

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 PHAM NGUYEN GIA LOC
論文題目  Association studies between <i>IRF6-TP63</i> pathway and <i>GREM1</i> with non-syndromic orofacial clefts among Vietnamese population	

## I. 緒言

本研究では、症例対照研究および家族ベース研究という 2 種類のアプローチにより、連鎖不平衡および一塩基多型(SNP)の相互作用を解析し、ベトナム人集団の *IRF6*、*TP63*、および *GREM1* 遺伝子に存在する 5 つの SNP が非症候群性口腔顔面裂 (NSOFC) の表現型に関連しているかどうかを検証した。

## II. 対象及び方法

### 1. 対象

対象は、2013 年から 2019 年にかけて、私が所属するベトナム、ホーチミン市にあるホーチミン市立 Odonto-Maxillo-Facial 病院において NSOFC を有すると診断されたベトナム人患者 527 名とその両親のトリオ (患児 1 名と両親 2 名) を、臨床検査、治療経過、および診療録に基づいて抽出した。これら 527 組の内訳は、非症候群性単独口蓋裂 (NSCPO) が 101 組、非症候群性単独口唇裂 (NSCLO) が 172 組、非症候群性口唇口蓋裂 (NSCLP) が 254 組であった。また、口腔顔面裂 (OFC) の家族歴のない、人種および地域が一致した 527 名の健常者を症例対照研究の対照群として採用した。

### 2. SNP 選択、DNA 抽出、および遺伝子型決定

ベトナム、ホーチミン市のベトナム人 (Kinh 族 KHV 集団) 1000 名のゲノムデータベースにおいて、マイナーアレル頻度 (MAF) が 5%以上であることを条件とし、既存の GWAS およびその他の関連研究の情報に基づき、*IRF6* 上の 2 SNP (rs2235375, rs846810)、*GREM1* 上の 2 SNP (rs2280738, rs1258763)、および *TP63* 上の 1 SNP (rs9332461) の計 5 SNP を遺伝子型決定用を選択した。

DNA は QIAMP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN、ヒルデン、ドイツ) 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 (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用い、事前に標準化し、実験的に検証された TaqMan SNP (Applied Biosystems) 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%を許容可とした。

### 3. 統計分析

ハーディ・ワインバーグ平衡 (HWE) が成立しているかどうかについては、健康な対照群と NSOFC 群の各裂型の患者のデータを用い、すべての SNP について評価した。症例対照研究では、マーカーごとに、対立遺伝子 (Allele)、遺伝子型 (Geno)、顕性 (Dom)、潜性 (Rec) およびヘテロ接合体 (Het) モデルについて対照群と各裂型患者群との比較を行った。比較には  $\chi^2$  乗検定およびオッズ比 (ORs) とその 95%信頼区間 (CI) を用いた。伝達不平衡試験 (TDT) と片親起源効果 (POO) の解析は、ゲノムデータ解析ソフトウェア PLINK を用いて実施した。症例対照分析および症例・親トリオ解析における各表現型の連鎖不平衡 (LD) についての  $r^2$  の算出および  $\chi^2$  乗検定によるハプロタイプ解析は、Haploview 4.2 を用いて実施した。

統計的有意差の有無の決定においてボンフェローニの補正を行った。対立遺伝子関連解析、TDT、POO においては 5 つの SNP に対し 5 種類の裂型群について解析を行ったため 25 で除し ( $p=0.002$ )、ハプロタイプ分析においては 6 つのハプロタイプに対し 5 種類の裂型群について解析を行ったため 30 で除して ( $p=0.0017$ )、有意となる  $p$  値を決定した。

## III. 結果

### 1. 対象群の特性

本研究には NSOFC 患者 527 名が参加した。NSOFC の裂型別出現率を見ると、NSCPO (19.2%) の

方が NSCL±P (80.8%) よりも出現頻度が低かった。NSCL±P の片側性・両側性については片側性 (NSUCL±P) (76.3%) が両側性 (NSBCL±P) (23.7%) よりも一般的であり、右側 NSUCL±P (34.8%) は左側 NSUCL±P (65.2%) よりも頻度が低かった。

## 2. 単一マーカー分析

本研究で解析した 5 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 5% を超えており、KHV 集団 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。

## 3. 症例対照研究およびハプロタイプ分析

*IRF6* 遺伝子の rs2235375 は、対立遺伝子モデルにおいて NSCLP ( $p_{\text{Allele}}=0.0018$ ) および NSCL±P ( $p_{\text{Allele}}=0.0003$ ) に有意な関連性を示した。また rs2235375 は、遺伝子型モデルでも NSCL±P について低い p 値 ( $p_{\text{Geno}}=0.0014$ ) を示し、NSCL±P との関連が示唆された。NSCL±P と rs2235375 との関連については潜在遺伝モデルの p 値も低く、 $p_{\text{Rec}}=0.0011$  であった。

*IRF6* 遺伝子の rs846810 は、NSCL±P 群と対照群との間で対立遺伝子頻度に有意差を示し、 $p_{\text{Allele}}=0.0015$ 、オッズ比 (OR) 1.41 (95%信頼区間 (CI) 1.14-1.74) であった。

*IRF6* の rs2235375-rs846810 が G-G であるハプロタイプは、NSCL±P ( $p=0.0003$ ) および全 NSOFC ( $p=0.0012$ ) との関連が示された。さらに、*IRF6* の rs2235375-rs846810 が C-A であるハプロタイプは NSCL±P との関連が示唆された ( $p=0.0011$ )。

## 4. 家族ベース関連研究とハプロタイプ分析

5 つの SNP 中では rs2235375 のみが伝達不平衡を示し、NSCL±P と対立遺伝子 G との間に有意な関連が認められた ( $p=0.002$ 、OR=1.34 (95% CI 1.11-1.63))。

## IV. 考察

ベトナム人における口唇裂に関する遺伝的研究は限られている。その中で、当研究室の論文では *MEOX2* の rs2237493 が NSCP0 とに関連しており、*TFAP2A* の rs1675414 については NSCLO との関連を示唆している。

### 1. *IRF6*

多くの研究で、*IRF6* の共通する対立遺伝子と NSOFC との関連が示されており、*IRF6* は NSOFC に関連して最もよく研究されている遺伝子となっている。その関連性は GWAS、その他の候補遺伝子探索研究、動物モデルによる研究でそれぞれ独立して確認されている。*IRF6* のイントロン 6 に位置する rs2235375 は、OFC に関連すると広く認められている *IRF6* 上の V274I の位置との間に強い連鎖不平衡を示すことが報告されている。さらに、rs2235375 は小脳組織における *IRF6* の DNA メチル化の増加および遺伝子発現の減少と関連があることが示されている。ベトナム人を対象とした今回の症例対照研究では、rs2235375 が G である“対立遺伝子 G”は、NSCLP および NSCL±P のリスクであることが示唆された。これらの結果は、イタリア人、中国人 (漢民族)、チリ人、ノルウェー人などを対象としたこれまでの複数の報告と一致する。一方、rs2235375 はメキシコ人においては OFC との関連は認められていない。この違いは人種の多様性によるものと考えられる。

伝達不平衡試験 (TDT) により、rs2235375 で対立遺伝子 G を受け継いだ子孫は、対立遺伝子 C を受け継いだ子孫と比較して NSCL±P のリスクが 1.34 倍高いことが示唆された。同様の結果は、メキシコ人、ヨーロッパ系アメリカ人、台湾人、シンガポール人、韓国人、中国西部の症例・親トリオ解析でも認められている。

*IRF6* に関して本研究で最も注目すべき点は、これまでの GWAS でも追試でも報告されたことのない新規 SNP、rs846810 と NSOFC との関連が示されたことである。この新規 SNP rs846810 は NSCL±P との間に強い関連性を示した ( $p=0.0015$ )。この rs846810 が G である“対立遺伝子 G”の集団における頻度の増加は、その集団の NSCL±P のリスクと関連している可能性がある。ハプロタイプ分析では、*IRF6* における G-G ハプロタイプの増加または C-A ハプロタイプの減少またはそれらの両方に NSCL±P の発生への寄与が認められた。*IRF6* rs846810 は 1q32.2 に位置し、タンパク質の構造には直接影響を与えないが、NSOFC 関連 locus の制御に関わる SNP 候補として HaploReg により検出された。HaploReg は、非コード領域の疾患関連 locus の制御に関わる SNP 候補を探索するためのツールである。また HaploReg による分析の結果、rs846810 によって、Foxp1、rf\_disc3、Irf\_known9 などの転写因子の結合性が変化している可能性が示唆された。したがって、rs846810 は *IRF6* への転写因子の結合性を変化させることにより、NSOFC の発症において間接的な役割を果たしている可能性があると考えられる。

## 2. *TP63*

*TP63* の上流のプロモーターを含む転写調節領域から rs9332461 を選択した。*TP63* rs9332461 は、HaploReg により、脳、肺、甲状腺の発生における転写因子 Nkx2\_1 の発現を変化させる可能性があることが示唆されている。また、OFC の家族歴のある家族を対象とした既存の研究では、rs9332461 が NSCLP のリスクを増加させる可能性があることが示されている。しかし本研究では rs9332461 と NSOFC との関連は示されなかった ( $p_{\text{Allele}} > 0.002$ )。OFC と rs9332461 との関連性は、同一の人種的・地域的起源をもつ集団である民族ごとに異なる可能性があることに注意すべきである。したがって、OFC に対するこの SNP の役割を検証し理解するためには、さまざまな集団を対象としたさらなる研究が必要である。

## 3. *GREM1*

本研究では *GREM1* 遺伝子の SNP については NSOFC との関連は認められなかった ( $p_{\text{Allele}} > 0.002$ )。この知見は、OFC 患者において *GREM1* 遺伝子のエキソンには病因となる変異の数が少ないという既存の報告と矛盾しない。また、本研究の結果により、同じアジア人種であっても、民族が異なることによる遺伝的背景の差異により遺伝的変異の影響が異なる可能性があることが示唆された。*GREM1/FMNI* 遺伝子間領域には、少なくともベトナム人集団では原因となる変異が含まれていない可能性がある。SNP rs1258763 が位置している染色体 15q13.3 領域が、NSOFC の遺伝的原因となる領域であるかどうかを確認するには、さらなる研究が必要である。

## V. 結論

1. 本研究は、*IRF6* の SNP rs2235375 と NSCLP および NSCL±P との関連を支持するさらなる証拠を明らかにし、NSCL±P については対立遺伝子 G に連鎖不平衡があることを明らかにした。

2. 本研究は *IRF6* の SNP rs846810 と NSCL±P との関連を初めて示した。また、rs2235375-rs846810 が G-G または C-A であるハプロタイプが NSCL±P および NSOFC と関連していることも明らかにした。

3. 本研究により、ベトナム人では NSOFC への *TP63* と *GREM1* の直接的な関与はない事を明らかにした。