

顔面奇形の発生抑制遺伝子の解析

●吉浦 孝一郎¹⁾ ◆秋田 定伯²⁾ ◆夏目 長門³⁾

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原研分子医療部門 2) 長崎大学医学部・歯学部附属病院 3) 愛知学院大学歯学部口唇口蓋裂センター

＜研究の目的と進め方＞

口唇・口蓋裂は、非連続的（悉無）形質であり、閾値の存在を仮定した多因子疾患であると考えられている。本研究の目的は、唇裂・口蓋裂発症に関して、多因子遺伝疾患としての感受性を決定している遺伝子・SNP、または単一遺伝子疾患としての原因遺伝子を同定することを目的とした。

研究は、候補遺伝子を選定し、その遺伝子のコード領域の変異解析、コントロールとの比較による関連解析（association test: AT）、関連解析が陽性であったときに伝達不平衡試験（transmission disequilibrium test: TDT）を行うことにより感受性遺伝子、SNPの同定を目指した。

候補遺伝子の選定は、ノックアウトマウスで唇裂・口蓋裂を呈する遺伝子、これまでに感受性遺伝子として報告されたもの、発現が胎児期の第1～2鰓弓に確認されているもの、などを参考にした。

DNA試料について、初年度は夏目が収集したベトナム人の不完全トリオ（父-母-患者）を使用した。2年目以降は、日本人トリオが、収集されはじめたので日本人に関しての研究となった。

変異解析は、PCR法によって増幅できた全てのエクソンをダイレクトシーケンス法によって全て検索し、変異解析によって得られるエクソン、及びエクソン周囲のSNPをAT、TDTに利用することを考えた。研究当初は、ATには、変異解析によって得られてくるSNPを利用することで、解析が可能であろうと考えていたが、実際に変異解析を行ってみるとSNP自体があまりにも少なく、ATを行うには、不完全であり、十分な数のSNPを得られないことがわかった。従って研究途中から、変異解析に加えて、ATを行うためにイントロンを含めてある程度のSNP探索を行った。

関連解析（AT）は、それぞれのSNPごとに12検定を行うとともに、コンピュータープログラムによってハプロタイプ推定構築後に、ハプロタイプを使ったATを行った。これらの解析には、SNPAlyze、Haploviewのプログラムを用いた。

関連解析（AT）にて、関連のありそうなSNPに関しては、両親の遺伝子型の決定を行い、伝達不平衡試験（TDT）を行った。TDTには、FBATのプログラムを用いた。

＜研究開始時の研究計画＞

研究当初は、できる限り多くの候補遺伝子の変異解析に、主眼をおいた。唇裂・口蓋裂が、多因子疾患であると考えられているものの、ありふれた病気（common disease）とよべるだけcommonであるのかが疑問であり、common disease - common variant 仮説を前提とした関連解析が、唇裂・口蓋裂にとって適切な解析方法かどうか不明であったからである。

候補遺伝子としては、当初、以下のような遺伝子を設定した。IRF6（1q32）、TGFB3（14q24）、DLX3（17q21）、EPHB2（1p36.1-35）、EPHB3（3q21-qter）、

RYK（3q22）、PAX9（14q12-13）、BMP2（20p12）、BMP4（14q22-23）、TBX1（22q11.21）、CLPTM1（19q13.2-13.2）、MSX1（4p16.1-16.2）、INHBA（7p15-13）、INHBB（2q13）、Activin Receptor Type II（2q22.3-23.1）、RARA（17q12）。

研究開始時頃から、rare variantであっても、ハプロタイプを用いてATを行うことにより、感受性遺伝子の同定が可能であることがいわれはじめた。したがって、最終的に実施した実験方法は、候補遺伝子について、変異解析、個々のSNPによる関連解析、推定ハプロタイプによる関連解析、SNP・ハプロタイプによるTDTと全ての解析を各々の候補遺伝子で、行うこととした。

＜研究期間の成果＞

まず、初年度からRYK、EPHB2、EPHB3の変異解析をおこなった（論文成果リスト2）。患者試料はベトナム人患者221名とその家族282名と、次年度145組の両親と患者の日本人トリオ試料（夏目が収集）を使用した。

ベトナム人血液試料は、濾紙血として収集されたもので、DOP-PCR法等の全ゲノム増幅の必要があった。研究当初は、最近一般的となった ϕ 29-DNAポリメラーゼを用いた全ゲノム増幅法は、一般的でなく、自らDOP-PCR法を行った。われわれの用いたDOP-PCR法は、しばらくは、このゲノム領域でも使用された。

RYK遺伝子に関し、変異解析を終了し、1355G>A（Y452C）の1個の変異を見いだした。この変異は、96人のCEPH DNA、154人のベトナム人コントロール、474人の日本人コントロールにも見られなかった。患者の変異は、父親から伝達されていたが、試料採取時の臨床データでは、父親は唇裂・口蓋裂をもっておらず、孤発性の唇裂・口蓋裂であった。EPHB2、EPHB3については、原因であろうと推測させる変異は見いだせず、SNPのみが検出された。Y452Cの変異は機能解析として発現ベクターに変異遺伝子を組み込みNIH3T3細胞においてアガー上でのcolony formation assayを行った。Y450Cは野生型のRYK遺伝子に比べて約50%の活性を示すのみであり、Y450Cが機能喪失を起こし、唇裂・口蓋裂の原因である可能性が高かった（論文成果リスト2）。RYK、EPHB2、EPHB3の3遺伝子について見いだしたSNPを使って、AT、TDTを行ったが、すべて陰性結果であった。

IRF6遺伝子（1q32）（VWSの原因遺伝子）について、アメリカの研究協力者であるJeffrey C. Murray教授の要請で、c.820G>A（V274I）SNPを用いての伝達不平衡試験を行った。日本人においてはP値～0.5と陰性の結果であり、全く差がない、つまりV274I変異は日本人の唇裂・口蓋裂発症に関して全く連鎖がないことが示された。しかし、フィリピン人、ブラジル人、ベトナム人においてTDTによって陽性結果が示され、民族によっては、非症候性唇裂・口蓋裂においてIRF6が感受性遺伝子の一つであることが証明された（論文成果リスト5）。

TGFB3（14q24）、DLX3（17q21）、PAX9（14q12-13）、CLPTM1（19q13.2-13.2）、TBX10（11q13.2）、

TBX22 (Xq21.1), PVRL1 (11q23.3) の合計 7 遺伝子については、変異解析、個々の SNP による相関解析、推定ハプロタイプによる相関解析と全ての解析法を用いて、rare variant などによる原因遺伝子であるのか、感受性遺伝子であるのか、common variant によって説明できる感受性遺伝子であるのかどうかの検討を、この研究期間中に収集した日本人試料を用いて行った (論文成果リスト 3)。使用した試料は、東京歯科大学と長崎大学で収集した、112 組の唇裂・口蓋裂患者トリオと、16 組の口蓋裂のみをもつ患者トリオを使用した。変異解析の結果、1 例で PAX9 遺伝子に c.640A>G (S214G) が認められた。その他の遺伝子については、唇裂・口蓋裂の直接原因と考えられる変異は、認められなかった。PAX9 遺伝子の c.640A>G (S214G) は、唇裂・口蓋裂をもつ兄と妹に認められ、変異は母親から伝達されていた。しかし、母親は唇裂も口蓋裂も発症しておらず、c.640A>G が直接の原因でない rare variant であるのか、母親が、不完全浸透の原因であるのかは、今後の検討が必要である。

個々の SNP による相関解析の結果、7 遺伝子のうち、TGFB3 遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP, rs3917168 (IVS1+5321) と rs3917169 (IVS1+5417) が 1 1 2 人の唇裂・口蓋裂患者と 1 9 2 人のコントロールとの比較で、P-値 <0.002 を示し、SNP と唇裂・口蓋裂の相関が示唆された (劣性効果として odds ratio = 2.34 (1.40-3.93))。2 個の SNP は、完全な連鎖不平衡関係であり、同意義を持っていた。次に、rs3917168 と IVS1-5721 (rs2268225) にて構築しハプロタイプによって、相関解析を行った結果、患者において A-A ハプロタイプが有意に増加していた (P-値 <0.0006)。この A-A ハプロタイプを使った TDT を行った結果、P-値 <0.03 が得られ、有意に患者に伝達されていることが確認できた。従って、日本人において TGFB3 遺伝子内の SNP は、唇裂・口蓋裂の発症に相関をもち、連鎖していることが示された。TGFB3 遺伝子は日本人で初めて相関と連鎖が示された遺伝子である (論文成果リスト 3)。

この申請研究は、基本的には非症候性唇裂・口蓋裂の原因遺伝子・感受性遺伝子の同定を目指したが、同時に症候性の唇裂・口蓋裂も解析の対象とした。Van der Woude syndrome (VWS) では (論文成果リスト 4, 6)、日本での 3 家系、タイでの 1 家系それぞれに IRF6 遺伝子内に新しい変異、25C>T (R9W)、250C>T (R84C)、1046A>T (E349V)、1234del (C)、を見出した。日本 3 家系のうち、1 家系は、最初に提供された爪から DNA を抽出し、IRF6 遺伝子の変異解析を行ったが、変異が認められず、Van der Woude syndrome の新たな遺伝子座をもつ家系であると考えられた。そこで連鎖解析まで行ったが、最終的には、連鎖解析の結果 1q32 に連鎖領域が確定され、IRF6 遺伝子変異による Van der Woude syndrome であることが確定された。この家系の解析を通じて、爪試料の使用にあたって、十分な注意を払うこと、その上で手指 10 本分の爪試料で、数千回の PCR の解析に利用できることがわかった。爪から抽出した DNA は、時々片方のアリル特異的な増幅を示し、注意が必要であった。VWS 家系では、アメリカ人家系、日本人家系、タイ人家系を含め民族間に差はなく、IRF6 遺伝子の変異が見られることがわかった。

症候性の唇裂・口蓋裂のなかで、Basal Cell Nevus syndrome (BCNS) 4 家系の解析も行った。BCNS では、PTCH1 遺伝子の変異が知られていたため、変異解析を行った。結果、3 つの家系でそれぞれタンパク質切断タイプ変異 2798delC (934fsX958), 2910-2917dupAGTTCCT

(973fsX992), 833G>A (W278X) が見付き、一家系に 1415G>A (A472D), 1451G>T (G484V, 3956G>A (H1319R) の 3 変異が同時に見つかった。1 家系内で見つかった 3 変異は同一染色体上に見つかり、A472D が最も機能喪失を起こす可能性が高いが、どの変異がタンパク質の機能喪失をまねく原因変異かは不明のままである。(論文成果リスト 1, in press)。ハプロタイプを形成している 3 変異は、おそらく相同組み換え型 DNA 修復時に変異を起こしたのではないかと思われる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

症候性の唇裂・口蓋裂をもつ患者の解析を、VWS と BCNS について行った。症候性疾患は、遺伝子座位異質性は疾患によって異なるが、VWS と BCNS については、ほとんど知られておらず、確実に遺伝子変異が認められる。しかし、IRF6、PTCH1 の遺伝子変異は、非症候性唇裂・口蓋裂では、知られていないし、ほとんどないことがわかっていたので、今回の研究では、我々自身の非症候性唇裂・口蓋裂患者 DNA 試料で IRF6、PTCH1 の遺伝子変異の検索は、行わなかった。我々の結果でも、VWS と BCNS 家系の遺伝子解析は、VWS と BCNS 家系に遺伝子座位異質性が、ほとんど存在しないことがますます強く示唆された。

研究は、期間を通して非症候性唇裂・口蓋裂の原因遺伝子、感受性遺伝子の同定に力を注いだ。世界的に見ても、非症候性唇裂・口蓋裂の感受性遺伝子は、確実なもの「ない」といってよい。これまでに、一部の非症候性唇裂・口蓋裂が、症候性唇裂・口蓋裂の原因遺伝子 MSX1、p63、PVRL1、TBX22 などの原因性変異で説明されているが、本当にごく一部であって、我々の行った結果によると (未発表のデータも含めて)、日本人の非症候性唇裂・口蓋裂は、ほとんど説明できない。

論文成果リスト 2 の報告で、非症候性唇裂・口蓋裂の原因変異として、RYK 遺伝子の 1355G>A (Y452C) を示している。in press 状態でまだ、公になっていない。RYK 遺伝子の SNP が感受性を決めている証拠は得られず、変異はごく一部 (<1%) の非症候性唇裂・口蓋裂を説明できるにすぎない。しかし、RYK 遺伝子変異の報告は、これまでになく、世界初の報告となるので、今後の他の研究成果を見きわめたい。

論文成果リスト 3 は、TGFB3 遺伝子以外は、陰性の結果であるが、これまでの世界の報告からみても、日本人の非症候性唇裂・口蓋裂に関しては、非常に意味あるものとなっている。また、論文成果リスト 3 には、解析した遺伝子・SNP、を全て記載した。通常このような論文は、陽性だけの SNP を記載して、本物らしく装う論文も見られるが、われわれは、全ての遺伝子、使った SNP を全て記載し、Bonferroni 補正を施した結果についても議論している。

論文成果リスト 3 で報告した、日本人非症候性唇裂・口蓋裂の感受性遺伝子として TGFB3 遺伝子の報告は、意義深い。TGFB3 遺伝子の相関解析自体は、これまでに行われてきていたが、陽性と陰性の両方の結果が報告されていた。しかしハプロタイプによる詳しい解析、population-based、family-based の両解析が行われていないなど、解析方法に難があった。また、一部の報告は、試料数がごくわずかのものもある。論文成果リスト 3 の報告で、われわれは、TGFB3 遺伝子の第 1 イントロンのハプロタイプが、非症候性唇裂・口蓋裂の発症に関連していることを示した。個々の SNP を用いた解析よりも、ハプロタイプ解析の方が、かなり P-値が低く本来の感受性

決定SNPの存在が疑われる。また、相関解析の結果は、TDTによっても陽性結果が支持され、連鎖の存在が示唆されると同時に、充分な証拠を提示している。論文成果リスト3は、2006年1月に論文として公になったので、今後、我々の報告したSNP、ハプロタイプを用いての解析が他国でも行われると思われ、今後の結果の報告を待ちたい。

米国との共同で行ったIRF6遺伝子のc.820G>A (V274I) SNPを使ったTDTの報告は、非常に注目された(論文成果リスト5)。結果は、集団ごとに非常にodds比が異なっており、興味を持たれるところである。フィリピン人、ブラジル人、ベトナム人、アイオワ州人では、それなりの陽性結果を示し、その一方で他集団では陰性の結果を示したことも、今後の追試の結果を待つという意味で、new Engl J Medに掲載された理由であろう。今後の相関解析を含めた追試が待たれる。

症候性唇裂・口蓋裂として解析の対象とした、VWS、BCNSについては、単一遺伝子病であって、実際にIRF6遺伝子、PTCH1遺伝子のDNA変異が見られ、全く非症候性唇裂・口蓋裂の解析とは異なり、診断さえしっかりしていれば、遺伝子異常はほぼ確実に見られるものであった。論文成果リスト4、6は世界に向けて新しい報告ではないが、VWS、BCNSについて世界のどの集団でも単一遺伝子病として、遺伝子異常が確実に見つかることを示していた。BCNSの第4家系で認められた、一本の染色体上の3つの異なる変異は、相同組み換え型DNA修復時に変異を起こしたのではないかと思われ、このような変異のメカニズムは、疾患と関連しては、報告がなく世界的にまれな報告となった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

症候性の唇裂・口蓋裂を単一遺伝子疾患のように扱い、候補遺伝子をPCR-ダイレクトシーケンス法によって変異解析を行うに当たり、非常に時間がかかった。初年度は、濾紙血からのDNA抽出、DOP-PCR増幅に大きな時間をとられた。初期の濾紙血として収集したヴェトナム人の試料は、DOP-PCR増幅によって解析可能であったが、変異解析時によく変異が認められた。しかし、確認のために行った、相連鎖のシーケンス解析・また再解析によってことごとく変異が実験手技上のエラーであることがわかった。極めて注意深く使用することで、濾紙血は、よい試料であるが、確認作業に多くの時間を費やした。SNP解析を行う場合には、濾紙血からのDNA抽出⇒DOP-PCR増幅によるDNAは、威力を発揮するが、単一遺伝子疾患の解析には注意を要する。

2年目からは、長崎・東京のトリオ試料が集まってきたので、日本人試料として使用した。これらの試料は、新鮮血液からDNA抽出を行って、使用に際して問題はなかった。しかし、トリオとして収集したので、試料収集が思うように進まなかった。約4年経過した現在でも、約170組程度が収集されているのみである。トリオ試料収集は、極めて時間がかかるものの、連鎖と関連を検定できる試料として意義深い。相関解析用の患者だけのDNA試料も集めるべきであったと思われる。

日本人試料を使って、TGFB3 (14q24), DLX3 (17q21), PAX9 (14q12-13), CLPTM1 (19q13.2-13.2), TBX10 (11q13.2), TBX22 (Xq21.1), PVRL1 (11q23.3), EPHB2 (1p36.1-35), EPHB3 (3q21-qter), RYK (3q22) を解析したのであるが、変異解析、SNP-相関解析、TDT解析の全解析を行った。全てがシーケンス反応を基本としていたので、多くの候補遺伝子を解

析できなかった。結果として3~4ヶ月で1遺伝子を解析できたことになる。やはり、遅い。しかし、人員を割かずに解析するにはこれ位の解析速度にならざるをえない。SNPタイピングがシーケンス反応でなく、他の方法が安価で行えるのであれば、もっと速く進められたと思うが、コストの面からの制限は、如何ともしがたいものがある。SNP解析が機械依存性、コスト依存性であることは、どうにもできない。研究班としての改善が望まれる。

変異解析もSNP-相関解析も、シーケンス解析であるので、GC含有量の大きい領域は、解析できない。当然、PCR増幅ができないで変異解析、SNPタイピングができないことは、誰でも経験することである。われわれが指摘したい問題は、PCR増幅が見られた場合でも、GC含有量の大きい領域は、よく注意しないと、誤った結果を導く可能性が高いことである。SNPタイピングによる相関解析、TDT解析で明らかに偏向した結果が得られることが、GC含有量の大きい領域であった。また、プライマーの位置を変えても改善が見られず、個人のSNPタイピングがいつも違う結果が得られることがあった。このことは、大きな問題であって、相関解析時にはHardy-Weinberg分布に従っているか、親子でのSNPタイピング結果が矛盾ないかなど、必ず注意を払う必要がある。このようなアレル偏向性増幅は、DNAの精製度に依存するのではなく、常に起こりうることを自覚すべきである。変異解析を行うに当たっても、ヘテロ接合体は、PCRの反応を行う限り見落とす(増幅落とす)可能性があることを知っておくべきである。

もっと多くの遺伝子について解析できると考えていたが、そのような経緯に至らなかったことは、残念である。また、多くの症候性唇裂・口蓋裂の原因遺伝子が、報告されると期待していたが、症候性唇裂・口蓋裂の原因遺伝子の報告もなされず、候補遺伝子が絞れなかったこともあった。症候性唇裂・口蓋裂の原因遺伝子であるMSX1, p63, IRF6については、詳しく日本人集団で変異解析・相関解析を行うべきであったと考えるが、時間が無くなってしまった。

〈今後の課題〉

日本人試料は、完全なトリオの収集でなければ、非症候性唇裂・口蓋裂患者として300人以上は収集可能である。非症候性唇裂・口蓋裂は、悉無形質であるので試料の均一性は保たれる。両側性の唇裂・口蓋裂に着目すれば、家系として収集できる単一遺伝子疾患も混じっているとされる。患者の収集は、行えると思うが、最も困難なのは対照者の収集であろう。今後、研究の継続が可能であれば、非症候性唇裂・口蓋裂の他に何か疾患を設定して試料収集を行い、相互対照をして関連研究を行いたい。収集試料としては、新鮮血が最もよい。現在収集している、約170組のトリオ試料収集は、患者-対照試験で、陽性結果を得た後の、確認に使用したいところである。

今後の最も大きな課題は、いかにしてSNPタイピングを大量に、かつ高速に行うかである。現在は、この研究が始まった時期とは異なり、国際HapMapプロジェクトの完成、SNPの整備、GeneChip法(Affymetrix社)の開発など、全ゲノムを対象にしたSNP-相関解析が可能となっているので、研究補助次第で全ゲノム相関解析が可能であろう。非症候性唇裂・口蓋裂の試料が注意深く収集されれば、common variantによって説明可能な疾患である限り、必ず感受性遺伝子が同定できるに違いない。

非症候性唇裂・口蓋裂が、rare variantによって説明される場合は、SNPタイピングだけでは、原因遺伝子・感受性遺伝子の同定はできない可能性が残る。非症候性唇裂・口蓋裂が、限りなく単一遺伝子病に近い場合には、候補遺伝子の変異解析によってのみ同定可能であるので、今後も候補遺伝子に絞った変異解析は、続けていかねばならない。

大量のSNPタイピング、大量の変異解析を行うにあたって、シーケンサー・SNPタイピング機器の充実、それらの解析のための消耗品の費用が最終的に問題となってくる。実際には、現在、患者DNA試料は揃っており、大量高速SNPタイピング、大量変異解析は、機器依存となっている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Matsuzawa N., Nagao T., Natsume N., Niikawa N., Shimozato K., Yoshiura K. PTCH mutations in four Japanese families with basal cell nevus syndrome. *J Clin Pathol* (in press) .
2. Watanabe A., Akita S., Hirano A., Thi Duc Tin N., Natsume N., Nakano Y., Matsumoto N., Kishino T., Kinoshita A., Niikawa N., Uchiyama T., Yoshiura K. Amutation in RYK is a genetic factor for nonsyndromic cleft lip and palate. *The Cleft Palate-Craniofacial J.* (in press) .
3. 0602021652
Ichikawa E., Watanabe A., Nakano Y., Hirano A., Akita S., Kinoshita A., Kondo S., Kishino T., Uchiyama T., Niikawa N., Yoshiura K. PAX9 and TGFB3 are susceptible to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: Population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet* 51 (1) : 38-46, 2006.
4. 0602021723
Matsuzawa N., Yoshiura K., Machida J., Nakamura T., Niimi T., Furukawa H., Toyoda T., Natsuma N., Shimozato K., Niikawa N. Two missense mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98 (4) : 414-417, 2004.
5. 0602021714
Zuccherro TM., Cooper ME., Maher BS., Daack-Hirsch S., Nepomuceno B., Ribeiro L., Caprau D., Christensen K., Suzuki Y., Machida J., Natsume N., Yoshiura K., Vieira AR., Orioli IM., Castilla EE., Moreno L., Arcos-Burgos M., Lidral AC., Field LL., Lin YE., Ray A., Goldstein TH., Schults RE., Shi M., Johnson MK., Kondo S., Schutte BC., Marazita ML., Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 351 (8) : 769-780, 2004.
6. 310101029
Shotelersuk V., Srichomthong C., Yoshiura K., Niikawa N. A novel mutation, 1234del (C) , of the IRF6 in a Thai family with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med* 11 (4) : 505-507, 2003.