

sidase in cultured Gaucher's disease fibroblasts by immunocytochemistry. J Neurol 234: 44~51, 1987.

司会 ただ今、Gaucher 病の多様性というか、その診断についてお話し頂いたのですが、何か御質問ございますでしょうか。

木南 そうすると、あの Oligonucleotide の上部の中にもう一つ mutation があるということなんですか。

辻 正常の塩基配列を持った Oligonucleotide を用いると、患者ゲノム DNA にきちんとハイブリダイズしますので、19mer の Oligonucleotide の塩基配列については正常の塩基配列を持っているだろうと思います。

木南 もう一つはどこにあるのですか。

辻 それはわからないのです。クローニングを今やっているとところなのですが、少なくとも19個のまん中の方にはないだろうと思います。

司会 お話のⅡ型とⅢ型で遺伝型は似ているのですが、表現型はかなり違うというところには何かあるのでしょうか。

辻 非常におもしろい点なのですが、この変異は unstable な蛋白を作ることがわかっていまして、pulse-chase をやってみますと、pulse 直後というのはⅡ型もⅢ型もちゃんと precursor が作られるのですが、chase の課程でどちらも同じように早く消えていくのです。だから genotype だけでなく、蛋白レベルで見ても、Ⅱ型とⅢ型は非常に似ている所があって、unstable な蛋白が作られる結果、蛋白が減ってしまうということです。臨床症状は異なっているのに、生化学的に見ると両者はなかなか区別できないのです。興味深い点ですが、どうしてそうなるのかはわかりません。

司会 どうもありがとうございました。次に第5席の血友病の DNA 診断ということで、小出先生お願い致します。

5) 血友病の DNA 診断

新潟大学医学部生化学第二教室 小出 武比古

DNA Diagnosis of Hemophilias

Takehiko KOIDE

Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine

Hemophilias A and B are the most common hereditary hemorrhagic disorders that are caused by a deficiency or dysfunction of coagulation factors VIII and IX, respectively. Recently, both the factor VIII and the factor IX genes have been cloned and well characterized, and three and five intragenic RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) of the factor VIII and the factor IX genes, respectively, have been identified. These RFLPs can be successfully used for prenatal diagnosis and carrier detection of hemophilia A. DNA diagnosis of hemophilia B in Japanese, however, is not successful due to the absence of common polymorphisms thus far identified in Caucasians.

Key words: RFLP, DNA diagnosis, prenatal diagnosis, carrier detection, hemophilias. 多型性, DNA 診断, 胎児診断, 保因者診断, 血友病.

Reprint requests to: Takehiko KOIDE, Ph. D.
Department of Biochemistry,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-Dori, Niigata 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通り1番町
新潟大学医学部生化学第2教室
小出 武比古

ヒトのゲノム DNA は、約30億bp (base pairs, 塩基対) の大きさであるが、その塩基配列は個々人の間で全く同じであるわけではなく、100～数100bp に1個の割合で異なっている。これは DNA 塩基配列の多型性 (polymorphism) と呼ばれ、そのほとんどは疾病 (遺伝病) とは直接関係のないものであるが、この変異部位がまれにある制限酵素の認識部位となることがある。このような多型性は、ゲノム DNA をその制御酵素で消化した時に得られる DNA 断片の長さの違いとして検出することができ、RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) と呼ばれている。多型性は同一家系内において遺伝することから、最近幾つかの遺伝性疾患について、遺伝子内または遺伝子に連鎖 (link) した RFLP を利用して家系内の胎児診断 (prenatal diagnosis) や保因者診断 (carrier detection) が行われるようになり、『DNA 診断』(または『遺伝子診断』) と呼ばれているが、ここでは、血友病の DNA 診断について述べる。なお、本法は、あくまで患者家系内における遺伝の診断方法であって、血友病の原因となる異常遺伝子の変異部位の同定 (病因解析) とは異なるものである。

血友病とその遺伝

遺伝性の出血性疾患で最も一般的なものは血友病で、古典的血友病とも呼ばれる血友病Aと血友病Bがある。血友病AはⅧ因子遺伝子の異常 (または欠失) に因る疾患で、男性出生数1万人に1人の割合で出現し、全血友病の70～80%を占める。一方、血友病BはⅨ因子遺伝子の異常 (または欠失) に因る疾患で、その出現頻度は男性出生数3～5万人に1人の割合で、血友病Aの場合の1/5ほどである。両遺伝子は共にX染色体上 (それぞれXq28 および Xq27.3) に局在するため、血友病A、B共に伴性劣性遺伝の形式をとり、通常、女性が保因者となり、男性のみが発症する。

RFLP と DNA 診断

DNA 診断は問題となる遺伝子内またはその遺伝子と密接に連鎖する領域の RFLP とその遺伝形式に基づいて行われるものであり、従来よりの方法と比べてその信頼性は極めて高い方法であるが、RFLP を利用した血友病の DNA 診断の場合には、① 家系内の血友病患者の RFLP が分かっていること、② 診断対象者の母親の検出 RFLP がヘテロ型であることが必要条件となる。

RFLP の検出は遺伝子内 DNA 断片 (intragenic marker) をプローブとして用いる以外に、近傍の遺伝子

座の DNA マーカー (extragenic marker) を用いても行えるが、この場合の DNA 診断には常に recombination (または crossing-over, 交差) による誤診率があることを考慮しなければならない。たとえば、血友病Aの場合、X染色体 DNA マーカーの St14 (DXS52) や DX13 (DXS15) が有用であるが、これらのプローブ領域とⅧ因子遺伝子座 (F8C) との距離は、St14 が <4.5cm (centimorgan) で DX13 が 5.5cm である。1cm とは recombination 率が1%の長さのことで、約100万bp 離れた距離である。したがって、両 DNA マーカーを用いた場合には数%の誤診率が予測される。ここでは、遺伝子内プローブを用いた診断について述べる。

RFLP 検出法

DNA 診断における RFLP 検出のプロトコールを以下に略記した。

- 1) 被験者末梢血 (10～20ml) または絨毛膜よりのゲノム DNA の調製。
- 2) 制限酵素消化による断片化
- 3) アガロースゲル電気泳動による分離
- 4) DNA 断片のナイロンメンブラン (またはニトロセルロースフィルター) へのトランスファー (サザンブロット)
- 5) ^{32}P -標識プローブとのハイブリダイゼーション
- 6) オートラジオグラフィーによる DNA バンドの検出 (RFLP の検出)

血友病 A の DNA 診断

抗血友病因子であるⅧ因子の染色体遺伝子は、約186,000bp とこれまでに単離された遺伝子では最大の大きさで、26個のエクソン (成熟 mRNA となる領域) と25個のイントロン (転写後の mRNA のプロセッシングにおいて切り出されてしまう領域、介在配列ともいう) からなる¹⁾。

Ⅷ因子遺伝子内の RFLP は、これまでに、イントロン18内 (Bcl I で検出)²⁾³⁾、イントロン22内 (Xba I と Kpn I の併用で検出)⁴⁾、エクソン26の3'末端より下流部位 (Bgl I で検出)⁵⁾の3か所が同定されている。これらの RFLP を利用した診断法と日本人における診断率を表1に示した。診断率で注目すべきことは、Bcl I と Xba I の両 RFLP 検出法を併用した場合の診断率は79%で、同じく Bcl I と Bgl I または Xba I と Bgl I を併用した場合の診断率が、それぞれ77%と75%である。

表 1 VIII因子遺伝子内 RFLP による血友病Aの家系内診断と日本人における診断率

制限酵素	検出される DNA 断片の大きさ(kb)*	プ ロ ー プ	文 献	日本人における 出現比率(%)と診断率(%) ⁶⁾	
Bcl I	(-) 1.2	647 bp-StuI /ScaI 遺伝子断片 (exon 17-18 領域)	2, 3	33	46
	(+) 0.9			67	
Xba I (+Kpn I)	(-) 6.2	1.6 kb-Bst XI遺伝子断片 (intron 22 内)	4	48	58
	(+) 1.4			52	
Bgl I	(-) 20	1.8 kb-Eco RI cDNA 断片 (exon 26 の 3' 下流域)	5	8	13
	(+) 5			92	

* 制限酵素認識部位の存在する場合 (+) と存在しない場合 (-) を示す。

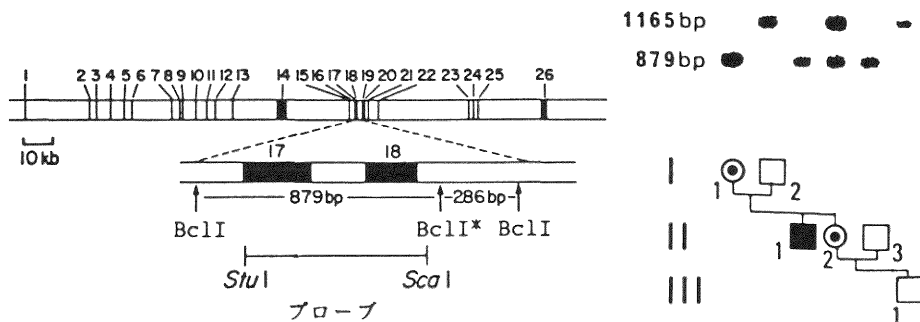


図 1 VIII因子遺伝子内 Bcl I 多型部位 (Bcl I*) とその RFLP を利用した家系内診断例^{2, 3)}

■ 血友病 A 患者, □ 正常者, ● 保因者 (キャリア)

り, いずれの場合も単独の場合よりも診断率が良くなっていることである⁶⁾。

血友病A家系内の保因者診断および出生前診断の具体例³⁾を図 1 に示した。図 1 左にはVIII因子遺伝子全体の模式図とエクソン17と18近傍の拡大図を示した。エクソン17と18の近傍に Bcl I 認識部位が3か所あり, 中間の Bcl I* が多型性を示す部位である。各被験者ゲノム DNA を Bcl I で消化し, アガロースゲル電気泳動後, 図中に示した領域の Stu I/Sca I 遺伝子断片 (647bp) をプローブとして用いると, Bcl I* 部位が切断される場合は, 879bp 断片が検出され, 切断されない場合には, 1165bp が検出される。図 1 の右上にオートラジオグラフィーの結果を示し, 各 DNA バンドと対応させて右下に家系図を示したが, 診断の対象者は, 血友病患者 (II₁) の妹 (II₂) と彼女が妊娠中の胎児 (III₁) である。家系図では, II₂ の母 (I₁) が保因者であり, 兄 (II₁) が血友病であることから, II₂ が保因者である可能性は

50%あるが, 図 1 の右上に示した RFLP から母 (I₁) のX染色体 (対立遺伝子を仮に X₁X₂ とする) が 879bp 断片に関してホモ型であるため, II₂ の 876bp 断片が母の血友病遺伝子 (X₁) を受け継いだものか, あるいは正常遺伝子 (X₂) を受け継いだものかの判断はできない (最終的には, X染色体の DNA マーカーである DX13 (Xq28 に局在) をプローブ (VIII因子遺伝子連鎖プローブ) とした別の RFLP 検出法によって II₂ が保因者であると結論された)。一方, 胎児 (III₁, karyotype から男児と判定) の出生前診断については, RFLP において 1165bp 断片が検出されていることから, この胎児は正常の祖父 (I₂) 由来のX染色体を母 (II₂) から受け継いでいることから, 胎児に血友病の危険性はないと診断された。

血友病 B の DNA 診断

IX因子の染色体遺伝子は, 約38,000bp の大きさで,

表2 IX因子遺伝子内 RFLP による血友病Bの家系内診断

RFLP 部位	制限酵素	検出される DNA 断片の大きさ (kb)*	出現比率 (%)	文 献
5' 上流配列内	Bam HI	(-) 25.0	6	8
		(+) 23.0	94	
イントロンA内	Hinf I	(+50)**0.70	76	9
	または	(-50)**0.65	24	
	Dde I	(+50)**1.74	76	
		(-50)**1.69	24	
イントロンC内	Xmn I	(-) 11.5	70	9
		(+) 6.5	30	
イントロンD内	Taq I	(-) 1.8	71	10
		(+) 1.4	29	
イントロンD内	Msp I	(-) 5.8	80	11
		(+) 2.4	20	

* 制限酵素認識部位の存在する場合 (+) と存在しない場合 (-) を示す。

** 50 bp 挿入配列の有る場合 (+50) と無い場合 (-50) を示す。

8個のエクソンと7個のイントロンからなり、その全塩基配列が決定されている⁷⁾。IX因子遺伝子内 RFLP は、5' 上流配列内 (Bam HI で検出)⁸⁾、イントロンB内 (Hinf I または Dde I で検出)⁹⁾、イントロンC (Xmn I で検出)⁹⁾およびイントロンD内に2か所 (一方は Taq I で検出、他方は Msp I で検出)¹⁰⁾¹¹⁾の5か所が同定されている。これらの RFLP を利用した血友病Bの家系内診断有効率は、白色人種では、60~80%と高い。しかし、日本人では、これらの RFLP はまったく検出されず、これまでのところ、診断有効率は0である¹²⁾。

参 考 文 献

- 1) Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J. and Lawn, R.M.: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312: 326~330, 1984.
- 2) Gitschier, J., Drayna, D., Tuddenham, E.G.D., White, R.L. and Lawn, R.M.: Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene. *Nature*, 314: 738~740, 1985.
- 3) Gitschier, J., Lawn, R.M., Rotblat, F., Goldman, E. and Tuddenham, E.G.D.: Antenatal diagnosis and carrier detection of haemophilia A using factor VIII gene probe. *Lancet*, i: 1093~1094, 1985.
- 4) Wion, K.L., Tuddenham, E.G.D. and Lawn, R.M.: A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. *Nucleic Acids Res.*, 14: 4535~4542, 1986.
- 5) Antonarakis, S.E., Waber, P.G., Kittur, S.D., Patel, A.S., Kazazian, H.H. Jr., Mellis, M.A., Counts, R.B., Stamatoyannopoulos, G., Bowie, E.J.W., Fass, D.N., Pittman, D.D., Wozney, J.M. and Toole, J.J.: Hemophilia A. Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N. Engl. J. Med.*, 313: 842~848, 1985.
- 6) Suehiro, K., Tanimoto, M., Hamaguchi, M., Kojima, T., Takamatsu, J., Ogata, K., Kamiya, T. and Saito, H.: 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**: 314~318, 1988.
- 7) Yoshitake, S., Schach, B.G., Foster, D.C., Davie, E.W. and Kurachi, K.: Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (Antihemophilic factor B). *Biochemistry*, **24**: 3736~3750, 1985.
 - 8) Hay, C.W., Robertson, K.A., Yong, S.-L., Thompson, A.R., Growe, G.H. and MacGillivray, R.T.A.: Use of a BamHI polymorphism in the factor IX gene for the determination of hemophilia B carrier status. *Blood*, **65**: 1508~1511, 1986.
 - 9) Winship, P.R., Anson, D.S., Rizza, C.R. and Brownlee, G.G.: Carrier detection in hemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphisms. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 8861~8872, 1984.
 - 10) Camerino, G., Grzeschik, K.H., Jaye, M., De La Salle, H., Tolstoshev, P., Lecocq, J.P., Heilig, R. and Mandel, J.L.: Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 498~502, 1984.
 - 11) Camerino, G., Oberle, I., Drayna, D. and Mandel, J.L.: A new Msp I restriction fragment length polymorphism in the hemophilia B locus. *Hum. Genet.*, **71**: 79~81, 1985.
 - 12) Kojima, T., Tanimoto, M., Kamiya, T., Obata, Y., Takahashi, T., Ohno, R., Kurachi, K. and Saito, H.: Possible absence of

common polymorphisms in coagulation factor IX gene in Japanese subjects. *Blood*, **69**: 349~352, 1987.

司会 DNA 解析というテクニックを使うことによって、診断だけでなく保因者の診断、あるいは出生前診断が可能であるという発表でしたが、どなたか御質問ございますか。

本山 出生前診断、胎児の診断の場合には、どの時期にどういう方法で行なわれているのでしょうか。

小出 具体的なことはわかりませんが、文献的には絨毛膜を biopsy しているそうで、早期診断で約9週位で既に可能であるということです。ですから、他の conventional な方法ではできない時期に既に診断が可能であるということは一つの大きな特徴であると思います。

司会 診断の確率を見ますと、100%かと思っていたのですが、意外と血友病Bなどでは60%位ということでちょっとがっかりしたのですが、この点はいかがですか。

小出 RFLP (制限酵素による多型性) の頻度が50:50というのが理想的なのですが、実際にそのような比で現れるものがほとんどないのです。例えば、Bam I の RFLP がIX因子の第1エクソンよりも少し上流に知られているのですが、これは実は6%位しかないのです。これではほとんど一般的に診断には使えないということになりますが、実際には、今紹介しました Taq I とか Xmn I とか、より頻度の高いもので診断できなかった haemophilia B の患者の家系が、BamHI の polymorphism で診断できたということがあります。しかし、一般的にはやはりその頻度の問題だと思います。

司会 ありがとうございました。続いて第6席、CMLにおける bcr rearrangement の意義ということで古川先生お願い致します。