

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

乙 第 号	論文提出者 NGUYEN MINH DUC
論文題目  Association of TFAP2A, 8q24 and JAM3 Polymorphisms in Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate among Vietnamese Population	

## I. 緒言

多くの非症候性口唇裂および口唇口蓋裂 (NSCL/P) の原因遺伝子とその作用機序は、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) および連鎖解析を通して明らかにされてきた。しかし、それらの結果は全ての人種と解析方法で再現されてはいない。そこで我々はベトナム人において原因遺伝子の研究を行った。

ヒトにおいて、*TFAP2A* (*transcription factor AP-2 alpha*) の変異は、口唇裂および口唇口蓋裂 (CL/P) を伴う常染色体顕性の希少疾患である鰓眼顔症候群 (BOFS) の原因遺伝子である。そしてこれまでの関連研究から *TFAP2A* については NSCL/P への関与も報告されている。即ち、*TFAP2A* は NSCL/P の病因遺伝子の有力な候補と考えられる。

先行研究で Beaty らは症例親トリオを用いた GWAS データを用いて、Zhang らは経路ベース解析を行い、染色体領域 8q24 及び *JAM3* (*junctional adhesion molecule 3*) 遺伝子中の各 SNP を統計的に最も有意な 2 つの SNP として報告した。

本研究では、症例対照研究と、症例親トリオという家族ベース研究の 2 種類のアプローチにより、ベトナム人集団中の NSCL/P とその 2 つのサブタイプである非症候性口唇裂単独 (NSCLO) と非症候性口唇口蓋裂 (NSCLP) の病因候補遺伝子について研究を行った。

## II. 対象及び方法

### 1. 対象

NSCLO 105 組と NSCLP 112 組で構成される NSCL/P 217 組の症例親トリオ (患児 1 名とその両親の 2 名) を家族ベースの研究に用いた。また、民族および地域が一致し家族歴に口唇口蓋裂ではない健康な 273 名を症例対照研究の対照とした。対象はすべて、ベトナム社会主義共和国ホーチミン市にあるホーチミン市立 Odonto-Maxillo-Facial 病院で採取した。

### 2. SNP 選択、DNA 抽出、および遺伝子型決定

a) 既存の GWAS および関連研究、b) ベトナム、ホーチミン市の Kinh 族 (KHV 集団) 1,000 名のゲノムデータベースから、マイナーアレル頻度 (MAF) 10%以上という条件で、*TFAP2A* 中の 2 つの SNP rs1675414 (エクソン) と rs303048 (イントロン)、染色体 8q24 上の SNP rs987525、および *JAM3* 中の 1 つの SNP rs470982 (イントロン) を遺伝子型決定用を選択した。

DNA は QIAMP DNA Blood Mini Kit を用いて乾燥血液スポットから抽出した。遺伝子型は、7900HT Fast-Real Time PCR システムを用い、事前に標準化し、実験的に検証された TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイにて決定した。遺伝子型のコール率 >99%を許容可能とした。

### 3. 統計分析

ハーディー・ワインベルク平衡検定、ペアワイズ連鎖不平衡解析 (ペアワイズ LD) の  $D'$  および  $r^2$  は、オンラインソフトウェア SHEsis を用いて計算した。症例群と対照群の間の遺伝子型とアレルの頻度比較にはカイ二乗検定を用いた。オッズ比 (OR) と 95%信頼区間 (95% CI) も SHEsis を用いて計算した。伝達不平衡試験 (TDT) は、ヘテロ接合の親から NSCL/P の子への標的アレルの伝達を調べるために実施した。片親起源効果の評価機能を持つソフトウェア PLINK を用いて、アレルの伝達における親の優先性をスクリーニングした。本研究では、 $p < 0.05$  をもって、有意差有りとした。

## III. 結果

### 1. ハーディー・ワインベルク平衡検定とマイナーアレル頻度 (MAF)

4つのSNPはすべてハーディー・ワインベルク平衡にあった。MAFはすべて10%を超えており、KHV 集団の1000名のゲノムデータベースで報告されたMAFと同程度であった。

## 2. 症例対照比較

ベトナム人集団において遺伝子型頻度およびアレル頻度を対照と比較したところ、*TFAP2A* rs303048、および8q24 rs987525についてはNSCLO、NSCLP、NSCL/Pとの明らかな関連は見いだせなかった。

*TFAP2A* rs1675414についてはNSCLO群で有意差が認められた。遺伝子型TCおよびrs1675414のCアレルは、それぞれTTおよびTアレルと比較してNSCLOのリスクを増加させていた。さらなる遺伝モデル解析により、Cアレルを含む遺伝子型の組(TC + CC)は、TTと比較してNSCLOと関連していることを明らかにすることができた。

一方で*JAM3* rs470982は、単一のGアレルまたは単一のAG表現型の頻度で対照と比較して有意差を示した。Gアレルを含む遺伝子型の組(AG+GG)はNSCLPのリスクの低下させることに関連していることが示唆された。

## 3. 伝達不平衡試験 (TDT)

TDTにより、NSCLO群の中でrs1675414のCアレルに連鎖不平衡が見られ、このアレルは同SNPのTアレルと比較してNSCLOリスクが1.88倍高いと推計された。

## 4. 片親起源効果

父方の伝達は予想されるメンデル遺伝からの有意な逸脱はなかった。*TFAP2A*のrs1675414がCであるCアレルは、NSCLO群において、母親から多く伝達(over-transmitted)されていた。しかし、父方と母方の間では伝達の差に有意差を示したSNPはなかった。

## 5. 連鎖不平衡 (LD) 解析

*TFAP2A* 遺伝子の2つのSNPが独立しているか否かを調べるためにペアワイズ連鎖不平衡(LD)解析を行った。その結果、NSCL/P群のrs1675414とrs303048との間に強い連鎖不平衡が認められた。

## IV. 考察

### 1. *TFAP2A*

本研究では、*TFAP2A*の2つのSNP、イントロン6のrs303048とエクソン1のrs1675414について、NSCL/Pに対する関連性を調べた。症例対照研究では、顕性遺伝子型(TC+CC)またはrs1675414のCアレルが、潜性遺伝子型であるTTまたはrs1675414のTアレルと比較してNSCLOのリスクを増加させることが示された。興味深いことに、AP-2Aとの結合部位を破壊する、MCS9.7のrs642961のアレルについても、NSCLO群では有意な連鎖不平衡が認められた。しかしこれはNSCLO群のみでNSCL/P群全体では連鎖不平衡は認められないことが報告されている。これらの知見は、NSCLOとNSCLPが異なった遺伝的病因を持つ別の疾患であることを示唆するものである。

NSCL/Pについての母性効果遺伝も、我々も含めた先行研究で*MTHFR*、*TGFA*、*MSX1*などのいくつかの候補遺伝子で報告されている。本研究で片親起源効果について解析を行ったところ、*TFAP2A* rs1675414について、母親由来の同SNPのCアレルが、同TアレルよりもNSCLOを誘発するリスクが有意に高いことが分かった。母親起源の片親起源効果は、母親由来のアレルの影響による可能性と、ゲノム刷り込みのようなエピジェネティックな変化による可能性の2通りの解釈ができるが、現時点ではそれらの区別はできていない。

## 2. 8q24

8q24 rs987525 の NSCL/P との関連は、エストニア人とリトアニア人、ポーランド人、非ヒスパニック系白人とヒスパニック人(ラテン系アメリカ人)で追試され、再現性が認められている。しかし本研究では、症例対照研究と症例親トリオ研究のいずれでも、ベトナム人集団における NSCL/P およびその 2 つのサブタイプと rs987525 との関連は認められなかった。中国人の漢族、ブラジル人および日本人を対象に実施された他のいくつかの研究でも、この SNP と NSCL/P との関連は示されていない。本研究の結果は、8q24 rs987525 の NSCL/P との関連は特定のヨーロッパ系人種に限って観察されるものという仮説を支持するものである。

## 3. *JAM3*

*JAM3* rs470982 については、症例対照研究により、G アレルを含む遺伝子型の組 (AG+GG) と NSCLP のリスク低下との関連が示唆された。単一の G アレルまたは単一の AG 表現型の頻度は対照群との比較において有意差を示した。しかし、TDT においては、*JAM3* rs470982 は NSCL0、NSCLP、NSCL/P のいずれとも有意な関連を示さなかった。*JAM3* rs470982 と NSCLP との関連性を確認するには、より大きなサンプルサイズでのさらなる研究が必要と考える。

## 4. 症例対照および家族ベース研究

一般に、GWAS の対象となるのは理論的に分かりやすく症例の収集も比較的容易な症例対照研究である。ただし症例対照研究では、背景因子を均一化しなければ交絡につながる可能性がある。本研究では 2 種類の手法を併用することにより、各 SNP が与える影響の有無の判定の信頼性を高めることを試みた。SNP rs1675414 について、症例対照研究と、症例親トリオにおける TDT および片親起源効果を考慮した TDT の両方で NSCL0 との関連が認められ、結果の信頼性を高めることができた。

## V. 結論

1) ベトナム人集団において、*TFAP2A* rs1675414 には、症例対照研究と家族ベース研究の両方で NSCL0 との有意な関連が認められた。すなわち遺伝子 *TFAP2A* は非症候性口唇裂の発症に関与する可能性がある。

2) ベトナム人集団において、8q24 rs987525 および *JAM3* rs470982 に関する特定の遺伝子型またはアレルと NSCL0、NSCLP、NSCL/P との関連は確認できなかった。