

201128081A

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

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤井克則

平成 24 年（2012 年）5 月

目 次

I. 総括研究報告	2
Gorlin 症候群の病態解明と治療法確立のための臨床的研究 藤井 克則（千葉大学大学院医学研究院小児病態学）	3
II. 分担研究報告	12
1. Gorlin症候群の責任遺伝子 PTCH1 の研究 宮下 俊之（北里大学医学部分子遺伝学）	13
2. Gorlin症候群における遺伝カウンセリング 斎藤加代子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）	17
3. 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 杉田克生（千葉大学教育学部基礎医科学）	21
4. Gorlin症候群患者由来 KCOT 細胞の不死化に関する研究 野口 一馬（兵庫医科大学歯科口腔外科学）	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	36

I 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

Gorlin 症候群の病態解明と治療法確立のための臨床的研究

研究代表者 藤井 克則 千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究要旨

Gorlin 症候群は、1960 年に Gorlin らによって報告された身体奇形と高発癌性を特徴とする神経皮膚症候群である。欧米での疫学調査により Gorlin 症候群の診断基準と有病率がそれぞれ示されているが本邦を含めアジアでの報告はない。我々は本事業において初めて全国調査を行い、日本国内に 300 人の Gorlin 症候群患者が存在すること、日本人 Gorlin 症候群の臨床症状の有病率、基底細胞癌の発症率が欧米豪と比較して少ないこと、Gorlin 症候群の有病率が 26 万人に 1 人であることを明らかにした。また Gorlin 症候群シンポジウムを開催し医療関係者のみならず疾患罹患者に対する啓発活動を行うとともに、Gorlin 症候群のホームページを開設して広く疾患情報の提供を行う場を整えた。本邦における Gorlin 症候群患者に対して疾患理解を促すとともに、その病態解明と治療法確立を今後も継続して行ってゆく。

研究分担者

- ・宮下 俊之 北里大学医学部、分子遺伝
教授
- ・齋藤加代子 東京女子医科大学小児科
教授
- ・杉田 克生 千葉大学教育学部基礎医科学 教授
- ・野口 一馬 兵庫医科大学歯科口腔外科
講師

研究協力者

- ・内川英紀 千葉大学医学部附属病院
小児科助教
- ・塩浜 直 千葉大学大学院医学研究院
小児病態学 大学院生
- ・水落 弘美 千葉大学大学院医学研究院
小児病態学 大学院生

A. 研究目的

Gorlin 症候群は 1960 年に Gorlin らによって報告された身体奇形と高発癌性を特徴とする神経皮膚症候群である。身体奇形には、手掌足底の皮膚小陥凹、顎骨嚢胞、椎骨肋骨奇形、大頭症、大脳鎌石灰化がある。また基底細胞癌等を多発する高発癌性遺伝疾患でもあり、別名母斑性基底細胞癌症候群(Nevoid basal cell carcinoma syndrome; NBCCS)、基底細胞母斑症候群(Basal cell nevus syndrome; BCNS)とも呼ばれる。

Gorlin 症候群は欧米では 27,000 人に 1 人(英国データ)の有病率を示す遺伝性高発癌性疾患だが、本邦では症例報告はあるものの現在までにまとまった報告はなかった。Gorlin 症候群では、年齢とともに基底細胞癌を初めとした癌が発生しやすい特徴がある。2-3 歳では小脳腫瘍である髄芽腫が、7 歳以上では

顎骨内に生じる角化性嚢胞性歯原性腫瘍 (Keratocystic Odontogenic Tumor; KCOT) が、そして 20 歳以上では皮膚癌である基底細胞癌が生じる。これ以外にも髄芽腫や心臓線維腫、卵巣線維腫が好発することが報告されている。

これら易腫瘍形成性の最大の問題点は加齢とともに発生する癌に対して現在予防法や治療方法が確立されていないことにある。このような状況の中で、医療者は手探りで診療を行っているのが実情であり、その対処法の確立は長年望まれてきている。

さらに Gorlin 症候群の疫学調査はアジア諸国では行われたことがない。欧米白人種とは違うアジアで、癌形成の有病率が異なることが予想されるため何らかの疫学調査の必要性が提起されていた。Gorlin 症候群の多岐にわたる合併症の有病率についても、その早期対処の必要性から実態調査が必要と考えられる。

これらを踏まえ、本研究の目的は全国調査を通じて Gorlin 症候群の現状を探るとともに、日常生活上の対応を含め具体的な診療指針を作成し、本症候群への医療的対応を示すこととし、平成 21 年から難治性疾患克服研究事業の中で本事業がスタートした。

Gorlin 症候群では臨床症状が多岐にわたるため診療科が複数に渡る傾向がある(藤井ら、脳と発達 1996)。すなわち先天奇形では小児科を、歯原性腫瘍(顎骨内嚢胞)では口腔外科を、皮膚小陥凹および基底細胞癌では皮膚科を、髄芽腫では脳神経外科を、そして側彎症や肋骨椎骨異常では整形外科を受診することが多い。Gorlin 症候群における合併症の報告は欧米を中心に行われているが(Kimonis et al., 1998)、いずれも Caucasian 中心の白人における検討である。基底細胞癌などは有色人種で発生率の相違がすでに予想されており、本研究では国内外で初めて

有色人種における Gorlin 症候群の現状を診療科横断的に解析することになる。人種差の具体例としては基底細胞癌の発症率の相違が考えられるが、その詳細は未だ明らかでない。本研究は現在行われている治療の内容を検討することで本症候群における望ましい診療指針を策定することが究極的な目標である。

B. 研究方法

研究を達成するための具体的な研究計画及び方法は下記の通りである。

研究計画は(a)臨床研究面と(b)基礎研究面の双方より策定した。臨床研究は疫学的調査が主体となり、現在行なわれている疾患治療の現状とその予後について調査するとともに、基礎的研究では疾患原因遺伝子の PTCH1 解析を通じて疾患発症メカニズムを解明する。具体的研究内容は下記の通りである。

1. 臨床研究面:研究代表者の藤井と研究分担者の杉田、そして研究協力者の内川、塩浜、水落が中心となって全国調査の結果解析を行い、Gorlin 症候群の有病率を明らかにするとともに、年齢別の腫瘍発生を解析しそれに対して行われた治療法とその予後を明らかにする。また発達上奇形(顎骨内嚢胞、手掌足底皮膚小陥凹、肋骨異常、大脳鎌石灰化)の発生年齢とその推移を明らかにする。腫瘍および発達上奇形についてはそれぞれ好発年齢が不明であるため、臨床医家に対する早期診断のための情報提供を行ってゆく。近年骨成熟に PTCH1 遺伝子が重要な役割を果たしていることが我々の研究で判明し、PTCH1 遺伝子変異を持つ Gorlin 症候群患者で骨異常がないかどうかについても検討する。
2. 基礎研究面:研究分担者の宮下、杉田、野口が中心となって、PTCH1 遺伝子解析

ならびに細胞解析を通じて表現型と遺伝子型の関連を調査し、疾患発生のメカニズム解明に役立てる。*PTCHI* 遺伝子解析はすでに方法として確立し、我々はすでに効率的なプライマー対を開発して高感度に *PTCHI* 遺伝子変異を検出している。本研究もその方法を踏襲して引き続き *PTCHI* 遺伝子解析を継続していく。すでに 22 家系 25 例の検討で 80%以上の精度で *PTCHI* 変異を同定している。また染色体微小欠失例の報告も行っており、腫瘍にこの微小欠失がないか CGH アレイ解析を新たに行う。

3. 研究代表者(藤井)は全体の研究を統括すると共に、倫理面への配慮を一般的に行なう。特に遺伝カウンセリングについては研究分担者の斎藤が総括的に行うこととした。臨床研究面は研究代表者の藤井と斎藤が、また基礎研究面については研究分担者の宮下、杉田、野口が原因となる *PTCHI* 遺伝子解析および細胞解析を通じて疾患の発症メカニズムを解明する。研究協力者(内川、塩浜、水落)はそれぞれ研究代表者と研究分担者を臨床面および基礎面から補佐する。いずれも長年の診療経験から Gorlin 症候群を熟知しており、遅滞なく計画を実行することができる。
4. この期間内に本邦における Gorlin 症候群の患者数を明らかにしてその有病率を算出するとともに、本患者における悪性腫瘍の頻度およびそれに対して選択された治療法とその予後について調査し今後の本患者に対する治療指針を策定する。Gorlin 症候群は診療科が多岐にわたるため、関連科(小児科、皮膚科、脳神経外科、整形外科、口腔外科)にすでに調査票を郵送し、集計した結果を解析する。具体的には続発する癌に対する治療効果を判定し、放射線療法の許容範囲など望ましい治療方

法を提示する。これら結果を受けて医療機関および患者家族向けのパンフレットを作成し、関連関連医療機関に配布する。また Gorlin 症候群の発生機序の解明に関わる *PTCHI* 遺伝子解析も継続して行い、従来に行き続いて *PTCH* 遺伝子が形態形成ならびに発癌に関与するメカニズムを解明する。

5. 倫理面について:研究対象者に対する人権擁護上の配慮は十分にを行い、個人情報保護に留意するとともに、不利益・危険性の排除や説明と同意(インフォームドコンセント)を取得して研究計画を実行する。現在本研究施行のための新たな説明・同意文書をすでに作成し、倫理委員会での承諾をすでに得ている。なお、本研究では実験動物を使用しないため、動物愛護上の配慮は必要としていない。
- なお今回の研究で行われる *PTCHI* 遺伝子解析(ヒト遺伝子解析研究)についてはすでに千葉大学の倫理委員会の承認を得ている。患者由来細胞についてはすでに患者より同意を得て採取されているが、平成 23 年にあらためて臨床研究指針にのっとり、千葉大学生命医学倫理委員会に審査を申請し認可されている。
- ヒトの遺伝子解析研究については、ヒト由来試料等の提供者、その家族・血縁者その他の関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分配慮する。Gorlin 症候群の遺伝子診断については、すでに千葉大学の生命倫理審査委員会から承認を受けておりその決定事項を遵守する。
- 供給者およびその家族に対しては十分な説明を行いインフォームドコンセントを文書で取得する。また疾患関連情報について提供者に供給する場合には、遺伝カウンセリングを受ける機会を与える等の配慮を行っている。

C. 研究結果

詳細は各分担研究者の報告を参照いただきたい。具体的には、1)平成23年度の全国二次調査による Gorlin 症候群患者の臨床症状の解析、2)PTCH1 遺伝子解析による PTCH1 以外の遺伝子変異例の発見、3)遺伝カウンセリングの体制整備、4)Gorlin 症候群の病態解明のための基礎実験、5)Gorlin 症候群シンポジウムの開催、6)Gorlin 症候群のパンフレット作成、7)Gorlin 症候群のホームページ作成の7点が平成23年度の研究成果である。

- 1) 全国二次調査(藤井克則講師、内川英紀助教、塩浜直大学院生:千葉大学): 一次調査では本邦における Gorlin 症候群の実態を調査するため、全国主要施設の小児科、小児神経科、遺伝科、脳神経外科、皮膚科、歯科口腔外科を対象にアンケート調査を行い、57.8%の施設から回答を得てのべ311症例が報告された。歯科口腔外科が62.1%と最も多く、次いで皮膚科が26.4%であった。年齢分布は10歳代が最多であり、症状は歯科疾患77.5%、皮膚科疾患57.2%、骨奇形30.9%の順であった。第二次調査の検討では、計159施設(歯科口腔外科78施設、小児科および遺伝科22施設、脳神経外科7施設、皮膚科51施設、神経内科1施設)に送付した結果、67施設から回答があり(回答率41.9%)、139家系157例についての患者詳細が得られた。157例のうち、56例(35.7%)が基底細胞癌を発症しており、発症頻度に男女差はなかった(男性34.62%、女性42.03%)。基底細胞癌「あり」群の平均年齢は33.1歳(9~77歳)であり、年齢別の発症頻度では、20歳以降で51.4%(103例中53例)が、40歳以

降で71.7%(46例中33例)が基底細胞癌を発症しており、高年齢ほど頻度が多かった(図5)。発症年齢は平均37.4歳(4~69歳)であり、10歳以前に発症した2例(4歳、5歳)ではそれぞれ髄芽腫、急性白血病に対する放射線治療歴があった。欧米の白人での調査と比較すると、邦人における基底細胞癌の発症頻度は全ての年齢層で有意に少なかった。Kaplan-Meier 法による発症率の解析において、Kimonis らが報告したアメリカ合衆国の白人と有意差をもって発症年齢が遅かった(Log-Rank 検定 $p < 0.001$)。また、Shanley らの報告における累積発症率と比較しても、邦人が有意に遅く発症していた。また一症例ごとの基底細胞癌の個数は1個から多数であり、現在の年齢、発症年齢、発症からの期間のいずれとも相関はなかった。これらの結果は本邦における基底細胞癌の特徴をよく示しており、人種差および地形学的特徴が反映されていると推察された。

- 2) PTCH1 遺伝子解析(宮下俊之教授:北里大学): 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。今年度我々は通常の方法では変異が見出せなかった症例の中に、NBCCS の責任遺伝子である *PTCH1* に複数のエキソンで重複が見られた症例と、ヘッジホッグシグナル伝達経路の下流で機能する *SUFU* 遺伝子に変異のある症例を経験した。前者は国内外を通じて初めての症例であり、後者は2例目であった。前者からは通常の方法で変異陰性の場合のコピー数解析の重要性が示された。後者からは文献的考察も含めて

SUFU 遺伝子に変異のある症例は高率に髄芽腫を発生することが示され、いずれも今後の本症候群の診断と経過観察に重要な示唆を与えるものであった。

- 3) Gorlin 症候群患者に対する遺伝カウンセリングの体制整備(齋藤加代子教授:東京女子医科大学):多発性顎嚢胞を認め Gorlin 症候群が疑われた 6 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、5 例に PTCH 遺伝子変異を認め確定診断を得た。遺伝カウンセリングにおいては疾患の十分な理解を促すと同時に、遺伝子変異が家系で共有され、未発症の at risk の家系員に有用な情報になることを伝える必要がある。しかし、家族関係や家系員の年齢を視野に入れながら、提供する内容、タイミングについて考慮していくことが重要である。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と考えられた。
- 4) 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(杉田克生教授)
ゴーリン症候群での髄芽腫は、主に幼少期に合併することが多い疾患であり、それに対する免疫療法として、IFN- β 投与があるがその有効率は低い。我々は、本研究前に他の細胞株を用いた検討により、IFN- β による細胞増殖抑制に microRNA-431(miR-431)が深く関与していることを報告している。この結論を基に本研究では、ゴーリン症候群に合併することの多い髄芽腫ならびに IFN- β 投与による免疫療法が臨床的に行われている膠芽腫の培養細胞を用いて、IFN- β による細胞増殖抑制に miR-431 が関与して

いると推察し、基礎的検討を開始した。本研究で用いた培養細胞の IFN- β 感受性、miR-431 ならびに miR-431 の Target Gene である SOCS6 の発現量を検討した結果、IFN- β 投与による細胞増殖抑制に伴い、miR-431 発現量は有意に低下した一方で、SOCS6 の発現量は有意に増加していた。以上の結果より、IFN- β による細胞増殖抑制に、miR-431 と SOCS6 の発現が深く関与していることが示唆された。

- 5) Gorlin 症候群患者由来 KCOT 細胞の不活化に関する研究(野口一馬講師)
角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)は Gorlin 症候群患者・非症候群患者のいずれにも発生することが知られているが、臨床病態に著しい差があるにもかかわらず両者の細胞病理学的な差については現在までほとんど解明されていない。理由として KCOT は良性腫瘍であり、培養細胞を用いた解析が不可能であったことが原因である。この問題を解決するために、研究分担者は Gorlin 症候群患者に生じた KCOT および非症候群患者の KCOT より腫瘍細胞の初代培養に成功し、さらに 3 つの遺伝子導入により、安定した増殖能を示し、且つ KCOT の腫瘍としての性質を保持したまま不活化した培養細胞を樹立した。今後は、本培養細胞を用いて Gorlin 症候群患者に生じた KCOT と非症候群患者に生じた KCOT の差を細胞生物学的に解析する予定である。
- 6) Gorlin 症候群シンポジウムの開催(藤井克則講師、宮下俊之教授、齋藤加代子教授、杉田克生教授、野口一馬講師、塩浜直大学院生):
Gorlin 症候群についての第 2 回のシンポジウムが平成 24 年 1 月 21 日神戸、兵庫

医療大学講堂において開催された。シンポジウムでは、Gorlin 症候群の歴史に始まり、臨床症状、遺伝子解析、歯口科病変(KCOT)、皮膚病変、遺伝カウンセリング体制、環境要因などがテーマとして取り上げられ、活発な討議が行われた。患者家族も参加し、医療サイドに留まらず、幅広い議論が展開されて有意義な一日となった。今後こうしたシンポジウムを開催する機会を設け、今後は患者家族会の結成に向けて積極的な支援を行ってゆきたいと考えている。

7) Gorlin 症候群の啓発活動:パンフレットの作成とホームページの開設(藤井克則講師、宮下俊之教授、斎藤加代子教授、杉田克生教授、野口一馬講師、内川英紀助教、塩浜直大学院生):

Gorlin 症候群を理解するためのパンフレットを作成し、第2回 Gorlin 症候群シンポジウムの配布した。Gorlin 症候群は症状が多岐にわたるため、その全体像を理解する医療関係者は比較的少ない。その意味でこのパンフレットは疾患理解の普及に役立つものと思われる。今後は改訂版を作成し、全国行政機関および医療機関に配布することを考慮している。

また Gorlin 症候群のホームページも作成して運用を継続している

(http://gorlin.chibadai-shonika.net/gorlin_syndrome/)。情報発信の場としては重要であり、今後も新規情報を更新して Gorlin 症候群の疾患理解を促進し、啓発活動につなげてゆきたいと考えている。

D. 考察

1) 全国二次調査:

昨年度初めて日本国内における Gorlin 症候群患者の一次調査(実数把握)がなさ

れ、当初予想をはるかに超える 311 名もの患者数が判明した。本年度ではこれら 311 名の患者に対して第二次アンケート調査を行い、157 症例(67 施設)の症状詳細について回答があった。年齢分布は、10~30 歳代と 60 歳以降が多い二峰性となり、それぞれ角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)および基底細胞癌(BCC)の発症年齢と合致すると思われた。BCC 発症頻度は米英豪より少なく、発症年齢は邦人で有意に高かった。これらは初めてのアジアからの報告であり、人種差および地理的要因が関与している可能性が高いと考えられた。KCOT はやや邦人に多いが発症年齢に有意差はなかった。その他の症状は、既報告との有意な相違はなかった。大脳鎌石灰化は8歳未満では認められず、幼少時の診断には有用でないと思われた。また本疾患の有病率はおよそ 10 万人あたり 0.42 人と推計された。

これら二次調査を行う中で、Gorlin 症候群に関わる複雑な社会状況が明らかとなった。まず成人期の基底細胞癌に対する治療が予想以上に困難を極めている。基底細胞癌に対して手術療法および抗癌剤治療が行われているが、経時的に多発するため根治させることが困難である。癌転移による生命の危険も生じており、基底細胞癌に対する根本的な治療法の開発が期待される。現在 PTCH タンパクの隣接タンパクである SMO を標的とした分子標的治療薬が登場し、臨床応用が行われている。現在までにヒトの基底細胞癌と髄芽腫に投与されその効果が限定的ではあるが確認されている(N Engl J Med, 361:164-72, 2009, 361:1173-8, 2009). 分子標的薬の使用に伴って SMO 遺伝子に新たな変異が加わることで薬剤効果が減じることも報告されており(N Engl J Med, 361:1173-8, 2009)、本格的な治療応用にはまだ時間が必要であろう。またこれら分子

標的治療薬は骨成長を停止させるため (Dev Cell, 14:689-699, 2008)、小児における臨床応用は現時点では考えられていない。これらのことから成人領域の基底細胞癌ではともかく、小児期に発症する髄芽腫の治療はやはり早期発見、早期治療に尽きるといっても過言ではない。

従来根本的治療がなかった Gorlin 症候群で多発する基底細胞癌に対する分子標的薬の登場は、本疾患における早期診断の重要性をますます高めるものとなるだろう。

2) PTCH1 遺伝子解析:

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、ソニックヘッジホッグタンパクの受容体として機能する。*PTCH1* 遺伝子変異は、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。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、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ない、80%以上の症例でその遺伝子変異を同定している。

今回宮下らは NBCCS の責任遺伝子である *PTCH1* に複数のエクソンで重複が見られた症例と、ヘッジホッグシグナル伝達経路の下流で機能する *SUFU* 遺伝子に変異のある症例を報告した。前者は国内外を通じて初めての症例であり、後者は2例目

であった。前者からは通常の方法で変異陰性の場合のコピー数解析の重要性が示され、後者からは文献的考察も含めて *SUFU* 遺伝子に変異のある症例は高率に髄芽腫を発生することが示された。いずれも今後の本症候群の診断と経過観察に重要な示唆を与えるものであった。

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。その上で *PTCH1* 遺伝子解析の意義は次の二通りが考えられる。すなわち第一に小児期早期の Gorlin 症候群には特徴的な臨床症状がそろわないことがあるため、*PTCH1* 遺伝子解析により早期診断を行い、注意深い経過観察と可能な治療に入ることが可能になる。第二に分子標的薬が今後臨床応用される際に、その治療効果の予測に遺伝子解析が用いられる可能性がある。Gorlin 症候群における Germline 変異を明らかにすることで分子レベルの治療選択が実現することも考えられ、本解析はその意味でも意義深いものになるだろう。

3) Gorlin 症候群の臨床像と遺伝子変異:

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、中でも Kimonis らの診断基準が臨床上最も汎用されている。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。この中で、主要5症候の基底細胞癌、皮膚小陥凹、顎骨内嚢胞、椎骨肋骨異常、大脳鎌石灰化は臨床上よく認められる症状であるがこれらは年齢依存性に出現し、診断基準にない症候も多く存在

するため早期には診断に難渋することが多い。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。従ってこのような状況においては、Gorlin 症候群と確定診断するためにその責任遺伝子である *PTCH1* 解析が有用である。

なお今回の二次調査で注目すべき臨床点としては、基底細胞癌の有色人種における発症率の低さが挙げられる。二次調査の詳細な解析では、欧米人種と比較して明らかに日本人の基底細胞癌の発症頻度は低く、その発症機序に人種差が存在することが考えられた。今後基底細胞癌の予防法および治療法を考える上で重要な易学情報になりうると思われる。

Gorlin 症候群は次の三つの理由から早期診断が非常に重要な疾患といえる。第一に高発癌性疾患であり、様々な腫瘍が年齢依存性に出現する。早期診断により発生する癌を定期的にチェックすることで腫瘍の早期発見から治療に導くことが重要である。第二に早期診断により治療や環境に伴って発生する二次癌を予防することができる。

Gorlin 症候群では髄芽腫における放射線治療により、その照射域に一致して多数の基底細胞癌やその他の二次癌が生じる現象が報告されている。また早期診断により不必要な放射線や紫外線照射を避け、基底細胞癌の発症リスクを低下させることが求められる。第三には正しい診断により不必要な検査を避けることができる。経時的な頭部 CT は頭部 MRI で代用可能であり、顎骨嚢胞はその好発年齢時に限って検査を行なうことができる。このように年齢依存性に出現する症状を必要最小限の検査で捉えるためにも早期診断は重要である。

Gorlin 症候群は今回我々が示したように非常に広い症候スペクトラムを呈するがゆ

えに診断に難渋し、なおかつ未だ不明な点も多い。今後も二次調査を通じて更なる症例の解析を行い、疾患理解を深めていくことが必要である。

E. 結論

全国第二次調査により 157 名の Gorlin 症候群患者の臨床症状の詳細が明らかになり、その臨床像は欧米豪とは異なり、基底細胞癌の発生疫学が低く、成人期の発癌問題の特殊性が改めて注目された。今後これらの発癌に対してアジア独自の方策を立てる必要性が考えられた。また *PTCH1* 遺伝子変異のみならず *SUFU* 遺伝子変異例も今回報告され、多様な遺伝子変異スペクトラムによって Gorlin 症候群が発症することが示された。また細胞生物学的に Gorlin 症候群の発症メカニズムも検討され、病態解明の一端になることが示された。

本研究成果により Gorlin 症候群の診断率向上、一般診療現場に貢献するのみならず、疾患発生の分子機序の解明を通じて、新たな局面を開くことが今後期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(主要原著論文および発表のみを記す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

1. 論文発表

Endo M, Fujii K, Sugita K, Saito K, Kohno Y, Miyashita T. Z Nationwide survey of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma. *Am J Med Genet* 2012;158A:351-357.

Fujii K, Matsuo K, Takatani T, Uchikawa H,

Kohno Y. Multiple cavitations in posterior reversible leukoencephalopathy syndrome associated with hemolytic-uremic syndrome. *Brain Dev* 2012;34:318-321.

Kazato Y, Fujii K, Oba H, Hino M, Ochiai H, Uchikawa H, Kohno Y. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome associated with brain parenchymal hemorrhage. *Brain Dev* (in press).

2. 学会発表

5th Europediatrics 23-26, June, 2011 Vienna, Austria

Nationwide survey of Gorlin syndrome in Japan

Fujii K, Endo M, Mizuochi H, Uchikawa H, Sugita K, Kohno Y, Saito K, Miyashita T.

5th Europediatrics 23-26, June, 2011 Vienna, Austria

Bone mass density in patients with Gorlin syndrome is partially regulated by hedgehog signaling

Mizuochi H, Fujii K, Miyashita T, Suyama M, Endo M, Uchikawa H, Kohno Y

5th Europediatrics 23-26, June, 2011 Vienna, Austria

Identification of *PTCH1* mutations in Japanese Gorlin syndrome patients

Uchikawa H, Fujii K, Miyashita T, Endo M, Mizuochi H, Kohno Y.

第 53 回日本小児神経学会総会(パシフィコ横浜) 2011.5.26-28

「本邦における Gorlin 症候群 157 例の臨床的検討」

遠藤真美子、藤井克則、水落弘美、須山麻衣子、内川英紀、宮下俊之、斎藤加代子、杉田克生、河野陽一

第 53 回日本小児神経学会総会(パシフィコ横浜) 2011.5.26-28

「*Alu* 配列を介した *PTCH* 遺伝子全欠失の Gorlin 症候群親子例」

本島敏乃、藤井克則、宮下俊之、引間昭夫、遠藤真美子、河野陽一

第 53 回日本小児神経学会総会(パシフィコ横浜) 2011.5.26-28

「Nasal glioma を合併した Gorlin 症候群の 1 男児例」

内川英紀、藤井克則、大場洋、宮下俊之、遠藤真美子、須山麻衣子、水落弘美、河野陽一

第 53 回日本小児神経学会総会(パシフィコ横浜) 2011.5.26-28

「Gorlin 症候群と骨形成の検討—動物モデルと骨密度との関連—」

水落弘美、藤井克則、宮下俊之、須山麻衣子、遠藤真美子、内川英紀、河野陽一

第 70 回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場)2011.10.3-5

「Low incidence of basal cell carcinomas in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan」

Fujii K, Miyashita T.

第 70 回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場)2011.10.3-5

「Molecular pathogenesis of keratocystic odontoidgenetic tumor developed in nevoid basal cell carcinoma syndrome」

Suzuki M, Nagao K, Takayama Y, Fujii K, Miyashita T.

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

II 分担研究報告

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）の遺伝子解析を行なってきた。今年度我々は通常の方法では変異が見出せなかった症例の中に、NBCCS の責任遺伝子である *PTCH1* に複数のエキソンで重複が見られた症例と、ヘッジホッグシグナル伝達経路の下流で機能する *SUFU* 遺伝子に変異のある症例を経験した。前者は国内外を通じて初めての症例であり、後者は 2 例目であった。前者からは通常の方法で変異陰性の場合のコピー数解析の重要性が示された。後者からは文献的考察も含めて *SUFU* 遺伝子に変異のある症例は高率に髄芽腫を発生することが示され、いずれも今後の本症候群の診断と経過観察に重要な示唆を与えるものであった。

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。それに加えて、基底細胞癌、角化嚢胞性歯原性腫瘍、髄芽腫等を高頻度に発症する高発癌性遺伝疾患でもある。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 NBCCS の遺伝子解析を行なってきた。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なかで、通常の方法では変異が見出されない 2 症例を経験し、更なる詳細な解析でこれらの症例の病因を明らかにすることを目的とした。

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* 全エキ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 の構造を解析した。

症例 1 に対しては MRC-Holland 社の MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) Kit を用いて MLPA 法による *PTCH1* 遺伝子のコピー数解析を行った。遺伝子重複が疑われる領域の切断点をはさむようにプライマーを設計し、PCR 法で切断点を含む領域を増幅した後、塩基配列を決定した。また、イントロン 16 の配列を含むプローブを PCR 法で増幅し、³²P 標識してサザンブロットを行った。更にエキソン 15 とエキソン 13 に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行い、かなる異常 mRNA

が転写されているかを解析した。

症例 2 に対しては、*SUFU* 遺伝子の全エキソンの塩基配列を PCR シーケンス法にて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は北里大学医学部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。

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 45 家系（54 症例）に達し、内 42 家系で何らかの遺伝子変異を見出した（表 1）。

変異の種類	家系数
数塩基までの挿入・欠失・重複	20 家系
スプライス変異	6 家系
ミスセンス変異	4 家系
ナンセンス変異	5 家系
遺伝子全体の欠失	5 家系
大きな重複	1 家系
<i>SUFU</i> 変異	1 家系

表 1 *PTCH1* の遺伝子解析の結果

症例 1 は 14 歳女性。Kimonis の診断基準のうち大症状 3 つと小症状 2 つを満たす典型的な NBCCS であった。*PTCH1* 全エキソンで変異陰性であった。MLPA 法の結果よりエキソン 10



図 1 症例 1 の遺伝子重複

症例	遺伝子変異	大症状	小症状	その他の症状	陰性データ
1	2.5Mb deletion		髄芽腫、先天奇形 (前頭突出、両眼解離)	発達遅延	
2	c.143dupA		髄芽腫	放射線照射域に髄膜腫	発達異常なし、 癌の家族歴なし
3	c.183-1G>T		髄芽腫		発達異常なし
4 (5の父)	c.1022+1G>A	足底の小陥凹、大 脳鎌石灰化	大頭症		奇形なし
5	c.1022+1G>A	手掌・足底の小陥 凹、第一度近親に NBCCS (父)	髄芽腫、大頭症	運動発達遅延、傾眠、 癌の家族歴 (母：乳 癌)	奇形なし、 出生時異常なし、 胸・腹・心臓 検査異常なし
本症例 (症例2)	c.550C>T	基底細胞癌、大脳 鎌石灰化	髄芽腫、 先天奇形 (前頭突出 、両眼解離)	髄膜腫、下垂体石灰化、 中等度肥満、脳梁無形 成、脳硬膜石灰化、顔 頸部の皮下結節、精神 遅滞、眉癒合	

表2 *SUFU*に配偶子変異を認めた症例のまとめ

から17のヘテロの重複が疑われた。タンデムの重複と仮定し、切断点をはさむと思われる位置にプライマーを設計して行ったPCRにて、本症例特異的なDNA増幅が認められた。PCR産物の塩基配列から、切断点はエキソン10とイントロン17にあることが証明された(図1矢印)。RT-PCRより、スプライシングはエキソン17と11の間で生じていることが明らかとなった。この構造はサザンブロット法でも確認された。複数のエキソンにわたる大きな遺伝子重複により発症したNBCCSは世界で初めての症例であった。

症例2は45歳の男性。診断基準のうち大症状2つと小症状2つを満たすやはり典型的なNBCCSであった。1歳9ヶ月時に髄芽腫を発症し、外科的摘出と40Gyの放射線照射を受けた。32歳時に髄膜腫を発症している。やはり*PTCH1*全エキソンで変異陰性であったため、ヘッジホッグシグナル伝達経路の下流で機能する*SUFU*遺伝子の全エキソンの塩基配列を解析したところエキソン4にc.550C>T(p.184Q>X)なるナンセンス変異が見出された。現在までに本症例を含め、国内外から5家系6症例の*SUFU*の配偶子変異例が報告されている。このうちNBCCSの診断基準を満たす症例は3/6症例、髄芽腫は5/6症例であった(表1)。

E. 結論

症例1からは、通常のPCRシーケンス法にてNBCCSの責任遺伝子である*PTCH1*に変異が認められない症例では、MLPA法、あるいはマイクロアレイ法などによる遺伝子のコピー数解析の必要性が示された。

また*PTCH1*の変異によるNBCCSは浸透率が極めて高く、髄芽腫の発症は約4%であることと比較して、*SUFU*の変異では必ずしもNBCCSとは臨床診断されない一方で、髄芽腫の発症が極めて高率であることが症例2及び文献の考察から示された。また、NBCCSに発症した髄芽腫に放射線治療を行った場合、従来報告のある基底細胞癌以外にも、髄膜腫の発症リスクも高まると考えられた。

本研究はNBCCSの遺伝子診断と経過観察に重要な示唆を与えるものである。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Endo, M., Fujii, K., Sugita, K., Saito, K., Kohno, Y., and Miyashita, T. (2012) Nationwide survey of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma. *Am. J. Med. Genet A.* 158A, 351-357

Ishizuka, Y., Furuta, J., Miyashita, T., and Otsuka, F. Splicing aberration in nevoid basal cell nevus syndrome. *Acta Derm.-Venereol. in press*

塩浜直, 内川英紀, 水落弘美, 宮下俊之, 藤井克則. ヘッジホッグシグナル伝達と脳腫瘍 (2012) 脳神経外科速報 22, 66-73

2. 学会発表

宮下俊之, 桐生麻衣子, 佐々木亮, 齋藤加代子, 藤井克則. 母斑基底細胞癌症候群に発症した歯原性腫瘍の遺伝子解析. 遺伝医学合同学術集会. 2011.6.16-19. 京都

鈴木麻衣子, 長尾和右, 高山吉永, 初瀬洋美, 亀山孝三, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群に発症する角化嚢胞性歯原性腫瘍の遺伝子解析. 第 24 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2011.8.23-24. 相模原

鈴木麻衣子, 長尾和右, 高山吉永, 藤井克則, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群に発症する角化嚢胞性歯原性腫瘍の腫瘍化機序の解析. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2011.10-3-5. 名古屋

藤井克則, 宮下俊之. 日本における母斑性基底細胞癌症候群における基底細胞癌発症率. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2011.10-3-5. 名古屋

鈴木麻衣子, 長尾和右, 高山吉永, 亀山孝三, 藤井克則, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群に発症した角化嚢胞性歯原性腫瘍の発症機序の解析. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011.12-13-16. 横浜

宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群の分子遺伝学. 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会. 2011.11-9-12. 千葉. シンポジウム

宮下俊之. Gorlin 症候群の遺伝子解析. 第 2 回 Gorlin 症候群シンポジウム. 2012.1.21. 神戸. シンポジウム

木島千尋, 岡秀宏, 宇津木聡, 宮島良輝, 萩原宏之, 安井美江, 藤井清孝, 宮下俊之. 髄膜腫を合併した Gorlin 症候群の分子遺伝学的検討. 第 116 回日本脳神経外科学会関東支部学術集会. 2011.12.10. 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

Gorlin症候群における遺伝カウンセリングの実践と課題

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

多発性顎嚢胞を認め Gorlin 症候群が疑われた 6 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、5 例に *PTCH* 遺伝子変異を認め確定診断を得た。遺伝カウンセリングにおいては疾患の十分な理解を促すと同時に、遺伝子変異が家系で共有され、未発症の at risk の家系員に有用な情報になることを伝える必要がある。しかし、家族関係や家系員の年齢を視野に入れながら、提供する内容、タイミングについて考慮していくことが重要である。

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

2007 年～2012 年までの間に臨床症状より Gorlin 症候群が疑われ、遺伝子検査を希望した 6 家系の遺伝カウンセリングの内容について検討し、検査前の遺伝カウンセリング、結果開示の遺伝カウンセリングについて、内容を分析し、課題となる点、今後、工夫していくべき点を抽出した。

(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 症候群の遺伝カウンセリングの要点

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、本症が浸透率 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すること、つまり罹患者の子は発症の可能性が 50%であることを伝える。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可能性があり、同胞がいる場合にはやはり 50%の確率で遺伝子変異を有することを伝える。ただし、患者や同胞が未成年の場合にはその後の対応に細かい配慮も必要になる。症状が腫瘍にかかわるため、未成年の at risk の家系員に不安を生じさせないようにさせていくことが大切である。

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、未成年者へのインフォームド・アセント(子どもからの同意)に留意し、結果の出た後の結果の解釈、説明も十分に理解を得られるような情報提供を心がける。

2) Gorlin 症候群の遺伝カウンセリングに関する留意点

症例の家族背景により、留意すべき観点を抽出し、それについて検討した。

①未成年者への配慮:6 症例のうち、2 症例は、10 代の未成年者であり、それぞれ *PTCH* 遺伝子変異、症例1(c.1067+1G>C)、症例2(c.1472delT)を認めた。

症例 2 は本人に詳しい疾患の話がなされておらず、初回

は母親への遺伝カウンセリングとなった。本人へどのように疾患についての説明をし、理解を促していくか、また遺伝子検査についても、インフォームド・アセントを得られるように、年齢に応じてわかりやすく伝えることが重要と考えられた。症例1では、親と一緒に遺伝カウンセリングを受けていたが、症状がない他児への心配が話題になった。本人と同時に親も過度に不安を生じないようにしていくことや他の同胞への配慮についてもカウンセリングの中で扱う必要があった。

②知る権利と知らないでいる権利

症例3は、結果の開示について考慮すべき点があった。症例3は68歳男性で、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。3人の同胞がおり、その内の1人に多発性顎嚢胞があり、Gorlin症候群と考えられた。しかし、兄弟同士が疎遠で、自身も遺伝子検査の結果はすぐに知りたくないと表明していた。

③遺伝情報と保険加入

症例4は23歳女性、多発性顎嚢胞、多発性埋伏歯を認め、Gorlin症候群を疑われ、遺伝カウンセリングに紹介となった。臨床所見において、Kimonsの診断基準からは典型ではなく、遺伝子検査においてもPTCH遺伝子変異は認めなかった。検査前の遺伝カウンセリングの中で、医療情報には生かして欲しいが、遺伝子診断で確定となると、今後、保険に加入しにくくなる可能性等を考えると今は結果が出て自分では知りたくないという意味を表明していた。民間保険において、遺伝情報を保険会社に知らせる義務は明確ではない。しかし、このように慎重に遺伝情報の開示について考える患者にも対応していくことが求められている。

D. 考察

Gorlin症候群を疑われた6例の遺伝カウンセリングを実施し、1)未成年者への配慮、2)知る権利と知らないでいる権利、3)保険加入の問題が引き出された。

アメリカ小児科学会による、インフォームド・アセントの実践に必要な要素は以下の4点が考えられている。

1. 子どもたちが自分の症状について発達段階に適した理解が得られるよう支援する
2. なされる検査や処置の内容とその結果について

子どもに説明する

3. 子どもの状況理解や反応に影響を与える要素について臨床的に査定する
4. 提案されたケアについて自発的に子どもが納得しているか否かを表現できるよう工夫する

2例の10代患者には、上記に留意しながら、将来起こるかもしれない症状について、不安を生じさせないように工夫し、遺伝子検査についても同意を得ていく必要がある。また、成人患者で、家族とは疎遠になっており、結果を特に伝えない、自分もすぐには知りたくないという患者に対しては、知らないでいる権利は認められるが、at riskの家系員に対しての情報開示も必要であるため、スタッフ間でも話し合い、対応していくことが重要である。

さらに、遺伝子検査を受ける場合には、遺伝子変異が同定された際の保険加入の問題が考えられ、症例4は結果をすぐには聞かない選択した。民間保険加入の際の告知義務については、現在のところ、保険加入申込の際に遺伝子検査の受診や、過去の検査結果の提示を求めている。しかしながら、遺伝子検査が臨床医学における一般的な検査になれば、告知の対象になるかもしれないため、今後の動向を考慮しながら、遺伝カウンセリングの内容に反映させていく必要が出てくるだろう。

E. 結論

Gorlin症候群と臨床診断した6例中5例に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が、遺伝カウンセリングに際しては、クライアントの年齢や家族関係も加味しながら、情報提供の内容を考えていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 浦野真理: 福島義光編、遺伝カウンセリングハンドブック「心理アセスメント」株式会社メディカルドゥ 182-183, 2011
2. 浦野真理: 福島義光編、遺伝カウンセリングハンドブック「実施上の留意点・転移と逆転移」株式会社メディカルドゥ 244-245, 2011
3. 安藤記子、浦野真理: 福島義光編、遺伝カウンセリングハンドブック「心理検査・評価尺度」株式会社メディカルドゥ

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ウ 396-397,2011

4. 斎藤加代子、松尾真理、菅野仁、浦野真理、相楽有規子.. 小児科領域における研究と治療の進歩 遺伝子医療.. 東京女子医科大学雑誌. 81(5):349-355;2011.
5. 斎藤加代子. 臨床遺伝学と遺伝カウンセリング. ドクターサロン. 55(7):17-20;2011.
6. 斎藤加代子、荒川玲子. 遺伝カウンセリング. 総合臨床. 60(4):599-600;2011.
7. 斎藤加代子、浦野真理、松尾真理、佐藤裕子. 遺伝子診療のなかでの遺伝カウンセリングの基礎と実践. 産婦人科の実際. 60(9):1253-1260;2011.
8. 斎藤加代子、浦野真理、佐藤裕子. 遺伝カウンセリング. 精神科. 20(1):33-37;2012.

2. 学会発表

1. 斎藤加代子. Gorlin 症候群の臨床 4) カウンセリング. 第2回 Gorlin 症候群シンポジウム. 2012.

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

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」

IFN- β による細胞増殖抑制に関わる miR-431 に関する研究

研究要旨

ゴーリン症候群での髄芽腫は、主に幼少期に合併することが多い疾患であり、それに対する免疫療法として、IFN- β 投与があるがその有効率は低い。我々は、本研究前に他の細胞株を用いた検討により、IFN- β による細胞増殖抑制に microRNA-431(miR-431)が深く関与していることを報告している。この結論を基に本研究では、ゴーリン症候群に合併することの多い髄芽腫ならびに IFN- β 投与による免疫療法が臨床的に行われている膠芽腫の培養細胞を用いて、IFN- β による細胞増殖抑制に miR-431 が関与していると推察し、基礎的検討を開始した。本研究で用いた培養細胞の IFN- β 感受性、miR-431 ならびに miR-431 の Target Gene である SOCS6 の発現量を検討した結果、IFN- β 投与による細胞増殖抑制に伴い、miR-431 発現量は有意に低下した一方で、SOCS6 の発現量は有意に増加していた。以上の結果より、IFN- β による細胞増殖抑制に、miR-431 と SOCS6 の発現が深く関与していることが示唆された。

研究分担者

杉田克生（千葉大学教育学部・教授）

研究協力者：田中健史（千葉大学医学部・助教）

(2) 細胞培養

ONS76 細胞は、牛血清を 10% (w/w) 含む RPMI1640 中で培養した。TE671, DAOY, A172 細胞は、牛血清を 10% (w/w) 含む Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) 中で培養した。U251MG 細胞は、牛血清を 10% (w/w) 含む Minimum Essential Medium (MEM) 中で培養した。

A. 研究目的

ゴーリン症候群での髄芽腫は、主に幼少期に合併することが多い疾患である。標準的な治療法は、手術療法、放射線療法、化学療法であるが、それに加え、免疫療法として、IFN- β の静脈内投与、腫瘍摘出腔内投与等が試みられている。しかしながら、その有効率が高いとは決して言えない。今回我々は、IFN- β が臨床的に治療薬として使用されている膠芽腫、髄芽腫に注目し、その抗腫瘍・細胞増殖抑制作用に、特定の microRNA (miR-431) が関与していることが推察され、検討を行った。

(3) IFN- β 添加による細胞増殖抑制作用に関する検討 (MTS Assay 法)

直径 35mm、6 well の新しい培養シャーレに 5×10^5 細胞/ml で撒き、それぞれの濃度 (1000 IU/ml, 50000 IU/ml, 100000 IU/ml) で IFN- β を培養液中に添加し、24, 48 時間後に、MTS Assay 法 (BIORAD Microplate Reader 490nm) を用いて細胞生存率を検討した。

B. 研究方法

(1) 培養ヒト細胞

髄芽腫細胞 (ONS76, TE671, DAOY) および膠芽腫細胞 (A172, U251MG) を用いた。

(4) microRNA-431 (miR-431) 発現量の変化に関する検討 (Real-time PCR 法)

直径 60mm の新しい培養シャーレに、 5×10^5 細胞/ml で撒き、それぞれの濃度 (1000 IU/ml, 50000