

日本人 NBCCS の 16%(5/32)は *PTCH1* 遺伝子の全欠損が原因であり、通常の方法で変異が見出されない家系に限ると、遺伝子欠損例は 63%(5/8)ということになる。以上の点から、変異陰性例ではコピー数解析が重要と考えられた。

日本人以外の NBCCS 症例で遺伝子欠損例の割合がいかほどであるのか興味のある点であり、国外からの報告が待たれる。コピー数解析には MLPA 法、定量 PCR 法が比較的簡便であるが、切断点を詳細に解析するには高みつどオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法が優れていると考えられる。

最後に本研究で明らかとなったような染色体切断点の配列データを蓄積することにより、遺伝子欠失の分子機序の解明に貢献すると考えられる。

E. 結論

今年度新たに見出された 2 家系を含めて、現在までに切断点の塩基配列まで報告されている *PTCH1* 遺伝子の欠損例をまとめて考察を加えた。日本人 NBCCS の 16%は *PTCH1* 遺伝子の全欠損が原因であり、通常の方法で変異が見出されない家系に限ると、遺伝子欠損例は 63%ということになり、変異陰性例ではコピー数解析が重要と考えられた。

本成果は NBCCS の診断率向上、経過観察に貢献するだけでなく、遺伝子欠失の分子機序の解明につながるとともに、他の遺伝性疾患や癌の診断にも応用可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe,Y., Oka,A., Mizuguchi,M., Igarashi,T., Ishikawa,S., Aburatani,H., Yokoyama,S., Asahara,H., Nagao,K., Yamada,M., and Miyashita,T. (2009). EYA4, deleted in a case with middle interhemispheric variant of holoprosencephaly, interacts with SIX3 both physically and functionally. Hum. Mutat. 30, E946-E955.

Sasaki,R., Saito,K., Watanabe,Y., Takayama,Y., Fujii,K., Agawa,K., Miyashita,T., Ando,T., and Akizuki,T. (2009). Nevroid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel PTCH gene mutations. J. Hum. Genet. 54, 398-402.

Miyauchi,J., Ito,Y., Tsukamoto,K., Takahashi,H., Ishikura,K., Sugita,K., and Miyashita,T. (2010). Blasts in transient leukaemia in neonates with Down syndrome differentiate into basophil/mast-cell and megakaryocyte lineages in vitro in association with down-regulation of truncated form of GATA1. Br. J. Haematol.

2. 学会発表

阿部裕一、島田隆史、古山晶子、星野英紀、久保田雅也、宮下俊之、岡明. 6 番染色体長腕に欠損を認めた全前脳胞症亜型における原因遺伝子についての検討、第 51 回日本小児神経学会総会、2009.5.28-30、米子

佐々木亮、齋藤加代子、宮下俊之、渡辺頼勝、藤井克則、阿川かおり、高山吉永、秋月種高、安藤智博. 多発性顎嚢胞を契機に診断した PTCH 遺伝子異常を伴った基底細胞母斑症候群、第 15 回日本家族性腫瘍学会学術集会、2009.6.12-13、東京
長尾和右、山田正夫、宮下俊之. FKBP5 ノッ

クアウト細胞株を用いたアポトーシス誘導機
序の解析、第 68 回日本癌学会総会、
2009.10.1-3、横浜

長尾和右、宮下俊之. FKBP5 ノックアウト白血
病細胞株を用いたグルコルチコイドによる
アポトーシス誘導機序の解析、第 32 回日
本分子生物学会年会、2009.12.9-12、横
浜

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含
む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

多発性顎嚢胞により Gorlin 症候群と診断した4家系

研究分担者 斎藤加代子

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター所長・教授

研究要旨

多発性顎嚢胞をきっかけに Gorlin 症候群と臨床診断した4家系の患者の末梢血からゲノム DNA を抽出し、PTCH 遺伝子検査を行い、すべてに PTCH 遺伝子変異を認め確定診断を得た。4 例の間で genotype-phenotype correlation は認めなかった。PTCH 遺伝子検査による診断の確定は、患者に将来起こりえる基底細胞癌に対する対策や早期治療、また浸透性の高さに関する理解を与えることができ重要である。

共同研究者

佐々木 亮

(所属)東京女子医科大学医学部歯科口腔外科学講座

A. 研究目的

Gorlin 症候群(または基底細胞母斑症候群)は基底細胞癌、多発性顎嚢胞、大脳鎌の石灰化など全身性に多種多様の徴候を示す常染色体優性遺伝性疾患である。原因遺伝子は体節極性遺伝子である PTCH である。多発性顎嚢胞を示し、Kimonis らの診断基準により Gorlin 症候群と臨床診断した症例に対し、原因遺伝子領域における変異分析を行い、PTCH の原因遺伝子領域のゲノム構造を臨床症状と照らし合わせて、遺伝子構造と臨床との関連を解析することを目的とした。

B. 研究方法

インフォームドコンセントの後、患者の末梢血を採取し末梢血液 10ml から、ゲノム DNA を抽出

する。ゲノム DNA の一部を連結可能匿名化して、北里大学に郵送して PTCH 遺伝子領域における変異の分析を行った。

(倫理面への配慮)

対象者に対して、遺伝子医療センターの外来において説明文書を用いて概要の説明し、理解を求め、文書により同意を得た。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、本学遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

症例1は、家族歴のない21歳男性。前頭部、側頭部の突出した顔貌を呈し、多発性顎嚢胞、手掌部の pit、二分肋骨、唇顎口蓋裂、側弯、肩甲骨の高さの非対称、大脳鎌の石灰化を認めた。多発性顎嚢胞の病理診断は角化嚢胞性歯源性腫瘍 (KCOT)であった。遺伝子解析を行い PTCH 遺伝子変異(c.3325_3328dup GGCG)を認めた。

症例2は、家族歴のない16歳男性。多発性

顎嚢胞、唇顎口蓋裂、大脳鎌の石灰化、小脳テントの石灰化像を認めた。多発性顎嚢胞の病理診断は KCOT であった。遺伝子解析を行い PTCH 遺伝子変異(c.1067+1G>C)を認めた。

症例 3 は家族歴のない 15 歳女性。多発性顎嚢胞、大脳鎌の石灰化、トルコ鞍の bridging、手掌部の pit、二分肋骨を認めた。多発性顎嚢胞の病理診断は KCOT であった。遺伝子解析を行い PTCH 遺伝子変異(c.1472delT)を認めた。

症例 4 は家族歴のある 68 歳男性。多発性顎嚢胞、顔面および背部の基底細胞癌、大脳鎌の石灰化、髄牙腫を認めた。多発性顎嚢胞の病理診断は KCOT であった。遺伝子解析を行い PTCH 遺伝子変異(c.1665T>A)を認めた。

D. 考察

Gorlin 症候群の 90%に多発性顎嚢胞が併発するとされ、特徴的な所見から本疾患を早期に診断可能である。4 例全例において X-p 上での多発性顎嚢胞が臨床診断のきっかけとなっていた。病理組織像はすべて KCOT であった。KCOT は高い再発性と組織浸潤性から 2005 年の WHO 分類から歯源性腫瘍として扱われており、慎重な経過観察が必要である。大脳鎌の石灰化も全例に認め、特徴的な所見と思われた。一方で、基底細胞癌は 68 歳の症例 4 のみに認めたが、全身性の多種多様な徴候は異時性に発症するため他の若年者の 3 例においても、UV 対策や必要以上のレントゲン検査を避けることなどの基底細胞癌への予防対策や早期発見が重要であると思われた。4 例とも異なった Phenotype と異なった Genotype であり、特定の genotype-phenotype correlation は認めなかった。

E. 結論

多発性顎嚢胞により Gorlin 症候群と臨床診

断した 4 例すべてに PTCH 遺伝子変異を認め、確定診断に至った。PTCH 遺伝子検査による診断の確定は、患者に将来起こりえる基底細胞癌に対する対策や早期治療、また浸透性の高さに関する理解を与えることができ、重要であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryo Sasaki, Kayoko Saito, Yorikatsu Watanabe, Yoshinaga Takayama, Katsunori Fujii, Kaori Agawa, Toshiyuki Miyashita, Tomohiro Ando, Tanetaka Akizuki: Nevroid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel *PTCH* gene mutations. *Journal of Human Genetics*, p1-5, 2009
- 2) Ryo Sasaki, Toshiyuki Miyashita, Naoyuki Matsumoto, Katsunori Fujii, Kayoko Saito, Tomohiro Ando. Multiple keratocystic odontogenic tumors associated with nevroid basal cell carcinoma syndrome having distinct *PTCH1* mutations: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *in press*, 2010

2. 学会発表

- 1) Ryo Sasaki, Yorikatsu Watanabe, Kayoko Saito, Katsunori Fujii, Tomohiro Ando, Yoshinaga Takayama, Toshiyuki Miyashita, Tanetaka Akizuki: NBCCS with mutation of the PTCH gene. *J Cranio-Maxillofaci Surg* 36 (2008) Suppl. 1, S174. EACMFS XIX Congress, Sep 9th-12th 2008, Bologna, Italy
- 2) 佐々木亮 斎藤加代子 渡辺頼勝 宮下俊之 阿川かおり 高山吉永 藤井克則 秋月

種高 安藤智博. 多発性顎嚢胞を契機に診断した PTCH 遺伝子異常を伴った基底細胞母斑症候群.第 15 回日本家族性腫瘍学会学術集会, 2009 年 6 月 12 日、13 日, 秋葉原コンベンションホール, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌刊行物

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Fuji, K., Minami, N., Hayashi, Y., Nishino, I., Nonaka, I., Tanabe, Y., Takanashi, J., and Kohno, Y.	Homozygous Female Becker muscular dystrophy.	Am. J. Med. Genet.	149A	1052-5.	2009
Okumura, A., Kidokoro, H., Shoji, H., Nakazawa, T., Mimaki, M., Fujii, K., Oba, H., and Shimizu, T.	Kernicteroid Syndrome of Preterm Infants.	Pediatrics	123	e1052-8	2009
Hashimoto, Y., Takanashi, J., Kaiho, K., Fujii, K., Okubo, T., Ota, S., and Kohno, Y.	A splenial lesion with transiently reduced diffusion in clinically mild encephalitis is not always reversible.	Brain Dev.	31	710-2	2009
藤井克則、宮下俊之	ヘッジホッグと形態形成 —発生生物学から臨床医学への応用—	脳と発達	41	247-252	2009
藤井克則、宮下俊之	ヘッジホッグと形態形成 —Gorlin 症候群と PTCH 遺伝子変異—	日本小児皮膚科学 会雑誌	28	65-71	2009
田辺良、藤井克則、宮下俊之、杉田克生、内川英紀、遠藤真美子、新井ひでえ、河野陽一	Gorlin 症候群における臨床的検討—主要症状を中心とした多様な症候スペクトラム—	脳と発達	41	253-257	2009
遠藤真美子、藤井克則、宮下俊之、杉田克生、内川英紀、田辺良、新井ひでえ、河野陽一	Gorlin 症候群における分子遺伝学的検討—PTCH1 遺伝子変異とその多様な変異スペクトラム—	脳と発達	41	259-263	2009
Chen, S-P., Dong, M., Kita, K., Shi, Q-W., Cong, B., Guo, W-Z., Sugaya, S., Sugita, K., and Suzuki, N.	Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of labdane and abietane diterpenoids from the pulp of Torreya nucifera in HeLa cells.	Mol. Med. Rep.			in press.

Abe, Y., Oka, A., Mizuguchi, M., Igarashi, T., Ishikawa, S., Aburatani, H., Yokoyama, S., Asahara, H., Nagao, K., Yamada, M., and Miyashita, T.	EYA4, deleted in a case with middle interhemispheric variant of holoprosencephaly, interacts with SIX3 both physically and functionally.	Hum. Mutat.	30	e946-55	2009
Miyauchi, J., Ito, Y., Tsukamoto, K., Takahashi, H., Ishikura, K., Sugita, K., and Miyashita, T.	Blasts in transient leukaemia in neonates with Down syndrome differentiate into basophil/mast-cell and megakaryocyte lineages in vitro in association with down-regulation of truncated form of GATA1	Br. J. Haematol.			2010
Sasaki, R., Saito, K., Watanabe, Y., Takayama, Y., Fujii, K., Agawa, K., Miyashita, T., Ando, T., and Akizuki, T.	Nevoid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel PTCH gene mutations	J. Hum. Genet.	54	398-402	2009
Sasaki, R., Miyashita, T., Matsumoto, N., Fujii, K., Saito, K., and Ando, T.	Multiple keratocystic odontogenic tumors associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome having distinct PTCH1 mutations: a case report	Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.			in press

IV 研究成果の刊行物・別刷

ヘッジホッグと形態形成 — Gorlin 症候群と *PTCH* 遺伝子変異 —

*¹ 千葉大学大学院医学研究院小児病態学

*² 北里大学医学部分子遺伝

藤井 克則*¹・宮下 俊之*²

ヘッジホッグと形態形成 — Gorlin 症候群と *PTCH* 遺伝子変異 —

藤井 克則^{*1}・宮下 俊之^{*2}

Hedgehog and Morphogenesis
— *PTCH* germline mutations in Gorlin syndrome patients —

Katsunori FUJII^{*1}, Toshiyuki MIYASHITA^{*2}

Key words : Gorlin 症候群, ヘッジホッグ, 形態形成, *PTCH*, *SMO*, *GLI* <J. Pediat. Dermatol., Vol. 28, No. 2, 2009>

要 旨

ヘッジホッグシグナルは動物細胞にとって形態形成と細胞増殖をコントロールするための重要な経路である。この経路はリガンドであるヘッジホッグとその受容体である *patched* (*PTCH*)、隣接タンパクの *smoothed* (*SMO*)、その下流の *GLI* (*GLI*) から構成される。Gorlin 症候群はこの *PTCH* 遺伝子変異によって発症する先天奇形と高発癌性を特徴とする常染色体優性遺伝疾患である。我々は Gorlin 症候群 25 家系 28 例の *PTCH* 解析を行い 22 家系 25 例 (88%) で遺伝子変異を同定した。*PTCH* 遺伝子解析は Gorlin 症候群の早期診断、早期治療を考える上で臨床上重要である。

はじめに

動物の形態形成メカニズムは、複雑な遺伝子群によって厳密に調節されている。中でも受精卵から個体の形態が完成するまでの一連の過程は、下等動物から哺乳動物に至るまで共通の遺伝子群によって制御されている。すなわち胚発生後 *nano* や *torso* 等の濃度勾配に従って母性効果遺伝子群が発現した後に、ギャップ遺伝子群、ペアルール遺伝子群、セグメントポラリティ遺伝子群が順次発現することにより、前後軸から体節部位が決定される¹⁾。これら普遍的な形態形成の調節機構を明らかにした業績により、1995 年のノーベル医学生理学賞は Edward B. Lewis, C. Nusslein-Volhard, Eric F. Wieschaus の三氏に贈られた²⁾。

彼らの実験ではショウジョウバエの様々な変異体が誘導されたが、正常では縞状である腹側歯状突起のパターンが、ある変異体ではハリネズミのように全身すべて歯状突起に変化することが見出された。この特異な表現型からその責任遺伝子がヘッジホッグと名づけられ、現在哺乳類では 3 種類のヘッジホッグタンパク (ソニックヘッジホッグ

^{*1} 千葉大学大学院医学研究院小児病態学
Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine

^{*2} 北里大学医学部分子遺伝
Department of Molecular Genetics, Kitasato University, School of Medicine

グ、インディアンヘッジホッグ、デザートヘッジホッグ)の存在が知られている。

このヘッジホッグシグナル伝達経路はリガンドであるヘッジホッグとその受容体である *patched* (PTCH)、隣接タンパクの *smoothed* (SMO)、その下流の Gli (GLI) から構成される。その経路の異常は、胎児期であれば形態形成異常より奇形症候群を、出生後であれば増殖調節異常より癌形成を来すことになる。

I. Gorlin 症候群とは

Gorlin 症候群 (MIM#109400) は母斑基底細胞癌症候群 (Nevoid basal cell carcinoma syndrome) とも呼ばれ、1960 年に Gorlin & Goltz によって報告された高発癌性遺伝性疾患である³⁾。顎骨内嚢胞、皮膚小陥凹、椎骨肋骨異常などの身体奇形と基底細胞癌等の腫瘍形成を特徴とし⁴⁾、1996 年にショウジョウバエの体節極性遺伝子 *patched* のヒトホモログ *PTCH1* が責任遺伝子として同定された⁵⁾⁶⁾。*PTCH1* はヘッジホッグの受容体であり、このヘッジホッグシグナル伝達経路はヒトの形態形成に重要な役割をもち、その異常は多様な症候スペクトラムを呈することが知られている。

Gorlin 症候群には今までに複数の診断基準が提唱されているが^{7)~9)}、中でも Kimonis らの診断基準が临床上最も汎用されている⁷⁾。その内容は 6 つの大項目 (基底細胞癌、顎骨嚢胞、手掌足底小陥凹、大脳鎌石灰化、肋骨異常、第 1 度近親の本症家族歴) と 6 つの小項目 (大頭症、先天奇形、骨格異常、X 線異常、卵巣線維腫、髄芽腫) からなり、2 つの大項目、あるいは 1 つの大項目と 2 つの小項目があれば Gorlin 症候群と診断できる。しかしながら、本疾患では主要症候が診断の契機になるものの、幼少期には必ずしもそれらが出現せず、さらにこれ以外の症状も临床上散見されるため、早期診断が困難なことがある。また常染色体優性遺伝でありながら新規の突然変異が多く、家族歴が存在しない症例も多い。

II. Gorlin 症候群における *PTCH1* 遺伝子変異

Gorlin 症候群の責任遺伝子である *PTCH1* はヒト 9 番染色体上で 24 個のエクソンから構成され、1447 個のアミノ酸をコードしている。*PTCH1* は 12 個の膜貫通領域、2 個の細胞外大ループ、1 個の細胞内大ループを有する 12 回膜貫通型細胞膜タンパクであり、Sonic hedgehog の受容体として機能する⁶⁾。*PTCH1* 遺伝子変異のデータベースがインターネット上で公開されており (www.cybergene.se/PTCH/)、現在までに 160 以上の変異が同定されている。また *PTCH1* には選択的スプライシングに由来する様々なアイソフォームが存在し、それらが臓器特異的に発現することも報告されている^{10)~12)}。欧州とオーストラリアからの *PTCH1* 遺伝子解析の多症例の報告はあるものの^{13)~16)}、アジアからの多症例の報告は少なく人種差について不明な点が多い。

我々はこの *PTCH1* 遺伝子解析を系統的に行い、その臨床像と遺伝子変異について報告を重ねてきた^{17)~19)}。今回新たに我々は、Kimonis の診断基準⁷⁾を満たす 25 家系 28 名の日本人 Gorlin 症候群患者の *PTCH1* 変異とその内容を検討した。

1) 対象

対象は 1997 年 4 月から 2009 年 4 月にかけて、Kimonis の診断基準⁷⁾を満たし Gorlin 症候群と考えられた 25 家系 28 例である。書面によるインフォームドコンセントを得た後、千葉大学大学院医学研究院小児病態学、国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部、および北里大学医学部分子遺伝において、*PTCH1* 遺伝子検査または染色体検査を施行した。なお 7 家系 8 例の *PTCH1* 遺伝子解析¹⁷⁾、および *PTCH1* ヘテロ全欠失を持つ 3 家系 4 例の遺伝子解析¹⁹⁾についてはすでに報告した。

2) 方法

臨床所見より Kimonis の診断基準に合致した

表 1 Gorlin 症候群患者における *PTCH1* 遺伝子変異

症例	エクソン	遺伝子変異	変異による影響	変異部位
挿入 / 欠失変異				
G15	3	c.459delT	フレームシフト	細胞外ループ 1
G28	3	c.479_482delAGAC	フレームシフト	細胞外ループ 1
G1 *	6	c.915delC	フレームシフト	細胞外ループ 1
G2 *	6	c.915delC	フレームシフト	細胞外ループ 1
G4	9	c.1261_1262insT	フレームシフト	細胞外ループ 1
G14	10	c.1416_1419dupTGGC	フレームシフト	細胞内ループ
G3	14	c.2011delC	フレームシフト	細胞内ループ
G21	17	c.2724_2725insT	フレームシフト	細胞外ループ 2
G11 §	18	c.3130_3131dupGC	フレームシフト	膜貫通領域 8
G12 §	18	c.3130_3131dupGC	フレームシフト	膜貫通領域 8
G30	20	c.3325_3328dupGGCG	フレームシフト	細胞内ループ
G20	20	c.3364_3365delAT	フレームシフト	細胞内ループ
G31	20	c.1472delT	フレームシフト	細胞内ループ
ナンセンス変異				
G25	3	c.550C>T	p.Q184X	細胞外ループ 1
G26	15	c.2446C>T	p.Q816X	細胞外ループ 2
スプライス変異				
G17	3	c.584G>A	異常スプライス→タンパク短縮	細胞外ループ 1
G9	6 (Intron)	c.945+5G>T	アミノ酸 29 個欠失	細胞外ループ 1
G29	7 (Intron)	c.1067+1G>C	異常スプライス→タンパク短縮	細胞外ループ 1
ミスセンス変異				
G8	11	c.1526G>A	p.G509D	膜貫通領域 4
G32	19	c.3257T>G	p.L1086R	膜貫通領域 10
G34	12	c.1665G>A	p.N555K	膜貫通領域 5
遺伝子欠損				
G5	1 ~ 23	whole gene deletion (11.0 Mb)	ヘテロ欠失	
G10	1 ~ 23	whole gene deletion (5.3 Mb)	ヘテロ欠失	
G19 ‡	1 ~ 23	whole gene deletion (165 kb)	ヘテロ欠失	
G27 ‡	1 ~ 23	whole gene deletion (165 kb)	ヘテロ欠失	
遺伝子変異 不明				
G6		不明		
G7		不明		
G13		不明		

*, §, ‡ はそれぞれ同一家系であることを示す。塩基番号は Genbank 番号 U59464 の最初の ATG の A を 1 としたものの。

日本人の Gorlin 症候群患者の末梢血リンパ球より DNA を抽出し, *PTCH1* の全エクソンを PCR direct sequence 法により遺伝子解析を行った。なお, これらで変異を認めなかった症例に対してはさらに Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法 (SALSA MLPA KIT P067 PTCH / Gorlin, MRC-Holland, Nether-

lands), 高精度オリゴヌクレオチドアレイ法により遺伝子欠損の解析を行った。

なお, この *PTCH1* 遺伝子研究については千葉大学大学院医学研究院, 国立成育医療センター研究所, 北里大学医学部の倫理委員会の承認を得て行われた。

表2 Gorlin 症候群 28 症例のまとめ

症例		年齢 (歳)	性別	遺伝子変異	Kimonis の診断基準に含まれる臨床症状	Kimonis の診断基準に含まれない臨床症状
1 [†]	G1	18	f	c.915delC frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、二分肋骨、家族歴あり、大頭、粗野顔貌、眼間開離	基底細胞母斑、脳梁低形成、interhemispheric lipoma、側弯症、empty sella
2 [†]	G2	16	f	c.915delC frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、二分肋骨、家族歴あり、大頭、粗野顔貌、眼間開離	基底細胞母斑、empty sella、心臓腫瘍 (心室内線維腫)、側弯症
3	G3	59	f	c.2011delC frameshift	基底細胞癌、顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、眼間開離	基底細胞母斑、中手骨短縮
4	G4	17	f	c.1261-1262insT frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、肋骨異常、大頭、前頭突出、粗野顔貌、眼間開離、sprengel 変形	基底細胞母斑、精神運動発達遅滞、脳梁欠損、潰瘍性大腸炎、empty sella
5	G5	12	m	whole gene deletion (11.0 Mb)	基底細胞癌、顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化、大頭、眼間開離	精神運動発達遅滞、小脳テント石灰化、脳梁低形成、てんかん、中手骨短縮
6	G6	19	m	全シークエンス変異なし	顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化	精神運動発達遅滞、クモ膜嚢胞、肥満、小脳テント石灰化、empty sella
7	G7	13	f	全シークエンス変異なし	顎骨嚢胞、肋骨異常	基底細胞母斑、慢性糸球体腎炎
8	G8	66	m	c.1526G>A missense mutation	基底細胞癌、顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化	—
9	G9	5	m	c.945+5G>T splice mutation	皮膚小陥凹、二分肋骨、大頭、前頭突出、眼間開離、トルコ鞍形成異常	精神運動発達遅滞、眼底腫瘍、白内障、脳室拡大
10	G10	8	m	whole gene deletion (5.3 Mb)	皮膚小陥凹、家族歴あり、Sprengel 変形、胸部変形、胸椎癒合不全	基底細胞母斑、精神運動発達遅滞、水頭症、てんかん、中手骨短縮
11 [†]	G11	3	m	c.3130_3131 dupGC frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、二分肋骨、家族歴あり	甲状腺機能障害、多足趾症、水腎症、水頭症
12 [†]	G12	37	f	c.3130_3131 dupGC frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、家族歴あり、胸部変形	腰部脂肪腫
13	G13	43	m	全シークエンス変異なし	皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、大頭、粗野顔貌、眼間開離、sprengel 奇形、胸部変形	基底細胞母斑、精神運動発達遅滞
14	G14	3	m	c.1416_1419 dupTGGC frameshift	大脳鎌石灰化、皮膚小陥凹、肋骨形成異常	基底細胞母斑、精神運動発達遅滞、West 症候群
15	G15	27	f	c.459delT frameshift	基底細胞癌、顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、二分肋骨、眼間開離、合指症、二分脊椎	—
16	G17	61	m	c.584G>A splice mutation	基底細胞癌、顎骨嚢胞、皮膚小陥凹	基底細胞母斑、水頭症
17 [†]	G19	10	m	whole gene deletion (165 kb)	顎骨嚢胞、肋骨の肥厚、家族歴あり、大頭、前頭突出、粗野顔貌、眼間開離、皮膚合指症	小脳テント石灰化、中手骨短縮
18 [†]	G27	43	f	whole gene deletion (165 kb)	家族歴あり、大頭、粗野顔貌、眼間開離	—
19	G20	10	m	c.3361_3365 delAT frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大頭、口唇口蓋裂	基底細胞母斑
20	G21	26	f	c.2721_2725 insT frameshift	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、家族歴あり、粗野顔貌、眼間開離、二分脊椎、卵巣線維腫	—
21	G25	20	f	c.550C>T nonsense mutation	顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化、卵巣線維腫	脳腫瘍 (pilocytic astrocytoma)、側弯症
22	G26	10	f	c.2446C>T nonsense mutation	顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化、大頭、前頭突出、粗野顔貌、眼間開離	—
23	G28	40	m	c.479_482 delAGAC frameshift	顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化、二分肋骨、大頭、粗野顔貌、眼間開離	—
24	G29	16	m	c.1067+1G>C	顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化、大頭、粗野顔貌、眼間開離、口唇口蓋裂、トルコ鞍骨性架橋	—
25	G30	23	m	c.3325_3328dupGGCG	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、二分肋骨、口唇口蓋裂、sprengel 変形、トルコ鞍骨性架橋、椎骨異常	—
26	G31	16	f	c.1472delT	顎骨嚢胞、皮膚小陥凹、大脳鎌石灰化、大頭症	精神発達遅滞
27	G32	15	m	c.3257T>G (p.L1086R)	顎骨嚢胞、髄芽腫、側弯症、大頭症	精神発達遅滞
28	G34	67	m	c.1665G>A (p.N555K) missense mutation	基底細胞癌、顎骨嚢胞、大脳鎌石灰化、髄芽腫、家族歴あり	精神発達遅滞

† 1 年齢は、遺伝子検査または染色体検査施行時のもの。

† 2 症例 1, 2、症例 11, 12、症例 17, 18 は同一家系症例。

3) 結果

Gorlin 症候群と臨床診断された 25 家系 28 例中、*PTCH1* 遺伝子変異は 22 家系 25 例 (88 %) で同定された (表 1)。変異内容の中で最も多かったのは 4 塩基までの挿入 / 欠失変異であり 11 家系 13 例 (44 %) に認められた。1 塩基置換によるミスセンス変異は 3 家系 3 例 (12 %) に認められ、その 3 例とも Sterol-sensing domain (SSD) の膜貫通領域に存在する変異であった。その他ナンセンス変異 2 家系 2 例 (8 %), スプライス変異 3 家系 3 例 (12 %), *PTCH1* がヘテロ全欠失しているものが 3 家系 4 例 (12 %) であった。この中でヘテロ全欠失は MLPA 法で全エクソンにわたり信号が半減しており、高精度オリゴヌクレオチドアレイで G5, G10, G19 それぞれ 11.0Mb, 5.3Mb, 165kb にわたりヘテロ接合性に欠失していることが判明した。ヘテロ全欠失以外の 19 変異の *PTCH1* タンパク内部は細胞外ループ 10 例 (53 %), 細胞内ループ 5 例 (26 %), 膜貫通領域 4 例 (21 %) であった。同一家系以外での同一変異はなく、*PTCH1* 変異の明らかな hot spot は我々の検討では認めなかった。

これらの検討では 22 家系 25 例 (88 %) で *PTCH1* 遺伝子変異を同定することができた。遺伝子型と表現型について相関はないとされているが、我々の結果でも同様だった (表 2)。従来の *PTCH1* 遺伝子変異の同定率は 50 % 以下とされており²⁰⁾²¹⁾、我々の検討ではそれらと比較してより高率であった。

この理由として次の三つが考えられる。第一に欧米との人種的相違が考えられる。従来報告は主に白人中心であり、アジア人種でのまとまった報告は少ない。*PTCH1* 変異検出率が日本人でより高率かどうかについては、今後さらなる症例数の蓄積が望まれる。第二に変異解析方法として PCR direct sequence 法を採用し全エクソンのシーケンスを行ったことである。この方法でも変異が同定されない場合には MLPA 法および高精度オリゴヌクレオチドアレイ法を組み合わせることさらに 3 家系 4 例 (12 %) の *PTCH1* ヘテロ全欠失を証明することができた。第三に従来報

告されていたプライマーを改良してスプライシング部位を含む広範囲に再設定しなおした点である¹⁷⁾。これにより変異の見落としが減少し、スプライシング部位を含む変異 2 例を同定することができた。

我々が同定した *PTCH1* 変異の種類は従来報告とほぼ同等の頻度で検出され、53 % が塩基の挿入 / 欠失変異であった。これらはフレームシフトを来し、結果として不完全タンパクが生じて、Gorlin 症候群を発症したと考えられる。また一塩基置換によるミスセンス変異も認められたが、このうち G509 の変異は以前報告されている²²⁾²³⁾。この変異は SSD の一部である第 4 膜貫通領域に存在した。SSD はコレステロールや細胞内小胞の輸送に重要な役割をもち、PTCH のみならずいくつかの膜タンパクで相同性が確認されている²⁴⁾。*PTCH1* では G509 以外にも SSD、特に第 4 膜貫通領域にミスセンス変異が多いことが報告されており²²⁾、この変異部位が Gorlin 症候群の発症に関与したことが考えられる。

PTCH1 遺伝子変異部位は *PTCH1* のほぼ全領域に分布していたが、細胞内外ループにあるものが全体の 85 % を占めた。Lindström らは *PTCH* 変異データベースの解析を行い、変異部位は細胞内外ループに 67 % と遺伝子多型群と比較し有意に多いと報告しており²⁵⁾、今回の解析結果はそれと矛盾しないものだった。*PTCH1* タンパクは Sonic Hedgehog の受容体であることから、細胞内外ループの遺伝子変異によりタンパク構造が変化することで受容体機能が低下し疾患発症に関与していると考えられる。

また我々の検討では、3 家系 4 例において MLPA 法と高精度オリゴヌクレオチドアレイを用いることでヘテロ接合性欠失を証明することができた。この中で G19 症例では遺伝子欠失範囲が 165kb と小さく、*PTCH1* 遺伝子のみが欠失していた¹⁹⁾。このことは、Gorlin 症候群の発症機序が *PTCH1* 変異による優勢阻害効果ではなく、ハプロ不全によるものであることを示している。このように PCR direct sequence 法で遺伝子変異が証明できない場合でも MLPA 法ないし高精度

ヌクレオチドアレイ法によつて的確にヘテロ接合性欠失を証明できることが示された。

なお、我々の検討では *PTCH1* 遺伝子変異を検出できない症例が3例存在した。これらは Gorlin 症候群の診断基準を満たしていることから *PTCH1* 発現を調節するプロモーター領域の異常、ないし未知のヘッジホッグシグナル調節障害が存在する可能性がある。これら異常を示唆する報告は現在まで出ていないが、今後プロモーター領域の解析やヘッジホッグシグナル伝達に関わる遺伝子群についても検討を行う必要がある。

今回の我々の検討で、日本人 Gorlin 症候群患者における *PTCH1* 遺伝子変異とその分布も明らかになった。Gorlin 症候群には易腫瘍形成性があり早期発見・早期治療が望ましい。小児期の Gorlin 症候群では早期に特徴的な臨床症状がそろわないことがあるため、積極的に *PTCH1* 遺伝子解析を行って早期診断に努め、その時点で注意深い経過観察と可能な治療に入ることが重要である。

III. Gorlin 症候群の今後の展望

近年 cyclopamine というアルカロイド物質がヘッジホッグ経路の構成分子である SMO に結合してヘッジホッグシグナル伝達経路を阻害することが判明している²⁵⁾。このことは形態形成期であればこの cyclopamine によりヘッジホッグシグナルが阻害されて身体奇形が生じるが、形態形成が終了した出生後であれば、奇形を生じることなくこの経路に依存的な腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

この cyclopamine をモデルマウスに投与することで髄芽腫が消失したり²⁶⁾、胃癌や膵臓癌が縮小、消退することがすでに報告されている²⁷⁾²⁸⁾。しかしながらマウスモデルにおいて髄芽腫を阻害剤 HhAntag より治療したところ、短期間の治療であったにもかかわらず骨の成長に影響があったことから、小児への投与には神経系の細胞に特異的に効果のある新たな誘導体の開発、投与法の再考等が必要である^{29)~31)}。

この cyclopamine を構造的に大量生産できな

いことが臨床応用にあたっての最大の問題点であったが、近年細胞を用いたスクリーニングシステムが開発され cyclopamine 類似の低分子化合物が相次いで発見された^{32)~34)}。実際にはすでに Genetech 社の阻害剤が進行性基底細胞癌に対して phase I 試験で著効を示している²⁹⁾³⁰⁾、今後はこうした分子の臨床応用が進み、こうした薬剤が基底細胞癌を始めとした腫瘍治療に使用される日も近いだろう。

発生生物学上のヘッジホッグタンパクの発見から25年以上が経過して、ヒトの疾病治療に応用される時代となった。今後も本経路の分子メカニズムの解明を受けて臨床応用が進んでいくと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「Gorlin 症候群の病態解明と治療法確立のための臨床的研究」(H21—難治—一般—058)、および平成21年度科学研究費補助金(基盤研究(C) 課題番号21591313)の補助により行われた。

文 献

- 1) Dean M. Polarity, proliferation and the hedgehog pathway. *Nat Genet* 1996;14:245-247.
- 2) Cohen B. Nobel committee rewards pioneers of development studies in fruitflies. *Nature* 1995;377:465.
- 3) Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med* 1960;262:908-912.
- 4) Gorlin RJ. Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine* 1987;66:98-113.
- 5) Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, et al.: Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996;85:841-851.
- 6) Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al.: Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996;272:1668-1671.
- 7) Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 69:299-308.
- 8) Evans DGR, Ladusaris EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the

- naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet* 1993; 30:460-464.
- 9) Shanley S, Ratcliffe J, Hockey A, et al.: Nevoid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. *Am J Med Genet* 1994;50:282-290.
 - 10) Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons. *Genomics* 2005;85:462-471.
 - 11) Nagao K, Togawa N, Fujii K, et al. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the PTCH gene with exon junction microarrays. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3379-3388.
 - 12) Uchikawa H, Toyoda M, Nagao K, et al. Brain- and heart-specific Patched-1 containing exon 12b is a dominant negative isoform and is expressed in medulloblastomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:277-283.
 - 13) Lindström E, Shimokawa T, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat* 2006;27:215-219.
 - 14) Marsh A, Wicking C, Wainwright B, Chenevix-Trench G. DHPLC analysis of patients with Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome reveals novel PTCH missense mutations in the sterol-sensing domain. *Hum Mutat* 2005;26:283.
 - 15) Savino M, d' Apolito M, Formica V, et al. Spectrum of PTCH mutations in Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients: identification of thirteen novel alleles. *Hum Mutat* 2004;24:441.
 - 16) Pastorino L, Cusano R, Nasti S, et al. Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat* 2005;25:322-323.
 - 17) Fujii K, Kohno Y, Sugita K, et al. Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat* 2003;21:451-452.
 - 18) Fujii K, Miyashita T, Omata T, et al.: Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese girl. *Am J Med Genet* 2003;121:65-68.
 - 19) Fujii K, Ishikawa S, Uchikawa H, et al.: High density oligonucleotide array with sub-kilobase resolution reveals breakpoint information of submicroscopic deletions in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Hum Genet* 2007;122:459-466.
 - 20) Marsh A, Wicking C, Wainwright B, Chenevix-Trench G. DHPLC analysis of patients with Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome reveals novel PTCH missense mutations in the sterol-sensing domain. *Hum Mutat* 2005;26:283.
 - 21) Pastorino L, Cusano R, Nasti S, et al.: Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat* 2005;25:322-323.
 - 22) Lindström E, Shimokawa T, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat* 2006;27:215-219.
 - 23) Chidambaram A, Goldstein AM, Gailani MR, Gerrard B, Bale SJ, DiGiovanna JJ, Bale AE, Dean M. Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in Caucasian and African-American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Cancer Res.* 1996;56:4599-4601
 - 24) Lum L, Beachy PA. The hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 2004; 304:1755-1759.
 - 25) Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000; 406:1005-1009.
 - 26) Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002;297:1559-1561.
 - 27) Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003;425:846-851.
 - 28) Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003 23:425:851-856.
 - 29) Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 2008;22:2454-2472.
 - 30) Garber K. Hedgehog drugs begin to show results. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:692-697.
 - 31) Kimura H, Ng JM, Curran T. Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure. *Cancer Cell* 2008;13:249-260.
 - 32) Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:1026-1033.
 - 33) Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14071-14076.
 - 34) Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, et al. Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4616-4621.
- 別刷請求先：〒260-8670
千葉市中央区亥鼻1-8-1
千葉大学大学院医学研究院小児病態学
藤井 克則

