

- Takeuchi T, Kohno N, Takei H, Yanagita Y, Noguchi S. Monthly versus 3-monthly goserelin acetate treatment in pre-menopausal patients with estrogen receptor-positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 443-451.
20. Naoi Y, Kishi K, Tanei T, Tsunashima R, Tominaga N, Baba Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128: 633-641.
21. Naoi Y, Kishi K, Tanei T, Tsunashima R, Tominaga N, Baba Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. High genomic grade index associated with poor prognosis for lymph node-negative and estrogen receptor-positive breast cancers and with good response to chemotherapy. *Cancer* 2011; 117: 472-479.
22. 碓井宏和、中島名津子、木原真紀、加来博志、生水真紀夫. 特集 婦人科がん妊孕性・卵巣機能温存治療と妊娠・分娩「胎状奇胎後の妊娠」. *産婦人科の実際* 2011.2.1 ; 60 (2) : 217-221
2. 学会発表・講演会
1. 深見真紀、生水真紀夫、花木啓一、佐野友昭、西垣敏紀、稲垣朱実、高木博史、堀川玲子、神埼晋、大山建司、緒方勤. エストロゲンによる間脳下垂体性腺系抑制機構の解明 アロマターゼ過剰症男性患者 18 例の分子遺伝学のおよび臨床的解析. 第 84 回日本内分泌学会学術総会. 2011.4.21-22 (神戸)
2. 生水真紀夫. アロマターゼ活性とその調節. 日本アンドロロジー学会第 30 回学術大会/第 17 回精子形成・精巣毒性研究会. 2011.7.22-23 (東京)
3. 生水真紀夫. 胎盤のアロマターゼが性差発現に果たす役割についての個体発生・系統発生学的研究. 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第 3 回領域会議. 2011.8.31-9.2 (佐賀)
4. 生水真紀夫. Aromatase inhibitors による排卵誘発の展望. 第 29 回日本受精着床学会総会・学術講演会. 2011.9.10 (東京)
5. 生水真紀夫. 女性の生涯とアロマターゼ遺伝子. 第 11 回日本内分泌学会北海道地方会「女性医師専門医育成・再教育プロジェクト"JES We Can"企画セミナー. 2011.10.1 (北海道)
6. 生水真紀夫. エストロゲンに纏わる新しい知見ーアロマターゼがエストロゲンを合成するわけー. 第 5 回阪神婦人科・内分泌研究会. 2011.11.5 (神戸)
7. 生水真紀夫. ゲノム進化の謎に挑む: なぜ胎盤にアロマターゼが発現したか?. 日本人類遺伝学会第 56 回大会・第 11 回東アジア人類遺伝学会. 2011.11.11 (千葉)
8. H.Usui, M.Kihara, H.Kaku, Q.Jia, H.Matsui, M.Shozu. Management and Outcome of Women with Gestational Trophoblastic Neoplasia without a Clinically Detectable Tumor. XVIth World Congress on Gestational Trophoblastic Diseases. 2011.10.16-19 (Budapest)
9. 深見真紀. PORD Update. スプリングセミナー2011. 2011.5.27-29 (大阪)
10. 深見真紀. 先天性内分泌異常症を招くゲノム微細構造異常: CGH 解析による新たな疾患成立機序の解明. アジレントゲノミクスフォーラム. 2011.6.14 (東京)
11. 深見真紀. 小児内分泌疾患診療に役立つ分子遺伝学の知識. 第 45 回小児内分泌学会学術集会教育セミナー. 2011.10.6 (大宮)
12. 深見真紀. 小児内分泌疾患の分子遺伝学: 最近の進歩と今後の展望. 静岡県小児内分泌学術講演会. 2011.12.1 (浜松)
13. 深見真紀. チトクローム P 450 オキシドレダクターゼ (POR) 異常症の分子基盤: POR 遺伝子発現制御機構の解明. 第 16 回生殖内分泌学会学術集会シンポジウム. 2011.11.19 (東京)
14. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome Caused by Cryptic Duplications and Deletions Leading to Gain-of-Function of CYP19A1. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011 (Boston)
15. Soneda S, Fukami M, Ogata T. Identification of the Promoter Region for Cytochrome P450 Oxidoreductase Gene. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011 (Boston)
16. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants. 50th annual ESPE meeting, 25-28 September, 2011 (Glasgow)

17. Ogata T, Soneda S, Fukami M.
Identification and characterization of the
promoter region for cytochrome P450
oxidoreductase gene. 50th annual ESPE
meeting, 25-28 September, 2011 (Glasgow)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

分担研究報告書

遺伝性女性化乳房の分子遺伝学的診断法の開発と評価

研究分担者 国立成育医療研究センター研究所 部長 深見真紀

研究要旨

平成 23 年度には下記の成果を挙げた。

(1) 患者のアレイ CGH 解析に基づき、遺伝性女性化乳房の発症に NAHR、NHEJ、FoSTes によって生じる CYP19A1 遺伝子周辺の多様なゲノム微細構造異常が関与することを明確とした。

(2) 本症の乳房腫大と骨年齢促進の重症度はゲノム異常の種類に相関するが、ゴナドトロピン分泌障害の程度は全患者で同等であることを明らかとし、比較的軽度の循環血中エストロゲン増加が下垂体における FSH を強く抑制することを見出した。

(3) 本症の治療にアロマターゼ阻害剤が有用であることを見出した。
以上の成果は、遺伝性女性化乳房患者の早期診断とよりよい治療法の選択に役立つと期待される。

共同研究者

なし

他の厚生労働省研究班との連携

本研究は、厚生労働省 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化事業（小児科・産科領域の大規模遺伝子配列解析による病因解明とゲノム解析拠点整備）と連携して研究を推進した。

A. 研究目的

遺伝性女性化乳房は、重度の乳房腫大、性腺機能障害などにより QOL 低下を招く難治疾患である。本研究の目的は、遺伝性女性化乳房患者の分子遺伝学的解析により、本症の発症機序を解明することである。さらに、本症の疾患重症化因子を同定し、疾患予後予測法やよりよい治療法の開発に貢献することを目指す。

これまでにわれわれは、独自に開発したカスタムアレイ Comparative genomic hybridization (CGH) を用いて 6 家系 18 例の解析を行い、本症の発症に由来知られている染色体逆位だけでなくアロマターゼ遺伝子(CYP19A1)プロモーター領域の微小重複

および CYP19A1 上流の微小欠失が関与することを明確とした。

平成 23 年度は、初年度の疫学調査で把握された新規患者の遺伝子解析を行った。また、これまでに同定されたゲノム異常陽性患者の遺伝子型—表現型解析を行い、変異パターンと疾患重症度の関連について検討した。

B. 研究方法

1. 新規患者の遺伝子解析

本研究班でこれまでに確立した 15q11.2–q26.3 領域に対応するカスタムアレイ CGH システムを用いて、新規患者のゲノムコピー数解析を行った。コピー数異常が同定された患者では、可能な限り切断点の塩基配列決定を行ってゲノム構造異常の発症機序について検討した。得られた塩基配列は NCBI BLAST Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で解析した。

2. 遺伝子型—表現型解析

本研究班で同定した患者、および、既報告の染色体逆位に起因する遺伝性女性化乳房患者 4 家系の疾患重症度の比較を行った。臨床症状としては、乳

乳房腫大の程度と発症時期、性腺機能不全の程度、内分泌学的検査データ、アロマターゼ阻害剤の効果について検討した。

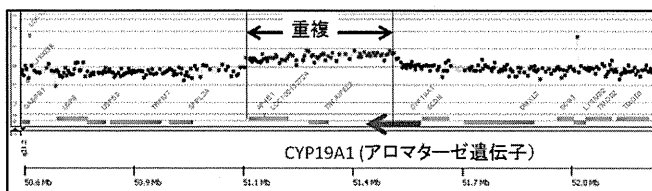
(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守して施行した。本課題は、国立成育医療研究センターおよび千葉大学の倫理委員会において承認されている。臨床検体は、患者本人または両親から書面でのインフォームドコンセントを得たのちに採取した。検体は、各医療機関で個人識別情報をなくして匿名化された後に当研究機関に送付された。

C. 研究結果

1. 新規患者の遺伝子解析

4例において、CYP19A1周辺のゲノム構造異常を同定した。1例はCYP19A1プロモーターを包含する微小重複、1例は隣接遺伝子DMXL2エクソンの一部を包含する微小欠失であった。これらは、われわれがこれまでに同定した家系と同様の異常であると推測される。一方、他の2例では、それぞれCYP19A1周辺の逆位と重複を伴う複雑構造異常とCYP19A1翻訳領域を包含する重複が同定された(図1)。



切断点周辺の塩基配列決定では、遺伝性女性化乳房を招くゲノム微細異常が、反復配列依存性および非依存性の両者の機序によって生じることが明確となった。すなわち、DMXL2の一部を包含する微小欠失は反復配列間の非相同組換え(Non-allelic homologous recombination (NAHR))もしくはDNA切断に起因するNon-homologous end-joining (NHEJ)によって生じ、プロモーターの重複と複雑構造常は、DNA複製時のエラーに起因するmicrohomologyを介したfork stalling and template switching (FoSTes)

によって生じる可能性が高いことが見出された。

2. 遺伝子型—表現型解析

16名の患者の解析から、ゲノム異常と疾患重症度の関連が明確となった(添付資料1)。(1)患者の乳房腫大と骨年齢促進の程度には、明瞭な症例間差異が存在する。(2)重複陽性患者では、乳房腫大が比較的軽度であり、発症時期が遅い。また、最終身長は正常範囲内である。(3)逆位陽性患者は、思春期前に発症する重度の乳房腫大と著明な骨年齢の促進、最終身長の低下によって特徴づけられる。(4)欠失陽性患者では、中等度の臨床症状が認められる。(5)全例において、FSH優位のゴナドトロピン分泌不全とそれに伴う比較的軽度な性腺機能不全が認められる。ゴナドトロピン分泌障害の程度は、ゲノム異常のパターンに無関係である。(6)男性患者では、妊孕性は保持される。(7)アロマターゼ阻害剤(Anastrozole)は、本症の治療に有用である。重複および欠失陽性例では1mg/日、逆位陽性例では2-4mg/日のAnastrozoleの投与によって明確な臨床症状と内分泌所見の改善が確認された。

D. 考察

1. 新規患者の遺伝子解析

遺伝性女性化乳房の発症には、CYP19A1遺伝子周辺の多様な染色体微細構造異常が関与することが明確となった。本症患者におけるCYP19A1過剰発現の原因として、遺伝子翻訳領域の重複、プロモーター数の増加、広範囲発現遺伝子とのキメラ遺伝子の形成の3つが存在することが見出された。なお、このようなゲノム構造異常の発症には、NAHR、NHEJ、FoSTesなどさまざまな要因が関与すると推測される。このことから、15番染色体長腕には、ゲノム脆弱性を惹起する何らかの配列モチーフが存在する可能性が示唆される。

これまで遺伝子過剰発現に起因する先天性疾患のなかで、その発症機序が解明されているものは少数にとどまる。本症の分子遺伝学的基盤の解明は、ヒトのゲノム病の成立機序の理解に貢献すると期待される。

2. 遺伝子型—表現型解析

本症の乳房腫大と骨年齢促進の重症度は、ゲノム異常の種類に相関することが明確となった。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。すなわち、生理的CYP19A1プロモーターの重複は、通常のCYP19A1発現部位に限局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形成には広範囲発現遺伝子のプロモーターが関与するため、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、DMXL2エクソン1には翻訳開始コドンが存在するため、DMXL2-CYP19A1キメラ遺伝子は、アロマターゼ蛋白のほかにDMXL2翻訳開始コドンから読みと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。このようなプロモーター構造の違いが、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。事実、5'-RACE産物のなかでキメラmRNAの占める割合は、欠失例では数%であるのに対し、既報の逆位例では80-90%であった。

一方、ゴナドトロピン分泌障害の程度がゲノム異常のパターンに無関係であったことから、比較的軽度の循環血中エストロゲン増加が、強いFSH抑制作用を発揮することが示唆される。これまでエストロゲンが視床下部-下垂体-性腺系に対し抑制的に働くことが知られていたが、その作用点は不明であった。今回の成績は、エストロゲンフィードバックの主な作用点が、下垂体におけるFSHの分泌抑制であることを明確とするものである。また、本研究では、アロマターゼ阻害剤の有効性が確認された。早期診断とアロマターゼ阻害剤による治療は、本症の予後の改善に役立つと期待される。

E. 結論

遺伝性女性化乳房の発症に、NAHR、NHEJ、FoSTesに起因するCYP19A1遺伝子周辺の染色体微細構造異常が関与することが明確となった。また、

本症の臨床症状の一部はゲノム異常の種類に相関するが、ゴナドトロピン分泌障害の程度は全患者で同等であることから、比較的軽度の循環血中エストロゲン増加が下垂体におけるFSHを強く抑制することが見出された。アレイCGHを用いた早期診断とアロマターゼ阻害剤による治療は、本症の予後の改善に役立つと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukami M, Shozu M, Ogata T. Molecular Bases and Phenotypic Determinants of Aromatase Excess Syndrome. *Int J Endocrinol.* 584807.2012
2. 深見真紀、緒方勤. 小児内分泌疾患とゲノムコピー数異常 生体の科学 62 (6) 546-551 2011.
3. 深見真紀、曾根田瞬、加藤芙弥子、花木啓一、神崎晋、大山建司、佐野友昭、西垣敏紀、稲垣朱実、高木博史、Gerhard binder、横谷進、堀川玲子、生水真紀夫、緒方勤. 遺伝性女性化乳房症 6 家系における疾患成立機序と臨床像の解明. *臨床内分泌 Update proceedings.*2011 June; 87(Supplement): 94-97

2. 講演・シンポジウム

1. 深見真紀. PORD Update. スプリングセミナー2011. 2011年5月27-29日、大阪
2. 深見真紀. 先天性内分泌異常症を招くゲノム微細構造異常: CGH解析による新たな疾患成立機序の解明. アジレントゲノミクスフォーラム2011年6月14日、東京
3. 深見真紀. 小児内分泌疾患診療に役立つ分子遺伝学の知識 第45回 小児内分泌学会学術集会教育セミナー 2011年10月6日、大宮
4. 深見真紀. 小児内分泌疾患の分子遺伝学: 最近の進歩と今後の展望 静岡県小児内分泌学術講演会 2011年12月1日、浜松
5. 深見真紀. チトクロームP450オキシドレダクターゼ(POR)異常症の分子基盤: POR遺伝子発現制御機構の解明 第16回生殖内分泌学会学術集会シンポジウム 2011年11月19日、東京
6. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome Caused by Cryptic Duplications and Deletions Leading to

Gain-of-Function of CYP19A1. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011, Boston

7. Soneda S, Fukami M, Ogata T. Identification of the Promoter Region for Cytochrome P450 Oxidoreductase Gene. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011, Boston
8. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants. 50th annual ESPE meeting, 25-28 September, 2011, Glasgow
9. Ogata T, Soneda S, Fukami M. Identification and characterization of the promoter region for cytochrome P450 oxidoreductase gene. 50th annual ESPE meeting, 25-28 September, 2011, Glasgow

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

遺伝子異常	微小重複	微小欠失	染色体逆位
症例数	2家系4例	4家系14例	4家系5例
獲得プロモーター ^a	<i>CYP19A1</i>	<i>DMXL2</i>	<i>MAPK6, CGNLI, TLN2, TMOD3</i>
臨床症状			
乳房腫大発症年齢 (歳)	10-13	7-11	5-8
乳房腫大重症度 (Tanner stage)	2-3	3-4	4-5
成人期身長	正常	正常	低身長
内分泌所見			
LH (基礎値)	正常	正常/低値	正常/低値
LH (GnRH負荷後 ^b)	正常/低値	さまざま	低値
FSH (基礎値)	低値	低値	低値
FSH (GnRH負荷後 ^b)	低値	低値	低値
T (基礎値)	正常/低値	正常/低値	正常/低値
T (hCG負荷後 ^c)	不明	正常	正常
E ₁ (基礎値)	高値	高値	高値
E ₂ (基礎値)	正常/高値	正常/高値	高値
E ₂ /T 比	高値	高値	高値
文献	(3)	(3)	(1), (2)
T: testosterone; E ₁ : estrone; E ₂ : estradiol; GnRH: gonadotropin releasing hormone; hCG: human chorionic gonadotropin			
^a <i>CYP19A1</i> に結合しているプロモーターが本来制御している遺伝子			
^b GnRH 100 µg/m ² (最大 100 µg) bolus i.v.; 血液採取 0, 30, 60, 90, 120分後			
^c hCG 3000 IU/m ² (最大5000 IU) i.m. 3日連続投与; 血液採取1日目と4日目			

文献

- (1) Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, Bryant M, Bulun SE. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med.*, 348: 1855–65, 2003
- (2) Demura M, Martin RM, Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, Bryant M, Mendonca BB, Hanaki K, Kanzaki S, Rhoads DB, Misra M, Bulun SE. Regional rearrangements in chromosome 15q21 cause formation of cryptic promoters for the CYP19 (aromatase) gene. *Hum Mol Genet.*, 16: 2529–41, 2007
- (3) Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome: Identification of Cryptic Duplications and Deletions Leading to Gain-of-Function of CYP19A1 and Assessment of Phenotypic Determinants. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(6):E1035–1043, 2011

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukami M, Shozu M, Ogata T	Molecular Bases and Phenotypic Determinants of Aromatase Excess Syndrome.	Int J Endocrinol.		584807	2012
深見真紀、緒方勤	小児内分泌疾患とゲノムコピー数異常	生体の科学	62 (6)	546-551	2011
深見真紀、曾根田瞬、加藤美弥子、花木啓一、神埼晋、大山建司、佐野友昭、西垣敏紀、稲垣朱実、高木博史、Gerhard Binder、横谷進、堀川玲子、生水真紀夫、緒方勤	遺伝性女性化乳房症6家系における疾患成立機序と臨床像の解明.	臨床内分泌 Update proceedings	87 (Supplement)	94-97	2011
Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T.	Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain of function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants.	J Clin Endocrinol Metab	96	E1035-1043	2011

Review Article

Molecular Bases and Phenotypic Determinants of Aromatase Excess Syndrome

Maki Fukami,¹ Makio Shozu,² and Tsutomu Ogata^{1,3}

¹Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Ohkura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan

²Department of Reproductive Medicine, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba City 206-8670, Japan

³Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Shizuoka, Hamamatsu 431-3192, Japan

Correspondence should be addressed to Maki Fukami, mfukami@nch.go.jp

Received 9 July 2011; Revised 22 September 2011; Accepted 2 October 2011

Academic Editor: Rodolfo Rey

Copyright © 2012 Maki Fukami et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aromatase excess syndrome (AEXS) is a rare autosomal dominant disorder characterized by gynecomastia. This condition is caused by overexpression of *CYP19A1* encoding aromatase, and three types of cryptic genomic rearrangement around *CYP19A1*, that is, duplications, deletions, and inversions, have been identified in AEXS. Duplications appear to have caused *CYP19A1* overexpression because of an increased number of physiological promoters, whereas deletions and inversions would have induced wide *CYP19A1* expression due to the formation of chimeric genes consisting of a noncoding exon(s) of a neighboring gene and *CYP19A1* coding exons. Genotype-phenotype analysis implies that phenotypic severity of AEXS is primarily determined by the expression pattern of *CYP19A1* and the chimeric genes and by the structural property of the fused exons with a promoter function (i.e., the presence or the absence of a natural translation start codon). These results provide novel information about molecular mechanisms of human genetic disorders and biological function of estrogens.

1. Introduction

Aromatase encoded by *CYP19A1* is a cytochrome P450 enzyme that plays a key role in estrogen biosynthesis [1]. It catalyzes the conversion of Δ^4 -androstendione into estrone (E_1) and that of testosterone (T) into estradiol (E_2) in the placenta and ovary as well as in other tissues such as the fat, skin, bone, and brain [1].

Overexpression of *CYP19A1* causes a rare autosomal dominant disorder referred to as aromatase excess syndrome (AEXS, OMIM no. 139300) [2–8]. AEXS is characterized by pre- or peripubertal onset gynecomastia, gonadal dysfunction, advanced bone age from childhood to pubertal period, and short adult height in affected males [2–8]. In particular, gynecomastia is a salient feature in AEXS, and, therefore, this condition is also known as hereditary gynecomastia or familial gynecomastia [5]. Affected females may also show several clinical features such as macromastia, precocious puberty, irregular menses, and short adult height [5, 6, 8].

Recently, three types of cryptic genomic rearrangements around *CYP19A1* have been identified in 23 male patients with AEXS [2–4]. The results provide useful implications not only for the clarification of underlying mechanisms but also for the identification of phenotypic determinants. Here, we review the current knowledge about AEXS.

2. The Aromatase Gene (*CYP19A1*)

CYP19A1 encoding aromatase is located on 15q21.2 adjacent to *DMXL2* and *GLDN* (Figure 1) [3, 9]. It spans ~123 kb and consists of at least 11 noncoding exons 1 and nine coding exons 2–10 [9–12]. Each exon 1 is accompanied by a tissue-specific promoter and is spliced alternatively onto a common splice acceptor site at exon 2, although some transcripts are known to contain two of the exons 1 probably due to a splice error [9–11]. Transcription of *CYP19A1* appears to be tightly regulated by alternative usage of the multiple

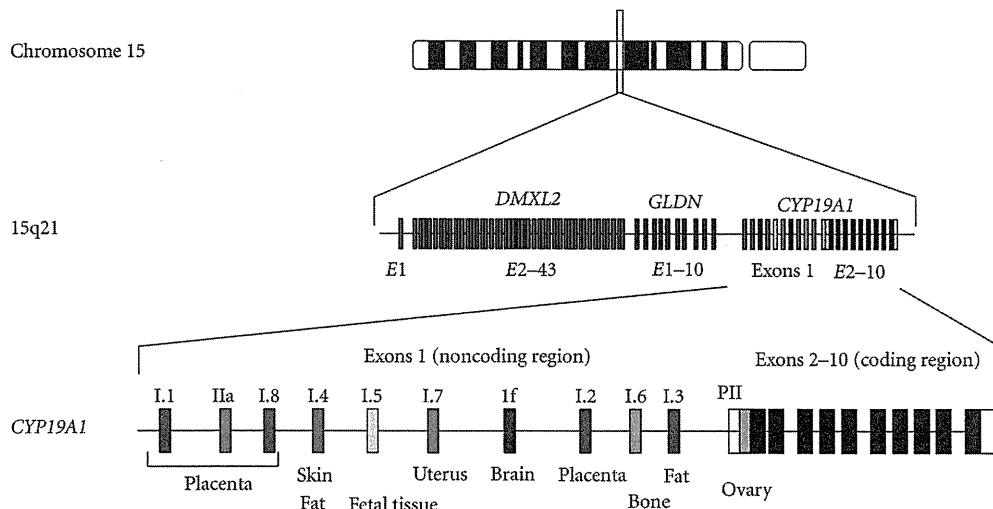


FIGURE 1: Simplified schematic representation indicating the genomic structure of *CYP19A1*. *CYP19A1* is located on 15q21.2 adjacent to *DMXL2* and *GLDN* and consists of at least 11 noncoding exons 1 and nine coding exons 2–10 [9, 10]. Each exon 1 is accompanied by a tissue-specific promoter and is spliced alternatively onto a common splice acceptor site at exon 2 [9–13].

promoters [9–13]. Actually, *CYP19A1* is strongly expressed in the placenta and moderately expressed in the ovary, whereas it is only weakly expressed in a rather limited number of tissues including skin, fat, and hypothalamus [4, 13]. Of the 11 noncoding exons 1, exon I.4 seems to play a critical role in the regulation of estrogen biosynthesis in males, because this exon contains the major promoter for extragonadal tissues [9, 10].

3. Molecular Bases of AEXS

A family with dominantly transmitted gynecomastia of prepubertal onset was first described in 1962 by Wallach and Garcia [14]. After this initial report, several cases have been described [5–8, 15]. Laboratory examinations of the affected males revealed markedly elevated serum estrogen values and estrogen/androgen ratios and significantly increased aromatase activity in fibroblasts and lymphocytes [5–8, 15]. Linkage analyses in two families indicated a close association between *CYP19A1*-flanking polymorphic markers and the disease phenotype [5, 6]. Thus, the condition was assumed to be caused by gain-of-function mutations of *CYP19A1*, and, therefore, the name of AEXS was coined for this condition [7, 8]. However, since direct sequencing and Southern blotting analysis failed to detect mutations or copy number abnormalities in the coding region of *CYP19A1* [5, 6], the molecular basis of this entity remained elusive until recently.

In 2003, Shozu et al. reported a father-son pair and a sporadic case with AEXS in whom they identified heterozygous chromosomal inversions of the chromosome 15 [2]. Subsequently, Demura et al. performed detailed molecular studies for these cases and additional two cases and characterized four types of inversions affecting the 5' region of *CYP19A1* [3]. Each inversion has resulted in the formation of a chimeric gene consisting of *CYP19A1* coding exons

and exon 1 of the widely expressed neighboring genes, that is, *CGNL1*, *TMOD3*, *MAPK6*, and *TLN2*. These data imply that overexpression of *CYP19A1* in the inversion-positive cases are caused by cryptic usage of constitutively active promoters. Consistent with this, *in silico* analysis revealed the presence of promoter-compatible sequences around exon 1 of *CGNL1*, *TMOD3*, and *MAPK6* in multiple cell types, although such sequences remain to be identified for noncoding exons of *TLN2* [4].

We recently studied 18 males from six families with AEXS (families A–F) and identified three types of heterozygous cryptic genomic rearrangements in the upstream region of the *CYP19A1* coding exons (Figure 2) [4]. In families A and B, we identified the same 79,156 bp tandem duplication encompassing seven of the 11 noncoding exons 1 of *CYP19A1*. Notably, this duplication includes exon I.4 that functions as a major promoter for extragonadal tissues such as fat and skin; therefore, *CYP19A1* overexpression in these families would be explained by increasing the number of this promoter. Indeed, RT-PCR analysis detected a splice variant consisting of exon I.4 at the 5' side and exon I.8 at the 3' side in lymphoblastoid cell lines and skin fibroblasts of the patients, indicating that the duplicated exon I.4 at the distal nonphysiological position actually functions as transcription start sites. In family C, we identified a 211,631 bp deletion affecting exons 2–43 of *DMXL2* and exons 5–10 of *GLDN*. This deletion appears to have caused *CYP19A1* overexpression because of cryptic usage of *DMXL2* exon 1 as an extra transcription start site for *CYP19A1*. Indeed, RT-PCR revealed the presence of chimeric mRNA clones consisting of *DMXL2* exon 1 and *CYP19A1* exon 2, supporting the notion that aberrant splicing has occurred between these two exons. Such *DMXL2/CYP19A1* chimeric mRNA accounted for 2–5% of *CYP19A1*-containing transcripts from skin fibroblasts. In families D–F, we identified

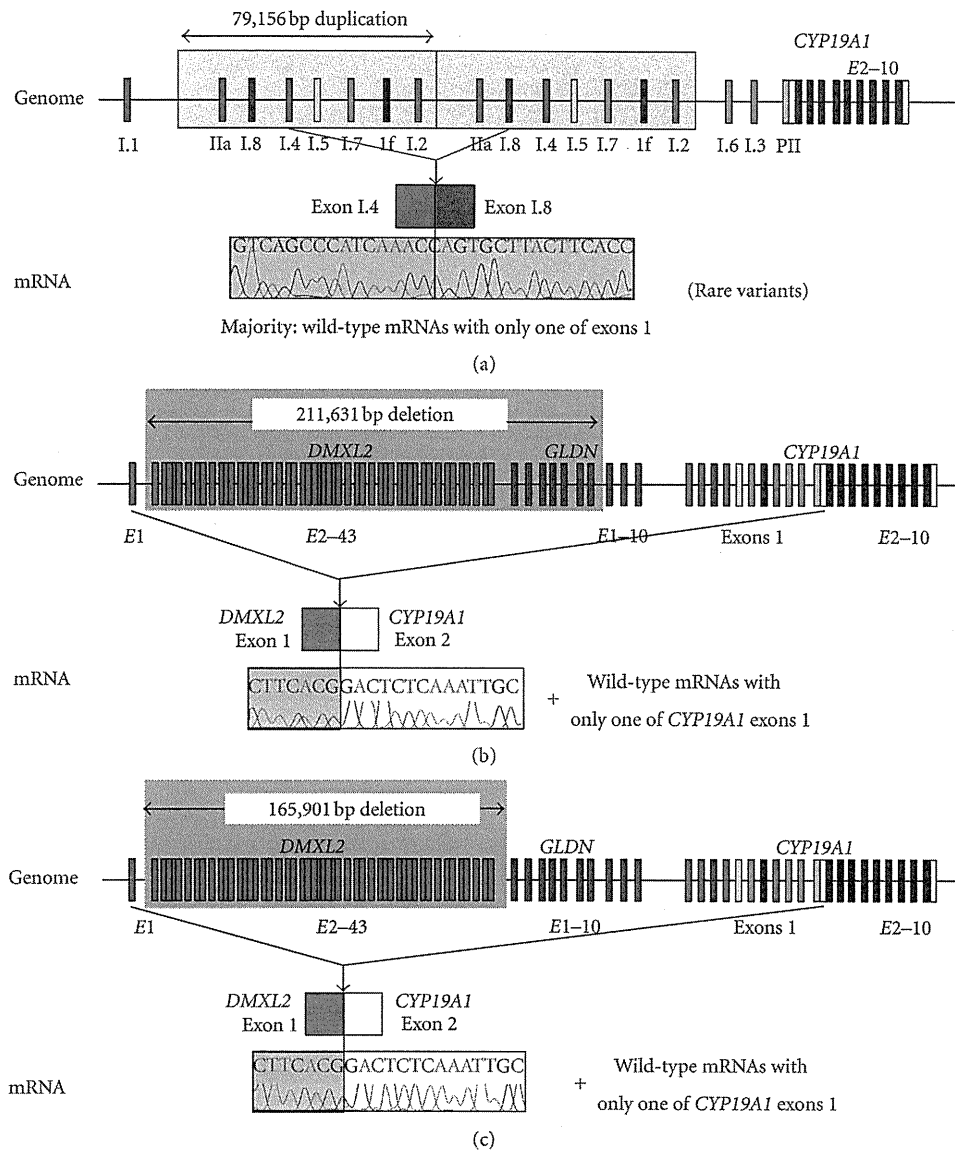


FIGURE 2: Schematic representation of duplications and deletions identified in patients with AEXS. (a) the tandem duplication of families A and B [4]. Genome: the duplication (yellow boxes) includes seven of the 11 noncoding exons 1 of *CYP19A1*. mRNA: the sequence of a rare transcript is shown. The 3'-end of exon I.4 is connected with the 5'-end of exon I.8. (b) The deletion of family C [4]. Genome: the deletion (a gray area) includes exons 2–43 of *DMXL2* and exons 5–10 of *GLDN*. mRNA: The sequence of a rare chimeric gene transcript is shown. *DMXL2* exon 1 consisting of a noncoding region and a coding region is spliced onto the common acceptor site of *CYP19A1* exon 2. (c) The deletion of families D–F [4]. Genome: the deletion (a gray area) includes exons 2–43 of *DMXL2*. mRNA: the sequence of a rare chimeric gene transcript is delineated. The mRNA structure is the same as that detected in family C.

an identical 165,901 bp deletion including exons 2–43 of *DMXL2*. RT-PCR identified the same chimeric mRNA as that detected in family C.

Collectively, three types of genomic rearrangements on 15q21 have been identified in AEXS to date, namely, inversion type (four subtypes), duplication type, and deletion type (two subtypes) (Figure 3(a)) [2–4]. In this regard, sequence analyses for the breakpoints have indicated that (1) inversion types are formed by a repeat sequence-mediated

nonallelic intrachromosomal or interchromosomal recombination or by a replication-based mechanism of fork stalling and template switching (FoSTeS) that occurs in the absence of repeat sequences and is often associated with microhomology [16], (2) duplication type is generated by FoSTeS, and (3) deletions are produced by nonhomologous end joining that takes place between nonhomologous sequences and is frequently accompanied by an insertion of a short segment at the fusion point or by a nonallelic recombination [16].

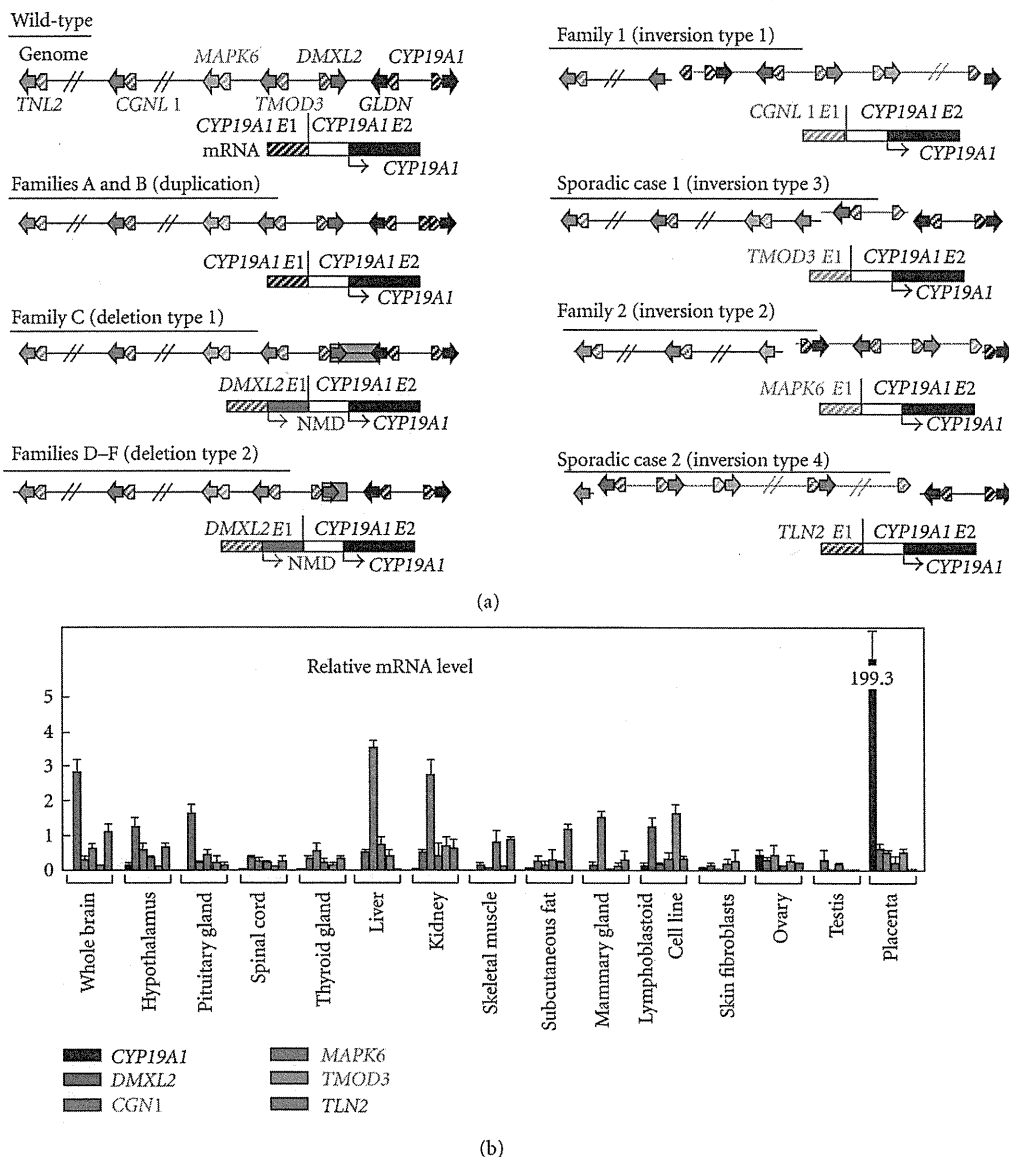


FIGURE 3: Structural and functional properties of the fused exons. (a) Schematic representation of the rearranged genome and mRNA structures. The white and the black boxes of *CYP19A1* exon 2 show untranslated region and coding region, respectively. For genome, the striped and the painted arrows indicate noncoding and coding exons, respectively (5' → 3'). The inverted genomic regions are delineated in blue lines. For mRNA, colored striped boxes represent noncoding regions of each gene. The *DMXL2-CYP19A1* chimeric mRNA has two translation initiation codons and therefore is destined to produce not only *CYP19A1* protein but also a 47 amino acid protein which is predicted to undergo nonsense-mediated mRNA decay (NMD). The deletion and the inversion types are associated with heterozygous impairment of neighboring genes (deletion or disconnection between noncoding exon(s) and the following coding exons). The inversion subtype 1 is accompanied by inversion of eight of the 11 *CYP19A1* exons 1, and the inversion subtype 2 is associated with inversion of the placenta-specific *CYP19A1* exon I.1. (b) Expression patterns of *CYP19A1* and the five neighboring genes involved in the chimeric gene formation [4]. Relative mRNA levels against *TBP* in normal human tissues are shown.

Thus, it appears that genomic sequence around *CYP19A1* harbors particular motifs that are vulnerable to replication- and recombination-mediated errors. The results provide novel mechanisms of gain-of-function mutations leading to human diseases.

4. Clinical Features of AEXS

To date, a total of 23 male cases from 10 families have been reported to have molecularly confirmed AEXS (Table 1, Figure 3(a)) [2–4]. They exhibited pre- or peripubertal onset

TABLE 1: Summary of clinical studies in male patients with aromatase excess syndrome (modified from [4]).

		(a)																	
Family		Family A			Family B			Family C			Family D			Family E					
Mutation types		Duplication			Duplication			Deletion			Deletion			Deletion					
The promoter involved in CYP19A1 overexpression		CYP19A1			CYP19A1			CYP19A1			DMXL2			DMXL2					
Case		Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10								
Age at examination (year)		66	15	20	15	15	13	42	9	12	13								
<Phenotypic findings>																			
Gynecomastia (tanner breast stage)		2	2	2	3	4	4	4	3	4	4								
Onset of gynecomastia (year)		13	13	10	11	12	11	11	7	9	10								
Mastectomy (year)		No	Yes (15)	No	Yes (15)	Yes (15)	Yes (13)	No	No	Yes (12)	Yes (13)								
Testis (ml)		N.E.	12	12	12	12	12	N.E.	3	12	20								
Pubic hair (tanner stage)		N.E.	2-3	4	5	4	3	N.E.	1	3	4								
Facial hair		Normal	Scarce	Scarce	Normal	Absent	Absent	N.E.	Absent	Absent	Absent								
Height (SDS) ^a		-1.2	-0.3	+0.4	+0.8	-2.0	-1.0	-1.6	+2.7	±0	+1.8								
Bone age (year) ^b		N.E.	N.E.	N.E.	16.0	16.0	13.5	N.E.	13.0	15.0	17.0								
Fertility (spermatogenesis)		Yes	?	(Yes) ^h	?	?	?	Yes	?	?	?								
<Endocrine findings> ^c																			
<At Dx>		B	B	S	B	S	B	S	B	S	B	S	B	B	S	B	S	B	S
	Stimulus																		
LH (mIU/mL)	GnRH ^e	3.8	2.3	14.3	2.1	17.0	2.4	29.4	1.9	40.6	1.8	69.2		1.1	11.5	0.6	39.5	6.7	14.8
LH (mIU/mL)	GnRH (after priming) ^f		1.8	9.5	1.3	10.7													
FSH (mIU/mL)	GnRH ^e	1.7	3.1	5.3	<0.5	1.2	0.9	2.4	1.4	4.2	2.0	7.8		3.2	6.6	0.6	2.9	0.7	1.0
FSH (mIU/mL)	GnRH (after priming) ^f		2.6	3.2	<0.5	0.9													
Prolactin (ng/ml)			4.3	5.3				8.2	9.1				11.3		18.8				
Δ ⁴ A (ng/mL)		0.5		1.1	1.2								0.6		0.7			2.4	2.9
T (ng/mL)	hCG ^g	2.9	1.6	2.2	4.0			2.6	7.2	1.4	7.9		0.6	3.6	2.4			3.2	9.7
DHT (ng/mL)		0.4		0.2														0.4	1.2
Inhibin B (pg/mL)		61.6		74.6	83.5			75.2											
E ₁ (pg/mL)		157		120	124								57		63			53	
E ₂ (pg/mL)		29	15	22	59			56	38				24	19	25			58	
E ₂ /T ratio (×10 ³)		10.0	9.4	10.0	14.8			21.5	27.1				31.7		10.4			18.1	

(b)														
Family	Family F								Family G		Family H		Sporadic	
Mutation types	Deletion								Inversion		Inversion		Inversion	
The promoter involved in CYP19A1 overexpression	DMXL2								CGNL1		MAPK6		TMOD3 TLN2	
Case	Case 11	Case 12	Case 13	Case 14	Case 15	Case 16	Case 17	Case 18	Case 19	Case 20	Case 21 ^j	Case 22	Case 23	
Age at examination (year)	69	35	44	45	9	8	13	10	35	7	13	17	36	
<Phenotypic findings>														
Gynecomastia (tanner breast stage)	Yesⁱ	Yesⁱ	Yesⁱ	Yesⁱ	2	3	3	3	Yes	3	5	N.E.	Yes	
Onset of gynecomastia (year)	?	?	?	?	8	8	11	10	5	5	8	7	?	
Mastectomy (year)	Yesⁱ	Yesⁱ	Yesⁱ	Yesⁱ	No	No	Yes (?)	Yes (?)	Yes (16)	No	Yes (?)	Yes (?)	Yes (19)	
Testis (ml)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	2	1.5	2	2	N.E.	N.E.	N.E.	Normal	N.E.	
Pubic hair (tanner stage)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	1	1	2	1	Normal	1	2-3 (at 21.0)	N.E.	N.E.	
Facial hair	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	N.E.	Scarce	N.E.	
Height (SDS) ^a	N.E.	~ -1.5	~ -1.5	~ -1.5	+1.4	N.E.	+2.0	+2.4	Short	>+2.5	-1.6 (at 21.0)	Short	N.E.	
Bone age (year) ^b	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	12.5	13.0	15.0	14.5 (at 12.5)	N.E.	13.0 (at 5.5)	17.0	N.E.	N.E.	
Fertility (spermatogenesis)	Yes	Yes	Yes	Yes	?	?	?	?	Yes	?	?	?	?	
<Endocrine findings> ^c														
	B	B	B	B	B	B	B	S	B	B	B	B	S	B
<At Dx>														
	Stimulus													
LH (mIU/mL)	GnRH ^e													
LH (mIU/mL)	0.2	3.5	1.7	3.0	0.2	<0.1	2.6	6.3	1.5	1.7	0.1	2.6	10.0	4.3
FSH (mIU/mL)	GnRH (after priming) ^f													
FSH (mIU/mL)	GnRH ^e													
FSH (mIU/mL)	1.4	2.3	0.8	0.8	1.4	0.5	0.8	1.2	1.2	1.5	0.3	<0.1	<0.1	2.7
Prolactin (ng/ml)	GnRH (after priming) ^f													
Δ ⁴ A (ng/mL)	1.4	0.4	1.7	0.5	0.3	<0.3	0.9	1.5	1.3	0.8	0.3	2.4	0.9	
T (ng/mL)	hCG ^g													
T (ng/mL)	2.6	2.5	2.1	2.5	<0.1	<0.1	2.7	9.2	2.7	3.2	<0.1	1.2	3.8	2.3
DHT (ng/mL)												0.2	0.5	
Inhibin B (pg/mL)														
E ₁ (pg/mL)	32	34	59	34	26	41	77	86	903	119	544		556	
E ₂ (pg/mL)	10	19	24	31	11	7	25	40	223	15	178		392	
E ₂ /T ratio (×10 ³)	3.8	7.6	11.4	12.4			9.3	14.8	69.6		148.3		170.4	

SDS: standard deviation score; Dx: diagnosis; Tx: therapy; LH: luteinizing hormone; FSH: follicle stimulating hormone; Δ⁴A: androstenedione; T: testosterone; DHT: dihydrotestosterone;

E₁: estrone; E₂: estradiol; GnRH: gonadotropin-releasing hormone; hCG: human chorionic gonadotropin; N.E.: not examined; B: basal; and S: stimulated.

Abnormal clinical findings are boldfaced.

Abnormally low hormone values are boldfaced, and abnormally high hormone values are underlined.

^aEvaluated by age- and ethnicity-matched growth references; heights ≥+2.0 SD or below ≤ -2.0 SD were regarded as abnormal.

^bAssessed by the Tanner-Whitehouse 2 method standardized for Japanese or by the Greulich-Pyle method for Caucasians; bone age was assessed as advanced when it was accelerated a year or more.

^cEvaluated by age-matched male reference data, except for inhibin B and E₁ that have been compared with data from 19 adult males.

^dTreated with aromatase inhibitors (anastrozole).

^eGnRH 100 μg/m² (max. 100 μg) bolus i.v.; blood sampling at 0, 30, 60, 90, and 120 minutes.

^fGnRH test after priming with GnRH 100 μg i.m. for 5 consecutive days.

^ghCG 3000 IU/m² (max 5000 IU) i.m. for 3 consecutive days; blood sampling on days 1 and 4.

^hAlthough Case 3 has not yet fathered a child, he has normal spermatogenesis with semen volume of 2.5 ml (reference value: >2 ml), sperm count of 105 × 10⁶/ml (>20 × 10⁶/ml), total sperm count of 262.5 × 10⁶ (>40 × 10⁶), motile cells of 70% (>50%), and normal morphological sperms 77% (>30%).

ⁱThese four patients allegedly had gynecomastia that required mastectomy (age unknown).

^jThe sister has macromastia, large uterus, and irregular menses; the parental phenotype has not been described.

The conversion factor to the SI unit: LH 1.0 (IU/L), FSH 1.0 (IU/L), E₁ 3.699 (pmol/L), E₂ 3.671 (pmol/L), Δ⁴A 3.492 (nmol/L), and T 3.467 (nmol/L).

gynecomastia, small testes with fairly preserved masculinization, obvious or relative tall stature in childhood and grossly normal or apparent short stature in adulthood, and age-appropriate or variably advanced bone ages. Blood endocrine studies revealed markedly elevated E_1 values and E_2/T ratios in all cases examined and normal or variably elevated E_2 values. In addition, Δ^4 -androstenedione, T, and dihydrotestosterone values were low or normal, and human chorionic gonadotropin (hCG) test indicated normal T responses. Notably, LH values were grossly normal at the baseline and variably responded to GnRH stimulation, whereas FSH values were low at the baseline and poorly responded to GnRH stimulation even after preceding GnRH priming, in all cases examined.

The severity of such clinical phenotypes is primarily dependent on the underlying mechanisms (Table 1). They are obviously mild in the duplication type, moderate in the deletion type, and severe in the inversion type, except for serum FSH values that remain suppressed irrespective of the underlying mechanisms. Likewise, gynecomastia has been reported to be ameliorated with 1 mg/day of aromatase inhibitor (anastrozole) in the duplication and the deletion types and with 2–4 mg/day of anastrozole in the inversion type [4].

5. Expression Pattern of *CYP19A1* and the Chimeric Genes as One Phenotypic Determinant

Phenotypic severity is much milder in the duplication type than in the deletion and the inversion types. This would be explained by the tissue expression pattern of *CYP19A1* and the chimeric genes. Indeed, RT-PCR analysis using normal human tissue samples revealed that *CYP19A1* is expressed only in a limited number of tissues such as placenta, ovary, skin, and fat, while the five genes involved in the formation of chimeric genes are widely expressed with some degree of variation (Figure 3(b)). Therefore, it is likely that the duplication types would simply increase *CYP19A1* transcription in native *CYP19A1*-expressing tissues, whereas the deletion and the inversion types lead to *CYP19A1* overexpression in a range of tissues, because expression patterns of chimeric genes are predicted to follow those of the original genes. Furthermore, it is also likely that the native *CYP19A1* promoter is subject to negative feedback by elevated estrogens [17], whereas such negative feedback effect by estrogen is weak or even absent for the chimeric genes in the deletion and the inversion types.

6. Structural Property of the Fused Exons as Another Phenotypic Determinant

Phenotypic severity is also milder in the deletion type than in the inversion types, despite a similar wide expression pattern of genes involved in the chimeric gene formation (Table 1, Figure 3(b)). In this context, it is noteworthy that a translation start codon and a following coding region

are present on exon 1 of *DMXL2* of the deletion type but not on exons 1 of the chimeric genes of the inversion types (Figure 3(a)). Thus, it is likely that *DMXL2/CYP19A1* chimeric mRNAs transcribed by the *DMXL2* promoter preferentially recognize the natural start codon on *DMXL2* exon 1 and undergo nonsense-mediated mRNA decay and that rather exceptional chimeric mRNAs, which recognize the start codon on *CYP19A1* exon 2, are transcribed into *CYP19A1* protein. By contrast, such a phenomenon would not be postulated for the inversion-mediated chimeric mRNAs. Consistent with this, it has been shown that the *DMXL2/CYP19A1* chimeric mRNA is present only in 2–5% of *CYP19A1*-containing transcripts from skin fibroblasts, whereas the *CGNL1/CYP19A1* chimeric mRNA and the *TMOD3/CYP19A1* chimeric mRNA account for 89–100% and 80% of transcripts from skin fibroblasts, respectively [2, 4].

In addition, the genomic structure caused by the rearrangements would affect efficiency of splicing between non-coding exon(s) of neighboring genes and *CYP19A1* exon 2. For example, in the inversion subtype 1, the physical distance between *CGNL1* exon 1 and *CYP19A1* exon 2 is short, and, while a splice competition may be possible between exon 1 of neighboring genes and original *CYP19A1* exons 1, eight of 11 *CYP19A1* exons 1 including exon I.4 have been disconnected from *CYP19A1* coding exons by inversion (Figure 3(a)). This may also enhance the splicing efficiency between *CGNL1* exon 1 and *CYP19A1* exon 2 and thereby lead to relatively severe overexpression of the *CGNL1-CYP19A1* chimeric gene, although this hypothesis would not be applicable for other chimeric genes.

7. Implication for the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis Function

It is notable that a similar degree of FSH-dominant hypogonadotropic hypogonadism is observed in the three types, although E_1 and E_2 values and E_2/T ratios are much higher in the inversion type than in the duplication and deletion types (Table 1). In particular, FSH was severely suppressed even after GnRH priming in the duplication type [4]. This implies that a relatively mild excess of circulatory estrogens can exert a strong negative feedback effect on FSH secretion primarily at the pituitary. This would be consistent with the results of animal studies that show strong inhibitory effect of E_2 on transcription of FSH beta-subunit gene in the pituitary cells and almost negligible effect on synthesis of LH beta-subunit and secretion of LH [18, 19]. In this regard, while T responses to hCG stimulation are normal in the duplication and the deletion types and somewhat low in the inversion type, this would be consistent with fairly preserved LH secretion in the three types and markedly increased estrogen values in the inversion type. In addition, whereas fertility and spermatogenesis are normally preserved in the three types, this would be explained by the FSH-dominant hypogonadotropic hypogonadism, because FSH plays only a minor role in male fertility (spermatogenesis) [20].

8. Conclusions

Current studies argue that AEXS is caused by overexpression of *CYP19A1* due to three different types of cryptic genomic rearrangements including duplications, deletions, and inversions. It seems that transcriptional activity and structural property of the fused promoter constitutes the underlying factor for the clinical variability in most features of AEXS except for FSH-dominant hypogonadotropic hypogonadism. Thus, AEXS represents a novel model for gain-of-function mutation leading to human genetic disorders.

References

- [1] S. Bhasin, "Testicular disorders," in *Williams Textbook of Endocrinology*, H. M. Kronenberg, M. Melmed, K. S. Polonsky, and P. R. Larsen, Eds., pp. 645–699, Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 11th edition, 2008.
- [2] M. Shozu, S. Sebastian, K. Takayama et al., "Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 19, pp. 1855–1865, 2003.
- [3] M. Demura, R. M. Martin, M. Shozu et al., "Regional rearrangements in chromosome 15q21 cause formation of cryptic promoters for the CYP19 (aromatase) gene," *Human Molecular Genetics*, vol. 16, no. 21, pp. 2529–2541, 2007.
- [4] M. Fukami, M. Shozu, S. Soneda et al., "Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain of function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 96, no. 6, pp. E1035–E1043, 2011.
- [5] G. Binder, D. I. Iliev, A. Dufke et al., "Dominant transmission of prepubertal gynecomastia due to serum estrone excess: Hormonal, biochemical, and genetic analysis in a large kindred," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 1, pp. 484–492, 2005.
- [6] R. M. Martin, C. J. Lin, M. Y. Nishi et al., "Familial hyperestrogenism in both sexes: clinical, hormonal, and molecular studies of two siblings," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 88, no. 7, pp. 3027–3034, 2003.
- [7] A. Tilpakov, N. Kalintchenko, T. Semitcheva et al., "A potential rearrangement between CYP19 and TRPM7 genes on chromosome 15q21.2 as a cause of aromatase excess syndrome," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 90, pp. 4184–4190, 2005.
- [8] C. A. Stratakis, A. Vottero, A. Brodie et al., "The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant p450 aromatase gene transcription," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 83, no. 4, pp. 1348–1357, 1998.
- [9] S. Sebastian and S. E. Bulun, "Genetics of endocrine disease: a highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (Aromatase) gene revealed by the human genome project," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 86, no. 10, pp. 4600–4602, 2001.
- [10] S. E. Bulun, K. Takayama, T. Suzuki, H. Sasano, B. Yilmaz, and S. Sebastian, "Organization of the human aromatase P450 (CYP19) gene," *Seminars in Reproductive Medicine*, vol. 22, no. 1, pp. 5–9, 2004.
- [11] M. Demura, S. Reierstad, J. E. Innes, and S. E. Bulun, "Novel promoter I.8 and promoter usage in the CYP19 (aromatase) gene," *Reproductive Sciences*, vol. 15, no. 10, pp. 1044–1053, 2008.
- [12] N. Harada, T. Utsumi, and Y. Takagi, "Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 23, pp. 11312–11316, 1993.
- [13] E. R. Simpson, "Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression," *Seminars in Reproductive Medicine*, vol. 22, no. 1, pp. 11–23, 2004.
- [14] E. E. Wallach and C. R. Garcia, "Familial gynecomastia without hypogonadism: a report of three cases in one family," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 22, pp. 1201–1206, 1962.
- [15] G. D. Berkovitz, A. Guerami, T. R. Brown, P. C. MacDonald, and C. J. Migeon, "Familial gynecomastia with increased extraglandular aromatization of plasma carbon19-steroids," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 75, no. 6, pp. 1763–1769, 1985.
- [16] W. Gu, F. Zhang, and J. R. Lupski, "Mechanisms for human genomic rearrangements," *Pathogenetics*, vol. 1, article 4, 2008.
- [17] M. B. Yilmaz, A. Wolfe, Y. H. Cheng, C. Glidewell-Kenney, J. L. Jameson, and S. E. Bulun, "Aromatase promoter I.f is regulated by estrogen receptor alpha (ESR1) in mouse hypothalamic neuronal cell lines," *Biology of Reproduction*, vol. 81, no. 5, pp. 956–965, 2009.
- [18] J. E. Mercer, D. J. Phillips, and I. J. Clarke, "Short-term regulation of gonadotropin subunit mRNA levels by estrogen: studies in the hypothalamo-pituitary intact and hypothalamo-pituitary disconnected ewe," *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 5, no. 5, pp. 591–596, 1993.
- [19] D. C. Alexander and W. L. Miller, "Regulation of ovine follicle-stimulating hormone β -chain mRNA by 17 β -estradiol in vivo and in vitro," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 5, pp. 2282–2286, 1982.
- [20] T. R. Kumar, Y. Wang, N. Lu, and M. M. Matzuk, "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility," *Nature Genetics*, vol. 15, no. 2, pp. 201–204, 1997.

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¹⁾。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)²⁾。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 2 Mbp 以下であり、通常の細胞遺伝学的検査では

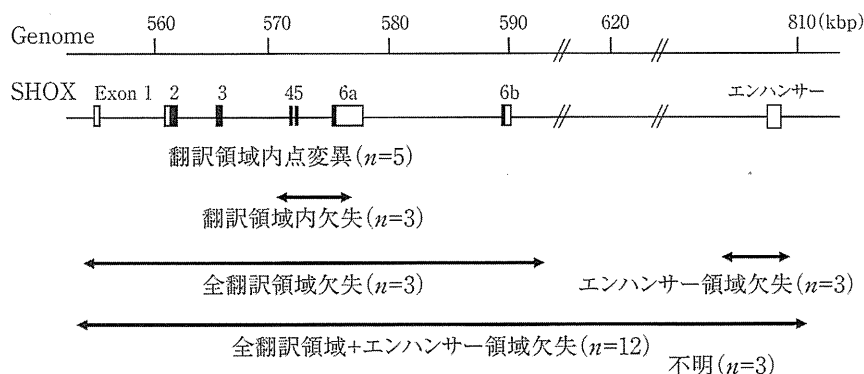


図 1 日本人レリーワイル症候群患者 29 家系における遺伝子異常

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

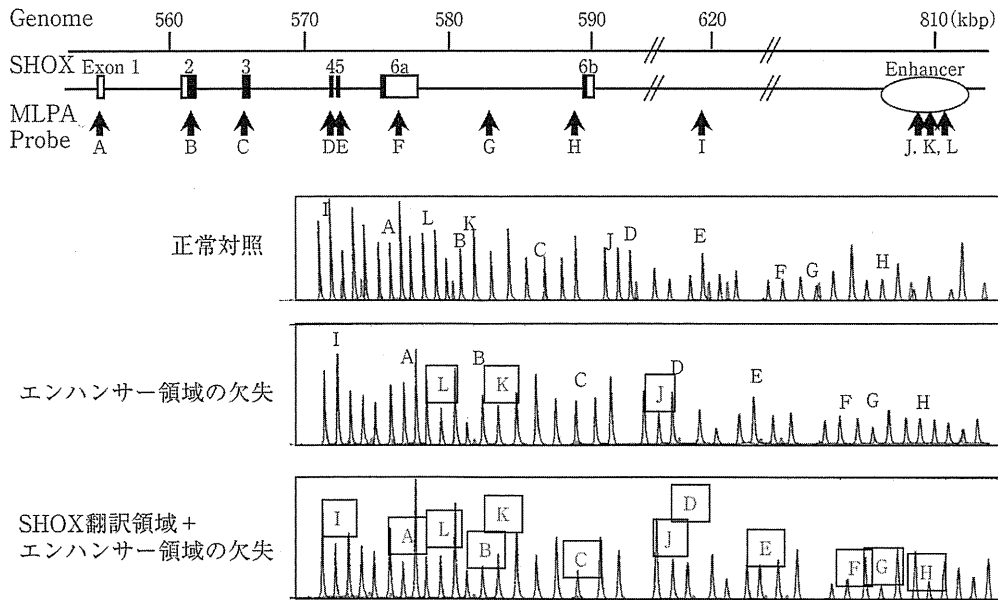


図2 レリーワイル症候群患者における multiple ligation probe amplification (MLPA) 法による欠失の同定
四角で囲ったプローブのピークの減少が認められ、この領域を包含するヘテロ接合性欠失が示唆される。

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)_n 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の範囲に局限化されている。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局限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(AEWS)はアロマターゼ遺

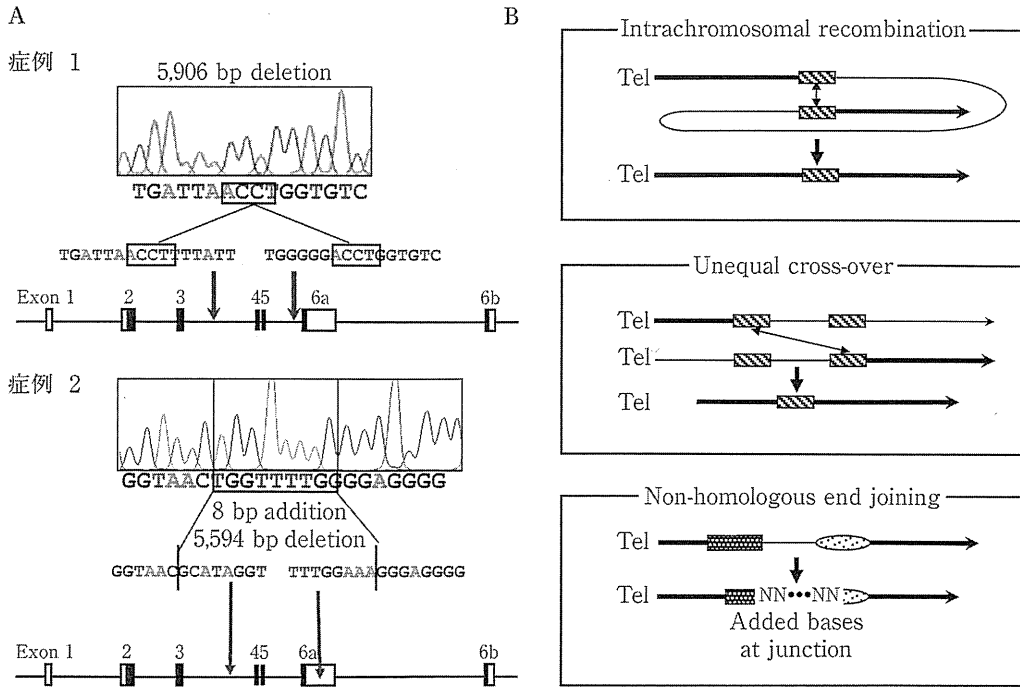


図 3 レリーワイル症候群患者 2 例における切断点の塩基配列解析

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^{3,4)}。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⁵⁾。家系AとBでは、CYP19A1翻訳領域から10,983bp離れた領域に79,156bp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IIa, 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1つを有する正常なクロンのほかに、5'側にエクソンI.4, 3'側にエクソンI.8が結合したクロンが得られた(図4C)。このクロ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141,758bp離れた領域に211,631bp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LINE1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1つを有する正常クロンのほか、DMXL2エクソン1とCYP19A1エクソン2を含むDMXL2-CYP19A1キメラクロンが得られた(図5C)。