

血友病の遺伝子異常と遺伝子診断

小嶋哲人
(名古屋大学医学部第一内科)

はじめに

血液凝固機序に関する因子には、現在のところ少なくとも13種の蛋白とリン脂質およびカルシウムイオンが知られている。これらの凝固蛋白の先天性異常による出血性素因の代表的なものに血友病(Hemophilia)がある。血友病には血友病Aと血友病Bがありそれぞれ血友病Aは血液凝固第VIII因子、血友病Bは第IX因子の量的あるいは質的な欠乏が原因で出血症状を呈する疾患である。血友病はX染色体連鎖性遺伝形式をとり男児に出現するが、これは第VIII因子、第IX因子がともにX染色体上にそれぞれ責任遺伝子が存在するためである。

日本人での血友病の発生率は欧米諸国と同様に男児出生人口10万人当り10人、血友病AとBとの比率はおおよそ5:1とされ、先天性出血性素因の中では最も頻度の高い疾患である[1]。血友病の診断は従来より凝血的ならびに生化学的な手法により行われてきたが、以下に述べるようにそれぞれの責任遺伝子およびcDNAが単離され、遺伝子のレベルでの診断が可能となっている。1980年代に入ってから遺伝子工学的解析技術のめざましい進歩により、同一症状を呈する血友病が遺伝子レベルでは様々な異常により引き起こされていることが明かにされている。とくに血友病Aでは、蛋白解析からは困難であった第VIII因子の構造・機能解析による病態解明に、これらの遺伝子解析から得られた知見が大いに貢献している。

血友病についての研究は、このように分子遺伝学的手法の発展に伴い画期的とも言える進歩を遂げ、遺伝子レベルの臨床診断、遺伝子工学を用いた組み換え型第VIII因子、第IX因子の

臨床応用、さらには新しい治療法としての遺伝子治療を目指した包括的な臨床的研究が進められている。本稿では、これらの最近の知見も踏まえ血友病の遺伝子解析、遺伝子診断について概説する。

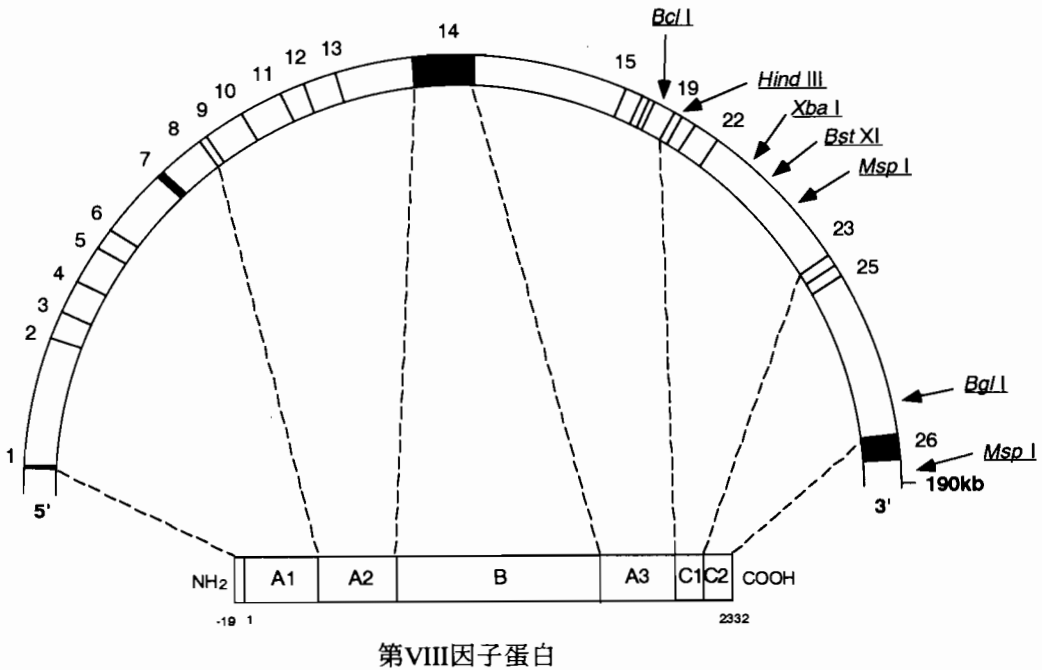
遺伝子構成と蛋白構造

1: 第VIII因子

X染色体上のXq28の位置にマッピングされたヒト血液凝固第VIII因子遺伝子は、1984年に分離されて図1に示すように26個のエクソンと25個のイントロンをもつ全長186kb(X染色体の約0.1%)にも及ぶ巨大な遺伝子であることが判明し、転写されたmRNAの大きさも9kbと巨大である[2]。第VIII因子が肝臓で産生されることは従来よりよく知られていたが、第VIII因子mRNAの産生部位の検索により腎臓、脾臓、リンパ節などでも発現していることが判明している[3]。第VIII因子遺伝子内およびそのごく近傍には、血友病Aの遺伝子診断に使用可能な制限酵素断片多型(Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)部位が少なくとも7ヶ所(*BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BstXI*, *MspI*, *BglI*, *MspI*)、第VIII因子遺伝子外では2ヶ所(*TaqI*/St14, *gIII*/DX13)に存在しており、これらを用いて血友病AのDNAレベルでの保因者診断、出生前診断が可能となっている[4]。

第VIII因子の血中濃度は100ng/mlときわめて微量の上に、精製過程でのプロテアーゼ分解のために純化が非常に難しく、蛋白レベルからの研究ではその詳細な解析は困難であった。しかし、第VIII因子遺伝子に加えそのcDNAも分離され[5]、これらの解析結果より推定される第VIII因子は19個のアミノ酸残基よりな

第VIII因子遺伝子



第VIII因子蛋白

図1. 第VIII因子の遺伝子と蛋白の構造(模式図)

BclI, *HindIII*, *XbaI*, *BstXI*, *MspI*, *BglI* は RFLP を検出する制限酵素とその部位を示す。

るシグナルペプチドをもち、その成熟蛋白は2332アミノ酸残基からなる一本鎖ポリペプチドとして合成されることが判明した。そして、この成熟第VIII因子は第V因子と非常によく似たドメイン構造をもち、N末からA1, A2, B, A3, C1, C2各ドメインから構成されることが明らかとなった。この各Aドメインはセルロプラスミンに見られるA1, A2, A3ドメインと相同性が認められており、一方Cドメインは discoidin あるいは mouse milk fat globule binding protein に相同性が認められている。さらに、リコンビナント第VIII因子の発現系を用いた詳細な第VIII因子合成分泌の研究により、リボゾームで合成された第VIII因子の前駆体は小胞体に移行する際にシグナルペプチドがはずされ、小胞体および次のゴルジ体において様々な糖付加などの修飾を受け、さらにゴルジ体を通過する際に Arg 1648-Glu 1649 および Arg 1313-Ala 1314 で切断を受け2本鎖型成熟第

VIII因子としての分子形態を完成させて行くことが明らかにされた[6](図2)。

血中へ分泌された成熟第VIII因子はフォンヴィルブランド因子と複合体を形成しており、様々なプロテアーゼから保護されている。このフォンヴィルブランド因子との結合には、第VIII因子の2ヶ所ある酸性配列 a1 部位(331-372), a2 部位(1649-1689)が重要で、とくに後者はフォンヴィルブランド因子との結合に必須とされ、その硫酸化 Tyr 1680 が重要な役割を果たしていることがリコンビナント第VIII因子の発現実験系において示されている[7]。

2: 第IX因子

第IX因子は分子量約54,000の一本鎖糖蛋白(糖鎖重量はおよそ17%)で、血中濃度はおよそ5 Mg/ml, 主たる産生場所は肝臓と考えられている。1982年, Kurachi & Davie ら[8]により全長1463bpのヒト第IX因子cDNAが単離さ

第VIII因子蛋白

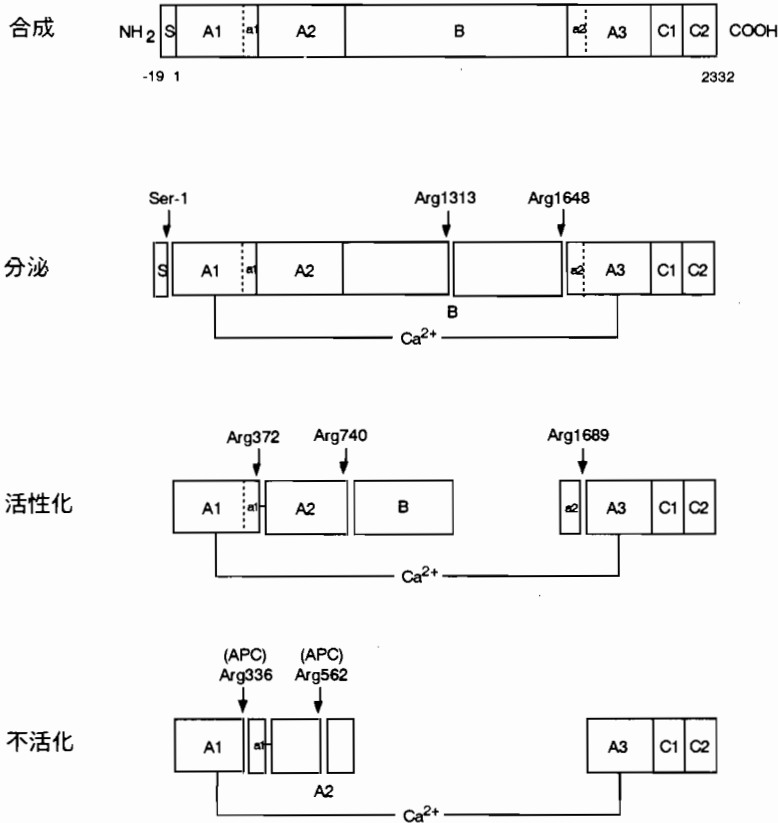
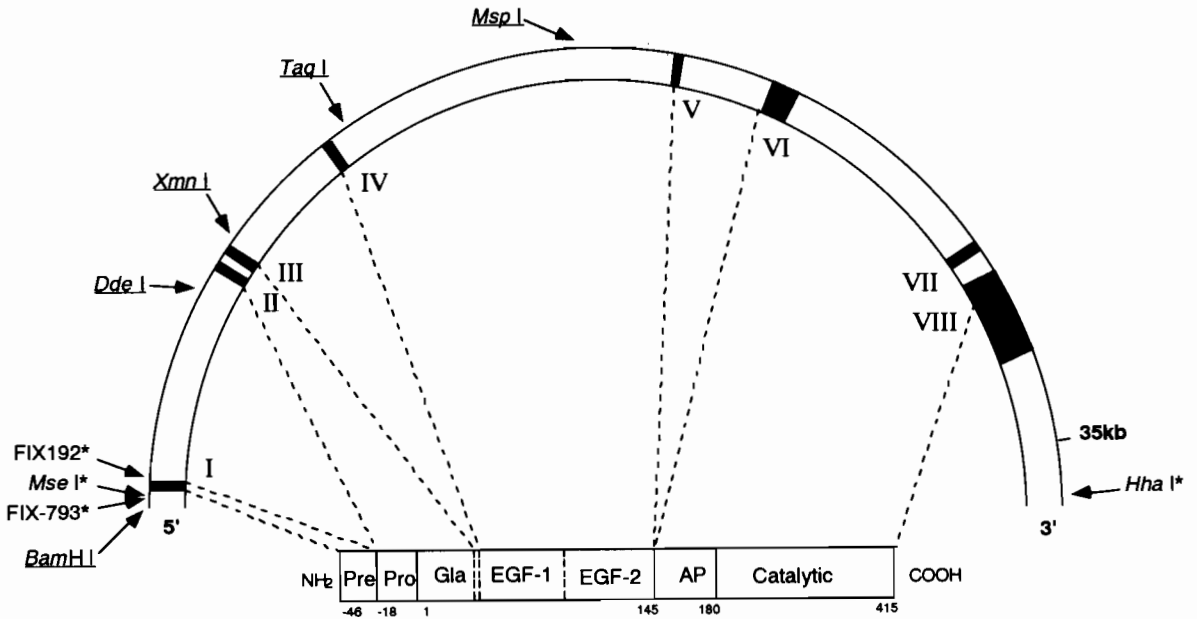


図2. 第VIII因子ドメイン構造とその合成分泌
活性不活化における蛋白解裂部位アミノ酸とその番号はC末側を示す。

れたが、これとは独立した数グループからもクローニングが報告されている。そして、ヒト第IX因子 cDNA は約 2.8 kb の大きさを持ち46個のアミノ酸残基からなるプレプロリーダー領域と415アミノ酸残基の成熟第IX因子をコードする領域、さらに1.4 kb の長いノンコーディング領域が存在することが判明した。ここで興味あることは Kurachi らの cDNA では148番目のアミノ酸が GCT でコードされる Ala であるのに対し、Jaye ら [9] のクローンでは ACT でコードされる Thr であったことで、染色体遺伝子の塩基配列あるいは精製蛋白のアミノ酸配列でも Ala と Thr とが確認されているので、この相違は正常人における二型性 (dimorphism) とされている。また、性染色体 q27.1 にマツ

ピングされているヒト第IX因子遺伝子は Yoshitake ら [10] により単離され、約 33 kb に及ぶその全塩基配列が決定された。そして、ヒト第IX因子遺伝子は8つのエクソンから約 2.8 kb の mRNA を産み出し、他のビタミンK依存性因子遺伝子との構造的な相同性を示すことが観察されている (図3)。第IX因子は蛋白構造上6つのドメインから成り、そのうち肝細胞からの分泌過程で必須の疎水性シグナルペプチドはエクソン a、プロペプチドおよび正常な蛋白折り畳みと Ca²⁺ 結合に必要な12個の γ -carboxyglutamic acid 残基を含む gla ドメインはエクソン b と c、Ca²⁺ の高親和性結合に重要な第1EGF ドメインはエクソン d、第2EGF ドメインはエクソン e、XIa 因子あるいは VIIa

第IX因子遺伝子



第IX因子蛋白

図3. 第IX因子の遺伝子と蛋白の構造(模式図)

BamHI, DdeI, XmnI, TaqI, MspI, HhaI, MseI は RFLP 部位, F9-192 は DGGE 法で検出される polymorphism 部位を示す。

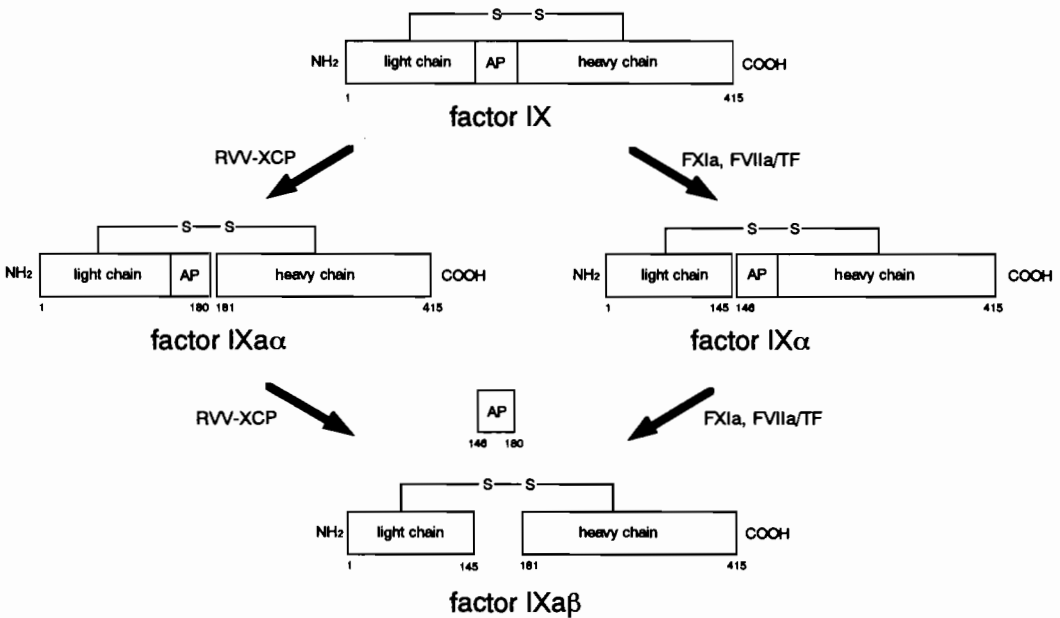


図4. 第IX因子の活性化機構

RVV-XCP: クサリヘビ毒アクチベーター

因子／組織因子により2カ所切断される活性化ドメインはエクソンf, His 221, Asp 269 と Ser 365 で構成される活性基を含むセリンプロテアーゼ・ドメインはエクソンgとhによってコードされている。

第IX因子は肝臓細胞で産生されるビタミンK依存性の糖蛋白で、図4に示したようにCa²⁺存在下にVIIa因子-組織因子、あるいはXIa因子によって活性化されIXa因子となる。また、第IX因子はクサリヘビ毒Xアクチベータ(RVV-XCP)によっても活性化され、この活性化系は補助因子が不要なので異常因子の解析やIX因子のアクチベータとして有用である。

血友病の遺伝子解析

1: 第VIII因子遺伝子解析

第VIII因子遺伝子は第IX因子遺伝子に比べて上述のごとく186 kbと非常に大きくかつやや遅れてクローニングされたため、血友病Aの遺伝子解析は血友病Bほど進んでいないのが現状である。当初、血友病Aの遺伝子解析はホットスポットであるCpGジヌクレオチドにおける変異を検索する方法で検討されていたが、最近のより迅速なスクリーニング法により血友病Aの遺伝子異常が多岐にわたることが判明している。そして、1991年のTuddenhamらによる255症例の集計では、182例の点変異、59例の大欠失、8例の小欠失、6例の挿入変異が報告されている[11]。

182例の点突然変異の中には、少なくとも80種以上の異なる点突然変異の型が認められており、血友病Aが遺伝子のレベルではかなり不均一な疾患であることが容易に理解できる。これらの点突然変異74例のうち、重症型の血友病Aは27例(36.5%)、中等症は29例(39%)、軽症型は18例(24%)であったが、ナンセンス変異の症例は全例重症型の表現型を持っていた。そして、中等症あるいは軽症型はすべてミスセンス変異型であった。

興味あることに、同一の点突然変異が必ずし

も同じ表現型を示さないという事実がある。例えば、Pattinsonらはコドン1689のCT変異をもつ患者に、あるものには重症型、あるものには中等症型血友病Aをもたらすことを報告している[12]。また、Schwaabら[13]はコドン2307のGT変異(Arg→Leu)重症型血友病Aを示すことを報告したが、同じ変異でInabaら[14]は中等症を示す症例の報告を行っている。これらの事象がなぜ起こるのかはその詳細は明かではないが、これはミスセンスに限った事象でナンセンス変異では必ず重症型の血友病を起こしている。

血友病Aの病型の多様性をもたらすものにも一つ、インヒビターの発生がある。血友病Bでは大きな遺伝子欠損がインヒビター発生に関与していると言われている[15]が、血友病Aではそれほどの相関は見られない。実際、Tuddenhamらの集計でも12例の点突然変異例においてインヒビターの発生が見られることが報告されており、逆に比較的大きな遺伝子欠損をもつ血友病A患者でもインヒビターをもたない症例が数多く報告されている。血友病Aの点突然変異12例のうち10例はナンセンス変異であり、残りの2例は2209 Arg→Glnと2229 Try→Cysアミノ酸置換例の軽症～中等症患者であった。しかし、そのインヒビター陽性ナンセンス変異8例は1914 Argと2147 Argに集中しており、これらのアミノ酸が免疫寛容をもたらす構造形成に重要な働きを持つことが想像される。

血友病Aには第VIII因子の抗原量を正常にもつが活性の低い変異型がある。これらはCross Reacting Material Positive (CRM+)あるいは血友病A+と呼ばれ、その頻度は全血友病Aの約5%である。これらの機能異常をもつ第VIII因子の解析は機能上重要な情報が得られる可能性があるが、第VIII因子の血中濃度が微量でかつ精製過程でのプロテアーゼ分解のために純化が非常に難しく、蛋白レベルからの研究ではその詳細な解析は困難であった。しかし、近年のモノクローナル抗体による純化法やイム

ノブロット解析法の進歩によりようやく解析できるようになってきている。例えば、アミノ酸372と1689のArgは第VIII因子活性化時のトロンビン解裂部位で、これらの部位のアミノ酸置換によるCRM+異常第VIII因子例の報告がある[16~19]。

一方、これらの点突然変異の38%はホットスポットと言われている CpG ジヌクレオチドにおけるCTあるいはGA置換である。実際、ヒト遺伝子病の原因となる点突然変異の約1/3はこのCG→TGあるいはCG→CA置換の結果とも言われている[20,21]が、Tuddenhamらの集計での高いCpGジヌクレオチドにおける変異の占める割合は、当初、制限酵素あるいはオリゴヌクレオチドによるこのCpG変異スクリーニング法を用いていたためである。しかし、最近より迅速なスクリーニング法により血友病Aの遺伝子異常が多様多岐にわたることが判明している。例えばHiguchiらは45組のプライマーによるPCRおよびDGGEによるスクリー-

ニングにより、軽症~中等症血友病A29例の蛋白コード領域およびスプライス結合領域を検索することにより25例の遺伝子異常を検出している[22]。しかしながら、血友病A患者の過半数を占める重症型では上記領域を網羅しても50%は遺伝子異常が検出不能であることが報告されている[23]。

Naylorらは28例の血友病A患者の第VIII因子mRNAからのRT-PCR産物からChemical mismatch解析を行い、軽症あるいは中等症の5例全例にミスセンス点突然変異を、重症血友病A23例中13例に原因と思われる遺伝子異常を認めたと報告している[24]。しかし、残り10例においてはエクソン1-22およびエクソン23-26では予想されるサイズの正常なフラグメントが得られるものの、エクソン22からエクソン23に連なるmRNAからのRT-PCR産物は全く得ることができなかつたと報告している。そして、最近2つのグループから[25,26]独立して、第VIII因子遺伝子のエクソンおよびその近傍に異

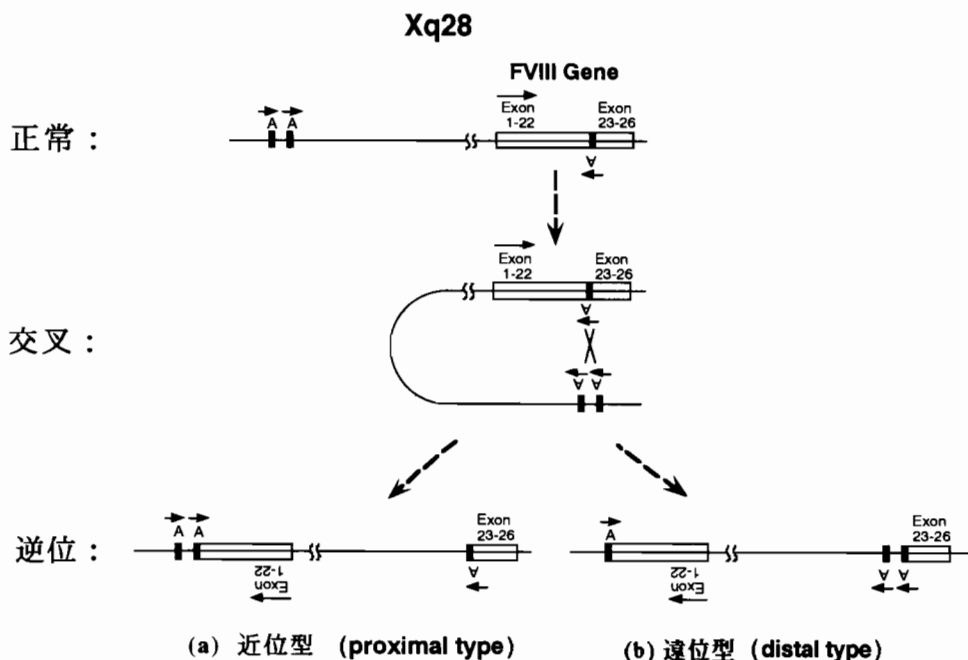


図5. 重症血友病A患者における第VIII因子遺伝子逆位のモデル(文献22より改変)
Exon 1-22, 23-26は第VIII因子遺伝子, Aは第VIII因子遺伝子内およびその上流に3コピー存在する別の遺伝子を示す。矢印は転写方向を示す。逆位には近位型と遠位型が存在する。

常を検出できない血友病A重症例におけるイントロン22と上流位との逆位 (Inversion) の可能性が報告され、注目されている。

逆位の生じる正確な機構については明らかではないが、約 500 kb 上流の 2 つの gene A とイントロン22内の逆向き gene A とで相同組換えが生じることにより引き起こされるものと考えられている。そして、イントロン22内の gene A と上流の gene A の 2 コピーのうちより近位に存在するもので組換えが起こる近位型 (Proximal type: 図 5 (a)), より遠位に存在するものとの遠位型 (Distal type: 図 5 (b)) の 2 種類のパターンを生じる。その結果、第 VIII 因子遺伝子がおのおの逆向きに分断されることになり、第 VIII 因子遺伝子は正常に転写できず重症の血友病Aを発症する。この場合、それぞれ蛋白コード領域、スプライス結合領域、プロモーター領域等での塩基配列には全く変異を起こしていないため、Higuchi らの用いた PCR および Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) によるスクリーニングでは遺伝子異常が検出できなかったのである。我々が non-RI サザンブロッティング法を用いてこの第 VIII 因子遺伝子逆位解析を行なった結果、欧米人と同様に日本人においても第 VIII 因子遺伝子逆位異常が重症型血友病Aの原因の一つであること判明した [27]。

2: 第 IX 因子遺伝子解析

第 IX 因子遺伝子は第 VIII 因子遺伝子に比べて比較的早期にクローニングされ、かつ約 33 kb と小さいため、血友病Aに比べ血友病Bの遺伝子解析が早くから進められてきた。1997年にまとめられた database [28] によると合計 1535名の血友病B患者における遺伝子異常が登録されている。そのうちあるものは重複しており、血友病Bの原因と思われる独立した遺伝子異常は597種類と報告されている。これらの多くは、いわゆるホットスポットである CpG ジヌクレオチドにおける変異 (CG→TG あるいは CA 変換) によるものであることが知られてい

表1. 血友病B患者に見られた第 IX 因子遺伝子異常 [28]

unique events	597
pont mutations	456
short additions or deletions or both	119
deletions	91
additions	22
additions and deletions	6
double mutations	21
triple mutation	1

る。しかしながら、少なくともその一部は CG doublets の高度繰り返しの founder effect によるものであることが明らかにされている。CG doublets 以外の突然変異の founder effect もよく知られており、そのほか多種の重複異常が認められている。おそらく全部ではないにしろ、これらの多くは共通起源のものと思われる。(表 1)

この集計には遺伝子の部分欠損あるいは完全欠損が含まれていないが、我々の報告を含めて現在までに29例の第 IX 因子遺伝子欠損例が報告されている。そして、この大きな遺伝子欠損と第 IX 因子インヒビター発生との因果関係が指摘されている [15]。

遺 伝 子 診 断

血友病のように X 染色体連鎖性遺伝をする疾患の遺伝相談には保因者診断が非常に重要であり、従来、これは詳細な家族歴の調査と血液凝固学的な検査法とを組み合わせで行なわれてきたが、精度の点でやや不確実である問題があった。最近、これに加え第 VIII 因子および第 IX 因子遺伝子ならびに cDNA がクローニングされ、より正確な DNA レベルでの診断が可能となりその威力を発揮している。

一般に遺伝子診断には、血友病の異常遺伝子と連鎖する遺伝子マーカーを指標にした間接診断法と、血友病の原因と思われる遺伝子の異常自体を検索する直接診断法とがある。血友病は

臨床検査上からも多様性の大きな疾患であることが知られているが、DNA レベルでの異常はさらに多種多岐にわたり一様でなく、しかも容易には同定できない。このため直接遺伝子診断法はごく限られた家系にのみに適用可能である。一方、間接診断法は、DNA の制限断片長多型 (RFLP) あるいはその他のポリモルフィズム (多型性) により解析するため、母親がヘテロ接合体でかつ異常 allele が判明している遺伝子

マーカが必要であるものの、より実用的で保因者診断のみならず出生前診断にも応用可能となっている。これらは、以下に述べるようにサンプロティング法、PCR 法、DGGE 法など、様々な遺伝子工学的手法の開発とその臨床への応用により格段の進歩を遂げてきた。

1) 異常遺伝子の直接診断法

血友病A、Bともに比較的大きな遺伝子異常

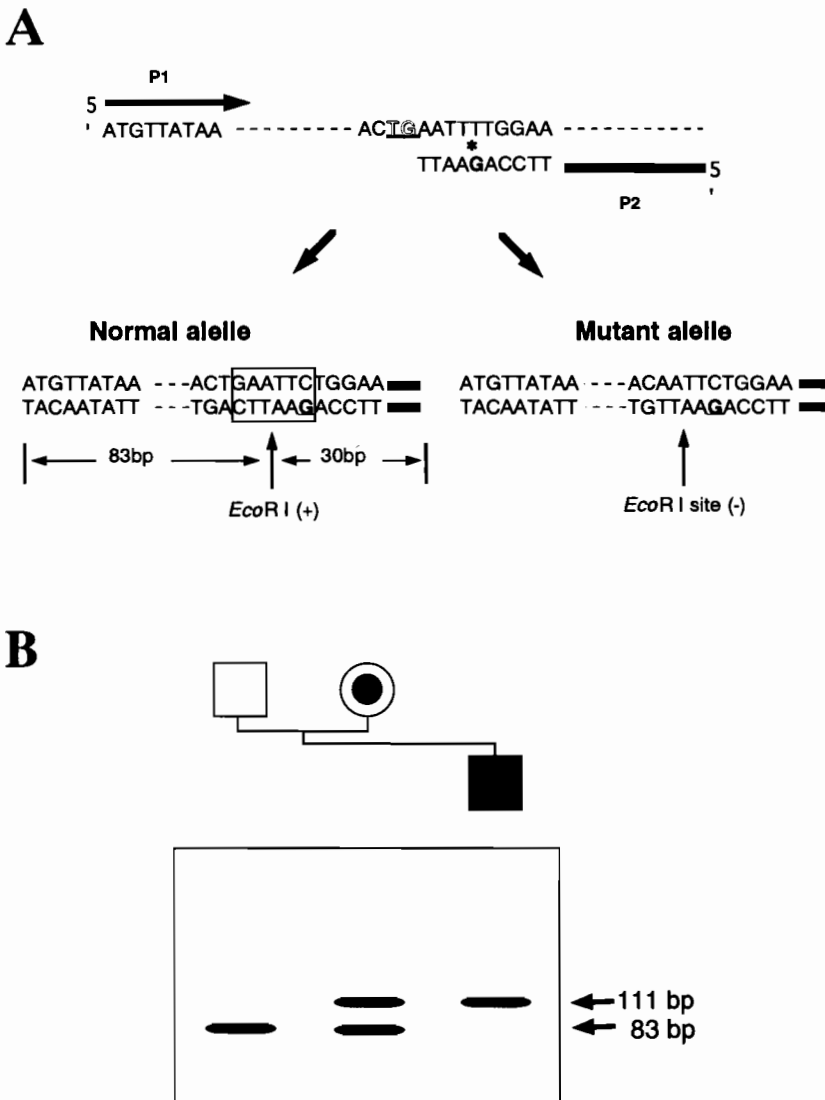


図 6. Mutagenic primer を用いた血友病Bの直接的遺伝子診断 (PCR 法) その原理 (A) と実際 (B): ■ = 血友病B患者, ● = 保因者

例(そのほとんどは欠損例)がサザンブロッティング法を用いた遺伝子解析により報告されている。また、点突然変異例の同定も数多く報告されているが、血友病Aでは第VIII因子遺伝子が巨大であるため当初は *TaqI* サイト(TCGA)の消失あるいは新たな出現により発見されたものが多い。これに対し、第IX因子遺伝子は第VIII因子遺伝子に比べ小さく比較的早期に単離されたため血友病Bではすでに1,000例を超えており、血友病が極めて多様性に富む遺伝子異常による疾患であることが判明している。

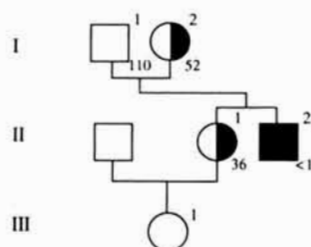
このように血友病遺伝子異常が判明している家系では、この遺伝子異常をマーカーにして直接家系内診断が可能である。しかし、上述のごとく血友病は極めて多様性に富む遺伝子異常による疾患であり、直接診断法が応用できる場合はむしろ稀である。血友病の遺伝子異常が判明しておりこの異常部位を認識する制限酵素がある場合は、これによる fragment のサイズを比較し家系内診断が可能である。有用な制限酵素部位のない場合でも、強制的に制限酵素部位を導入するように一部塩基配列を変えた primer (mutagenic primer) を用いて PCR を行ない、同様に家系内診断が可能である。

図6に、当教室の松下らが報告した血友病Bの遺伝子異常(2塩基(TG)欠損)での実用例を紹介する[29]。2塩基欠損部を含む113bpを増幅するPCR primer (P1, P2)のうち3'側の antisense primer (P2)の*印の塩基をAからGに置換しておけば、正常遺伝子由来のPCR産物に *EcoRI* を導入することができる。したがって、*EcoRI* 処理された正常遺伝子由来PCR産物は83bp、一方 *EcoRI* 処理されても異常遺伝子由来PCR産物は切断されないため2塩基短い111bpのバンドとして認識される。本家系では、父親は正常遺伝子(83bpバンド)を、母親は正常遺伝子と異常遺伝子(111bpバンド)を持ち、患者の異常遺伝子が母親由来であることが診断できた。

前述の如く、重症血友病A患者の約40%にお

いてX染色体長腕中の第VIII因子遺伝子の一部を含んだ領域で約500kbにおよぶ逆位が起こっていることが報告されている。我々が non-RI サザンブロッティング法を用いた第VIII因子遺伝子の逆位解析を行なった結果、日本人重症血友病A患者33名のうち12名(36.4%)に逆位を検出した[27]。そして、第VIII因子遺伝子内に存在する *BclI*, *HindIII*, *XbaI* RFLP による遺伝子保因者診断が不能であった家系において、この逆位解析を用いることにより保因者診断および出生前診断を行なうことができた一家系を経験した(図7)。II-1は血友病Aである弟(II-2)と同様、一方のX染色体に逆位(遠位型)を持つことが判明し、その母親(I-2)も正常と逆位を生じた異常X染色体のヘテロ接合体であった。したがって、両者はともに血友病Aの保因者であることが遺伝子レベルで確認できた。さらに、informed consent のもとに保因者であるII-1の妊娠11週時胎盤絨毛から調整し

A



B

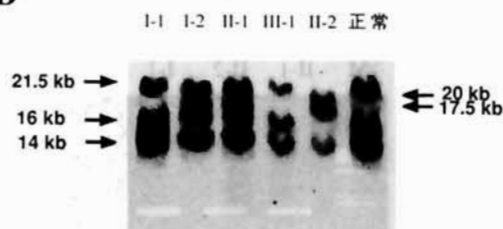


図7. 血友病Aにおける逆位解析による直接遺伝子診断(サザン法)

その家系図(A)とアガロースゲル電気泳動検査結果(B): ■=血友病A患者, □=保因者, 右下数字は第VIII因子活性値

たゲノム DNA 試料での Y 染色体検索の結果は陰性、すなわち逆位解析では正常パターンのみを示し胎児(III-1)は女兒で逆位異常 X 染色体を受け継いでいないことが判明した。

2) 血友病の間接遺伝子診断法

血友病 A の遺伝子診断に有用な RFLP は、少なくとも第 VIII 因子遺伝子内およびその極近傍に 7 ケ所 (*BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BstXI*, *MspI*, *BglI*, *MspI*)、遺伝子外で 2 ケ所 (*TaqI*/St 14, *BglII*/DX 13) のものがよく知られている (図 1)。当教室での血友病 A 24 家系における検討では、これらの RFLP は欧米人と同様に日本人にも使用でき、*BclI* + *XbaI* で 79%、*BclI* + *XbaI* + *TaqI*/St 14 の組み合わせでは 100% に保因者の診断をすることができた [30]。さらに、PCR 法の導入により迅速かつラジオアイソトープを用いず診断することもできるようになっている。図 8 に、*HindIII* による診断例を示すが、*HindIII* RFLP は *BclI* RFLP と強い連鎖性を示すものである。保因者診断を希望してきた女性(II-1)は 239 bp バンドと 159 bp + 80 bp バンドを示す X 染色体のヘテロ接合体であることが明らかとなったが、父親から 239 bp

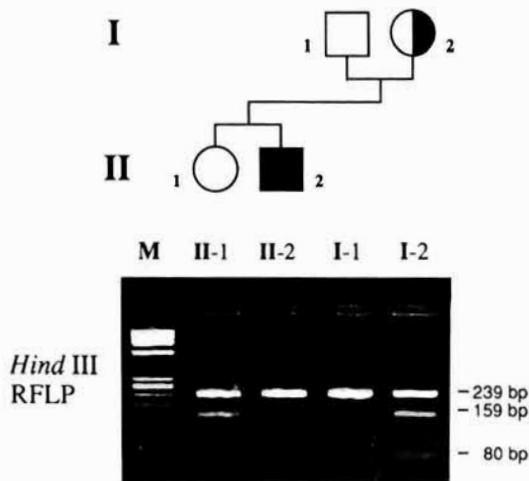


図 8. *HindIII* RFLP を用いた血友病 A の間接的遺伝子診断 (PCR 法)

その家系図とアガロースゲル電気泳動検査結果: ■ = 血友病 A 患者, □ = 保因者

バンドを示す X 染色体を、母親から 159 bp + 80 bp バンドを示す X 染色体をそれぞれ受け継いでいることが分かる。一方、患者である弟(II-2)が 239 bp バンドを示す X 染色体を持つことから、母親由来の 159 bp + 80 bp バンドは正常 X 染色体遺伝子由来であることが明らかで、この女性が保因者でないことが診断できた [31]。

第 IX 因子遺伝子内にも 4 ケ所の RFLP 部位 (*DdeI*, *XmnI*, *TaqI*, *MspI*) がよく知られており、これらを用いての欧米白人における保因者診断有効率は 60~80% と報告されている (図 3)。しかし、これらの RFLP は日本人にほとんど存在せず [32]、日本人家系の保因者診断に有用なポリモルフィズム部位の発見が必要であった。第 IX 因子遺伝子外の DXS 99 RFLP が第 IX 因子遺伝子と強い遺伝的リンケージを示すことが報告されたが、当教室において日本人を対象に

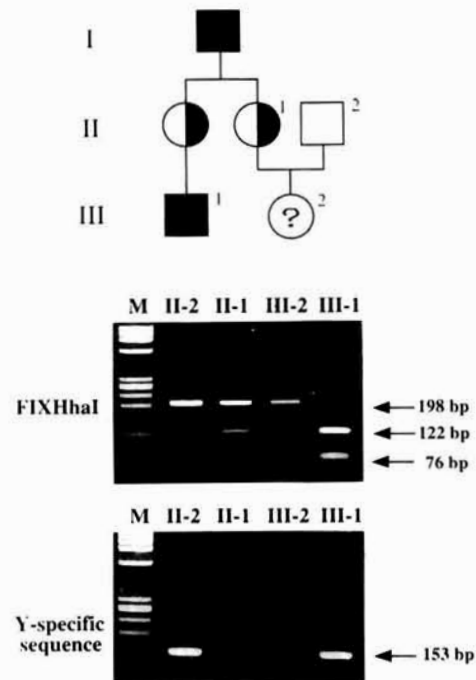


図 9. *HhaI* RFLP 解析による血友病 B の間接的遺伝子診断 (PCR 法)

その家系図とアガロースゲル電気泳動検査結果: ■ = 血友病 A 患者, □ = 保因者

検討したところ欧米人と同様(48%)に RFLP が検出され, 実際の診断可能率は63%と高率であった[33]. また, 我々は新たに3カ所の第IX因子遺伝子内もしくはごく近傍に存在するDNA ポリモルフィズム(FIX-793, FIX 192, FIXHhaI)が日本人に比較的高頻度に認められることを発見した[34]. 図9にFIXHhaI ポリモルフィズム解析を用いた血友病Bの出生前診断例を示す. 胎児(III-2)は, Y染色体検出PCRでは陰性で女兒と判明した. また, FIXHhaI ポリモルフィズム解析においては患者である母方従兄弟(III-1)のもつ血友病B責任遺伝子 allele の122+76bpのバンドをもっておらず, 胎児は血友病Bの保因者でないと診断された. なお, 本児は出生後測定した第IX因子活性および抗原量は共に70%であり正常女兒と診断されている. また, FIX-793, FIX 192に関しては母親(II-1)がホモ接合体であり診断不能であった[35].

おわりに

先天性の血液凝固異常疾患のなかでも, 血友病は出血症状が重篤でかつ頻度も高いことから臨床の場において血友病保因者診断が重要な課題となっている. 血友病では, 従来より凝血学的な因子活性量や抗原量測定が診断の手段に使われていたが, その精度にはやや問題があった. そして, 最近のめざましい分子生物学的手法の進歩とその応用により, これらの診断も, より正確な遺伝子レベルで行われるようになってきている. こうした遺伝子診断技術の進歩は, 従来の診断法の欠点を補う意味で重要で, より正確な診断が可能となることが大いに期待される.

文 献

- 1) 藤巻道男, 池松正次郎: 16凝固・線溶系. —VI 出血性素因. —6 凝固因子異常. 血液学(日比野進・監修), 丸善, 東京, 1985, p.1583.
- 2) Gitscier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., et al.: Characterization of tyhe human factor VIII gene. *Nature*. **312**: 326, 1984.
- 3) Wion, K. L., Kelly, D., Summerfield, J. A., et al.: Distribution of factor VIII mRNA and antigens in human liver and other tissues. *Nature*. **317**: 726, 1985.
- 4) 小嶋哲人: 先天性凝固因子異常症の遺伝子診断. 臨床医のための実験医学シリーズ13遺伝子診断(平井久丸・編), 羊土社, 東京, 1993, p. 24.
- 5) Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., et al.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312**: 342, 1984.
- 6) Kaufman, R. J., Wasley, L. C., Dorner, A. J.: Synthesis processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 6352, 1988.
- 7) Lyete, A., van Schijndel, H. B., Njehrs, C., et al.: Sulfation of Try 1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **266**: 740, 1991.
- 8) Kurachi, K., Davie, E. W.: Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 6461, 1982.
- 9) Jaye, M., de la Sale, H., Schamber, F., et al.: Isolation of a human anti-hemophilic factor IX cDNA clone using a unique 52-base synthetic oligonucleotide probe deduced from the amino acid sequence of bovine factor IX. *Nucl. Acids Res.* **1**: 2325, 1983.
- 10) Yoshitake, S., Schach, B. G., Foster, D. C., et al.: Nucleotide sequence of the gene for human factor IX. *Biochemistry*, **24**: 3736, 1985.
- 11) Tuddenham, E. G. D., Cooper, D. N., Gitschier, J., et al.: Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucl. Acid Res.* **19**: 4621, 1991.
- 12) Pattinson, J., Millar, D. S., McVey, J. H., et al.: The molecular genetic analysis of hemophilia A: directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. *Blood* **76**: 2242, 1990.
- 13) Schwaab, R., Oldenburg, J., Tuddenham, E. G. D., et al.: Mutations in haemophilia A. *Brit. J. Haematol.* **83**: 450, 1993.
- 14) Inaba, H., Fujimaki, M., Kazazian, H. H., et al.: Mild hemophilia A resulting from arg-to-leu substitution in exon 26 of the factor VIII gene. *Hum. Genet.* **81**: 335, 1989.
- 15) Tanimoto, M., Kojima, T., Kamiya, T., et al.: DNA analysis of seven patients with hemophilia B who have anti-factor IX antibodies: relationship to clinical manifestations and evidence that the abnormal gene was inherited. *J. Lab. Clin. Med.* **112**: 307, 1988.
- 16) O'Brien, D. P., Tuddenham E. G. D.: Purification and characterization of factor VIII 1,689-Cys: a

- non functional cofactor occurring in a patient with severe hemophilia A. *Blood* **73**:2117, 1989.
- 17) Arai, M., Inaba, H., Higuchi, M., et al.: Direct characterization of factor VIII in plasma: Detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372->histidine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4277, 1989.
 - 18) O'Brien, D. P., Pattinson, J. K., Tuddenham E. G. D.: Purification and characterization of factor VIII 372-Cys: A hypofunctional cofactor from a patient with moderately severe hemophilia A. *Blood* **75**:1664, 1990.
 - 19) Arai, M., Higuchi, M., Antonarakis, S. E., et al.: Characterization of a thrombin cleavage site mutation (Arg1, 689 to Cys) in the factor VIII gene of two unrelated patients with cross-reacting material-positive hemophilia A. *Blood* **75**:2117, 1990.
 - 20) Cooper, D. N. and Youssoufian, H.: The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet.* **78**:151, 1988.
 - 21) Cooper, D. N. and Krawczak, M.: Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomics. *Hum. Genet.* **83**:181, 1989.
 - 22) Higuchi, M., Antonarakis, S. E., Kasch, L., et al.: Molecular characterization of mild-to moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8307, 1991.
 - 23) Higuchi, M., Kazazian, H. H., Kasch, L., et al.: Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7405, 1991.
 - 24) Naylor, J. A., Green, P. M., Rizza, C. R., et al.: Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum. Mol. Genet.* **2**:11, 1993.
 - 25) Lakich, D., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., et al.: Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature genet.* **5**:236, 1993.
 - 26) Naylor, J. A., Brink, A., Hassock, S., et al.: Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet.* **2**:1773, 1993.
 - 27) 岡本能弘, 小嶋哲人, 勝見 章, ほか: 第VIII因子遺伝子逆位解析の重症血友病Aにおける保因者診断, 出生前診断への応用 *臨床血液* **36**(11):1252-1256, 1995.
 - 28) Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S., et al.: Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions, 7th edition. *Nucl. Acid Res.* **25**:133, 1997.
 - 29) 松下 正, 齋藤英彦: 血友病のDNA診断, *血液・腫瘍科* **22**:129, 1991.
 - 30) Suehiro, K., Tanimoto, M., Hamaguchi, M., et al.: Carrier detection in Japanese hemophilia A by use of three intragenic and two extragenic factor VIII DNA probes: a study of 24 kindreds. *J. Lab. Clin. Med.*, **112**:314, 1988.
 - 31) 小嶋哲人: 血友病「遺伝子診断実践ガイド」中井利昭ほか編 p.267, 中外医学社, 1995.
 - 32) Kojima, T., Tanimoto, M., Kamiya, T., et al.: Possible absence of common polymorphisms in coagulation factor IX gene in Japanese subjects. *Blood*, **69**:349, 1987.
 - 33) Tanimoto, M., Kojima, T., Kamiya, T., et al.: DNA analysis of seven patients with hemophilia B who have anti-factor IX antibodies: relationship to clinical manifestations and evidence that the abnormal gene was inherited. *J. Lab. Clin. Med.*, **112**:307, 1988.
 - 34) Toyozumi, H., Kojima, T., Matsushita, T., et al.: Diagnosis of Hemophilia B Carriers Using Two Novel Dinucleotide Polymorphisms and Hha I RFLP of the Factor IX Gene in Japanese Subjects. *Thromb. Haemost.* **74**(4):1009, 1995.
 - 35) 小嶋哲人, 勝見 章, 山崎鶴夫, ほか: 日本人血友病BのDNAポリモルフィズムを用いた保因者ならびに出生前遺伝子診断 *日本血栓止血学会誌* **7**(1):29, 1996.