

## 最近のトピックス

## 日本人口唇・口蓋裂患者における分子遺伝学的研究

## Molecular genetics of cleft lip and/or palate in Japanese

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
口腔生命科学専攻  
口腔健康科学講座  
顎顔面口腔外科学分野

藤田 一, 永田昌毅, 小野和宏, 飯田明彦, 碓井由紀子,  
児玉泰光, 大久保博基, 奈良井省太, 小林孝憲, 高木律男

Division of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Department of Oral Health Science,  
Course for Oral Life Science,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Hajime FUJITA, Masaki NAGATA, Kazuhiro ONO,  
Akihiko IIDA, Yukiko USUI, Yasumitsu KODAMA,  
Hiroki OKUBO, Shota NARAI,  
Takanori KOBAYASHI, Ritsuo TAKAGI

## 1. はじめに

口唇・口蓋裂 (CL±P) は, 外表奇形の中でも高率に認められ, 日本人においては出生児1,000人につき1.82~2.06人の割合で発症しています。この値は白人での本疾患の発生率, 出生児1,000人につき0.7~1.36人という報告に比較してかなり高頻度であることが注目されています。

本疾患の発症は, 従来から多因子しきいモデルで説明されることが多く, 効果は小さいが相加的に働く遺伝子と多数の環境因子との相互作用によって生じ, 両者の作用が疾患へのかかりやすさ (易罹病度) の一定のしきい値を越えたときに発現すると考えられてきました。しかし1980年代に入り, 統計遺伝学的分析法を用いた白人における口唇・口蓋裂家系の検討から, 白人の唇裂・唇顎口蓋裂 (CL/P) の発症には, 作用効果が大きく, 少数の遺伝子の存在で発現するmajor-geneモデルが適するという報告がなされました。その後, major geneとしていくつかの候補遺伝子が挙げられ, 1980年代後半からは分子遺伝学的研究法により, 本疾患と候補遺伝子との関連性について報告されるようになりました。

本稿では, これまでに本疾患との関連を検索されている候補遺伝子ならびに今後の研究の方向性について述べてみたいと思います。

## 2. これまでに報告されている候補遺伝子

CL±Pに関し, 初めて候補遺伝子として報告されたのは, 1987年Eibergら<sup>1)</sup>によるF13Aです。彼らは, CL±P家系についてF13Aの血清蛋白型を分析して二点連鎖解析を行い, 最大LODスコア3.66を得たと報告しました。

その後, 1989年Ardingerら<sup>2)</sup>は, CL/P孤発例とTGFAの制限酵素TaqI多型 (RFLP) について関連解析を行い, 連鎖不平衡を認めたと報告し, これ以降, 多数の研究機関にて, 分子遺伝学的手法を用いてTGFAに関する様々な検索が行われるようになりました。

また, 1995年Steinら<sup>3)</sup>は, CL/P多発家系についてマイクロサテライト多型を分析し, 遺伝的同質性試験で選定した17家系において, BCL3の位置にて多点連鎖解析で最大ロッドスコア7.00, 伝達不平衡解析 (TDT) でも連鎖不平衡が認められたと報告し, BCL3をmajor geneの一つであるとしました。

以上の3つの遺伝子の近傍領域は, 現在, OFC (orofacial cleft) 1, OFC 2, OFC 3として登録されていますが, その後の追試では肯定, 否定両者の報告があり, 今のところ一致した結論は得られていません。

その他には, レチノイン酸の受容体遺伝子であるRARA, 細胞増殖因子のTGFB2, TBFB3, ホメオティック遺伝子のMSX1, ヒト白血球抗原のHLA, 葉酸代謝に関与するMTHFRなどが候補遺伝子として様々な検索が行われていますが, いまだに原因遺伝子の同定に至ったものはありません。

なお, 上記の遺伝子についての詳細を表1に示し, 参考までに, CL±Pを合併することのある症候群とその原因遺伝子の一覧を表2に示しました。

表1

Table 1. Candidate gene and chromosomal localization of nonsyndromic CL±P

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P)
OFC1 (orofacial cleft 1): 6p24.3
F13A1 (coagulation factor XIII A1): 6p25.3-p24.3
OFC2 (orofacial cleft 2): 2p13-p14
TGFA (transforming growth factor $\alpha$ ): 2p13
OFC3 (orofacial cleft 3): 19q13
BCL3 (B-cell leukemia/lymphoma 3): 19q13.1-q13.2
Others
MTHFR (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase): 1p36.3
TGFB2 (transforming growth factor $\beta$ -2): 1q41
MSX1 (msh homeo box homolog 1), HOX7: 4p16.3-p16.1
TGFB3 (transforming growth factor $\beta$ -3): 14q24
RARA (retinoic acid receptor $\alpha$ ): 17q12
Cleft palate only (CPO)
CPI (cleft palate, isolated): 2q32

表 2

Table 2. Responsible gene and chromosomal localization of syndromic CL±P

van der Woude syndrome (VWS)	VWS: 1q32-q41
Treacher Collins syndrome	TCOF1: 5q32-q33.1
Ectrodactyly, ectodermal dysplasia and cleft lip/palate syndrome (EEC)	EEC1: 7q11.2-q21.3 EEC2: Chr.19
Apert syndrome, Crouzon syndrome	FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2): 10p26
DiGeorge syndrome (DGS), Velocardiofacial syndrome (VCFS), CATCH22	VCF: 22q11.21-q11.23
Opitz G/BBB syndrome	MID1 (midline 1): Xp22
Cleft palate and/or ankyloglossia	CPX: Xq21.3-q22
Holoprosencephaly (HPE)	
HPE1	HPE1: 21q22.3
HPE2	SIX3 (sine oculis homeo box homolog 3): 2p16-p21
HPE3	SHH (sonic hedgehog homolog): 7q36
HPE4	TGIF (TGFB-induced factor): 18p11.3
HPE5	ZIC2 (zinc finger protein of cerebellum 2): 13q32
HPE7	PTCH (patched homolog): 9q22.3

### 3. 当科における口唇・口蓋裂の分子遺伝学的研究

1994年Satokataら<sup>4)</sup>は、MSX1欠損マウスに口蓋裂等の異常が発生すると報告しました。これを受けて当科では、日本人を対象とし、TGFA/TaqI多型とマウスMSX1に相当するHOX7近傍のマイクロサテライト多型を検出し、関連解析を行いました。その結果、口蓋裂(CP)群においてTGFA多型に連鎖不平衡が成立しましたが、HOX7多型では患者群と対照群の間に有意差は認められなかったと報告しました<sup>5)</sup>。

その後、私たちは、日本人CL/P多発家系についてBCL3および近傍の遺伝子(D19S178, 007/008, AC1/AC2)のマイクロサテライト多型を検出し、LINKAGE packageのMLINKにて二点連鎖解析を行い、近傍の遺伝子では連鎖が否定されましたが、BCL3では組換え率0%、浸透率0.999において最大LODスコア0.206を示し、連鎖否定とも連鎖ありとも判定できなかつたと報告を行っています<sup>6)</sup>。

### 4. 今後に向けて

#### (1) ゲノムワイド多型解析

近年、感受性遺伝子の同定の困難な多因子遺伝疾患に対し、全染色体上に配置した遺伝的多型マーカーを用いてゲノムマッピングを行うことにより、疾患の遺伝的基盤情報を得る試みがなされてきています。このようなスクリーニング的解析には、いまだマイクロサテライト多型が応用されることも多いのですが、最近では、多型解析の中心がマイクロサテライトからSNP(single nucleotide polymorphism)によるものに移行しつつあ

ります。更に、リアルタイムPCRやマイクロアレイ技術を用いたハイスループット解析がようやく具体化しつつあり、私たちとしても、これらの技術を有効に用いて分析を進めることの必要性を感じています。

2000年Prescottら<sup>7)</sup>は、CL/Pの罹患同胞対を含む英国人92家系に対し、第一段階で400個、第二段階では118個のマイクロサテライトを用いてゲノムワイドに多型解析を行いました。そしてGENEHUNTER等によるノンパラメトリック連鎖解析の結果、1p, 2p, 6p, 8q, 11cen, 12q, 16p, Xcen-qにおいて関連を認めたと報告しています。また、2002年Marazitaら<sup>8)</sup>は、36の中国人CL/P多発家系を用いて、387個のマイクロサテライト多型を検出し、多点連鎖解析で第1~4, 6, 18, 21染色体, TDTで第3, 5~7, 9, 11, 12, 16, 20, 21染色体に関連を認めたと報告しています。

今後は、このようなゲノムワイド分析により関連が示唆される遺伝子領域を選定し、次のステップとして、その領域内における多数のSNPを用いて関連解析を行うことが疾患感受性遺伝子の同定に有効であると考えられます。

#### (2) 動物モデルを利用した感受性遺伝子の検索

これまで、ヒトゲノムに対する様々な研究について述べてきましたが、ヒトに比べて動物モデルでは、検体数で制限を受けず、交配が自由で遺伝様式の理解が容易であり、任意にコンジェニックマウス等を製作することができるため、多因子遺伝疾患の解析には最適と考えられます。

2001年Juriloffら<sup>9)</sup>は、CP感受性マウスと正常マウスを用い、第11, 13染色体に候補遺伝子(cif1, cif2)を見出し、ヒトにおいては17q, 5q/9qに相当すると報告をしました。これが動物モデルを用いた本疾患の分子遺伝学的研究として唯一のものですが、当科としても、CL±P感受性マウス(CL/Fr系統マウス)と先天奇形誘発マウス(p53ノックアウトマウス)のコンジェニックマウスを用いた実験や薬物投与に伴う遺伝子発現の変化について検討を予定しています。

1970~80年代のマウス系統を用いた病因解析の試みから、1990年代から現在に至るヒトゲノムに対する取り組みを経て、最近の遺伝子解析技術の飛躍的進歩により、再度動物モデルの有用性が浮かび上がりつつあります<sup>10)</sup>。今後は、動物モデルにおいても様々な研究が行われ、CL±P発症機構についての仮説や新たな候補遺伝子について探求がなされることが期待されます。

## 参考文献

- 1 ) Eiberg H, Bixler D, et al : Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clin Genet*, 32 : 129-132, 1987.
- 2 ) Ardinger HH, Buetow KH, et al : Association of genetic variation of transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet*, 45 : 348-353, 1989.
- 3 ) Stein J, Mulliken JB, et al : Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate : evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet*, 57 : 257-272, 1995.
- 4 ) Satokata I, Maas R, et al : Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*, 6 : 348-356, 1994.
- 5 ) 小澤真理子, 大橋 靖, 他 : 日本人における口唇裂口蓋裂の発生と形質転換増殖因子 (TGFA) 遺伝子およびHOX 7 遺伝子の関連について . *口科誌*, 45 : 152-161, 1996.
- 6 ) 藤田 一, 永田昌毅, 他 : 日本人唇裂・唇顎口蓋裂患者における19q13.2領域のマイクロサテライト多型を用いた連鎖解析 . *口科誌*, 51 : 15-22, 2002.
- 7 ) Prescott NJ, Lees MM, et al : Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet*, 106 : 345-350, 2000.
- 8 ) Marazita ML, Field LL, et al : Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet*, 71 : 349-364, 2002.
- 9 ) Juriloff DM, Harris MJ al : Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mammalian Genome*, 12 : 426-435, 2001.
- 10 ) Kodama Y, Yoshikai Y, et al : The D5Mit7 locus on mouse chromosome 5 provides resistance to -ray induced but not N-methyl-N-nitrosourea induced thymic lymphomas. *Carcinogenesis*, 24, 2003. ( in press )