

- 原著 -

日本人家系における唇裂・唇顎口蓋裂に関する候補遺伝子
(F13A1 , D16S539 , BCL3) の解析

大久保 博 基, 藤 田 一, 高 木 律 男

新潟大学大学院医歯学総合研究科
顎顔面口腔外科学分野 (主任: 高木律男教授)

Candidate gene analysis at F13A1, D16S539, and BCL3 loci regarding to
non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Japanese families

Hiroki Okubo, Hajime Fujita, Ritsuo Takagi

*Division of Oral and Maxillofacial Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Chief: Prof. Ritsuo Takagi)*

平成 17 年 1 月 24 日受付 6 月 9 日受理

Key words : cleft lip with or without cleft palate (唇裂・唇顎口蓋裂), F13A1, D16S539, BCL3, linkage disequilibrium analysis (連鎖不平衡解析)

Abstract : We have examined about the relationship between cleft lip with or without cleft palate and three genetic loci of F13A1 (6p25.3 - p24.3), D16S539 (16q24) and BCL3 (19q13.2). At first, we extracted genome DNA from the 77 patients and their parents that were obtained written and oral informed consent. Secondly, we amplified each DNA using the microsatellite marker of genetic loci. Then we detected alleles by 8% polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, we performed a transmission disequilibrium test (TDT) and an association test. The results of the TDT were $P=0.995$ ($\chi^2=0.067$) at F13A1, 0.167 ($\chi^2=9.124$) at D16S539 and 0.679 ($\chi^2=1.512$) at BCL3. The empirical P values of three genetic loci were 0.379, 0.798 and 0.828, respectively. We could not find a statistical significance either in each locus or any specific allele, so transmission disequilibrium was not approved. However, the P value in D16S539 was comparatively low, and we got comparatively high empirical P values in D16S539 and BCL3. The results of the association test were $P=0.062$ ($\chi^2=7.33$) at F13A1, 0.088 ($\chi^2=10.99$) at D16S539 and 0.061 ($\chi^2=7.36$) at BCL3. The P values were approximate to statistical significance although we could not find a significant difference between patients and control subjects. These lines of evidence do not suggest a significant result, but are not the results that denied actively F13A1, D16S539 and BCL3 as candidate genes. We need to accumulate the case and analysis further more in the future.

抄録 : 唇裂・唇顎口蓋裂 (CL/P) における F13A1 (6p25.3-p24.3), D16S539 (16q24), BCL3 (19q13.2) の 3 つの遺伝子座と本疾患の関連について検討を行った。インフォームドコンセントの得られた CL/P 77 家系の患者および両親 231 名からゲノム DNA を抽出し、各遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて PCR 増幅後、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にてアリルを検出した。TDT の結果、F13A1 において $P=0.995$ ($\chi^2=0.067$)、D16S539 において $P=0.167$ ($\chi^2=9.124$)、BCL3 において $P=0.679$ ($\chi^2=1.512$) であり、検出力はそれぞれ 0.379, 0.798, 0.828 であり、各遺伝子座および特定のアリルにおいても統計学的有意差は得られず、伝達不平衡は成立しなかった。しかし、D16S539 における P 値は比較的小さく、検出力は D16S539 と BCL3 はともに比較的高い値が得られた。相関解析における結果は、F13A1 において $P=0.062$ ($\chi^2=7.33$)、D16S539 において $P=0.088$ ($\chi^2=10.99$)、BCL3 において $P=0.061$ ($\chi^2=7.36$) であった。各遺伝子座において、健常人と患者およびその両親の間に相関を見いだすには及ばなかったが、P 値は有意確率に近い結果が得られた。以上から有意な結果は得られなかったものの、F13A1、

D16S539, BCL3 を候補遺伝子として積極的に否定する結果でもなく、今後、症例の蓄積と更なる分析の必要性が考えられた。

緒 言

口唇・口蓋裂 (CL ± P) の発生原因には、環境的要因と遺伝的要因が考えられており¹⁾、候補遺伝子に関する分子遺伝学的分析はこれまでも国内外で多数報告されてきた²⁻²⁹⁾。しかし確定的な報告はなく、未だに原因遺伝子の同定には至っていない。私たちも、これまでに BCL3 および近傍の遺伝子座 (19q13.2) について、唇裂・唇顎口蓋裂 (CL/P) 多発家系の連鎖解析を行い、左側および両側裂を示す家系において二点連鎖解析で最大 LOD (logarithm of odds) スコア 1.70、多点連鎖解析で 1.91 と比較的高い値を得たものの明らかな連鎖を示すには至らなかったと報告し²⁾、今後の再検討が必要であると考えた。

疾患多発家系を対象として行う連鎖解析は、相対危険度の高い疾患遺伝子座については極めて有効な手段である³⁰⁾とされているが、日本人集団の中では CL/P 多発家系が少ないこと、本疾患は common disease と同様に相対危険度が低いと予想されることなどの問題がある。これに対し、伝達不平衡解析 (transmission disequilibrium test: TDT)³¹⁾ や相関解析などの連鎖不平衡解析は、多数の小家系を収集することにより、相対危険度の低い遺伝子座でも分析が可能である³²⁾ という利点を有しており、今後は以上のような対象および遺伝統計学的手法にて分析を行っていく必要がある。

近年、ハイスループット解析技術の進歩により、本疾患のゲノムワイド分析に関する報告がなされるようになってきた。2000 年 Prescott ら³⁾ は、英国人 92 家系について罹患同胞対分析を行い、8 個の染色体上で関連を認めたと報告した。また 2002 年 Marazita ら⁴⁾ は、中国人 36 家系について多点連鎖解析および TDT を行い、それぞれ 7 個、10 個の染色体上で関連を認めたと報告した。そこで私たちは、これらの報告で関連の認められた染色体領域の中から、高い多型性を有する F13A1 および D16S539 を選定し、BCL3 と合わせた 3 つの遺伝子座について、日本人家系における本疾患との関連について検討を行った。

対象および方法

1. 患者および両親

新潟大学医歯学総合病院口腔外科顎顔面外科診療室を受診した CL/P 患者のうち、インフォームドコンセンートの得られた患者およびその両親を含む 77 家系 231 名を

対象とした。なお、合併奇形を有する、症候群あるいはその疑いと診断される、従来から CL/P とは遺伝系統が異なる³³⁾と考えられている口蓋裂単独の患者を含む家系は除外した。本研究を施行するにあたっては、新潟大学歯学部倫理委員会の審査と承認を受け、対象家系には研究の主旨を十分に説明して同意書に署名をいただいた上で末梢血採血を行った。患者の裂型の詳細は、唇顎口蓋裂 63 名、唇顎裂 12 名、唇裂 2 名で、孤発例が 71 家系、片親もしくは同胞に同種疾患を有するものがそれぞれ 2 家系、4 家系であった (表 1)。

表 1. 患者裂型と家系について

患者裂型	唇顎口蓋裂	63
	左側	37
	両側	20
	右側	6
	唇顎裂	12
	左側	9
	両側	1
	右側	2
	唇裂	2
	左側	2
家系	孤発例	71
	家系内発現例	6
	片親	2
	同胞	4
計		77

2. マイクロサテライトマーカー

遺伝子マーカーには、F13A1 (6p25.3-p24.3)、D16S539 (16q24)、BCL3 (19q13.2) の 3 つのマイクロサテライトを用いた。F13A1 と D16S539 は 4 塩基繰り返しの tetranucleotide repeat marker、BCL3 は 2 塩基繰り返しの dinucleotide repeat marker であり、これらの各遺伝子座について、既報告³⁴⁻³⁶⁾ または The Genome Database (GDB) に登録されているゲノム情報をオンライン検索 (<http://www.gdb.org/>) し、プライマーを設定した (表 2)。