

IU/ml, 100000 IU/ml) で IFN- β を培養液中に添加し、24, 48 時間後に、トリゾル処理を施した後、Total RNA を抽出した。次に、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit を用いて、それぞれの Total RNA から cDNA を合成し、合成した cDNA を基に、TaqMan MicroRNA primer を用いて、Real-Time PCR 法 (Applied Biosystems: StepOne Real-Time PCR system) により、miR-431 の発現変化を検討した。

(5) 「IFN- β 添加 + miR-431 molecule transfection」による細胞生存率の変化に関する検討 (MTS Assay 法)

(3) と同様に、IFN- β をそれぞれの濃度で培養液中に添加し、更に各細胞株に miR-431 molecule を siPORT Neo FX Transfection Agent を用いて、50 pM transfection した。48 時間後、MTS Assay 法 (BIORAD Microplate Reader 490nm) を用いて細胞生存率を検討した。

(6) miR-431 の Target Gene の検索

miR-431 の Target Gene の検索には、Target Scan Human (<http://www.targetscan.org/>) を活用した。

(7) Target Gene の mRNA 発現量の検討

(Real-Time PCR 法)

各細胞株に、100000 IU/ml の IFN- β のみ培養液中に添加したものと、更に miR-431 molecule を transfection したものを作成し、48 時間後それぞれから RNA を抽出した。それらを基に cDNA を合成し、あらかじめ設定した Target Gene の Primer を基に、Real-time PCR 法での発現量の変化を検討した。

(8) Target Gene の発現量の検討 (Western Blotting 法)

(7) と同様の条件で各細胞株を培養し、48 時間後に SDS 処理する。それを基に、Western Blotting 法で、蛋白質レベルの Target Gene の発現量を検討した。

C. 研究結果

(1) 培養細胞株に、IFN- β をそれぞれの濃度添加し、24, 48 時間培養したところ、濃度・時間依存的に細胞生存率の低下を認めた。

(2) 各細胞株に、IFN- β をそれぞれの濃度で添加し、24, 48 時間培養した後に、miR-431 の発現量の変化を解析した結果、いずれの条件においても miR-431 の発現量は、有意に低下していた。

(3) 培養細胞に IFN- β 100000 IU/ml 添加し、更に miR-431 molecule も transfection し、48 時間後に細胞生存率を検討した結果、細胞増殖抑制は認められなかった。(図 1)

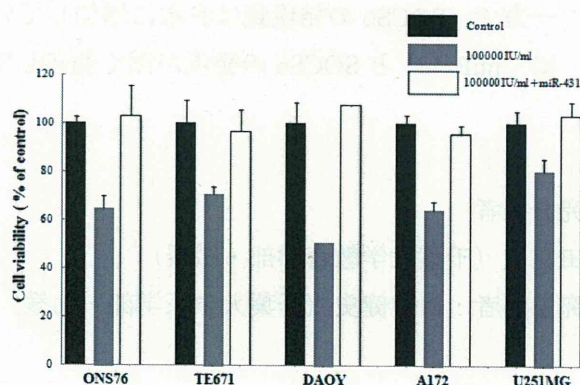


図 1. 細胞生存率

(4) Target Scan Human を用いて、miR-431 の Target Gene を検索した結果、166 Genes が候補遺伝子であった。それらのうち、IFN- β による細胞増殖抑制作用に関与すると考えられた SOCS6 (suppressor of cytokine signaling 6) に注目した。

(5) 各細胞株に、100000 IU/ml の IFN- β のみ培養液中に添加したものでは、48 時間後、SOCS6 の mRNA 発現量は増加していた。一方で、IFN- β 添加に加え、miR-431 molecule も同時に transfection したものでは、SOCS6 の mRNA 発現量は有意に減少していた。

(6) Western Blotting 法により、SOCS6 の発現を

検討した結果を図2に示す。

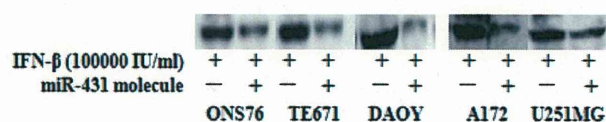


図2. SOCS6 発現

IFN-β 100000 IU/ml 添加単独では、SOCS6 発現量は増加しているが、それに miR-431 molecule を transfection すると、SOCS6 の発現は抑制された。

D. 考察

我々が既に他の細胞株を用いて報告した、IFN-β による細胞増殖抑制に、miR-431 が深く関与しているという結論を基に、今回我々は、ゴーリン症候群患者に合併することが多く、免疫療法として、IFN-β 治療が行われる髄芽腫、さらに膠芽腫に注目し、それらの細胞株を用いて同様に基礎的検討を進めた。

両細胞株において、IFN-β による細胞増殖抑制に伴い、miR-431 の発現は有意に低下していた。microRNA は、各 Target Gene の翻訳を抑制することにより、遺伝子発現を調節する機能を有する。IFN-β 投与により、miR-431 の発現が有意に低下していたことで、我々が注目した SOCS6 の発現が有意に上昇していたと考えられる。SOCS6 は、Jak / Stat Pathway に関与する遺伝子であり、特に Jak を抑制する。その結果、Jak 以下の細胞増殖促進に関与する Signal 系遺伝子の応答が阻害され、細胞増殖が抑制されることが考えられた。Jak 以下の Signal 系遺伝子の発現変化については、現在も解析を進めている。

本研究の結果を基に、髄芽腫、膠芽腫における IFN-β による細胞増殖抑制機構を解明することで、その有効性を高めることが期待される。

E. 結論

IFN-β 投与により、miR-431 の発現が抑制され、それに伴い SOCS6 の発現が亢進されることで、髄芽腫、膠芽腫における細胞増殖が抑制されることが考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka T, Sugaya S, Kita K, Arai M, Kanda T, Fujii K, Imazeki F, Sugita K, Yokosuka O, Suzuki N. Inhibition of cell viability by human IFN-β is mediated by microRNA-431. *Int J Oncol.* 40, 1470-76, 2012.
2. Kita K, Sugita K, Chen S-p, Suzuki T, Sugaya S, Tanaka T, Jin Y-U, Satoh T, Tong X-B, Suzuki N. Extracellular recombinant annexin II confers UVC resistance and increases the Bcl-xL to Bax protein ratios in human UVC-sensitive cells. *Radiation Research* 176:732-742, 2011.
3. Endo M, Fujii K, Sugita K, Saito K, Kohno Y, Miyashita T. 2011. Nationwide survey of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma. *Am J Med Genet Part A* 9999:1-7, 2011.
4. Sugaya S, Tanaka K, Akagi T, Kasetani T, Qiu-Ji Z, Guo WZ, Udagawa A, Nomura J, Sugita K, Ohta R, 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 Journal* 2011, 87(5).
5. 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. *IMJ* 2011, 18(2), 130-132

2. 学会発表

1. 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、齋藤加代子、杉田

克生、河野陽一 第 53 回日本小児神経学会
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
2011/5/27 パシフィコ横浜

2. 田中健史、菅谷茂、喜多和子、新井誠人、神
田達郎、今関文夫、横須賀収、鈴木信夫、
「Human IFN- β により発現上昇した miR-431
は、細胞増殖調節に重要な役割を果たす」第
84 回日本生化学会 2011/9/21-24 国立京都国
際会館
3. 杉田克生 日本児童青年精神医学会 第 52
回日本児童青年精神医学会総会 研修コー
ス 5 「イメージからせまる小児神経疾患」
2011/11/11 あわぎんホール
4. 喜多和子、佐藤哲生、陳 仕萍、トウギョウ
ハ、菅谷 茂、杉田克生、鈴木信夫 細胞外
放出 anneixn II による X 線および抗癌剤に
対する抵抗化 第 54 回日本放射線影響学会
大会、2011/11/18、神戸商工会議所.

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 野口一馬 兵庫医科大学医学部・歯科口腔外科学講座・講師

研究要旨

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死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。

A. 研究目的

Gorlin 症候群は Gorlin らによって報告された身体的奇形と高発癌性を特徴とする神経皮膚症候群で、身体奇形では手掌足底の皮膚小陥凹、椎骨肋骨奇形、大頭症、大脳鎌石灰化が、腫瘍性疾患としては顎骨腫瘍や基底細胞癌、髄芽腫等を多発する高発癌性遺伝疾患である。とくに本症候群では 10～20 歳代に顎骨内に角化嚢胞性歯原性腫瘍（keratocystic odontogenic

tumor : KCOT）を生じることが知られており、本研究班の全国調査により本邦における KCOT の発生頻度は臨床症状の中で最も多く、86.3%の患者が発症していることが確認されている。

KCOT は、従来は歯原性嚢胞としての扱いであったが、2005 年の WHO 分類から組織性格が他の嚢胞には見られない増殖能、侵襲的性格や再発傾向を示すことから良性歯原性腫瘍に区別されるようになった。KCOT は孤立性もしくは

は多発性に顎骨内に生じるが、Gorlin 症候群患者の KCOT は多発性で、再発率が高く、発生部位も下顎骨だけでなく上顎骨にも発生し、がん化率も高い、など孤立性に発生する非症候性の KCOT とは性格が異なる。

ところが KCOT は良性腫瘍で、高い細胞増殖能を有するものの、がん細胞とは異なり不死化と自己複製能を持ち合わせていないため、病理組織学的解析が一般的で、細胞生物学的・分子生物学的解析はほとんどなされていないのが現状である。また、近年では Gorlin 症候群の疾患モデルとして原因遺伝子の *PTCH1*^{+/−} の遺伝子改変マウスが使われるようになったが、マウスは齧歯類であり *PTCH1*^{+/−} KCOT モデルを応用しても病理組織学的解析と同様にヒトの病態モデルにはなり得ない。そのため、われわれは KCOT の細胞生物学的特性を解析するための足がかりとして、Gorlin 症候群患者および非症候群患者の KCOT 腫瘍細胞の初代培養を行い、さらに、これらの培養細胞をいくつかの遺伝子を導入することになり不死化することを試みた。

A. 研究方法

① KCOT 細胞培養の試み

Kimonis の診断基準に従い、Gorlin 症候群と診断された患者と臨床的に Gorlin 症候群ではない患者の KCOT の手術材料を用いた。患者には文書によ

る IC を行い、文書で同意を得た患者の手術材料のみを使用し、本研究は兵庫医科大学倫理委員会の承認を得て行われた。手術標本を 1mm 大に細片し、ケラチノサイト専用培地を用いて outgrowth 法で初代培養を開始した。同時に摘出腫瘍は HE 染色により KCOT であることを確認した。なお、Gorlin 症候群では皮膚の基底細胞癌や KCOT など基底細胞（ケラチノサイト）由来の病変が発生するので、従来の研究のように線維芽細胞ではなく、KCOT から初代培養を目指した。outgrowth 法により得られた細胞は 2 つに分け、0.25% EDTA-trypsin を用いてそのまま継代を続けた群と、適切な細胞数が得られれば以下の述べる方法で不死化を試みる群に分け、培養を進めた。

② KCOT 細胞不死化の試み

研究結果①で示したように、細胞の分化を抑制できず、安定した継代ができないことが今までの本疾患の細胞生物学的解析を妨げている要因であると判断し、いくつかの遺伝子を導入することで可及的に正常に近い状態での不死化を試みた。以前から SV40 ウイルスを用いた不死化は有名であるが、KCOT の細胞生物学的性質を保存し、将来がん化メカニズムの解析に応用すべく oncogene を直接 transfection することは避け、さらに p53 の変異も誘導しないように p16/RB 経路とテロメア長の調節のみを行う様にウイル

スベクターをデザインし、レンチウイルス CS II-CMV-RfA をベクターとして変異型 CDK4、cyclinD1、hTERT を導入できる CS II-CMV-hTERT、-cyclinD1、-hCDK4R24C を作成した。これら3種類のベクターを導入順序も併せて検討した。

③ 不死化 KCOT 培養細胞の生物学的検討

得られた不死化細胞が KCOT 細胞の性質を維持しているか、また、Gorlin 症候群患者の不死化 KCOT 培養細胞での PTCH1 変異がリンパ球由来の PTCH1 変異と一致しているかどうかを PTCH1 のシーケンスを確認することで検討した。また、組織の origin の同定として KCOT 細胞に高発現し、口腔粘膜ケラチノサイトでは確認できないサイトケラチン 17 (CK17) の発現を検討した。

B. 研究結果

① KCOT 細胞培養の試み

1mm 大に細片した手術標本をプラスチックシャーレ上に静置し、37°C、5%CO₂ 下で培養すると約 1 週間から 10 日で組織周囲よりケラチノサイトが確認できるようになり (写真 1 左)、引き続き培養を継続した。KCOT 細胞は当初、順調に増殖したが 3~5 継代目で細胞は肥大化し、細胞増殖が停止する terminal differentiation の状態になった (写真 1 右)。この現象は Gorlin

症候群患者でも非症候群患者でも、また正常皮膚ケラチノサイトでも確認できるものであった。さまざまな増殖因子や分化阻害剤を培養液に添加するも terminal differentiation を回避することはできなかった。

② KCOT 細胞不死化の試み

CS II-CMV-hTERT、-cyclinD1、-hCDK4R24C を 3 継代目の KCOT 培養細胞に感染ののち、selection すると安定して増殖するコロニー形成を確認できた。これらを single cell cloning し得られた細胞を Gorlin 症候群患者由来のものは NBCCS-KCOTcct と、非症候性 KCOT より樹立したものは KCOT1cct と命名した。不死化に成功したそれぞれの KCOT 培養細胞を示す (写真 2)。培養細胞は 30 継代を超えて安定した細胞増殖を示し、倍加時間も大きく変化していないことから腫瘍性変化は起きていないものと考ええる。p53 の変異についてはウエスタンブロットによる検討のみでシーケンスの確認はまだであり、今後の検討課題である。本報告には提示しないが、本不死化での染色体異常は見られていない。

③ 不死化 KCOT 培養細胞の生物学的検討

手術標本を提供した Gorlin 症候群患者血液および NBCCS-KCOTcct より DNA を抽出し、それぞれの PTCH1 のシーケンスを確認したところ、両者に

intron3 C584+2T>G の *PTCH* gene point mutation を確認することができた。すなわち、PTCH1 の変異を保存した状態で Gorlin 症候群患者の KCOT 細胞の不死化に成功した。また、手術検体および NBCCS-KCOTcct 細胞の CK17 の発現を免疫組織化学染色で、共焦点レーザー顕微鏡にて検討したところ、写真 3 のように発現が維持されており、KCOT の生物学的特徴も保存されていることが確認できた。

D. 考察

ヒト正常培養細胞、とくにケラチノサイトは、特殊な場合を除き一定回数分裂すると細胞老化 (senescence) により細胞周期が停止する。この現象は、おもに Cyclin dependent kinase (CDK) インヒビターの増加とそれに伴う RB 経路の活性化により誘導される不可逆的な増殖停止である。テロメア短小化による CDK インヒビターの増加による増殖停止は、分裂寿命、Hayflick 限界、M1 (mortality stage 1) などと呼ばれる。他方、培養という細胞へのストレス (いわゆる “culture shock”) によって誘導されるテロメア非依存的な p21 や p16INK4a (以下、p16) などの CDK インヒビターの発現増加と RB の活性化による増殖停止も存在し、premature senescence, SIPS (stress-induced premature senescence), M0 (mortality stage 0) などと呼ばれている。この 2 つの壁を超えたものが「細胞の不死化」であり、最初に訪れる M0 に対

しては p16/RB 経路の不活化を、M1 に対してはテロメラーゼを活性化すればよいことになる。そこで、われわれは p16/RB 経路を不活化するために p16 と結合出来ない変異 CDK 4 と Cyclin D1 を、さらにテロメラーゼを活性化するために hTERT をレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、KCOT の不死化に成功した。

発がんの研究を行う上で必要な細胞はヒト正常細胞や腫瘍母細胞である。Gorlin 症候群の家族性腫瘍発生のメカニズムの解明でも延命・不死化という過程を経て幹細胞の同定や形質維持のメカニズムを解析することが課題であり、幹細胞の維持のためのフィーダー細胞の利用やそれが供給する因子やリガンドの同定、さらには ES 細胞で実現されているような至適化された培養法を開発する必要がある。同時に culture shock を極力抑える「癒し系培養法」とも呼ぶべき培養法の確立が必要であるが、それまでの間は p16/RB 経路を不活化して培養する技術が必要である。我々が行った不死化は p53 は不活化されていないため染色体不安定性は少なく初代培養細胞の性質を長期間維持できると考えられる。細胞生物学的特性を解析することにより発がん研究の足掛かりをつかめるのではないかと考えている。

E. 結論

われわれは Gorlin 症候群および非症候群

患者の発生した KCOT より腫瘍細胞を培養し、不死化技術を利用することで安定した細胞増殖と分化をコントロールした cell line を樹立した。今後はこれらの細胞を用いた細胞生物学的解析を進めていきたいと考えている。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujii M, Noguchi K, Urade M, Muraki Y, Moridera K, Kishimoto H, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano Y. Novel PTCH1 mutations in Japanese Nevoid basal cell carcinoma syndrome patients: two familial and three sporadic cases including the first Japanese patient with medulloblastoma. J Hum Genet 2011 56(4) 277-83

Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fijita M, Urade M, Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. Am J Cancer Res 2011;1(7):869-881

Toyohara Y, Hashitani S, Kishimoto H, Noguchi K, Yamamoto N, Urade M. Inhibitory effect of vitamin D-binding

protein-derived macrophage activating factor on DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis and its derived carcinoma cell line. Oncology Letters 2:685-691, 2011

Hiromoto T, Noguchi K, Yamamura M, Zushi Y, Segawa E, Takaoka K, Moridera K, Kishimoto H, Urade M. Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation Oncology Rep 26:1415-21 2011

山村倫代、野口一馬、森寺邦康、豊原幸代、大山秀樹、浦出雅裕 上顎に発生した幼児の黒色神経外胚葉性腫瘍の 1 例 日本口腔外科学会誌 57(1) 30-33 2011

森寺邦康、野口一馬、富士原将之、山本聡、高岡一樹、奥井 森、浦出雅裕 頭頸部扁平上皮癌における超選択的動注化学療法併用放射線療法の治療成績 日本口腔腫瘍学会 23(4) 129-138 2011

2. 学会発表

野口一馬、藤井 碧、浦出雅裕 Gorlin 症候群患者の病態解明と治療法の確立における歯科医師の果たす役割について 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会 2011.1.27-28 熊本

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

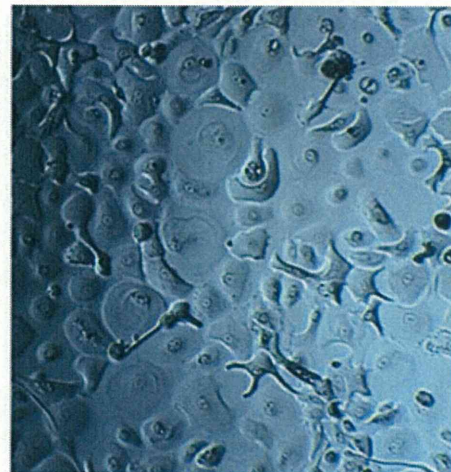
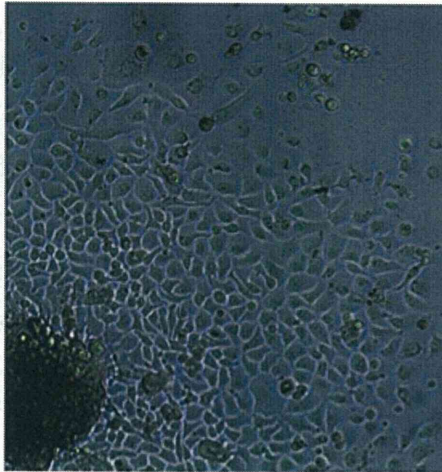
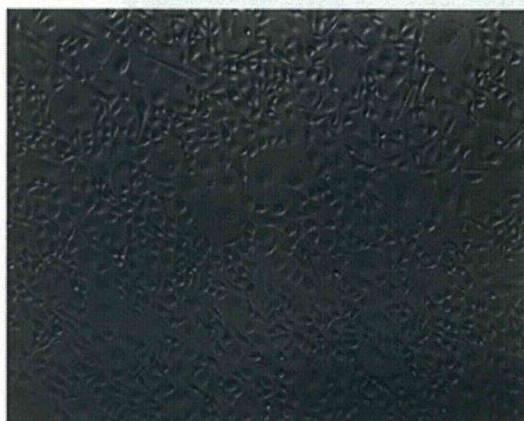


写真 1

手術により採取した KCOT 細片をプラスチックシャーレに静置し、5%CO₂、37℃で培養すると左図のように腫瘍組織周囲より腫瘍細胞の増殖が確認された。これを継代培養すると 3-5 継代目で右図のように細胞増殖が停止し、最終分化した状態になる。



KCOT1 cct



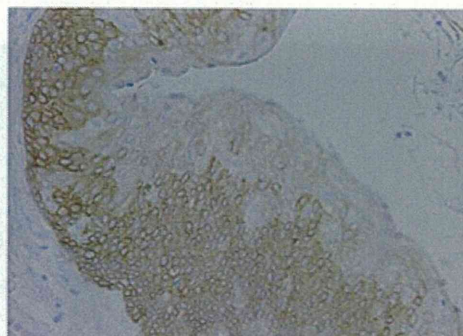
NBCCS-KCOT cct

写真 2

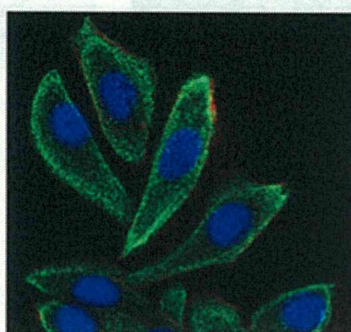
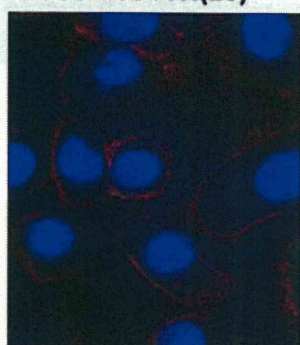
左図は非症候性 KCOT、右図は Gorlin 症候群患者の KCOT を不死化した培養細胞



NBCC-KCOTcct(10)



KCOT Immunohistochemical staining (CK17)



**NBCCS-KCOTcct
(CK17)**

Red: actin
Blue: DAPI(Nuclear)
Green: CK17

Immortalized human tongue keratinocyte (CK17)

写真 3

得られた NBCCS-KCOTcct 細胞は手術標本と同様に CK17 を高発現しており KCOT としての性質を保持していた。

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Endo M, <u>Fujii K</u> , <u>Sugita K</u> , <u>Saito K</u> , Kohno Y, <u>Miyashita</u> <u>T</u>	Nationwide survey of nevroid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma.	Am J Med Genet A	158A	351-357	2012
Ishizuka, Y., Furuta, J., <u>Miyashita, T.</u> , and Otsuka, F.	Splicing aberration in nevroid basal cell nevus syndrome.	Acta Derm.-Vener eol.		in press	
塩浜直, 内川英紀, 水 落弘美, <u>宮下俊之</u> , 藤 井克則	ヘッジホッグシグナル 伝達と脳腫瘍	脳神経外科速 報	22	66-73	2012
Tanaka T, Sugaya S, Kita K, Arai M, Kanda T, <u>Fujii K</u> , Imazeki F, <u>Sugita K</u> , Yokosuka O, Suzuki N.	Inhibition of cell viability by human IFN- β is mediated by microRNA-431.	Int J Oncol	40	1470-1476	2012
Sugaya T, Kasetani T, Qiu-Ji Z, Guo WZ, Udagawa A, Nomura J, <u>Sugita K</u> , Ohta R, Suzuki N.	Studies on the amounts of serumhydroperoxide MMP-3, urinary 8 OHDG, and salivary IgA, in rheumatoid arthritis patients who experienced Sinriyoku	Chiba Med J	87	181-187	2011
Kita K, <u>Sugita K</u> , Chen SP, Suzuki T, Sugaya S, Tanaka T, Jin YH, Satoh T, Tong XB, Suzuki N.	Extracellular recombin ant annexin II confers UVC-radiation resista nce and increases the Bcl-xL to Bax protein ratios in human UVC- radiation-sensitive cells	Radiat Res	176	732-742	2011
<u>Sugita K</u> , Uesaka T, Nomura J, <u>Sugita K</u> , Inagaki M	A family based associa tion study does not su pport DYX1C1 as a ca ndidate gene in dyslex ia in Japan	Int Med J	18	130-132	2011
Fujii M, <u>Noguchi K</u> , Urade M, Muraki Y, Moridera K, Kishimoto H, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano Y.	Novel PTCH1 mutations in Japanese Nevoid basal cell carcinoma syndrome patients: two familial and three sporadic cases including the first Japanese patient with medulloblastoma.	J Hum Genet	56	277-283	2011

Fujii K, Matsuo K, Takatani T, Uchikawa H, Kohno Y.	Multiple cavitations in posterior reversible leukoencephalopathy syndrome associated with hemolytic-uremic syndrome.	Brain Dev	34	318-321	2012
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	
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
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
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
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
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

著書

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
浦野真理	心理アセスメント	福島義光	遺伝カウンセリングハンドブック	株式会社メディカルドゥ	大阪市	2011	182-183
浦野真理	実施上の留意点・転移と逆転移	福島義光	遺伝カウンセリングハンドブック	株式会社メディカルドゥ	大阪市	2011	244-245
安藤記子、浦野真理	心理検査・評価尺度	福島義光	遺伝カウンセリングハンドブック	株式会社メディカルドゥ	大阪市	2011	396-397

IV 研究成果の刊行物・別刷

Nationwide Survey of Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome in Japan Revealing the Low Frequency of Basal Cell Carcinoma

Mamiko Endo,¹ Katsunori Fujii,^{1*} Katsuo Sugita,¹ Kayoko Saito,² Yoichi Kohno,¹ and Toshiyuki Miyashita³

¹Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

²Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

³Department of Molecular Genetics, Kitasato University School of Medicine, Sagami-hara, Japan

Received 2 September 2011; Accepted 15 November 2011

Nevroid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) is characterized by developmental defects and tumorigenesis. The clinical manifestations of NBCCS have been reported in large epidemiological studies from the United States, the United Kingdom, and Australia, but not from an Asian country. We conducted a nationwide survey and identified 311 NBCCS patients in Japan. We investigated the detailed clinical manifestations of 157 patients ranging in age from 9 months to 77 years old (mean: 33.1 years). We then compared the frequency and age of onset for various tumors developed in Japanese NBCCS patients with patients from the three countries listed above in which NBCCS studies were previously conducted. Our most significant finding was the low frequency of basal cell carcinoma (BCC) in Japanese patients. Frequency of BCC in patients over 20 years of age was 51.4%, a much lower rate compared to the United States, Australia, and the United Kingdom (91%, 85%, and 73%, respectively). The mean age of BCC onset was 37.4 years of age, a much older age compared to the above-mentioned countries. These findings suggest that differences in ethnicity and/or environmental factors affect the incidence of BCC. Because the age of BCC onset is generally higher in Japanese NBCCS patients, careful skin examination over a prolonged period of time is warranted. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: nevroid basal cell carcinoma syndrome; basal cell carcinoma; keratocystic odontogenic tumor; Gorlin syndrome

INTRODUCTION

Nevroid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS; OMIM 109400) or Gorlin syndrome is an autosomal dominant disorder characterized by developmental defects including bifid ribs, palmar or plantar pits, and tumors, such as basal cell carcinoma (BCC), medulloblastoma, or keratocystic odontogenic tumor (KCOT; formerly known as odontogenic keratocysts) [Gorlin and Goltz, 1960; Gorlin, 1987]. The estimated prevalence of NBCCS is 1 in 55,600 in the United Kingdom [Evans et al., 1993]. The gene

How to Cite this Article:

Endo M, Fujii K, Sugita K, Saito K, Kohno Y, Miyashita T. 2012. Nationwide survey of nevroid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma.

Am J Med Genet Part A 158A:351–357.

responsible for NBCCS is the human homolog of the *Drosophila patched* gene, *PTCH1* [Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996]. Heterozygous loss of *PTCH1* found in certain sporadic and familial cases of BCC indicates that *PTCH1* is also a tumor suppressor gene [Gailani et al., 1996; Uden et al., 1996]. Previously, we performed the largest analysis of NBCCS patients in Japan for *PTCH1* mutations and found diverse mutations including point mutations, insertion/deletion mutations, and entire deletions of the *PTCH1* gene [Fujii et al., 2003; Nagao et al., 2005; Sasaki et al., 2010; Nagao et al., 2011]. However, to date, genotype–phenotype correlation has not been reported [Wicking et al., 1997]. Therefore, there is no correlation between *PTCH1* mutation type and the incidence of BCC or KCOT. In addition, although missense mutations tend to cluster in the transmembrane domains, no marked hot spots or common mutations have been evident in *PTCH1* [Lindström et al., 2006].

Abbreviations: NBCCS, nevroid basal cell carcinoma syndrome; BCC, basal cell carcinoma; KCOT, keratocystic odontogenic tumor.

Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare on Science Research Grants.

None of the authors have any financial or other interest.

*Correspondence to:

Katsunori Fujii, Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-8670, Japan. E-mail: kfujii@faculty.chiba-u.jp

Published online 13 January 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/ajmg.a.34421

To date, there have been no large studies of NBCCS in Asia except one small literature-based survey from Korea [Ahn et al., 2004], which retrospectively examined 33 individuals with NBCCS. Since the incidences of various types of cancer including BCC are associated with ethnicity or geographical factors [Leiter and Garbe, 2008], it is imperative to compare the clinical manifestations of NBCCS between Asians and Caucasians. Herein, we report on the first nationwide survey of NBCCS in Asia examining 157 Japanese patients and show a markedly low frequency of BCC in Japan compared with countries in which mainly Caucasians live.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

To understand the frequencies of various clinical manifestations in Japanese NBCCS patients, we sent a questionnaire regarding the basic information of NBCCS patients including the number of patients being treated for NBCCS and their sex, age, and major clinical manifestations to the Departments of Pediatrics, Genetics, Neurosurgery, Dermatology, and Oral Surgery of University Hospitals, Regional Children's Hospitals, and large Municipal Hospitals with 500 or more beds in Japan. Out of the 1,938 medical facilities that we sent the questionnaire to, 1,107 responded, 147 of which had NBCCS cases. Then, we sent a second questionnaire regarding the detailed clinical manifestations of the patients to these facilities. We used the diagnostic criteria outlined by Kimonis et al. [1997], which have frequently been employed in previous studies (Table I). Regarding the patients enrolled in this study, they were required to have 2 of the 6 major criteria or 1 major and 2 minor criteria. This research was approved by the ethics committee of Chiba University, and conformed to the provisions of the Declaration of Helsinki in 1995 (as revised in Seoul 2008).

TABLE I. Diagnostic Criteria for NBCCS Used in Our Study

Major criteria
More than 2 BCCs or 1 under the age of 20 years
Odontogenic keratocysts of the jaw proven by histology
Three or more palmar or plantar pits
Bilamellar calcification of the falx cerebri
Bifid, fused, or markedly splayed ribs
First-degree relative with NBCC syndrome
Minor criteria
Macrocephaly determined after adjustment for height
Congenital malformations: cleft lip or palate, frontal bossing, "coarse face," moderate or severe hypertelorism
Other skeletal abnormalities: sprengel deformity, marked pectus deformity, marked syndactyly of the digits
Radiological abnormalities: bridging of the sella turcica, vertebral anomalies, such as hemivertebrae, fusion, or elongation of the vertebral bodies, modeling defects of the hands and feet, or flame-shaped lucencies of the hands or feet
Ovarian fibroma
Medulloblastoma

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 18 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical differences in the frequencies of clinical manifestations between Japanese and Caucasians were evaluated using the Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test. The distribution of the onset of the first BCC or KCOT in the affected individuals was estimated by means of Kaplan-Meier analysis. The Kaplan-Meier curves of the incidences of BCC and the KCOT in Americans reported by Kimonis et al. [1997] were scanned and plotted using Microsoft® Excel® and then compared with those of the Japanese patients. Statistical comparisons between the results of the Kaplan-Meier analyses of the Japanese and American populations were performed using the Log-Rank test. Spearman's rank-correlation coefficient was used to examine the correlation between the number of tumors and the age of onset.

RESULTS

In the first survey, we found 311 NBCCS patients in Japan. This represents a prevalence of 1 in 235,800 according to the current population estimates by the Statistics Bureau of the Ministry of Internal Affairs and Communications of Japan. After the second survey, the detailed clinical manifestations of 157 NBCCS patients were available. These patients were confirmed to include no duplications according to the date of birth, sex, and age. No significant difference in the survey questionnaire completion rate was observed among departments or types of hospitals. The patients were widely distributed throughout Japan. The ages of the 157 patients ranged from 9 months to 77 years, with their mean age being 33.1 years. There were 83 males and 74 females (ratio: 1.1:1). All but one patient, a Japanese-Brazilian boy, were Japanese. The age ranges of both sexes showed a bimodal distribution (Fig. 1), and the mean ages of the males and females were 30.09 and 36.34, respectively.

The frequencies of the various clinical features of the Japanese NBCCS patients are listed (Table II). The clinical manifestations that displayed frequencies greater than 50% were KCOT (86.3%), falx calcification (79.4%), palmar/plantar pits (69.2%), hypertelorism (68%), and a broad nasal bridge (58.4%). The major criteria that were less frequently seen included BCC (37.8%), rib anomalies (36.4%), and a relevant family history (48.4%).

We compared the frequencies of representative manifestations with those previously reported for the United States [Kimonis et al., 1997], the United Kingdom [Evans et al., 1993], and Australia [Shanley et al., 1994] (Table III). No marked differences among the populations were observed in the frequencies of clinical manifestations other than BCC and KCOT. The details of the tumors that occurred in the NBCCS patients are described below.

Basal Cell Carcinoma

Of the 148 Japanese NBCCS patients, 56 (37.8%) had BCC either as part of their clinical history or at the time of our evaluation. The frequency of BCC in patients of over 20 years was 51.4% (53/103), and that of patients of over 40 years of age was 71.7% (33/46). These frequencies were significantly lower than those described in previous reports (Table III). A less significant difference was

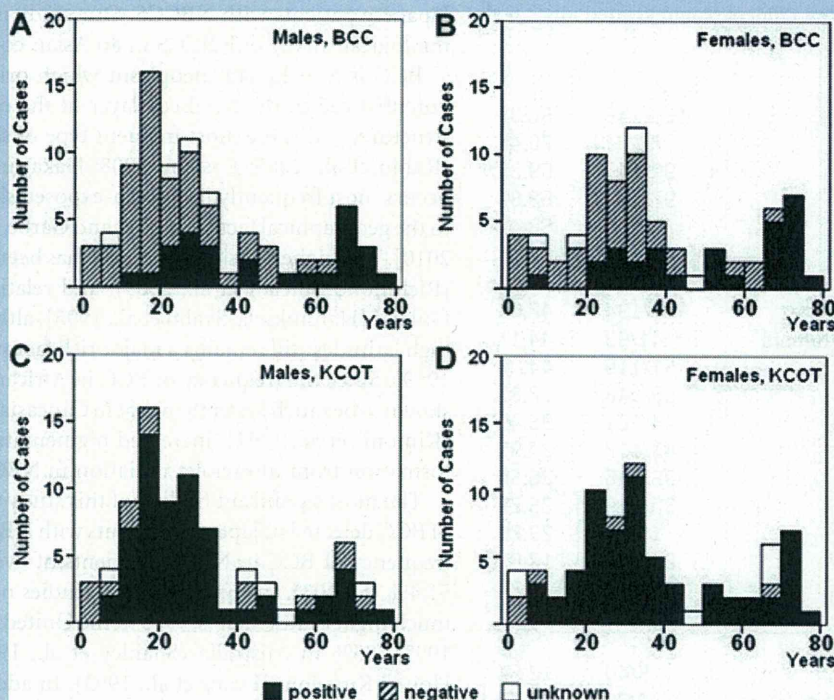


FIG. 1. Age distribution of NBCCS. Age distribution of BCC (A,B) and KCOT (C,D) cases. The presence or absence of BCC and KCOT at the time of the survey is shown. Male (A,C) and female (B,D) cases are shown separately.

detected between Japan and the United Kingdom than between Japan and the United States, which may reflect the reduced exposure of the patients in the United Kingdom to ultraviolet radiation. The age of the patients at the initial BCC diagnosis ranged from 4 to 69 years (mean: 37.4 years, median: 38 years), which was much higher than those in Western countries. Accordingly, Kaplan-Meier analysis of BCC demonstrated that its frequency in the Japanese population is markedly lower than that reported for Caucasians by Kimonis et al. [1997] (Fig. 2). As reported previously [Jones et al., 2011], the frequency of BCC was similar between males and females (34.62% vs. 42.03%). The age distributions of BCC frequency in males and females sexes are shown in Figure 1A and Figure 1B, respectively. We observed no correlation between the number of BCC and the age of onset ($r = 0.049$; data not shown).

KeratoCystic Odontogenic Tumor

One hundred twenty-six out of 146 (86.3%) patients with NBCCS had a history of KCOT, which was significantly higher than the incidences described in the previous reports, although the difference was less marked than that for BCC. The age of the patient at the onset of the tumor ranged from 5 to 77 years (mean: 32.8 years), and the number of tumors ranged from 1 to 10 (mean: 3.68). In contrast to BCC, the number of KCOT was inversely correlated with the age of onset ($r = -0.453$; Fig. 3). The frequency of KCOT in the patients aged over 20 years was 91.1% (92/101), and that in the patients aged over 40 years was 82.0% (32/39). Kaplan-Meier analysis of the

frequency of KCOT in Japanese and American NBCCS patients indicated that there were no significant differences in the frequency of KCOT and the age at first KCOT between the two groups (Fig. 4). The frequency of KCOT was similar between males and females (81.82% vs. 91.18%). The age distributions of KCOT incidence in males and females are shown in Figure 1C and Figure 1D, respectively.

Medulloblastoma

Four out of 120 patients (3.4%) had medulloblastoma, and these patients were diagnosed between the ages of 0 and 4 years (mean: 1.8 years). Kimonis et al. [1997] reported that radiotherapy for medulloblastoma results in the early development of BCC and other cerebral tumors, such as ependymomas and meningiomas. In our study, all four patients had radiation therapy for medulloblastoma. However, to date, none of the four patients have had subsequent BCC on the irradiated area.

Ovarian Fibroma

Forty women with NBCCS were evaluated for the frequency of ovarian fibroma, and 5 were found to have ovarian fibromas (12.5%). Their ages ranged from 16 to 25 years (mean: 20.8 years). The frequency of ovarian fibroma in this study was somewhat lower than those described in previous reports. However, since not all women underwent abdominal ultrasound, the actual frequency might have been higher than observed.

TABLE II. Frequencies of the Clinical Manifestations in Japanese NBCCS Patients

50% or greater		
KCOT	126/146	86.3%
Falx calcification	77/97	79.4%
Palmar/plantar pits	99/143	69.2%
Hypertelorism	97/141	68.8%
Broad nasal bridge	73/125	58.4%
15–49%		
Family history	62/128	48.4%
Frontoparietal bossing	63/134	47.0%
Family members developing tumors	41/93	44.1%
Highly arched eyebrows	51/116	44.0%
Basal cell carcinoma	56/148	37.8%
Rib anomalies	44/121	36.4%
Coarse face	43/117	27.9%
Macrocephaly	36/136	26.5%
Prognathism	30/119	25.2%
Bridging of sella turcica	18/76	23.7%
Intellectual disability	24/136	17.6%
Hydrocephalus	22/136	16.2%
Vertebral anomalies	16/106	15.1%
14% or less		
Ovarian fibroma	5/40	12.5%
Short 4th metacarpals	4/38	10.5%
Cleft lip/palate	12/133	9.0%
Epilepsy	12/134	9.0%
Pectus deformity	8/118	6.1%
Medulloblastoma	4/120	3.3%
Sprengel deformity	3/102	2.7%
Flame-shaped lucencies of hands/feet	1/40	2.5%
Cardiac fibroma	2/95	2.1%
Syndactyly	3/143	2.1%
Polydactyly	2/134	1.5%
Modeling defects of hands/feet	0/49	0%

Cardiac Fibroma

Two patients (1 male and 1 female) among 95 evaluated patients were found to have cardiac fibromas (2.1%). Their age at diagnosis ranged from 6 to 7 years. The size of the cardiac fibromas in these patients did not increase over time, and no functional deficits were observed.

Other Tumors

The other tumors recognized in this study included meningioma (4 cases), ovarian tumors other than fibromas (3 cases), and thyroid tumors (2 cases).

DISCUSSION

In this study, we first performed a nationwide survey of NBCCS in Japan. To date, there have been three large epidemiological studies of NBCCS, which were performed in the United States [Kimonis et al., 1997], the United Kingdom [Evans et al., 1993], and Australia [Shanley et al., 1994], and 105, 84, and 118, patients, respectively,

were enrolled in these studies. In this study, we enrolled 157 Japanese patients with NBCCS. Our study is the first large epidemiological survey of NBCCS in an Asian country.

BCC is a malignant neoplasm which originates from a pluripotential cell in the basal cell layer of the epidermis or follicular structure, and is the most frequent type of skin cancer in humans [Rubin et al., 2005; Epstein, 2008; Nakayama et al., 2011]. BCC occurs most frequently in the sun-exposed skin area, and is related to the geographical factors [Leiter and Garbe, 2008; Dessinioti et al., 2010]. The highest incidence of BCC has been reported in Australia [Richmond-Sinclair et al., 2009], and relatively low incidence in Finland [Hannuksela-Svahn et al., 1995], although sunlight even at high latitudes still remains a major risk factor of BCC [Moan et al., 1989]. Since the frequency of BCC in African-Americans has been shown to be much lower than that in Caucasians in the United States [Kimonis et al., 1997], increased pigmentation may prevent BCC formation from ultraviolet radiation in NBCCS families.

The most significant finding of this study was the low frequency of BCC detected in Japanese patients with NBCCS. In our study, the frequency of BCC in NBCCS patients of over 20 years of age was 51.4% (53/103). In contrast, other studies of NBCCS have shown much higher rates; that is, 91% in the United States [Kimonis et al., 1997], 85% in Australia [Shanley et al., 1994], and 73% in the United Kingdom [Evans et al., 1993]. In addition to the low BCC incidence, the age of BCC onset, at an average of 37.4-year old, was markedly higher in the Japanese population than those in Western countries. Considering previous reports mentioned above, the lower frequency and the higher onset age of BCC in Japanese NBCCS population are probably due to geographical factor and/or ethnicity. However, since it is not uncommon that BCC develops in the less sun-exposed area in NBCCS patient, UV-exposure is obviously not the only factor for BCC development. Therefore, especially in Japan, careful skin examination over a prolonged period of time is warranted, even after middle age, for the early diagnosis and treatment of late onset BCC.

KCOT, which was formerly known as multiple jaw cysts, is sometimes the first manifestation of NBCCS, and early surgical intervention for tumors is clinically required for both the maintenance of jaw function and the prevention of subsequent bacterial infections. KCOTs are basically benign cystic lesions, but they often show locally destructive behavior and high recurrence rates [Morgan et al., 2005]. Recently, they were re-classified as benign neoplasms of odontogenic origin in the World Health Organization classification 2005 [Madras and Lapointe, 2008]. In this study, the mean age at KCOT onset was 19.8 years, which was similar to those reported in two of the other large studies; that is, 17.3 years in the United States [Kimonis et al., 1997] and 15.5 years in Australia [Shanley et al., 1994]. Accordingly, Kaplan–Meier analysis found that the frequency of KCOT among Japanese NBCCS patients was similar to that in the United States. However, the frequency of KCOT in patients over 20 years of age was 91.1%, which was slightly but significantly higher than those found in other studies; that is, 81% in the United States [Kimonis et al., 1997], 80% in Australia [Shanley et al., 1994], and 82% in the United Kingdom [Evans et al., 1993]. These findings also suggest that Japanese NBCCS patients should receive careful periodical examinations for the jaw cysts. It remains to be elucidated whether ethnicity and/or environmental

TABLE III. Comparison of NBCCS Anomalies Among Four Large Studies

	Evans et al. [United Kingdom]	Shanley et al. [Australia]	Kimonis et al. [United States]	Our study [Japan]
Number of cases	84	118	105	157
Number of families	29	64	26	139
Mean age [years]	N.A.	35	34.5	33.1
Sex ratio M:F	1:1.3	1:1.3	1:1.2	1:1.1
Number with BCC-total (%)	33/70 [47]	90/118 [76]**	71/90 [80] ^{a,**}	56/148 [37.8]
Age >20 years (%)	33/45 [73]*	71/84 [85]**	58/64 [91] ^{a,**}	53/103 [51.4]
Age >40 years (%)	19/21 [90]	35/37 [95]*	34/35 [97] ^{a,**}	33/46 [71.7]
Mean age first BCC [years]	N.A.	20.3	21.4	37.4
Number with KCOT/total (%)	46/70 [66]**	85/113 [75]*	78/105 [74]*	126/146 [86.3]
Age >20 years (%)	37/45 [82]	66/82 [80]*	60/74 [81]	92/101 [91.1]
Age >40 years (%)	19/21 [90]	25/35 [71]	29/38 [76]	32/39 [82.0]
Range of total number of KCOT (mean)	N.A.	1-28 [6]	1-28 [5.1]	1-10 [3.68]
Mean age at first jaw cyst [years]	N.A.	15.5	17.3	19.8
Pitting-palms/soles (%)	50/70 [71]	82/103 [80]	89/102 [87]**	86/143 [60.1]
Cleft lip/palate (%)	4/70 [5]	4/107 [4]	3/103 [3]	12/133 [9.0]
Calcification of falx cerebri (%)	NA	81/89 [92]*	53/82 [65]*	78/98 [79.6]
Medulloblastoma (%)	3/84 [4]	1/118 [1]	4/105 [4]	4/120 [3.3]
Ovarian fibroma (%)	6/25 [24]	9/63 [14]	9/52 [17]	5/40 [12.5]

N.A., not applicable.
^aRestricted to Caucasians.
*P<0.05.
**P<0.001.

factors are responsible for this difference. Alternatively, the difference may be due to the comparative data collection bias, that is, types of clinics and physicians solicited for patients. In any case, since the difference was relatively small, more cases need to be examined in order to conclude that the frequency of KCOT in Japanese NBCCS is higher than that in Western countries.

In this study, the frequency of medulloblastoma among NBCCS patients was 3.4%, which was similar to those described in previous

reports [Evans et al., 1993; Shanley et al., 1994; Kimonis et al., 1997]. Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in childhood. In NBCCS patients, medulloblastomas are reported to occur earlier than sporadic medulloblastomas. The mean ages of onset of syndromic and sporadic medulloblastomas are 28 months and 6 years, respectively [Amlashi et al., 2003]. In our study, the mean age was 1.8 years, which was comparable to those of previous reports. Although the frequency of

