

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460866

研究課題名(和文)日本人に適したマルチプレックス INDEL 多型検出システムの構築とその法医学的応用

研究課題名(英文) A multiplex system using highly polymorphic INDEL markers in Japanese population and its forensic application

研究代表者

永井 淳(Nagai, Atsushi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00207961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：市販の INDEL 多型検出キットを用い、キットに含まれる30種類の INDEL マーカーの日本人集団における多型性を調査するとともに、その結果を他の人種集団のデータと統計学的に比較し、本キットの総合識別能は日本人集団では白人集団に比べ低いことを明らかにした。次いで、常染色体から日本人集団において高い多型性を示す12種類の INDEL マーカーを選び出し、これらのマーカーを用いたマルチプレックス INDEL 多型検出法について検討した。また、INDEL マーカーを選択する過程で見出した INDEL-STR について、STR における可変反復ブロックの反復数と INDEL 多型との間に強い関連があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using commercial INDEL polymorphism detection kit, I investigated the polymorphisms in the Japanese population for 30 INDEL markers included in the kit and compared the result with the data of other racial groups statistically, and I clarified the combined power of discrimination value of this kit in the Japanese population was lower than that in the Caucasian populations. Then, I selected 12 INDEL markers on autosome, which were highly polymorphic in the Japanese population and examined the multiplex INDEL polymorphism detection method using these markers. In addition, about INDEL-STR which I found in the process that selected the INDEL markers, I clarified the repeat number of the variable repeat block of STR are strongly associated with the INDEL polymorphism in the flanking region of STR.

研究分野：法医学

キーワード：INDEL多型 個人識別 日本人集団

1. 研究開始当初の背景

INDEL (Insertion/Deletion) 多型[1]とは、数 bp から十数 bp 程度の短い塩基配列の挿入 (insertion) もしくは欠失 (deletion) により生ずる DNA 多型のことである。ヒトゲノムでは、INDEL 多型部位は 200 万か所ほどであると推定されており[2]、VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)、STR (Short Tandem Repeat)、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) につづく新しい DNA マーカーとして様々な領域でその利用が期待されている[1-3]。

INDEL マーカーの特徴として、PCR 増幅サイズが百数十 bp 以下と小さいこと、突然変異が生じにくいことなどがある[4]。これらの特徴は、法医学領域においては、小さく断片化しているような DNA 試料を用いた個人識別や、親子鑑定に特に有効である。

一方、個々の INDEL マーカーでは、その多型性の低さが指摘されている。すなわち、INDEL マーカーのアレルは「挿入」アレルと「欠失」アレルの 2 種類であるため、個々の INDEL マーカーのヘテロ接合度は高くても 0.5 を超えない[4,5]。そのため STR に匹敵する高い識別能を得るには、SNP 検査と同様、多くの INDEL マーカーについて型判定を行う必要があるが、INDEL 自体は PCR 増幅サイズが小さいことに加え、アレル・サイズの幅が小さいため、マルチプレックス PCR を用いて一度に多数のマーカーを同時に検出することが容易である[4,5]。それゆえ、個々の INDEL マーカーの多型性の低さは法医学的利用における欠点とはならない。

2. 研究の目的

INDEL 多型の集団遺伝学的解析は、白人、黒人、アジア人など、主要な人種集団についてすでに行われており、INDEL マーカーの多型性は人種によって異なることが明らかにされている[4-6]。

そこで、試みに市販の INDEL 多型検出キット (Investigator DIPplex Kit, QIAGEN 社) を用いて日本人 50 人における多型性を検討したところ、キットに含まれる 30 種類の INDEL マーカーのうち、約 1/3 にあたる HLD111、HLD118、HLD99、HLD114、HLD48、HLD122、HLD64、HLD81、HLD97、HLD39 などのマーカーにおいて、「挿入」アレルの出現頻度と「欠失」アレルのそれとの間に大きな偏りを認められた。一方、白人集団[7]では、これら 30 種類のマーカーのいずれにおいてもアレルの出現頻度の偏りは非常に小さく、総合識別率も 2.83×10^{-13} と、日本人の 2.79×10^{-11} と比較してきわめて高い値を示している。また、Pereira ら[4]も、彼らが選択した 38 種類の INDEL マーカー・セットの識別能は、白人集団で高く、アジア人集団では低いことを報告している。

以上のように、INDEL 多型は法医学領域における有用な DNA マーカーであるが、その多

型性には人種間で差異が認められ、日本人集団の多型性は白人集団に比べてきわめて低い。したがって、白人集団と同様に日本人集団でも、法医学領域における新たな DNA マーカーとして INDEL 多型を利用するためには、日本人に適した、より識別能の高い INDEL マーカー・セットから成る「マルチプレックス INDEL 多型システム」を構築する必要がある。

本研究では、日本人に最適化した、識別能の高いマルチプレックス INDEL 多型検出システムを開発し、法医鑑定実務に応用するとともに、対象として、前述の Investigator DIPplex Kit (QIAGEN 社) を使用し、その日本人集団における多型性について検討することを目的とする。なお、本研究は、岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会の承認を得て実施した。

3. 研究の方法

(1) 試料

岐阜県在住の日本人非血縁者約 175 人の末梢血もしくは口腔粘膜細胞から抽出した DNA を試料とした。

(2) INDEL マーカーの選択

Mammalian Genotyping Service (<https://www3.marshfieldclinic.org/mgs/>)、UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) および dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) を利用し、既報[4,5]のデータを参照しつつ、常染色体上の INDEL マーカーを選択した。

(3) シングルプレックス PCR および各 INDEL 多型の検出

選択した各 INDEL マーカーの日本人集団における多型性について検討するために、まず各 INDEL マーカーのシングルプレックス PCR を実施した。各 INDEL マーカーのプライマーの設計には Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を使用した。PCR 条件は既報[4,8]に準拠した。なお、PCR 条件の検討に際しては、鋳型 DNA として市販のヒト cell line DNA (9947A、9948、いずれも Promega 社) を用いた。各 INDEL 多型は、2% アガロースゲルもしくは 4~7% 変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色や銀染色により検出した。多型性を判断する基準は Pereira ら [4] の報告に準拠した。

(4) マルチプレックス PCR および INDEL 多型の同時検出

前項の基準により、日本人集団において多型性を認めた INDEL マーカーについて、マルチプレックス PCR 法を用いた同時検出を試みた。INDEL マーカーの各プライマーの末端を FAM、HEX、TAMRA などの蛍光色素で修飾し、市販のマルチプレックス PCR キット (Qiagen

Multiplex PCR kit, QIAGEN 社) を用い, 既報[4]を参照しつつ, マルチプレックス PCR 条件を検討した。増幅産物に Gene Scan 400HD ROX Size Standard (Applied Biosystems 社) および HiDi-Formamide (Applied Biosystems 社) を加え熱変性後, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) によりキャピラリー電気泳動を行い, GeneMapper ID Software v3.2 (Applied Biosystems 社) を用いて型判定を行った。

(5) Investigator DIPplex Kit による解析
キットに付属のプロトコールに従い, 試料を PCR 後, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) および GeneMapper ID Software v3.2 (Applied Biosystems 社) を用いて型判定を行った。

(6) 統計学的解析
得られた各 INDEL マーカーの遺伝子型をもとに Arlequin v3.5 ソフトウェアを使用して Hardy-Weinberg 平衡検定を実施した。また, 集団間におけるアレルの頻度分布の差異を検討するために 2×2 分割表を用いた χ^2 検定を行った。各 INDEL マーカーにおける識別能 (Power of Discrimination: PD), 多型情報含有値 (Polymorphic Information Contents: PIC) ならびに異型接合度 (Heterozygosity: HZ) は Stat40F を使用して算出した。

(7) INDEL-STR ローカスのシーケンス解析
INDEL マーカーを選択する過程で見出した 2 種類の INDEL-STR ローカス (DXS10146, DXS10148) のシーケンス解析を行った。各ローカスを PCR 法により増幅し, ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後, エチジウムブロマイド染色を行い, 目的の DNA バンドを切り出した。次いで, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用い, DNA バンドから回収した増幅産物のサイクルシーケンス反応を行い, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) によりシーケンスを解析した。

4. 研究成果

Investigator DIPplex Kit (QIAGEN 社) を使用し, キットに含まれる 30 種類の INDEL マーカー (HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD58, HLD56, HLD118, HLD92, HLD93, HLD99, HLD88, HLD101, HLD67, HLD83, HLD114, HLD48, HLD124, HLD122, HLD125, HLD64, HLD81, HLD136, HLD133, HLD97, HLD40, HLD128, HLD39, HLD84) の日本人 175 人における多型性について検討した。その結果, 各 INDEL マーカーの 2 種類のアレルのうち, 「欠失」アレルについて見ると, その出現頻度は最も低いもので 0.080 (HLD118), 最も高いもので 0.934 (HLD111) を示した。予備実験の結果とは若干マーカーは異なるものの, 同様に

30 種類の INDEL マーカーの約 1/3 にあたる HLD111, HLD118, HLD99, HLD122, HLD64, HLD81, HLD128, HLD39, HLD84 において, 各アレルの出現頻度に大きな偏りが認められた。多型性を示す指標では, 識別能 (PD) の値は最も低いものは 0.228 (HLD111), 最も高いものは 0.647 (HLD77), 多型情報含有値 (PIC) の値は最も低いものは 0.115 (HLD111), 最も高いものは 0.375 (HLD56), 異型接合度 (HZ) の値は最も低いものは 0.123 (HLD111), 最も高いものは 0.500 (HLD56) を示し, いずれの値もアレルの出現頻度に偏りが見られるマーカーほど低値を示す傾向にあった。本実験に用いた日本人集団における Hardy-Weinberg 平衡の成立の有無について検討したところ, HLD93 および HLD99 を除き, いずれの INDEL マーカーにおいても Hardy-Weinberg 平衡は否定されなかった ($P > 0.05$)。

本日本人集団と他の集団との間でアレルの頻度分布に差異があるか否かを検討した。その結果, 他の日本人集団[9]との間ではすべてマーカーにおいて, 韓国人集団[10,11]との間では HLD99 を除くほとんどのマーカーにおいて, アレルの頻度分布に有意差は認められなかった ($P > 0.01$)。しかしながら, デンマーク人[12], フィンランド人[13], チェコ人[14], ハンガリー人[15], アメリカ人 (白人, アフリカ人, ラテンアメリカ人)[8], イタリア人[16], スペイン人[17], ウルグアイ人[18] などの人種集団との間では, HLD111, HLD118, HLD58 など, 10 種類以上の INDEL マーカーにおいて, アレルの頻度分布に有意な差を認めた。これら有意差を認めた INDEL マーカーのほとんどは, 本実験に用いた日本人集団において多型性の低かったものである。また, 本日本人集団における総合識別能 (Combined PD) の値は 0.99999999998053 であったのに対し, デンマーク人集団[12]では 0.9999999999954 と高値を示した。

以上の成績から, 市販の INDEL 多型検出キット (Investigator DIPplex Kit) における日本人集団の多型性は白人集団等の他の人種集団に比べてきわめて低いことが改めて確認された。

そこで, 日本人集団において識別能の高いマルチプレックス INDEL 多型検出システムの構築を構築するため, まず常染色体の非遺伝子領域から 14 種類の INDEL マーカー, rs3047269, rs2307708, rs1160963, rs1160956, rs2308137, rs2307978, rs35769550, rs1160886, rs10688868, rs2308189, rs2308020, rs3051300, rs33917182, rs35605984 を選択し, 日本人 50 人について各アレルの出現頻度を調査した。その結果, INDEL マーカーの 2 種類のアレルのうちの「欠失」アレルについて見ると, その出現頻度は rs2308189 および rs3051300 ではそれぞれ 0.230, 0.260 と, 設定した多型性の判断基準である 0.3 を若干下回ったが, その他のマーカーでは最も低いもので 0.390

(rs2308137), 最も高いもので 0.630 (rs35769550)を示した。識別能 (PD) の値は最も低いものは 0.519 (rs2308189), 最も高いものは 0.663 (rs10688868), 多型情報含有値 (PIC) の値は最も低いものは 0.292 (rs2308189), 最も高いものは 0.375 (rs2308020), 異型接合度 (HZ) の値は最も低いものは 0.300 (rs2308189), 最も高いものは 0.540 (rs2308137)であった。rs2308189 および rs3051300 を除く 12 種類の INDEL マーカーの総合識別能 (Combined PD) の値は 0.9999937 と算出された。選択したこれらの INDEL マーカーは, いずれも増幅産物のサイズが 70 bp から 160 bp 程度と小さく, rs2308189 および rs3051300 を除き, 日本人集団において高い多型性を有することから, 法医学的個人識別に有効と考えられた。

次いで, 選択した 12 種類の INDEL 多型マーカーを用いたマルチプレックス検出法の確立を目指し, マルチプレックス PCR 法を行うための最適条件の検討を試みた。Qiagen Multiplex PCR kit (QIAGEN 社) を使用し, PCR 条件は, 予備変性 95 15 分の後, 94 30 秒, 60 90 秒, 72 60 秒を 10 サイクル, 94 30 秒, 58 90 秒, 72 60 秒を 20 サイクル行い, 追加伸長 72 60 秒とした。鋳型 DNA としてヒト cell line DNA 9947A および 9948 (いずれも Promega 社) を用い, 上述の条件でマルチプレックス PCR 後, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) および GeneMapper ID Software v3.2 (Applied Biosystems 社) により 12 種類の INDEL 多型を検出したところ, 一部のマーカーを除き, 型判定に十分な増幅産物が得られなかった。そこで, Fondevila ら [8] の報告に従い, サイクル数と追加伸長時間を変更して PCR 条件を再検討したが, 結果に大きな改善は見られなかった。

選択した 12 種類の INDEL 多型マーカーのマルチプレックス検出が不首尾に終わった原因として, まず第一に, マルチプレックス PCR における増幅効率の低下ならびに非特異的な増幅が考えられる。そのため, 本実験で作成した各プライマーの設計を見直す必要がある。また, 鋳型 DNA 量と PCR 条件に関しても検討し直すべきと考えられる。12 種類の INDEL 多型マーカーの日本人集団における総合識別能 (Combined PD) の値は 0.9999937 であり, 白人集団に匹敵する高い識別能 (0.999999999999995) [4] を有するマルチプレックス・システムを構築するためには, さらに 10~20 種類程度の INDEL 多型マーカーが必要である。新たな INDEL マーカーの選択に際しては, すでに検討した 12 種類のマーカーの取捨選択も考慮するべきであろう。

本研究では, 研究期間内に当初に目的とした成果が得られなかった。今後は他の研究者の協力も仰ぎながら, 本研究を完遂する所存である。

なお, STR の反復領域の近傍に INDEL 多型

領域が存在することがあるが, 本研究において INDEL 多型マーカーを検索する過程で, DXS10146 および DXS10147 の 3' 側のフランキング領域内に, DXS10146 には 3 箇所, DXS10147 には 1 箇所の INDEL 多型領域を見出した。シーケンス解析を行ったところ, これらの INDEL 多型における各塩基の欠失は, いずれもそれぞれの STR の反復領域に存在する特定の反復ブロックの反復数と強い関連があることがわかった。すなわち, 複合型の STR である DXS10146 では, 2 つの可変反復ブロックのひとつ, (TTCC)_x の反復数が 6 の場合にのみ, 3' 側のフランキング領域内の 3 つ INDEL 多型, (TTCTTTCTTCTTTCTTT/-), (TCTT/-), (TTCTTTC/-) のいずれかが欠失タイプとなり, 単純型 STR である DXS10147 では, 可変反復ブロック (AAAC)_x の反復数が 6 の場合にのみ, 3' 側のフランキング領域内の INDEL 多型 (AGA/-) において欠失が認められた。また DXS10146 における INDEL 多型 (TCTT/-) において欠失のみられる試料では, 市販の X-STR 解析キット (Investigator Argus X-12 Kit, QIAGEN 社) に含まれる DXS10146 が十分に増幅されないことが明らかとなった。これはプライマー結合領域内にこの INDEL 多型領域が存在するためと考えられた。本研究で明らかになった INDEL-STR 多型は, 日本人集団のみならず, 白人, アフリカ人, インドネシア人, エジプト人の各集団においても認められた。

したがって, ひとつの STR アレルにおける反復数とシーケンス変異など, 複数の多型を同時に検出可能な次世代シーケンサーを使用した法医学領域の個人識別において, このような INDEL-STR 多型は強力な解析ツールになると考えられる。

< 引用文献 >

- [1] Weber JL, et al. *Am J Hum Genet* 71, 854-862, 2002.
- [2] Mills RE, et al. *Genome Res* 16, 1182-1190, 2006.
- [3] Mullaney JM, et al. *Hum Mol Genet* 19(R2), R131-R136, 2010.
- [4] Pereira R, et al. *Electrophoresis* 30, 3682-3690, 2009.
- [5] Li C, et al. *Forensic Sci Int Genet* 5, e27-e30, 2011.
- [6] Freitas NSC, et al. *Int J Legal Med* 124, 589-593, 2010.
- [7] QIAGEN 社ホームページ (<http://www.qiagen.com/>).
- [8] Fondevila M, et al. *Int J Legal Med* 126, 725-737, 2012.
- [9] Nunotani M, et al. *Legal Med* 17, 467-470, 2015.
- [10] Kim EH, et al. *Int J Legal Med* 128, 51-52, 2014.
- [11] Seong KM, et al. *Forensic Sci Int Genet* 8, 80-83, 2014.

- [12] Friis SL, et al. Forensic Sci Int Genet 6, e72-e74, 2012.
- [13] Neuvonen AM, et al. Forensic Sci Int Genet 6, e99-e102, 2012.
- [14] Zidkova A, et al. Int J Legal Med 127, 7-10, 2013.
- [15] Kis Z, et al. Forensic Sci Int Genet 6, e125-e126, 2012.
- [16] Turrina S, et al. Forensic Sci Int Genet Supple 3, e331-e332, 2011.
- [17] Martín P, et al. Forensic Sci Int Genet 7, e27-e30, 2013.
- [18] Saiz M, et al. Forensic Sci Int Genet 9, e27-e29, 2014.

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 1 件)

Atsushi Nagai, Masaaki Hara, Tomomi Ishihara, Akiyoshi Tamura, Akira Kido, Yasuo Bunai, INDEL polymorphisms at the DXS10146 flanking region in four racial populations, Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 査読無, 4 巻, 2013, e318-e319 DOI:10.1016/j.fsigss.2013.10.162

〔学会発表〕(計 1 件)

A. Nagai, M. Hara, A. Tamura, A. Kido, Y. Bunai, INDEL polymorphisms at the DXS10146 flanking region in four racial populations, The 25th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2013 年 9 月 2 日～2013 年 9 月 7 日, Melbourne, Australia

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

永井 淳 (NAGAI, Atsushi)
 岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：00207961

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()