

—原著—

日本人家系における唇裂・唇顎口蓋裂に関する候補遺伝子
(F13A1, D16S539, BCL3) の解析

大久保 博 基, 藤 田 一, 高 木 律 男

新潟大学大学院医歯学総合研究科
顎顔面口腔外科学分野 (主任: 高木律男教授)Candidate gene analysis at F13A1, D16S539, and BCL3 loci regarding to
non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Japanese families

Hiroki Okubo, Hajime Fujita, Ritsuo Takagi

Division of Oral and Maxillofacial Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Chief: Prof. Ritsuo Takagi)

平成 17 年 1 月 24 日受付 6 月 9 日受理

Key words : cleft lip with or without cleft palate (唇裂・唇顎口蓋裂), F13A1, D16S539, BCL3, linkage disequilibrium analysis (連鎖不平衡解析)

Abstract : We have examined about the relationship between cleft lip with or without cleft palate and three genetic loci of F13A1 (6p25.3 - p24.3), D16S539 (16q24) and BCL3 (19q13.2). At first, we extracted genome DNA from the 77 patients and their parents that were obtained written and oral informed consent. Secondly, we amplified each DNA using the microsatellite marker of genetic loci. Then we detected alleles by 8 % polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, we performed a transmission disequilibrium test (TDT) and an association test. The results of the TDT were $P=0.995$ ($\chi^2=0.067$) at F13A1, $P=0.167$ ($\chi^2=9.124$) at D16S539 and $P=0.679$ ($\chi^2=1.512$) at BCL3. The empirical P values of three genetic loci were 0.379, 0.798 and 0.828, respectively. We could not find a statistical significance either in each locus or any specific allele, so transmission disequilibrium was not approved. However, the P value in D16S539 was comparatively low, and we got comparatively high empirical P values in D16S539 and BCL3. The results of the association test were $P=0.062$ ($\chi^2=7.33$) at F13A1, $P=0.088$ ($\chi^2=10.99$) at D16S539 and $P=0.061$ ($\chi^2=7.36$) at BCL3. The P values were approximate to statistical significance although we could not find a significant difference between patients and control subjects. These lines of evidence do not suggest a significant result, but are not the results that denied actively F13A1, D16S539 and BCL3 as candidate genes. We need to accumulate the case and analysis further more in the future.

抄録: 唇裂・唇顎口蓋裂 (CL/P) における F13A1 (6p25.3-p24.3), D16S539 (16q24), BCL3 (19q13.2) の3つの遺伝子座と本疾患の関連について検討を行った。インフォームドコンセントの得られた CL/P 77 家系の患者および両親 231 名からゲノム DNA を抽出し、各遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて PCR 増幅後、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にてアレルを検出した。TDT の結果、F13A1 において $P=0.995$ ($\chi^2=0.067$)、D16S539 において $P=0.167$ ($\chi^2=9.124$)、BCL3 において $P=0.679$ ($\chi^2=1.512$) であり、検出力はそれぞれ 0.379, 0.798, 0.828 であり、各遺伝子座および特定のアレルにおいても統計学的有意差は得られず、伝達不平衡は成立しなかった。しかし、D16S539 における P 値は比較的小さく、検出力は D16S539 と BCL3 はともに比較的高い値が得られた。相関解析における結果は、F13A1 において $P=0.062$ ($\chi^2=7.33$)、D16S539 において $P=0.088$ ($\chi^2=10.99$)、BCL3 において $P=0.061$ ($\chi^2=7.36$) であった。各遺伝子座において、健常人と患者およびその両親の間に相関を見いだすには及ばなかったが、P 値は有意確率に近い結果が得られた。以上から有意な結果は得られなかったものの、F13A1,

D16S539, BCL3 を候補遺伝子として積極的に否定する結果でもなく、今後、症例の蓄積と更なる分析の必要性が考えられた。

緒 言

口唇・口蓋裂 (CL ± P) の発生原因には、環境的要因と遺伝的要因が考えられており¹⁾、候補遺伝子に関する分子遺伝学的分析はこれまでも国内外で多数報告されてきた^{2~29)}。しかし確定的な報告はなく、未だに原因遺伝子の同定には至っていない。私たちも、これまでに BCL3 および近傍の遺伝子座 (19q13.2) について、唇裂・唇顎口蓋裂 (CL/P) 多発家系の連鎖解析を行い、左側および両側裂を示す家系において二点連鎖解析で最大 LOD (logarithm of odds) スコア 1.70, 多点連鎖解析で 1.91 と比較的高い値を得たものの明らかな連鎖を示すには至らなかったと報告し²⁾、今後の再検討が必要であると考えた。

疾患多発家系を対象として行う連鎖解析は、相対危険度の高い疾患遺伝子座については極めて有効な手段である³⁰⁾とされているが、日本人集団の中では CL/P 多発家系が少ないこと、本疾患は common disease と同様に相対危険度が低いと予想されることなどの問題がある。これに対し、伝達不平衡解析 (transmission disequilibrium test: TDT)³¹⁾ や相関解析などの連鎖不平衡解析は、多数の小家系を収集することにより、相対危険度の低い遺伝子座でも分析が可能である³²⁾ という利点を有しており、今後は以上のような対象および遺伝統計学的手法にて分析を行っていく必要がある。

近年、ハイスループット解析技術の進歩により、本疾患のゲノムワイド分析に関する報告がなされるようになってきた。2000 年 Prescott ら³⁾ は、英国人 92 家系について罹患同胞対分析を行い、8 個の染色体上で関連を認めたと報告した。また 2002 年 Marazita ら⁴⁾ は、中国人 36 家系について多点連鎖解析および TDT を行い、それぞれ 7 個、10 個の染色体上で関連を認めたと報告した。そこで私たちは、これらの報告で関連の認められた染色体領域の中から、高い多型性を有する F13A1 および D16S539 を選定し、BCL3 と合わせた 3 つの遺伝子座について、日本人家系における本疾患との関連について検討を行った。

対象および方法

1. 患者および両親

新潟大学医歯学総合病院口腔外科顎顔面外科診療室を受診した CL/P 患者のうち、インフォームドコンセンツの得られた患者およびその両親を含む 77 家系 231 名を

対象とした。なお、合併奇形を有する、症候群あるいはその疑いと診断される、従来から CL/P とは遺伝系統が異なる³³⁾と考えられている口蓋裂単独の患者を含む家系は除外した。本研究を施行するにあたっては、新潟大学歯学部倫理委員会の審査と承認を受け、対象家系には研究の主旨を十分に説明して同意書に署名をいただいた上で末梢血採血を行った。患者の裂型の詳細は、唇顎口蓋裂 63 名、唇顎裂 12 名、唇裂 2 名で、孤発例が 71 家系、片親もしくは同胞に同種疾患を有するものがそれぞれ 2 家系、4 家系であった (表 1)。

表 1. 患者裂型と家系について

患者裂型	唇顎口蓋裂	63
	左側	37
	両側	20
	右側	6
	唇顎裂	12
	左側	9
	両側	1
	右側	2
	唇裂	2
	左側	2
家系	孤発例	71
	家系内発現例	6
	片親	2
	同胞	4
計		77

2. マイクロサテライトマーカー

遺伝子マーカーには、F13A1 (6p25.3-p24.3), D16S539 (16q24), BCL3 (19q13.2) の 3 つのマイクロサテライトを用いた。F13A1 と D16S539 は 4 塩基繰り返し (tetranucleotide repeat marker), BCL3 は 2 塩基繰り返し (dinucleotide repeat marker) であり、これらの各遺伝子座について、既報告^{34~36)} または The Genome Database (GDB) に登録されているゲノム情報をオンライン検索 (<http://www.gdb.org/>) し、プライマーを設定した (表 2)。

表 2. 遺伝子マーカー

遺伝子座	染色体領域	プライマー塩基配列 (5' → 3')
F13A1 ³⁴⁾	6p25.3-p24.3	F: -GAG GTT GCA CTC CAG CCT TTG CAA- R: -TTC CTG AAT CAT CCC AGA GCC ACA-
6S539 ³⁵⁾	16q24	F: -GAT CCC AAG CTC TTC CTC TT- R: -ACG TTT GTG TGT GCA TCT GT-
BCL3 ³⁶⁾	19q13.2	F: -TGG CAT AAA TGT TGA GTA AG- R: -TAA GGG CGA GTA TTG TTT CA-

結 果

1. 遺伝子多型

患者および両親の試料から、各遺伝子座のアリルは F13A1 では 283-295bp の 4 種類、D16S539 では 131-137bp の 4 種類、BCL3 では 157-181bp の 7 種類のアリルが検出され、多型が認められた (図 1)。

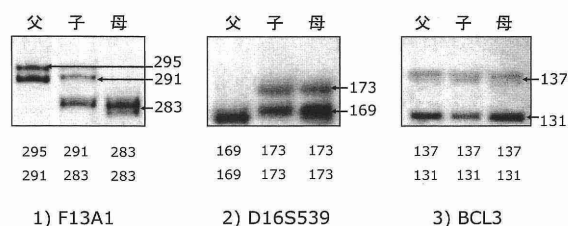


図 1. 遺伝子多型 (8% ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動像)
各電気泳動像の横および下の数字は
各々のアリルの塩基数を示す。

3. PCR 増幅およびアリルの検出²⁾

EDTA 添加末梢血を 10 倍量の 0.2% NaCl を加えて溶血後、遠心分離により有核細胞を採取し、TNE buffer (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5) と 0.5% SDS および Proteinase K (Merck 社) 100 μ g/ml を加えて 58°C で一晩消化し、phenol/chloroform 抽出後、ethanol 沈殿でゲノム DNA を回収した。

PCR 反応溶液の組成は、ゲノム DNA 50ng, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, dNTP 各 200 μ M, AmpliTaq Gold TM (Applied Biosystems 社) 1 単位, プライマー各 0.2 μ M で、25 μ l の反応系とした。PCR 条件は、denature 94°C 1 分, annealing 57°C 1 分, extension 72°C 1 分を 40 回繰り返す、DNA を増幅した。

上記の PCR 産物 8 μ l に等量の form amide loading buffer を加えて 95°C にて熱変性させ、8% ポリアクリルアミド変性ゲル (8M 尿素, アクリルアミド: ビス = 29: 1) で電気泳動を行った。その後、銀染色 (Bio-Rad 社) にて各アリルを検出し、遺伝子型を判定した。

4. 遺伝統計学的手法

連鎖不平衡解析として、TDT および相関解析を行った。TDT に関しては、multi-allelic な場合に使えるように拡張された extended TDT (ETDT) package Ver. 2.5 (<http://www.gene.ucl.ac.uk/users/dcurtis/software.html>)^{37, 38)} を用い、TDT の有意確率をモンテカルロ法で求める MCETDT program にて検出力を算出した。

相関解析に関しては、患者 77 名と健常日本人のアリル頻度について統計解析ソフト SPSS for Windows Ver. 12.0J を用いて分析を行った。なお、各遺伝子座における健常日本人のアリル頻度については既報告^{2, 39, 40)} のデータを用いた。

2. TDT

各遺伝子座における TDT の結果、F13A1 において $P=0.995$ ($\chi^2=0.067$), D16S539 において $P=0.167$ ($\chi^2=9.124$), BCL3 において $P=0.679$ ($\chi^2=1.512$) であり、検出力はそれぞれ 0.379, 0.798, 0.828 であった (表 3)。なお、各アリルにおける TDT の結果を表 4 に示す。いずれの遺伝子座および特定のアリルにおいても統計学的有意差は得られず伝達不平衡は成立しなかったが、D16S539 における P 値は比較的小さく、D16S539 と BCL3 においてともに比較的高い検出力を得た。

3. 相関解析

F13A1 において $P=0.062$ ($\chi^2=7.33$), D16S539 において $P=0.088$ ($\chi^2=10.99$), BCL3 において $P=0.061$ ($\chi^2=7.36$) であった。各遺伝子座において、健常人と患者およびその両親の間に相関を見いだすには及ばなかったが、有意確率に近い P 値を得た。

表 3. 各遺伝子座における TDT

遺伝子座	自由度	χ^2 値	P 値	検出力
F13A1	3	0.067	0.995	0.379
D16S539	6	9.124	0.167	0.798
BCL3	3	1.512	0.679	0.828

表 4. 各アリルにおける TDT

遺伝子座	アリル	伝達	非伝達	X ² 値	P 値
F13A1	283	56	55	0.286	0.593
	287	23	20	0.231	0.631
	291	0	4	—	—
	295	75	75	0.176	0.675
D16S539	157	1	2	—	—
	161	27	51	1.058	0.304
	165	42	23	4.550	0.033
	169	41	31	0.472	0.492
	173	33	34	0.620	0.431
	177	9	12	1.484	0.223
	181	1	1	—	—
BCL3	131	27	22	0.074	0.786
	133	15	14	0.681	0.409
	135	82	82	0.400	0.527
	137	30	36	0.862	0.353

表 5. 相関解析

遺伝子座	アリル	アリル頻度		X ² 値	P 値
		患者	対照 ^{2, 39, 40)}		
F13A1	283	0.503	0.596	7.33	0.062
	287	0.009	0.032		
	291	0.089	0.092		
	295	0.398	0.280		
D16S539	157	0.013	0.008	10.99	0.088
	161	0.163	0.099		
	165	0.317	0.192		
	169	0.255	0.243		
	173	0.092	0.172		
	177	0.157	0.280		
	181	0.003	0.006		
BCL3	131	0.258	0.027	7.36	0.061
	133	0.544	0.818		
	135	0.050	0.007		
	137	0.148	0.149		

考 察

CL ± P の候補遺伝子に関する研究は、1987 年 Eiberg ら⁵⁾ により報告された血液凝固第 13 因子 F13A が最初である。彼らはデンマーク人の CL ± P 多発 58 家系について F13A の血清蛋白型を分析して二点連鎖解析を行い、最大 LOD スコア 3.66 を得たと報告した。一方、本疾患に関して初めて分子遺伝学的分析を行っ

たのは 1989 年の Ardinger ら⁶⁾ で、米国人の CL/P 孤発例 80 名と α 型形質転換増殖因子 TGFA (2p13) の制限酵素 *Taq I* 断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) について解析を行い、連鎖不平衡解を認めたと報告した。その後、多数の研究機関で検索⁷⁻¹⁵⁾ が行われるようになり、本邦でも日本人集団について小澤ら⁸⁾、佐藤¹³⁾、Tanabe ら¹⁴⁾ の報告がみられるが、一致した見解は得られていない。これに対して F13A は、後に F13A1 (6p25.3-p24.3) や近傍の領域に

について分子遺伝学的分析が行われるようになった^{16~18)}がTGFAに比べて報告は少なく、特に日本人集団では検討されておらず今後の分析が待たれていた。

1995年Steinら¹⁹⁾は、顔面形成に関連が推測される22の遺伝子について、米国人のCL/P多発39家系についてマイクロサテライト多型を分析した。このうち遺伝的同質性試験で選定した17家系において、癌原遺伝子BCL3(19q13.2)の遺伝子座において多点連鎖解析で最大LODスコア7.00、伝達不平衡解析(TDT)でも連鎖不平衡が認められたと報告した。BCL3遺伝子は、B細胞型慢性リンパ性白血病(B-CLL)の転座点近傍に位置する遺伝子⁴¹⁾で後にWyszynskiら²⁰⁾が米国人45家系、メキシコ人22家系について、Martinelliら²¹⁾がイタリア人40家系について、Gasparら²²⁾がブラジル人98家系について検索を行い、関連性を認めたと報告した。私たちも、日本人CL/P多発14家系の連鎖解析を行い、左側および両側裂を示した9家系において、明らかな連鎖を認めるには至らなかったが、二点連鎖解析で最大LODスコア1.70、多点連鎖解析で最大LODスコア1.91と比較的高い値を得たと報告²⁾し、有力な候補遺伝子の一つとして今後も詳細を検索する必要があると考えた。

その他のCL±P候補遺伝子については、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素MTHFR(1p36.3)²³⁾²⁴⁾、β型形質転換増殖因子TGFB2(1q41)^{9, 14)}、TGFB3(14q24)^{9~11, 13~15, 25)}、ホメオティック遺伝子MSX1(4p16.3-16.1)^{8, 9, 11, 13, 15, 25)}、ヒト白血球抗原HLA(6p21.3)^{16, 26)}、レチノイン酸受容体遺伝子RARA(17q12)^{7, 27~29)}などが報告されている。それらの遺伝統計学的手法は連鎖解析、罹患同胞対分析、TDT、相関解析など様々な手法が用いられているが、未だに原因遺伝子の同定には至っていない⁴²⁾。私たちは、既報告²⁾においてはCL/P多発家系を収集し、パラメトリック連鎖解析法によって分析を行ったが、日本人集団にはCL/P患者を含む大家系は少なく、有用な結果を得にくい点を指摘し、今後は多数の小家系についてノンパラメトリック連鎖解析法やTDTを用いて分析することが有用であると考えた。

近年、感受性遺伝子を同定することが困難な多因子遺伝疾患に対し、全染色体上に配置した遺伝的多型マーカーを用いてゲノムマッピングを行うことにより、疾患の遺伝的基盤情報を得る試みがなされてきた。2000年Prescottら³⁾は、CL/Pの罹患同胞対を含む英国人92家系に対し、第一段階で400個、第二段階では118個のマイクロサテライトを用いてゲノムワイドに多型解析を行い、GENEHUNTER⁴³⁾等によるノンパラメトリック連鎖解析の結果、1p36, 2p13, 6p24-23, 6p25, 8q23-24, 11p12-14, 12p11-q24, 16q22-24, Xcen-q21において関連を認めたと報告した。また2002年Marazitaら⁴⁾は、中国人CL/P多発36家系を用いて387個のマイクロサ

テライト多型を検出し、多点連鎖解析で第1, 2, 3, 4, 6, 18, 21染色体, TDTで第3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 16, 20, 21染色体に関連を認めたと報告した。そこで私たちは、この両報告において関連が認められた遺伝子領域内あるいは近傍にある遺伝子座のうち、これまでCL±Pの候補遺伝子として報告されたものの日本人集団では検討されていないF13A1(6p25.3-p24.3)、F13A1とともに高い多型性を有し、法医学の分野において個人識別などに有用なマイクロサテライトマーカーとされている³⁹⁾⁴⁰⁾D16S539(16q24)に注目し、これらに加えて有力な候補遺伝子の一つと考えられるBCL3(19q13.2)の3遺伝子座について、多数の小家系を収集して、TDTと相関解析によって分析を行うこととした。

本研究の結果、TDTによって各遺伝子座および特定のアリルでの統計学的有意差は得られず、伝達不平衡は成立しなかった。しかしD16S539におけるP値は比較的小さく、D16S539とBCL3においてともに比較的高い検出力を得た。また相関解析においては、各遺伝子座で健常人と患者およびその両親の間に相関を見いだすには及ばなかったが、有意確率に近いP値を得た。これらは、有意な結果は得られなかったもののF13A1, D16S539およびBCL3を候補遺伝子として積極的に否定する結果でもなく、更なる検討によって有意な結果を得られる可能性が考えられる。本疾患のように相対危険度が低いと考えられる疾患では症例数が大変重要であり、本研究で検索を行った77家系では十分な結果を得るには不十分であると考えられる。今後更に症例を蓄積して再検討を行う必要があるが、現実的に1つの施設だけでは症例数にも限界があり、将来的には多施設共同研究の形態で1,000例以上の規模で検索を行っていくことが望ましいであろう。

本研究では、マイクロサテライト遺伝子多型を用いて解析を行ったが、マイクロサテライトは多型性が高く、時として10種類以上アリルを有し、少なくとも100kb以上にわたって連鎖不平衡を維持することが知られている⁴⁴⁾。したがって30億塩基対からなるヒトゲノムの全染色体領域にわたり100kbに1個の間隔で計3万個のマイクロサテライトマーカーを設定・配置すれば、ゲノムワイドに連鎖不平衡マッピングを行うことが可能になると試算される⁴⁵⁾。これに対し、SNP(single nucleotide polymorphism)は2種類の多型しかないが、ゲノム上の300~500bpに1つの割合で存在し、マイクロサテライトの出現頻度(数十~数百kbに1つ)の数百倍の高頻度を示すため、ゲノム全体での多型性は高い⁴⁶⁾という利点がある。今後あらゆる疾患の感受性遺伝子を同定する際、このようなゲノムワイド分析が関連を示唆する遺伝子領域を100kb程度に絞り込んだ後、各感受性候補領域内に存在するSNPマーカーを用いて

case-control study を行うことが有効である⁴⁵⁾と考えられているが、この手法を本格的に行うためには大規模で多額の予算による研究が必要となってくる。そのために本研究では、ゲノムワイド分析を行った既報告で関連が示唆される遺伝子領域内のうち、特に F13A1, D16S539 にマーカーを絞って検討を行った。今後はこれらの遺伝子座近傍の SNP についても詳細な分析を行って再検討する必要があると考えている。

ところで CL ± P の病因解析については、1970 ~ 80 年代のマウス系統を用いた研究から 1990 年代から現在に至るヒトゲノムに対する研究を経て、遺伝子解析技術の飛躍的な進歩により再度動物モデルの有用性が認識されつつある。動物モデルはヒトのように検体数で制限を受けず、交配が自由で遺伝様式の理解が容易で任意にコンジェニックマウス等を制作することができるため、多因子遺伝疾患の解析には最適と考えられる。2001 年 Juriloff ら⁴⁷⁾ は、口蓋裂感受性マウスと正常マウスを用いて第 11, 13 染色体に候補遺伝子 (*clf1*, *clf2*) を見出し、ヒトにおいては 17q, 5q/9q に相当すると報告した。今後は動物モデルにおいても様々な研究が行われ、CLAP の発症機構についての仮説や新たな候補遺伝子について探求がなされ、ヒトゲノム研究にフィードバックしていくことも重要と考える。

結 語

今回私たちは、合併奇形を認めない CL/P 患者およびその両親について、TDT および相関解析によって本疾患と F13A1, D16S539, BCL3 との関連を検討した。いずれの遺伝子座についても統計学的有意差は得られなかったが、TDT において高い検出力を認め、比較的小さな *P* 値を示す遺伝子座もあること、相関解析において有意確率に近い値を示したことから、今後の症例の蓄積と更なる分析の必要性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、患者からの採血に御協力いただきました新潟大学医歯学総合病院口腔外科顎顔面外科診療室、歯科麻酔科診療室の先生ならびに看護師の皆様にご心から感謝申し上げます。

本研究の一部は、平成 13-14 年度日本学術振興会科学研究費補助金（若手研究 (B) 課題番号 13771210）によって行われた。なお論文の要旨は、第 28 回日本口蓋裂学会総会（2004 年 5 月、鹿児島市）、第 4 回新潟ゲノム医学研究会（2004 年 6 月、新潟市）、平成 16 年度新潟歯学会第二回例会（2004 年 11 月）において発表した。

引用文献

- 1) 高橋庄二郎: 口唇裂・口蓋裂の発生原因. 口唇裂・口蓋裂の基礎と臨床, 第 1 版, 57-126 頁, 日本歯科評論社, 東京, 1996.
- 2) Fujita H, Nagata M, Ono K, Okubo H, Takagi R: Linkage analysis between BCL3 and nearby genes on 19q13.2 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in multigenerational Japanese families. *Oral Dis*, 10: 353-359, 2004.
- 3) Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcom S: Identification of susceptibility loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet*, 106: 345-350, 2000.
- 4) Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn, Liu Y: Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in multiplex families. *Am J Hum Genet*, 71: 349-364, 2002.
- 5) Eiberg H, Bixler D, Nielsen LS, Conneally PM, Mohr J: Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clinical Genet*, 32: 129-132, 1987.
- 6) Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC: Association of transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet*, 45: 348-353, 1989.
- 7) Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG: Cleft lip with or without cleft palate: Associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet*, 51: 1377-1385, 1992.
- 8) 小澤真理子, 大橋 靖, 内藤笑美子, 他: 日本人における口唇裂口蓋裂の発生と形質転換増殖因子 α (TGFA) 遺伝子および HOX7 遺伝子の関連について. *口科誌*, 45: 152-161, 1996.
- 9) Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Scheerer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W: Studies of candidate genes TGFB2, MSX1, stigma, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in Philippines. *Cleft Palate Craniofac J*, 34: 1-6, 1997.
- 10) Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang KY, Duffy

- DL, VanderKolk C: Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: Including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet*, 73: 337-344, 1997.
- 11) 町田純一郎: ベトナム人における口唇, 口蓋裂候補遺伝子の解析. *愛院大歯誌*, 36: 9-15, 1998.
 - 12) Scapoli C, Collins A, Martinelli M, Pezzetti F, Scapoli L, Tognon M: Combined segregation and linkage analysis of nonsyndromic orofacial cleft in two candidate regions. *Ann Hum Genet*, 63: 17-25, 1999.
 - 13) 佐藤文彦: 日本人家族における口唇・口蓋裂候補遺伝子の解析. *日口外誌*, 46: 1-8, 2000.
 - 14) Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M: Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clinical Science*, 99: 105-111, 2000.
 - 15) Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F: Variants of development genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol*, 24: 230-239, 2003.
 - 16) Hecht JT, Wang Y, Connor B, Blanton SH, Daiger SP: Nonsyndromic cleft lip and palate: No evidence of linkage to HLA or Factor 13A. *Am J Hum Genet*, 52: 1230-1233, 1993.
 - 17) Davies AF, Stephens RJ, Olavesen MG, Heather L, Dixon MJ, Magee A, Flintner F, Ragoussis J: Evidence of a locus for orofacial clefting on human chromosome 6p24 and STS content map of the region. *Hum Mol Genet*, 4: 121-128, 1995.
 - 18) Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M: Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Genomics*, 43: 216-220, 1997.
 - 19) Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R, Blanton SH, Amos C, Seemanova E, Hecht JT: Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet*, 57: 257-272, 1995.
 - 20) Wyszynski DF, Maestri N, McIntosh I, Smith EA, Lewanda AF, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E, Wulfsberg E, Beaty TH: Evidence for an association between markers on chromosome 19q and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in two groups of multiplex families. *Hum Genet*, 99: 22-26, 1997.
 - 21) Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Bacillero U, Padula E, Tognon M: Suggestive linkage between markers on chromosome 19q13.2 and nonsyndromic orofacial cleft malformation. *Genomics*, 51: 177-181, 1998.
 - 22) Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, Araujo BC, Andre M, Steman S, Otto PA, Passos-Bueno MR: Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian Families. *Genet Epidemiol*, 23: 364-374, 2002.
 - 23) Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S: Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*, 39: 368-369, 2002.
 - 24) Blanton SH, Patel S, Hecht JT, Mulliken JB: MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet*, 110: 404-405, 2002.
 - 25) Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC: Association of MSX1 and TGFB3 with Nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet*, 63: 557-568, 1998.
 - 26) Sakata Y, Tokunaga K, Yonehara Y, Bannai M, Tsuchiya N, Susami T, Takato T: Significant association of HLA-B and HLA-DBR1 alleles with cleft lip with or without cleft palate. *Tissue Antigens*, 53: 147-152, 1999.
 - 27) Vintiner GM, Lo KK, Holder SE, Winter RM, Malcolm S: Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: Linkage and association studies. *J Med Genet*, 30: 773-778, 1993.
 - 28) Kanno K, Suzuki Y, Yang X, Yamada A, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y: Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population. *J Hum Genet*, 47: 269-274, 2002.
 - 29) Peanchitlertkajorn S, Cooper ME, Liu YE, Field LL, Marazita ML: Chromosome 17: Gene mapping studies of cleft lip with or without cleft

- palate in Chinese families. *Cleft Palate Craniofac J*, 40: 71-79, 2003.
- 30) 井ノ上逸朗: 遺伝子多型を利用した疾患遺伝子検索法. 中村祐輔編集: SNP 遺伝子多型の戦略, 第1版, 47-70 頁, 中山書店, 東京, 2000.
- 31) Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ: Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 52: 506-516, 1993.
- 32) 鎌谷直之: 遺伝子多型を利用した疾患遺伝子研究 - その理論. 中村祐輔編集: SNP 遺伝子多型の戦略, 第1版, 28-46 頁, 中山書店, 東京, 2000.
- 33) Fogh-Anderson P: Inheritance of harelip and cleft palate. *Nyt. Nordisk Forlag-Arnold Busck*, Copenhagen, 1942.
- 34) Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR: Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1). *Nucleic Acid Res*, 19: 4306, 1991.
- 35) Selim AG, Ryan A, El-Ayat G, Wells CA: Loss of heterozygosity and allelic imbalance in apocrine metaplasia of the breast: microdissection microsatellite analysis. *J Pathol*, 196: 287-291, 2002.
- 36) St George-Hyslop PH, Ohno H, Gusella JF, McKeithan T: The BCL3 locus on chromosome 19 displays an informative microsatellite polymorphism. *Nucl Acids Res*, 20: 927, 1992.
- 37) Sham PC, Curtis D: An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet*, 59: 323-336, 1995.
- 38) Zhao JH, Sham PC, Curtis D: A program for the Monte Carlo evaluation of significance of the extended transmission/ disequilibrium test. *Am J Hum Genet*, 64: 1481-1485, 1999.
- 39) Nata M, Kimura T, Hashiyada M, He P, Yan W, Li X, Funayama M, Sagisaka K: Allele frequencies of eight STRs in Japanese and Chinese. *Int J Legal Med*, 112: 396-399, 1999.
- 40) Okamoto O, Yamamoto Y, Inagaki S, Yoshitome K, Ishikawa T, Imabayashi K, Miyaishi S, Ishizu H: Analysis of short tandem repeat (STR) polymorphisms by the PowerPlex 16 system and capillary electrophoresis: application to forensic practice. *Acta Med Okayama*, 57: 59-71, 2003.
- 41) Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW: The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to gene implicated in cell linkage determination and cell cycle control. *Cell*, 60: 991-997, 1990.
- 42) 藤田 一, 永田昌毅, 小野和宏, 他: 日本人口唇・口蓋裂患者における分子遺伝学的研究. *新潟歯学会雑誌*, 33: 273-275, 2003.
- 43) Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES: Parametric and nonparametric linkage analysis: A unified multi-point approach. *Am J Hum Genet*, 58: 1347-1363, 1996.
- 44) Koch HG, McClay J, Loh EW, Higuchi S, Zhao JH, Sham P, Ball D, Craig IW: Allele association studies with SSR and SNP markers at known physical distances within a 1 Mb region embracing the ALDH2 locus in the Japanese, demonstrates linkage disequilibrium extending up to 400 kb. *Hum Mol Genet*, 9: 2993-2999, 2000.
- 45) 岡本浩一, 猪子英俊: マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的相関解析. *医学のあゆみ*, 202: 769-773, 2002.
- 46) 森谷真紀, 板倉光夫: SNPs と多遺伝子性疾患. *実験医学*, 18: 1907-1911, 2000.
- 47) Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ: Unraveling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mammalian Genome*, 12: 426-435, 2001.