



Nondeletional type of hereditary persistence of fetal haemoglobin:molecular characterization of three unrelated Thai HPFH

Winichagoon, Fucharoen Pranee

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-01-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1895

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001895>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	Pranee Winichagoon Fucharoen	（タイ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1436号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成7年1月11日	
学位論文題目	Nondeletional type of hereditary persistence of feral haemoglobin:molecular characterization of three unrelated Thai HPFH （非欠失型高胎児ヘモグロビン血症：タイ3家系の分子遺伝学的解析）	
審査委員	主査 教授 千原和夫 教授 松尾雅文 教授 堀田 博	

論文内容の要旨

Introduction

The human β -globin gene locus consists of five linked genes arranged in the developmental order 5'- ϵ - γ^G - γ^A - δ - β -3', and span approximately 65 kilobases (kb) of DNA on the short arm of chromosome 11. These genes are expressed in a tissue-and stage-specific manner. The γ -globin genes are normally expressed during the fetal stage of development. The expression of these genes diminishes around the time of birth and is placed by the expression of δ - and γ -globin genes in the adult bone marrow. This phenomenon is known as hemoglobin (Hb) switching. This switch changes the amount of HbF ($\alpha_2\gamma_2$) from 60-80% at birth to the adult level (<1%) after 12 months of neonatal life. In the condition known as hereditary persistence of fetal hemoglobin (HbF), the γ -globin gene is expressed even in the adult life resulting in an elevated HbF level ranging from 15 to 20% of the total hemoglobin (Weatherall and Clegg, The Thalassemia Syndromes, 3rd edn. Blackwell Sci Public, Oxford, 1981). Since modulation of γ -globin gene expression in adults could provide a therapeutic intervention in hemoglobinopathy (Stamatoyannopoulos and Nienhuis, Ann Rev Int Med 1993;43:497, Fucharoen et al, Blood 1993;82, (suppl.1):357a, Voskaridou et al, Blood 1993;82, (suppl.1):357a, Costin et al, Blood 1993;82, (suppl.1):357a, Blau et al, Blood 1993;81:529-537), study of the molecular mechanisms generating HPFH is medically relevant.

Molecular analysis by DNA mapping have classified HPFH into two types, the deletion and nondeletion HPFH. Deletions of different lengths of the γ -, δ - and β -globin genes have been found in the former type, whereas the entire globin genes are intact in the latter (Stamatoyannopoulos et al, Molecular Basis of Blood Diseases. Saunders, Philadelphia, 1987). Several point mutations in the promoter region of the γ -

globin gene have been identified in the nondeletion type of HPFH (Ottolenghi et al, Hemoglobin 1989;13:523-541). As several nuclear factors bind to these promoter regions (Mantovani et al, Nuc Acids Res 1988;16:7783-7797, Gumucio et al, Mol Cell Biol 1988;8: 5310-5322, Gumucio et al, Blood 1990;75:756-761, Sykes and Kaufman, Mol Cell Biol 1989; 10:95-102, Martin et al, Nature 1989;338:435-438, Ronchi et al, Nature 1989;17:10231-10241), a mutation might either increase the affinity of the promoter for an activator protein, or decrease the affinity for an inhibitor protein.

Recently it has been shown that expression of the genes on the β -globin gene cluster can be regulated by the distant elements located 6-18kb upstream of the ϵ -globin gene (Locus Control Region, LCR) or in the 3' enhancer region 700-1100 nucleotides 3' of the β -globin gene and deletion of the major regulatory sequences (hypersensitive sites, HS 2-4) in the LCR can inactivate the β -globin gene downstream (Grosveld et al, Cell 1987; 51:975-985).

Reorganization of the chromatin surrounding the globin gene locus results in an open chromatin domain which is necessary, but not sufficient, for stage specific control of expression of each of the distant embryonic, fetal or adult genes of the locus. β -Globin gene switching is also elicited by the binding of both ubiquitous and tissue-restricted transcription factors to regulatory modules (promoters, enhancers) within the globin loci. Different classes of trans-acting factors are regulatory molecules that control lineage-restricted gene expression in erythroid cells.

In Thailand we also encounter with adult individuals who have high HbF. Some had already been characterized by the Southern blot technique as the deletion type of $\delta\beta$ -thalassemia (Fucharoen et al, Eur J Haematol 1987;39:154-160, Winichagoon et al, Hemoglobin 1990;14:185-197), and some were identified as the deletion type of HPFH (unpublished data).

In this report, in order to clarify the molecular basis of the nondeletion type of HPFH condition of three unrelated Thai individuals, we examined the structure of the globin genes by using various DNA technologies.

Materials

1. *Reagents and equipments*: Model ZF 6 Electronic cell counter, Coulter, USA; Radioactive counter, Beckman, USA; DU-64 Spectrophotometer, Beckman, USA; BT-23 Water bath incubator, Yamato, Japan; Microcentrifuge, Tomy, Japan; DNA Thermal cycler, Perkin Elmer Cetus, USA; model 894 DNA/RNA synthesizer, Applied Biosystem, USA; ECPS 3000 Electrophoresis constant power supply, Pharmacia, USA; model 583 Gel drying, Biorad, USA.

Cellulose acetate, Helena, USA; Restriction endonuclease enzymes, Takara, Japan and BRL, USA; Amplitaq, Cetus and Taq polymerase, Promega, USA; T7 sequencingTM kit, Pharmacia, USA; Radioactive isotopes, ³H-leucine, [α -³²P] dCTP, ³⁵S-dATP, Amersham, UK.

2. *Subjects*: Three unrelated Thai families (families A, B and C) with hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) attended hematology clinic, Division of Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand. In family A, the mother passed the high HbA₂/high HbF condition to the proband (DP) and the other two daughters. They should have the β -thalassemia gene since they have increased level of HbA₂. In family B, the proband (AS) and his sisters had inherited this abnormal gene from the mother. One of his sister also had β -thalassemia gene from the father and died at 18 years of age. Since she had only HbA₂ and HbF (no HbA) and the level of HbA₂ in AS and the mother was normal, the β -globin gene inherited from the mother acts as a silent β -thalassemia gene. In family C, the mother and the proband (MS) had only high HbF but normal HbA₂. There were no evidence of β -thalassemia gene in MS but the presence of silent β -thalassemia gene could not be ruled out. All heterozygote individuals are asymptomatic.

Methods

1. *Hematological and hemoglobin analysis*:

Hematological data were obtained from Coulter counter, model ZF6. Distribution of red cells containing HbF was demonstrated by acid elution test. Hemoglobin type was performed by starch-gel electrophoresis in tris-EDTA-buffer, pH8.6. Hemoglobin was quantitated by elution after cellulose acetate electrophoresis. Alkali denaturation of HbF was carried out by the Betke's method. Determination of the G γ /A γ ratio was obtained from the globin chains separated by Triton X-100 acid-urea polyacrylamide gelelectrophoresis. In vitro globin chain synthesis was determined from the reticulocytes of heparinized blood as previously described.

2. *Molecular analysis by DNA mapping*:

Blood samples from probands and their family members were collected in heparin and DNA was isolated from leukocytes with phenol/chloroform. DNA mapping of the β -globin gene cluster was determined by the Southern blot technique. Various restriction enzymes, *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *BglIII*, *XbaI*, *PvuII*, were used to digest genomic DNA. Then the digested DNA samples were electrophoresed, denatured and transferred to nitrocellulose membrane. The probes used were the 3.5 kb *HindIII* A₇ fragment, the 2.3 kb *PstI* δ -fragment, the 4.1 kb *HpaII* β -fragment, pRK 29, a 1.2 kb *EcoRI* fragment derived from the 3' flanking DNA, 18 kb 3' side of the β -globin gene, and HPFH-3D, a 1 kb *BamHI*/*EcoRI* fragment derived from the 3' end point of the HPFH-1 deletion. Before hybridization to nitrocellulose membrane, all probes were labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Autoradiography was performed after stringent wash (Winichagoon et al, Hemoglobin 1990;14:185-197, Winichagoon et al, Br J Haematol 1993;83:633-639).

3. *Polymerase chain reaction and haplotype analysis*:

Haplotype analysis of DNA polymorphisms on the β -globin gene cluster was performed by amplification of the seven DNA segments containing each of the common polymorphic restriction sites within the β -globin gene cluster, using different sets of oligonucleotide primers. These included the *Hinc*II site 5' to the ϵ -globin gene, the *Hind*III sites within the G γ - and A γ -globin genes, the *Hinc*II sites within the ϕ β - and 3' ϕ β -globin genes, the *Ava*II site in the β -globin gene and *Bam*HI site 3' to the β -globin gene. Six μ l of the amplified products was directly digested with 5-10 units of the appropriate restriction enzymes in 10 μ l volume at 37°C for 1 h. After digestion, 2 μ l of the dye-marker was added and the patterns of DNA polymorphisms were visualized after electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

4. Direct nucleotide sequencing and dot blot hybridization:

Direct nucleotide sequencing was performed from the single-strand amplified DNA obtained by using two steps of polymerase chain reaction (Winichagoon et al, Biochim Biophys Acta 1992;1139:280-286). In the first amplification, double-stranded DNA was amplified by using equal amounts of two primers. Then, a 2 μ l aliquot of the amplified DNA was used in the second amplification reaction which contained only one of the two primers in a 100 μ l reaction mixture. The amplified DNA was then extracted once with chloroform and precipitated by 5 M ammonium acetate and isopropanol alcohol.

Nucleotide sequences of the amplified fragment were determined by the dideoxy chain termination method, using an appropriate sequencing primer located internally of the amplified fragment. Briefly, 1 pmole of the sequencing primer was annealed to the amplified DNA. The four nucleotides including 185-370 kBq of a ^3S -dATP were incorporated with 2 μ l of T7 DNA polymerase (dilute 1:5, T7 Sequencing™ kit, Pharmacia) at 37°C for 5 min. The mixture of 4.5 μ l was dispensed into 2.5 μ l of each termination mixture for G, A, T, and C (T7 Sequencing™ kit) and the reaction was allowed to proceed at 37°C 5 min before 5 μ l stop solution were added. An aliquot of 2.5 μ l of each sequencing reaction (G, A, T and C) was then electrophoresis on 8 M urea/6% polyacrylamide gel at 1500-2000V.

Dot blot hybridization of the amplified products was performed as previously described (Winichagoon et al, Biochim Biophys Acta 1992;1139:280-286). Hybridization temperature was at 42°C and washing temperature was at $T_m - 2^\circ\text{C}$, whereas T_m was calculated from $2(A+T)+4(G+C)$.

Results and Discussion

In this study we used the polymerase chain reaction-related techniques, such as direct nucleotide sequencing, to identify the molecular defect of three unrelated Thai families with the nondeletion type of HPFH. Deletion of the γ - or β -globin genes was excluded by the presence of the normal DNA mapping using Southern blot analysis.

Several lines of evidence strongly suggested that DNA sequence elements in the

minimal promoter of the γ -globin gene that contains a TATA box (-30), two CCAAT boxes (-85 and -110) and a CAC box (-140), are necessary for γ -globin gene regulation. In addition, the 5' flanking region of the human γ -globin gene, upstream of the canonical promoter was also important. One of these regions, at positions -182 to -175 to the cap site of the gene, contains the octanucleotide motif (ATGCAAAT) which has been found to be important in the expression of a variety of genes. The sequence between 196 and 202 bp 5' to the cap site of the γ -globin gene is also essential for γ -globin gene transcription. The single base substitutions around these regions were found to be associated with over expression of the γ -globin gene. However, direct nucleotide sequencing demonstrated that all subjects in this study have normal nucleotide sequences from the cap site to the position -400 of both G γ - and A γ -globin genes.

A novel DNA polymorphism occurred from a four nucleotides, AGCA, deletion at position -225 to -222 to the cap site of one A γ -globin allele was also detected in one subject (AS). Dot blot hybridization confirmed the presence of the 4 bp deletion in this subject. This should not be responsible for this HPFH condition because the heterozygosity for this mutation was also observed in other 3 out of 13 Thai and 2 out of 13 Japanese individuals who have normal level of HbF.

All individuals suspected of having the β -thalassemia gene that linked to the high HbF condition in this study also have normal β -globin gene sequence, spanning from the position -108 to the cap site to the polyadenylation site. Furthermore, it has been previously shown that the (AT)_x(T)_y motif at position -540 to the cap site of the β -globin gene acts as a binding site of the repressor protein (BP1) and the Albanian variant (AT)₈(T)₆, was suggested to be associated with the reduction in β -globin chain synthesis in a silent carrier of β -thalassemia. We also performed direct sequencing of this region in the three patients. Each was found to be homozygous for the sequence (AT)₇ (T)₇, (AT)₈ (T)₈ and (AT)₉ (T)₈, respectively. These results are consistent with the neutral polymorphism previously described.

The restriction fragment length polymorphism was identified from the presence or the absence of the restriction site at that region, and the haplotype of the β -globin gene cluster was obtained when a set of different polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster was identified. The result showed that the 5' haplotype, +, - + - + + (the *Xmn*I site 5' to the G γ -globin gene, the *Hinc*II site 5' to the ϵ -globin gene, the *Hind*III sites within the G γ - and A γ -globin genes, the *Hinc*II sites within the ϕ β - and 3' ϕ β -globin genes, respectively), was associated with the HPFH phenotype in these three families, therefore indicating that a determinant of high HbF could be located within the β -globin gene cluster.

The region distant from the γ -globin genes could be involved in the pathogenesis of the high HbF condition of these families. One of the candidate regions is the LCR in the β -globin gene cluster. Under the influence of the LCR, developmental regulation of the β -globin gene cluster appears to reflect a combination of promoter competition

during the fetal stage, autonomous silencing of the γ -globin gene during the adult stage, and perhaps interaction of different combination of elements from the LCR during the two stages. Since the HS 2 site of the LCR was found to contain many binding sites of the regulatory proteins, sequence analysis of the HS 2 site in these subjects were performed. A specific rearrangement of the polydinucleotides, $(TA)_9CACATATACG(TA)_{10}$ were detected in all individuals who had high HbF. Family studies indicated that this pattern is linked to the 5' haplotype (+, -+--+). A study of 18 normal chromosomes from individuals who have the normal level of Hb F showed that this specific rearrangement of the polydinucleotides in the HS 2 site was also linked to three alleles with the haplotype +, -+--+ and to one allele with -, +----, indicating that the polydinucleotides in HS2 are polymorphic.

In conclusion, high Hb F and the abnormal function of the β -globin gene in this study appeared to be associated with the 5' haplotype (+, -+--+) and the *Xmn*I (+) site but there were no other abnormal sequences or gross rearrangements of the β -globin gene cluster. These cases of HPFH could be classified into a new category of H PFH, and this unique type of HPFH should provide a new insight into the molecular mechanism of Hb switching.

非欠失型高胎児ヘモグロビン血症：タイ3家系の分子遺伝学的解析

ブラニー フチャロエン

ヒト β グロビン遺伝子群は11番染色体の短腕の約65kbにわたり、5' から ϵ - γ - δ - β グロビン遺伝子の順に並んで存在している。これらの遺伝子は発生の時期特異的に発現しており、これはヘモグロビンスイッチングとして知られる。つまり γ グロビン遺伝子は胎児期に発現し、出生後その発現は δ と β グロビン遺伝子に移行する。この現象の解明は、個体発生に伴う遺伝子発現調節機構という基礎医学の面からのみならず、胎児型グロビン遺伝子の活性化によるヘモグロビン異常症の治療という臨床医学の面からも注目されている。そこで本研究者は、この機構の解明を目指し、成人でありながらHbFのレベルが高く、ヘモグロビンスイッチングに異常を来たした疾患と考えられる、高胎児ヘモグロビン血症 (HPFH:hereditary persistence of fetal hemoglobin) の解析を行なった。すでにHPFHは β グロビン遺伝子群に広範な欠失がある欠失型と、それが見られない非欠失型とに分類されている。後者に関しては γ グロビン遺伝子のプロモーター領域に塩基置換が知られており、このため転写制御因子の結合不良や、結合亢進がおこり、転写が亢進するものと考えられている。

本研究では、タイで見出されたHPFHの3家系 (Family A, B, C) を対象に、Hb分析、グロビン遺伝子群の解析を行なった。Family Aの発端者 (DP) はHPFHとともに β サラセミアトレイトの表現型を有しており、Family Bの発端者 (AS) はHPFHならびに β サラセミアサイレントキャリアーであり、Family Cの発端者 (MS) もHPFHとともに、 β サラセミアサイレントキャリアーの可能性もある。まず3名の発端者の末梢血白血球から調製した高分子量DNAを用いてSouthern blottingを行なった。その結果 β グロビン遺伝子群には明らかな欠失や付加がなく、このHPFHは非欠失型であることが分かった。そこで、 γ グロビン遺伝子のプロモーター領域の解析を行なった。 γ

グロビン遺伝子のプロモーターとしては、-30位にTATA box、-85と-110位にCCAAT box、-140位にCAC boxが存在している。また-182から-175位にかけて存在するATGCAAATからなる8塩基のモチーフ、さらに-196から-202位の領域が γ グロビン遺伝子の発現に必要であることが分かっており、これまで非欠失型HPFHでは、以上の領域に塩基置換が見いだされている。ダイレクトシーケンシング法により、G γ およびA γ グロビン遺伝子のcap部位から-400位に至る領域を解析した結果、3名ともに-158位T→C置換のヘテロ接合型であることが分かった。また、ASのA γ グロビン遺伝子には、-225から-222位にかけAGCAの欠失が見られた。しかしその他の変化は見いだされなかった。-158位の置換はXmnI切断部位の多型として知られている。また、AGCAの欠失についても、13人の正常なHbF値を持つタイ人のうち3名、および13人の日本人中2名がこの欠失のヘテロ接合型であり、多型と考えられた。ところで、HPFHを来した3名の発端者とも β サラセミア遺伝子のキャリアーである可能性が高いため、 β グロビン遺伝子の発現に関与する領域を含む-108位からポリアデニンレーション部位に至る配列を決定した。その結果、変異は見いだされなかった。また-540位に位置する(AT)_x(T)_yにはリプレッサー(BP1)が結合し、またアルバニア人家系の β サラセミアサイレントキャリアーではこの配列が(AT)₈(T)₆であることから、この領域が β グロビン遺伝子の発現低下に関与していることが示唆されている。そこで、3名の発端者について解析を行なったが、DPでは(AT)₇(T)₇、ASでは(AT)₈(T)₅、MSでは(AT)₈(T)₆のホモ接合型であり、これらの繰り返し配列は多型性の高い領域と考えられ、サラセミアとは直接関係ないものと結論した。

以上のように、HPFHおよび β サラセミアでこれまで報告された領域には、明らかな変異は見いだせなかったため、本HPFHでは高HbF値をもたらす部位が β グロビン遺伝子群に連鎖しない可能性も考えられた。そこで、 β グロビン遺伝子群のハプロタイプをPCR法を用いて決定した。その結果、既に明らかにしたG γ グロビン遺伝子の-158位にあるXmnI部位の多型をあわせ、5'ハプロタイプつまり、 ϵ グロビン遺伝子の5'領域にあるHincII部位、G γ およびA γ グロビン遺伝子内のHindIII部位、 ϕ β グロビン遺伝子内、および3'側にあるHincII部位の多型は3家系とも(+, -+ -++)であった。以上から、本HPFHは β グロビン遺伝子群に連鎖していると考えられた。 β グロビン遺伝子群の上流部位に、LCR (locus control region)が存在し、スイッチングはLCRと各グロビン遺伝子とが、時期特異的に相互作用することにより起きると考えられている。本HPFHでは高HbF値と β グロビン遺伝子発現低下とが同時に見られることから、LCRの変異も想定される。そこでLCRの中で最も高い活性をもつHS2領域について配列を決定した。その結果、3名の発端者とも、(TA)₉CACATATACG (TA)₁₀からなる配列をもち、これが(+, -+ -++)と連鎖していることが分かった。正常タイ人18アレルの解析により、この配列は4つのアレルに見られ、3つのアレルが(+, -+ -++)、そして1つのアレルが(+, +----)と連鎖していることが分かり、この配列は多型と結論された。

以上から本HPFHはハプロタイプ(+, -+ -++)と連鎖しているが、 γ や β グロビン遺伝子の発現に関わる領域には明らかな変異は見られなかったことから、全く新しいカテゴリーに属するHPFHであると考えられた。この解明により、ヘモグロビンスイッチングの機構に新たな知見が得られることが期待された。

論文審査の結果の要旨

ヒト β グロビン遺伝子群は11番染色体短腕に約65kbにわたって、5'から ϵ -G γ -A γ - δ - β

グロビン遺伝子の順に並んで存在する。これらの遺伝子は個体発生において時期特異的に発現し、これはヘモグロビンスイッチングとして知られる。つまり γ グロビン遺伝子は胎児期に発現し、出生後その発現は δ と β グロビン遺伝子に移行する。この現象の解明は、個体発生に伴う遺伝子発現調節機構という基礎医学の面からのみならず、胎児型グロビン遺伝子の活性化によるヘモグロビン異常症の治療という臨床医学の面からも注目されている。そこで本研究者は、この機構の解明を目指し成人でありながらHbFのレベルが高く、ヘモグロビンスイッチングに異常を来した疾患と考えられる、高胎児ヘモグロビン血症 (HPFH: hereditary persistence of fetal hemoglobin) の解析を行なった。すでにHPFHは β グロビン遺伝子群に広範な欠失がある欠失型と、それが見られない非欠失型とに分類されている。後者に関しては γ グロビン遺伝子のプロモーター領域に塩基置換が知られており、このため転写制御因子の結合不良や、結合亢進がおこり、転写が亢進するものと考えられている。

本研究では、タイで見いだされたHPFHの3家系 (Family A, B, C) を対象に、Hb分析、グロビン遺伝子群の解析を行なった。Family Aの発端者 (DP) はHPFHとともに β サラセミアトレイトの表現型を有しており、Family Bの発端者 (AS) はHPFHならびに β サラセミアサイレントキャリアーであり、Family Cの発端者 (MS) もHPFHとともに、 β サラセミアサイレントキャリアーの可能性がある。まず3名の発端者の末梢血白血球から調製した高分子量DNAを用いてSouthern blottingを行なった。その結果 β グロビン遺伝子群には明らかな欠失や付加がなく、このHPFHは非欠失型であることが分かった。そこで、 γ グロビン遺伝子のプロモーター領域の解析を行なった。ダイレクトシーケンシング法により、G γ およびA γ グロビン遺伝子のcap部位から-400位に至る領域を解析した結果、3名ともに-158位T \rightarrow C置換のヘテロ接合型であることが分かった。またASのA γ グロビン遺伝子には、-225から-222にかけAGCAの欠失が見られた。しかしこの変異と欠失は多型と結論された。ところで、HPFHを来した3名の発端者とも β サラセミア遺伝子のキャリアーである可能性が高いため、 β グロビン遺伝子の発現に関与する領域を含む-108位からポリアデニレーション部位に至る配列を決定したが、変異は見いだされなかった。また-540位に位置する(AT)_x(T)_yにはリプレッサー (BP1) が結合し、またアルバニア人家系の β サラセミアサイレントキャリアーではこの配列が(AT)₈(T)₈であることから、この領域が β グロビン遺伝子の発現低下に関与していることが示唆されているが、3人の発端者は該当しなかった。

以上のように、HPFHおよび β サラセミアでこれまで報告された領域には、明らかな変異は見いだせなかったため、本HPFHでは高HbF値をもたらす部位が β グロビン遺伝子群に連鎖しない可能性も考えられた。そこで、 β グロビン遺伝子群のハプロタイプをPCR法を用いて決定したところ、本HPFHは β グロビン遺伝子群に連鎖していることが明らかになった。

以上から本HPFHはハプロタイプ (+, -+ -+ +) と連鎖しているが、 γ や β グロビン遺伝子の発現に関わる領域には明らかな変異は見られなかったことから、全く新しいカテゴリーに属するHPFHであると考えられた。以上、本研究はヘモグロビンスイッチングの機構の解明をめざして非欠失型高胎児ヘモグロビン血症の3家系について β グロビン遺伝子を解析したものであるが、従来知られていなかった新しいタイプの高胎児ヘモグロビン血症を見出し、ヘモグロビンスイッチングの機構を調べる上で重要な知見を得た価値ある業績と認める。よって本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。