

表 2 第一次調査結果

	全体	歯科 口腔外科	小児科 遺伝科	脳神経外科	皮膚科
対象施設数	1916	414	423	479	600
有効回答数	1107	213	306	246	342
回答率(%)	57.8	51.6	72.3	50.9	56.7
「あり」施設数	146	77	12	6	51
「あり」施設 /回答施設(%)	13.1	35.7	3.9	2.4	14.9
症例数	311	192	28	8	83

表 3 第二次調査結果

	全体	歯科 口腔外科	小児科 遺伝科	脳神経外科	皮膚科	神経内科
送付施設数	159	78	22	7	51	1
回答施設数	67	27	13	2	24	1
回答率(%)	41.9	40.3	59.1	28.6	47.1	100
患者数	157	75	32	2	46	1

図 1 全体の年齢分布

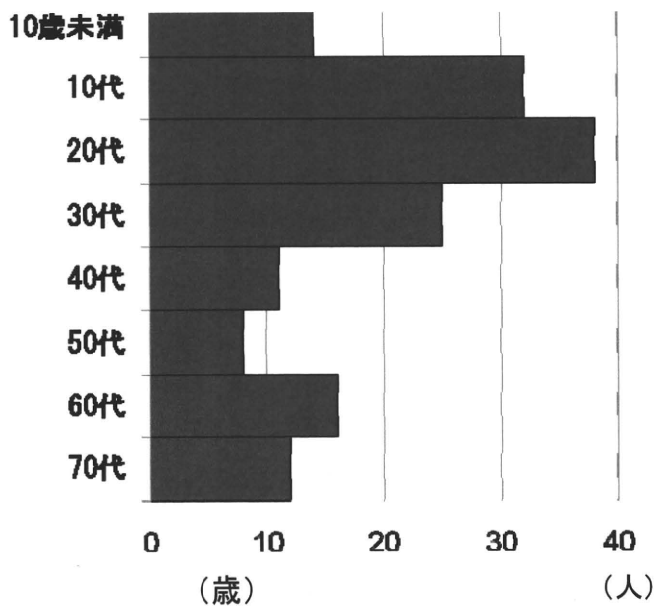


図 2 年齢別各科割合

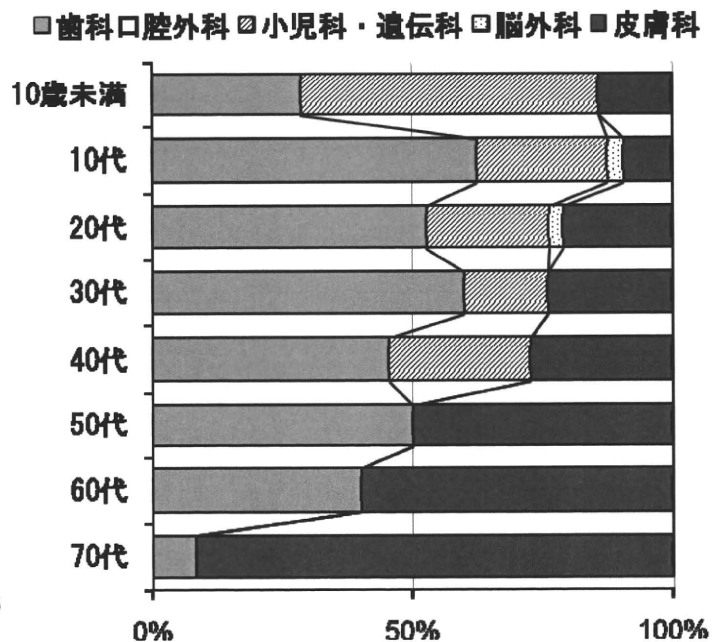
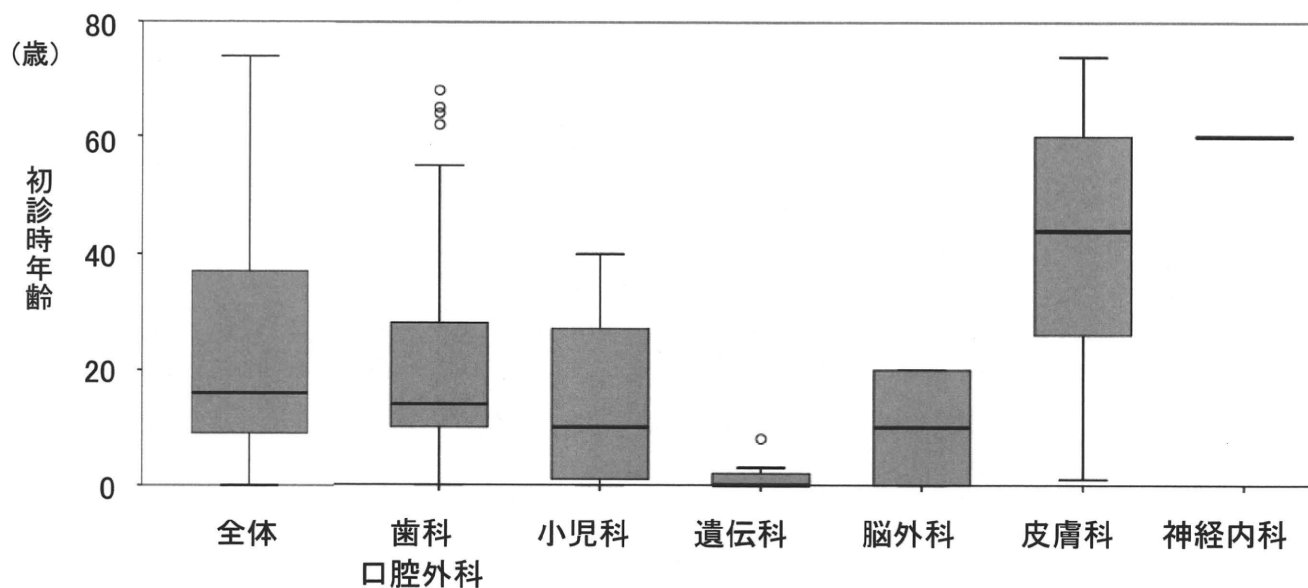


図3 各科別初診時年齢分布

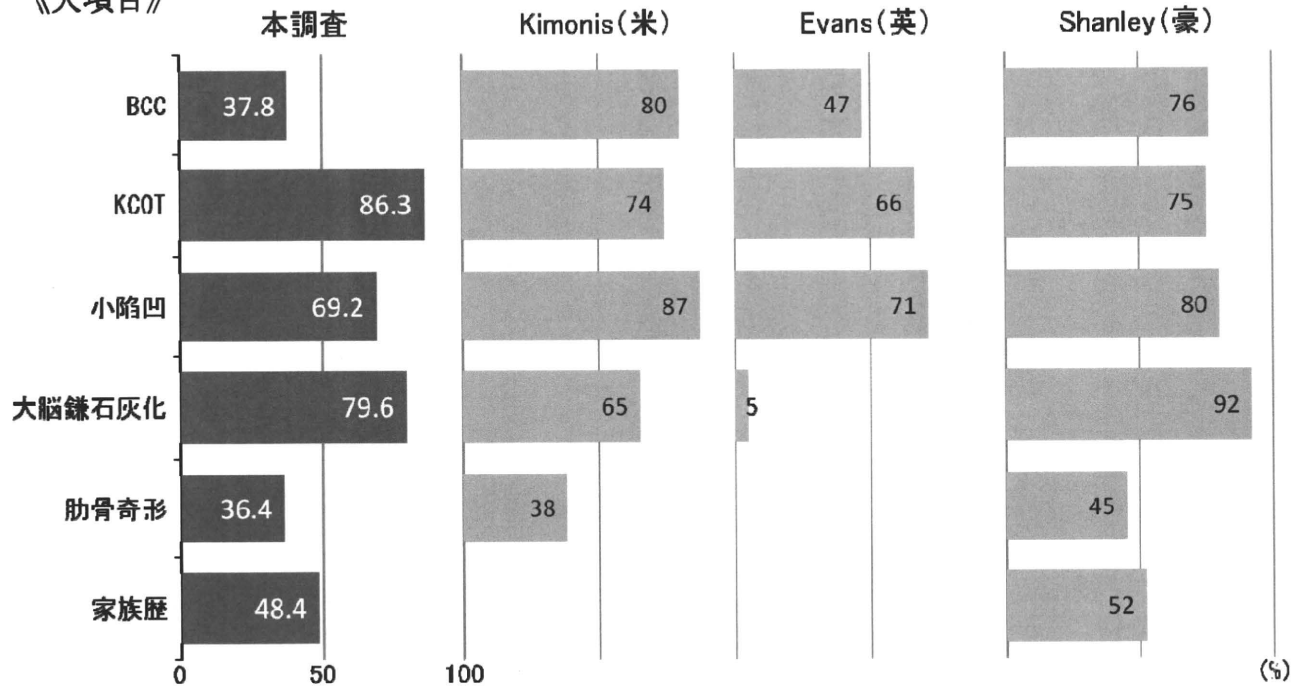


	全体	歯科 口腔外科	小児科	遺伝科	脳外科	皮膚科	神経内科
平均年齢(歳)	24.4	19.9	13.8	1.56	10.0	41.6	60
SD	21.1	16.4	14.1	2.65	14.1	21.3	—
最小値(月)	0	1	0	0	0	22	
中央値(歳)	16.0	14.0	10.0	0.0	10.0	44.0	
最大値(歳)	74	68	40	8	20y	74	

表4 他の大規模調査との比較

	我々の調査 (日本)	Kimonisら (米)	Evansら (英)	Shanleyら (豪)
症例数	157	105	84	118
家系数	139	26	29	64
平均年齢(歳)	33.1	34.5	N.A.	35
男女比	1.1 : 1	1 : 1.2	1 : 1.3	1 : 1.3
BCCあり症例数(%)	56/148 (37.8)	71/90 (80) <sup>a**</sup>	33/70 (47)	90/118 (76) <sup>**</sup>
20歳以上(%)	53/103 (51.4)	58/64 (91) <sup>a**</sup>	33/45 (73) <sup>*</sup>	71/84 (85) <sup>**</sup>
40歳以上(%)	33/46 (71.7)	34/35 (97) <sup>a*</sup>	19/21 (90)	35/37 (95) <sup>*</sup>
BCC平均発症年齢(歳)	37.4	21.4	N.A.	20.3
KCOTあり症例数(%)	126/146 (86.3)	78/105 (74) <sup>*</sup>	46/70 (66) <sup>**</sup>	85/113 (75) <sup>*</sup>
20歳以上(%)	92/101 (91.1)	60/74 (81)	37/45 (82)	66/82 (80) <sup>*</sup>
40歳以上(%)	32/39 (82.0)	29/38 (76)	19/21 (90)	25/35 (71)
一症例のKCOT個数(平均)	1-10 (3.68)	1-28 (5.1)	N.A.	1-28 (6)
KCOT平均発症年齢(歳)	19.8	17.3	N.A.	15.5
手掌/足底の小陥凹(%)	86/143 (60.1)	89/102 (87) <sup>**</sup>	50/70 (71)	82/103 (80)
口唇裂/口蓋裂(%)	12/133 (9.0)	3/103 (3)	4/70 (5)	4/107 (4)
大脳鎌石灰化(%)	78/98 (79.6)	53/82 (65) <sup>*</sup>	N.A.	81/89 (92) <sup>*</sup>
髄芽腫(%)	4/120 (3.3)	4/105 (4)	3/84 (4)	1/118 (1)
卵巣線維腫(%)	5/40 (12.5)	9/52 (17)	6/25 (24)	9/63 (14)

図4 診断基準項目の比較  
《大項目》



《小項目》

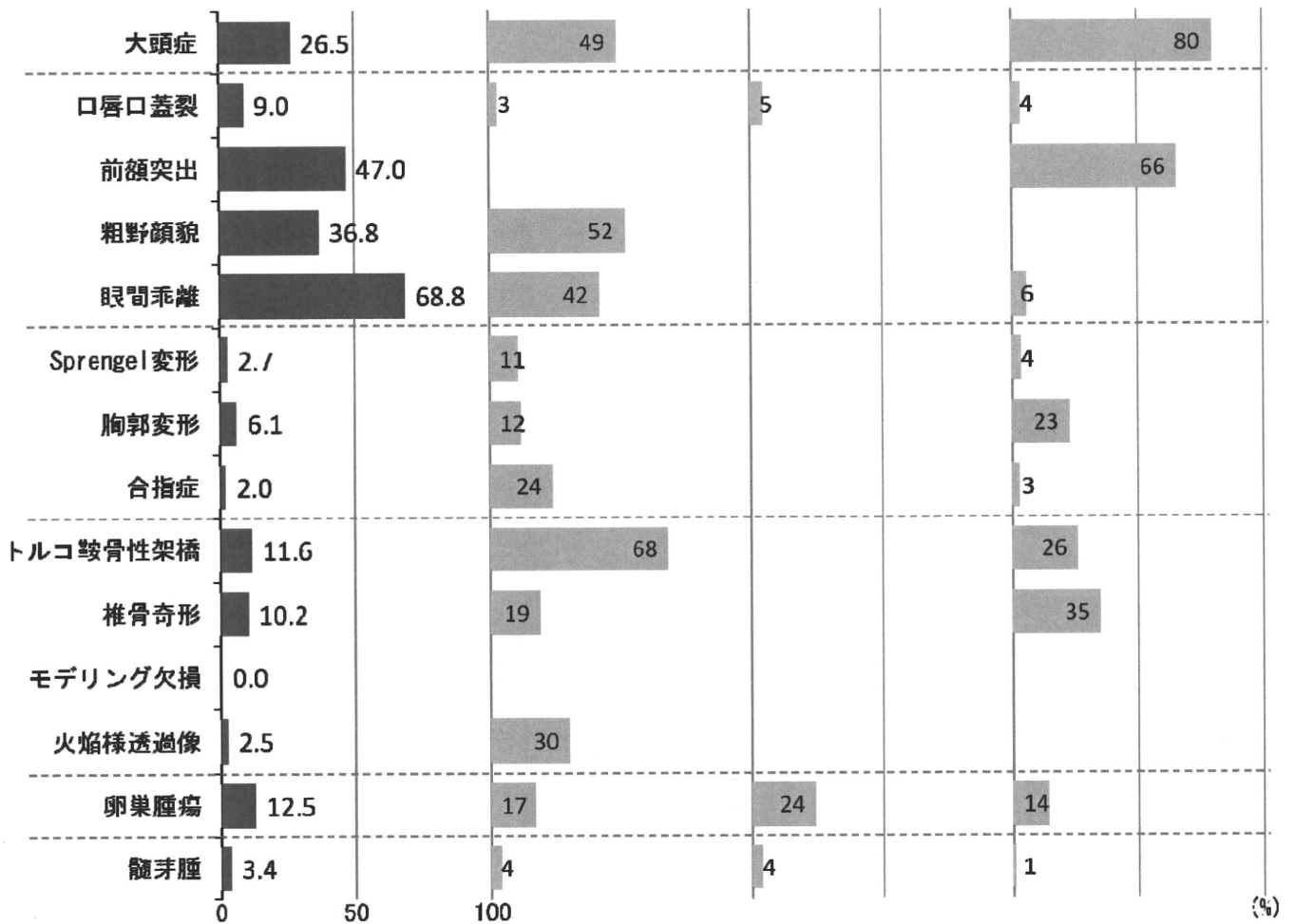


表 5 本邦における Gorlin 症候群の合併症頻度

50%以上		
角化嚢胞性歯原性腫瘍	126/146	86.3%
大脳鎌石灰化	77/97	79.4%
手掌・足底の小陥凹	99/143	69.2%
眼間解離	97/141	68.8%
幅広い鼻根部	73/125	58.4%
15~49%		
家族歴あり	62/128	48.4%
前頭突出	63/134	47.0%
家族内腫瘍発症	41/93	44.1%
高く弓なりの眉	51/116	44.0%
基底細胞癌	56/148	37.8%
粗野顔貌	43/117	27.9%
肋骨奇形	44/121	36.4%
大頭症	36/136	26.5%
顎前突症	30/119	25.2%
トルコ鞍骨性架橋	18/76	23.7%
精神遅滞	24/136	17.6%
水頭症	22/136	16.2%
椎骨奇形	16/106	15.1%
14%以下		
卵巣線維腫	5/40	12.5%
第4指中手骨短縮	4/38	10.5%
口唇裂/口蓋裂	12/133	9.0%
てんかん	12/134	9.0%
胸郭変形	8/118	6.1%
髓芽腫	4/120	3.3%
Splengel 変形	3/102	2.7%
手足の火焰様透亮像	1/40	2.5%
心臓線維腫	2/95	2.1%
合指趾症	3/143	2.1%
多指趾症	2/134	1.5%
手足のモデリング欠損	0/49	0%

図5 基底細胞癌の年齢分布

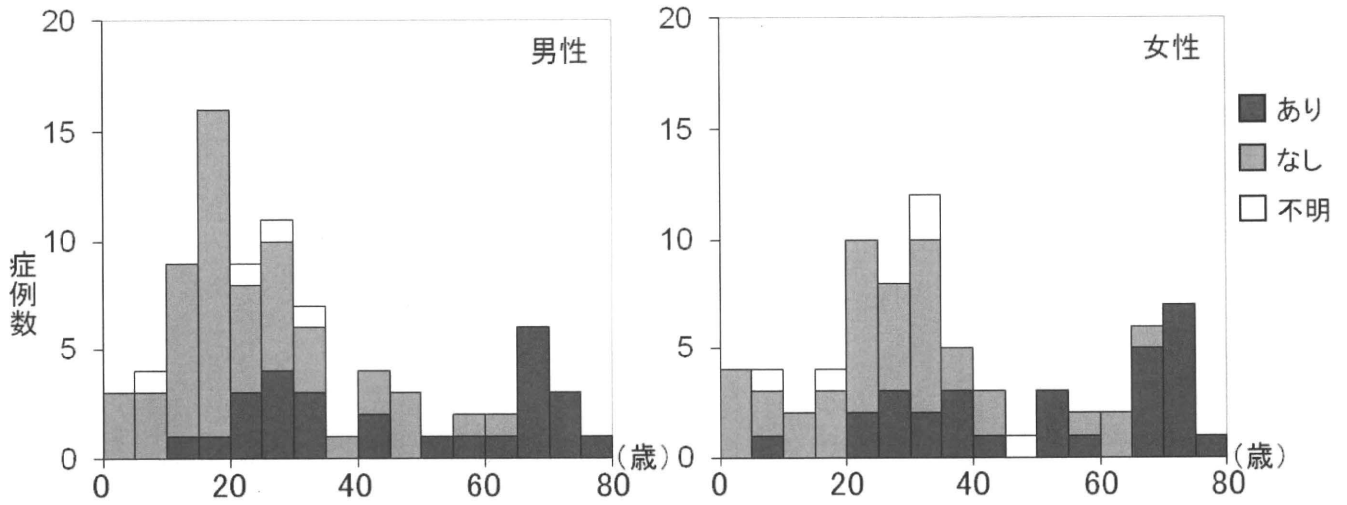


図6 基底細胞癌の累積発症率曲線

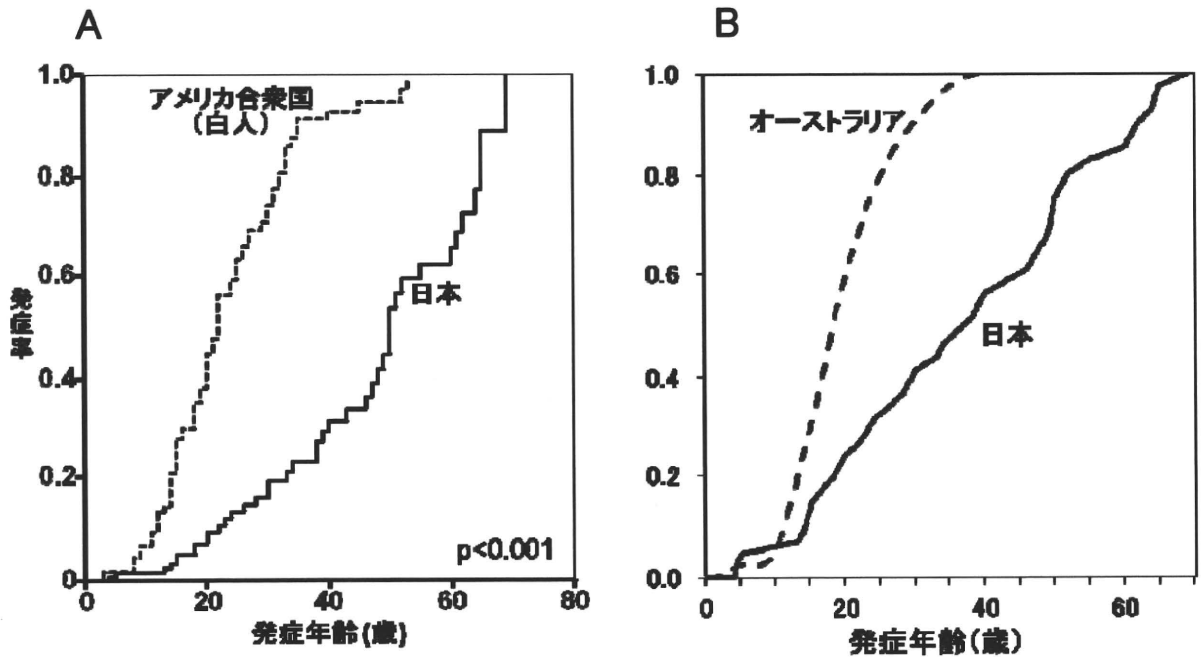


図7 基底細胞癌の個数と年齢

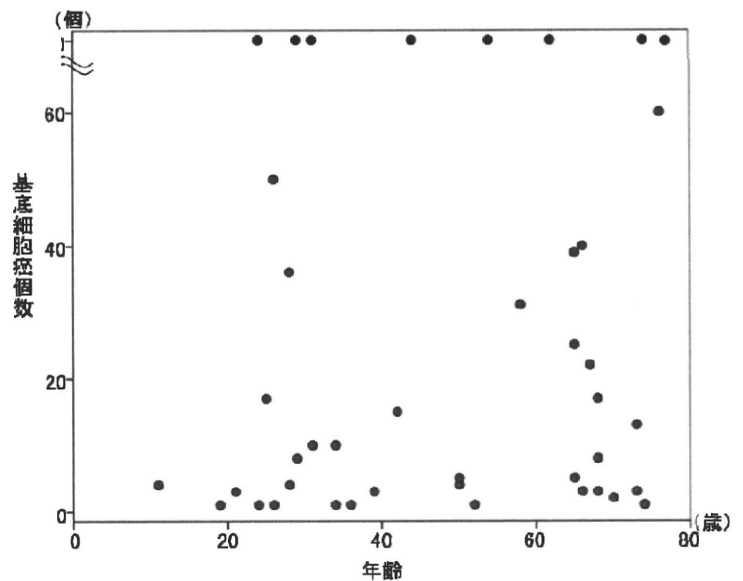


図8 角化嚢胞性歯原性腫瘍の年齢分布

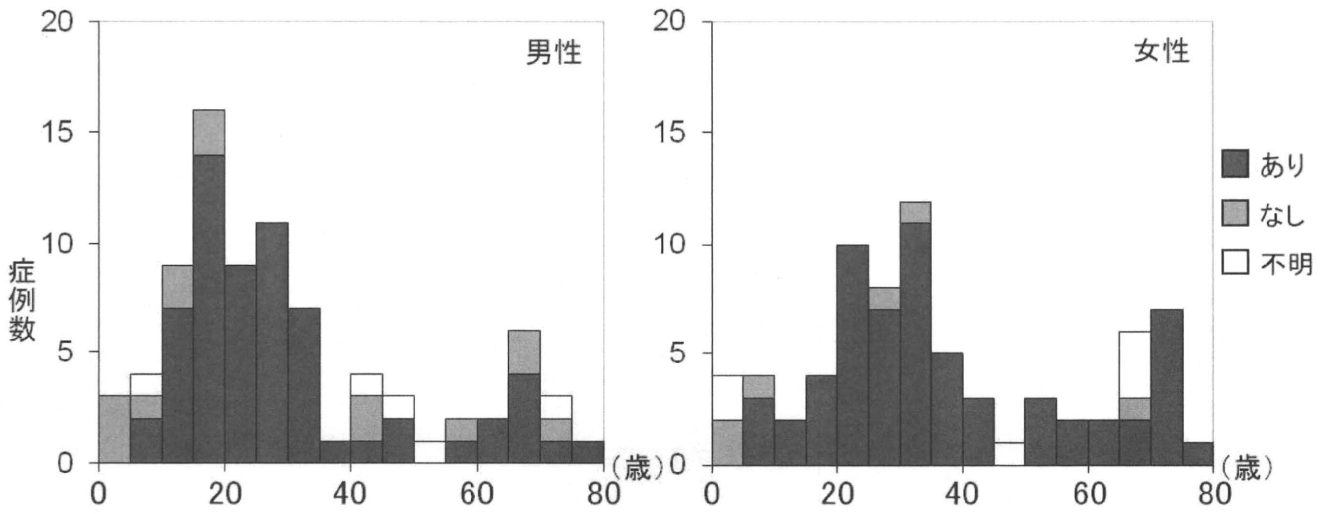


図9 角化嚢胞性歯原性腫瘍の累積発症率曲線

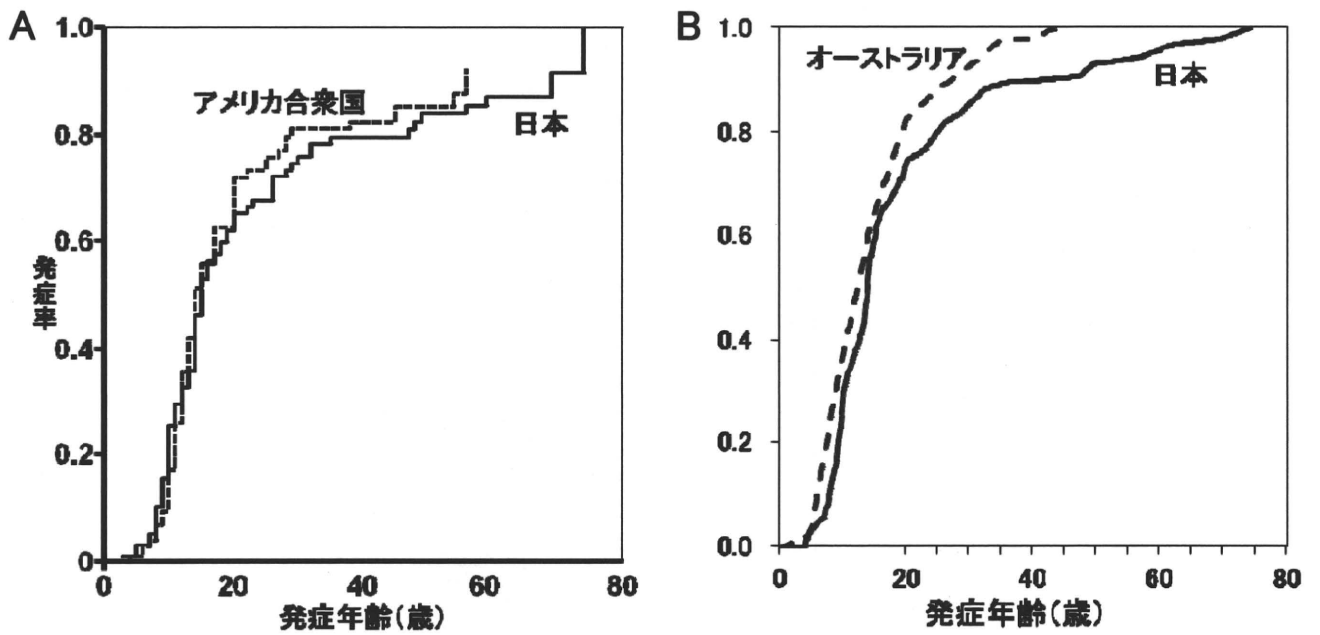


図10 角化嚢胞性歯原性腫瘍の個数と発症年齢

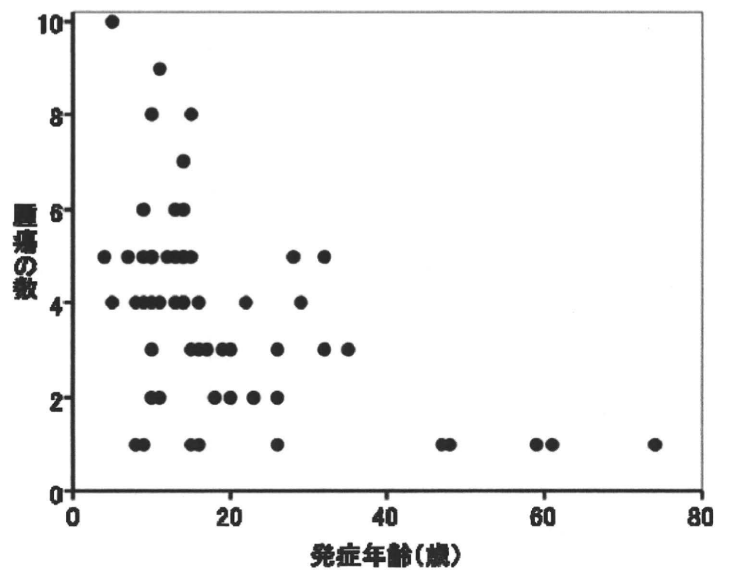


図 11 大脳鎌石灰化の年齢分布

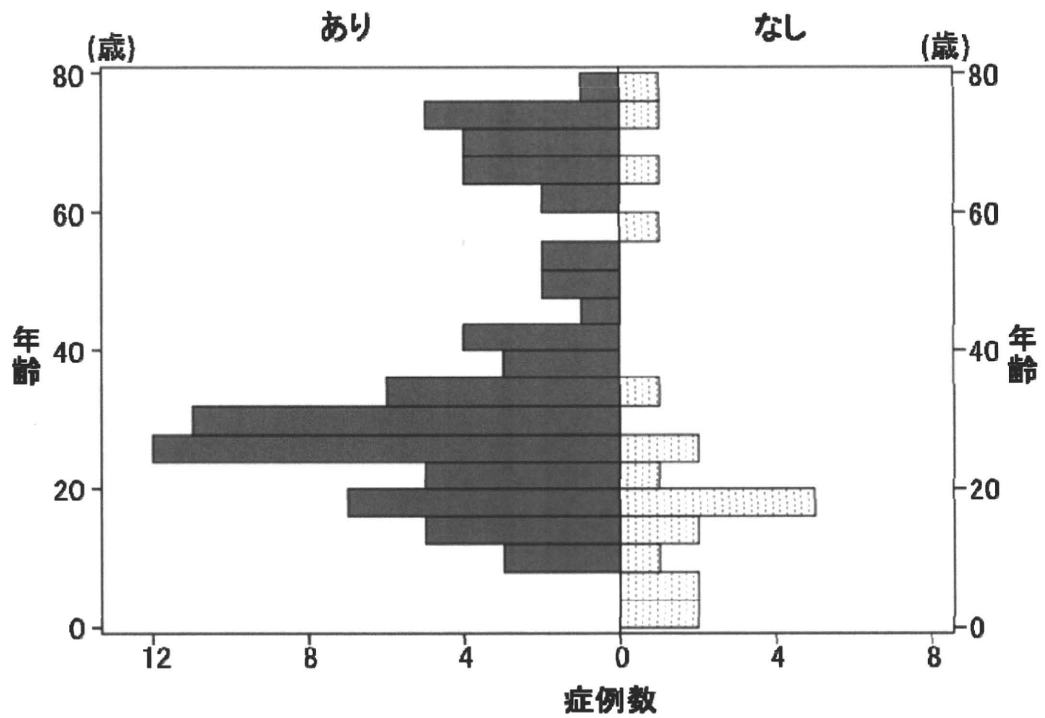


図 12 施行された検査

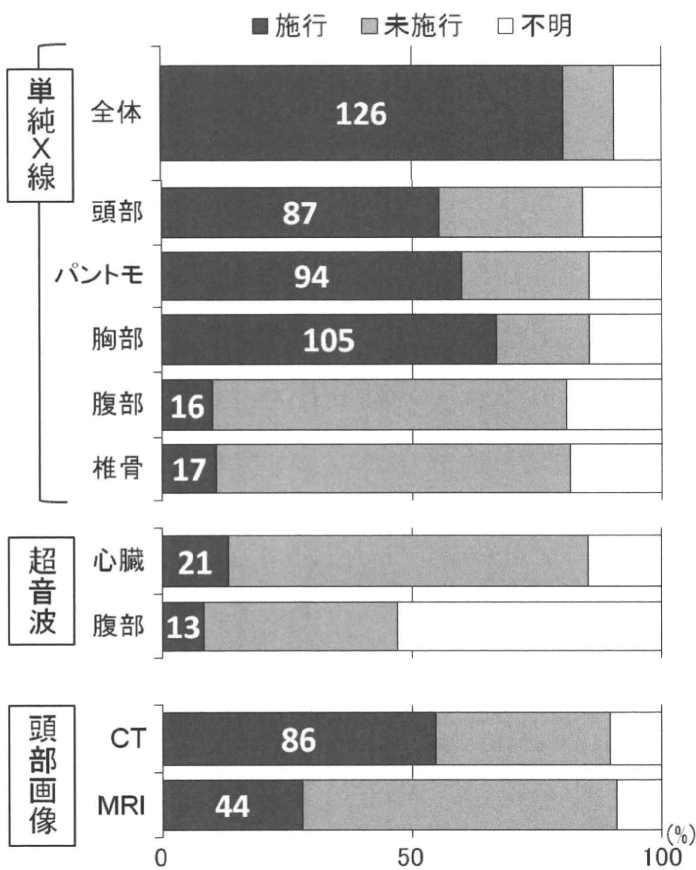
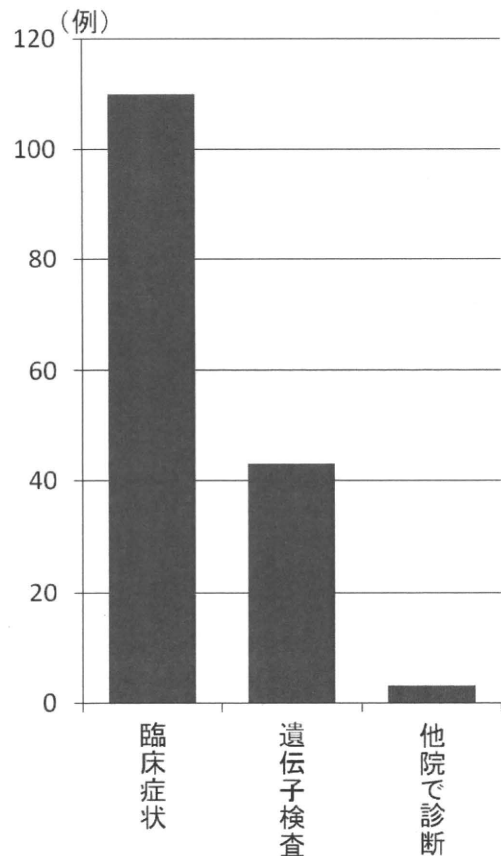


図 13 診断方法



厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
研究分担報告書

Gorlin 症候群の病態解明と治療法確立のための臨床的研究

研究分担者 宮下 俊之 北里大学医学部・分子遺伝学・教授

研究要旨

我々は以前より母斑基底細胞癌症候群(NBCCS)(別名 Gorlin 症候群)(常染色体優性遺伝をする神経皮膚症候群、高発癌性遺伝疾患でもある)の遺伝子解析を行ってきた。NBCCS では基底細胞癌、髄芽腫の他に、80%以上で顎骨に角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)と呼ばれる良性腫瘍を発症することが知られている。我々は NBCCS7 例において発症した9個のKCOTの遺伝子解析を行い、その発症機序を解析した。7例中3例でNBCCSの責任遺伝子である *PTCH1* に新たな体細胞変異を見出した。そのうち1例は腫瘍化との関連は不明であった。1例では上顎と下顎で異なる遺伝子型を示した。*PTCH1* プロモーターのメチル化によるエピジェネティックな不活化は認めなかった。また *PTCH1* 同様に Shh シグナル伝達の構成分子をコードする *SMO*、*SUFU* 遺伝子に変異の検出された症例はなかった。

A. 研究目的

NBCCS は常染色体優性遺伝をする小奇形を伴う神経皮膚症候群である。それと同時に基底細胞癌、髄芽腫等を多発する高発癌性遺伝疾患でもある。この他にも80%以上の症例で顎骨に角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)と呼ばれる良性腫瘍を発症することが知られている。ショウジョウバエの体節形成時に作用する遺伝子 *ptc* のヒトホモログ *PTCH1* がこの疾患の責任遺伝子として同定されている。我々は以前より母斑基底細胞癌症候群 NBCCS の遺伝子解析を行ってきた。本年度も全国から依頼を受けた症例の遺伝子解析を続けるとともに、KCOTの腫瘍組織の遺伝子解析を行い、腫瘍化の分子機序を検討した。

B. 研究方法

症例の遺伝子解析は従来どおり末梢血よりゲノムDNAを抽出し、*PTCH1* 全エクソンの塩基配列を解析した。必要に応じて不死化リンパ球よりRNAを抽出し、mRNAのスプライシング異常を調べた。また一部の検体ではオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いたコピー数解析も

行った。

KCOTの遺伝子解析に際しては7例の末梢血及び腫瘍組織からDNAを抽出した。複数の腫瘍を発症した症例からは可能な限り個々の組織からDNAを抽出した。PCR-シーケンス法により *PTCH1*、*SMO*、*SUFU* 遺伝子の全エクソンの塩基配列を解析した。また *PTCH1* についてはプロモーターの CpG のメチル化を bisulphite シーケンス法で解析した(QIAGEN EpiTect Sulfite Kit)。また *PTCH1* のコピー数をマイクロアレイを用いて解析した。コピー数解析には、Agilent 社に委託してカスタム作製したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた。オリゴヌクレオチドの長さは約60ntであり、*PTCH1* をはさむ約20 Mbの領域に52,761個のオリゴヌクレオチドプローブ(プローブ間の中央値394bp)を作製した。250 ngのDNAを断片化した後、腫瘍由来DNAはCy5で、血液由来DNAはCy3で標識して array-based comparative genomic hybridization (aCGH)を行った。(倫理面への配慮)

本研究は北里大学、東京女子医科大学、千葉



大学倫理委員会の承認を得た上、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して行われた。

変異の種類	家系数
数塩基までの挿入・欠失・重複	16 家系
スプライス変異	4 家系
ミスセンス変異	4 家系
ナンセンス変異	4 家系
遺伝子全体の欠失	5 家系

表 1 *PTCHI* の遺伝子解析の結果

### C. 研究結果

前年度から引き続いて行っている NBCCS の遺伝子診断は 37 家系 (43 症例) に達し、内 33 家系で何らかの遺伝子変異を見出した (表 1)。KCOT 組織とペアで解析した 7 例中 3 例で *PTCHI* に新たな体細胞変異を見出した (表 1 の G30、G31、G38)。そのうち 1 例は腫瘍化との関連は不明であった (G30)。1 例では上顎と下顎で異なる遺伝子型を示した。*PTCHI* プロモーターのメチル化によるエピジェネティックな不活化は認めなかった。また *PTCHI* 同様に Shh シグナル伝達の構成分子をコードする *SMO*、*SUFU* 遺伝子に変異の検出された症例はなかった。

### D. 考察

我々の NBCCS における遺伝子変異検出率は約 90% であり、世界的に見ても引き続きトップレベルを維持していた。

腫瘍化の分子機序は網膜芽細胞腫のように two-hit で説明できるものから、大腸癌のように multi-hit で発症するものまで様々である。我々は KCOT において *PTCHI* の配偶子変異 (1st hit) に引き続いて起こる体細胞変異 (2nd hit) を解明すべく研究を進めたところ、7 例中 3 例で *PTCHI* に新たな体細胞変異を見出した。内 2 例は見出した体細胞変異が 2nd hit と考えられたが、他の 1 例は正常人で多型として報告されている変異であるため、腫瘍化とは直接関係してはいないと考えられた。残る症例においては 2nd hit に相当する遺伝子変異は今のところ不明であり、今後の更なる解析が必要である。今後症例を蓄積し、引き続き腫瘍化の分子機序の解析を行う予定である。

興味深いことに 1 例で同時に採取した 2 箇所 of 腫瘍で異なる 2nd hit で腫瘍化していることが示唆された。

### E. 結論

2 例においては *PTCHI* 遺伝子の two-hit により腫瘍化を説明できたが、それ以外の症例では *PTCHI*、*SMO*、*SUFU* 以外の遺伝子が腫瘍化に関与しているものと思われた。また重複する腫瘍においてそれぞれ異なる腫瘍化の機序が示唆された症例があった。

腫瘍番号	<i>PTCHI</i> 配偶子変異	<i>PTCHI</i> 体細胞変異	<i>SMO</i> 変異	<i>SUFU</i> 変異	<i>PTCHI</i> プロモーターのメチル化	<i>PTCHI</i> の LOH
G11 T1	c.3130_3131dupGC	none	未	なし	なし	なし
G29 T1	c.1067+1G>C	none	未	未	なし	なし
G30 T1 (上顎)	c.3325_3328dupGGCG	c.-4_-5dupCGG	なし	なし	なし	なし
G30 T2 (下顎)	c.3325_3328dupGGCG	c.-4_-5dupCGG	未	未	なし	なし
G31 T1 (下顎)	c.1472delT	c.264_265insAATA	未	未	なし	なし
G31 T2 (上顎)	c.1472delT	none	なし	なし	なし	なし
G32 T1	c.3257T>G	none	なし	なし	なし	なし
G34 T1	c.1665T>A	none	なし	なし	なし	なし
G38 T1	c.714_715delGG	c.812_815delTAAA	未	未	なし	なし

表 2

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、KCOT のみならず NBCCS で発症する腫瘍の発症メカニズムの解明に貢献するものと思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagao, K., Fujii, K., Saito, K., Sugita, K., Endo, M., Motojima, T., Hatsuse, H. and Miyashita, T. (2011) Entire *PTCHI* deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan. Clin. Genet. 79, 196-198

宮下俊之, 桐生麻衣子, 齋藤加代子, 杉田克生, 遠藤真美子, 藤井克則. (2011) 見逃してはいけない家族性腫瘍:本邦における母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異と臨床的特徴 家族性腫瘍 11, 14-18

藤井克則, 宮下俊之. (2010) 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

宮下俊之. (2010) グルココルチコイド受容体 日本薬理学会誌 135, 117-118

##### 2. 学会発表

長尾和右, 桐生麻衣子, 高山吉永, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群の約 16%が *PTCHI* 遺伝子全欠損で発症する. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010. 9.22-24. 大阪

高山吉永, 長尾和右, 桐生麻衣子, 宮下俊之.

ヘッジホッグシグナル伝達経路に抑制的に働く抗 *PTCHI* マウスモノクロナル抗体の作製.

第 69 回日本癌学会学術総会. 2010. 9.22-24. 大阪

宮下俊之, 長尾和右, 遠藤真美子, 本島敏乃, 齋藤加代子, 杉田克生, 藤井克則. 日本人母斑基底細胞癌症候群の 16%は *PTCHI* 遺伝子の片アレル欠損で発症する. 第 16 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 2010.7.9-10. 新潟

宮下俊之, 遠藤真美子, 齋藤加代子, 杉田克生, 藤井克則. 第 16 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 2010.7.9-10. 新潟

長尾和右, 高山吉永, 亀山孝三, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群症例の 16%が *PTCHI* 遺伝子の全欠失によって発症する. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010.12-7-10. 神戸  
高山吉永, 志村将人, 桐生麻衣子, 長尾和右, 亀山孝三, 宮下俊之. ヒト Patched1 (*PTCH1*) レセプターに対して作製したマウスモノクロナル抗体の評価. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010.12-7-10. 神戸

#### 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

Gorlin症候群における遺伝カウンセリング

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

Gorlin 症候群における遺伝カウンセリングでは、病歴、家系図などの情報を収集し、再発率評価を行い、医療情報の提供を行うと共に、必要に応じて社会的支援の提供を行う。未成年や未発症者における遺伝カウンセリングでは、十分な配慮が大切である。Gorlin 症候群では複数の診療科、遺伝医療の専門家、ソーシャルワーカー、患者サポート組織などの連携体制の整備、チーム医療の構築が必要である。

共同研究者

浦野 真理(東京女子医科大学附属遺伝子医療センター)

佐々木 亮(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。Kimonis らの診断基準により Gorlin 症候群と臨床診断した症例における遺伝カウンセリングに関する留意事項について明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

- 1) Gorlin 症候群遺伝カウンセリングにおける実施事項
- 2) 遺伝カウンセリングの流れ
- 3) 遺伝カウンセリングにおける留意点
- 4) 遺伝子検査について
- 5) Gorlin 症候群の遺伝カウンセリングに関した問題点

について検討した。

(倫理面への配慮)

Gorlin 症候群の患者・家族に対して、遺伝子医療センターの外来において遺伝カウンセリングを実施した。遺伝子検査は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

C. 研究結果

1) Gorlin 症候群遺伝カウンセリングにおける実施事項

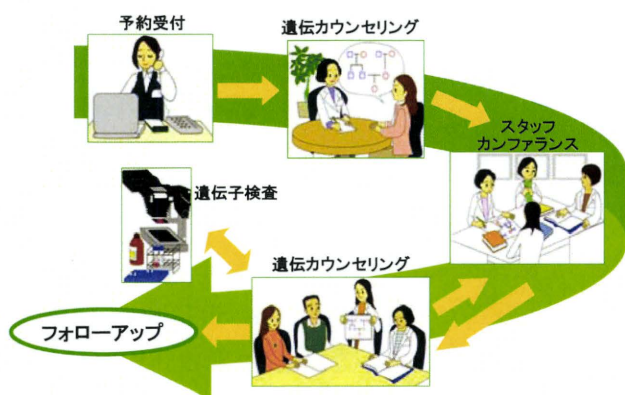
遺伝カウンセリングでは、まず、家系図、病歴の聴取に加えて、検査所見を含む情報収集を行う。そして、身体所見、画像検査により診断の検証と評価をする。遺伝カウンセリングでは患者本人からは Gorlin 症候群をもつ子が生まれるか、Gorlin 症候群をもつ子の母親からは次の子も Gorlin 症候群に罹患するかという再発率の評価を行う。本症は浸透率 100%の常染色体優性遺伝形式を取るため、罹患者の子は 50%の確率で変異遺伝子を有し、言い換えれば罹患者の子は発症の可能性が 50%である。診断された患者の 70-80%は両親のどちらかが罹患している。すなわち、新生突然変異が

20-30%に存在する。さらに、遺伝子変異と表現型の相関は報告されていない。Gorlin 症候群の確定診断として、PTCH 遺伝子変異の同定がなされるようになってきた。遺伝子検査においては、インフォームド・コンセントとともに、結果の出た後の結果の解釈、説明も重要である。疾患の自然歴、疾患による影響を遺伝カウンセリングで言及するが、そこで再発に対する不安のケアなどのカウンセリングが必要である。また心理社会的支援が遺伝カウンセリングにおいては必要な実施事項である。

## 2) Gorlin 症候群における遺伝カウンセリングの流れ

図1に示すように、主治医や患者本人からの連絡により遺伝カウンセリングが始まる。Gorlin 症候群とはどのような疾患であるか、遺伝子検査を受けるための情報

図1 遺伝カウンセリングの流れ



## 3) 遺伝カウンセリングにおける留意点

遺伝カウンセリングの実施に当たっては、プライバシーの保たれた快適な空間において、話のしやすい雰囲気、クライアントの感情に注意を払い共感を持って支える心構えが必要である。遺伝学的・医学的な内容は患者にとって難解であり得るので、医学・医療情報を分かりやすく伝える。また、クライアントが良く理解した上で自己決定するために支援をしていく。Gorlin 症候群の遺伝学的特徴として以下の事が挙げられる。

(1) 原因遺伝子は染色体 9q22.3 の PTCH 遺

伝子

(2) 浸透率は 100%

(3) 常染色体優性遺伝形式

即ち、罹患者の子は 50%の確率で変異遺伝子

を有する＝罹患者の子は発症の確率が 50%

(4) 診断された患者の 70-80%は両親のどちらかが

罹患している

(5) 新生突然変異は 20-30%

(6) 遺伝子変異と表現型の相関は報告されていない。

## 4) 遺伝子検査について

Gorlin 症候群は NBCC 症候群の診断基準 (Kimonis et al. 1997) のように臨床症候から診断できるが、遺伝子検査は確定診断であると共に、その結果、腫瘍の早期発見・治療がなされ、家族における遺伝に関する問題を明らかにする事が可能となる。腫瘍摘出による早期治療に結びつく事もある一方で、患者・家族にとって、心理的ストレスを引き起こす事もあり得る。従って、遺伝子検査の実施に当たっては、十分な情報提供を含む遺伝カウンセリングが必要である。当センターでは遺伝カウンセリングにおいて使用する目的で、「遺伝子検査を受ける患者さんへ - Gorlin 症候群についてのご説明」として説明・同意文書を作成した。遺伝子検査により診断確定した4例は以下の通りである。

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原性腫瘍 (KCOT)であった。遺伝子解析を行い PTCH 遺伝子変異

(c.3325\_3328dupGGCG)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。

#### 5) Gorlin 症候群の遺伝カウンセリングに関する問題点

Gorlin 症候群の遺伝カウンセリングにおいては、以下のような問題点がある。

##### (1) 小児における遺伝子検査

本人に自発的なインフォームド・コンセントをすることができない場合、本人の福祉を第一に考えて決断しなければならない。小児が、遺伝子診断についての決定に賛意を表することができる場合(およそ中学生以上)には、法的な資格のある代諾者(親、保護者)からの同意のほか、さらに小児の賛意(インフォームド・アセント)を得ることを要する。思春期には、遺伝子診断のもたらす個別のリスクとメリットを評価する能力がある者もいる。青年期には、保因者のことや子を産むかどうかの選択に関する情報に純粋な関心をもつ段階にある。ただし、家族・同年代の者からの強制や、差別、自己イメージの変化に耐えられないことも起こりうる。小児の被検者から賛意を得た場合に、理解力に応じて(概ね中学生以上)、同意の署名と年月日を小児の被検者本人が記載する。一般に、7 歳以上であれば、年齢に応じた言葉や説明に

対して理解が可能である。署名が得られない場合、口頭の場合には、代諾者の同意文書に、本人から賛意が得られたことを記載する。

##### (2) 発症前診断

Gorlin 症候群のリスクはあるが無症状の場合の遺伝子診断において、神経疾患や家族性腫瘍における発症前診断と同様に取り扱う。

##### (3) 出生前診断、着床前診断

Gorlin 症候群において欧米では実施されているが、本邦では実施されていない。

#### 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。しかし、正確な診断、早期の診断による適切な医療の選択、家族における発症の問題の解決、臨床症状と遺伝子型との関連の解析などの見地から、遺伝子検査は診療上、有用である。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得て、長期のフォローアップ体制の確立の基盤となる。

遺伝子検査を診療に用いる場合に、個人情報保護としての遺伝子・遺伝情報管理の問題の他に、遺伝子検査により生じる心理的問題に対するケアが必要である。具体的には、患者・患者家族を中心として、主治医および症候に関係する複数の診療科による医療的ケアと長期のフォローアップ、遺伝医療の専門家(臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーなど)による遺伝カウンセリングと心理的サポート、ソーシャルワーカーによる医療福祉的支援、患者サポート組織によるピアカウンセリングなどの体制の整備、チーム医療の構築が望まれる。

#### E. 結論

1) Gorlin 症候群における遺伝カウンセリングについて報告した。遺伝カウンセリングとは、人々が遺伝性疾患における医学的、心理学的、家族的影響について理解し、それに適応

できるように支援するプロセスである。

2) 遺伝カウンセリングでは、病歴、家系図などの情報を収集し、再発率評価を行い、医療情報の提供を行うと共に、必要に応じて社会的支援の提供を行う。

3) 未成年や未発症者における遺伝カウンセリングでは、十分な配慮が大切である。

4) Gorlin 症候群では複数の診療科、遺伝医療の専門家、ソーシャルワーカー、患者サポート組織などの連携体制の整備、チーム医療の構築が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

2) Sasaki R, Miyashita T, Matsumoto N, Fujii K, Saito K, Ando T, 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*, 2010;110(2):e41-6.

3) Nagao K, Fujii K, Saito K, Sugita K, Endo M, Motojima T, Hatsuse H, Miyashita T: Entire *PTCH1* deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevroid basal cell carcinoma syndrome in Japan. *Clin Genet* 2011; 79: 196-198

4) 齋藤加代子. 日常診療に必要な臨床遺伝学と遺伝カウンセリング. *日本医師会雑誌* 2010; 139(3):573-576.

5) 齋藤加代子. 保因者診断と遺伝カウンセリ

ング. *日本臨床 遺伝子診療学* 第2版 2010; 68:183-188.

6) 福島武春, 齋藤加代子, 菅野仁, 川島眞, 肝付浩一郎. 遺伝子検査結果の電子化. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 2011;31(2):131-135.

7) 宮下俊之, 桐生麻衣子, 齋藤加代子, 杉田克生, 遠藤真美子, 藤井克則. 見逃してはいけない家族性腫瘍: 本邦における母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異と臨床的特徴. *家族性腫瘍* 2011;11(1):14-18.

#### 2. 学会発表

なし

#### 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

厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

研究分担報告書

研究課題:「Gorlin 症候群の病態解明と治療法確立のための臨床的研究」

Gorlin 症候群患者由来細胞における放射線応答機構に関する研究

研究分担者 杉田克生(千葉大学教育学部・教授)

#### 研究要旨

ゴーリン症候群患者では、放射線照射により、基底細胞癌などの腫瘍が生じることが知られている。本研究では、ゴーリン患者由来のケラチノサイトを用い、放射線応答機構について基礎的な検討を行った。本研究で用いた細胞の放射線感受性を調べたところ、X線に関しては、顕著な放射線感受性は見られなかった。また、*K-ras* 癌遺伝子におけるコドン 12 の塩基置換をドットプロットハイブリダイゼーション法により検出する遺伝子レベルでの検査法にて、ゴーリン細胞では、5Gy照射後に変異が検出された。このことから、従来言われている放射線による癌の誘発が実験レベルでも再現されることが示唆された。

研究協力者:菅谷茂(千葉大学大学院医学研究院)

#### A. 研究目的

遺伝子における変異の発生は、癌化と深く関わると考えられている。ゴーリン症候群患者では、加齢や紫外線、放射線照射等による組織の Loss of heterozygosity (LOH)により、基底細胞癌等の腫瘍が発生することが知られているが、その分子メカニズムに関しては、不明な点が多い。細胞の癌化には、*ras* 遺伝子などの突然変異が関わることを示唆されている。今回、ゴーリン症候群患者由来の細胞を用い、X線感受性および誘発突然変異などの基礎的な検討を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) 培養ヒト細胞

兵庫医科大学歯科口腔外科 野口らにより樹立されたゴーリン患者由来のケラチノサイト細胞(GK 細胞)を用いた。また、比較として子宮頸癌由来 HeLa 細胞、肺癌由来 A549 細胞を用いた。

##### (2) 細胞培養

GK 細胞は、Epilife 培地に HKGS を添加したも

のを用いた。HeLa 細胞、A549 細胞は、牛血清を 10%(w/w)含む minimum essential medium (MEM) 中で培養した。

##### (3) X線感受性テスト

X線照射装置(MBR-1520R; Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan)を使用し、0.1mm Cu 0.5mm Al フィルター条件下で照射を行った。細胞への照射は、無血清培養液状態で行った。直径 60mm の新しい培養シャーレに 300 細胞/シャーレで撒き、24 時間培養後 X線を 5Gy 照射した。その後、3 週間培養の後、シャーレ中の細胞コロニーを 0.2%メチレンブルー/30%メタノール液で染色しコロニー数を計数し、コロニー形成率を求めた。

##### (4) X線誘発塩基置換突然変異の検出

GK 細胞にX線5Gy照射後、さらに1週間培養を続け、変異を固定させた。次に細胞よりDNAを抽出し、*K-ras* コドン 12 周辺の目的配列をPCRにて増幅し、ナイロン膜上にドットプロットした。そのナイロン膜 3' 末端をジゴキシゲニラベルされたプローブと共にハイブリダイゼーションした。*K-ras* コドン 12 の突然変異プローブは、6種を等量混合したものである。結合シグナルを nitro blue tetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 液で可

視化し、黒いドットとして確認された場合、変異ありと判定した。

### C. 研究結果

(1)放射線感受性を調べるため、HeLa 細胞および GK 細胞を5グレイ照射後のコロニー形成率を調べた。HeLa 細胞では、15%、ゴーリン細胞では11%と顕著な放射線感受性は見られなかった。(図1)。

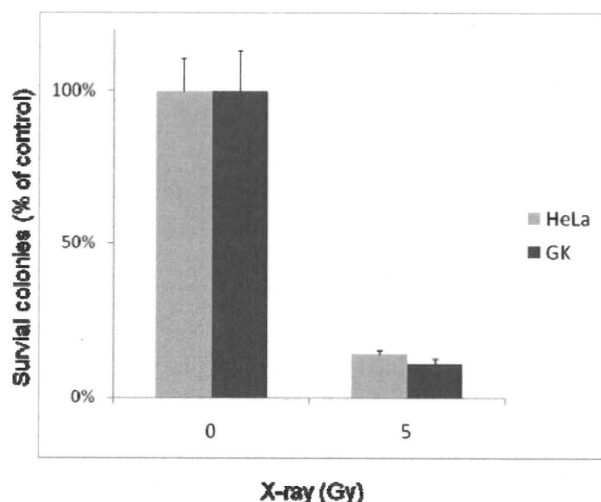


図1. X線致死感受性テスト

(2)K-ras コドン 12 に突然変異を持つ、A549 肺癌細胞由来の DNA では、黒いドットが見られた。GK 細胞では、未照射の細胞から収集した DNA には変異が見られなかったが、5Gy 照射後に、わずかではあるが、変異が検出された(図2)。

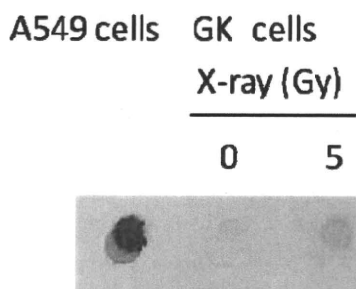


図2 塩基置換変異テスト阻害剤

### D. 考察

平成 21 年度は、ゴーリン患者由来の GK 細胞について検討した。細胞の放射線感受性については、X 線に関しては、今回調査した範囲で

は、顕著な感受性は認めず、HeLa 細胞と同程度の感受性であった。また、突然変異検出テストに関しては、5 Gy 照射後の細胞で、ドットブロット法により、わずかではあったが、K-ras コドン 12 に塩基置換変異が見られるとの示唆が得られた。未照射の細胞から抽出した DNA サンプルでは変異は見られないことから、元々集団中に存在しているものでなく、放射線による誘発変異と考えられる。ゴーリン症候群患者では、放射線照射により基底細胞癌などの腫瘍が生じることが知られているが、K-ras 遺伝子が癌化に関与する機序を今後詳細に検討することが重要と思われる。K-ras コドン 12 に変異を持つ A549 細胞と比較すると、非常にわずかである。残念ながら、この細胞集団のクローン化を試みたが、成功しておらず、今後は変異を持つ細胞で癌化が見られるかなど、メカニズムの詳細を解明いきたい。

他のゴーリン患者由来の細胞を用いた解析から、細胞の X 線応答に SUMO 遺伝子が関与することが示唆されている。SUMO 遺伝子は、細胞の増殖や放射線の感受性に関与することが報告されており、GK 細胞にける放射線応答の分子メカニズムについても解析を行っていく予定である。

### E. 結論

X 線による誘発突然変異がゴーリン患者由来細胞において見られた。このことから、従来言われている放射線による癌の誘発が実験レベルでも可能であることが示唆された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 宮下俊之、桐生麻衣子、齋藤加代子、杉田克生、遠藤真美子、藤井克則 見逃してはいけない家族性腫瘍:本邦における母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異と臨床的特徴 家族性腫瘍 11巻1号、14-18、2011 (2011年1月発行)
- 2) 杉田克生、林雅晴監修 イメージからせまる小児神経疾患一症例から学ぶ 診断・治療プロセス 日本小児神経学会編集 診断と治療社 東京(平成22年7月29日)



- 3) Torii M, Shimoyama I, Sugita K., Phonemic and semantic working memory in information processing in children with high function pervasive developmental disorders. IMJ Vol 17, No 1, 35-39, 2010.
  - 4) Sugita K., Suzuki N, Oi K, Allen-Tamai M, Sugita Ki, Shimoyama I. Cross-Sectional Analysis for Matching Words to Concepts in Japanese and English Languages. IMJ Vol 17, No 1, 41-45, 2010.
  - 5) Chen S-P, Dong M, Kita K, Shi Q-W, Cong B, Guo W-Z, Sugaya S., Sugita K., 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. 3, 673-678, 2010.
  - 6) Nagao K, Fujii K, Saito K, Sugita K., Endo M, Motojima T, Hatsuse H, Miyashita T. Entire PTCH1 deletions cause 16% of cases of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan. Clinical Genetics 2011; 79: 196-198
  - 7) Zahed M, Suzuki T, Kita K, Sugaya S., Suzuki N. Screening of novel peptide ligands bound to the carboxy-terminal domain of GRP94 by phage display. Chiba Medical J. (in press).
  - 8) Sugaya S., Tanaka K, Akagi T, Kasetani T, Qiu-Ji Z, Guo W, Udagawa A, Nomura J, Sugita K., Ohta R and Suzuki N. Studies on the amounts of serum hydroperoxide, MMP-3, urinary 8-OHdG, and salivary IgA in rheumatoid arthritis patients who experienced Shinrin-yoku (forest-air bathing and walking). Chiba Medical J. (in press).
  - 9) Kita K, Sugita K., Suzuki T, Sugaya S., Tanaka T, Jin Y-H, Chen S-p, Satoh T, Tong X-B, Suzuki N. Increased resistance to UVC lethality and Bcl-xL/Bax protein ratios in Cockayne syndrome patient-derived cells cultured in medium containing recombinant annexin II. (in press)
  - 10) Sugita K., Uesaka T, Nomura J, Sugita Ki, Inagaki M A family-based association study does not support DYX1C1 as a candidate gene in dyslexia in Japan (in press)
2. 学会発表
- 1) 菅谷茂、古川聡子、喜多和子、田中健史、紀仲秋、鈴木信夫「カドミウムによるヒト細胞増殖阻害に関わるユビキチン様タンパクSUMO-2/3」第83回日本生化学会 2010/12/7-10 神戸
  - 2) 菅谷茂、郭文智、佐藤守、朝長毅、野村文夫、日和佐隆樹、瀧口正樹、喜多和子、鈴木信夫
  - 3) 「腫瘍転移抑制因子 NM23-H1 は、ユビキチン様タンパクSUMO-2を介したX線照射後のDNA合成能の増大に関わる」第7回千葉疾患プロテオミクス研究会 2010/11/13 東京
  - 4) 喜多和子、杉田克生、陳仕萍、佐藤哲生、郭文智、鈴木敏和、菅谷茂、鈴木信夫「細胞外に添加されたHSPB-Aによるコケイン症候群患者由来細胞の紫外線致死抵抗化」第53回放射線影響学会大会 2010/10/20-22 京都
  - 5) 宮下俊之、長尾和右、遠藤真美子、本島敏乃、齋藤加代子、杉田克生、藤井克則 日本人母斑基底細胞癌症候群の16%はPTCH1遺伝子の全欠損で発症する 第16回家族性腫瘍学会 2010/7/10 新潟
  - 6) 遠藤真美子、水落弘美、内川英紀、藤井克則、宮下俊之、齋藤加代子、杉田克生、河野陽一 本邦におけるGorlin症候群157例の検討ー欧米豪との相違と診断基準についてー 第22回千葉県小児神経懇話会 2010/11/6 千葉

### 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
Komoi Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Hayashidani M, Shimojima K, Nishizawa T, Higashi K, Yasukawa K, Saitsu H, Miyake N, Mizuguchi T, Matsumoto N, Osawa M, Kohno Y, Higashinakagawa T, Yamamoto T.	Zebrafish gene knockdowns imply roles for human <i>YWHAG</i> in infantile spasms and cardiomegaly.	Genesis	48	233-43	2010
Sasaki R, Miyashita T, Saito K, Fujii K, Ando T, Akizuki T.	Multiple keratocystic odontogenic tumors associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome having distinct <i>PTCH1</i> mutations.	Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.	110	e41-6	2010
Endo M, Fujii K, Miyashita T, Uchikawa H, Tanabe R, Yamada Y, Kohno Y.	Clinical manifestations in Japanese Gorlin syndrome patients	Child Neuropsychiatry	7	100	2010
Fujii K, Miyashita T, Endo M, Uchikawa H, Kohno Y.	Germline and somatic <i>PTCH1</i> mutations in Japanese basal cell nevus syndrome	Child Neuropsychiatry	7	102	2010
Nagao K, Fujii K, Saito K, Sugita K, Endo M, Motojima T, Hatsuse H, Miyashita T.	Entire <i>PTCH1</i> deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan	Clin Genet	79	196-8	2011
Sugita K, Suzuki N, Oi K, Allen-Tamai M, Sugita Ki, Shimoyama I.	Cross-Sectional Analysis for Matching Words to Concepts in Japanese and English Languages.	IMJ	17	41-5	2010

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— 基底細胞母斑症候群	日本小児皮膚科学 会雑誌	28	65-71	2010
藤井克則		小児科臨床ヒュクシス 17 「年代別子ども 皮膚疾患」中山書店 五十嵐隆総編集、専 門編集 馬場直子		34-35	2010 年 4 月 28 日刊行
斎藤加代子	日常診療に必要な臨床遺伝学と遺伝カウンセ リング	日本医師会雑誌	139	573-6	2010
藤井克則	顎骨内嚢胞、手掌小陥凹、粗野顔貌を呈し た 11 歳女児例	イメージからせまる小 児神経疾患 50 編 集: 杉田克生、林雅 晴 監修: 日本小児 神経学会。診断と治 療社		35-36	2010
宮下俊之、桐生麻衣子、斎藤加代子、 杉田克生、遠藤真美子、藤井克則	見逃してはいけない家族性腫瘍: 本邦におけ る母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異と臨 床的特徴	家族性腫瘍	11	14-8	2011