

血友病B孤発家系の遺伝カウンセリングにおいて遺伝子変異の解析は必須である

Mutation analysis is an essential strategy in the genetic counselling of sporadic haemophilia B families

M. P. Bicocchi, M. Pasino, F. Bottini, T. Lanza, P. G. Mori and M. Acquila

Haemostasis and Haemophilia Laboratory, IV Paediatric Division, G. Gaslini Institute, Genoa, Italy

血友病B (HB) は単一遺伝子の異常に起因し、単一遺伝子異常疾患のモデルと考えられているが、多様な変異が認められ、そのほとんどは点変異である⁽¹⁾。さらに、高頻度に*de novo*変異が認められると報告されている⁽²⁾。

イタリアにおける血友病患者のQOLはかなり改善されたが、高リスク群の女性のほとんどは自らが保因者であるか否かを知ることが希望していると同時に、この疾患とその遺伝性、および出生前診断(PD)に関する十分な情報を得たいと考えている。今日、適切な遺伝カウンセリングは、疾患の原因となっている変異の特定に基づくものと考えられている。この方法は、保因者かどうかを正確に診断するための、現状では唯一の手段であるとともに、*de novo*変異の発生頻度を見いだす上で唯一の方法といえる。RFLP解析のみが利用可能であった時代には、孤発型HB患者の母親の保因者診断と、血友病患者と同じX染色体をもつ女性の保因者診断が不可能であった(Table 1)。その後、原因となっている変異を特定するためのより直接的な方法が確立されたことにより、保因者診断の精度は劇的に向上した。

過去に我々は、孤発型のHB 12家系を対象に研究した結果、保因者診断には遺伝子変異の特定が必須であることを確認した。最初に、血友病患者と血縁

関係にある女性で患者と同じXハプロタイプをもたないすべての女性を保因者から除外するために、HB患者12例とその母親、そして保因リスクをもつ女性血縁者14例を対象に3種類のRFLP解析 [*DdeI*/intron d, *MnI*(e) exon f, *HhaI*/flanking exon h] を行った。保因者疑いの女性14例中の7例は非保因者であった(Table 1)。続いて、各患者とその家族を対象に、Hinksら⁽³⁾の方法に従ってconformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE)による遺伝子変異の検出を行い、第IX因子(FIX)遺伝子のコード領域、intron/exon スプライス部位、5'および3'非翻訳領域、ならびにプロモーターおよびポリアデニル化部位のスクリーニングを行った。いずれの患者においてもCSGEにおいて特有の異常が認められ、市販キット(ABI Prism BigDye terminator kit; Applied Biosystems, Warrington, UK)を用いて直接的シーケンス解析を行い変異を特定した。

患者の母親と保因者疑いの女性血縁者における変異の検討の結果、母親12例中9例が保因者で、残りの3例には変異が認められなかった。体細胞モザイクや生殖細胞限定モザイクが存在しないと仮定すれば、今回の患者における*de novo*変異の発生頻度は25%であり、他の研究で報告されている頻度とほぼ一致する^(2, 4, 5)。分子レベルでの検討では、RFLPでは診断不可能であった女性血縁者7例のうち、2例が非保因者で、残りの5例はFIX遺伝子に変異をもつことが明らかになった。

詳細な変異解析を行った結果、12例のHB患者のうち11例に点変異が認められ、その多く(7例)は塩基転位であった(Table 2)。これらの変異が認められた症例のほとんどは重症HBであった(12例中9

Correspondence: Dr M. Patrizia Bicocchi, Laboratorio di Ematologia ed Emofilia, IV Divisione di Paediatrica, Istituto Gaslini, Largo G. Gaslini n.5, 16147 Genoa, Italy.
Tel.: + 39 010 563 6277; fax: + 39 010 563 6556;
e-mail: patriziabicocchi@ospedale-gaslini.ge.it

Table 1. RFLPs analysis and carrier status assessment by mutation characterization in 12 sporadic haemophilic's mothers and 14 related at risk females.

	Informativity	Carrier status	
	RFLP	RFLP	Mutation analysis
Mothers of sporadic patients	4/12 homozygous	4/12 undetermined	4/12 carriers*
	8/12 heterozygous	8/12 undetermined	5/12 carriers 3/12 noncarriers†
Related at-risk females		7/14 noncarriers	2/7 noncarriers
		7/14 undetermined	5/7 carriers*

*Mutation analysis made PD possible in two male fetuses. †A possible somatic and/or germinal mosaicism should be taken in account.

Table 2. Sites of mutation of factor IX gene in 12 sporadic haemophilia B patients.

Exon b	Exon c	Exon e	Exon f	Exon h	Poly A
C6364T	T6685G*	G17755T*	G20375A	30799/30802 + A	G30864T
G6365A			G20549A*	G31053A	
T6400A				C31118T	
6418-AGAG					

*Novel mutation.

例)。12種類のDNA異常のうち3種類はFIXデータベースに未記載の新規の異常であり^(6,7), これらは重症HBと関連していた。このうち1種類目の変異はT6685G転換(exon c)であり, γ -カルボキシル化ドメイン内においてフェニルアラニン⁴¹→システイン置換(芳香族アミノ酸→含硫アミノ酸)が生じていた。2種類目の変異はG17755T転換(exon e)であり, EGF-2様ドメイン内においてグリシン¹¹⁴→停止コドン置換が生じていた。3種類目の変異はG20549A転位(exon f)であり, 触媒ドメイン内において中性アミノ酸グリシン¹⁹⁰→アスパラギン(酸性アミノ酸)置換が生じていた。

男性胎児2例において変異解析による精度の高い

出生前診断が行われ, 結果は1例がHBであった。

HB患者の母親および保因者疑いのある女性血縁者の保因・非保因を特定するためには遺伝子変異の解析が唯一の方法である。HB孤発家系の母親を非保因者と診断する場合に関して, 以下の点を付け加えたい。これまでに報告されているように⁽⁸⁾, 孤発例においてモザイクが生じる推定リスクは6.5%未満である。白血球以外の組織を用いた検査が可能であれば体細胞-生殖細胞モザイクの存在の確認に寄与すると思われるが, 体細胞モザイクが存在する可能性は決して除外することはできない。したがって, 遺伝カウンセリングには変異が認められない母親を対象とした胎児の出生前診断を含めるべきである。

References

- 1 Roberts HR. Molecular biology of hemophilia B. *Thromb Haemost* 1993; 70: 1-9.
- 2 Lillicrap D. The molecular basis of hemophilia B. *Haemophilia* 1998; 4: 350-7.
- 3 Hinks JL, Winship PR, Makris M, Preston IR, Goodeve AC. A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis. *Br J Haematol* 1999; 104: 915-8.
- 4 Ljung R, Petrini P, Tengborg L, Sjorin E. Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. *Br J Haematol* 2001; 113: 81-6.
- 5 Thompson AR, Chen SH. Germ line origins of *de novo* mutations in hemophilia B families. *Hum Genet* 1994; 94: 299-302.
- 6 Giannelli F, Green PM, Sommer SS *et al.* Haemophilia B database of point mutations and short additions and deletions, 8th edn. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 265-8.
- 7 Giannelli F, Green PM, Sommer SS *et al.* *Haemophilia B Database of Point Mutations and Short Additions and Deletions*, 9th edn. URL: <http://www.umds.ac.uk/mol-gen/haemBdatabase.htm>.
- 8 Green PM, Saad S, Lewis CM, Giannelli F. Mutation rates in humans. Overall and sex specific rates obtained from the population study of hemophilia B. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1572-9.