

日本人における RB1 遺伝子第17および20番イントロン内 VNTR の多型性の検討および遺伝性網膜芽細胞腫における遺伝相談への応用

岡山大学医学部小児科学教室 (指導: 清野佳紀教授)

二 宮 伸 介

(平成 5 年10月 7 日受稿)

Key words : 網膜芽細胞腫, VNTR, 多型, PCR, 遺伝相談

緒 言

網膜芽細胞腫 (Rb) は, 出生20,000人に1人の頻度で網膜に発生する小児の悪性腫瘍である¹⁾. 本腫瘍は常染色優性遺伝様式を示す遺伝性 (30%) と非遺伝性 (70%) のものにとに分類される. 両側発生の腫瘍がすべて遺伝性なのに対し, 片側発生の腫瘍は多く (84%) は非遺伝性で一部 (16%) は遺伝性である²⁾. Rb の発生機構は, Two-hit theory で説明される³⁾. すなわち, 遺伝性のもものでは, 生殖細胞において癌抑制遺伝子である網膜芽細胞腫遺伝子 (RB1) の一方の対立遺伝子に突然変異が起こり, ついで体細胞 (網膜芽細胞) に染色体異常や遺伝子再編成により他方の対立遺伝子に欠失や突然変異が起こると, 両側多焦点性に腫瘍が発生する. 一方, 非遺伝性の Rb では, 体細胞の2つの対立遺伝子に2回の突然変異が起こるために, 片側単焦点性に腫瘍が発生する. Rb 罹患した体質性染色体異常症の研究より, RB1 の遺伝子座位は13q14バンドに決定されていたが⁴⁾, 1980年代後半になり RB1 遺伝子がクローニングされた⁵⁾. 本遺伝子は全長が200kbにおよぶ巨大な遺伝子で, 27個のエクソンを含むことが明らかにされた⁶⁾.

Rb では早期診断と早期治療により視力を温存できるので, とくに, 遺伝性の Rb の保因者における発症前診断は重要な課題となっている. しかし, 遺伝性 Rb では点突然変異あるいは微

細な欠失が主たる原因であり⁷⁾, 全エクソンの配列解析による遺伝子診断には莫大な労力を要し, 実用的とはいえない. このような理由から, 遺伝性 Rb では RFLP (制限酵素切断 DNA 断片の多型性) を用いた遺伝子診断が一般的に用いられている⁸⁾. この際, 目的とする遺伝子そのものの多型性を応用すれば, 減数分裂における組み替えを無視でき, 診断の精度は100%である. VNTR (variable number of tandem repeat) はゲノム DNA 中で一定数の塩基配列が繰り返し構造をとるもので, しかも, その繰り返しの数は個人によって異なるため, 個人を識別する非常に有効な遺伝標識として注目されている⁹⁾.

本研究は遺伝性 Rb において実用的な発症前遺伝子診断法を開発することを目的として, 日本人において RB1 遺伝子第17および20番イントロン内に存在する VNTR を PCR (Polymerase chain reaction) 法により増幅しその多型性の種類と頻度とを検討した. また, この多型性を遺伝性 Rb 3 家系における発症前診断や染色体欠失の親の起源の決定に応用した.

対 象 と 方 法

1. 対 象

日本人における RB1 第17および20番イントロン内 VNTR の多型性の頻度を検討するため, 遺伝的に無関係の正常日本人50例 (男性26人, 女性24人, 年齢24~48歳) を対象として DNA を

抽出した。これらのイントロン内の VNTR 多型性の解析を、以下に述べる遺伝性の Rb の 3 家系で、Rb の発症前診断あるいは染色体欠失の親の起源の決定に応用した。

1) 家系 1 (図 1 a)

相談者 (II-3) は第 3 子の新生児女児。父親 (I-1) は片側性 Rb で眼球摘出を受けた。第 1 子 (II-1) は男児、両側性 Rb のため生後 6 か月で左側の眼球摘出と右側の網膜凝固術を受けた。体細胞および腫瘍細胞の染色体分析は正常であった。視神経末端の腫瘍細胞浸潤はなかったが、Cyclophosphamide と Vincristine の化学療法を 1 年間受け、完全寛解を続行している。第 2 子 (II-2) は現在 5 歳で、Rb の発生は認められなかった。

2) 家系 2 (図 1 b)

相談者 (II-2) は第 2 子の生後 3 歳の男児。父親 (I-1) が両側 Rb で、両眼球摘出を受けた。第 1 子 (II-1) の女児は生後 3 か月で両側 Rb を指摘され、右眼球の摘出と左眼球の網膜凝固術を受けた。第 2 子は男児で、現在まで Rb の発生が認められないが、両親が発症前診断を希望した。第 1 子の体細胞および腫瘍細胞の染色体分析はいずれも正常であった。

3) 家系 3

発端者は正常な両親 (父親 34 歳, 母親 29 歳) から生まれた第 2 子の男児。生後 4 か月の時、両側 Rb を指摘され、右側眼球摘出および左側網膜凝固術を受けた。表現型にはとくに異常を認めなかったが、染色体分析で 13 番染色体長腕部分欠失が認められた。高精度分染法により核型は、46, XY, del(13)(q14.3q21.4) と同定された (図 2)。腫瘍細胞の染色体分析は正常であ

った。なお、両親の染色体は正常であった。生後 6 歳で、境界領域の精神遅滞と著明なアトピー性皮膚炎が認められた。染色体異常の親の起源を決定するために、家族の承諾を得て、遺伝子診断を施行した。

2. 方 法

1) DNA の抽出

末梢血白血球よりフェノール・クロロホルム法あるいは Jeanpiere の迅速 DNA 抽出法¹⁰⁾を用い、DNA を抽出分離した。後者の方法では、混入した蛋白を除去するため、さらにフェノール・クロロホルムで DNA を精製した。DNA 濃度を 260nm における吸光度より測定した。

2) 分子遺伝学的方法

(1) RB1 第 17 番イントロン内 VNTR の PCR 法による増幅

Scharf らの方法¹¹⁾に従い、RBD12 (5'-CCTAACGTATGGCCAAGTTTCC-3') および RBD13 (5'-GCTAAACCATTTCATGAGG-GAT-3') の 2 つの oligonucleotides を Applied Biosystems 社製の DNA 合成器で作製し、プライマーとして用いた。PCR 法の反応系は総量 100 μ l で、ゲノム DNA 1 μ g, dNTP 100 μ M, 各プライマー 0.5 μ M, MgCl₂ 1.5mM, Taq polymerase 2.5U, Tris-HCl 10mM, TritonX-100 0.1% を含有する。PCR の条件として、denature 94 $^{\circ}$ C, annealing 55 $^{\circ}$ C, extension 72 $^{\circ}$ C

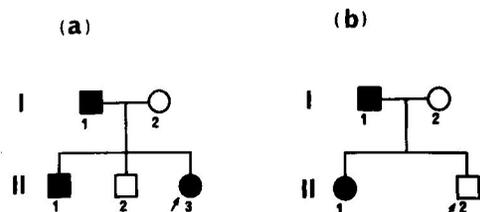


図 1 遺伝性 Rb の家系。a は家系 1, b は家系 2 矢印は相談者を、黒ぬり記号は Rb 患者を示す。

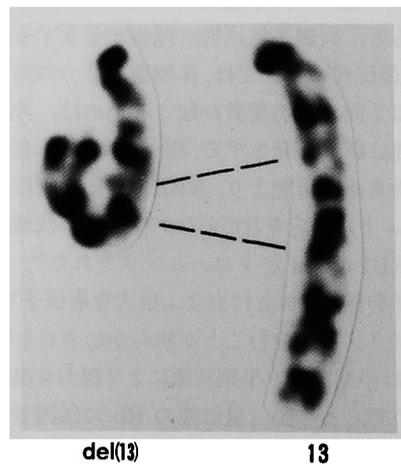


図 2 家系 3 の患児の末梢血染色体部分核型

それぞれ 1 分間を、アステック社のサーマルサイクラーで 30 サイクル施行した。PCR 増幅産物を 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイドを含む 1.5%、アガロースゲル 11.5 \times 12.5 cm で 20 mA、4 時間電気泳動した後、紫外線下でポラロイドフィルムで撮影し、PCR 産物の塩基長を決定した。分子量マーカーとして 100 bp-ladder (Pharmacia 社) を使用した。

(2) RB1 第 20 番イントロン内 VNTR 領域の PCR 法による増幅

第 20 番イントロン内の VNTR の増幅には Yandell と Dryja の方法¹²⁾を改変した Brandt らの方法¹³⁾を用いた。プライマーとしては primer

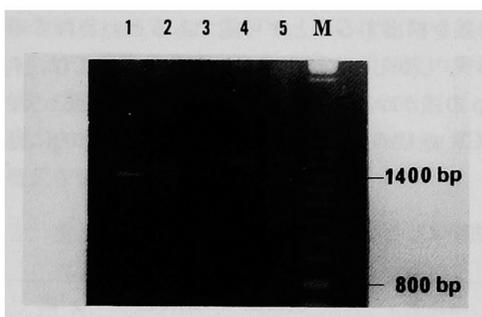


図 3 第 17 番イントロン内 VNTR の多型性
M はマーカー、レーン 1 は 1400 bp のホモ接合体、レーン 2 は 1400/1450 bp のヘテロ接合体、レーン 3 は 1400/1500 bp のヘテロ接合体、レーン 4 は 1500 bp のホモ接合体、レーン 5 は 1500/1550 bp のヘテロ接合体を示す。

表 1 RB1 第 17 番イントロン VNTR 遺伝型の実測値と期待値とのカイ 2 乗検定

遺伝型 (bp)	実測値	期待値	χ^2 値
1400/1400	26	26.65	0.01
1400/1450	1	0.73	0.01
1400/1500	20	17.52	0.36
1400/1550	0	1.46	1.46
1450/1450	0	0.01	0.01
1450/1500	0	0.24	0.24
1450/1550	0	0.02	0.02
1500/1500	1	2.88	1.23
1500/1550	2	0.48	4.81
1550/1550	0	0.02	0.02

$$\chi^2 = 8.25, \text{ df} = 9, \text{ p} = 0.5$$

310 (5'-AAGTAAGAAAATCAAGCACTT-3') および primer103 (5'-AATTAACAAGGTGTGGTGGT-3') を使用し、反応系は 50 μl で、ゲノム DNA 0.5 μg 、dNTP 200 μM 、各プライマー 1 μM 、5% ホルムアミド、 MgCl_2 1.5 mM、Taq polymerase 1.25 U、Tris-HCl 10 mM、Triton X-100 0.1% を含有する。PCR の条件は、最初の denature 94 $^\circ\text{C}$ を 5 分間行った後、denature 94 $^\circ\text{C}$ 15 秒、annealing 52 $^\circ\text{C}$ 15 秒、extension 71 $^\circ\text{C}$ 30 秒を 35 サイクル行い、最後に annealing 52 $^\circ\text{C}$ 1 分間、extension 71 $^\circ\text{C}$ 3 分間を施行した。PCR 産物 10 μl を制限酵素 BstNI 10 単位、60 $^\circ\text{C}$ で 3 時間消化し、non-repeat 部分を切断した。つぎに、この消化物 3.5 μl と同量の色素液 (0.05% Xylenecyanol, 2.5% Ficoll 400, 1.5 mM EDTA) とを混合し、12% ポリアクリルアミドゲル 10 \times 10 cm を使い、150 V、2 時間電気泳動した。ゲルを銀染色キット (第一化学薬品) で染色し塩基長を決定した。分子量マーカーとして 100 bp-ladder を用いた。

3) 統計学的方法

出現頻度の統計学的分析にはカイ 2 乗検定を用い、 $\text{p} < 0.05$ を有意とみなした。

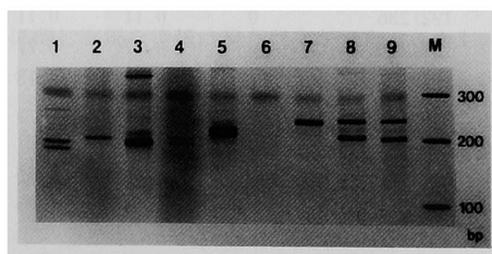


図 4 第 20 番イントロン内 VNTR の多型性
M はマーカー、レーン 1 は 192/200 bp のヘテロ接合体、レーン 2 は 208/208 bp のホモ接合体、レーン 3 は 196/240 bp のヘテロ接合体、レーン 4 は 196/208 bp のヘテロ接合体、レーン 5 は 216/224 bp のヘテロ接合体、レーン 6 は増幅なし、レーン 7 は 236/240 bp のヘテロ接合体、レーン 8 は 204/240 bp のヘテロ接合体、レーン 9 は 208/240 bp のヘテロ接合体を示す。

結 果

1. 正常日本人における第17番イントロン内 VNTR の多型性

Scharf らの原法¹¹⁾では26~28サイクルでもっとも増幅の効率が良好で特異性が高いと報告されているが、本研究では30サイクルが増幅と特異性の2点で優れていた。本 VNTR の基本骨格は54bp の繰り返し構造であるので、PCR 産物の塩基長を、アガロース電気泳動における増幅産物の100 bp-ladder マーカーとの位置関係から約50bp 間隔で恣意的に定義した。正常日本人50症例の第17番イントロンの VNTR には1400 bp, 1450bp, 1500bp および1550bp の4種類の対立遺伝子が存在しており(図3), その出現頻度はそれぞれ0.73, 0.01, 0.24および0.02であった。異なった対立遺伝子のヘテロ接合体の場合にも、増幅産物の染色強度は均等であった。

また、本論文にはデータを示さないが、これらの対立遺伝子は codominant に遺伝していることを確認した。この VNTR 遺伝子がヘテロ接合体である頻度は46% (23/50) であり、PIC (Polymorphism information content) は0.35であった。それぞれの遺伝型で出現頻度の実測値と期待値から計算したカイ2乗値は8.25(df = 9, p = 0.5) で(表1)。本 VNTR 遺伝子には Hardy-Weinberg の平衡式が成立すると考えられた。

2. 正常日本人における第20番イントロン内 VNTR の多型性

この VNTR の骨格となる塩基配列は CTTT (T) の繰り返し構造であり、理論的には1塩基対の差を検出することが可能であるといわれている¹²⁾。しかし、本研究で用いた泳動条件では、4 bp の差がかろうじて検出可能であった。従って、PCR 産物の塩基長は4 bp の間隔で恣意的に定

表2 RB1 第20番イントロン内 VNTR 遺伝型の実測値と期待値とのカイ2乗検定

遺伝型 (bp)	実測値	期待値	χ^2 値	遺伝型	実測値	期待値	χ^2 値
192/192	2	0.61	3.22	200/240	4	2.87	0.44
192/196	0	0.55	0.55	204/204	1	0.25	2.33
192/200	6	4.51	0.49	204/208	2	1.61	0.09
192/204	0	0.77	0.77	204/216	0	0.07	0.07
192/208	1	2.53	0.93	204/224	0	0.28	0.28
192/216	0	0.11	0.11	204/236	0	0.07	0.07
192/224	0	0.44	0.44	204/240	0	0.49	0.49
192/236	0	0.11	0.11	208/208	6	2.65	4.26
192/240	0	0.77	0.77	208/216	0	0.23	0.23
196/196	1	0.13	6.13	208/224	0	0.92	0.92
196/200	2	2.05	0	208/236	0	0.23	0.23
196/204	1	0.35	1.21	208/240	1	1.61	0.23
196/208	0	1.15	1.15	216/216	0	0	0.01
196/216	0	0.05	0.05	216/224	0	0.04	0.04
196/224	0	0.20	0.20	216/224	0	0.01	0.01
196/236	0	0.05	0.05	216/240	0	0.07	0.07
196/240	0	0.35	0.35	224/224	0	0.13	0.13
200/200	8	8.41	0.02	224/236	0	0.05	0.05
200/204	2	2.87	0.26	224/240	1	0.28	1.85
200/208	7	9.43	0.63	236/236	0	0	0.01
200/216	1	0.41	0.85	236/240	1	0.07	12.36
200/224	3	1.64	1.13	240/240	0	0.49	0.49
200/236	0	0.41	0.41				

$$\chi^2 = 44.5, \text{ df} = 44, \text{ p} = 0.5$$

義した。また、本 VNTR の増幅は第17番イントロン内 VNTR と比較して効率が悪く、Brandtらの原法¹²⁾に記載されている denature を10秒より15秒に、anealing を10秒より15秒に、extension を20秒より30秒に改変して初めて良好な増幅を得た。しかし、非特異的なバンドの増幅がいかなる PCR 条件でも認められた。正常日本人50症例における第20番イントロン内 VNTR には192bp, 196bp, 200bp, 204bp, 208bp, 216bp, 224bp, 236bp および240bp の少なくとも9種類の対立遺伝子が存在していた(図4)。その出現頻度はそれぞれ0.11, 0.05, 0.41, 0.07, 0.23, 0.01, 0.04, 0.01および0.07であった。本遺伝子は codominant に遺伝しており、ヘテロ接合体の頻度は64% (32/50) で、PICは0.74であった。なお、それぞれの遺伝型で出現頻度の実測値と期待値より計算したカイ2乗値は44.1(df = 44, p = 0.5) (表2) で Hardy-Weinberg の平衡式が成立していた。

3. 遺伝性 Rb 家系の発症前診断および染色体異常の親の起源への VNTR 多型性の応用

1) 家系 1

第17番イントロン内 VNTR 多型性を応用したところ(図5)、父親は1400bp と1500bp のヘテロ接合体、母親は1400bp のホモ接合体であった。患者である第1子は1400bp と1500bp のヘテロ接合体、一方、正常である第2子は1400bp のホモ接合体であり、父親の1500bp を含む染色体に RB1 遺伝子の異常が存在すると考えられた。第

3子は1400bp と1500bp のヘテロ接合体であり、患者と診断された。つぎに、第20番イントロン内 VNTR の多型性を応用したところ(図6)、父親は204bp と240bp とのヘテロ接合体、母親は200bp と208bp とのヘテロ接合体、第1子は200bp と204bp とのヘテロ接合体、第2子は200bp と240bp とのヘテロ接合体であり、RB1 遺伝子の異常は父親の204bp を含む染色体に存在することが判明した。第3子は200bp と204bp とのヘテロ接合体であり、患者であると診断した。なお、第3子は、生後4カ月に両眼球に Rb が発生し、両側網膜凝固療法を受けた。

2) 家系 2

第17番イントロン内 VNTR 多型性の応用では、父親、母親、第1子および発端者である第2子いずれも1400bp のホモ接合体であり、情報は得られなかった。しかし、第20番イントロン内 VNTR 多型性の応用では(図7)、父親は192bp と196bp とのヘテロ接合体、母親は200bp と204bp とのヘテロ接合体、患者である第1子は192bp と200bp とのヘテロ接合体であり、父親の RB1 遺伝子異常は192bp を含む染色体に存在することが判明した。第2子は196bp と204bp とのヘテロ接合体であり、正常であると診断した。

3) 家系 3

第17番イントロン内 VNTR 多型性の応用では、両親および子供いずれも1400bp のホモあるいはヘミ接合体であり、染色体異常の親の起源に関し有用な情報は得られなかった。しかし、

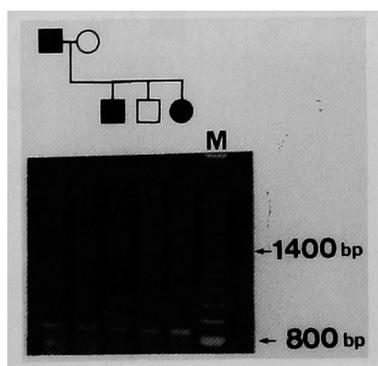


図5 第17番イントロン内 VNTR の多型性の家系 1 への応用

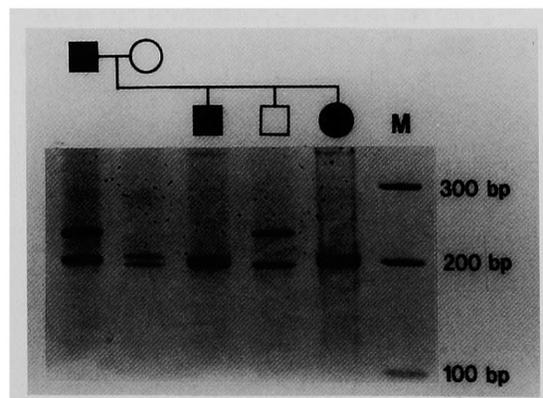


図6 第20番イントロン内 VNTR の多型性の家系 1 への応用

第20番イントロン内 VNTR の多型性の応用では(図8), 父親は188bpと196bpとのヘテロ接合体, 母親は200bpと240bpとのヘテロ接合体であった。患者である子供は240bpのみのヘミ接合体であったので, 父親の対立遺伝子が存在する染色体が欠失したと診断した。

考 察

Rbの原因遺伝子がクローニングされた現在, Rbの遺伝相談には遺伝子診断は不可欠である。遺伝子診断により, 高リスクの保因者で早期の診断と治療により, 視力が温存される機会が増加し, 非保因者で危険を伴う全身麻酔下の頻回の眼底検査を回避することが可能となる。しかし, 遺伝性 Rb の遺伝解析で, 染色体レベルで検出可能な異常が8%¹⁴⁾, サザンブロット分析で検出可能な異常が10~20%と報告されており¹⁵⁾, 多くの症例は点突然変異あるいは微細な欠失であることが推測されている。RB1 遺伝子の全塩基配列の決定に費やされる労力と時間の観点から, より迅速で実用的な方法の開発が要求されている。本研究では, 個人識別にもっとも有効な VNTR の多型性を用いて RB1 遺伝子異常が存在する染色体を判別した。日本人における RB1 第17番および20番イントロン内 VNTR の多型性を検討した結果, 4および9種類の対立遺伝子が存在しており, ヘテロ接合体の頻度はそれぞれ46%および64%であった。これらの2つの VNTR の多型性の応用により, 遺伝性 Rb 3 家系で出生前診断あるいは親の起源の決定が

可能であった。

RB1 の遺伝子解析より, 第17番イントロンには RsaI などの制限酵素で多型を示す VNTR の存在が知られていた⁸⁾。Scharf ら¹¹⁾はこのイントロンの塩基配列より VNTR を特異的に増幅する PCR 法を開発し, 250人の試料から 650~1800bp にわたる11種類の対立遺伝子を同定した。ヘテロ接合体の頻度はコーカサス人, アフリカ系アメリカ人, スペイン系アメリカ人およびスペイン系メキシコ人でそれぞれ62%, 75%, 61%および50%であった。最も共通した対立遺伝子はコーカサス人, スペイン系アメリカ人およびスペイン系メキシコ人で1450bpであり, 全対立遺伝子の59~69%を占めていた。一方, アフリカ系アメリカ人では1500bpと1450bpの対立遺伝子が最も多く認められ, コーカサス人とアフリカ人との中立的な民族の混合が示唆された。日本人では4種類の対立遺伝子のみが存在していたが, 最も共通した対立遺伝子は, 白色および黒色人種とは異なり1400bpであった。日本人ではこの共通した対立遺伝子の頻度は73%と高率のため, ヘテロ接合体の比率が低く, 遺伝性 Rb 家系の連鎖解析で有用な情報を得る機会が少ないと考えられた, しかしながら, 第17番イントロン内 VNTR の PCR 法による増幅は, エチジウムブロマイド染色で繰り返しの最小単位の54塩基対の差を容易に検出できるものであり, 個人識別に非常に有効であると考え

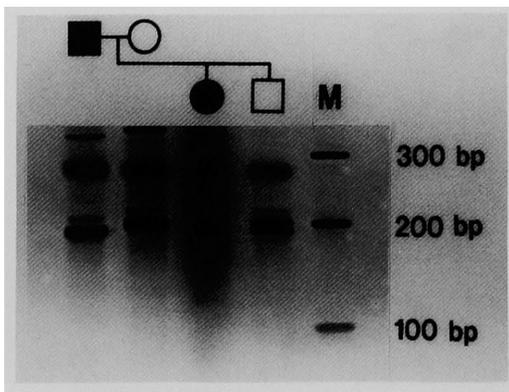


図7 第20番イントロン内 VNTR の多型性の家系2への応用

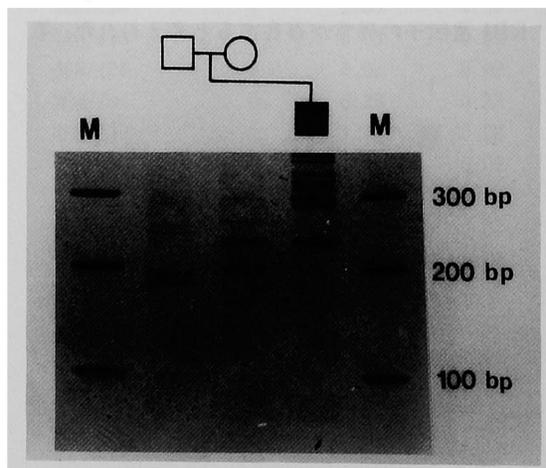


図8 第20番イントロン内 VNTR の多型性の家系3への応用

られる。

これとは対照的に、第20番イントロン内 VNTR には日本人においても少なくとも 9 種類の対立遺伝子が検出され、ヘテロ接合体の頻度は 64% であった。これらの対立遺伝子は均等に分布しており、最も高頻度の 200bp の対立遺伝子でも 41% を占めるにすぎなかった。この VNTR 多型性の連鎖解析における情報は高く (PIC = 0.74)、遺伝性 Rb 3 家系すべてにおいて発症前診断あるいは染色体異常の親の起源の決定に応用可能であった。

第20番イントロン内 VNTR の存在は Yandell と Dryja ら¹²⁾により初めて報告された。彼らは CTTT(T)の繰り返し構造を含む 550~600bp 領域を PCR 法で増殖した後、³²P で末端標識したプライマーでシーケンス反応を行い、オートラジオグラフィで PCR 産物の塩基長を決定した。本研究では彼らの方法を改変した Brandt ら¹⁴⁾の方法を使用した。その方法はさらに短い部分を PCR 法で増幅し、制限酵素 BstN I で non-repeat 部分を切断した後、分離するものである。検出には、オートラジオグラフィではなく、銀染色を応用しており、簡便性ばかりでなく安全性からも優れた方法といえる。本研究で明らかにした日本人のヘテロ接合体の頻度 (64%) が Yandell と Dryja の報告 (94%) と比して低率であったことは、民族特異性というより、電気泳動法の分離能に依存していると考えられる。本研究で使用した 10×10cm のゲルでは 1 塩基の差を分別することが不可能であり、比較的低鎖長での 1 塩基差のヘテロ接合体や比較的高鎖長での 4 塩基差のヘテロ接合体をホモ接合体として認識した可能性が否定できない。シーケンシングゲル泳動法や高精度ポリアクリルアミドゲル泳動法¹⁶⁾を応用すれば、検出可能な対立遺伝子の種類はさらに増加すると思われる。

13番染色体欠失を合併した両側性 Rb の家系 3 では、第20番イントロン内 VNTR 多型の応用から、欠失の染色体起源は父親であることが確認された。体細胞の 13番染色体に欠失あるいは転座が認められた Rb 13 例の研究で、有用な情報が得られた 9 例のうち 8 例では染色体異常が父親に由来していた¹⁴⁾。一方、Rb 腫瘍細胞にお

ける RFLP マーカーを用いたヘテロ接合体の消失 Loss of heterozygosity (LOH) の研究では¹⁷⁾、片側性腫瘍 10 例のうち 4 例で父親の対立遺伝子のみが残存したのに対し、両側性腫瘍 14 例のうち 13 例では父親の対立遺伝子のみが残存していた。Rb の体細胞ではどちらの親の対立遺伝子が残存するか選択されないが、生殖細胞では父親の対立遺伝子 (染色体) に変異が起りやすいことが考えられる。この親の選択性の理由として、精子の対立遺伝子が突然変異を受けやすい、あるいは易変異性が父親由来の染色体に刷り込まれているとする genomic imprinting 説のいずれかが推測されている¹⁸⁾。

散发性の Rb 症例における遺伝子診断は、Rb が子孫に遺伝するかどうかの予知に必要である。かかる症例における RB1 遺伝子の多型性の応用には限界が存在する。従来、Rb 発生には LOH が重要であると報告されている¹⁹⁾。しかし、腫瘍細胞にたとえ LOH が証明されても、多型性だけの応用では Rb 遺伝子異常が生殖細胞あるいは体細胞のいずれに発生したかを決定することは困難である。RB1 の遺伝子変異を検出する方法として RT-PCR が報告されている²⁰⁾。この方法は、細胞の mRNA から逆転写酵素により合成した cDNA を用い遺伝子変異を検出するものであるが、変異遺伝子からの mRNA の発現が抑制されている正常体細胞には応用できない。この抑制は、とくに、フレームシフトにより途中で停止コドンを生じるような変異で知られており²¹⁾、RB1 の転写が正常 RB1 から作られる Rb 蛋白により制御される説が提唱されている²²⁾。Yandell ら²³⁾は腫瘍細胞および体細胞の DNA から全エクソンを PCR 法により増幅し、その塩基配列を決定した結果、散发性で両側性の Rb 4 例のうち 3 例で生殖細胞レベルの突然変異を検出した。この方法は多大の労力と時間を必要とするものであるが、散发例の遺伝性 Rb の予知において唯一有効であると考えられる。

結 論

遺伝性 Rb の発症前診断に迅速で実用的な方法を開発することを目的に、PCR 法により RB1 遺伝子第 17 番および 20 番イントロン内 VNTR の

多型性を正常日本人50症例で検討し、遺伝性 Rb 3 家系の発症前診断あるいは染色体異常の親の起源の決定に応用した。日本人の第17および20番イントロン内 VNTR には、それぞれ4および9種類の対立遺伝子が認められ、ヘテロ接合体の頻度はそれぞれ46および64%であった。これらの VNTR の遺伝型の頻度は、対立遺伝子の頻度から算定した遺伝型の期待度数と相反しなかった。第17番イントロン VNTR 多型性の応用では1家系において、第20番イントロン VNTR の応用では、3家系すべてにおいて、診

断に有用な遺伝情報が得られた。PCR 法による第17番および20番イントロン VNTR の多型性の解析は、遺伝性 Rb の発症前診断や遺伝子あるいは染色体異常の親の起源の決定に確実かつ実用的であると考えられた。

稿を終えるあたり、御指導、御校閲を賜りました岡山大学医学部小児科学教室清野佳紀教授に深く感謝致します。また、終始直接に御指導、御教示いただきました榎原幸二助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Devesa MHS : The incidence of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* (1975) **80**, 263—265.
- 2) Vogel F : Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* (1979) **52**, 1—54.
- 3) Knudson AG : Mutations and Cancer : Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* (1971) **68**, 820—823.
- 4) Sparkes R, Sparkes M and Wilson M : Regional assignment of genes for human enterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science* (1980) **208**, 1042—1044.
- 5) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM and Dryja TP : A human DNA segment with properties of the gene that predispose to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* (1986) **323**, 643—646.
- 6) Lee WH, Bookstein R, Hong F, Yong LJ, Shew JY and Lee YH : Human retinoblastoma susceptibility gene : cloning, identification, and sequence. *Science* (1987) **235**, 1394—1399.
- 7) Horsthemke B, Barnet HJ, Greger V, Passarge E and Höpping W : Early diagnosis in hereditary retinoblastoma by detection of molecular deletion at gene locus. *Lancet* (1987) **1**, 511—512.
- 8) Wiggs J, Nordenskjöld M, Yandell D, Rapaport J, Grondin V, Janson M, Werelius B, Petersen R, Craft A, Riedel K, Liberfarb R, Walton D, Wilson W and Dryja TP : Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma, using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *N Engl J Med* (1988) **318**, 151—157.
- 9) Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E and White R : Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* (1987) **235**, 1616—1622.
- 10) Jeanpierre M : A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res* (1987) **15**, 9611.
- 11) Scharf SJ, Bowcock AM, McClure G, Klitz W, Yandell DW and Erlich HA : Amplification and characterization of the retinoblastoma gene VNTR by PCR. *Am J Hum Genet* (1992) **50**, 371—381.
- 12) Yandell DW and Dryja TP : Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* (1989) **45**, 547—555.
- 13) Brandt B, Greger V, Yandell DW, Passarge E and Horsthemke B : A simple and nonradioactive method for detecting the Rb1.20 DNA polymorphism in the retinoblastoma gene. *Am J Hum Genet* (1992) **51**, 1450—1451.

- 14) Ejima Y, Sasaki MS, Kaneko A and Tanooka H : Types, rates, origin and expressivity of chromosome mutations involving 13q14 in retinoblastoma patients. *Hum Genet* (1988) **79**, 118—123.
- 15) Goddard AD, Balakier H, Canton M, Dunn J, Squire J, Reyes E, Becker A, Phillips RA and Gallie BL : Infrequent genomic rearrangement and normal expression of the putative RB1 gene in retinoblastoma tumors. *Mol Cell Biol* (1988) **8**, 2082—2088.
- 16) Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ and Allen RC : Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by High-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* (1991) **48**, 137—144.
- 17) Zhu X, Dunn JM, Phillips RA, Goddard AD, Paton KE, Becker A and Gallie BL : Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. *Nature* (1989) **340**, 312—313.
- 18) Hall JG : Genomic imprinting : Review and relevance to human disease. *Am J Hum Genet* (1990) **46**, 857—873.
- 19) Dryja TP, Cavenee W, White R, Rapaport JM, Petersen R, Albert DM and Bruns GA : Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *N Engl J Med* (1984) **310**, 550—553.
- 20) Dunn JM, Phillips RA, Becker AJ and Gallie BL : Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* (1988) **241**, 1797—1800.
- 21) Dunn JM, Phillips RA, Zhu X, Becker and Gallie BL : Mutations in the RB1 gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol* (1989) **9**, 4596—4604.
- 22) Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, McConkie-Rosell A, Buckley EG and Dryja TP : Oncogene point mutations in the human retinoblastoma gene : their application to genetic counseling. *N Engl J Med* (1989) **321**, 1689—1695.

**VNTR polymorphism in the 17th and 20th introns of
the RB1 gene in Japanese and its application to
genetic counseling in hereditary retinoblastoma**

Shinsuke NINOMIYA

Department of Pediatrics,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Seino)

Risk estimation for siblings or offspring is important in genetic counseling of patients with hereditary retinoblastoma. The RB1 gene spans approximately 200 kb in length, containing 27 exons. The use of polymorphic markers within the RB1 gene will eliminate the need of laborious specification of a mutation. The present study determined types and frequencies of VNTR polymorphisms of the 17th and 20th introns of the RB1 gene in 50 unrelated Japanese, using PCR amplification. In the 17th intron VNTR, there were 4 alleles, which ranged from 1400 bp to 1550 bp. The most common allele was 1400 bp with a frequency of 73%, and the heterozygosity rate was 46%. In the 20th intron VNTR, there were at least 9 alleles, which ranged from 192 bp to 240 bp. The alleles were more evenly distributed than those of the 17th intron VNTR, and the heterozygosity rate was 64%. These VNTR polymorphisms were successfully applied to the prediction of retinoblastoma and to the determination of parental origin of a chromosome deletion in 3 families with hereditary retinoblastoma. Analysis of VNTR polymorphisms within the RB1 gene proves to be practical and efficient for risk estimation in hereditary retinoblastoma.