

# 琉球大学学術リポジトリ

## [原著] ミャンマー人における口唇口蓋裂発症とMTHFR遺伝子C677T多型の関連に対する検討

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語:<br>出版者: 琉球医学会<br>公開日: 2010-04-28<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En): isolated non-syndromic cleft lip with or without palate, Myanmar, folate, 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase<br>作成者: 後藤, 尊広, 新垣, 敬一, 國仲, 梨香, 石川, 拓, 仲間, 錠嗣, 夏目, 長門, 大関, 悟, 砂川, 元, Goto, Takahiro, Arakaki, Keiichi, Kuninaka, Rika, Ishikawa, Taku, Nakama, Joji, Natsume, Nagato, Ozeki, Satoru, Sunakawa, Hajime<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015626">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015626</a>   |

## ミャンマー人における口唇口蓋裂発症と MTHFR遺伝子C677T多型の関連に対する検討

後藤尊広<sup>1)</sup>, 新垣敬一<sup>1)</sup>, 國仲梨香<sup>1)</sup>, 石川 拓<sup>1)</sup>  
仲間錠嗣<sup>1)</sup>, 夏目長門<sup>2)</sup>, 大関 悟<sup>3)</sup>, 砂川 元<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>琉球大学医学部高次機能医科学講座顎顔面口腔機能再建学分野

<sup>2)</sup>愛知学院大学歯学部口腔先天異常学研究室

<sup>3)</sup>福岡歯科大学口腔顎顔面外科学講座口腔腫瘍学分野

(2009年3月3日受付, 2009年6月3日受理)

## Association of MTHFR Gene Polymorphisms on Nonsyndromic Isolated Cleft Lip and with or without cleft palate in a Myanmar population.

Takahiro Goto<sup>1)</sup>, Keiichi Arakaki<sup>1)</sup>, Rika Kuninaka<sup>1)</sup>, Taku Ishikawa<sup>1)</sup>  
Joji nakama<sup>1)</sup>, Nagato Natsume<sup>2)</sup>, Satoru Ozeki<sup>3)</sup> and Hajime Sunakawa<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Oral and Maxillofacial Functional Rehabilitation, Department of  
Clinical Neuroscience, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

<sup>2)</sup>Division of Research and Treatment for Oral and Maxillofacial Cogenital Anomalies,  
School of Dentistry, AICHI-GAKUIN University Section of Oral Oncology

<sup>3)</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery FUKUOKA DENTAL COLLEGE

### ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the association between folate metabolizing enzyme gene polymorphism, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism C677T and the development of isolated non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) in a Myanmar population. Patients-/Participants: We examined 156 Myanmar isolated NSCL/P patients, 96 their mothers and 64 their fathers compared to 109 controls. Results: The genotype and allele frequencies of MTHFR C677T in Myanmar isolated NSCL/P did not show statistically differences between the patient and the control group ( $p=0.813, 0.535$ ) as well as the father ( $p=0.513, 0.267$ ), the mother ( $p=0.501, 0.420$ ) and the control group (Genotype frequency, Allele frequency). Conclusion: Our results did not suggest that MTHFR C677T polymorphism does not make a important role in the development of isolated NSCL/P in a Myanmar population. *Ryukyu Med. J.*, 28(1,2)25~29, 2009

Key words: isolated non-syndromic cleft lip with or without palate, Myanmar, folate, 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase

### 緒言

口唇口蓋裂 (CL/P) は発生頻度が高い主要な先天異常の一つである。NSCL/Pの発生原因は、遺伝的要因と環境的要因が複雑に絡み合い、ある境界を超えた場合に発症すると考える多因子閾説が有力視され<sup>1)</sup>、現在までにいくつかのCL/Pの発症に関与する候補遺伝子が

報告されてきた<sup>2-5)</sup>が、未だその発生機序は不明瞭な部分が多い。一方で、疫学的検討から母親の妊娠期間における葉酸の摂取が、CL/P発症に対する抑制効果を示すことが報告された<sup>6,7)</sup>。

5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) は葉酸の代謝に関与する重要な酵素のひとつである。このMTHFR遺伝子の677番目の野生型Cアレルの変異型

Tアレルへの置換 (*MTHFR* C677T) はミスセンス変異であり、コードアミノ酸であるアラニンのバリンへの置換 (*MTHFR* A222V) を引き起こし、それによる *MTHFR* の熱耐性低下によってその活性が低下することが知られている<sup>8)</sup>。その結果、血中ホモシステイン濃度が高まるなどし、これらと口唇裂口蓋裂発症との関連が示唆されているが、その機序は不明である。

一方で、*MTHFR* C677T が神経管閉鎖障害 (NTDs)<sup>9)</sup> や CL/P<sup>10-12)</sup> の発症に対する関与を示唆する報告がなされた。しかしながら、*MTHFR* C677T と CL/P の関与に対し否定的な報告も多い<sup>13-18)</sup>。今回、我々の知る限り世界で初めて、ミャンマー人血液サンプルを用いて孤発性の非症候性口唇口蓋裂 (NSCL/P) と *MTHFR* C677T との関連について検討した。

### 対象・方法

対象として、ミャンマー連邦の首都ヤンゴン市サンピア病院と第二の都市マンダレー市マンダレー歯科大学病院において、国連認定法人 (ロスター) 日本口唇口蓋裂協会による医療援助活動として、CL/P の手術を受けた患者のうち、インフォームド・コンセントが得られた患者ならびにその両親、また対照群より血液を採取した。患者群は、本人以外の家系の構成員に CL/P をはじめとした他の先天異常や症候群を有さない孤発性かつ、他の症状を認めない非症候性の CL/P 患者156例とした。また、裂型別の内訳は口唇裂 (CL) 56例、口唇口蓋裂 (CLP) 100例であった。さらに患者群の両親は、妊娠期間中の飲酒やタバコ、コーヒーなどの摂取歴がなく、その父親64例、母親96例に対しても同様の検討をおこなった。

対照群は本人及びその家系の構成員に CL/P をはじめとした先天異常や症候群を有さない109例とした。

方法として、遺伝子レポジトリ用血液乾燥濾紙 (903 BOGEN/SHEETS 100 STUCK/PIECES 580×580mm REF. NO. 10539018 Schleicher & Schuell) に血液を滴下し自然乾燥させ、匿名化システムで管理された愛知学院大学ハイテク・リサーチ・センター口腔疾患関連遺伝子バンキングルームに保管したのち、血液乾燥濾紙より血液 4 ~ 6  $\mu$  l 相当の直径 6 mm の断片を打ち抜き、QIAGEN 社製の DNA Tissue Kit を用い、

付属のプロトコールに従って DNA の抽出をおこなった。次に、過去の報告を参考にプライマーを設計し<sup>8)</sup>、SIGMA GENOSYS に合成を依頼した。PCR 産物を、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析をおこない、ゲノムデータベース (UCSC Genome Informatics) で、目的とした領域が増幅されていることを確認した。次に、Hinf I を用いて制限酵素処理を行ったのち、4%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドを用いて *MTHFR* C677T の遺伝子型判定を行った。最後に、危険率 5% 以下を有意差ありとした、chi-square test (SPSS version 13.0) をおこない、患者群およびその両親と、対照群の遺伝子型頻度とアレル頻度の分布を比較した。

なお、本研究は琉球大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得た上でおこなった。

### 結果

患者群およびその両親、対照群の *MTHFR* C677T の遺伝子型およびアレル頻度と、chi-square test による結果を Table 1 に示した。患者群の遺伝子型において *MTHFR* の活性に影響する CT および TT をもつ確率は 27% と 1% であり、対照群はそれぞれ 24% と 1% であった。これらを chi-square test で比較したところ p-value 0.813 で統計学的有意差を認めなかった。アレル頻度では患者群の T アレル頻度 15% に対し、対照群は 13% であり、chi-square test による p-value 0.535 で統計学的有意差を認めなかった。患者の父親および母親に対し、同様の検討をおこなったが、いずれも統計学的有意差を認めなかった。

### 考察

CL/P は発生頻度の高い先天異常の一つであり、我が国の発症率は 0.144% と報告されている<sup>19)</sup>。また、原因として、遺伝的要因と環境的要因が複雑に絡み合った結果として発症する多因子閾説が有力視されている<sup>1)</sup>。これまでに CL/P 発症に関与する候補遺伝子がいくつか報告されているが<sup>2-5)</sup>、未だその発生機序は不明瞭な部分が多い。

*MTHFR* は重要な葉酸代謝酵素のひとつである。

Table 1 Distribution of genotypes and allele frequencies relative to polymorphisms of *MTHFR* C677T.

|             |         | Genotype frequencies |          |         |                |         | Allele frequencies |          |                |         |
|-------------|---------|----------------------|----------|---------|----------------|---------|--------------------|----------|----------------|---------|
| MTHFR C677T |         | CC n(ratio)          | CT       | TT      | x <sup>2</sup> | p-value | C n(ratio)         | T        | x <sup>2</sup> | p-value |
| control     | (n=109) | 82(0.75)             | 26(0.24) | 1(0.01) |                | ref     | 190(0.87)          | 28(0.13) |                | ref     |
| case        | (n=156) | 112(0.72)            | 42(0.27) | 2(0.01) | 0.414          | 0.813   | 266(0.85)          | 46(0.15) | 0.385          | 0.535   |
| father      | (n=64)  | 43(0.67)             | 20(0.31) | 1(0.02) | 1.34           | 0.513   | 106(0.83)          | 22(0.17) | 1.23           | 0.267   |
| mother      | (n=96)  | 69(0.72)             | 24(0.25) | 3(0.03) | 1.38           | 0.501   | 162(0.84)          | 30(0.16) | 0.65           | 0.42    |

\*=P<0.05

*MTHFR* 遺伝子の677番目の野生型のCアレルが変異型Tアレルに置換すると、アラニンからバリンへのアミノ酸置換(A222V)が起こり、酵素の活性低下や熱耐性低下を引き起こすことが知られている<sup>7)</sup>。その結果、血中ホモシステイン濃度が高まるなどし、これらとCL/Pの発症との関連が示唆されているが、その機序は不明である。

葉酸はNTDsにおいてその発症リスクを低減させるとされており<sup>9)</sup>、平成11年度、わが国でも厚生省から‘NTDsの発症リスクを低減のための妊娠可能な女性等に対する葉酸摂取に係わる適切な情報提供の推進’として、妊娠可能な女性に対して妊娠1ヶ月以上前から妊娠3ヶ月までの間、食品からの葉酸摂取に加えて、いわゆる栄養補助食品から1日0.4mgの葉酸を摂取すれば、NTDsの発症リスクが低減することができるとしている<sup>20)</sup>。NTDsは頭部および尾部神経管の閉鎖不全による中枢神経系の異常を示す。頭蓋の発生と時期を同じくして、顔面の発生にも神経堤細胞がきわめて複雑な挙動を示しており、CL/Pの発生もこの神経堤細胞の挙動異常が原因の一つであることが示唆される<sup>21)</sup>。

Tolarovaらは、女性が受胎前から総合ビタミン剤と葉酸製剤を服用すると、服用群は非服用群と比較してCL/Pに対する抑制効果を示したと報告している<sup>6)</sup>。加えて、Shawらは、受胎前後の総合ビタミン剤と葉酸製剤の服用が、口腔顔面裂発生の危険性を25~50%減少したと報告した<sup>7)</sup>。これらの報告をうけて葉酸単独の効果を示すために、新美らは、A-J系マウスに葉酸を投与することにより、CL/Pならびに胸腺・心血管系異常の発生に対する抑制効果が確認されたと報告している<sup>22)</sup>。

そこで、われわれは葉酸代謝に重要な役割を担っている*MTHFR*の酵素活性に影響する多型C677TとNSCL/P発症に関連を認めた場合、葉酸による口腔顔面裂の予防効果の機序解明の一助になると考えた。過去において、Tolarovaらによるアルゼンチン、MartinelliおよびPezzettiらによるイタリアにおける*MTHFR* C677TとNSCL/P発症の関連を示すいくつかの報告がされた<sup>10-12)</sup>。一方で、否定的な報告も認める<sup>13-18)</sup>。今回のわれわれによる解析において、対照群と患者群・父親群・母親群のそれぞれにおいて遺伝子型頻度およびアレル頻度に統計学的有意差を認めず、ミャンマー人における孤発性NSCL/Pの発症と*MTHFR* C677Tの関連を認めなかった。我々の結果はこれまでに報告されたアジア人における同様の検討<sup>15, 17)</sup>によって得られた結果を支持するものであった。その要因の一つとして、CL/Pの発生頻度は人種によって異なり<sup>23)</sup>、さらに、*MTHFR* C677Tの遺伝子型頻度も人種によって異なる<sup>24)</sup>ことから人種差が影響していることが示唆される。

また、アジア諸国は、欧米諸国と比較し野菜類を比較的多く摂取する食習慣を有することが示唆される。Fohrらは、*MTHFR* 遺伝子がTTであっても、葉酸摂

取量が十分である場合、血中ホモシステイン濃度は低く保たれると報告した<sup>25)</sup>。両親、特に母親の食習慣によっては*MTHFR* 遺伝子型による影響が低いことが示唆されるため、血中葉酸ならびにホモシステイン濃度に関する情報を得ることは今後の課題であると考えられた。

## 結 語

ミャンマー人における孤発性NSCL/Pの発症と*MTHFR* C677Tとの関連は認められなかった。今後、血液サンプルを増やし、他の葉酸代謝に関与する遺伝子多型や遺伝子間相互作用などを含めた更なる解析を進める必要性が示唆された。

## 謝 辞

本研究に協力してくださった患者様およびご家族の方々に陳謝いたします。愛知学院大学歯学部口腔先天異常学研究室および附属病院口唇口蓋裂センター、古川博雄先生、南 克浩先生、新美照幸先生、鈴木 聡先生、藤原久美子先生、上谷美幸先生、早川統子先生、澤田昌美さん、Erkhembaatar Lkhagva-Ochir先生、Tserenkhand Tsooj先生、および中央検査室、日本口唇口蓋裂協会のスタッフの方々、口腔病理学講座吉田和加博士、独協医科大学医学部口腔外科学講座越路千佳子先生、福岡歯科大学歯学部口腔顎顔面外科学講座口腔腫瘍学分野の諸先生方、米国アイオワ大学Jeffrey C Murray教授および、すべての同僚に重ねて陳謝致します。

本研究の一部は科学研究費補助金(課題番号19209062)によって行われた。

## 参考文献

- 1) Murray J. C. : Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. Clin Genet. 61: 248-256, 2002.
- 2) Suzuki Y., Jezewski P.A., Machida J., Watanabe Y., Shi M., Cooper M. E., Viet L. T., Tin N. T. D., Hai H., Natsume N., Shimozato K., Marazita M, L. and Murray J. C.: In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. Genet Med. 6 (3): 117-125, 2004.
- 3) Zuccherro T.M., Cooper M.E., Maher B.S., Daack-Hirsch S., Nepomuceno B., Ribeiro L., Caprau D., Christensen K., Suzuki Y., Machida J., Natsume N., Yoshiura K., Vieira A.R., Orioli I.M., Castilla E.E., Moreno L., Arcos-Burgos M., Lidral A.C., Leighfield L., Liu Y., Ray A., Goldstein T.H., Schultz R.E., B.S., Shi M.,

- Johnson M.K., Kondo S., Schutte B.C., Marazita M.L. and Murray J.C.: Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate. *N Engl J Med.* 351: 769-780, 2004.
- 4) Machida J., Yoshiura K., Funkhauser C.D., Natsume N., Kawai T. and Murray J.C.: Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics.* 61 (3): 237-42, 1999.
  - 5) Mansilla M.A., Cooper M.E., Goldstein T., Castilla E.E., Lopez Camelo J.S., Marazita M.L. and Murray J.C.: Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 43 (1): 21-9, 2006.
  - 6) Tolarova M. and Harris J.: Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology,* 51:71~78, 1995.
  - 7) Shaw G.M., Lammer E.J., Wasserman C.R., O'Malley C.D. and Tolarova M.M.: Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet,* 346: 393-396, 1995.
  - 8) Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthew R.G., Boers G.J., Den Heijer M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L. P. and Rozen R.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet,* 10: 111-113, 1995.
  - 9) Whitehead A.S., Gallagher P., Mills J.L., Kirke P.N., Burke H., Molloy A.M., Weir D.G., Shields D.C. and Scott J.M.: A genetic defect in 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM,* 88: 763-766, 1995.
  - 10) Tolarova MM, Van Rooij IA, Pastor M, van der Put N, Goldberg AC, Hol F, Capozzi A, Thomas CM, Pastor L, Mosby T, Ferarri C, Eskes TK, Steegers-Theunissen RP. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. *Am J Hum Genet.* 1998;63: A27.
  - 11) Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F., Carinci F., Carinci P., Stabellini G., Bisceglia L., Gombos F. and Tognon M.: C677T Variant Form at the MTHFR Gene and CL/P: A Risk Factor for Mother? *Am J Med Genet.* 98 (4) 357-360, 2001.
  - 12) Pezzetti F., Martinelli M., Scapoli L., Carinci F., Palmieri A., Marchesini J., Carinci P., Caramelli E., Rullo R., Gombos F. and Tognon M.: Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat.* 24 (1) 104-105, 2004.
  - 13) Shaw G.M., Rozen R., Finnell R.H., Todoroff K. and Lammer E.J.: Infant C677T Mutation in MTHFR, Maternal Periconceptional Vitamin Use, and Cleft Lip. *Am J Med Genet.* 80 (3): 196-198, 1998.
  - 14) Blanton S.H., Patel S., Hecht J.T., Mulliker J.B.: MTHFR Is Not a Risk Factor in the Development of Isolated Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Am J Med Genet.* 110: 404-405 2002.
  - 15) 菅野貴世史, 山田 敦, 鈴木洋一, 松原洋一: 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. *日形会誌.* 21: 690-694, 2001.
  - 16) 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. *愛知学院大学歯学会誌*43 (3) 421-437, 2005.
  - 17) Shotelersuk V., Ittiwut C., Siriwan P., Angspatt A.: Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip *J Med Genet.* 40 (5): e64, 2003.
  - 18) Little J., Gilmour M., Mossey PA., Fitzpatrick D., Cardy A., Clayton-Smith J., Hill A., Duthie SJ., Fryer AE., Molloy AM., Scott JM. and ITS MAGIC Collaboration.: Folate and clefts of the lip and palate—a U. K. -based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 45 (4): 428-38, 2008.
  - 19) Natsume N., Kawai T., Kohama G., Teshima T., Kochi S., Ohashi Y., Enomoto S., Ishii M., Shigematsu T., Nakano Y., Matsuya T., Koguchi M., Yoshimura Y., Ohishi M., Nakamura N., Katsuki T., Goto M., Shimizu M., Yanagisawa S., Mimura T., Sunakawa H.: Incidence of cleft lip or palate in 303738 Japanese babies born between 1994 and 1995. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 38: 605-607, 2000.
  - 20) 厚生省児童家庭局母子保健課, 厚生省保健医局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室: 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の

女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について. 児母第72号, 健医地生発第78号: 平成12年12月28日

- 21) 倉谷 滋, 大隈典子: 神経堤細胞 脊椎動物のボディプランを支えるもの, pp.32-44, 東京大学出版会, 東京, 1997.
- 22) 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. 愛院大歯誌, 36 (4): 663-669, 1998.
- 23) Croen LA., Shaw GM., Wasserman CR., Tolarova MM.: Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet.* 79: 42-47, 1998.
- 24) Verkleij-Hagoort A., Blik J., Sayed-Tabatabaei

F., Ursem N., Steegers E. and Steegers-Theunissen R.: Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat.* 24: 104-5, 2004.

- 25) Fohr IP., Prinz-Langenohl R., Bronstrup A., Bohlmann AM., Nau H., Berthold HK., Pietrzik K.: 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am J Clin Nutr.* 75 (2): 275-82, 2002.