

**FIG. 4.** Zebrafish *ywhag1* is required for development of the brain and the heart. Morphological observation of wild type (WT) (A, B), control MO morphant (C, D), *ywhag1*-MO1 morphant (E, F), *ywhag1*-spMO morphant (G, H) and *ywhag1*-MO1+*ywhag1*-spMO morphant (I, J) embryos at 72 hpf. Gene knockdown of *ywhag1* caused developmental abnormalities of the head and the enlarged heart tube. Three types of *ywhag1* morphants showed hypomorphic head (E–J). Although weak malformation of the trunk and the tail were observed only in *ywhag1*-spMO morphants (bracket) (G), this anomaly was likely to be nonspecific. As same as this manner, the reason of enlargements of the heart pericardiums observed in *ywhag1* morphants (arrows) (E, G, I) is obscure. Cross-sections containing the diencephalon (K, M, O, Q, S) and the midbrain tegmentum (L, N, P, R, T) of WT (K, L), control (M, N), *ywhag1*-MO1 morphant (O, P) and *ywhag1*-spMO morphant (Q, R) and *ywhag1*-MO1+spMO morphant (S, T) embryos at 72 hpf are shown (arrows). Compared with WT (K, L) and control (M, N), *ywhag1* morphants showed hypomorphic heads. Cross-sections of the heart ventricles in WT (U), control (V), *ywhag1*-MO1 morphant (W), *ywhag1*-spMO morphant (X) and *ywhag1*-MO1+spMO morphant (Y) embryos at 72 hpf. Compared with WT (U) and control (V), *ywhag1* morphants (W, X, Y) showed enlarged ventricles of the hearts. All images are displayed with dorsal to the top; A–J are displayed with rostral to the left.

exhibited obvious dysplasia of the brain (Fig. 4O–T). In normal cerebral development in the zebrafish, the brain ventricle is narrowed along with the progression of de-

velopment and almost buried until 72 hpf (Fig. 4K–N). In the knockdown experiments, wild type and control embryos had a solid diencephalon structure (Fig. 4K,M), whereas the diencephalons of all *ywhag1* morphants were divided by the brain ventricle (Fig. 4O,Q,S). Similar abnormal partitions were observed in the tectum opticum (the dorsal upper structure of midbrain tegmentum indicated by arrow; Fig. 4P,R,T). Furthermore, the mid-brain tegmentum was not formed properly in morphants (Fig. 4P,R,T). About the heart tube, major diameter of the ventricle was obviously enlarged in *ywhag1* morphants (Fig. 4W,X,Y) compared with wild type and control morphants (Fig. 4U,V). These results strongly indicate that *ywhag1* is important for normal brain and heart development.

Regarding the functions of the heart in all zebrafishes, we measured the pulse rate, and there were no statistically significant differences among all groups of larvae. However, incidence of arrhythmia was significantly elevated in all three types of *ywhag1* morphants (Supporting Information Table S1 and Fig. S7).

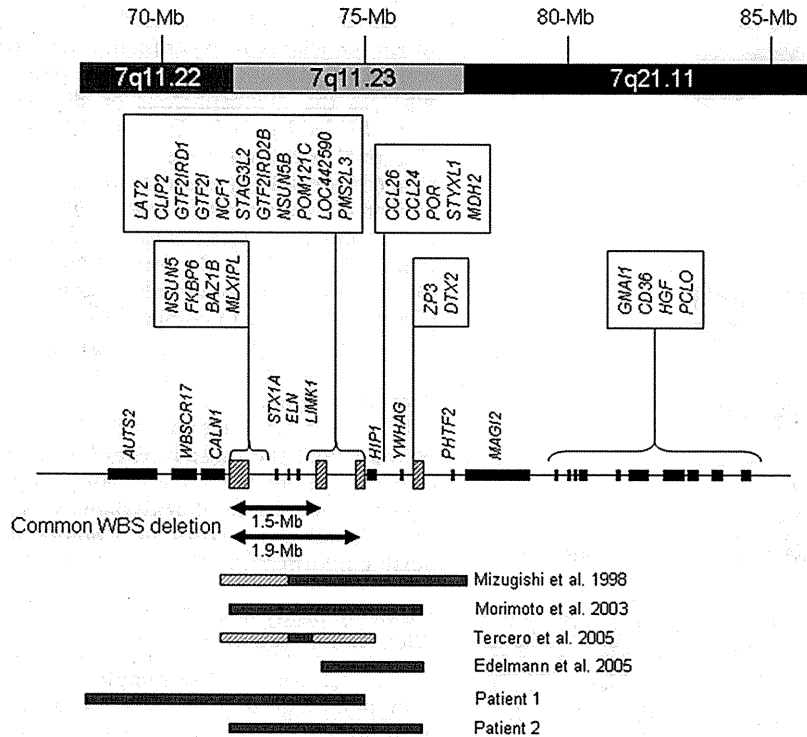
#### Mutation analysis of *HIP1* and *YWHAG* in Patients With Neurological Symptoms

Although total of 142 samples derived from patients with neurological symptoms including developmental delay and/or epilepsy were analyzed for mutation analysis of *HIP1* and *YWHAG*, there was no pathogenic mutation.

#### DISCUSSION

Because WBS is not usually associated with infantile spasms, genotype-phenotype comparisons in WBS patients with atypically large deletions may assist identification of gene(s) responsible for infantile spasms. Marshall *et al.* (2008) investigated 16 patients associated with documented seizures and interstitial deletions of 7q11.23-q21.1, which is neighboring to the WBS critical region, and revealed overlapping deletions of the *MAGI2* in most patients. However, they reported at least one patient having infantile spasms and a chromosomal deletion including WBS critical region but in which *MAGI2* was not included, who had been reported previously by Morimoto *et al.* (2003).

In this study, we identified two additional WBS patients with atypically large deletions. Patient 1 had a deletion at 7q11.23 that extended into the proximal region and included three genes; i.e. *AUTS2*, *WBSCR17*, and *CALN1* (Fig. 5, Table 1). Expression of human *CALN1* (*calneuron 1*) is brain specific (Wu *et al.*, 2001), and expression of the mouse homolog in the cerebellum increases from the postnatal 2nd week to day 21, and reaches to adult level. In situ hybridization showed a high level of expression of *CALN1* in the cerebellum, hippocampus, striatum, and cortex (Wu *et al.*, 2001). The postnatal expression pattern in mice is consistent with the onset of infantile spasms in humans, which occurs from 3 to 6 months after birth. *CALN1* shows sig-



**FIG. 5.** Chromosome map around the common WBS deletion. Black and hatched rectangles on a horizontal bar indicate the sizes and the locations of genes and duplicated segments, respectively. Gray bars indicate the region of the chromosome deleted in the indicated patient, with the ambiguity indicated as hatched bars.

nificant similarity to members of the calmodulin superfamily (Wu *et al.*, 2001). Thus, haploinsufficiency of *CALN1* may cause the infantile spasms in this patient. *AUTS2* is also a compelling candidate gene for the infantile spasms in patient 1, because it is robustly expressed in the fetal brain and is reported to be interrupted by a translocation breakpoint in patients with autistic behavior or mental retardation (Kalscheuer *et al.*, 2007; Sultana *et al.*, 2002).

Patient 2 had a deletion that extended into the distal telomeric region. The range of this deletion is exactly same as that of the patient reported by Morimoto *et al.* who also showed infantile spasms and cardiomegaly (Morimoto *et al.*, 2003) (see Fig. 5). At the telomeric breakpoint, there is a region of duplicated segments. This telomeric breakpoint was also shared by a patient reported by Edelmann *et al.* (2007), who presented with autism associated with a chromosomal deletion of 7q11.23, which did not include *ELN* but expanded into the telomeric region beyond the WBS critical region (see Fig. 5). These common breakpoints indicate that this region of duplicated segments can act as a LCR for non-homologous allele recombination (NHAR).

There are 9 genes in the expanded deletion toward the telomeric region neighboring the WBS critical region (see Fig. 5). Among them, Edelmann *et al.* (2007)

focused on *HIP1* and *YWHAG* as the prime candidates responsible for autism seen in their patient, and analyzed the expression levels of them by RT-PCR method. Then, they revealed reduced expression of *YWHAG* in transformed lymphocytes derived from the patient, but no decrease in *HIP1*. Based on these findings, we analyzed the function of *HIP1* and *YWHAG* using a gene knock-down system in zebrafish, and the correlation with neurological functions.

In this study, the zebrafish *bip1* knockdown did not show significant abnormality, which is consistent with previous reports of *Hip1*-deficient mice. Homozygous *Hip1*<sup>-/-</sup> mice generated by targeted deletion exhibited degeneration of the seminiferous tubules of the testis with excessive apoptosis of postmeiotic spermatids, but these mice developed to adulthood and did not show overt neurologic symptoms (Rao *et al.*, 2001). In addition, mice with different deletions of *bip1* showed hematopoietic abnormalities, spinal defects, and cataracts due to cell death in the lens, but had no notable cerebral or neurological anomalies (Oravec-Wilson *et al.*, 2004).

In contrast, reduced brain size and enlargement of the heart tube were observed when *ywhag1* was knocked down in zebrafish. This indicates that the infantile spasms and the cardiomegaly observed in patient 2 might be derived from haploinsufficiency of *YWHAG*,

because the WBS patient reported by Morimoto *et al.* (2003), also showed infantile spasms and cardiomegaly. *YWHAG* binds to *protein kinase C alpha (PRKCA)* and *p53* is directly phosphorylated by *PRKCA*, which is crucial for activation of *p53 protein* (Autieri and Carbone, 1999; Price and Youmell, 1997). 14-3-3 proteins including *YWHAG* modulate cell survival and control apoptosis (Morrison, 2009; Porter *et al.*, 2006) and inhibition of physical binding between 14-3-3 and its ligand proteins causes apoptosis (Masters and Fu, 2001). Therefore, the etiology of hypoplastic brain in the zebrafish model might be the consequence of apoptotic cell death in central nervous system at early development. Regarding the involvement of the heart, we observed arrhythmia in *Yubag1* knockdown zebrafish and the incidence of arrhythmia in *yubag1* knockdown zebrafish is worth noting. Although patient 2 did not show arrhythmia, it might be masked by medication with beta-blockers. Since we did not identify any mutations in patients with mental retardation and/or epilepsy, no definitive evidence of a link between *HIP1/YWHAG* haploinsufficiencies and neurological symptoms was obtained. However, given the evidence reported herein, *YWHAG* are promising candidate genes for infantile spasms.

In conclusion, we have described two new WBS patients that presented with infantile spasms and had atypically large deletions in 7q11, one extending into the proximal side of the common WBS deletion and one extending into the telomeric side. In the telomeric side, we identified two promising candidate genes, *HIP1* and *YWHAG*. Using a knockdown approach, we showed that a loss of zebrafish *yubag1* leads to brain development delay and heart tube enlargement. Because the patient with haploinsufficiency of *YWHAG* showed infantile spasms and cardiomegaly, *YWHAG* may have important roles in both brain and heart development. Although there was no *YWHAG* mutation identified in the patients with mental retardation and/or epilepsy, this gene is a noteworthy candidate for epilepsy, along with *AUTS2*, *CALN1*, and *HIP1*.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

After obtaining informed consents based on a permission approved by the institution's ethical committee, peripheral blood samples were obtained from the patients and their parents.

For genomic mutation screening for *HIP1* and *YWHAG*, we used 142 DNA samples derived from 128 and 14 patients with idiopathic mental retardation with and without epilepsy, respectively. Etiologies of all these patients were unknown and were negated to have genomic copy number aberrations using aCGH (Shimajima *et al.*, 2009b). In 128 patients with epilepsy, there were 5 patients with early infantile epileptic encephalopathy, 43 patients with West syndrome, and 2 patients with Lennox-Gastaut syndrome. All of the 14 nonepilep-

tic patients showed cerebral dysgenesis including gyrus malformation, brain atrophy, and microcephaly.

### aCGH Analysis

For aCGH analysis of patient 1, we used the originally developed microarray in which 5,057 BAC/PAC clones were plotted. We selected probes using the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) spaced every 0.7 Mb across the whole human genome, and chose 4,235 clones that showed a unique FISH signal at the predicted chromosomal location. A total of 822 clones were not subjected to aCGH analysis; 438 (8.7%) yielded multiple chromosomal signals using FISH and 384 (7.6%) showed aberrant FISH signals likely due to contamination in our laboratory. Fifty-nine BAC/PAC clones, previously used for subtelomere and syndromic-MR-specific microarray analysis, were among the 4,235 clones (Harada *et al.*, 2004; Kurosawa *et al.*, 2004). BAC/PAC DNA was extracted using the PI-100 automatic DNA extraction system (Kurabo, Osaka, Japan), subjected to two rounds of PCR amplification, purified, adjusted to a final concentration of >500 ng/ $\mu$ l, and spotted in duplicate on CodeLink<sup>TM</sup> activated slides (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) using the ink-jet spotting method (Nihon Gaishi, Nagoya, Japan) as described previously (Miyake *et al.*, 2006). aCGH analysis was performed using 4,235 BAC arrays. After complete digestion using *DpnII*, CGH1 was set up using subject DNA labeled with Cy-5-dCTP (Amersham Biosciences) and reference DNA labeled with Cy-3-dCTP (Amersham Biosciences) using a DNA random primer kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). To rule out false positives, dyes were swapped in the CGH2 set (subject DNA was labeled with Cy3 and reference DNA was labeled with Cy5), such that the signal patterns of CGH1 were reversed. Prehybridization and hybridization were performed as described previously (Harada *et al.*, 2004). The arrays were scanned by GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City, CA) and analyzed using GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments). The signal intensity ratio between subject and control DNA was calculated from the data of the single-slide experiment in each for CGH1 and CGH2, using the ratio of means formula (F635 Mean-B635 Median/F532 Mean-B532 Median) according to GenePix Pro. 6.0. The standard deviation of each clone was calculated. The signal intensity ratio was considered significant if it was greater than three standard deviations from the mean in both the CGH1 and CGH2 sample sets.

For patient 2, genomic copy number aberrations were analyzed using the Human Genome CGH Microarray 105A chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) according to methods described elsewhere (Shimajima *et al.*, 2009a). Briefly, 500 ng genomic DNA was extracted from peripheral blood of the patient and the reference individual, using the QIAquick DNA extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA), and was digested with restriction enzymes. Cy-5-dUTP (patient) or Cy-3-dUTP (reference) was incorporated using the Klenow frag-

ment. The array was hybridized in the presence of Cot-1 DNA and blocking agents for 40 hours at 65°C, washed, and scanned by GenePix 4000B (Axon Instruments). Data were extracted w Agilent Feature Extraction software version 9 using default settings for CGH. Statistically significant aberrations were determined using the ADM-II algorithm in the CGH analytics version 3.5 (Agilent Technologies). Breakpoints were defined as the start and stop location of the first and last probes, respectively, included in the algorithmically determined region of deletion.

### FISH Analysis

Metaphase or prometaphase chromosomes were prepared from phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood lymphocytes according to standard techniques. RP11 BAC clones were selected from in silico library build 2006 and were purchased from Invitrogen (Table 1).

FISH analyses using the combination with two BAC clones were performed according to the following method. After hardening chromosome slides at 65°C for 150 min, they were denatured in 70% formamide containing 2× standard saline citrate (SSC) at 70°C for 2 min, and then dehydrated at -20°C in ethanol. BAC clone DNA was extracted using GenePrepStar PI-80X (Kurabo) and labeled with SpectrumGreen TM-11-dUTP or SpectrumOrange TM-11-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL) by nick translation and then denatured at 70°C for 5 min. The probe-hybridization mixture was applied to the chromosomes, which were incubated at 37°C for 16 h. Slides were washed twice in 50% formamide containing 2× SSC at 43°C for 15 min, then in 2× SSC for 5 min, 1× SSC for 5 min, 0.1% Triton X-100 containing 4× SSC for 5 min with shaking, 4× SSC for 5 min and 2× SSC for 5 min. Slides were then mounted in antifade solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA) containing 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence photomicroscopy was performed as described previously (Miyake *et al.*, 2003).

### Mutation Screening of *HIP1* and *YWHAG* Coding Regions

All exons of *HIP1* and *YWHAG* (21 and 3 total exons, respectively) were amplified by PCR using originally designed primers derived from the neighboring intronic sequences of each exon (Supporting Information Tables S2 and S3), according to standard methods. All amplicons were subjected to direct sequencing using the Big-Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Sequencing results were analyzed using the 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### Zebrafish Maintenance

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 28.5°C under 14-hr light/10-hr dark cycle conditions. Fertilized eggs from natural crosses were collected a few

minutes after spawning and cultured at 28.5°C in water containing 0.006% NaCl and 0.00025% methylene blue. Embryos were staged according to morphology and hours post-fertilization (hpf) as described (Kimmel *et al.*, 1995). N-Phenylthiourea was added to culture water at a final concentration of 0.003% to avoid pigmentation of larvae.

### Sequence Analyses of Zebrafish *bip1* and *ywbag1*

The nucleotide sequence of *bip1* cDNA has been predicted from the genomic information of zebrafish. The cDNA corresponding to the ORF of *bip1* was experimentally cloned by RT-PCR using primers designed based on the predicted sequence. The 5'- and 3'-UTRs of *bip1* were also cloned by RACE. To design antisense MOs against *ywbag1*, the 5'-UTR in our zebrafish strain, Michigan, was cloned using 5' RACE. Then, the cDNA sequence, Accession #NM\_21302, was obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). In addition, fragments surrounding the exon-intron junctions of *ywbag1*, including the putative exon 1/intron 1 and intron 1/exon 2 junctions, were amplified by PCR using genomic DNA as a template and primers corresponding to the zebrafish whole-genome shotgun scaffolds *Zv7\_NA122* and *Zv7\_NA727*. Total RNA was extracted from embryos 24-hpf using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN), and cDNA was synthesized using the Omniscript RT Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Extraction of genomic DNA from adult zebrafish was performed as described (Westerfield, 1995). All PCR amplification reactions were performed using KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan). For 5' RACE, the 5'-RACE Core Set (Takara, Otsu, Japan) was used. The sequences of the primers used in this study are shown in Supporting information Table S4.

### Morpholinos and Microinjection

MOs were purchased from Gene Tools (Philomath, OR). For gene knockdown of *bip1*, two nonoverlapping translation-inhibiting MOs (*bip1*-MO1, *bip1*-MO2) were used. For *ywbag1*, one translation-inhibiting MO (*ywbag1*-MO1) and one splice-inhibiting MO (*ywbag1*-spMO) were employed. As a negative control, a standard control MO was used. The sequences of these MOs are shown in Supplemental Table S4. MOs were resuspended at 10 µg/µl in Danieau solution (5 mM HEPES, pH 7.6, 58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and stored at -20°C. Microinjections were performed as described (Razzaque *et al.*, 2007).

### Preparation of Zebrafish Head Sections

Zebrafish embryos at the 72 hpf were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C overnight. The fixed embryos were serially dehydrated in ethanol, soaked in xylene, and embedded in Paraplast Plus embedding medium (McCormick Scientific, St. Louis, MO) under microscopic observation. Specimens were cut into serial sec-

tions (7  $\mu\text{m}$ ) and stained with Mayer's hematoxylin and eosin solutions.

## LITERATURE CITED

- Autieri MV, Carbone CJ. 1999. 14-3-3Gamma interacts with and is phosphorylated by multiple protein kinase C isoforms in PDGF-stimulated human vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol* 18:555-564.
- Besser J, Bagowski CP, Salas-Vidal E, van Hemert MJ, Bussmann J, Spaink HP. 2007. Expression analysis of the family of 14-3-3 proteins in zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 7:511-520.
- Bhattacharyya NP, Banerjee M, Majumder P. 2008. Huntington's disease: Roles of huntingtin-interacting protein 1 (HIP-1) and its molecular partner HIPPI in the regulation of apoptosis and transcription. *FEBS J* 275:4271-4279.
- Edelmann L, Prosnitz A, Pardo S, Bhatt J, Cohen N, Lauriat T, Ouchanov L, Gonzalez PJ, Manghi ER, Bondy P, Esquivel M, Monge S, Delgado MF, Splendore A, Francke U, Burton BK, McInnes LA. 2007. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. *J Med Genet* 44:136-143.
- Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. 1993. Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder. Williams syndrome. *Nat Genet* 5:11-16.
- Harada N, Visser R, Dawson A, Fukamachi M, Iwakoshi M, Okamoto N, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. 2004. A 1-Mb critical region in six patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome. *J Hum Genet* 49:440-444.
- Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F, Arkesteijn G, Ropers HH, Ullmann R. 2007. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Hum Genet* 121:501-509.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Kurosawa K, Harada N, Sosonkina N, Niikawa N, Matsumoto N, Saitoh S. 2004. Unmasking 15q12 deletion using microarray-based comparative genomic hybridization in a mentally retarded boy with r(Y). *Am J Med Genet A* 130A:322-324.
- Marshall CR, Young EJ, Pani AM, Freckmann ML, Lacassie Y, Howald C, Fitzgerald KK, Peippo M, Morris CA, Shane K, Priolo M, Morimoto M, Kondo I, Manguoglu E, Berker-Karazum S, Edery P, Hobart HH, Mervis CB, Zuffardi O, Raymond A, Kaplan P, Tassabehji M, Gregg RG, Scherer SW, Osborne LR. 2008. Infantile spasms is associated with deletion of the MAGI2 gene on chromosome 7q11.23-q21.11. *Am J Hum Genet* 83:106-111.
- Masters SC, Fu H. 2001. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem* 276:45193-45200.
- Miyake N, Kurotaki N, Sugawara H, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Tsukahara M, Ishikiriyama S, Sonoda T, Miyoshi Y, Sakazume S, Fukushima Y, Ohashi H, Nagai T, Kawame H, Kurosawa K, Touyama M, Shiikahara T, Okamoto N, Nishimoto J, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. 2003. Preferential paternal origin of microdeletions caused by prezygotic chromosome or chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1331-1337.
- Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Ohashi H, Kurosawa K, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Shotelersuk V, Hou JW, Fukushima Y, Kondoh T, Matsumoto T, Shinoki T, Kato M, Tonoki H, Nomura M, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. 2006. No detectable genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome patients. *Am J Med Genet A* 140:291-293.
- Mizugishi K, Yamanaka K, Kuwajima K, Kondo I. 1998. Interstitial deletion of chromosome 7q in a patient with Williams syndrome and infantile spasms. *J Hum Genet* 43:178-181.
- Morimoto M, An B, Ogami A, Shin N, Sugino Y, Sawai Y, Usuku T, Tanaka M, Hirai K, Nishimura A, Hasegawa K, Sugimoto T. 2003. Infantile spasms in a patient with Williams syndrome and craniosynostosis. *Epilepsia* 44:1459-1462.
- Morris CA. 2006. Genotype-phenotype correlations in Williams-Beuren syndrome. In: Morris CA, Lenhoff HM, Wang PP, editors. Williams-Beuren syndrome. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. pp 59-82.
- Morrison DK. 2009. The 14-3-3 proteins: Integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19:16-23.
- Oravec-Wilson KI, Kiel MJ, Li L, Rao DS, Saint-Dic D, Kumar PD, Provot MM, Hankenson KD, Reddy VN, Lieberman AP, Morrison SJ, Ross TS. 2004. Huntingtin Interacting Protein 1 mutations lead to abnormal hematopoiesis, spinal defects and cataracts. *Hum Mol Genet* 13:851-867.
- Porter GW, Khuri FR, Fu H. 2006. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol* 16:193-202.
- Price BD, Youmell MB. 1997. Phosphorylation of the p53 protein regulates its transcriptional activity. In: Proc. 45th Annual Meeting of the Radiation Research Society. Oak Brook, IL. p 57.
- Pujic Z, Omori Y, Tsujikawa M, Thisse B, Thisse C, Malicki J. 2006. Reverse genetic analysis of neurogenesis in the zebrafish retina. *Dev Biol* 293:330-347.
- Rao DS, Chang JC, Kumar PD, Mizukami I, Smithson GM, Bradley SV, Parlow AF, Ross TS. 2001. Huntingtin interacting protein 1 is a clathrin coat binding protein required for differentiation of late spermatogenic progenitors. *Mol Cell Biol* 21:7796-7806.
- Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, Kamisago M, Momma K, Katayama H, Nakagawa M, Fujiwara Y, Matsushima M, Mizuno K, Tokuyama M, Hirota H, Muneuchi J, Higashinakagawa T, Matsuoka R. 2007. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39:1013-1017.
- Shimajima K, Adachi M, Tanaka M, Tanaka Y, Kurosawa K, Yamamoto T. 2009a. Clinical features of microdeletion 9q22.3 (pat). *Clin Genet* 75:384-393.
- Shimajima K, Komoike Y, Tohyama J, Takahashi S, Paez MT, Nakagawa E, Goto Y, Ohno K, Ohtsu M, Oguni H, Osawa M, Higashinakagawa T, Yamamoto T. 2009b. TULIP1 (RALGAP1) haploinsufficiency with brain development delay. *Genomics* 94:414-422.
- Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. 2002. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 17:269-271.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D, Haider ST, Trask BJ, Green ED, Raskind WH, Distchele CM, Wijsman E, Dawson G, Storm DR, Schellenberg GD, Villacres EC. 2002. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* 80:129-134.
- Westerfield M. 1995. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Oregon: University of Oregon Press.
- Woods IG, Wilson C, Friedlander B, Chang P, Reyes DK, Nix R, Kelly PD, Chu F, Postlethwait JH, Talbot WS. 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res* 15:1307-1314.
- Wu YQ, Lin X, Liu CM, Jamrich M, Shaffer LG. 2001. Identification of a human brain-specific gene, calneuron 1, a new member of the calmodulin superfamily. *Mol Genet Metab* 72:343-350.
- Wu YQ, Sutton VR, Nickerson E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, Greenberg F, Tassabehji M, Shaffer LG. 1998. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet* 78:82-89.

# ヘッジホッグシグナルと脳腫瘍

塩浜 直<sup>1)</sup>, 内川英紀<sup>1)</sup>, 水落弘美<sup>1)</sup>, 宮下俊之<sup>2)</sup>, 藤井克則<sup>1)</sup>

Tadashi SHIOHAMA, Hideki UCHIKAWA, Hiromi MIZUOCHI, Toshiyuki MIYASHITA, Katsunori FUJII

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学

ヘッジホッグシグナルは、形態形成と細胞増殖において中核的な役割を果たし、特に髄芽腫や基底細胞癌などの腫瘍形成において治療標的となる重要な経路である。Gorlin 症候群（母斑基底細胞癌症候群）は、ヘッジホッグ受容体である PTCH 遺伝子の異常により生じる先天性奇形症候群であり、肋骨異常、手掌足底小陥凹、大脳鎌の石灰化を主とした多彩な身体奇形と角化嚢胞性歯原性腫瘍、髄芽腫、基底細胞癌などの易腫瘍形成を特徴とする。Gorlin 症候群では髄芽腫に対する全脊髄照射により二次性に基底細胞癌を生じるため注意が必要である。現在、同経路を阻害する低分子化合物の臨床応用が進んでおり、髄芽腫で効果が報告されている。したがって脳腫瘍の治療においてもヘッジホッグ経路を理解することが望ましい。

**Key Words:** ヘッジホッグシグナル, Gorlin 症候群, 髄芽腫, 基底細胞癌, 分子標的療法

## I. はじめに

ヘッジホッグシグナルは胎生期の形態形成と細胞増殖を担う経路である。すなわち胎生期の本経路の異常では Gorlin 症候群をはじめとする奇形症候群を来し、出生後においては同経路の活性化が髄芽腫や基底細胞癌などの腫瘍形成において中核的な役割を果たしている。さらに同経路の阻害剤は臨床上も抗腫瘍作用を示し、すでに髄芽腫などの悪性腫瘍に対する低分子化合物治療による臨床試験が始まっている。したがって同経路を理解することは脳腫瘍の診療にあたる読者にも重要と考える。腫瘍形成との関連性という本稿の主旨に沿って、①ヘッジホッグシグナルと発癌の関連性、②髄芽腫の治療において重要な疾患である Gorlin

症候群について、③ヘッジホッグシグナルに対する分子標的療法の3点に分けて概説する。

## II. ヘッジホッグシグナルと発癌

まずヘッジホッグシグナル発見の経緯から述べる。1970年代後半に Lewis らによりショウジョウバエの研究が行われ、発生過程において特定の遺伝子群が順次発現することにより形態形成が調節されていることが明らかになった<sup>1, 2)</sup>。すなわちヒトを含めた生物の形態形成はギャップ遺伝子群による前後軸形成、ペアルール遺伝子群による体節の位置決定、セグメントポラリティ遺伝子群による体節の区画化という普遍的な過程を経て成り立っている。伝達経路の主要なリガンドであるヘッジホッグと、その受容体である patched は

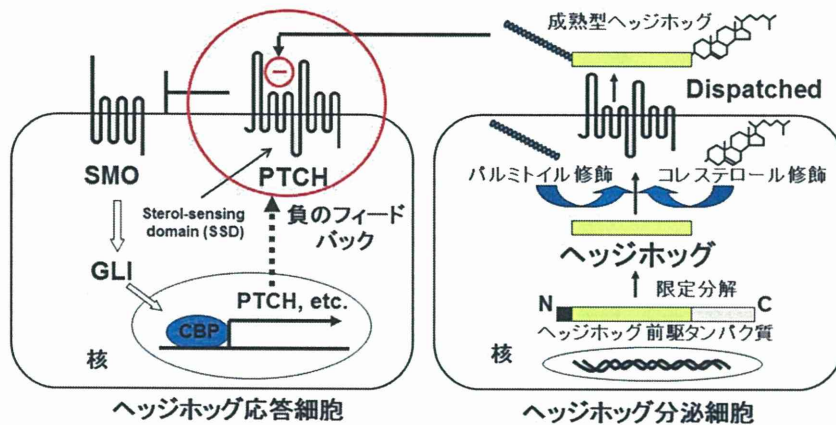


図1 ヘッジホッグシグナル (ヒト) (文献18より許可を得て転載)

ヘッジホッグタンパクは分泌細胞内で限定分解を受けた後、C末端にコレステロール修飾を、N末端にパルミトイル修飾を受けて、Dispatchedを經由して細胞外に放出される。ヘッジホッグ応答細胞では、ヘッジホッグが受容体のPTCHに結合するとSMOの抑制が解除され、転写制御因子であるGLI1を介してPTCH遺伝子等の転写が亢進する。産生されたPTCHは負のフィードバック機構によりシグナルを制御する。簡潔にするため primary cilia は省略した。

セグメントポラリティ遺伝子群に含まれる。ヘッジホッグ遺伝子を変異させたショウジョウバエは、通常腹側に局在した縞状の歯状突起が全身に分布し、表現型がハリネズミ (ヘッジホッグ) のようになることが、その名前の由来となっている。ヒトにおいては、胎生期からのヘッジホッグ伝達経路の異常は Gorlin 症候群を初めとする奇形症候群の原因となり、その一方で出生後には基底細胞癌<sup>3, 4)</sup> や髄芽腫<sup>5, 6)</sup>、消化管腫瘍<sup>7)</sup> などの悪性腫瘍の発生に深く関与している。

次にヘッジホッグシグナルについて概説する (図1)。ヘッジホッグタンパクは分泌細胞内で合成後に自己分解 (auto-processing) を行い、N末端でパルミトイル修飾を、C末端でコレステロー

ル修飾を受け、Dispatchedを經由して細胞外に放出される。リガンドであるヘッジホッグは哺乳類では3種類のホモログ (sonic hedgehog : SHH, Indian hedgehog : IHH, desert hedgehog : DHH) が知られており、特にSHHが生物学的に最も重要である。ヘッジホッグは応答細胞に発現している12回膜貫通型タンパクの Patched1 (PTCH1) を受容体としている。ヘッジホッグが未結合のときには、PTCHは隣接する7回膜貫通型タンパクの Smoothed (SMO) が細胞膜へ局在化するのを抑制し、下流のシグナルはOFFの状態になっている。しかしヘッジホッグがPTCHに結合すると、SMOの抑制が解除され細胞膜に移行することで下流の転写調節因子

である Gli (GLI) が活性化し、核内に移行する。最終的に CRE 結合蛋白質 (CBP) により PTCH や GLI などの転写活性が亢進する。さらに転写活性された PTCH によりヘッジホッグシグナルは負のフィードバックを受ける。

最近の研究により PTCH による SMO 抑制において、細胞から線毛上に突出した細胞内器官である primary cilia がきわめて重要な役割を果たすことが判明した<sup>8)</sup>。すなわち PTCH による抑制が外れた SMO は、細胞膜に単純に局在化するのではなく primary cilia に沿って局在化することにより、初めて下流の GLI が活性化するのである。さらに primary cilia 欠損マウスによる基底細胞癌形成の検討により、primary cilia は単にヘッジホッグシグナルを介在するだけではなく、下流のヘッジホッグシグナルを抑制する働きも併せ持つことも判明した<sup>9)</sup>。ヘッジホッグシグナルと同様に腫瘍形成と胚形成で重要な役割を果たす重要なシグナルである Wnt 経路においても、primary cilia はシグナル抑制に働くことがわかっており<sup>10)</sup>、今後 primary cilia の発現調節が腫瘍治療の新たな治療標的となる可能性も考えられる。

ヘッジホッグシグナルの活性亢進と多種の腫瘍形成には密接な関連性が認められている。膠芽腫や髄芽腫などの腫瘍細胞において GLI や PTCH の発現が亢進しており<sup>5)</sup>、乳癌組織の免疫染色においても SHH, GLI や PTCH の発現亢進が証明されている<sup>11)</sup>。

活性亢進の要因としては、リガンドの過剰発現と伝達経路の体細胞変異の 2 つの側面が考えられる。腫瘍細胞におけるリガンドの過剰発現として

は、肺小細胞癌<sup>12)</sup>、消化器系腫瘍<sup>7)</sup>、膀胱癌<sup>13)</sup>においてヘッジホッグの過剰分泌によるヘッジホッグシグナルの活性化が報告されている。腫瘍細胞によるヘッジホッグの自己分泌により細胞増殖が促進されていると考えられている。

その一方でヒト腫瘍細胞内におけるヘッジホッグシグナルの体細胞変異についても報告がある。基底細胞癌において PTCH および SMO の体細胞変異が報告されている<sup>3, 4)</sup>。最近では、髄芽腫小児例における腫瘍組織の遺伝子解析により 17% (15/88) で PTCH 変異を認め、最も高率な変異であったとの報告がある<sup>6)</sup>。いずれの腫瘍においても PTCH は機能喪失性変異に伴うハプロ不全により、SMO は機能獲得性変異により下流のヘッジホッグシグナル伝達経路の活性亢進に至ることで、腫瘍形成を促進すると考えられる。詳細は後述するが SMO 阻害薬による同経路の遮断が抗腫瘍効果を示すことから、同経路の活性亢進が腫瘍形成において中核的な役割を果たしていることがわかる。

またヘッジホッグ伝達経路は小脳の発生過程と髄芽腫の発生にも深く関与する。胎生期には小脳プルキンエ細胞から SHH が分泌され、外顆粒層細胞には PTCH が発現する。それに伴い外顆粒層細胞の SHH ヘッジホッグ経路が活性化することで小脳の層構造が形成される<sup>14, 15)</sup>。小脳層構造の形成を終えると、外顆粒層細胞は第四脳室下壁の後髄沓を残してほとんどが消退する。髄芽腫は小脳外顆粒層に残存した前駆細胞における SHH ヘッジホッグ伝達経路の活性亢進により発生すると考えられており<sup>16)</sup>、小児の髄芽腫が小脳



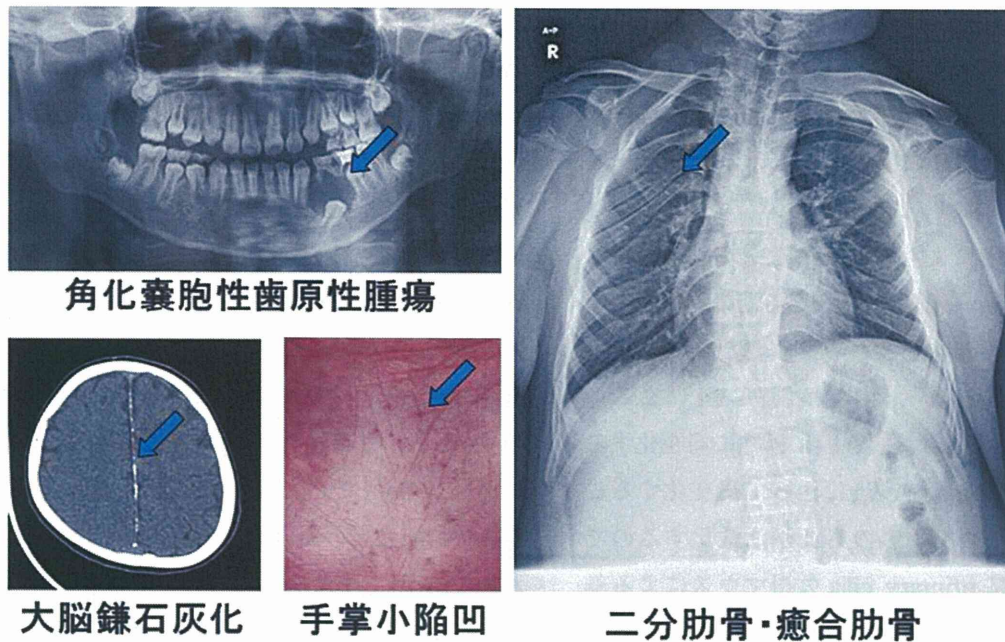


図2 Gorlin 症候群の臨床症状 (文献18より許可を得て転載)

虫部に発生するという臨床上的の事実と合致する。

### Ⅲ. Gorlin 症候群

Gorlin 症候群 (母斑基底細胞癌症候群) はヘッジホッグ受容体である PTCH の遺伝子変異により生じる先天奇形症候群である。肋骨異常, 手掌足底小陥凹, 大脳鎌の石灰化を主とした多彩な身体奇形と角化嚢胞性歯原性腫瘍, 髄芽腫, 基底細胞癌などの易腫瘍形成を特徴とする (図2)<sup>17, 18, 19, 20)</sup>。臨床症状の詳細は本稿の主旨から外れるので別稿に譲るが, 年齢依存性に腫瘍が出現する高発癌性の遺伝疾患であるため早期診断が重要である。同疾患では放射線治療により, 照射部位に一致した皮膚に基底細胞癌が生じることが知られ

ており<sup>21, 22, 23)</sup> (図3), 髄芽腫や基底細胞癌の治療においても放射線治療は一般的に禁忌とされている。髄芽腫の発見の時点では, Gorlin 症候群の診断がなされていない症例もあるため, 特徴的な臨床症状や易腫瘍形成の家族歴に注意して, 本疾患を見逃さないようにすることがきわめて重要である。また疑わしい臨床所見を認めた際には継続的な画像検査も頭部 CT ではなく頭部 MRI を選択するなど過度の放射線照射を避ける配慮が必要である。Gorlin 症候群は常染色体優性遺伝する疾患であり, 遺伝カウンセリングの必要性からも専門医への紹介が望ましい。

表1 ヘッジホッグシグナルに対する低分子療法 (文献30より一部抜粋)

製剤名	製薬会社	標的分子	対象となる腫瘍	臨床試験
GDC0449	Roche/ Genentech/Curis	SMO	髄芽腫, 再発性多形膠芽腫, 基底細胞癌, 胃十二指腸癌, 転移性直腸癌, 肺小細胞癌, 卵巣癌, 転移性膵癌	第II相
BMS-833923	BMS/Exelixis	SMO	基底細胞癌, 肺小細胞癌, 転移性胃十二指腸癌, 多発性骨髄腫	第I相
LDE225	Novartis	SMO	髄芽腫 基底細胞癌	第I相 第II相
PF0449913	Pfizer	不明	慢性骨髄性白血病	第II相
IPI-926	Infinity	SMO	転移性固形腫瘍	第I相

clopamine 類似の低分子化合物が相次いで開発されている<sup>30, 31)</sup> (表1)。

ヘッジホッグシグナル伝達経路を遮断する薬剤としては, SHH, SMO, GLI それぞれに対して阻害作用を有する低分子化合物<sup>30, 31, 32)</sup>, さらにSHH 中和抗体<sup>33)</sup>, PTCH 抗体<sup>34)</sup> などの抗腫瘍効果が報告されている。現時点で臨床応用が最も進んでいるのは cyclopamine と同じ SMO 阻害効果を持つ低分子化合物である。2009年に多発性転移巣のある髄芽腫の患者に対して, SMO 阻害作用を持つ GDC0449 を経口投与したところ転移巣が著明に消退したという報告がなされた<sup>35)</sup>。その後 SMO の機能獲得性変異があり腫瘍自体は再発したが, SMO 阻害薬に抗腫瘍効果があり, ヘッジホッグシグナルが腫瘍治療において主要な分子標的になりうることを示した非常にインパクトある報告であった (図4)。それに続いて, GDC0449 は髄芽腫, 基底細胞癌, 胃十二指腸癌, 転移性膵癌, 肺小細胞癌, 転移性大腸癌, 再発性多形膠芽腫に

対する第二相臨床試験が欧米を中心に行われており<sup>30, 36)</sup>, 日本への導入も期待されている。

ヘッジホッグシグナルは形態形成以外にも, 正常機能として SHH は心筋梗塞後の心筋修復<sup>37)</sup>に, IHH は骨形成過程<sup>38)</sup>に, DHH は末梢神経の髄鞘形成<sup>39)</sup>に働くことが報告されている。一方, 髄芽腫モデルマウスに SMO 阻害薬である HhAntag を投与したところ短期間にもかかわらず不可逆的な骨構造異常をきたしたとの報告がある<sup>40)</sup>。このように, ヘッジホッグシグナル遮断に伴う正常幹細胞への影響には注意が必要である。抗腫瘍作用を減弱させることなく, この問題点をどのように克服するかが今後の重要な研究課題である。

## V. おわりに

ヘッジホッグシグナルは腫瘍形成, 形態形成, 骨代謝等の多方面でたいへん注目されている経路である。今後は, 同経路を阻害する低分子化合物療法が脳腫瘍に対しても治療選択肢の一つになっ

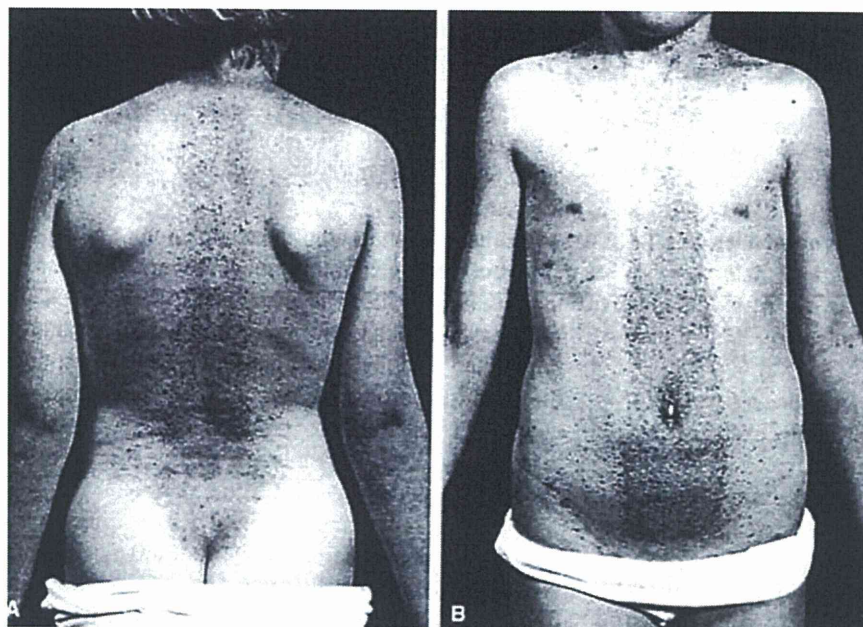


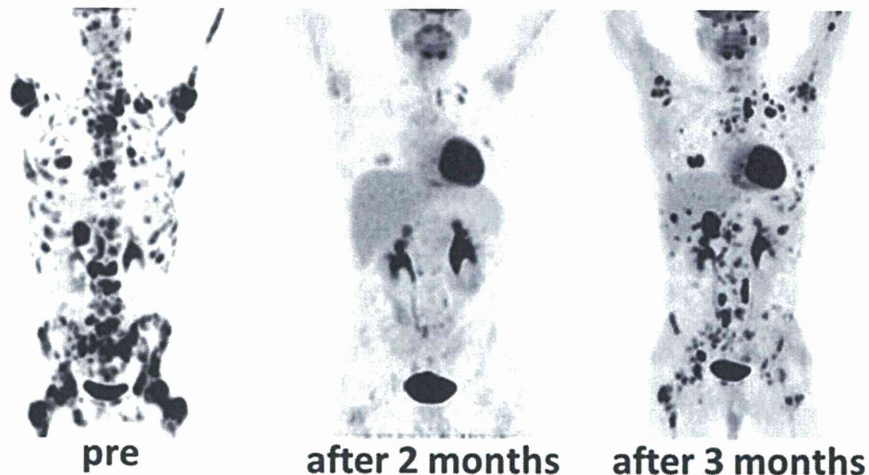
図3 Gorlin 症候群患者における放射線誘発性基底細胞癌 (Walter AW, et al: J Pediatr Hematol Oncol 19: 258-62, 1997 より許可を得て転載)

Gorlin 症候群の患児において髄芽腫に対する放射線治療を行ったところ、20 カ月後に胸腹部、背部の照射部位に一致して多発性の基底細胞癌が発症した。

#### IV. ヘッジホッグシグナルに対する分子標的療法

前述のようにヘッジホッグシグナルの活性亢進は種々の腫瘍細胞の増殖促進において重要な役割を果たしており、その経路の阻害による腫瘍治療には大きな関心がもたれていたが、SMO 阻害作用を有する cyclopamine についての報告が、創薬に至る大きな転換点になった。1960 年代よりカリフォルニアに生息する corn lily という植物を形態形成期の妊娠羊が摂取すると、単眼症の子羊が出生することが知られていたが<sup>24)</sup>、1998 年以降、その原因が cyclopamine という麦角アル

カロイドであること<sup>25)</sup>、cyclopamine が SMO に結合することにより特異的な阻害作用を示すことが判明した<sup>26)</sup>。形態形成期の胎児に cyclopamine が移行することでヘッジホッグのハプロ不全と同様の病態が生じ、単眼症を発症したことになる。このことは cyclopamine は形態形成期においては催奇形性を示すが、同時にヘッジホッグシグナル経路依存性の腫瘍に対する治療薬となる可能性を意味する。事実その後、cyclopamine はモデルマウスにおいて髄芽腫<sup>27)</sup>、胃癌<sup>28)</sup>、膵臓癌<sup>29)</sup>において著しい抗腫瘍効果を示すことが報告された。さらに精力的な drug discovery system とマウス線維芽細胞を用いた網羅的研究により、cy-



Copyright © 2009 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

図4 髄芽腫患者におけるSMO阻害薬(GDG-0449)の治療効果(文献35より許可を得て転載)

継時的なFDG-PETでは、治療前に全身性散在していた髄芽腫転移部位が、治療開始2カ月後にはいったん縮小した。その1カ月後には再燃を認めた。

ていくと考えられるが、本稿がその背景の理解の一助になれば幸いである。

#### 参考文献

- 1) Lewis EB: A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-70, 1978
- 2) Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E: Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801, 1980
- 3) Xie J, Murone M, Luoh SM, et al: Activating Smoothed mutation in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391: 90-2, 1998
- 4) Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al: Mutations of the human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85: 841-51, 1996
- 5) Dafmane N, Sanchez P, Gitton Y, et al: The sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128: 5201-12, 2001
- 6) Parsons DW, Li M, Zhang X: The genetic landscape of the children cancer medulloblastoma. *Science* 28: 435-9, 2011
- 7) Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumor. *Nature* 425: 846-51, 2003
- 8) Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP: Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317: 372-6, 2007
- 9) Wong SY, Seol AD, So P, et al: Primary cilia can both mediate and suppress hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nature Med* 15: 1055-61, 2009
- 10) Lancaster MA, Schroth J, Gleason JG: Subcellular spatial regulation of signaling at the primary cilium. *Mature Cell Biol* 13: 700-7, 2011
- 11) Kubo M, Nkamura M, Tasaki A, et al: Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* 64: 6071-4, 2004
- 12) Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al: Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422: 313-7, 2003
- 13) Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al: Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431: 707-12, 2004
- 14) Dahmane N, Ruiti-Altava A: Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126: 3089-100, 1999
- 15) Sneyne RJ, Chu T, Lewin A, et al: Local control of cell generation by cerebellar purkinje cells. *Mol Cell Neurosci*

- 6: 230-51, 1995
- 16) Marino S. Medulloblastoma: development mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11: 17-22, 2005
- 17) Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, et al: Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 69: 299-308, 1997
- 18) 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: 247-52, 2009
- 19) 田辺 良, 藤井克則, 宮下俊之, 他: 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: 253-8, 2009
- 20) 遠藤真美子, 藤井克則, 宮下俊之, 他: 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: 259-63, 2009
- 21) O'Malley S, Weitman D, Olding M, et al: Multiple neoplasmas following craniospinal irradiation for medullo blastoma in a patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome: Case report. *J Neurosurg* 86: 286-8, 1997
- 22) Walter AW, Pivnick EK, Bale AE, et al: Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: a case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 19: 258-62, 1997
- 23) Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, et al: Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nature Med* 5: 1285-91, 1999
- 24) Keeler RF, Binns W: Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of sterodis from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology* 1: 5-10, 1968
- 25) Cooper MK, Porter JA, Young KE, et al: Pantat-derived and synthetic teratogens inhibit the ability of the targets tissues to respond to sonic hedgehog signaling. *Science* 280: 1603-7, 1998
- 26) Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al: Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406: 1005-9, 2000
- 27) Berman DM, Karthdkar SS, Hallahan AR, et al: Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297: 1559-61, 2002
- 28) Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumors. *Nature* 425: 846-51, 2003
- 29) Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, et al: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425: 851-6, 2003
- 30) Mas C, Altaba ARI: Small molecule modulation of HH-GLI signaling: Current leads, trials and tribulations. *Biochem Pharmacol* 80: 712-23, 2010
- 31) Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, et al: Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of smoothened agonists and antagonists. *J Biol* 1: 10, 2002
- 32) Stanton BZ, Oeng LF, Maloof N, et al: A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 5: 154-6, 2009
- 33) Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, et al: Small molecule inhibitors reveal multiple strategies for hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14132-7, 2009
- 34) Nakamura M, Kubo M, Yanai K, et al: Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation. *Anticancer Res* 27: 3743-7, 2007
- 35) Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al: Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 361: 1173-8, 2009
- 36) Von Hoff DD, LoRusso PM, Rubin CM, et al: Inhibition of hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 361: 1164-72, 2009
- 37) Kusano KF, Pola R, Murayama T, et al: Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* 11: 1197-1204, 2005
- 38) Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, et al: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulate Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14: 689-99, 2008
- 39) Parmantier E, Lynn B, Lawson D, et al: Schwann cell-delivered Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23: 713-24, 1999
- 40) Kimura H, Ng JM, Curran T: Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure. *Cancer Cell* 13: 249-60, 2008

# 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

宮下俊之<sup>\*1</sup> 桐生麻衣子<sup>\*1</sup> 齋藤加代子<sup>\*2</sup> 杉田克生<sup>\*3</sup>  
遠藤真美子<sup>\*4</sup> 藤井克則<sup>\*4</sup>

母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS, Gorlin 症候群) は骨格を中心とする小奇形と高発癌を特徴とする常染色体性優性遺伝疾患である。今回行った全国調査で 311 例の NBCCS 患者が報告された。欧米の報告と比べて基底細胞癌の発症率が低く (38%), 発症年齢も高い (37.5 歳) 点が注目された。また, 現在までに行った 35 家系における責任遺伝子 *PTCH1* の解析の結果, 32 家系 (91%) で遺伝子欠失 (5 家系) を含む何らかの遺伝子異常が検出された。

キーワード: 癌抑制遺伝子, *PTCH1*, 基底細胞癌, 角化嚢胞性歯原性腫瘍, ヘッジホッグシグナル, 半量不全

## I. 母斑基底細胞癌症候群とは

母斑基底細胞癌症候群 (nevroid basal cell carcinoma syndrome; NBCCS) は骨格を中心とする小奇形と高発癌を特徴とする常染色体性優性遺伝疾患であり, Gorlin と Goltz によって 1960 年に報告された<sup>1)</sup>。発見者の名前をとって Gorlin 症候群, または Gorlin-Goltz 症候群とも呼ばれる。更に基底細胞母斑症候群 (basal cell nevus syndrome) と呼ばれることもある。臨床診断基準は細部が若干異なる Evans らによるものと K imonis らによるものが報告されているが, 後者を表 1 に示した<sup>2)</sup>。本邦における発生頻度は明らかでないが, 英国では 26,000 人に 1 人という報告がある。

責任遺伝子は分泌型タンパク質であるソニックヘッジホッグ (Shh) の抑制性受容体をコードする *PTCH1* である<sup>3,4)</sup>。*PTCH1* の半量不全による Shh シグナル伝達の亢進が発症機序と考えられる。哺乳類には *PTCH1* と同一性の高い *PTCH2* が存在する。*PTCH2* に変異のある NBCCS の 1 家系が報告されている<sup>5)</sup>が, *PTCH2* のノックアウトマウスで表現型が現れない点, 変異の種類がミスセンス変異である点から, この変異が本当に NBCCS の発症に関与していると結論づけるには, 更なる症例報告が必要と思われる。更に最近, *PTCH1* の下流で Shh シグナ

ル伝達を抑制している *SUFU* 遺伝子にスプライシング変異のある NBCCS の 1 家系が報告された<sup>6)</sup>。

## II. 本邦における母斑基底細胞癌症候群の臨床的特徴

我々は厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業の一環として NBCCS の全国調査を行った。詳細は別途報告の予定であるため, 本稿ではその概略と腫瘍の発生に関して速報として述べるに留めたい。また最終の集計で若干数字が異なってくる可能性もある。

一次調査の結果, 147 施設から 311 症例の報告があった。K imonis らの診断基準にあげられている各表現型の頻度を表 1 の括弧内に示した。大症状はすべて 1/3 以上の症例で認められた。家族歴陽性例は 40% であるため, 半数以上の症例は新規の遺伝子変異と考えられた。

NBCCS 症例に発症した腫瘍を海外の報告と比較してまとめたのが表 2 である。発症頻度が最も高い腫瘍は, 顎骨に生ずる角化嚢胞性歯原性腫瘍 (keratocystic odontogenic tumor; KCOT) である。KCOT は歯原性角化嚢胞 (odontogenic keratocyst; OKC) として嚢胞に分類されていたが, 浸潤性や再発率の高さ, 増殖活性の高さから 2005 年の WHO 分類により腫瘍として取り扱うようになった<sup>7)</sup>。孤発例に比べ NBCCS に伴う KCOT は多発する傾向があり, 再発率も高いといわれている。

NBCCS における基底細胞癌 (basal cell carcinoma; BCC) の発症は疾患名からもわかるように有名であり, 白人では天寿を全うする間には必ず発症すると言われていたほど頻度が高い。しかしながら表に示すように日本人では明らかに欧米の報告より頻度が低く (38% vs. 76-80%), かつ平均発症年齢も高い傾向が認められた (37.4

\*1 北里大学医学部分子遺伝学

\*2 東京女子医科大学付属遺伝子医療センター

\*3 千葉大学教育学部基礎医学

\*4 千葉大学大学院医学研究院小児病態学

連絡先: 宮下俊之 〒252-0374 相模原市南区北里 1-15-1  
北里大学医学部分子遺伝学

Tel: 042-778-8816 Fax: 042-778-9214

2010 年 11 月 18 日受理

家族性腫瘍 第 11 巻 第 1 号 (2011 年) p.14-18

歳 vs. 20.3 ~ 21.4 歳). 症例数は少ないものの, 韓国人でも同様の傾向が認められる<sup>8)</sup>. これは皮膚癌全般に白人で発生頻度が高いという事実と一致する結果である.

表1. KimonisらによるNBCCSの診断基準と出現率

大症状2つ,あるいは大症状1つと小症状2つを満たす場合NBCCSと診断	
大症状	
1.	2個以上,あるいは20歳以下の基底細胞癌[38%]
2.	顎骨の歯原性角化嚢胞[86%]
3.	3個以上の手掌,足底の小陥凹[60%]
4.	大脳鎌の石灰化[79%]
5.	肋骨異常(二分肋骨,癒合あるいは極端な扁平化等)[36%]
6.	第一度近親(親,子,同胞,二卵性双生児)にNBCCSをもつ[40%]
小症状	
1.	大頭症(身長で補正後)[27%]
2.	先天奇形(口唇口蓋裂[8%],前頭突出[47%],粗野顔貌[37%],両眼開離[69%])
3.	その他の骨格異常(Sprengel変形[3%],胸郭変形[7%],合指症[2%])
4.	X線検査の異常:トルコ鞍骨性架橋[24%],脊椎の異常(半椎等)[15%],手足のモテリング欠損,手足の火焰様透亮像[3%]
5.	卵巣線維腫[4%]
6.	髄芽腫[3%]

文献2)による.[ ]内の数字は今回の全国調査における出現頻度.

表2. 主な腫瘍とその発生頻度

腫瘍	報告者(国)	度数(あり/全体)	頻度(%)	平均発症年齢
B basal cell carcinoma	本研究(日本)	56/148	38	37.4
	Kimonis(米国)	71/90	80	21.4
	Evans(英国)	>20 years 33/45	73	
		>40 years 19/21	90	
	Shanley(オーストラリア) Ahn(韓国)	90/118 5/33	76 15.2	20.3
K keratocystic odontogenic tumor	本研究(日本)	126/146	86.3	19.8
	Kimonis(米国)	78/105	74	17.3
	Evans(英国)	46/70	66	
	Shanley(オーストラリア)	85/113	75	15.5
	Ahn(韓国)	30/33	91	
I medulloblastoma	本研究(日本)	4/120	3.3	0~4
	Kimonis(米国)	4/105	4	2~3
	Evans(英国)	3/84	4	1~4
	Shanley(オーストラリア)	1/118	1	
	Ahn(韓国)	1/33	3	
O ovarian fibroma	本研究(日本)	5/40	12.5	20.8
	Kimonis(米国)	9/52	17	
	Evans(英国)	6/25	24	
	Shanley(オーストラリア)	9/63	14	
	Ahn(韓国)	1/33	3	

上記の他に頻度の少ない腫瘍として髄膜腫(4例),その他の卵巣腫瘍(3例),心臓線維腫(2例),甲状腺腫瘍(2例)があった. 国外の頻度は文献2, 8, 14, 15)によった. KimonisらによるBCCのデータは白人に限った値である.

生命予後の悪い髄芽腫の発生も有名であるが,日本人でも頻度は低かった. そのほかにも,頻度は低いものの,さまざまな腫瘍の合併がみられたが,偶然の合併も含まれているかもしれない.

### III. 本邦における母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異

NBCCSの責任遺伝子PTCH1は24個のエキソンからなり,ゲノム上の約73 kbにわたる遺伝子で,アミノ酸1,447個からなるタンパク質をコードしている.我々は現在までにNBCCSの35家系,41症例について遺伝子解析を行ってきた.PTCH1全コーディングエキシンの塩基配列をPCR-シーケンシング法で解析したところ27家系(77%)で全て異なる変異が検出された(図1).変異の内訳は1~4塩基の欠失,挿入によるフレームシフト変異が15家系(43%)で最も多かった.変異が認められた場所を図2に示した.エキソン2からエキソン20まで満遍なく変異が認められ,変異のホットスポットは見られなかった.これらの所見は欧米の報告と大差ないものである.しかしながら4家系で見出されたミスセンス変異は膜貫通領域に集中しており,この部分はPTCH1タンパク質の機能に重要な役割を演じていることが示唆される(図3).また最も3例ではエキソン20にフレームシフト変異がみられることより,PTCH1タンパク質のC末端側約300個のアミノ酸が欠失すると機能が失われることが示唆される.

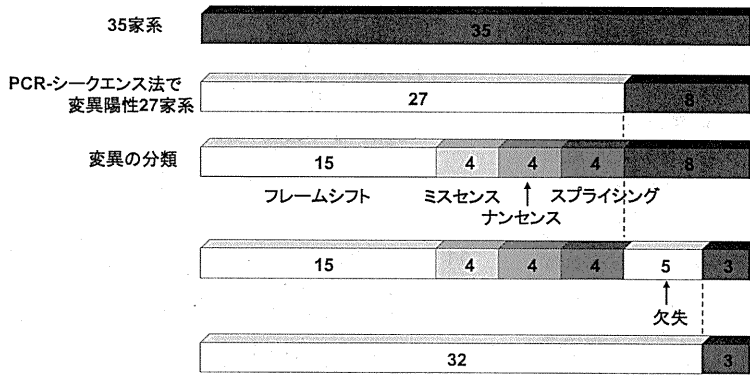


図1. NBCCSのPTCH1遺伝子解析.

全35家系を解析し, PCR-シーケンス法で27家系が変異陽性であった. この時点で変異陰性であった残る8家系のうち5家系でPTCH1遺伝子の欠失が認められたため, 結局32/35 = 91%で何らかの変異が見出された.

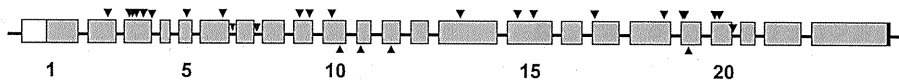


図2. 遺伝子変異の分布.

PTCH1遺伝子の各エキソン(四角)と検出された27の変異の位置(矢頭)を示した. 翻訳領域は灰色で, 非翻訳領域は白で表した. イントロンの長さは実際より短く表されている. エキソン24は3非翻訳領域なので省略した. 遺伝子欠失の5家系は含まれていない. ミスセンス変異は上向きの矢頭で, その他の変異は下向きの矢頭で表した.

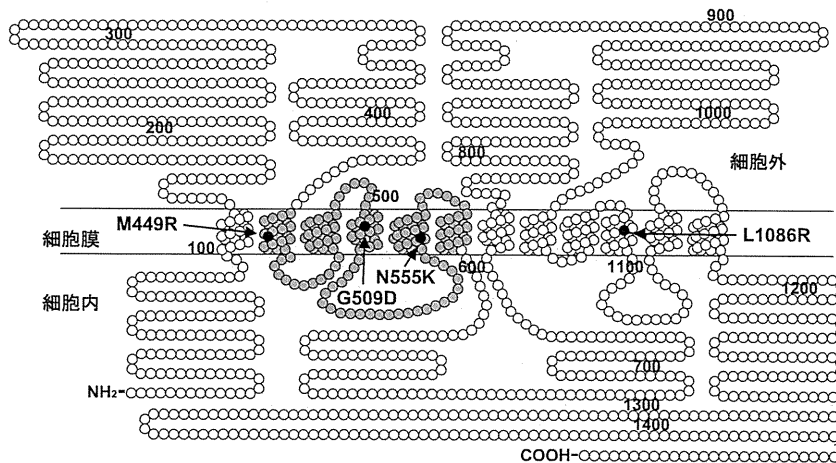


図3. ミスセンス変異の分布.

PTCH1タンパク質の構造を模式的に示した. 数字はアミノ末端から数えたアミノ酸の番号を示す. 我々が見出したミスセンス変異を黒丸で, ステロールセンシングドメインと呼ばれるいくつかのタンパク質で保存されている領域を灰色の丸で表した.

従来, 通常行われる遺伝子解析で変異陰性であった複数のNBCCS症例に対して, 積極的にコピー数解析を行った報告はない. 我々はこの時点で変異陰性であった8家系につき, PTCH1の遺伝子欠失の可能性を疑い, 高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いてコピー数解析を行ったところ, 5家系(全家系の14%)でPTCH1遺伝子の半量欠失を検出できた(図1)<sup>9)</sup>. 欠失の範囲は最も小さいもので165kbであり, この欠失に含まれる遺伝子はPTCH1のみであった. この症例はNBCCSがPTCH1の半量不全で発症することを証明する貴重な症例であった. 欠失は大きなもので11 Mbに及んでおり, PTCH1遺伝子を含む複数の遺伝子が欠失しており, 痙攣や重度の精神運

動発達遅滞等, NBCCSでは通常出現しない所見が認められた. 結局, コピー数解析まで行っても遺伝子異常が見出されなかった家系は3家系であり, 遺伝子異常の検出率は91%と, 従来のいずれの報告より高いものであった.

#### IV. まとめと今後の展望

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について概説した. 今回行った全国規模のアンケート調査によって, 日本人のNBCCSでは白人と比べBCCの発症が明らかに少なく, かつ発症年齢も高いことが明らかとなった. また, 本症を扱う診療科は, 症例数の多い順



に歯科，皮膚科，小児科，脳外科と多岐にわたることも明らかとなった．多臓器に病変が生じる本症の診療にあたっては，各診療科の密接な連携が重要であると思われた．

NBCCSには年齢とともに出現する症状が少なくない．また髄芽腫は早期発見が重要であるうえ，NBCCS患者は放射線感受性が高く，放射線照射域に一致して，後に多数の基底細胞癌やその他の二次癌を生じるため，放射線療法は禁忌，あるいは最小限に留めるべきであるとする報告がある<sup>10-12)</sup>．したがって若年発症の髄芽腫（特に desmoplastic subtype）の症例はNBCCSである可能性を慎重に検討する必要がある．また基底細胞癌は不必要な紫外線照射を避けることである程度予防可能である．以上の点を考慮すると，遺伝子診断は小児においても治療，経過観察にとってメリットが大きいと考えられる．患者の子供で親の変異がないとわかれば安心して日光を浴びることもできるし，不要な検査を省くことも可能である．また，臨床的にNBCCSであって通常の遺伝子解析で変異陰性の結果がでた場合は，遺伝子欠失の可能性が高いので，定量PCR，multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA）法，あるいはマイクロアレイ法によるコピー数解析を推奨したい．

最近，Shhシグナル伝達を抑制する分子標的薬の開発が盛んであり，一部臨床応用も始まっている<sup>13)</sup>．将来NBCCSに発症する各種腫瘍にも応用されることを期待したい．

文 献

- 1) Gorlin RJ, Goltz RW : Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib : a syndrome. *N Engl J Med* 1960; 262: 908-912.
- 2) Kimonis VE, Goldstein AU, Pastakia B, et al. : Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 69: 299-308.
- 3) Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. : Mutations of the human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85: 841-851.
- 4) 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.
- 5) Fan Z, Li J, Du J, et al. : A missense mutation in *PTCH2* underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family. *J Med Genet* 2008; 45: 303-308.
- 6) Pastorino L, Giorzo P, Nasti S, et al. : Identification of a *SUFU* germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 1539-1543.
- 7) Madras J, Lapointe H : Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *J Can Dent Assoc* 2008; 74: 165-165h.
- 8) Ahn SG, Lim YS, Kim DK, et al. : Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33

affected Korean individuals. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 458-462.

- 9) Nagao K, Fujii K, Saito K, et al. : Entire *PTCH1* deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan. *Clin Genet* (in press).
- 10) Gorlin RJ : Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *JAMA* (Baltimore) 1987; 66: 98-113.
- 11) O'Fallon S, Weitman D, Olding W, et al. : Multiple neoplasms following craniocervical irradiation for medulloblastoma in a patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome : case report. *J Neurosurg* 1997; 86: 286-288.
- 12) Walter AW, Pivnick EK, Bale AE, et al. : Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: a case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 258-262.
- 13) Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. : Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009; 361: 1173-1178.
- 14) Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, et al. : Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet* 1993; 30: 460-464.
- 15) Shanley S, Ratcliffe J, Hockley A, et al. : Nevoid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. *Am J Med Genet* 1994; 50: 282-290.

Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome: Characteristics of Clinical Manifestations and Gene Mutations in Japanese Individuals

Toshiyuki Miyashita<sup>\*1</sup>, Naoko Iryu<sup>\*1</sup>, Kayoko Saito<sup>\*2</sup>, Katsuo Sugita<sup>\*3</sup>, Naoko Endo<sup>\*4</sup>, Katsunori Fujii<sup>\*4</sup>

<sup>\*1</sup>Department of Molecular Genetics, Kitasato University School of Medicine

<sup>\*2</sup>Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University

<sup>\*3</sup>Division of Child Health, Faculty of Education, Chiba University

<sup>\*4</sup>Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine

Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), also called Gorlin syndrome, is an autosomal dominant disorder characterized by minor anomalies and predisposition toward cancer. It is caused by mutations in the *PTCH1* gene encoding a suppressor component of a receptor complex for a secreted protein, sonic hedgehog. We performed a nation-wide surveillance of NBCCS and reviewed the findings of 311 affected individuals. The major criteria were met at frequencies ranging from 36-86% and 60% of cases were expected to have novel mutations. Of note, compared with reports from Western countries, the frequency of basal cell carcinoma (BCC) was much smaller in Japanese (38%) and the mean age of onset of BCC was much younger (37.5 years). Mutational analyses demonstrated that 91% of the NBCCS families carried *PTCH1* mutations including large deletions. Clinical diagnosis of NBCCS is not always easy because

some of the NBCCS phenotypes develop with age. Therefore, early genetic testing is advisable for the early detection of tumors and for the protection of BCCs.

**Key words :** tumor suppressor gene, *PTCH1*, basal cell

carcinoma, keratocystic odontogenic tumor, hedgehog signaling, haploinsufficiency

( J Fam Tumor 2011 ; 11 : 14-18 )

## 出生時

## 基底細胞母斑症候群

藤井克則

① 基底細胞母斑症候群の  
主症状

## 発達上の奇形

手掌足底皮膚小陥凹，大脳  
鎌石灰化，顎骨嚢胞，肋骨  
奇形

## 年齢依存性の腫瘍形成

髄芽腫，基底細胞癌，卵巢  
線維腫，心臓腫瘍，髄膜腫

\*1  
二分肋骨，癒合肋骨など。



●平成21年度より厚生労働省の難治性疾患克服研究事業に基底細胞母斑症候群（Gorlin 症候群）が採用され，現在，全国調査が進行中である。日本国内にすでに300人近くの患者数が確認されており，今後，日本人を対象とした新たな診断基準の作成が期待されている。

## ② 基底細胞母斑症候群の診断基準

大症状2つ，あるいは大症状1つと小症状2つを満たす場合，基底細胞母斑症候群と診断

## ●大症状

1. 2個以上，あるいは20歳以下の基底細胞癌 [80%]
2. 顎骨の歯原性角化嚢胞 [74%]
3. 3個以上の手掌，足底の小陥凹 [87%]
4. 大脳鎌の石灰化 [65%]
5. 肋骨奇形（二分肋骨，癒合あるいは極端な扁平化等） [43%]
6. 第1度近親（親，子，同胞，二卵性双生児）に基底細胞母斑症候群をもつ

## ●小症状

1. 大頭症（身長で補正後） [49%]
2. 先天奇形（口唇口蓋裂 [3%]，前頭突出 [26%]，粗野顔貌 [52%]，眼間開離 [42%]）
3. その他の骨格異常（Sprengel 変形 [11%]，胸郭変形 [12%]，合指趾症 [24%]）
4. X線検査の異常：トルコ鞍骨性架橋 [68%]，脊椎の異常（半椎等） [31%]，手足のモデリング欠損，手 [30%] 足 [17%] の火焰様透亮像
5. 卵巢線維腫 [女性の17%]
6. 髄芽腫 [4%]

[ ] 内の頻度は Kimonis ら<sup>5)</sup> (米国) の解析による。

(Kimonis VE. 1997<sup>5)</sup>)

- 1960年 Gorlin と Goltz によって報告された神経皮膚症候群である<sup>1)</sup>。
- 常染色体優性遺伝を呈するが，孤発例も多い。

## 原因

- 癌抑制遺伝子の *PTCH1* 遺伝子変異により発症する。
- PTCH1* はヘッジホッグタンパクの受容体で，形態形成と発癌に関与する。
- 常染色体優性遺伝形式をとり，loss of heterozygosity（異型接合の消失）によってさまざまな腫瘍が生じる。
- 現在までに160以上の *PTCH1* 遺伝子変異が報告されている。

## 症状 (①)

- 年齢依存性に症状が出現する。
- 典型的には，出生時から乳児期にかけて大頭症があり，手掌足底皮膚小陥凹や椎骨肋骨奇形<sup>\*1</sup>で気づかれる。
- 2～3歳時に髄芽腫が発生することがあり，要注意である。
- 10歳前後で顎骨嚢胞が生じるが，この嚢胞感染から発赤疼痛をきたし，歯科口腔外科を受診することが多い。
- 10歳台に側彎症が生じ，時に卵巢線維腫ないし心臓腫瘍も気づかれる。

●20歳台からは基底細胞癌，髄膜腫などの腫瘍が多発し，外科的摘出手術が必要になることがある<sup>2)</sup>。

●臨床症状はきわめて多様であるため，受診する診療科も多岐にわたり，その結果診断が遅れる傾向にある。

●小児期は特徴的な臨床症状がそろわないため，*PTCH1* 遺伝子解析が本症の診断確定に有用である<sup>3,4)</sup>。

## 診断

●米英豪より診断基準が出されているが，なかでも Kimonis の診断基準（米国）<sup>5)</sup> が汎用されている (②)。

●外来診察の場では，手掌足底皮膚小陥凹の確認が診断上重要である。

## 治療

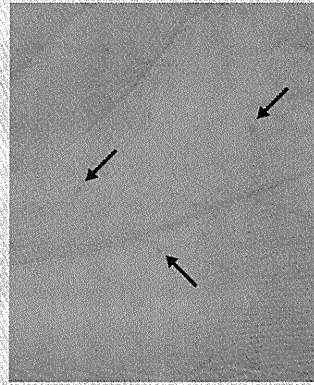
- 対症療法が中心となる。
- 10歳前後で生じる顎骨嚢胞は感染を伴うため、歯科口腔外科で開窓術と嚢胞摘出術が行われる。
- 基底細胞癌に対しては局所的な外科手術および抗癌剤治療を行い、骨格異常に対しては整形外科的処置が行われる。

## 症例

16歳、男子。頭部打撲で撮られたCTで大脳鎌石灰化が認められたため、精査目的に小児科受診となった。

知的に正常だが、既往歴として出生時に大頭症があり、体は常に大きめだった。幼児期に手掌と足底に小さな皮膚陥凹が複数認められ③、胸部X線上で二分肋骨と癒合肋骨を指摘されていた。8歳ごろからは顎骨が発赤腫脹して歯原性角化嚢胞と診断され、嚢胞の開窓摘出手術を受けた。10歳ごろから皮膚に基底細胞母斑が多発してきた。母親にも幼少時から同様の症状があり、最近、眼瞼部の基底細胞癌と脳髄膜腫の摘出手術を受けている。

③ 手掌の皮膚小陥凹 (拡大図)



患者は Kimonis の診断基準に照らし、基底細胞母斑症候群と診断された。



## アドバイス

- 髄芽腫に対する全脊髄照射で、照射皮膚領域に一致して基底細胞癌が多発する特異な現象が報告されている。
- したがって、二次癌発生防止の観点から、過度の放射線照射は避けるべきとされている。

## 文献

- 1) Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. N Engl J Med 1960 ; 262 : 908-12.
- 2) 田辺 良ほか. 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 2009 ; 41 : 253-7.
- 3) 遠藤真美子ほか. 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 2009 ; 41 : 259-63.
- 4) Fujii K, et al. Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. Hum Mutat 2003 ; 21 : 451-2.
- 5) Kimonis VE, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. Am J Med Genet 1997 ; 69 : 299-308.