

学位申請論文

# 日本人孤発性口唇・口蓋裂発症に関する 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 遺伝子 C677T・A1298C多型の解析

獨協医科大学 口腔外科学

越路千佳子

**要 旨** 口唇・口蓋裂の発症は多因子遺伝と考えられ、未だ原因の詳細は不明である。著者は、葉酸の代謝関連酵素である *MTHFR* 遺伝子の C677T ならびに A1298C の多型が日本人孤発性非症候群の口唇・口蓋裂の発症と関連するのかが検討を行った。対象は口唇・口蓋裂患児 240 症例、その父親 103 症例、ならびに母親 153 症例で、健常人 68 名を対照とした。多型の検出は血液より DNA を抽出し、PCR 増幅と制限酵素処理により、C677T 多型と A1298C 多型の発現について、1. ケース・コントロールスタディ症例群、2. 伝達不平衡テスト、3. ハプロタイプ解析について分析した。その結果、*MTHFR* 遺伝子 C677T および A1298C 多型は、日本人の口唇・口蓋裂発症と関連はないものと考えられた。その理由として、*MTHFR* 677 (C→T) 変異、1298 (A→C) 変異のホモ結合体の割合が低いこと、人種間の相違などが考えられたが、TT 多型の頻度は比較的高い傾向を示し、血清葉酸濃度や血清ホモシステイン濃度との関係について検討する必要があると思われた。

**Key Words** : 遺伝子多型, 口唇・口蓋裂, 多因子遺伝, 葉酸

## 緒 言

口唇・口蓋裂は、日本人では 1,000 人あたり 1.82 ~ 2.06 人の発症率を認め、顎顔面領域でもっとも頻度の高い先天異常である<sup>1)</sup>。その発生は一般には遺伝的要因と環境的要因が複数関わる、多因子しきいモデルで説明されているが、未だその詳細は不明である<sup>2)</sup>。遺伝的要因として、口唇・口蓋裂の候補遺伝子は *TGF $\alpha$* , *TGF $\beta$ 3*, *MSX1*, *GABRB3*, *RARA*, *BCL3* などが報告され<sup>3,4)</sup>、環境的要因としては妊娠期間中における喫煙、アルコール、薬剤、ウイルス感染などの関係が知られている<sup>5)</sup>。

近年、母体のビタミン欠乏は先天奇形を発症し、妊娠期間中に葉酸を含むビタミン剤を投与すると、先天奇形の発症を減じ<sup>5~7)</sup>、特に、妊娠初期における葉酸の予防投与が神経管閉鎖障害 (Neural tube defects, NTDs) の予防に有用であることが報告された<sup>6,7)</sup>。さらに、瀧ら、

新美らは口唇、口蓋裂自然発生 A/J 系マウスに葉酸を妊娠前から妊娠期間中を通して経口投与し、口唇・口蓋裂の発生が減少したことを<sup>8,9)</sup>、また、Tolarova ら、Shaw らは妊娠前から器官形成期まで葉酸を含むビタミン剤を母親が摂取することにより口唇口蓋裂の発症率が低下したことを報告し<sup>10,11)</sup>、口唇・口蓋裂の発症と葉酸との関わりが知られるようになった。そのため、血清葉酸濃度に影響を与えるとされている遺伝的要因として、葉酸の代謝関連酵素である葉酸代謝還元酵素遺伝子 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 遺伝子が注目され、検討が行われているが、未だ一定の見解の一致が得られていない。そこで、著者は *MTHFR* の酵素活性を低下させる *MTHFR* 遺伝子の塩基 677 番目と 1298 番目の多型が、口唇・口蓋裂発症と関連があると報告されていることに着目し、日本人孤発性非症候群の口唇・口蓋裂患者について検討を行った。

## 対象および方法

対象は、獨協医科大学病院口腔外科ならびに愛知学院大学歯学部附属病院口唇口蓋裂センターにて治療中でインフォームド・コンセントが得られている孤発家系の非

平成 21 年 11 月 30 日受付、平成 21 年 12 月 16 日受理  
別刷請求先：越路千佳子

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
獨協医科大学 口腔外科学

症候性口唇・口蓋裂患児240症例, その父親103症例, 母親153症例である. なお, 対照は, 本人および家系内に口唇口蓋裂などの先天異常を有していないボランティア68名とした.

方法は末梢血液からDNAを抽出し, PCRによる目的領域の増幅と制限酵素処理により多型の検出を行い, C677T多型とA1298C多型の発現について, 以下の方法を用いて検討した.

### 1. ケース・コントロールスタディ

患児(以下, 症例群)とその父親(以下, 症例の父親群)および母親(以下, 症例の母親群)に対し, それぞれ以下の項目について比較検討した.

①症例と対照群との比較, ②裂型別(口唇裂単独群, 口唇口蓋裂群, 口唇裂+口唇口蓋裂群ならびに口蓋裂単独群)による対照群との比較, ③性別における比較, ④裂型間による比較を行った.

### 2. 伝達不平衡検定 (Transmission Disequilibrium Test: 以下, TDT)

C677T多型およびA1298C多型において, それぞれ遺伝子型がヘテロ型である両親とその子供である患児に対して, 親から患児へ伝達される各対立遺伝子の頻度不平衡があるかどうかを検討した.

### 3. ハプロタイプ解析

親から患児に伝達される対立遺伝子の状況は家系によって異なるので, 両親と患児を一組とし, C677T多型とA1298C多型の2つの多型の情報に対して家系情報を考慮したソフトウェアFBAT (Harvard School of Public Health)を用いてハプロタイプの連鎖不平衡を検討した.

### 4. C677TならびにA1298C多型の検出

#### 1) DNA抽出法

DNA Blood Mini Kit (QIAGEN社製)を用いてDNA抽出を行った. 末梢血液200 $\mu$ lにProtease等を添加後, 15秒間混和し, 56 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし, エタノールを添加, 再度15秒間混和し, 6,000 $\times$ g, 1分間の遠心分離を行った. 1回目の洗浄バッファー500 $\mu$ l添加後, 6,000 $\times$ g, 1分間の遠心分離し, 2回目の洗浄バッファー500 $\mu$ l添加後, 20,000 $\times$ g, 3分間遠心分離を行い, さらに20,000 $\times$ gで1分間の遠心分離を行った. 溶出は5分間室温保温した後, 6,000 $\times$ g, 1分間の遠心分離を行った.

#### 2) PCR増幅

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いて行った.

C677T多型: プライマーの塩基配列はForward; 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3', Reverse; 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'<sup>12)</sup>(増幅フラグメント198bp)とし, PCR反応液には0.5 $\mu$ MのDNAを鋳型として, 各プライマーを0.2 $\mu$ M, Premix Taq (タカラバイオ株式会社)が含まれた全量10 $\mu$ lの反応液中で行った. PCRの条件はプレヒートを94 $^{\circ}$ Cで5分間行い, その後, 変性を94 $^{\circ}$ Cで1分間, アニールリングを64 $^{\circ}$ Cで1分間, 伸長を72 $^{\circ}$ Cで1分間とし, これを1サイクルとして, 30サイクルを行い, 最後に72 $^{\circ}$ Cで5分間追加伸長反応を行った.

A1298C多型: プライマーの塩基配列はForward; 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3', Reverse; 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'<sup>13)</sup>(増幅フラグメント163bp)とした. PCR反応液には1 $\mu$ MのDNAを鋳型として, 各プライマーを0.25 $\mu$ M, Premix Taq (タカラバイオ株式会社)が含まれた全量10 $\mu$ lの反応液中で行った. PCRの条件はプレヒートを94 $^{\circ}$ Cで5分間行い, その後, 変性を94 $^{\circ}$ Cで1分間, アニールリングを57 $^{\circ}$ Cで1分間, 伸長を72 $^{\circ}$ Cで1分間とし, これを1サイクルとして, 35サイクルを行い, 最後に72 $^{\circ}$ Cで5分間追加伸長反応を行った.

#### 3) 制限酵素処理

制限酵素は, C677T多型はHinf I (タカラバイオ株式会社)を, A1298C多型にはMbo II (タカラバイオ株式会社)を使用し, 制限酵素断片は4%のアガロースゲルを用い, 電気泳動後, エチジウムロマイド溶液に浸し, トランスイルミネーターによって多型の検出を行った. C677T多型はMTHFR遺伝子の塩基677番目で野生型をCC型(以下677CC), ヘテロ型をCT型(以下677CT), 劣性型をTT型(以下677TT)と, A1298C多型は野生型をAA型(以下1298AA), ヘテロ型をAC型(以下1298AC), 劣性型をCC型(以下1298CC)と遺伝子型を分類した.

統計的検定はFisherの直接確率検定, TDTはMcZne-mar検定およびハプロタイプ解析はRabinowitzらの $\chi^2$ 検定を用いた.

## 結 果

### 1. ケース・コントロールスタディ

#### 1) MTHFR C677T多型について

(1) 症例について(表1)

表 1 症例における *MTHFR* C677T 多型の比較

	Total	遺伝子型			p	アレル頻度		p
		CC (%)	CT (%)	TT (%)		677C (%)	677T (%)	
症例群	240	89 (37.1)	116 (48.3)	35 (14.6)	0.656	294 (61.2)	186 (38.8)	0.464
口唇裂群	73	32 (43.8)	32 (43.8)	9 (12.4)	0.757	95 (66.0)	49 (34.0)	0.824
口唇口蓋裂群	124	41 (33.1)	61 (49.2)	22 (17.7)	0.339	143 (57.7)	105 (42.3)	0.177
口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	197	73 (37.1)	93 (47.2)	31 (15.7)	0.543	239 (60.7)	155 (39.3)	0.409
口蓋裂群	43	16 (37.2)	23 (53.5)	4 (9.3)	0.937	55 (64.0)	31 (36.0)	0.909
対照群	68	27 (39.7)	34 (50.0)	7 (10.3)	—	88 (64.7)	48 (35.3)	—
男性 症例群	129	45 (34.9)	63 (48.8)	21 (16.3)	0.935	153 (59.3)	105 (40.7)	0.884
男性 口唇裂群	42	18 (42.9)	19 (45.2)	5 (11.9)	0.777	55 (65.5)	29 (34.5)	0.533
男性 口唇口蓋裂群	73	21 (28.8)	37 (50.7)	15 (20.5)	0.692	79 (54.1)	67 (45.9)	0.418
男性 口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	115	39 (33.9)	56 (48.7)	20 (17.4)	0.894	134 (58.3)	96 (41.7)	0.773
男性 口蓋裂群	14	6 (42.9)	7 (50.0)	1 (7.1)	0.762	19 (67.9)	9 (32.1)	0.499
男性 対照群	29	10 (34.5)	15 (51.7)	4 (13.8)	—	35 (60.3)	23 (39.7)	—
女性 症例群	111	44 (39.6)	53 (47.8)	14 (12.6)	0.693	141 (63.5)	81 (36.5)	0.493
女性 口唇裂群	31	14 (45.2)	13 (41.9)	4 (12.4)	0.722	41 (66.1)	21 (33.9)	0.820
女性 口唇口蓋裂群	51	20 (39.2)	24 (47.1)	7 (13.7)	0.657	64 (62.7)	38 (37.3)	0.468
女性 口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	82	34 (41.5)	37 (45.1)	11 (13.4)	0.654	105 (64.0)	59 (36.0)	0.54
女性 口蓋裂群	29	10 (34.5)	16 (55.2)	3 (10.3)	0.735	36 (62.1)	22 (37.9)	0.476
女性 対照群	39	17 (43.6)	19 (48.7)	3 (7.7)	—	53 (67.9)	25 (32.1)	—

## ① 症例群と対照群の比較

症例群と対照群における *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, CC, CT および TT の遺伝子型頻度に有意差は認められなかった. また, C および T アレル頻度に関しても両群間で有意な差は認められなかった.

## ② 裂型別による比較

口唇裂, 口唇口蓋裂症例は口蓋裂単独症例とその発生機序が異なると考えられていることから, 症例全体を口唇裂単独群 (以下, 口唇裂群), 口唇口蓋裂群, 口唇裂 + 口唇口蓋裂群ならびに, 口蓋裂単独群 (以下, 口蓋裂群) に分類し, それぞれ対照群と *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った. その結果, 各裂型群における

表2 症例の父親における *MTHFR* C677T 多型の比較

	Total	遺伝子型			p	アレル頻度		p
		CC (%)	CT (%)	TT (%)		677C (%)	677T (%)	
父親群	103	31 (30.1)	54 (52.4)	18 (17.5)	0.849	116 (56.3)	90 (43.7)	0.583
口唇裂群	32	8 (25.0)	18 (56.2)	6 (18.8)	0.751	34 (53.1)	30 (46.9)	0.422
口唇口蓋裂群	54	17 (31.5)	26 (48.1)	11 (20.4)	0.758	60 (55.6)	48 (44.4)	0.552
口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	86	25 (29.1)	44 (51.1)	17 (19.8)	0.728	94 (54.6)	78 (45.4)	0.450
口蓋裂群	17	6 (35.3)	10 (58.8)	1 (5.9)	0.698	22 (64.7)	12 (35.3)	0.678
男性 対照群	29	10 (34.5)	15 (51.7)	4 (13.8)	—	35 (60.3)	23 (39.7)	—

CC, CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意な差は認めなかった。また, CおよびTアレル頻度に関しても有意な差は認められなかった。

各裂型群間の *MTHFR* C677T 多型の分布については口唇裂群と口唇口蓋裂群, 口唇裂群と口蓋裂群, 口唇口蓋裂群と口蓋裂群, および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群の各群間における *MTHFR* C677T 多型の分布に, いずれも有意差は認められなかった。

### ③ 性差の検討

口唇・口蓋裂は, 性別により各裂型の発生率に違いがあるため, 症例群を性別に分け, それぞれ男性対照群, 女性対照群と比較検討した。

#### • 男性について

男性症例 (以下, 男性群) と男性対照群における *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, CC, CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意な差は認められなかった。また, CおよびTアレル頻度に関しても両群の間に有意な差は認められなかった。

裂型別において, 各裂型群と男性対照群の *MTHFR* C677T 多型の分布の比較を行った結果, CC, CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意な差は認められなかった。また, CとTのアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

男性群の各裂型における *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, 口唇裂群と口唇口蓋裂群, 口唇裂群と口蓋裂群, 口唇口蓋裂群と口蓋裂群, および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群では, いずれも有意差は認められなかった。

#### • 女性について

女性症例 (以下, 女性群) と女性対照群における *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, CC, CT, TTの遺伝子型頻度に有意な差は認めなかった。また, CおよびTアレル頻度に関しても両群に有意な差は認めなかった。

裂型別において, 各裂型群と女性対照群の *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, CC, CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意な差は認められなかった。また, CとTのアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

女性群の裂型間における *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, 口唇裂群と口唇口蓋裂群, 口唇裂群と口蓋裂群, 口唇口蓋裂群と口蓋裂群, および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群との間では, いずれも有意差は認められなかった。

#### • 男性と女性との比較

男性群と女性群の *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, 有意な差は認めなかった。

さらに症例を裂型別に分類し, 男女の比較を行ったが, いずれも有意な差は認められなかった。

### (2) 症例の父親について (表2)

#### ① 症例の父親群と男性対照群の比較

症例の父親群と男性対照群における *MTHFR* C677T 多型の分布について比較を行った結果, CC, CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また, CおよびTアレル頻度について比較を行うと, 両群間に有

表3 症例の母親におけるMTHFR C677T多型の比較

	Total	遺伝子型			p	アレル頻度		p
		CC (%)	CT (%)	TT (%)		677C (%)	677T (%)	
母親群	153	56 (36.6)	80 (52.3)	17 (11.1)	0.693	192 (62.7)	114 (37.3)	0.393
口唇裂群	51	17 (33.3)	26 (51.0)	8 (15.9)	0.408	60 (58.8)	42 (41.2)	0.210
口唇口蓋裂群	68	24 (35.3)	37 (54.4)	7 (10.3)	0.678	85 (62.5)	51 (37.5)	0.423
口唇裂群 +口唇口蓋裂群	119	41 (34.5)	63 (52.9)	15 (12.6)	0.499	145 (60.9)	93 (39.1)	0.266
口蓋裂群	34	15 (44.1)	17 (50.0)	2 (5.9)	0.954	47 (69.1)	21 (30.9)	0.880
女性 対照群	39	17 (43.6)	19 (48.7)	3 (7.7)	—	53 (67.9)	25 (32.1)	—

意な差は認めなかった。

### ② 父親の症例の裂型別による男性対照群との比較

症例の父親群に関して、症例の裂型別に分類し、男性対照群とMTHFR C677T多型の分布について比較を行った結果、CC、CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、CおよびTアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

また、症例の裂型間により分類した各群間の比較も行った。口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群の各群間では、いずれも有意差は認められなかった。

### (3) 症例の母親について (表3)

#### ① 症例の母親群と女性対照群の比較

症例の母親群と女性対照群におけるMTHFR C677T多型の分布について比較を行った結果、CC、CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意な差は認めなかった。また、CおよびTアレル頻度においても有意な差は認めなかった。

#### ② 母親の症例の裂型別による女性対照群の比較

症例の母親群に関して、症例の裂型別に分類をし、女性対照群とMTHFR C677T多型の分布について比較を行った結果、CC、CTおよびTTの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、CおよびTアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

各裂型間においてMTHFR C677T多型の分布につい

て比較を行った結果、口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群、いずれも有意差は認められなかった。

### 2) MTHFR A1298Cについて

#### (1) 症例について (表4)

##### ① 症例群と対照群の比較

症例群と対照群におけるMTHFR A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA、ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

##### ② 裂型別による比較

症例全体を口唇裂群、口唇口蓋裂群、口唇裂+口唇口蓋裂群ならびに口蓋裂群に分類し、それぞれ対照群とMTHFR A1298C多型の分布について比較を行った。その結果、AA、ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意な差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても有意差は認めなかった。

各裂型間のMTHFR A1298C多型の分布については、口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群の各群間における多型の分布に、いずれも有意差は認められなかった。

##### ③ 性差における検討

症例群を性別に分け、男性対照群、女性対照群と比較検討した。

表4 症例におけるMTHFR A1298C多型の比較

	Total	遺伝子型			p	アレル頻度		p
		AA (%)	AC (%)	CC (%)		1298A (%)	1298C (%)	
症例群	240	155 (64.6)	77 (32.1)	8 (3.3)	0.910	387 (80.6)	93 (19.4)	0.807
口唇裂群	73	51 (69.8)	21 (28.8)	1 (1.4)	0.466	123 (84.2)	23 (15.8)	0.370
口唇口蓋裂群	124	73 (58.9)	45 (36.3)	6 (4.8)	0.839	191 (77.0)	57 (23.0)	0.589
口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	197	124 (62.9)	65 (33.0)	8 (4.1)	0.989	313 (79.4)	81 (20.6)	0.994
口蓋裂群	43	31 (72.1)	11 (25.6)	1 (2.3)	0.596	73 (84.9)	13 (15.1)	0.306
対照群	68	43 (63.2)	22 (32.4)	3 (4.4)	—	108 (79.4)	28 (20.6)	—
男性 症例群	129	89 (69.0)	34 (26.4)	6 (4.6)	0.668	212 (82.2)	46 (17.8)	0.619
男性 口唇裂群	42	33 (78.6)	8 (19.0)	1 (2.4)	0.312	74 (88.1)	10 (11.9)	0.227
男性 口唇口蓋裂群	73	46 (63.0)	22 (30.1)	5 (6.9)	0.765	114 (78.1)	32 (21.9)	0.847
男性 口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	115	79 (68.7)	29 (25.2)	7 (6.1)	0.556	187 (81.3)	43 (18.7)	0.730
男性 口蓋裂群	14	10 (71.4)	4 (28.6)	0 (0)	0.701	24 (85.7)	4 (14.3)	0.499
男性 対照群	29	18 (62.1)	10 (34.5)	1 (3.4)	—	46 (79.3)	12 (20.7)	—
女性 症例群	111	66 (59.5)	43 (38.7)	2 (1.8)	0.407	175 (63.6)	47 (21.2)	0.902
女性 口唇裂群	31	18 (58.1)	13 (41.9)	0 (0)	0.317	49 (79.0)	13 (21.0)	0.947
女性 口唇口蓋裂群	51	27 (52.9)	23 (45.1)	1 (2.0)	0.315	77 (75.5)	25 (24.5)	0.526
女性 口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	82	45 (54.9)	36 (43.9)	1 (1.2)	0.205	126 (76.8)	38 (23.2)	0.642
女性 口蓋裂群	29	21 (72.4)	7 (24.1)	1 (3.5)	0.764	49 (84.5)	9 (15.5)	0.457
女性 対照群	39	25 (64.1)	12 (30.8)	2 (5.1)	—	62 (79.5)	16 (20.5)	—

• 男性について

男性群と男性対照群におけるMTHFR A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA、ACおよびCC遺伝子型頻度に有意な差は認めなかった。AおよびCアレル頻度に関しても両群の間に有意な差は認められなかった。

裂型別において、各裂型群と男性対照群のMTHFR

A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA、ACおよびCC遺伝子型頻度に有意な差は認めなかった。AおよびCアレル頻度に関しても両群の間に有意な差は認められなかった。

各裂型間におけるMTHFR A1298C多型の分布は、口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋

表5 症例の父親における *MTHFR* A1298Cの比較

	Total	遺伝子型			P	アレル頻度		P
		AA (%)	AC (%)	CC (%)		1298A (%)	1298C (%)	
父親群	103	63 (61.2)	33 (32.0)	7 (6.8)	0.793	158 (76.7)	48 (23.3)	0.675
口唇裂群	32	22 (68.8)	9 (28.1)	1 (3.1)	0.858	53 (82.8)	11 (17.2)	0.621
口唇口蓋裂群	54	32 (59.2)	17 (31.5)	5 (9.3)	0.619	81 (75.0)	27 (25.0)	0.452
口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	86	54 (62.8)	25 (29.1)	7 (8.1)	0.639	133 (77.3)	39 (22.7)	0.753
口蓋裂群	17	9 (52.9)	7 (41.2)	1 (5.9)	0.807	25 (73.5)	9 (26.5)	0.524
男性 対照群	29	18 (62.1)	10 (34.5)	1 (3.4)	—	46 (79.3)	12 (20.7)	—

裂群の各群間に、いずれも有意差は認められなかった。

#### ・女性について

女性群と女性対照群における *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA, ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

裂型別において、各裂型群と女性対照群の *MTHFR* A1298C多型の分布について、比較を行った。その結果、AA, ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

女性群の裂型間における *MTHFR* A1298C多型の分布について口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群で、各群の間に有意差は認められなかった。

#### ・男性と女性との比較

男性群と女性群の *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、有意な差は認めなかった。

また、男性群と女性群を裂型別に比較したところ、いずれも有意な差は認められなかった。

#### (2) 症例の父親について (表5)

##### ① 症例の父親群と男性対照群の比較

症例の父親群と男性対照群における *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA, ACおよび

CCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

##### ② 父親の症例の裂型別による男性対照群の比較

症例の父親群に関して、症例の裂型別に分類し、男性対照群と *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA, ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

各裂型間における *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群では、いずれも有意差は認められなかった。

#### (3) 症例の母親について (表6)

##### ① 症例の母親群と女性対照群の比較

症例の母親群と女性対照群における *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA, ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

##### ② 母親の症例の裂型別による女性対照群の比較

症例の母親群に関して、症例の裂型別に分類をし、女性対照群と *MTHFR* A1298C多型の分布について比較を行った結果、AA, ACおよびCCの遺伝子型頻度に有意差は認めなかった。また、AおよびCアレル頻度に関しても各群に有意な差は認めなかった。

表6 症例の母親におけるMTHFR A1298C多型の比較

	Total	遺伝子型			p	アレル頻度		p
		AA (%)	AC (%)	CC (%)		1298A (%)	1298C (%)	
母親群	153	104 (68.0)	44 (28.8)	5 (3.2)	0.816	252 (82.3)	54 (17.7)	0.558
口唇裂群	51	34 (66.7)	15 (29.4)	2 (3.9)	0.947	83 (81.4)	19 (18.6)	0.751
口唇口蓋裂群	68	50 (73.5)	17 (25.0)	1 (1.5)	0.406	117 (86.0)	19 (14.0)	0.213
口唇裂群 + 口唇口蓋裂群	119	84 (70.6)	32 (26.9)	3 (2.5)	0.616	134 (84.0)	96 (16.0)	0.355
口蓋裂群	34	20 (58.8)	12 (35.3)	2 (5.9)	0.898	52 (76.5)	16 (23.5)	0.660
女性 対照群	39	25 (64.1)	12 (30.8)	2 (5.1)	—	62 (79.5)	16 (20.5)	—

表7 TDT (MTHFR C677T多型とA1298C多型)

Allele	Transmitted	Not Transmitted	
677C	33	23	p=0.181
677T	23	33	
1298A	8	10	p=0.637
1298C	10	8	

表8 ハプロタイプ解析 (MTHFR C677T多型とA1298C多型)

Marker	$\chi^2$	p
C677T	1.274	0.259
A1298C	1.607	0.302

また、各裂型間において、MTHFR A1298C多型の分布について比較を行った結果、口唇裂群と口唇口蓋裂群、口唇裂群と口蓋裂群、口唇口蓋裂群と口蓋裂群、および口唇裂+口唇口蓋裂群と口蓋裂群との間では、いずれも有意差は認められなかった。

## 2. Transmission disequilibrium test (TDT) (表7)

両親ともにC677T多型のヘテロ型 (677CT) を持つ家族28組とA1298C多型のヘテロ型 (1298AC) をもつ家族9組について検討した。C677T多型ならびにA1298C多型はいずれも症例に伝達されたマーカーアレルと伝達されなかったマーカーアレル (仮想対照) と比較した結果、有意な差はなく、両多型とも疾患との相関は認めなかった。

## 3. ハプロタイプ解析 (表8)

ソフトウェアFBAT (Harvard School of Public Health) を使用して、89組の家系情報についてハプロタイプ解析を行った。その結果、C677T多型およびA1298C多型のハプロタイプと疾患の間に関連は認められなかった。

## 考 察

口唇・口蓋裂は最も頻度の高い先天奇形の1つであり、複数の遺伝的要因と環境的要因が関連する多因子遺伝であると考えられている<sup>1,2)</sup>。すなわち、口唇・口蓋裂は家族性に発生することがあり、近親者の罹患率が一般集団における罹患率よりも高く<sup>5)</sup>、遺伝的要因の関連が考えられるが、必ずしもメンデル型遺伝に従わないこと、また、口唇・口蓋裂をもつ一卵性双生児において不一致例が過半数を占め、孤発例が家族例より多く、また、実験奇形学的研究において口唇・口蓋裂発症を誘発する環境因子が発見されていることから、口唇・口蓋裂の発症には遺伝的要因のみならず、環境的要因も関与する<sup>5)</sup>と考えられている。環境的要因として、母体の葉酸欠乏がヒト胎児の発育障害をきたし、奇形胎児の増加がみられること、妊娠前からの葉酸の投与による神経管閉鎖障害の妊娠頻度の抑制が報告され、また、葉酸の投与により口蓋裂の発症に予防効果を表すことが報告されている<sup>6,7)</sup>。

葉酸はビタミンBの一種で、プリン、アミノ酸、タンパク質などの生合成に関与している補酵素で、プリン体の1つであるグアニンとアデニン、ピリミジンの1つであるチアミンの合成に必須である。また、ホモシステイ



ンをメチル化し、メラニンへ変換する反応に関与し、フェニルアラニンをチロシン、ヒスチジンをグルタミン酸、セリンをグリシンに変換する反応を助けるなどの働きをしており、DNAやRNAの合成に葉酸は不可欠で、細胞分裂が盛んな胎児の器官形成に重要な役割を果たす<sup>14-16)</sup>と考えられている。また、血清葉酸濃度に影響を与えるとされる遺伝的要素として、葉酸の代謝関連酵素である*MTHFR*遺伝子多型が注目され、代表的な一塩基多型であるC677TとA1298Cについて検討されている。すなわち、677番のCがTに、1298番目のAがCに置き換わると酵素活性低下を引きこし、5,10-メチレンTHFから5-メチルTHFの生産が減少する。5-メチルTHFはホモシステインがメチオニンに代謝される過程を調整していることから、5-メチルTHFが減少するとその過程が障害され、血清ホモシステイン (tHcy) 濃度が高まり、それにより口唇・口蓋裂が発生すると報告されている<sup>9,14,16-18)</sup>。

また、神経管閉鎖障害に母体の葉酸代謝に関わることは既に述べたが、神経堤細胞が障害された場合、神経堤由来の間葉細胞にも作用し、顔面奇形を誘発することが知られていることから、著者は*MTHFR*のC677TならびにA1298Cの多型に注目し、検討を行った。現在までに日本人における*MTHFR* C677T多型について、裂型別に検討した報告はなく、さらに、本邦における口唇・口蓋裂患者のA1298C多型についての報告は、著者が渉猟し得た限り認められず、初めての解析である。

分析方法は、疾患の発症には1つの対立遺伝子(以下、アレル)のみならず、複数のアレルが関連すると考えられているため、複数の多型座位のアレルの並び(以下、ハプロタイプ)について分析する必要があると考えた。ハプロタイプは世代間で組み換えにより変化していく多型であるが、近接した多型座位の間では、世代を経ても変化せず、アレルの関連が残る(連鎖不平衡)と考えられている。この連鎖不平衡を応用して疾患関連遺伝子を深査する方法として、個々の多型座位を単独でマーカーとして利用するケース・コントロールスタディ、Transmission disequilibrium test (TDT)、そして複数のマーカー座位を一括して分析するハプロタイプ解析が知られている。

そこで、前述の考えを基本に、まず症例群と対照群におけるマーカー遺伝子の遺伝子型頻度、すなわち、C677T多型ではCC, CT, TT型の遺伝子型頻度、A1298C多型ではAA, AC, CC型の遺伝子型頻度について分析し、口唇・口蓋裂においてC677T多型ではTT型の発現頻度が、A1298C多型ではCC型の発現頻度が高いとの仮説のもと、ケース・コントロールスタディを行なった。

また、ケース・コントロールスタディでは症例群と対照群における遺伝的背景の相違や集団の構造化が存在すると、実際にはマーカー座位と疾患座位の間に連鎖がないのに相関があるという偽の連鎖不平衡が検出されてしまうことがあるため、このようなバイアスを回避するため、家系情報を用いて検討する伝達不平衡テスト(Transmission disequilibrium test : TDT)も行った。TDTは相関があるとされているマーカー座位と疾患の座位の間に連鎖があるかどうかを検定する方法で、親が患者にどのアレルを伝え、どのアレルを伝えなかったのか、により親を分類し集計するため、マーカー遺伝子型がヘテロの両親のみが対象となる。今回、対象となるのは、C677T多型ではCT型の両親、A1298C多型ではAC型の両親であり、C677T多型ではTアレル、A1298C多型ではCアレルがマーカーアレルとして親から子供に伝達する確率が高いと仮定し検討した。

さらに、C677T多型やA1298C多型に連鎖する多型、すなわち同一染色体上に存在する2つ以上の遺伝子が、減数分裂時に組み替えられるとことごとく一緒になって遺伝するマーカー多型が存在する可能性があること、また、ハプロタイプの連鎖不平衡の状態を世代レベルで解析するため、ハプロタイプ解析を併せて行った。なお、ハプロタイプ解析をするためには、FBATやEMアルゴリズムなどの特定のソフトウェアを使用する必要があるが、今回は家系情報を用いて分析するFBATを使用した。

裂型別分類は、口唇・口蓋裂の発生機序を考慮し、裂型を分類した。すなわち、口唇裂は一次口蓋の形成が部分的もしくは完全に欠如することにより生じること、口蓋裂は二次口蓋の裂異常により生じること、また、口唇口蓋裂は一次口蓋の裂異常が二次口蓋の裂異常を誘発し、口唇裂と口蓋裂が結合した裂異常として生じるか、あるいは、口唇裂と口蓋裂がまったく別に発生し、結果的に結合したことにより生じると言われており<sup>19)</sup>、臨床的にもこの裂型別分類が多く用いられている。そこで、本研究においてもこれらを基に、口唇裂単独群、口唇口蓋裂群、口唇裂+口唇口蓋裂群、口蓋裂単独群に分類し、検討を行った。

しかしながら、今回の結果からは、いずれの解析においても日本人における*MTHFR*遺伝子のC677T多型ならびにA1298C多型と口唇・口蓋裂発症との関連は認められなかった。

従来の報告では、Tolarovaらは1998年に*MTHFR*遺伝子C677T多型が、口唇・口蓋裂発症に関係すること<sup>20)</sup>、Martinelliらは、患者群や両親群で顕著な差は認めなかったが、母親群と対照群のアレル頻度が顕著な差を認め、また、Tアレルの頻度が高かったこと<sup>21)</sup>、Irisらは、妊

娠時の葉酸摂取量が少なかった母親ではC677TならびにA1298C多型と口唇・口蓋裂の発症とに関連がある<sup>22)</sup>と報告している。その一方で、Shawらは、C677T多型は口唇裂、口唇口蓋裂発症とは関係がなかったこと<sup>18)</sup>、また菅野らは、日本人におけるC677T多型と口唇・口蓋裂発症とに関連はなかったこと<sup>23)</sup>、Pezzettiらは、C677T多型は口唇・口蓋裂の発症と関連するが、A1298C多型では口唇・口蓋裂発症と関連はなかった<sup>3)</sup>と報告している。

このようにMTHFR C677TとA1298C多型は口唇・口蓋裂の発症とにに関連について現在まで一致した見解はみられていないが<sup>18,20~27)</sup>、今回、日本人においてC677T多型ならびにA1298C多型は口唇・口蓋裂発症と関連する結果は得られなかった理由として、日本人におけるMTHFR 677 (C→T)変異ならびに1298 (A→C)変異のホモ接合体が証明される割合が比較的低いことがその一因である可能性が考えられ、解析症例を蓄積して改めて検討する必要があると思われる。

また、口唇・口蓋裂の発症率は地域、民族間により異なるが、MTHFR C677TとA1298C多型の分布にも民族間で差があることが報告されて<sup>28,29)</sup>、吉田はベトナム人やモンゴル人の多型分布は、同じアジア人種の中でも異なる<sup>30)</sup>と述べている。今回の結果とベトナム人とのC677T多型の発現をみても、その分布に相違がみられており、これらの多型と口唇・口蓋裂発生の関連についても、人種間の相違が関与していることも考えられた。

一方、今回の結果は、5%の有意水準でC677T多型やA1298C多型と口唇・口蓋裂との間の連鎖不平衡によって生じる関連が見出せなかったが、関連解析における結果が有意といえるようになる時点を判断するのは、困難であることが示唆されている<sup>31)</sup>。福島らは、多型TT型の頻度が約15%でC-1代謝が妨げられて血清tHcy濃度の上昇がみられ、血清葉酸値が低値を示したことを報告している<sup>32)</sup>。今回の研究結果においても、ケース・コントロールスタディでTT多型の頻度は高い傾向を示し、約15%みられていたことは興味深い結果であり、血清葉酸濃度や血清tHcy濃度との関係について検討する必要があると思われる。

なお、葉酸の代謝過程は未だ詳細が明らかでないが、関与している酵素やレセプターには、幾つかの遺伝子多型が存在し代謝への影響が知られている。今後は、葉酸の代謝過程に関する酵素であるMethionine synthase (MS)、Methionine synthase reductase (MSR)や口唇・口蓋裂と関連が示唆されている候補遺伝子についても検討を進める必要があると思われる。

## 結 論

MTHFR C677T多型とA1298C多型と、日本人孤発性非症候性口唇・口蓋裂の発症との関連について、ケース・コントロールスタディ、TDT、ハプロタイプ解析を用いて分析を行ったが、いずれも有意な差は認めず、これらの多型と日本人孤発性非症候性口唇・口蓋裂の発症とは関連があるとは言えなかった。

謝 辞 稿を終えるにあたり、始終御教授を賜りました獨協医科大学口腔外科学講座、今井 裕教授に深甚なる感謝の意を表します。また、統計学の御指導頂きました医療情報センター 木村一元先生ならびに研究の御協力頂いた愛知学院大学歯学部口腔先天異常学研究室 夏目長門教授に深謝申し上げます。

本研究は文部科学省科学研究費基盤研究(A)(課題番号:16209060)の一部により行われた。

## 参考文献

- 1) 住吉好雄: 先天異常モニタリング等に関する研究. 平成14年度厚生労働科学研究(こども家庭総合研究事業)報告書(第2/11), 301-310, 2003.
- 2) 高橋庄二郎: 口唇裂・口蓋裂の基礎と臨床. 日本歯科評論社, 東京, pp57-58, 1996.
- 3) Pezzetti F, Martineli M, Scapolo L, et al: Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. HUMAN MUTATION Mutation in Brief **728**: 1-5, 2004.
- 4) Fumihiko S: Candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate and isolated cleft palate in Japanese families. 日本口腔外科学会誌 **46**: 1-8, 2000.
- 5) 高橋庄二郎: 口唇裂・口蓋裂の基礎と臨床. 日本歯科評論社, 東京, pp. 87-144, 1996.
- 6) Milunsky A, Jick H, et al: Methylfolate supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. JAMA **262**: 2847-2852, 1989.
- 7) Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA, et al: Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. JAMA **269**: 1257-1261, 1993.
- 8) 瀧 昌弘: 葉酸によるA/J系マウス口唇裂・口蓋裂の発生予防に関する研究—Nile blue 生体染色による観察, 日本口蓋裂学会誌 **17**: 227-246, 1992.

- 9) 新美照幸：葉酸が口唇、口蓋裂ならびに胸腺・心血管系異常発生に与える影響に関する実験的研究。愛知学院大学誌学会誌 **36**：663-669, 1998.
- 10) Tolarova M, Harris J：Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* **51**：71-78, 1995.
- 11) Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, et al：Risk of orofacial clefts in children born to woman using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* **346**：393-396, 1995.
- 12) Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al：A candidate genetic risk factor for vascular disease：a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase *Nature Genetics*, **10**：111-113, 1995.
- 13) Nathalie M. J, Fons G, Erilk M.B：A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene：An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *Am. J. Hum. Genet* **62**：1044-1051, 1998.
- 14) 栄養学ハンドブック編集委員会：第3版 栄養学ハンドブック, 技報堂出版, 東京, pp96-98, 1996.
- 15) Otsuka Academy of Vitamin Experts (OAVEX)：Otsuka Academy Reference- Vitamins, Minerals & Herbs-, Otsuka Academy of Vitamin Program- UCLA Center for Human Nutrition 認定日本ビタミン学会後援. 日本語版 pp33-35, 2000.
- 16) 木村修一, 小林修平：専門領域の最新情報 最新栄養学第7版, Chapter 21 葉酸. 建帛社, 東京, pp. 203-217, 1997.
- 17) 西尾和子, 浜島信之：葉酸代謝にかかわる遺伝素因検査の現状と課題. *小児看護* **31**：146-151, 2008.
- 18) Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, et al：Infant C677T Mutation in MTHFR, Maternal Periconceptional Vitamin use, and Cleft Lip. *Am J Med Genet* **80**：196-198, 1998.
- 19) 河合 幹, 夏目長門：口唇口蓋裂における基礎研究と予防の現状. 丸善出版, 東京, pp151-153, 2004.
- 20) Tolarova, M.M., Ven Rooij, Pastor M, et al：A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. *Am J Hum Genet* **63**：pp. A 27, 1998.
- 21) Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, et al：C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P：a risk factor for Mothers? *Am J Med genet* **98**：357-360, 2001.
- 22) Iris ALM, Christl VK, Leo AJK, et al：Dose the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? *Am J Epidemiol* **157**：583-591, 2003.
- 23) 菅野貴世史, 山田 敦, 鈴木洋一, 他：唇裂・口蓋裂におけるMTHFR 遺伝子C677T変異の関与は否定的である. *日本形成学会誌* **21**：690-694, 2001.
- 24) Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, et al：Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants 677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian caseparent triads. *Am J Epidemiol* **15**：1083-1091, 2003.
- 25) Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, et al：Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet* **40**：1-4, 2003.
- 26) Wyszynski DF, Diehl SR：Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and risk of Nonsyndromic cleft lip. *Am j Med Genet* **9281**：79-80, 2000.
- 27) Shaw GM, Todoroff K, Finnell RH, et al：Maternal vitamin use, infant C677T mutation in MTHFR, and isolated cleft palate risk. *Am J Med Genet* **85**：84-85, 1999.
- 28) Lorenzo D, Quanhe Y：5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies：A HuGE Review. *Ame J Epidemiol* **151**：862-877, 2000.
- 29) Hiraoka M, Kato K, Saito Y, et al：Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women, *BBRC* **316**：1210-1216, 2004.
- 30) 吉田和加：ベトナム人口唇・口蓋裂患者における5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子C677T多型に関する研究. *愛学院大学誌学会誌* **43**：421-437, 2005.
- 31) 村松正實, 木南 凌ら：ヒトの分子遺伝学, メディカルサイエンスインターナショナル, 東京, pp.511-518.
- 32) 福島真実：高度バイオテクノロジーによる生活習慣病の一次予防 葉酸栄養状態とホモシステイン, 遺伝子多型について (抄). *ハイテク・リサーチ・センター 研究発表会 女子栄養大学*, 7, 2005.