

日本人血友病Aにおける 第VIII因子遺伝子異常に関する研究

(分担研究課題：効果的な小児慢性特定疾患治療研究事業の推進に関する研究)

吉 岡 章*

要旨：第VIII因子(FVIII)遺伝子は全長186kbで、26個のexonと25個のintronから構成されている。そのmRNAは9kbで、2,351個のアミノ酸をコードしている。これらの異常は血友病Aをもたらす。FVIII遺伝子の解析として、まず、正常日本人女性におけるFVIII遺伝子内の5種類のRFLPとそのヘテロ接合体出現率を検索した。次いで、血友病患者の母親で保因者と診断された30名の上記RFLPを検索し、やはりBcl IとXba Iの組合せが63.3%と高率であった。次に、日本人集団におけるFVIII遺伝子イントロン13内のCA repeat(VNTR)を解析し、女性40名中19名(47.5%)がヘテロ接合体を示した。以上より、Bcl I RFLPとXba I RFLPの組合せとイントロン13内VNTRは血友病A保因者診断及び出生前診断に有用と考えられた。

さらに、血友病A患者51例のgenomic DNAをPCRで増幅後SSCP法でスクリーニングの後、異常バンドを示すDNAの塩基配列解析を行った。現在までのところ、欠失2例、挿入0例、逆位18例、点変異13例、不明18例であった。

見出し語：血友病A、第VIII因子、第VIII因子遺伝子、RFLP、VNTR、SSCP

目的・背景：わが国における血友病の出生頻度は、1991年のわれわれの調査によると男児出生10万人中14人で、小児慢性特定疾患のうち先天性血液疾患の中では最多である。血友病はX連鎖劣性遺伝性疾患で、第VIII因子(FVIII)の異常に基づく血友病Aと第IX因子(FIX)の異常に基づく血友病Bとがあり、その比率はおよそ5:1である。この他同様の出血症状を反復する先天性凝固障害症が存在し、これらの鑑別診断と重症度判定は本疾患群の治療研究事業の推進

にとって不可欠の要素である。診断には、従来より、家系調査と凝血学的検査により行われてきたが、近年の遺伝子解析法の進歩に伴い、本症でも大きな進展がみられている。これらFVIII及びFIXの遺伝子レベルでの解析は本症の病因・病態の解明に重要であるのみならず、血友病の遺伝相談、保因者診断および出生前診断に極めて有用な情報を提供する。また、FVIIIまたはFIX補充療法に伴うインヒビターの発生機序の解明にも貢献するものである。本研究報告は、まず、1.FVIII遺伝子内の5種類のrestriction fragment length polymorphism(RFLP)解析と2.

* 奈良県立医科大学小児科

FVIII遺伝子イントロン13内のCAのvariable number of tandem repeat(VNTR)解析とを述べ、次いで、3.血友病A患者のFVIII遺伝子の解析について述べる。

FVIII遺伝子は全長186Kbで、26個のexonと介在する25個のintronから構成されている。そのmRNAは約9kbで、2,351個のアミノ酸をコードしている。血中ではN末の19個のアミノ酸(シグナルペプチド)が切断された成熟FVIII(2,332個のアミノ酸)として存在する。FVIII遺伝子にはその表現型に変化を及ぼさない種々の変異のあることが知られている。それには特定の制限酵素による遺伝子断片長多型(RFLP)やある一定の塩基配列を一単位とする反復配列(VNTR)がある。これらは患者の異常遺伝子を直接同定することなしに、相同染色体上にある遺伝子座を区別し、病的遺伝子を持つ遺伝子座が同一家系内でどのように受け継がれているかを分析することが可能である。したがって、血友病Aの保因診断や出生前診断に極めて有用である。

1. FVIII遺伝子RFLP解析

欧米で既に報告されているFVIII遺伝子内にある5種類の制限酵素によるRFLPについて、日本人正常者と血友病A家系内女性について検索した。

1) 対象と方法：

① 正常日本人35名(男性5名、女性30名)の末梢白血球からgenomic DNAを抽出した。一方、1保因者と診断された血友病A患者の母30名についても同様にDNAを得た。

② プローブ：F8A(exon 17~18)、Intron 22-fragment B(intron 22)およびFVIII cDNA-fragment B(exon 14~26)、FVIII cDNA-fragment C

(exon26)を用いた。

③ 制限酵素：Bcl I、Kpn I、Xba I、Bgl I、Hind III、Msp Iを用いた。それぞれの多型部位と用いたプローブ及び断片サイズはTable 1に示した。

Table 1. Factor VIII intragenic RFLPs

Enzyme	Position	Probe	Size(kb)
BclI	Intron 18	F8A	1.2/0.8
HindIII	Intron 19	F. VIIIcDNA fr. B	2.7/2.6
XbaI+KpnI	Intron 22	Intron 22 fr. B	6.2/1.4
BglI	Intron 25	F. VIIIcDNA fr. C	20/5
MspI	3'flanking region	F. VIIIcDNA fr. C	7.5/4.3

④ Southern blot：常法に従った

2) 成績と考察

正常女性におけるFVIII遺伝子内の5種類のRFLPとそのヘテロ接合体頻度について検索し、以下の成績を得た(Table 2)。

① Bcl Iポリモルフィズムでは、F8Aをプローブとして用いて0.8kbと1.2kbの断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ86.2%と13.8%で、ヘテロ接合体頻度は26.7%であった。

② Hind IIIポリモルフィズムでは、Factor VIII cDNA-fragment Bをプローブとして用いて、2.6kbと2.7kbの断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ13.8%と86.2%で、ヘテロ接合体頻度は26.7%であった。

③ Xba Iポリモルフィズムでは、Intron 22-fragment Bをプローブとして用いて、1.4kbと6.2kbの断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ60%と40%で、ヘテロ接合体頻度は63.0%であった。

④ Bgl Iポリモルフィズムでは、Factor VIII cDNA-fragment Cをプローブとして用いて、5.0kbと20kbの断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ86.2%と13.8%で、ヘテロ接合体頻度は26.7%であった。

⑤ Msp Iポリモルフィズムでは、Factor VIII c DNA-fragment Cをプローブとして用いて、4.3kbと7.5kbの断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ13.8%と86.2%で、ヘテロ接合体頻度は26.7%であった。

⑥ Bcl I、Hind IIIとMsp Iポリモルフィズムは連鎖していた。

⑦ ヘテロ接合体検出率はBcl IとXba Iポリモルフィズムの組合せが一番効果的で、66.7%が検出し得た。

Table 2. Allele frequencies of intragenic factor VIII RFLPs in normal subjects

Probe	Enzyme	No. of X chromosome	Alleles (kb)	No.	Frequency	Heterozygosity (%)
F8A	Bcl I	65	0.8(B)	56	0.862	26.7
			1.2(B2)	9	0.138	
Intron 22	Fr.B Xba I	65	1.4(X1)	39	0.600	63.0
			6.2(X2)	26	0.400	
Factor VIII cDNA	Fr.C Bgl I	65	5.0(Bg1)	56	0.862	23.3
			20.0(Bg2)	9	0.138	
	Fr.B Hind III	65	2.6(H1)	9	0.138	26.7
			2.7(H2)	56	0.862	
	Fr.C Msp I	65	4.3(M1)	9	0.138	26.7
		7.5(M2)	56	0.862		

次に、血友病A保因者30例における5種類のFVIII遺伝子内RFLPについて検討した(Table 3)。ヘテロ接合体頻度はBcl I、Hind VIII、Xba I、Bgl I、Msp Iポリモルフィズムでそれぞれ23.3%、23.3%、60%、10%、23.3%であった。Bcl IとXba Iの組合せが最も効果的で63.3%においてヘテロ接合体を認めた。

Table 3 Allele frequencies of intragenic factor VIII RFLPs in 30 mothers of hemophilia A patients

Probe	Enzyme	No. of X chromosome	Alleles (kb)	No.	Frequency	Heterozygosity (%)
F8A	Bcl I	60	0.8(B1)	51	0.850	23.3
			1.2(B2)	9	0.150	
Intron22	Fr.B XbaI	60	1.4(X1)	40	0.667	60.0
			6.2(X2)	20	0.333	
Factor VIII cDNA	Fr.C BglI	60	5.0(Bg1)	55	0.917	10.0
			20.0(Bg2)	5	0.083	
	Fr.B HindIII	60	2.6(H1)	9	0.150	23.3
			2.7(H2)	51	0.850	
	Fr.C MspI	60	4.3(M1)	9	0.150	23.3
		7.5(M2)	51	0.850		

2. FVIII遺伝子内intron 13内のVNTR解析

Lallozら(1991)によってFVIII遺伝子intron

13内のCAの2塩基よりなるVNTRが報告された。欧米人正常女性におけるヘテロ接合体出現率は91%と高率であったので、日本人におけるこのVNTRを検索した。

1)対象と方法

① 正常日本人70名(男性30名、女性40名)の末梢血白血球からDNAを抽出した。

② intron 13CAのリピート領域をはさむプライマーを作製し、5'プライマーのみ、 γ -³²P-ATPでエンドラベルし、PCRにてゲノムDNAを増幅した。7M尿素-8%ポリアクリルアミドゲルを用いて、70W、2時間電気泳動後、オートラジオグラフィを行った。マーカの作製は、PCRフラグメントが2塩基ずつ異なるようにデザインされた計4対のプライマーを用い、鋳型は塩基配列解析によりCAリピートの判明したプラスミドを使用して同様にPCRを行った。

2)成績と考察

① 健常日本人70名(男性30名と女性40名)由来の計110個のX染色体のうち20リピートは59.1%、21リピートは23.7%、22リピートは3.6%、23リピートは11.8%及び25リピートは1.8%であった。

Table 4 Allele frequencies for intron 13 (CA)n repeat in 3 reports

(CA)n	Number of alleles		
	Morimoto (1995) ^{a)}	Lalloz et al (1991) ^{b)}	Wang et al (1993) ^{c)}
(CA)25	2 (1.8%)	0	0
(CA)24	0	2 (1.3%)	0
(CA)23	13 (11.8%)	8 (5.0%)	2 (1.7%)
(CA)22	4 (3.6%)	17 (10.7%)	0
(CA)21	26 (23.7%)	47 (29.6%)	25 (21.7%)
(CA)20	65 (59.1%)	71 (44.7%)	86 (74.8%)
(CA)19	0	12 (7.5%)	2 (1.7%)
(CA)18	0	1 (0.6%)	0
(CA)17	0	0	0
(CA)16	0	1 (0.6%)	0
Total	110	159	115

a) all Japanese

b) >50% white Europeans, 40% Asian Indians, <10% Afro-Caribbean

c) all Chinese

Heterozygosity in females is 47.5% in Japanese, 91% in white Europeans, Asian Indians and Afro-Caribbean and 53% in Chinese, respectively.

② 40名の女性のうち19名(47.5%)がこのVNTRに関してヘテロ接合体を示した。

㉓ 本VNTRは血友病A家系におけるFVIII遺伝子がどのように伝播しているかをより迅速に、また、より簡便に分析できる極めて有望なDNAマーカーの1つであると考えられた。

3. 血友病A患者のFVIII遺伝子の欠失、挿入、逆位及び点変異

血友病Aの遺伝子解析は緒についたばかりである。我々は血漿FVIII抗原量を正常に有する血友病A⁺病型（またはcross reacting material positive:CRM⁺病型）に注目し、すでに3病型、FVIII Okayama(Arg³⁷²→Cys)、FVIII Hiroshima(Arg¹⁶⁸⁹→Cys)およびFVIII Ise(Arg²¹⁶⁹→Cys)を解析し、報告した。これらは予めエピトープの明らかなポリクロナール及び各種モノクロナール抗体を用いたサンドウィッチELISAでアミノ酸レベルでの異常部位を推定し、次いで、直接塩基配列を解析したものである。

1) 対象及び方法

㉔ 上記3例を含む51例の血友病A患者の末梢白血球よりgenomic DNAを抽出した。

㉕ スプライシング部位を含む各exon毎にプライマーを作製し、患者DNAをPCR法で増幅後(single strand conformation polymorphism:SSCP)を行った。異常バンドを示す患者DNAについてクローニング後、塩基配列解析を行った。

㉖ intron 22と5'側上流F8A遺伝子間の逆位の検出はGitcherらの方法に準じてSouthern blot法で行った。

2) 成績と考察

51例中現在までのところ、欠失2例、挿入0例、逆位18例、点変異13例が確認されたが、残る18例は不明であった。今後さらに解析を進める予定である。

Table 5 FVIII gene analysis in 51 patients with hemophiliaA

Abnormality	Cases (%)
Deletion	2 (3.9)
Inversion	18 (35.3)
Point mutation	13 (25.5)
Unknown	18 (35.3)
Total	51 (100.0)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要旨:第 VIII 因子(FVIII)遺伝子は全長 186kb で、26 個の exon と 25 個の intron から構成されている。その mRNA は 9kb で、2,351 個のアミノ酸をコードしている。これらの異常は血友病 A をもたらす。FVIII 遺伝子の解析として、まず、正常日本人女性における FVIII 遺伝子内の 5 種類の RFLP とそのヘテロ接合体出現率を検索した。次いで、血友病患者の母親で保因者と診断された 30 名の上記 RFLP を検索し、やはり Bc1 I と Xba I の組合せが 63.3%と高率であった。次に、日本人集団における FVIII 遺伝子イントロン 13 内の CA repeat (VNTR)を解析し、女性 40 名中 19 名(47.5%)がヘテロ接合体を示した。以上より、Bc1 I RFLP と Xba I RFLP の組合せとイントロン 13 内 VNTR は血友病 A 保因者診断及び出生前診断に有用と考えられた。

さらに、血友病 A 患者 51 例の genomic DNA を PCR で増幅後 SSCP 法でスクリーニングの後、異常バンドを示す DNA の塩基配列解析を行った。現在までのところ、欠失 2 例、挿入 0 例、逆位 18 例、変異 13 例、不明 18 例であった。