

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790645

研究課題名(和文) CNV解析による一卵性双生児の個人識別 aCGH法とリアルタイムPCR法による

研究課題名(英文) Individual identification of monozygotic twins by CNV analysis

研究代表者

伊澤 光 (IZAWA, Hikaru)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30514103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：6組12人については血液を試料としマイクロアレイを使用したaCGH法によりCNV解析を行い、9組18人については口腔粘膜上皮を試料としてSYBR Greenを用いたリアルタイムPCR法によりCNV解析を試みた。

6組12人のaCGH法によるCNV解析では、2組の第2染色体上の2061bpに共通してCNVが検索された。すべてに共通して検索されたCNVは無かったが、6組12人においてCNVは存在し個人識別は可能であった。

また第2染色体を中心にprimerを作製しリアルタイムPCR法を行ったところ、1組(生後半年)を除いて個人識別は可能であった。

研究成果の概要(英文)：Is performed CNV analysis by aCGH method using a microarray as a sample of blood for six monozygotic twins, an attempt was made to CNV analysis by real-time PCR using SYBR Green as a sample oral mucosal epithelium for nine monozygotic twins.

The CNV analysis by aCGH method of six monozygotic twins, CNV is found in common to 2061bp on chromosome 2 of the two sets. There was no CNV that are found in common to all, personal identification was possible CNV is present in 12 people six monozygotic twins.

Also was subjected to real-time PCR method to prepare a primer about the second chromosome, personal identification was possible with the exception of the (six months old) a pair.

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：一卵性双生児 個人識別 CNV解析 aCGH法

## 1. 研究開始当初の背景

一卵性双生児(以後双生児とする)は1個の受精卵から分化の過程で2つに分かれ、それぞれに成長するために遺伝情報は同一とされているが、法医学分野では指紋、顔貌、身長などは異なっていることから、遺伝情報は同一ではないことは予測されていた。しかしながら、現在のDNA鑑定検査による鑑定技術では双生児の親子鑑定は可能であっても双生児間の個人識別は不可能であることも事実であった。近年は双生児による犯罪も増加傾向にあり双生児間の個人識別に資する方法論の開発は喫緊の課題であった。临床上、一卵性双生児の一方が糖尿病や癌等を発症するのに対し、片方はしないという症例があることに着目したBruderらは、2008年、片方が神経疾患様の疾病を有する双生児の遺伝子解析を行ったところ、双生児間の塩基配列は同一であるが遺伝子構造の相違 Copy Number Variations (CNV) の存在を報告した(Am J Hum Genet. 82, 763-771, 2008)。子の遺伝子は両親から1コピーずつ受け継ぎ2コピー存在するのが通常であるが、個人によっては特定の遺伝子が欠失して1コピーのみであったりあるいは増幅されて3コピー存在したりする現象、すなわちCNVが観察されるのである。

そこで、マイクロアレイを用いた aCGH 法により CNV 解析を行うことで双生児の個人識別が行えるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでにマイクロアレイを用いた array comparative genomic hybridization (aCGH 法) による Copy Number Variation (CNV) 解析によって、一卵性双生児の個人識別が可能であることを報告した。また、aCGH 法は高価で時間を要するために、安価で迅速なリアルタイム PCR を用いた相対定量法による CNV 解析により双生児の個人識別が可能であることを報告している。そこで、

一卵性双生児の例数を増やし aCGH 法およびリアルタイム PCR 法を用いた相対定量法による CNV 解析を行い、個人識別の指標となる普遍的な CNV の発見に努める。また、同一個体における組織間の CNV の相違について検討し、法医鑑定実務により即した研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 試料の採取および一卵性双生児の確認  
双生児から血液、口腔粘膜上皮、毛髪、爪、精液および尿を採取する。今回の実験で試料の提供を受けた一卵性双生児は10組20人である。男性双生児は2組、女性双生児は8組、生後半年～36歳までの試料である。

近年までは、「胎盤が一つなら一卵性、二つなら二卵性」と誤解する医師もいたほどで、临床上は一卵性なのに二卵性と誤診された例は少なくない。DNA型検査を行わないかぎり一卵性なのか、二卵性なのかを確定することはできない。したがって、一卵性と申告された双生児について、常染色体(15ローカス)および性染色体(Y:16ローカス、X:8ローカス)上に位置するSTR型検査により、確定した。

### (2) gDNA の抽出

gDNA の抽出は自動 DNA 抽出装置 (FujiFilm) を使用して行う予定であったが、aCGH 法を行う上で、DNA の濃度、精度が基準値を満たすことができなかつたために、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出を行った。マイクロアレイを用いた aCGH 法による CNV 解析は、全染色体の CNV の領域を確認するものであり、高密度のプローブを持ったマイクロアレイを使用するために、口腔粘膜上皮からの DNA では実験を行う規定値に満たなかつたために血液から抽出した gDNA のみを使用した。

### (3) aCGH 法による CNV 解析

ULS (Universal Linkage System) による蛍光色素のラベル化を行うことにより、双生児

の片方の gDNA に緑色の蛍光色素を結合させた。またもう一方の gDNA に赤色の蛍光色素を結合させた。その後、未反応蛍光色素の除去を行い、一つのマイクロアレイ上にラベル化された双生児両者の gDNA を注入し、40 時間高温槽の中でハイブリダイゼーションを行った。40 時間経過後に、マイクロアレイの洗浄を行い、アジレントスキャナ (Agilent) にセットし、スキャンニングを行った。スキャンニングされた蛍光度を Future Extraction Software v.10.5 (Agilent) を用いて数値化した。

#### (4) 相対定量法による CNV 解析

PCR 反応溶液は Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) を使用し、リアルタイム PCR 装置 Mx3000P (同) を用いて 95 3 分で酵素を活性化させた後、95 5 秒・60 20 秒を 40 サイクル行った。また、コントロール試料として TaqMan Copy Number Reference Assay RNase P (ABI) を使用し 40 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 反応条件は、これまでの研究成果を基本としたが、作製したプライマーによっては条件を変更しなければいけないこともあった。その際には、適宜、プライマ - の最適条件を検討する必要がある。40 サイクルの PCR を行った後、95 1 分・55 30 秒・95 30 秒を 1 サイクル行い、Dissociation Curve を確認し、primer dimer が存在しないことを確認した。

#### 4 . 研究成果

試料の提供を受けた 10 組 20 人のうち、1 組の双生児に関しては、常染色体 STR (15 ローカス) および X 染色体 STR (8 ローカス) による解析により、二卵性双生児と確定された。常染色体 STR によって二卵性双生児と確定された 1 組の双生児についても、aCGH 法での結果がどのようになるのかを確かめるためにマイクロアレイにて実験を行った。7 組 14 人 (うち一組は二卵性双生児) についてはマイクロアレイを使用した aCGH 法により CNV 解析を行い、9 組 18 人については

SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 法を行っている。

7 組の双生児の血液から DNA を抽出し、マイクロ array を使用した aCGH 法により双生児の DNA を直接 Hybridize させて Copy Number Variation (CNV) 解析を行った。また、双生児の DNA に結合させる蛍光色素を交換させ、検証試験として SWAP 試験を行っている。aCGH 法を行うにあたり、口腔粘膜上皮を試料として DNA 抽出を行い、実験を行ったが DNA 量および DNA の精度が実験を行える基準値に満たないために、血液から抽出した DNA を使用することとした。

2 組の双生児には第 2 染色体上の同部位に CNV が検索された。この共通して検索された CNV が一卵性双生児に普遍的な CNV である可能性も考えられたために、他の双生児においても重点的に検索しようと考えていた。6 組 12 人 (1 組は二卵性双生児のために、aCGH 法を行っているが、ここでの結果に含めない) に共通して見られる CNV は存在しなかったものの、すべての双生児において CNV が検索することができ、個人識別は可能であることが示唆された。CNV として検索されたコピー数の違いで、一番多かった双生児は 20 ヶ所の CNV、また一番少なかった双生児で 4 ヶ所であり、1 組の双生児に検索された CNV は平均で 8 箇所であった。また、約 200bp ~ 約 20000bp と範囲の狭い CNV、範囲の広い CNV とさまざま検索されている。二卵性双生児では、別人の DNA を比較しているものであり、常染色体 STR で二卵性双生児と判定されたように、aCGH 法においても一卵性双生児の結果とは全く異なる結果となった。

つぎに、2 組の双生児において、第 2 染色体上に共通して認められた CNV 領域内 (2061bp) にプライマーを 5 種類設計し、コストが高く、検査にかなりの時間を要するマイクロアレイを使用した aCGH 法に比べて安価で迅速な SYBR Green を用いたリアルタイム

定量 PCR 法による CNV 解析を試みた。リアルタイム PCR を行う際の試料として、血液および口腔粘膜上皮から抽出した DNA を用いて行った。

その結果、2 種類のプライマーに関しては、PCR による増幅が行えなかったもの、再現性が認められないものであり、個人識別を行うことは出来なかった。残り 3 種類のプライマーに関して、9 組 18 人は同一の結果が得られ、個人識別は可能であった。しかしながら、1 組の双生児に関しては、2 人のコピー数が同一の結果となり、個人識別を行うことが出来なかった。このコピー数が同じになる 1 組は生後半年の双生児の口腔粘膜上皮から抽出された DNA であり、CNV の存在はエピジェネティックな変化であることが予想される結果であった。CNV はエピジェネティックな DNA の変化であることが事実であるならば、将来のまたは過去の時点においての個人識別を行うことは難しい。しかしながら、現時点での個人識別を行えるようにすることは法医鑑識領域では有効な方法と考えている。口腔粘膜上皮および血液では同様の結果となり、同一人内での各臓器によるコピー数の変化は認められなかった。毛髪および爪から抽出した DNA では、今回作製したプライマーにより個人識別を行うことができなかった。毛髪および爪から DNA を抽出することはが大変難しく、微量な量しか抽出されなかったこと、作製したプライマーでは微量な DNA の増幅が困難であること等が考えられ、さらなる研究が必要となることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 伊澤 光、堤 博文、丸山 澄、小室歳信, aCGH 法を応用した CNV 解析による一卵性双生児の個人識別 第 97 次日本

法医学会学術全国集会 2013 年 6 月 27 日 札幌

2. 伊澤 光、丸山 澄、堤 博文、小室歳信, 一卵性双生児の個人識別を可能にした CNV 解析 第 64 回日本大学歯学会総会・学術大会 2013 年 5 月 20 日 東京
3. 伊澤 光、堤 博文、丸山 澄、網干博文、小室歳信, CNV 解析による一卵性双生児の個人識別 - リアルタイム PCR 法による - 第 81 回日本法医学会学術関東地方集会 2012 年 10 月 20 日 群馬  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

- #### 6. 研究組織
- (1)研究代表者  
伊澤 光 (IZAWA, Hikaru)  
日本大学・歯学部・助教  
研究者番号: 30514103.

- (2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号:

- (3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号: