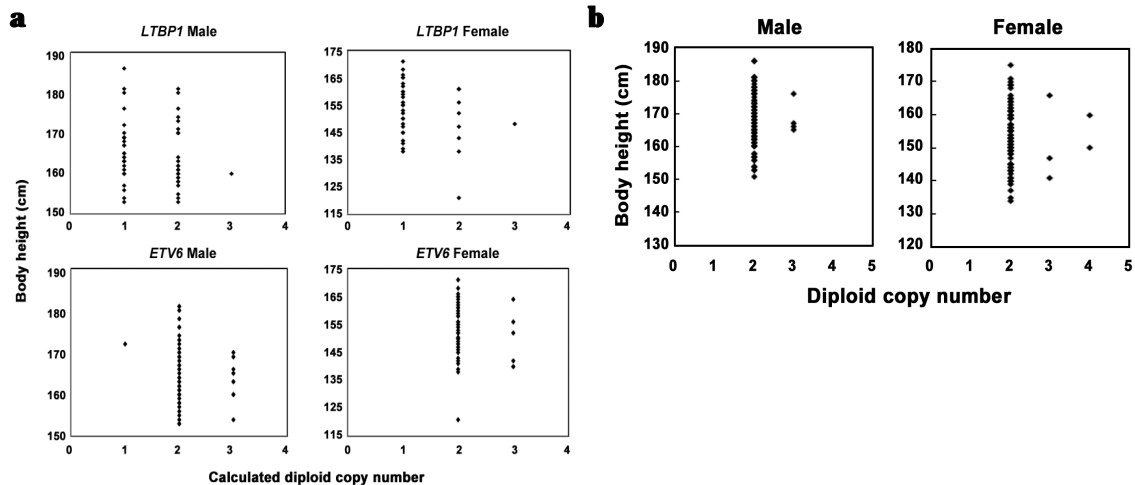


図4 日本人由来法医学サンプルの2倍体あたりのCNVコピー数と身長の関係 (a) *LTBP1*、*ETV6* (b) *NEDD4L*

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, K. Yamada, Y. Takinami, H. Takeshita, R. Iida, T. Yasuda. Low genetic heterogeneity of copy number variations (CNVs) in the genes encoding the human deoxyribonucleases 1-like 3 and II potentially relevant to autoimmunity. *PLOS ONE*, 14, e0215479, 2019, 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0215479

M. Ueki, H. Takeshita, J. Fujihara, K. Kimura, R. Iida, T. Yasuda. Analysis of CNV (copy number variation) in the *NEDD4L* gene potentially implicated in body height in Japanese population. *Legal Med.*, 37, 83-85, 2019, 査読あり

DOI: 10.1016/j.legalmed

M. Ueki, H. Takeshita, N. Utsunomiya, T. Chino, N. Oyama, M. Hasegawa, K. Kimura, J. Fujihara, R. Iida, T. Yasuda. Survey of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding human deoxyribonuclease I-like 2 producing loss of function potentially implicated in the pathogenesis of parakeratosis. *PLOS ONE*, 12, e0175083, 2017, 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0175083

M. Ueki, H. Takeshita, J. Fujihara, K. Kimura, R. Iida, T. Yasuda. Simple screening method for CNV copy number variations associated with physical feature. *Legal Med.*, 25, 71-74, 2017, 査読あり

DOI: 10.1016/j.legalmed.2017.01.006

M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, R. Iida, H. Takeshita, T. Yasuda. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the human deoxyribonuclease (DNase) family potentially relevant to autoimmunity. *Immunol. Invest.*, 45, 406-419, 2016, 査読あり

DOI: 10.3109/08820139.2016.1157813

#### 〔学会発表〕(計4件)

飯田 礼子、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり、安田 年博. 定量的 real-time PCR を用いた簡便な CNV 解析法の応用 NEDD4L 遺伝子. 第 27 回日本 DNA 多型学会学術集会、2018

T. Yasuda, R. Iida, M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, K. Yamada, H. Takeshita. Survey of copy number variations (CNVs) associated with body height. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine、2018

安田 年博、飯田 礼子、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり、山田 和夫、河合 康幸. 自己免疫疾患に関与するヒト DNase family 遺伝子の functional SNPs. 第 101 次日本法医学会学術全国集会、2017

飯田 礼子、安田 年博、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり. 法医学的個人識別に有用な CNV のスクリーニング. 第 25 回日本 DNA 多型学会学術集会、2016

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究協力者

研究協力者氏名：竹下 治男

ローマ字氏名：(TAKESHITA, haruo)

研究協力者氏名：植木 美鈴

ローマ字氏名：(UEKI, misuzu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。