

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

甲 第 号	論文提出者 大野 磨弥
論 文 題 目	日本における Van_der_Woude 症候群の疫学 ならび遺伝学的研究

I. 緒 言

Van der Woude 症候群は、口唇・口蓋裂と先天性下唇瘻を合併する先天異常症候群である。先天性下唇瘻は、1845 年に Demarquay が初めて報告した先天異常であり、下唇赤唇部に瘻孔が存在するものを言う。また、1954 年に Van der Woude により口唇裂あるいは口蓋裂に先天性下唇瘻を合併する一連の症状が報告されたことによりこれらの症状を有するものを「Van der Woude 症候群 (以下 VWS)」と呼称するようになった。以後、わが国でも VWS について多数報告されている。

高橋らは、自験例 4 例を含めた 34 例について考察し、下唇瘻を有する口唇・口蓋裂 (CL/P) はそれを有しない口唇・口蓋裂に比べて遺伝傾向が著しく高いという報告をしている。本田らは、下唇瘻と口唇・口蓋裂を合併したものは口唇・口蓋裂患者 855 例中 1 例であり、その発生原因および遺伝関係については不明であるとしている。渡辺らは、下唇瘻と口唇・口蓋裂を合併したものは口唇・口蓋裂患者 4108 例中 12 例であり、その 12 例中 6 例が両側裂であり、2 個の下唇瘻を有していたので両側性口唇裂との深い関わりを示唆していると報告した。守谷らは下唇瘻と口唇・口蓋裂を合併したものは口唇・口蓋裂患者 586 例中 5 例の報告、黒川らは左側口唇裂と下唇瘻の 1 例報告をしており、下唇瘻が 1 個の場合は片側裂を伴うものが多く、2 個の場合は両側裂を伴うものが多い傾向があるとしている。横倉らは下唇瘻と口唇・口蓋裂を合併した 2 例を経験したが、その遺伝関係については不明としており、わが国での下唇瘻の発現率は 1/200,000～400,000 とし、白人よりも若干少ないとしている。竹之下らは両側性口唇口蓋裂に下唇瘻を合併した 1 例を報告し、常染色体優性遺伝と考えられているが、この症例は単発例のため環境要因の関与も考えられるとしている。中津留らは過去の報告 90 例を調査し、口唇・口蓋裂と下唇瘻の合併率は 0.5% 以下、性差はやや男性に多いとしている。三沢らは先天性下唇瘻と口唇・口蓋裂を合併したものは口唇・口蓋裂患者 1456 例中 6 例であり、先天性下唇瘻は正中部にほぼ対称に 2 個存在することが多く、女性に多くみられるとしている。高田らは先天性下唇瘻 7 例を経験し、瘻孔の最適な切除方法は水平方向の設計であるとしている。

現在までに数々の報告がされているが性差については未だばらつきがあり、下唇瘻の発生機序や口唇裂と下唇瘻の関係等不明な点がある。

その後、VWS は常染色体優性遺伝であることや、我々の共同研究では原因遺伝子が IRF6 であることが報告されたが、いまだ臨床所見としての表現型と IRF6 の関係は不明な点が多い。

VWS の副症状としては、歯数不足、高口蓋、先天性心疾患、手の合指、分葉舌、小帯短縮症、上下顎歯肉の癒着があるとの報告がある。しかしながら、症例報告は多いものの、日本における裂型別の罹患率や性差についての詳細な報告はない。

当研究室は、平成 18 年より寄付講座「口腔先天異常遺伝学・言語学」を設立して口腔先天異常に特化した遺伝子分析や遺伝カウンセリングに注力しているが、その中で、口唇・口蓋裂は以前より遺伝要因があると言われており、遺伝カウンセリングを希望される患者家族は多い。口唇・口蓋裂を含む頭部顔面口腔の先天異常を有する患者及び家族に対する遺伝カウンセリングは、臨床遺伝専門医、口腔外科医、小児科医、認定心理士、看護師、言語聴覚士等がチームを形成し遺伝医学的な情報の提供、単一遺伝子疾患・多因子遺伝子疾患・染色体異常に関する説明、理論的・経験的再発率の推定などを実施し、自発的な意思決定を援助することで、心理社会的側面のサポートを行うことを目的としている。この中でも、VWS に対する遺伝カウンセリングで重要な

点は、常染色体優性遺伝であり、家族にとっては高い発現率を背景に精神的負担が大きい。しかし、臨床所見としての表現型が多様のためカウンセリングする上でその詳細を予測することは困難である。

そこで本研究ではこれまでの報告をふまえ、疫学的手法により臨床所見を VWS 披裂パターンモデルで分析するとともに、同意の得られた VWS の患者及び家族の IRF6 の遺伝子解析を行い、VWS について詳細を解明することにより、VWS の遺伝カウンセリングに応用できる基礎資料を得ることを目的に実施したので報告する。

II. 研究対象ならびに研究方法

研究対象者は、1982 年～2012 年までに愛知学院大学歯学部附属病院を受診した口唇・口蓋裂患者 4209 例とした。VWS と臨床的に診断された症例について、性別、口唇・口蓋裂の披裂パターン、家族歴、下唇瘻の数や発現位置等の調査を行った。また、披裂パターンの研究には、夏目・長瀬らが考案した披裂パターン分類に下唇瘻の情報を加え、VWS 披裂パターンモデルとして新たに考案したものを使用した。症例は 2 群にわけ、VWS の 22 例を VWS 群、研究対象者から VWS の 22 例を除いた 4187 例をコントロール群とした。裂型別分類や性差、裂型別の側差等についてはウェルチの t-検定を行い、危険率 5 %未満 ($P < 0.05$) をもって有意とした。遺伝子解析については、研究に対し同意を得られた 4 家系 12 人とした。サンプル番号は「家系番号-個体番号」とし、家系番号を 1～4 とし、さらに個体番号は発端者を 1、母親を 2、父親を 3、同胞は年長者か日本における Van der Woude 症候群の疫学ならびに遺伝学的研究ら 4 以降のナンバリングを行った。サンプルは、Oragene-DNA®キット (DNA Genotek 社) を使用しキットの採取方法に従い、被験者自身が採取キットのチューブで唾液の採取を行い、抽出を行うまで室温保管とした。DNA 抽出は、キットに付属されている精製試薬 (prepIT®・L2P) を使用して行った。

Oragene-DNA®キットの保存溶液にサンプルをよく混合した後、摂氏 50 度でインキュベートし、スクレアーゼを完全に不活化させた。この混合サンプル 500 μ l に 試薬 PT-L2P 20 μ l を加えボルテックスにて攪拌後、氷で冷却しながら 10 分間培養した。さらに不純物を完全に除去するためエタノール洗浄を 2 度行い、TE バッファーを 100 μ l 加えて DNA ペレットを溶解した。抽出した DNA は Thermo Fishier Scientific 社 Nano Drop 1000 を用いて吸光度法により DNA の定量化を行った。解析方法は、IRF6 のアミノ酸コード領域の exon 3～9 について、PCR 後、Big Dye® XTerminator™ 精製キットを用いて反応溶液を精製し、3130xl Genetic Analyzer にて DNA シークエンスを行い、各 exon について遺伝子解析を行った。

III. 結 果

1 Van der Woude 症候群の罹患率

下唇瘻と口唇・口蓋裂を合併したものは 24 例であり、うち 2 症例は Popliteal pterygium syndrome (PPS) であった。臨床的に VWS と診断された症例は口唇・口蓋裂 4209 例中 22 例であったため、口唇・口蓋裂中の VWS 罹患率は 0.5%となった。

2 各群の裂型別の出現率

VWS 群の裂型の出現率は、口唇裂 (以下 CL) は 22 例中 6 例 (27.3%)、口唇口蓋裂 (以下 CLP)

は 22 例中 13 例 (59.1%)、口蓋裂 (以下 CP) は 22 例中 3 例 (13.6%) であった。一方、コントロール群の裂型の出現率は、CL は 4187 例中 1378 例 (32.9%)、CLP は 4187 例中 1745 例 (41.7%)、CP は 4187 例中 1064 例 (25.4%) であった。VWS 群では CP の出現率が有意に低い結果となった。

3 裂型別の口唇・口蓋裂と下唇瘻の合併率

口唇・口蓋裂患者の裂型別下唇瘻の合併率は、CL 患者 1384 例中下唇瘻 6 例 (0.4%) のうち、1 個の症例は 2 例 (0.1%)、2 個の症例は 4 例 (0.3%) であった。CLP 患者 1758 例中下唇瘻 15 例 (0.9%) のうち、1 個の症例は 5 例 (0.3%)、2 個の症例は 10 例 (0.6%) であった。CP 患者 1067 例中下唇瘻 3 例 (0.3%) のうち、全ての症例で 2 個 (0.3%) であった。裂型別の下唇瘻の合併率は CLP で最も高い傾向がみられた。

なお、CLP 15 例の 2 個症例 10 例のうち 2 例は PPS であるため、VWS 群は CLP 1758 例中 13 例 (0.7%)、1 個の症例は 5 例 (0.3%)、2 個の症例は 8 例 (0.5%) となる。

4 各群の裂型別の男女の比較

VWS 群の合計では、男性 22 例中 9 例で 40.9%、女性 22 例中 13 例で 59.1% であった。一方、コントロール群の合計では、男性 4187 例中 2215 例で 52.9%、女性 4187 例中 1972 例で 47.1% であり、これらを裂型別に細かく調査した結果、VWS 群の CL では、男性 6 例中 1 例で 16.7%、女性 6 例中 5 例で 83.3% となり、コントロール群の CL では、男性 1378 例中 736 例で 53.4%、女性 1378 例中 642 例で 46.6% であった。VWS 群の CLP では男性 13 例中 7 例で 53.8%、女性 13 例中 6 例で 46.2% であり、コントロール群の CLP では、男性 1745 例中 1062 例で 60.9%、女性 1745 例中 683 例で 39.1% であった。VWS 群の CP では、男性 3 例中 1 例で 33.3%、女性 3 例中 2 例で 66.7% であり、コントロール群の CP では、男性 1064 例中 417 例で 39.2%、女性 1064 例中 647 例で 60.8% であった。CL において合計の性差と比較して VWS 群の女性が有意に多かった。

5 VWS 披裂パターンモデルによる比較

VWS 群において VWS 披裂パターンモデルを用いて検討したところ、片側性口唇裂 (UCL) は 3 症例のうち、男性 1 例、女性 2 例であり、全て左側口唇裂であった。下唇瘻は 1 個の症例が 2 例で 66.7%、2 個の症例が 1 例で 33.3% となり披裂側と必ずしも一致しているわけではなかった。

両側性口唇裂 (BCL) も 3 症例であった。すべての症例が女性であり、下唇瘻は全ての症例で 2 個存在した。

片側性口唇口蓋裂 (UCLP) は 7 症例のうち、男性 5 例、女性 2 例とこの披裂パターンのみ男性に多くみられた。下唇瘻 1 個の症例は 3 例 (42.9%) であり、披裂側と下唇瘻の位置は一致していたが、片側裂であっても下唇瘻 2 個の症例が 4 例 (57.1%) 認められ、披裂側と下唇瘻の数や位置には規則性はなかった。

両側性口唇口蓋裂 (BCLP) は 6 症例のうち、男性 2 例女性 4 例であった。下唇瘻は 1 個の症例が 2 例で 33.3%、2 個の症例が 4 例で 66.7% であり、両側裂であっても下唇瘻が 1 個の症例を認めることができた。

どの裂型においても口唇裂に関しては、全例完全口唇裂であり、不完全口唇裂は1例も認められなかった。

一方、口蓋裂 (CP) は3症例のうち、男性1例、女性2例であった。全例において下唇瘻は2個認められ、すべて軟口蓋裂であった。

下唇瘻が正中に存在するものをF3としたが、今回の研究では1例も認めなかった。

6 各群の裂型別の裂側の比較

VWS 群の側差は、CL では右側裂 6 例中 0 例で 0.0%、左側裂 6 例中 3 例で 50.0%、両側裂 6 例中 3 例で 50.0%であり、CLP では右側裂 13 例中 3 例で 23.0%、左側裂 13 例中 4 例で 30.8%、両側裂 13 例中 6 例で 46.2%であった。一方、コントロール群の側差は、CL では右側裂 1378 例中 445 例で 32.3%、左側裂 1378 例中 746 例で 54.1%、両側裂 1378 例中 166 例で 12.1%であり、CLP では右側裂 1745 例中 430 例で 24.6%、左側裂 1745 例中 751 例で 43.0%、両側裂 1745 例中 521 例で 29.9%となりともに左側裂の発生が最も多かった。これより VWS 群では両側裂が多く発生しており、コントロール群の口唇・口蓋裂の裂側とは大きく異なることが分かった。また、CLP において VWS 群はコントロール群よりも有意に両側裂の分布が高かった。

7 VWS 群の下唇瘻の数及びその性差

VWS 群 22 例中、下唇瘻が1個の症例は6例 (27.3%)、2個の症例は16例 (72.7%) であった。この結果に関して男女別に分別すると、下唇瘻1個の症例では性差はなく、下唇瘻2個の症例では男性より女性に多い傾向があったが、有意差はなかった。

8 裂型別の家族内発現について

家族内発現について分析した結果、VWS 群では22例中 7例で 31.8%であり、コントロール群では4187例中327例で7.8%であった。裂系別に分析した結果、VWS 群は、CL が2/22例 (9.1%)、CLP が4/22例 (18.2%)、CP が1/22例 (4.5%) であった。コントロール群は、CL が111/4187例 (2.7%)、CLP が133/4187例 (3.2%)、CP が80/4187例 (1.9%) であった。これより、VWS 群の家族内発現がコントロール群と比較して有意に高かった。

9 遺伝子解析について

調査の同意が得られた4家系12人に対して、唾液を採取し、抽出したDNAに対してIRF6のアミノ酸コード領域の exon 3～9 についてDNAシーケンスを行った結果、9人に突然変異が見つかった。症例1-1、1-3、2-1、3-1、3-4、4-3において、exon 7の多型としてデータベースに登録されている rs2235371 ミスセンス変異を認めた。また、症例3-1、3-3、3-4においては exon 9にアルギニン (Arg) がストップコドン (X) に変化するアミノ酸変異を伴うナンセンス変異を認め、さらに、症例4-1、4-2においては、exon 7にグルタミン酸 (Glu) がバリン (Val) に変化するアミノ酸変異を伴うミスセンス変異が認められた。exon 9のナンセンス変異と exon 7のミスセンス変異の未だ報告のない突然変異を確認することができた。また、poly phen2 を使用し SNPs がヒトに与える影響を予測したところ、すべての SNPs で probably damage という結果となった。

(学位論文の内容を要約したもの)

No. 5

愛知学院大学

10 VWS 披裂パターンモデルと遺伝子解析結果について

VWS 披裂パターンモデルと IRF6 の遺伝子解析結果の exon 位置やアミノ酸変異との関係に規則性はなく、VWS の表現型と IRF6 の突然変異については不明であった。