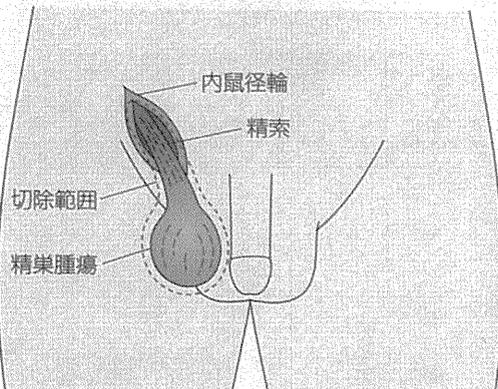


# 高位精巣摘除術

## 手術DATA

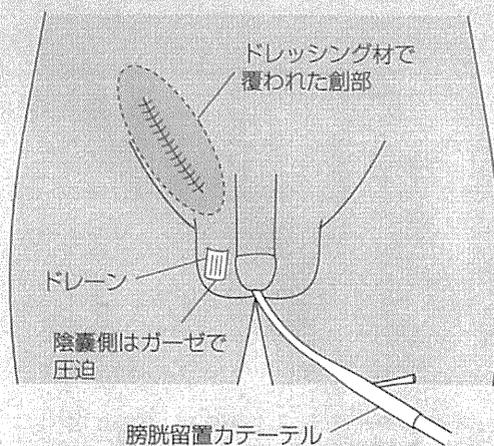
- 平均手術時間 約1時間
- 麻酔法 腰椎麻酔または全身麻酔
- 手術体位 仰臥位
- 手術費用 精巣悪性腫瘍手術9,460点 (K-833)

## 手術部位



精索を中枢側に内鼠径輪まで十分に剥離し、精索を精管と精巣血管などその他の組織を分けてそれぞれ絹糸で結紮、切断し精巣を摘出します。

## 術後のドレーン・カテーテル留置位置



最近ではドレーンを留置しないことも少なくありませんが、当院ではドレーンを留置し、筋膜、皮下、皮膚を縫合します。膀胱留置カテーテルを挿入します。最後に、陰嚢側から出血予防のためにガーゼを用いて圧迫します。

# 高位精巣摘除術とは

## 1. 手術の概要

当院では、以前は精巣腫瘍を疑う患者が受診したその日または翌日に緊急手術として高位精巣摘除術を行っていましたが、現在はいちばん早く予定手術として施行できる日に（一般的には1週間以内）に手術を施行しています。

麻酔は全身麻酔または腰椎麻酔で行います。腰椎麻酔の際には手術の際に精索の牽引に伴う痛みが生じることがあるため、第4胸髄レベル付近まで麻酔を十分に効かせる必要があります。その際にさらにレベル上昇することもあり、呼吸抑制、血圧低下などにも注意し、必要に応じて昇圧薬、酸素の投与も行います。

皮膚切開は、鼠径管に沿って皮膚を約7cm切開し、鼠径管を確認したのちに鼠径管を開放して精索を同定します。精索の周囲を剥離し、ネラトンカテーテルで精索を確保したのちに腫瘍細胞を播種させないように精索をネラトンカテーテルで縛ります。術前の検査で確実に精巣を摘出する場合は、太めの絹糸で精索を結紮します。続いて精索を遠位側（精巣の方向）に剥離を進め、陰嚢を裏返すようにしながら切開創より精巣を脱転し、精巣の状態を確認します。この時点で診断が疑わしい場合は、精巣生検を行うことがあります。精巣を摘出しない場合は、ネラトンカテーテルによるクランプを解除して精巣への血流を再開します。精巣腫瘍と診断し、摘除が必要と判断した場合は、精索を中枢側に内鼠径輪まで十分に剥離を進め、精索を精管と精巣血管などその他の組織を分けてそれぞれ絹糸で結紮、切断を行い、精巣を摘出します。この際の結紮糸は後腹膜リンパ節郭清の際の郭清組織の遠位端となるため、目印となるように長めに切っておきます。

十分に止血を行い、ドレーンを留置し（最近ではドレーンを留置しないことも少なくありません）、筋膜、皮下、皮膚を縫合します。膀胱留置カテーテルを挿入し、陰嚢側から出血予防のためにガーゼを用いて圧迫して終了します。

る場合もあることを、ある程度説明しておいたほうがよいと考えます。

#### ④術前・術後指示の確認

術前、術後の補液、抗菌薬の指示、術後の疼痛時の指示など、予測できる範囲での指示を前もって出しておく必要があります。

## 2. ナースが見ること・聞くこと

### ①病状と全身状態の把握

肺転移や後腹膜リンパ節転移をしている場合もあるため、現在の病状を把握し術後の観察点を押さえる必要があります。既往歴や内服中の薬剤にも十分注意して確認します。

### ②患者本人、家族の病状の把握

外来受診から手術に至るまでの期間が比較的に短いため、患者さんとその家族が精神的に動揺していることもあり、病状を正確に把握できていないことが少なくありません。入院時に患者さん本人と家族がどのように病状を理解されているかを確認し、不明点があれば医師からの病状についての説明が受けられるよう調整します。

## 3. ナースがすること

### ①術前オリエンテーション

緊急手術であることも多いため、手術前後の流れや注意点を患者にとって不明点のないようにオリエンテーション用紙を用いてわかりやすく説明する必要があります。この際に、可能ならば患者本人ばかりでなく家族も含めて説明をすると理解が得られやすいです。

### ②手術の承諾書の確認

手術の承諾書は医師がとりカルテに保管していますが、手術室入室前に看護師も承諾書が準備されていることを確認します。

### ③補液および抗菌薬の確認

指示の時間や投与速度などのダブルチェックを行い、術前補液、抗菌薬の投与を開始します。術中に抗菌薬投与を行う場合には、手術室看護師に申し送る必要があります。

### ④精神的支援

精巣腫瘍の診断を受けてから間もないことが多く、手術の準備で慌ただ

しいなかで心の整理ができない患者さんがいます。医師からの説明後は病状や手術の受け止めを確認し、患者さんが思いを表出できる機会を設ける必要があります。また、家族を支える立場である患者も多いため、家族の不安の有無や将来的な挙児希望の有無を確認します。

## 術直後にすること

### 1. 医師の処置

#### ①バイタルサイン、全身状態の確認

一般的な手術と同様に発熱の有無、血圧の変動の有無、酸素濃度の低下の有無、尿量の状態など、術後の全身状態の把握を行います。

#### ②麻酔レベルおよび覚醒状態の確認

腰椎麻酔の場合、麻酔レベルが高くなると呼吸状態の悪化がみられることがあります。術後麻酔レベルの上昇がないことを確認します。全身麻酔、腰椎麻酔ともに、術後の麻酔からの覚醒の状態を経時的に把握します。

#### ③完全覚醒後の経口摂取開始の指示

完全覚醒が得られた段階で、経口摂取を開始します。最初は飲水より開始して、問題がなければ食事也开始します。腹腔内の手術ではないため、当院では帰室後3時間をめどに腹部の聴診を行い、問題がなければ飲水を開始する指示を出しています。

#### ④施行された手術の説明

術後に、患者さん本人、家族に手術の経過、術中所見について説明をします。予定どおりの場合は術前に説明したとおりであったことを告げますが、術前の説明と異なる処置を要した場合は、その理由を含めて本人、家族が理解しやすいようにていねいな説明が必要です。実際には病理結果が出ないと詳細な治療方針が決まらないため、今後の予定についても簡単に説明するようにしています。

### 2. ナースが見ること・聞くこと

#### ①バイタルサイン、全身状態の確認

手術から帰室後にはすぐにバイタルサインを測定します。全身の皮膚の

表1 ●腫瘍マーカー数値の例

症例1	術前	術後
$\beta$ -hCG (mIU/mL)	0.0	0.0
AFP (ng/mL)	1,603.6	5.0

術後にAFPは正常化しています。

症例2	術前	術後
$\beta$ -hCG (mIU/mL)	11,482.0	29.4
AFP (ng/mL)	1,962.0	61.9

術後も $\beta$ -hCG、AFPともにマーカーの高値が継続しており、腫瘍の残存が示唆されます。

正常値	$\beta$ -hCG	0~0.5	(mIU/mL)
	AFP	1.0~10.0	(ng/mL)

#### ④次回受診日の確認

病理結果が出るまでに2週間ほどかかることが少なくありません。そのため、退院後に病理結果を外来でお話しすることになります。そのことを踏まえて、次回受診日を調整する必要があります。

## 2. ナースが見ること・聞くこと

### ①全身状態の確認

退院まで患者さんの体調の変化と創部の状態を観察します。肺転移がある場合も多いため、血中酸素濃度や呼吸苦の有無についても観察します。

### ②鎮痛状態の確認

創部の痛みに応じて鎮痛対処を行います。十分な鎮痛効果が得られているか確認し、患者さんと相談し、必要であれば退院時に鎮痛薬の処方医師に依頼します。

### ③退院に向けての不安な点、疑問点の確認

転移がある場合、術後化学療法が必要となる場合があります。若年層で社会的、家庭的に重要な役割の患者が多く、今後の長期入院への不安が強まることもあるため精神的支援を行います。

### 3. ナースがすること

#### ①退院時処方と次回受診日の確認

退院日が決定したら、退院時処方の有無を確認します。創部痛がある場合には患者さんと相談し、鎮痛薬の処方を医師に依頼します。退院前に次回受診日の予約がされていることを確認し、患者さんに伝達します。

#### ②緊急連絡先の説明

術後早期に退院となることが多く、退院後の緊急連絡先を患者さんに説明する必要があります。どのような症状があるときに受診もしくは緊急連絡先への連絡が必要となるかを患者さんに指導します。

(三井貴彦・野々村克也・佐賀可奈子・植西佳奈・高木真弓)



## 性分化疾患

深見 真紀\*

### はじめに

ヒトの性分化には、性腺形成を制御する転写因子、ステロイド代謝酵素、性ホルモン受容体、細胞増殖因子などさまざまな因子が関与する。これらの因子をコードする遺伝子の異常は、性分化疾患 (Disorders of sex development, DSD) を招く。近年、多数の DSD 患者の分子遺伝学的、臨床的解析が行われ、個々の遺伝子異常症の臨床像が明らかとなってきた。さらに、動物実験や *in vitro* 解析によって哺乳類の性分化における新たな遺伝子相互作用が解明された。本稿では、既知遺伝子変異に起因する DSD の臨床像および性分化の分子基盤に関する最近の知見の一部を紹介する。

### ① 46, XY 核型患者における DSD (46, XY DSD) を招く遺伝子異常症

#### 1) Steroidogenic factor 1 (SF-1) 異常症

近年、多数の SF-1 (別名 Ad4Bp, NR 5A1) 異常症患者が報告され、本症が 46, XY DSD の原因疾患として重要であることが明確となった<sup>1)</sup>。また、本症患者の臨床的多様性が明らかとなった。SF-1 は、1990 年代に単離された遺伝子で、副腎と性腺の形成と機能の様々な段階に関与すること

が知られている。SF-1 は、組織特異的に発現する核内転写因子であり、標的遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに直接結合してその転写を調節する。SF-1 標的遺伝子には、性腺形成に関与する因子 (*DAX1*, *SOX9*)、ゴナドトロピン分泌調節に関与する因子 (*GnRH*, *GnRH* 受容体, *FSH $\beta$* , *FSH* 受容体) およびステロイド合成酵素 (*CYP11A1*, *STAR*, *HSD3B2*) など、多数の遺伝子が含まれる。SF-1 の機能低下変異は、これら標的遺伝子の発現異常を招く。なお、変異陽性患者の大多数は、SF-1 の機能低下または機能喪失変異をヘテロ接合性に有するが、ミスセンス変異をホモ接合性に有する症例も報告されている<sup>1)</sup>。SF-1 の変異は遺伝子全体に分布しており、DNA 結合領域に多く認められる。

SF-1 遺伝子変異は、46, XY 患者において、子宮を有する女性型表現型から尿道下裂と停留精巣のみを呈する男性型表現型までさまざまな重症度の DSD を招く<sup>1)</sup>。同様に、精巣の形態はほぼ正常から重度の異形成または低形成まで幅がある。SF-1 異常症の正確な発症頻度は不明であるが、性腺異形成を伴う 46, XY DSD 患者の 15% に SF-1 の異常が同定されたとの報告がある<sup>1)</sup>。また、Philibert らは、テストステロン低値を呈する 46, XY 原発性無月経患者 15 例を解析し、5 例において SF-1 遺伝子変異を同定した<sup>2)</sup>。この成績は、出生時に 46, XY DSD と診断される新生児のみならず、思春期以降に原発性無月経によって見出される 46, XY 核型女性患者においても、SF-1 遺伝

\*独立行政法人国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部

Maki Fukami: Disorders of sex development. Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health and Development.

子異常が存在する可能性を示唆する。一方、性腺機能異常を伴わない副腎機能低下症患者では、*SF-1* 遺伝子変異の頻度は著しく低いと推測されている<sup>3)</sup>。また、*SF-1* 変異陽性 DSD 患者のなかで、副腎不全症状を認める症例は比較的少数である<sup>1)</sup>。したがって、*SF-1* 半量不全患者において副腎の形成はある程度保持されると推測される。

*SF-1* 遺伝子変異は、46, XY DSD のみならず、46, XX 患者における卵巣機能不全を招く。*SF-1* 変異陽性女性では、原発性または続発性無月経が認められる。しかし、正常卵巣機能を有する変異陽性女性が多く報告されていることから、*SF-1* は卵巣よりも精巣において重要な役割を果たしていることが示唆される<sup>1)</sup>。

## 2) アンドロゲン受容体 (AR) 異常症

AR 異常症は、46, XY DSD を招く単一遺伝子異常症の中でもっとも頻度が高い病態である<sup>4)</sup>。とくに、完全な女性型外性器と血中テストステロン高値を呈する 46, XY 症例では、過半数において AR 変異が同定される。これまでに多数の患者が報告され、本症の分子遺伝学的、臨床的特徴が明らかとなった<sup>4)</sup>。本症は、完全な女性型表現型を呈する症例から不妊症の男性まで、幅広い臨床スペクトラムを有する。

AR は、X 染色体上に位置する遺伝子であり、男性では 1 コピーの AR の機能喪失により DSD が生じる。AR 遺伝子変異は、翻訳領域全体に広く分布し、ミスセンス、ナンセンス、フレームシフト、スプライス異常など多くの変異パターンを含む<sup>4)</sup>。最近の研究では、エクソン 1 に多くの変異が存在することが見出されている<sup>4)</sup>。変異の種類と位置は、患者の表現型の重症度に関連すると推測される。さらに、AR 遺伝子エクソン 1 の非翻訳領域には (CAG)<sub>n</sub> 反復配列多型が存在し、その数の差が同一変異陽性患者間の疾患重症度の差の一因である可能性が見出されている。

## 3) Chromobox homolog 2 (CBX 2) 異常症

*CBX2* は、2009 年にはじめてヒト 46, XY DSD への関与の可能性が見出された遺伝子である<sup>5)</sup>。

従来、*CBX2* のマウス相同遺伝子 *M33* は、DSD 発症責任遺伝子であると推測されていた。これは、*M33* が形態形成に関与するポリコム遺伝子群に属すること、および、ノックアウトマウスオスの 50 ~ 75 % で女性型内外性器の形成が認められることに基づく。Bison-Lauber らは、DSD 患者を対象として *CBX2* の変異解析を行い、完全女性型外性器と卵巣を有する 46, XY 患者において、複合ヘテロ接合性変異を同定した<sup>5)</sup>。さらに彼らは、野生型 *CBX2* は *in vitro* で *SF-1* の転写を活性化するが、患者で同定された変異型 *CBX2* はこのような転写活性化能を喪失していることを見出した。以上の成績は、*CBX2* がヒトの性分化カスケードにおいて *SF-1* の上流に位置し、その機能喪失性変異が常染色体劣性遺伝形式の 46, XY DSD を招く可能性を示唆する。しかし、患者で同定された変異はいずれもミスセンス変異であるため、まれな多型である可能性は否定できない。今後さらなる患者解析が必要である。

## 2] 46, XX DSD を招く遺伝子異常症

### 1) R-spondin 1 (RSPO 1) 異常症

46, XX DSD の原因としては、これまでに、先天性副腎酵素欠損症、染色体構造異常による *SRY* の獲得、*DAX1* や *WNT4* の異常などが知られている。一方、これらの異常を伴わない患者、とくに精巣組織を有する *SRY* 陰性 46, XX 患者における疾患発症機序はほとんど解明されていなかった。

2006 年、*RSPO1* がこのような 46, XX DSD の発症責任遺伝子であることが明らかとなった<sup>6)</sup>。Parma らは、多数の患者を有する近親婚 2 家系の解析から、*RSPO1* 近傍の座位が 46, XX DSD と連鎖することを見出し、患者において *RSPO1* ホモ接合性変異を同定した。*RSPO1* は、成長因子であり、 $\beta$  カテニンの安定化または WNT シグナルの活性化を介して卵巣の形成に関与すると推測される。この成績は、単一遺伝子の機能喪失変異が、*SRY* 非存在下で 46, XX 個体における精巣の形成と内外性器の男性化を招きうることをはじ

めて明確とするものである。一方、*RSPO1* 変異をホモ接合性に有する 46, XY 男性は正常妊孕性を保持していることから、*RSPO1* は精巣機能には必須でないと推測される。なお、*RSPO1* は皮膚においても強く発現しており、変異陽性患者では、DSD に加え、皮膚の角化異常と扁平上皮癌の易罹患性が認められる<sup>6)</sup>。最初の報告の後 46, XX 卵巣精巣性 DSD (46, XX ovotesticular DSD) 患者においても *RSPO1* 変異が同定され、*RSPO1* 変異がさまざまな重症度の 46, XX DSD を招くことが明らかとなった<sup>7)</sup>。

### 3 46, XY DSD と 46, XX DSD を招く遺伝子異常症

#### 1) チトクローム P450 オキシドレダクターゼ (POR) 異常症

POR 異常症は、2004 年に疾患概念が確立された劣性遺伝病であり、先天性副腎酵素欠損症の一つに位置づけられる。最初の変異陽性患者が報告されてから 5 年間に 60 例以上の患者が相次いで報告され、本疾患が先天性副腎酵素欠損症の中で、比較的頻度の高い病態であることが明らかとなった。本症では、男女共に出生時の外性器異常を認めることが重要な点である。すなわち、女児では陰核肥大、陰唇融合、共通尿生殖洞などの男性化が、男児では尿道下裂、停留精巣、マイクロペニスなどの男性化不全が認められる (図 1)<sup>8,9)</sup>。なお、*POR* 変異陽性患者では、DSD に加え、骨形成異常、副腎不全、妊娠中母体男性化など多彩な臨床症状が認められる。これは、*POR* が 50 種類以上の酵素の活性化に関与する補酵素であることによって説明される。

POR 異常症の外性器異常の発症には、ステロイド産生異常とビタミン A 代謝異常の 2 つの要因が関与すると推測される。ステロイド産生異常としては、1) 胎盤アロマトラーゼ (*CYP19A1*) 活性低下に起因する男性ホルモン蓄積、2) 胎児期・新生児早期特異的男性ホルモン産生経路 (backdoor pathway) における男性ホルモン過剰産生、3) 胎

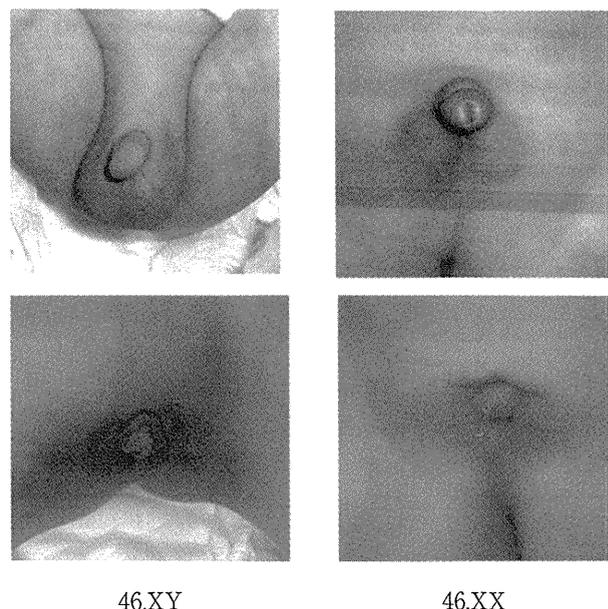


図 1 POR 異常症患者の外性器 (文献 8, 9 より引用, 改変): POR 異常症は、46, XY DSD と 46, XX DSD を招く疾患である。なお、日本人患者では、比較的男性外性器異常の頻度が低く、女性外性器異常の頻度が高いと推測される。すなわち、男性においては正常男性型外性器 (左上段) またはマイクロペニスや停留精巣 (左下段) が認められ、女性ではほぼ全例に陰核肥大や陰唇融合などの男性化 (右) が認められる。これは、本邦において *CYP17A1* に対する残存活性が低い人種特異的変異が高頻度に認められることによって説明される。

児精巣における *CYP17A1* 活性低下による男性ホルモン産生障害が関与すると推測される (図 2)。なお、これらのうち、胎盤と backdoor pathway における男性ホルモン産生は出生後に消失するため、出生後の女児男性化の進行はない。思春期には、男女ともに性腺におけるホルモン産生障害を反映する二次性徴の出現不全を認める。ビタミン A 代謝異常としては、*POR* 依存性ビタミン A 代謝酵素 (*CYP26A1*, *B1*, *C1*) の活性低下に起因する活性型ビタミン A (all-trans retinoic acid, atRA) 蓄積が関与すると推測される<sup>10)</sup>。この仮説は、*POR* 異常症患者において、atRA による器官形成障害に一致する腎泌尿器・下部消化管奇形が高頻度に認められること、血中 atRA 濃度が正常上限から高値であることによって支持される<sup>10)</sup>。

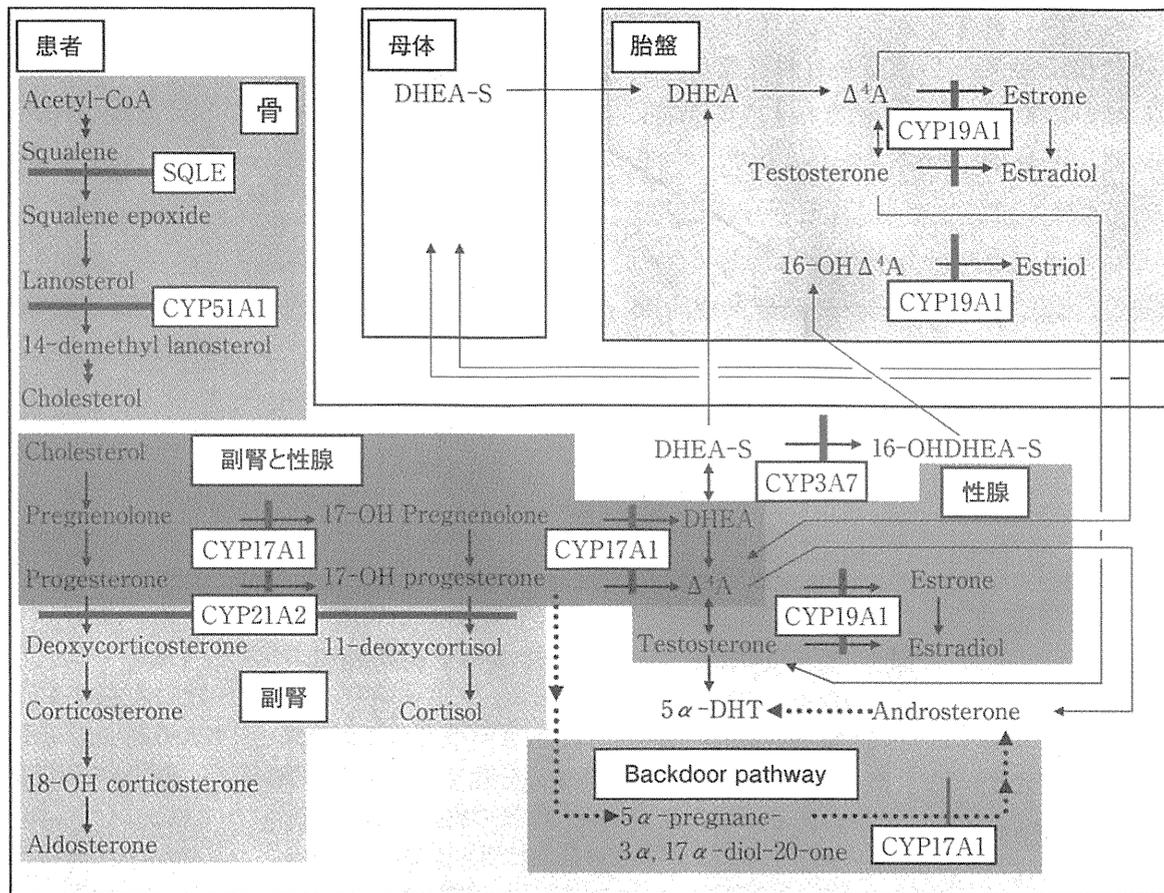


図2 POR異常症におけるコレステロール，ステロイド代謝異常（文献8より引用，改変）：  
 POR異常症では，骨，副腎，性腺，胎盤におけるPOR依存性酵素の活性低下に起因する骨形成障害，DSD，妊娠母体男性化が認められる．46, XY DSDの発症には精巢CYP17A1活性低下によるアンドロゲン産生低下が，46, XX DSDの発症には胎盤CYP19A1活性低下によるアンドロゲン蓄積とbackdoor pathway由来のdihydrotestosterone過剰産生が関与していると推測される．

なお，POR異常症の変異パターンには人種差があり，本邦においては全変異アレルの70%以上を人種特異的創始者変異であるR457Hが占める<sup>8)</sup>．一方，欧米人患者で多く報告されているA287Pはこれまで日本人患者では同定されていない．このような変異パターンの差は，臨床症状の重症度の人種差を招く．とくに，日本人患者では欧米人に比較して女性外性器異常の頻度が高く，男性外性器異常の頻度が低いと推測される．これは，R457H変異体が，CYP19A1とCYP17A1に対し比較的低い残存活性を有することに一致する．

#### 4 哺乳類の性分化に関する新たな知見

近年，マウスの研究から，性分化の分子基盤に関する2つの重要な知見が得られた（図3）．これらは，ヒトのDSD発症メカニズムの理解に役立つと考えられる．第一に，精巢形成を制御する遺伝子相互作用が解明された<sup>11)</sup>．すなわち，精巢形成の基盤となるセルトリ細胞の分化が*Sox9*の持続的発現に依存することが見出され，さらにこの*Sox9*の発現を発生時期特異的に制御する転写因子が明らかとなった：1) 10.5 dpcまでの精巢分化初期における基礎的転写はSf-1に依存する，2) 11.0 dpc前後にSryとSf-1による強い転写誘導が生じる，3) その後，Sf-1と*Sox9*自身および

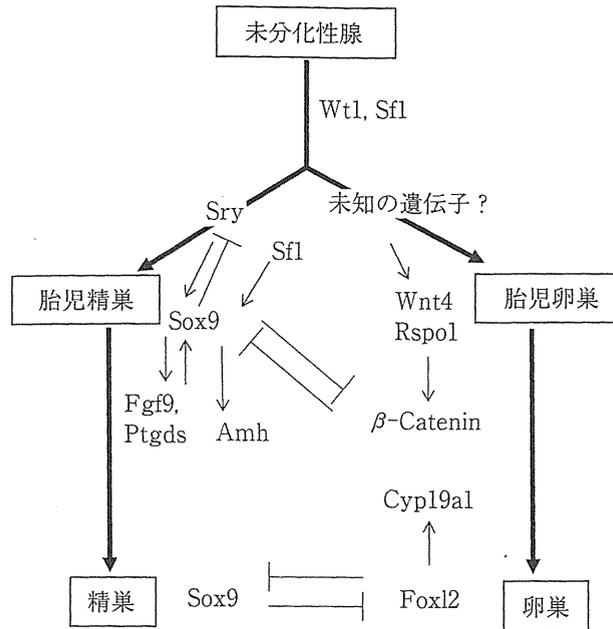


図3 哺乳類の性腺の分化と維持に関する遺伝子相互作用

精巣の分化と維持には Sox9 が中心的役割を果たすと推測される。卵巢の分化を支配する因子は依然不明な点が多い。卵巢の維持に Foxl2 が関与することが最近の研究で明らかになった。このモデルは、マウスにおいて解明された<sup>11-13)</sup>。ヒトにおける性分化の分子基盤に関しては今後の検討が必要である。

Fgf9 などの因子によって強い発現が維持される。このような転写制御は、Sry, Sf-1, Sox9 が Sox9 精巣特異的エンハンサー (TES) へ直接結合することによって生じると推測される。なお、上記 2) の Sry による Sox9 誘導に関して、Hiramatsu らは、11.0 - 11.25 dpc のわずか6時間における Sry の発現が精巣形成を決定することを見出している<sup>12)</sup>。性決定因子 Sry の主要な生体内機能は、この時期の Sox9 の発現誘導であると推測される。一方、Sry の発現が 12.0 dpc に消失するにもかかわらず Sox9 の発現は持続することから、Sry は Sox9 の発現誘導には必須であるが、発現維持に関与しないことが明らかである。なお、46, XX 個体では、46, XY 個体と同様に Sf-1 による Sox9 の基礎的転写が生じるが、その後 Sox9 の発現が抑制される。この Sox9 抑制機構は充分解明され

ていないが、下記の Foxl2 などが関与すると推測される。

第二に、卵巢形成の可逆性が明らかとなった。従来、性腺の分化は SRY/Sry の有無に依存し、SRY が存在するときは精巣への分化が生じ、存在しないときは受動的に卵巢が形成されると考えられていた。しかし、2009 年、Uhlenhaut らは、成獣 46, XX マウスで Foxl2 の機能を喪失させた場合、Sry が存在しないにもかかわらず卵巢組織の形態が精巣様に変化することを見出した<sup>13)</sup>。さらに、このマウスの性腺は、正常精巣に類似した遺伝子発現パターンと男性ホルモン産生能を有していた。この成績は、正常 46, XX 個体において卵巢の形態と機能を維持するための機構が生涯にわたり機能しており、この機構の破綻が Sry 非依存性に成獣期卵巢の精巣への再分化を招くことを示

唆する。この卵巣維持機構の中心は、Foxl2によるSox9の抑制であると推測される。今後、ヒトの卵巣機能におけるFOXL2の役割について検討が必要である。

### おわりに

性分化は、様々な遺伝子が関与する複雑な過程である。既知遺伝子の変異が同定されないDSD患者が多く報告されていることから、DSDの発症には多数の未知遺伝子が関与すると推測される。また、DSDは、単一遺伝病のほか、多因子遺伝病およびインプリンティング異常症として発症することが知られている。今後、モデル動物の解析や患者の網羅的変異解析などにより、DSDの発症メカニズムに関する研究が急速に進展すると期待される。

### 文 献

- 1) Köhler, B., et al. : *Minerva Endocrinol.*, 35 (2) : 73, 2010.
- 2) Philibert, P., et al. : *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 8 (1) : 28, 2010.
- 3) Lin, L., et al. : *Sex. Dev.*, 2 (4-5) : 200, 2008.
- 4) Audi, L., et al. : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95 (4) : 1876, 2010.
- 5) Biason-Lauber, A., et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, 84 (5) : 658, 2009.
- 6) Parma, P., et al. : *Nat. Genet.*, 38 (11) : 1304, 2006.
- 7) Tomaselli, S., et al. : *Hum. Mutat.*, 29 (2) : 220, 2008.
- 8) Fukami, M., et al. : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 94 (5) : 1723, 2009.
- 9) Fukami, M., et al. : *Pediatr. Res.*, 59 (2) : 276, 2006.
- 10) Fukami, M., et al. : *Mol. Genet. Metab.*, 100 (3) : 269, 2010.
- 11) Sekido, R., et al. : *Trends Genet.*, 25 (1) : 19, 2009.
- 12) Hiramatsu, R., et al. : *Development*, 136 (1) : 129, 2009.
- 13) Uhlenhaut, N. H., et al. : *Cell*, 139 (6) : 1130, 2009.

特集 コピー数変異

# 小児内分泌疾患とゲノムコピー数異常

深見真紀 緒方 勤

生 体 の 科 学

第62巻 第6号 別刷

2011年12月15日 発行

(財)金原一郎記念医学医療振興財団／医学書院

## 小児内分泌疾患とゲノムコピー数異常

深見 真紀 緒方 勤

近年、分子遺伝学的解析技術の進歩に伴い、ゲノムコピー数異常が容易に検出されるようになった。これにより、さまざまな単一遺伝子異常症において疾患発症の原因となる微小欠失や重複が同定された。このようなコピー数異常には遺伝子翻訳領域を包含する欠失や重複だけでなく、翻訳領域から離れた領域の異常が含まれる。本稿では、コピー数異常に起因する小児内分泌疾患の例として、SHOX 異常症とアロマターゼ過剰症について概説する。

### 1 SHOX 異常症(レリーワイル症候群)

性染色体短腕擬常染色体領域に位置する遺伝子 SHOX は、骨細胞特異的に転写活性化作用を發揮する核内転写因子をコードしている<sup>1)</sup>。SHOX は X 不活化を受けず、男女ともに2コピーの活性型

で存在する。1コピーの SHOX の機能喪失(半量不全)は低身長、ターナー骨格徴候、レリーワイル症候群(LWD)の原因となる。LWD は四肢短縮と前腕マデルング変形を主徴とする先天性骨形成異常症であり、これまでに200例以上の患者が報告されている。

われわれはこれまでに、典型的なLWDを呈する日本人患者29家系50例の解析を行い、本症の分子遺伝学的異常を明らかとしている(図1)<sup>2)</sup>。とくに重要な知見として、下記の3点が挙げられる。

第1に、LWD患者における遺伝子異常の主体は遺伝子内点変異ではなく微小欠失である。これは、29家系のうちSHOX 遺伝子内点変異を有する家系が5家系のみであり、21家系は微小欠失を有していたことに基づく。なお、これらの欠失は2Mbp以下であり、通常の細胞遺伝学的検査では

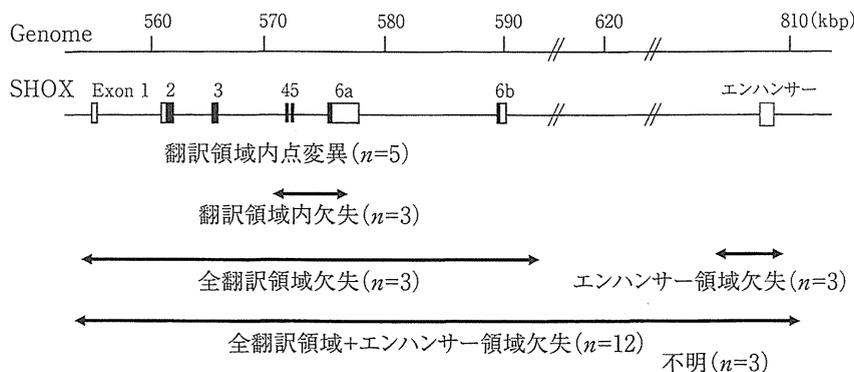


図1 日本人レリーワイル症候群患者29家系における遺伝子異常

Pediatric endocrine disorders and copy number abnormalities

Maki Fukami : 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部(〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1)

Tsutomu Ogata : 浜松医科大学 小児科(〒431-3192 静岡県浜松市半田山1-20-1)

0370-9531/12/¥500/論文/JCOPY

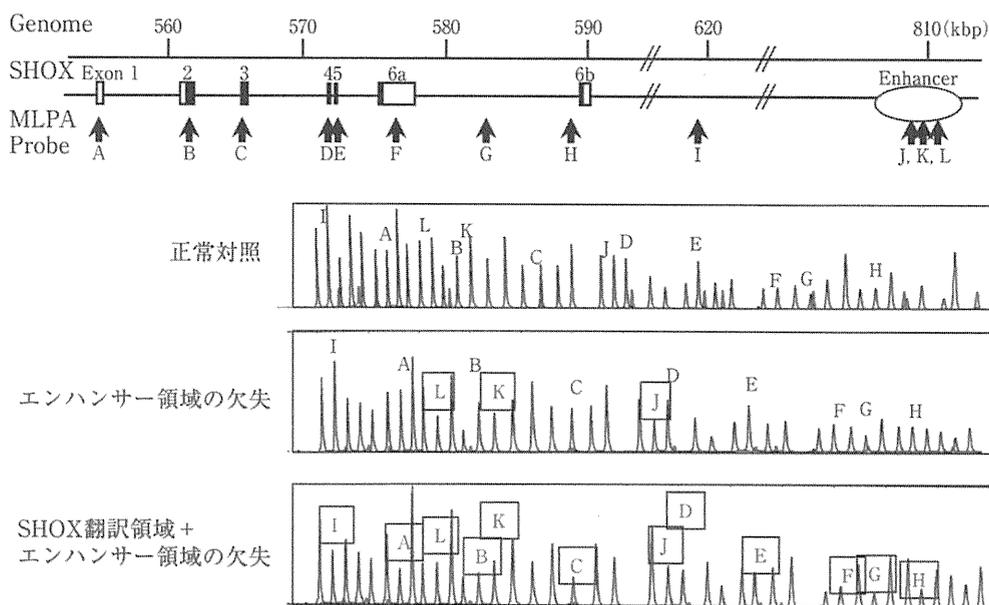


図 2 レリーワイル症候群患者における multiple ligation probe amplification (MLPA) 法による欠失の同定  
 四角で囲ったプローブのピークの減少が認められ、この領域を包含するヘテロ接合性欠失が示唆される。

同定不可能であった。大部分の症例の欠失は、*SHOX* 翻訳領域を包含するコスミドをプローブとした FISH 解析または *SHOX* 遺伝子上流の (CA)<sub>n</sub> 多型を利用したマイクロサテライト解析で同定された。一方、3 例において認められた遺伝子内微小欠失は、multiple ligation probe amplification (MLPA) 法によってはじめて同定可能であった(図 2)。さらに最近、より感度の高い方法としてアレイ comparative genomic hybridization (CGH) 法が用いられるようになった。MLPA 法とアレイ CGH 法は患者のゲノム DNA のみを用いて微小欠失の同定が可能であることから、*SHOX* 異常症のような欠失主体の疾患のスクリーニング法としてきわめて有用である。

第 2 に、LWD 患者における微小欠失のサイズと位置はさまざまである。切断点の塩基配列解析から、これらの欠失の発症には相同配列間での組換え異常 (non-allelic recombination), および、non-homologous end-joining (NHEJ) の両者が関与することが示唆されている(図 3)。これは、*SHOX* が存在する性染色体擬常染色体領域において高頻度に組換えが生じること、また、*SHOX* 周辺に *Alu* などの反復配列が多く存在することによって説明される。反復配列は直接的に組換え異常の原因となるのみならず、NHEJ の発症リス

クを高めると考えられる。

第 3 に、LWD 患者の遺伝子異常には *SHOX* 翻訳領域から離れた部位の微小欠失が含まれる。この欠失領域内には *SHOX* の骨特異的発現を支配するエンハンサーが存在し、このエンハンサーの機能喪失がほぼ完全な *SHOX* 発現消失を招くと予想される。現在、このエンハンサーの存在部位は *SHOX* 翻訳領域から 3' 側に約 250-300 kbp 離れた約 10 kbp の範囲に限局化されている。しかし、翻訳領域の下流に存在するエンハンサーが *SHOX* 発現を制御する機序は解明されていない。

なお、LWD 患者における微小欠失のパターンには人種差が存在する可能性がある。われわれが行った日本人患者の解析では、全翻訳領域とエンハンサー領域をともに包含する欠失が最も高頻度であった(図 1)。一方、スペインからはエンハンサー領域に限局した微小欠失の頻度が最も高いとの報告がなされている。今後、多数の患者の解析により、個々の人種における微細欠失のパターンが明らかとなると期待される。このような知見は人種特異的多型の解明につながる可能性がある。

## 2 アロマターゼ過剰症

アロマターゼ過剰症 (AEXS) はアロマターゼ遺

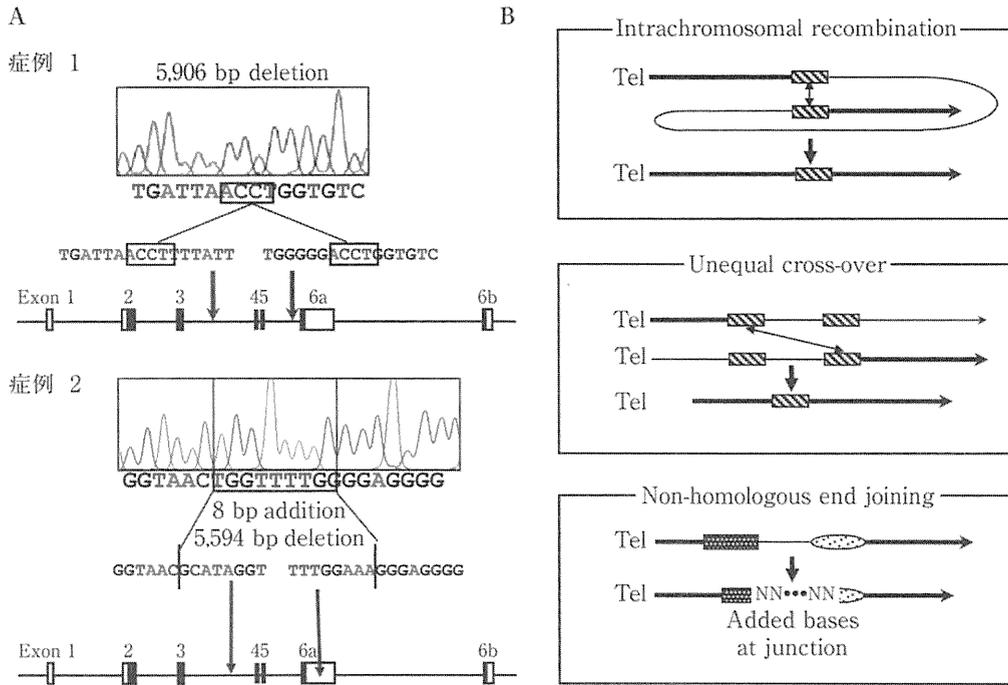


図 3 レリーワイル症候群患者 2 例における切断点の塩基配列解析

SHOX 欠失の発症には組換え異常および non-homologous end-joining の両者が関与することが示唆される。

伝子 (*CYP19A1*) の過剰発現に起因するまれな常染色体優性遺伝疾患である。アロマターゼは男性ホルモン(アンドロゲン)を女性ホルモン(エストロゲン)へと変換するミクロゾーム酵素である。AEXS を有する男性患者ではエストロゲン過剰産生を反映して、乳房腫大、骨年齢促進、性腺機能不全が認められる。女性患者の多くは無症状であるが、一部の症例では月経不順や思春期早発が生じる。2003 年、Shozu らおよび Demura らにより、AEXS 2 家系と 2 孤発例において、アロマターゼ遺伝子上流の染色体逆位が同定された<sup>3,4)</sup>。このような逆位陽性患者では、*CYP19A1* と近隣に位置する広範囲発現遺伝子の間でキメラ遺伝子が形成されることにより、アロマターゼ過剰発現が生じると推測される。

2011 年、われわれは 6 家系 18 例(家系 A-F)の AEXS 患者の解析を行い、本症の原因となる新たなコピー数異常を同定した<sup>5)</sup>。家系 A と B では、*CYP19A1* 翻訳領域から 10,983 bp 離れた領域に 79,156 bp の大きさのタンDEM重複が同定された(図 4A, B)。この領域は、*CYP19A1* の非翻訳エクソン 1(組織特異的プロモーター)11 個のうちの七つ(エクソン II a, I.8, I.4, I.5, I.7, I.f, I.2)を包含していた。この重複の fusion point は

反復配列外にあり、1 塩基の相同性を有していた。mRNA 解析では *CYP19A1* エクソン 1 のうちのひとつを有する正常なクローンのほかに、5' 側にエクソン I.4, 3' 側にエクソン I.8 が結合したクローンが得られた(図 4C)。このクローンはスプライスエラーによって生じた産物であると推測される。このようなキメラクローンの存在は、非生理的な位置に存在する遠位のプロモーターからも転写が生じていることを示すものである。したがって、家系 A と B では *CYP19A1* プロモーター数の増加によって転写効率が増加し、アロマターゼ遺伝子過剰発現が生じたことが示唆される。

家系 C では *CYP19A1* スタートコドンから 141,758 bp 離れた領域に 211,631 bp の欠失が同定された(図 5A, B)。この欠失は隣接遺伝子 *DMXL2* エクソン 2-43 と *GLDN* エクソン 5-10 を包含していた。この欠失の切断点は、一方は LINE 1 配列内、他方は反復配列外にあり、33 塩基の由来不明の塩基配列の挿入を伴っていた。mRNA 解析では *CYP19A1* エクソン 1 のうちのひとつを有する正常クローンのほか、*DMXL2* エクソン 1 と *CYP19A1* エクソン 2 を含む *DMXL2-CYP19A1* キメラクローンが得られた(図 5C)。

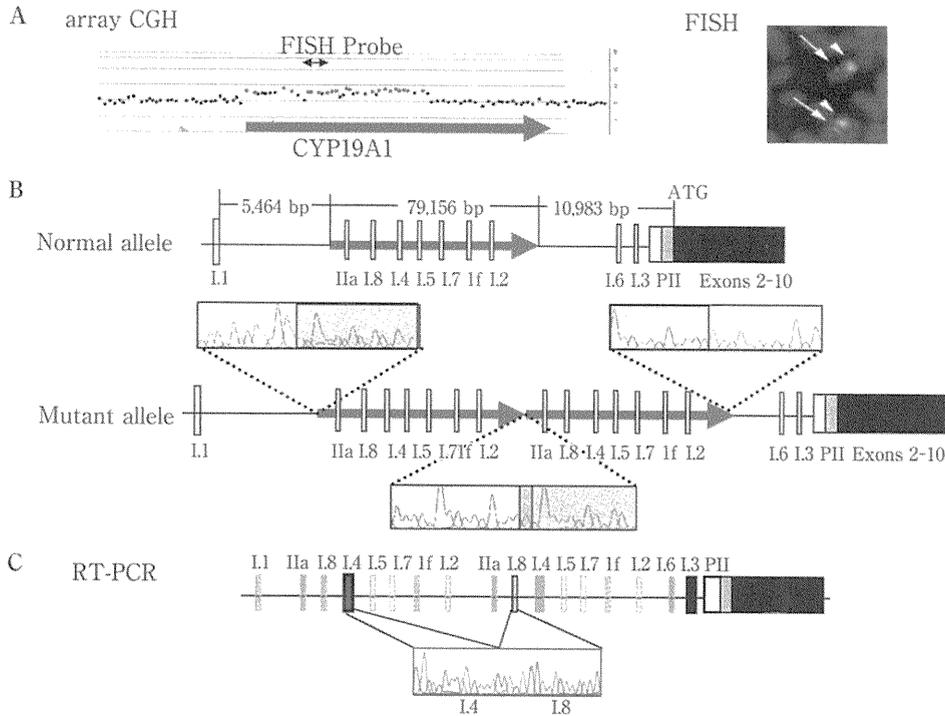


図 4 アロマトラーゼ過剰症家系 A と B における遺伝子異常

A: アレイ CGH 解析(左)と FISH 解析(右)。CYP19A1 のプロモーター領域のヘテロ接合性重複が同定された。B: ゲノム構造異常。CYP19A1 エクソン 1 のうち七つを包含するタンデム重複。Fusion point は反復配列外にあり, 1 塩基の相同性を有する。C: mRNA 解析。5'側にエクソン I.4, 3'側にエクソン I.8 が結合した mRNA クローンが同定された。このクローンの存在は遠位に増えたエクソン I.4 からも転写が生じていることを示唆する。

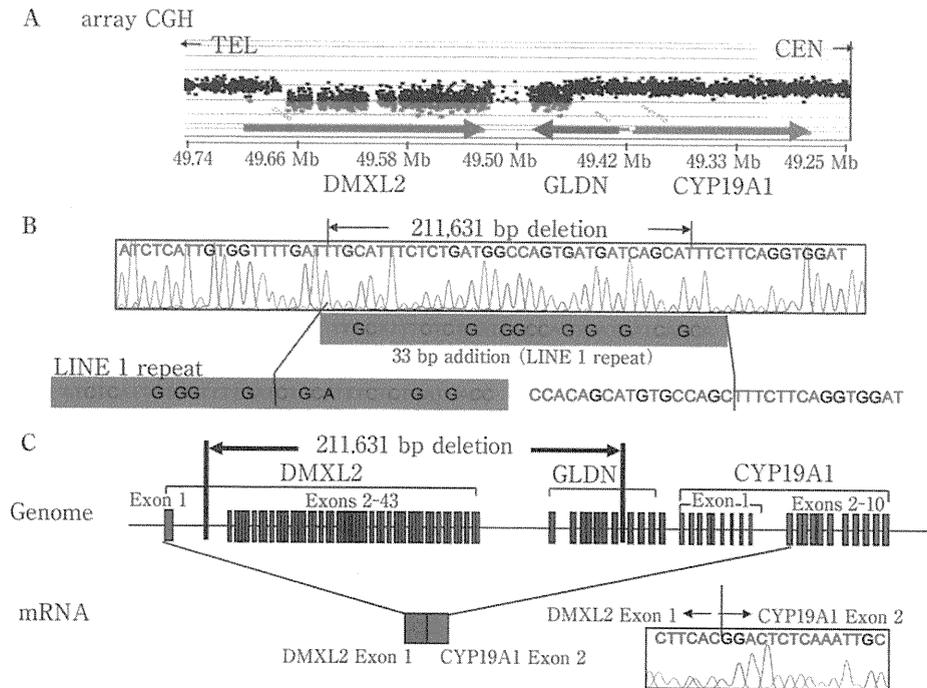


図 5 アロマトラーゼ過剰症家系 C における遺伝子異常

A: アレイ CGH 解析。CYP19A1 上流領域のヘテロ接合性欠失が同定された。B: ゲノム構造異常。DMXL2 エクソン 2-43 と GLDN エクソン 5-10 を包含する欠失が同定された。切断点は一方は LINE 1 配列内, 他方は反復配列外にあり, 33 塩基の由来不明の塩基配列の挿入を伴う。C: mRNA 解析。DMXL2-CYP19A1 キメラ mRNA クローンが同定された。

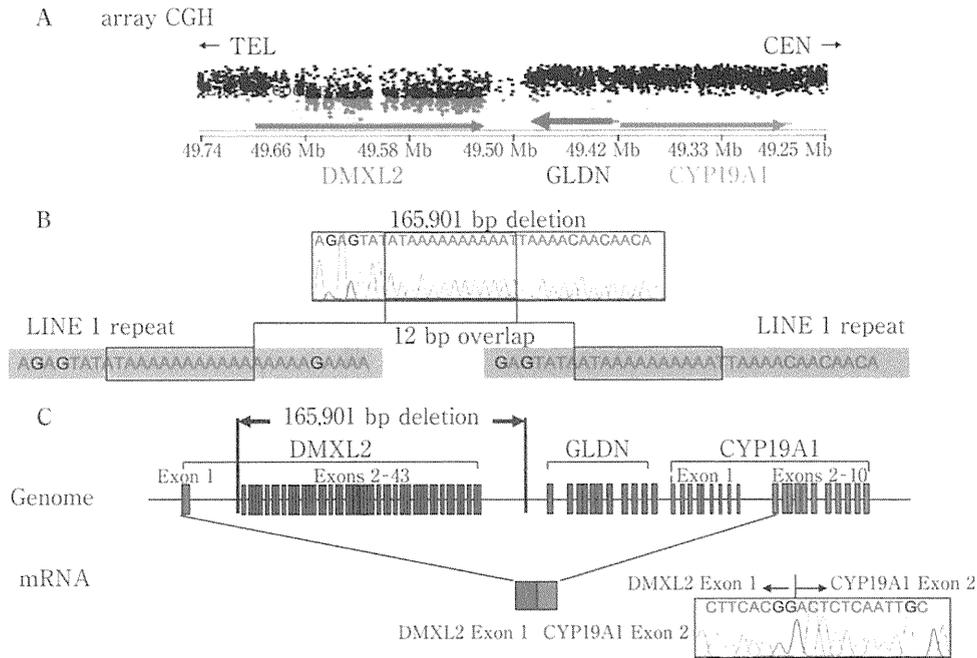


図6 アロマターゼ過剰症家系 D-F における遺伝子異常

A: アレイ CGH 解析。*CYP19A1* 上流領域のヘテロ接合性欠失が同定された。B: ゲノム構造異常。*DMXL2* エクソン 2-43 を包含する欠失が同定された。切断点はともに LINE 1 配列内にあり、12 塩基の重複を伴う。C: mRNA 解析。*DMXL2-CYP19A1* キメラ mRNA が同定された。

このクローンの存在は、欠失によって *DMXL2* エクソン 1 と *CYP19A1* エクソン 2 の間でスプライスが生じ、その結果、*CYP19A1* 翻訳領域が *DMXL2* プロモーターによる制御を受けるようになったことを示唆する。

家系 D-F では *CYP19A1* スタートコドンから 174,315 bp 離れた領域に 165,901 bp の欠失が同定された(図 6A, B)。この欠失は *DMXL2* エクソン 2-43 を包含していた。この欠失の二つの切断点はともに LINE 1 配列内にあり、12 塩基の重複を伴っていた。これらの家系では家系 C と同様の機序で *DMXL2-CYP19A1* キメラ遺伝子が形成され、アロマターゼ遺伝子過剰発現が生じたと推測される(図 6C)。

患者の遺伝子型-表現型解析から、遺伝子変異パターンと臨床症状の重症度の間にはある程度の相関があることが明らかとなった。すなわち、重複陽性患者では比較的軽度の、欠失陽性患者では中等度の症状が認められた。また、過去に報告された逆位陽性患者では重度の乳房腫大や骨年齢促進が生じることが見出されている。このことは、本症の重症度が *CYP19A1* に結合したプロモーターの機能と構造を反映することを示唆する。生

理的 *CYP19A1* プロモーターの重複は通常の *CYP19A1* 発現部位に局限した過剰発現を招くため、比較的少量のアロマターゼ蛋白過剰産生を招くと推測される。一方、欠失例と逆位例のキメラ遺伝子では、広範囲発現遺伝子のプロモーターによる多臓器・組織での *CYP19A1* 遺伝子発現増加が生じ、比較的多量のアロマターゼ蛋白が産生されると予想される。さらに、*CYP19A1* エクソン 2 と *DMXL2* エクソン 1 の両者に翻訳開始コドンを有する *DMXL2-CYP19A1* キメラ遺伝子は、アロマターゼ蛋白のほかにも *DMXL2* 翻訳開始コドンから読み取られる無機能蛋白をコードするが、エクソン 1 に翻訳開始コドンを持たない逆位例のキメラ遺伝子ではアロマターゼ蛋白のみが産生される。このため、アロマターゼ蛋白産生量は *DMXL2-CYP19A1* キメラ遺伝子より逆位例のキメラ遺伝子においてはるかに多いと考えられる。このようなプロモーター構造の違い(融合プロモーターを有するエクソン上の翻訳開始点の有無)が、欠失陽性患者と逆位陽性患者の重症度の差に寄与している可能性がある。さらに、増加したエストロゲンによる負のフィードバックは生理的 *CYP19A1* プロモーターの重複では認められ

るが、欠失や逆位による非生理的プロモーターでは存在しない、あるいは乏しいと推測され、これも臨床像の違いに寄与していると思われる。

以上の成績は、生理的プロモーターの重複および遺伝子上流の微小欠失が遺伝子過剰発現を招き、ヒトの遺伝病の原因となることを世界で初めて示すものである。なお、切断点の塩基配列解析から、家系 A と B の重複は fork stalling and template switching (FoSTeS) によって説明可能であり、家系 C と家系 D-F の欠失はそれぞれ non-homologous end joining と non-allelic recombination に一致することが見出された。このことは、本症の発症に DNA 複製エラーと組換え異常に起因する多様な染色体微細構造異常が関与することを示唆する。このような多様な構造異常が *CYP19A1* 周辺領域に認められることから、この染色体領域にはゲノム微細構造異常を生じやすいなんらかの特異的モチーフが存在すると推測さ

れる。

## 結 語

近年、小児内分泌疾患の発症にさまざまなコピー数異常が関与することが明確となった。このようなゲノム微細構造異常は小児内分泌疾患以外の疾患の発症にも関与する可能性がある。

## ●文 献

- 1) 緒方勤：ターナー症候群の遺伝学，メディカルレビュー社，東京，2003
- 2) Fukami M, Dateki S, Kato F et al : *J Hum Genet* 53(5) : 454-459, 2008
- 3) Shozu M, Sebastian S, Takayama K et al : *N Engl J Med* 348 : 1855-1865, 2003
- 4) Demurá M, Martin RM, Shozu M et al : *Hum Mol Genet* 16 : 2529-2541, 2007
- 5) Fukami M, Shozu M, Soneda S et al : *J Clin Endocrinol Metab* 96(6) : E1035-1043, 2011

