

(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 <sup>j</sup>	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)	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>Yes</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	N.E.	<b>Yes</b>			
Onset of gynecomastia (year)	?	?	?	?	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	?			
Mastectomy (year)	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>Yes<sup>i</sup></b>	<b>Yes<sup>i</sup></b>	No	No	<b>Yes (?)</b>	<b>Yes (?)</b>	<b>Yes (16)</b>	No	<b>Yes (?)</b>	<b>Yes (?)</b>	<b>Yes (19)</b>			
Testis (ml)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	2	1.5	<b>2</b>	<b>2</b>	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	<b>Absent</b>	Absent	N.E.	<b>Scarce</b>	N.E.			
Height (SDS) <sup>a</sup>	N.E.	~ -1.5	~ -1.5	~ -1.5	+1.4	N.E.	<b>+2.0</b>	<b>+2.4</b>	<b>Short</b>	<b>&gt;+2.5</b>	-1.6 (at 21.0)	<b>Short</b>	N.E.			
Bone age (year) <sup>b</sup>	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	<b>12.5</b>	<b>13.0</b>	<b>15.0</b>	<b>14.5 (at 12.5)</b>	N.E.	<b>13.0 (at 5.5)</b>	<b>17.0</b>	N.E.	N.E.			
Fertility (spermatogenesis)	Yes	Yes	Yes	Yes	?	?	?	?	Yes	?	?	?	?			
<Endocrine findings> <sup>c</sup>																
<At Dx>																
Stimulus																
LH (mIU/mL)	GnRH <sup>e</sup>		<b>0.2</b>	3.5	1.7	3.0	0.2	<0.1	2.6	6.3	1.5	1.7	0.1	2.6	<b>10.0</b>	4.3
LH (mIU/mL)	GnRH (after priming) <sup>f</sup>		<b>1.4</b>	2.3	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	1.4	0.5	<b>0.8</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	1.5	0.3	<b>&lt;0.1</b>	<b>&lt;0.1</b>	2.7
FSH (mIU/mL)	GnRH <sup>e</sup>		<b>1.4</b>	2.3	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	1.4	0.5	<b>0.8</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	1.5	0.3	<b>&lt;0.1</b>	<b>&lt;0.1</b>	2.7
FSH (mIU/mL)	GnRH (after priming) <sup>f</sup>		<b>1.4</b>	2.3	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	1.4	0.5	<b>0.8</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	1.5	0.3	<b>&lt;0.1</b>	<b>&lt;0.1</b>	2.7
Prolactin (ng/ml)																
Δ <sup>4</sup> A (ng/mL)			1.4	<b>0.4</b>	1.7	<b>0.5</b>	0.3	<0.3	<b>0.9</b>	1.5	1.3	<b>0.8</b>	0.3	2.4	<b>0.9</b>	
T (ng/mL)	hCG <sup>g</sup>		<b>2.6</b>	<b>2.5</b>	<b>2.1</b>	<b>2.5</b>	<0.1	<0.1	<b>2.7</b>	<b>9.2</b>	<b>2.7</b>	3.2	<0.1	<b>1.2</b>	3.8	<b>2.3</b>
DHT (ng/mL)																
Inhibin B (pg/mL)																
E <sub>1</sub> (pg/mL)			<u>32</u>	<u>34</u>	<u>59</u>	<u>34</u>	26	<u>41</u>	<u>77</u>		<u>86</u>	<u>903</u>	119	<u>544</u>		<u>556</u>
E <sub>2</sub> (pg/mL)			10	19	24	31	11	7	25		<u>40</u>	<u>223</u>	15	<u>178</u>		<u>392</u>
E <sub>2</sub> /T ratio (×10 <sup>3</sup> )			3.8	<u>7.6</u>	<u>11.4</u>	<u>12.4</u>					<u>9.3</u>	<u>14.8</u>		<u>148.3</u>		<u>170.4</u>

SDS: standard deviation score; Dx: diagnosis; Tx: therapy; LH: luteinizing hormone; FSH: follicle stimulating hormone; Δ<sup>4</sup>A: androstenedione; T: testosterone; DHT: dihydrotestosterone; E<sub>1</sub>: estrone; E<sub>2</sub>: 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. <sup>a</sup>Evaluated by age- and ethnicity-matched growth references; heights ≥+2.0 SD or below ≤ -2.0 SD were regarded as abnormal. <sup>b</sup>Assessed 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. <sup>c</sup>Evaluated by age-matched male reference data, except for inhibin B and E<sub>1</sub> that have been compared with data from 19 adult males. <sup>d</sup>Treated with aromatase inhibitors (anastrozole). <sup>e</sup>GnRH 100 μg/m<sup>2</sup> (max. 100 μg) bolus i.v.; blood sampling at 0, 30, 60, 90, and 120 minutes. <sup>f</sup>GnRH test after priming with GnRH 100 μg i.m. for 5 consecutive days. <sup>g</sup>hCG 3000 IU/m<sup>2</sup> (max 5000 IU) i.m. for 3 consecutive days; blood sampling on days 1 and 4. <sup>h</sup>Although 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 × 10<sup>6</sup>/ml (>20 × 10<sup>6</sup>/ml), total sperm count of 262.5 × 10<sup>6</sup> (>40 × 10<sup>6</sup>), motile cells of 70% (>50%), and normal morphological sperms 77% (>30%). <sup>i</sup>These four patients allegedly had gynecomastia that required mastectomy (age unknown). <sup>j</sup>The 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), E<sub>1</sub> 3.699 (pmol/L), E<sub>2</sub> 3.671 (pmol/L), Δ<sup>4</sup>A 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,  $\Delta^4$ -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  $\beta$ -chain mRNA by 17 $\beta$ -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.

## アロマターゼ過剰症 6 家系の分子遺伝学的／臨床的解析 ：新たな遺伝疾患発症機序とホルモン調節機構の解明

深見 真紀\*<sup>1</sup> 曾根田 瞬\*<sup>1</sup> 加藤 美弥子\*<sup>1</sup> 花木 啓一\*<sup>2</sup>  
 神崎 晋\*<sup>2</sup> 大山 建司\*<sup>3</sup> 佐野 友昭\*<sup>3</sup> 西垣 敏紀\*<sup>4</sup>  
 稲垣 朱実\*<sup>5</sup> 高木 博史\*<sup>5</sup> Gerhard Binder\*<sup>6</sup> 横谷 進\*<sup>1</sup>  
 堀川 玲子\*<sup>1</sup> 生水 真紀夫\*<sup>7</sup> 緒方 勤\*<sup>1,8</sup>

### はじめに

アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンへと変換する酵素である。アロマターゼ遺伝子 (*CYP19A1*) は、15 番染色体長腕に位置し、少なくとも 11 個の非翻訳エクソン 1 と翻訳領域であるエクソン 2-10 から成る。各々のエクソン 1 は、組織特異的プロモーターとして機能している。個々の組織では 11 個のエクソン 1 のうちの一部が選択され、エクソン 2 の共通スプライスアクセプターサイトに結合する。これによって、当該組織における遺伝子発現量が決定される。通

常、*CYP19A1* の発現は、胎盤や卵巣など一部の組織を除いて低いレベルに制御されている。

*CYP19A1* の過剰発現は、アロマターゼ過剰症 (AEXS) と呼ばれる病態を招く。AEXS は、男性患者における乳房腫大、骨年齢促進と最終身長低下、性腺機能低下を主徴とする常染色体性優性遺伝疾患である。本症は、遺伝性女性化乳房症とも称される。女性患者の多くは無症状であるが、一部の症例では月経異常や思春期早発などが認められる。

2003 年、Shozu らにより、AEXS 患者においてはじめて *CYP19A1* 遺伝子近傍の染色体逆位が同定された<sup>1)</sup>。その後、これまでに合計 2 家系と 2 孤発例の患者において逆位が同定されている<sup>2)</sup>。これら逆位陽性患者では、*CYP19A1* と広範囲発現遺伝子のキメラ形成が *CYP19A1* 過剰発現の原因であることが明らかとなっている<sup>1,2)</sup>。しかし、AEXS 患者の詳細な臨床像、および、逆位陰性患者における発症機序は解明されていない。今回われわれは、AEXS 患者 6 家系の分子遺伝学的／臨床的解析を行い、AEXS の分子遺伝学的発症機序およびエストロゲンフィードバックによるゴナドトロピン調節機構を明らかにした<sup>3)</sup>。

\*<sup>1</sup> 国立成育医療研究センター, \*<sup>2</sup> 鳥取大学, \*<sup>3</sup> 山梨大学, \*<sup>4</sup> 大阪警察病院, \*<sup>5</sup> 名古屋第二赤十字病院, \*<sup>6</sup> Tübingen 大学, \*<sup>7</sup> 千葉大学, \*<sup>8</sup> 浜松医科大学  
 Maki Fukami<sup>1</sup>, Shun Soneda<sup>1</sup>, Fumiko Kato<sup>1</sup>, Keiichi Hanaki<sup>2</sup>, Susumu Kanzaki<sup>2</sup>, Kenji Ohyama<sup>3</sup>, Tomoaki Sano<sup>3</sup>, Toshinori Nishigaki<sup>4</sup>, Akemi Inagaki<sup>5</sup>, Hiroshi Takagi<sup>5</sup>, Gerhard Binder<sup>6</sup>, Susumu Yokoya<sup>1</sup>, Reiko Horikawa<sup>1</sup>, Makio Shozu<sup>7</sup>, Tsutomu Ogata<sup>1,8</sup> :  
 Molecular and clinical analysis for 6 families with aromatase excess syndrome.

<sup>1</sup>National Research Institute for Child Health and Development and National Medical Center for Children and Mothers, <sup>2</sup>Tottori University, <sup>3</sup>University of Yamanashi, <sup>4</sup>Osaka Police Hospital, <sup>5</sup>Nagoya Second Red Cross Hospital, <sup>6</sup>University Children's Hospital, Tuebingen, <sup>7</sup>Chiba University, <sup>8</sup>Hamamatsu University School of Medicine.

## 1 対 象

臨床的に AEXS と診断された男性 6 家系 18 例 (家系 A-F). 家系 E はドイツ人, 他の家系は日本人である. 発端者は全例, 思春期前または思春期早期からの乳房腫大によって見出された. 乳房腫大の程度は, 家系 A と B においてやや軽度であった. 一部の症例では, 精巣容積低下および軽度の二次性徴進行不全を認めた. 骨年齢は正常または軽度促進していた. 成人患者の妊孕性 (精子形成) は保持されていた. 血中ホルモン検査では, 検査された全例において, estrone ( $E_1$ ) 高値, estradiol ( $E_2$ ) / testosterone (T) 比の高値が認められた. また, LH は, 基礎値正常またはやや低値で GnRH 負荷に対し比較的良好に反応したが, FSH は, 基礎値低値で GnRH に対しほぼ無反応であった. 皮膚線維芽細胞の解析では, *CYP19A1* mRNA 量増加とアロマターゼ酵素活性亢進が確認された.

## 2 方 法

### 1) *CYP19A1* 翻訳領域の塩基配列解析

本研究の遺伝子解析は, 国立成育医療研究センター倫理委員会において承認されている. インフォームドコンセントを得たのち, ゲノム DNA を採取し, *CYP19A1* 翻訳領域であるエクソン 2-10 を PCR で増幅した. その後直接塩基配列決定を行い, アミノ酸変化を伴う変異の有無について検討した.

### 2) ゲノム構造異常解析

Comparative genomic hybridization (CGH) 法により, *CYP19A1* 近傍のゲノム構造異常の有無について検討した. 本研究では, 15q11.2-q26.3 領域に対応する 90,000 のプローブと他の染色体領域に対応する約 10,000 のリファレンスプローブを搭載したカスタムマイクロアレイを作成し, 解析に使用した (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). 欠失や重複が同定された場合は, 確認のため long-PCR でプローブを作成し, FISH

を行った. また, 切断点周辺に設計したプライマーを用いた long-PCR 産物の直接塩基配列決定により, 切断点の位置と構造を決定した.

### 3) mRNA 解析

患者末梢血または皮膚線維芽細胞から mRNA を抽出し, 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) 法により, *CYP19A1* 翻訳領域に結合しているプロモーターを同定した.

## 3 結 果

### 1) *CYP19A1* 翻訳領域の塩基配列解析

*CYP19A1* 翻訳領域には変異が同定されなかった.

### 2) ゲノム構造異常解析

家系 A-F において, *CYP19A1* 遺伝子翻訳領域上流にヘテロ接合性ゲノム構造異常が同定された. これらの異常は, CGH によって見出され, FISH で確認された. さらに, Long PCR 産物の塩基配列決定により, 切断点が決定された.

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 1A, B). この領域は, *CYP19A1* の 11 の非翻訳エクソン 1 のうちの 7 つ (エクソン IIa, 1.8, 1.4, 1.5, 1.7, 1f, 1.2) を包含していた. この重複の切断点は, 反復配列外にあり, 1 塩基の相同性を有していた.

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 2A, 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.

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 3A, 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 2 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.

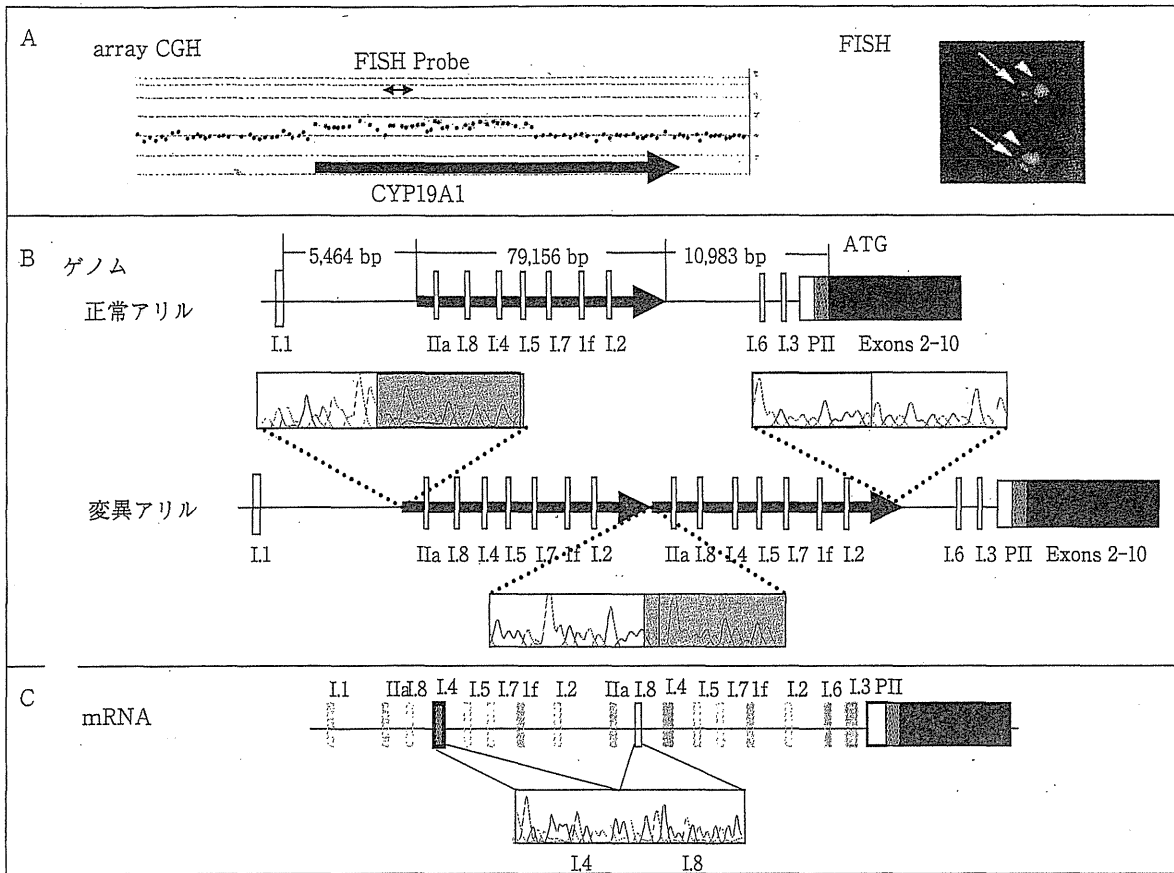


図1 家系 A と B における遺伝子異常

- A : CGH アレイ解析 (左) と FISH 解析 (右). *CYP19A1* の一部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 7 つを包含するタンデム重複. 切断点は, 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 1.4, 3' 側にエクソン 1.8 が結合した mRNA クローンが同定された.

### 3) mRNA 解析

5'-RACE により, 患者の *CYP19A1* mRNA について検討した. 家系 A と B では, *CYP19A1* エクソン 1 のうちの 1 つを有する正常な mRNA クローンのみが検出された. 一方, 5'-RACE 産物をテンプレートとして, 各エクソン 1 に位置するプライマーを用いて行った PCR では, 5' 側にエクソン 1.4, 3' 側にエクソン 1.8 が結合したクローンが得られた (図 1C). 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. このクローンの存在は, 重複によって遠位に増えた 1.4 プロモーターから転写が生じている

ことを示すものである.

家系 C-F では, *CYP19A1* エクソン 1 のうちの 1 つを有する正常クローンのほか, *DMXL2* エクソン 1 を含む *DMXL2-CYP19A1* キメラクローンが得られた (図 2C, 3C). このキメラ mRNA は, 全 5'-RACE 産物の 2~5% を占めていた. 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.

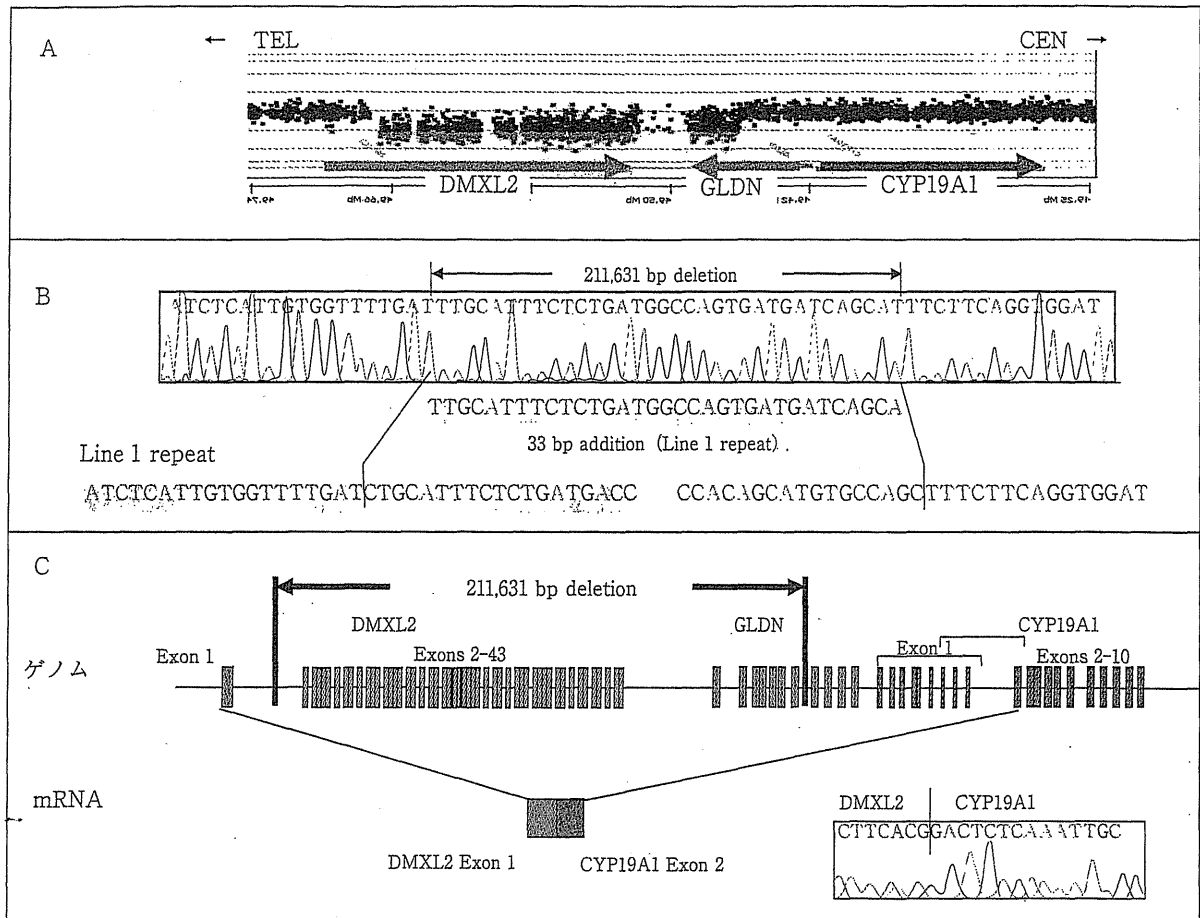


図2 家系Cにおける遺伝子異常

A: CGH アレイ解析. *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, 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.

#### 4 考 察

AEXS 6家系の解析により, 2家系で *CYP19A1* プロモーター領域の重複, 4家系で *CYP19A1* 上流の微小欠失が同定された. 重複陽性患者では, *CYP19A1* プロモーター数増加に起因する転写効率増加によって, アロマターゼ過剰産生が生じたと推測される. 一方, 欠失陽性患者では, *DMXL2* プロモーターの獲得による *CYP19A1* の異所性発現とプロモーター数増加による転写効率増加がアロマターゼ過剰産生の原因であると推測される. この成績は, 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. このようなゲノム微細構造異常は, 他の遺伝疾患の発症にも関与している可能性がある.

さらにこの成績は, AEXSの発症にDNA複製エラーと組み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. すなわち, 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 homolo-

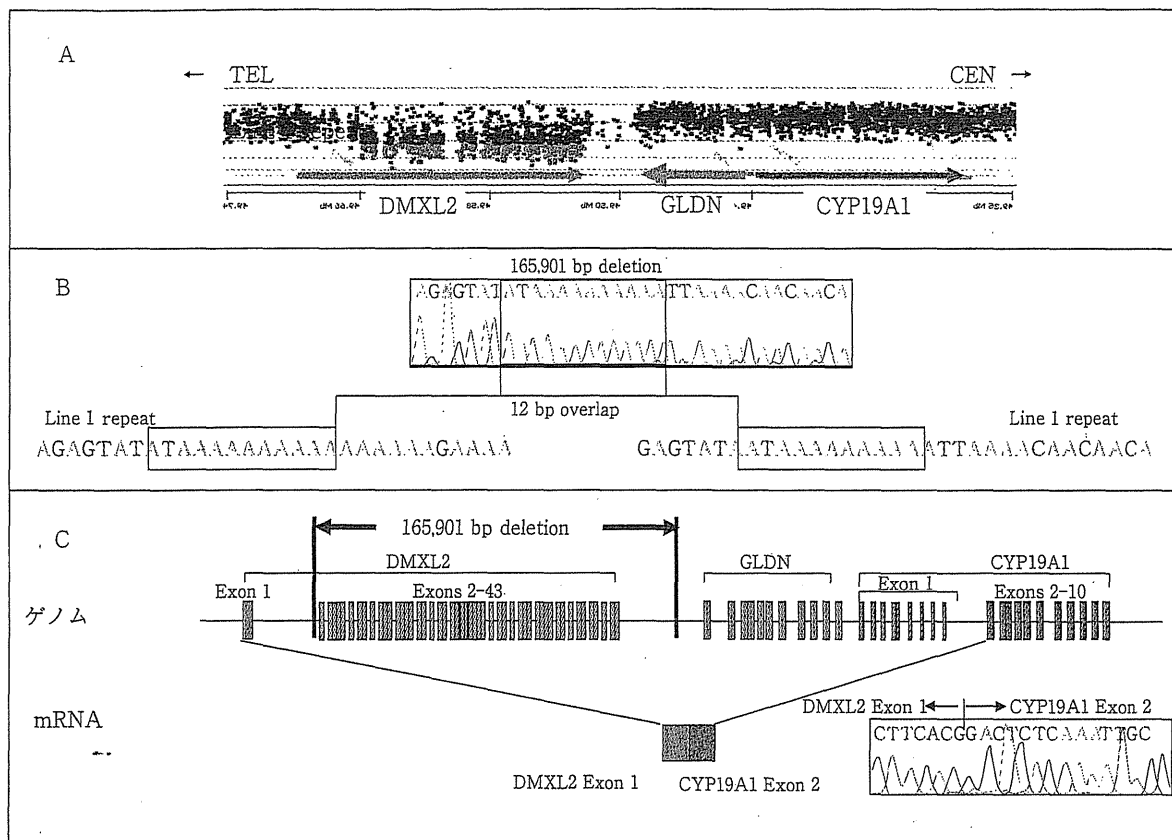


図3 家系D-Fにおける遺伝子異常

- A: CGH アレイ解析. *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 LINE1 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.

gous recombination に一致する. 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特異的モチーフが存在すると推測される.

本研究および過去の2つの研究において, 合計23例の AEXS 患者が同定されている (表1). これらの患者の解析から, 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, 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. 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制御が生じ, 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, *DMXL2* エクソン1に翻訳開始コドンをもつ *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



表1 これまでに報告されたアロマターゼ過剰症患者の遺伝子異常と臨床所見

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 <sup>a</sup>	<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 <sup>b</sup> )	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 <sup>b</sup> )	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 <sup>c</sup> )	不明	正常	正常
E <sub>1</sub> (基礎値)	高値	高値	高値
E <sub>2</sub> (基礎値)	正常/高値	正常/高値	高値
E <sub>2</sub> /T比	高値	高値	高値
文献	(3)	(3)	(1), (2)

T : testosterone ; E<sub>1</sub> : estrone ; E<sub>2</sub> : estradiol ; GnRH : gonadotropin releasing hormone ; hCG : human chorionic gonadotropin

<sup>a</sup> *CYP19A1* 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

<sup>b</sup> GnRH 100 µg/m<sup>2</sup> (最大 100 µg) bolus i.v. ; 血液採取 0, 30, 60, 90, 120 分後 .

<sup>c</sup> hCG 3000 IU/m<sup>2</sup> (最大 5000 IU) i.m. 3 日連続投与 ; 血液採取 1 日目と 4 日目

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。

AEXS 患者の内分泌学的検査からは、FSH 優位のゴナドトロピン分泌不全が本症に特徴的な所見であることが見出された(表1)。さらに、血中エストロゲン値は逆位陽性患者において他の患者より高値であるが、ゴナドトロピン分泌不全の程度は遺伝子異常の種類にかかわらず全患者でほぼ同程度であることが明らかとなった。このことは、エストロゲンフィードバックの主体が下垂体におけるゴナドトロピン分泌抑制であり、比較的軽度のエストロゲン量増加によってFSH分泌が著明に障害されることを明確にするものである。一方、患者で妊孕性が保持されていたことから、

FSHが男性妊孕性の獲得と維持に及ぼす効果はわずかであることが示唆される。

## 結 語

本研究によって、プロモーター領域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がはじめて明らかとなった。また、エストロゲンが、主として下垂体レベルでのFSH分泌抑制を介して、視床下部下垂体性腺系を制御することが見出された。

## 文 献

- 1) Shozu M et al : N Engl J Med 348 : 1855, 2003.
- 2) Demura M et al : Hum Mol Genet 16 : 2529, 2007.
- 3) Fukami M et al : J Clin Endocrinol Metab 96 (6) : E1035, 2011.

## 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発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 2 Mbp 以下であり、通常の細胞遺伝学的検査では

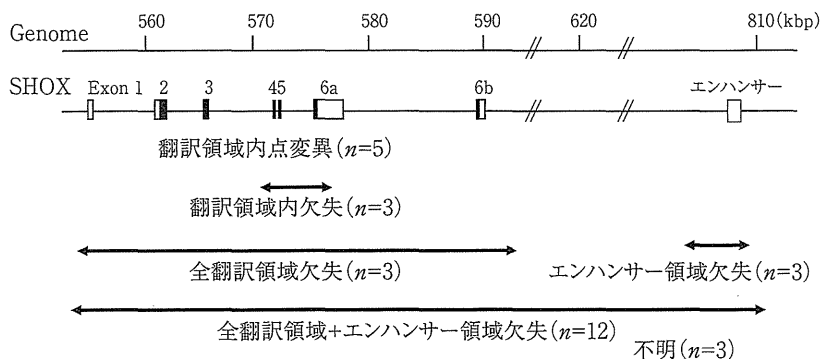


図 1 日本人レリーワイル症候群患者 29 家系における遺伝子異常

#### 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

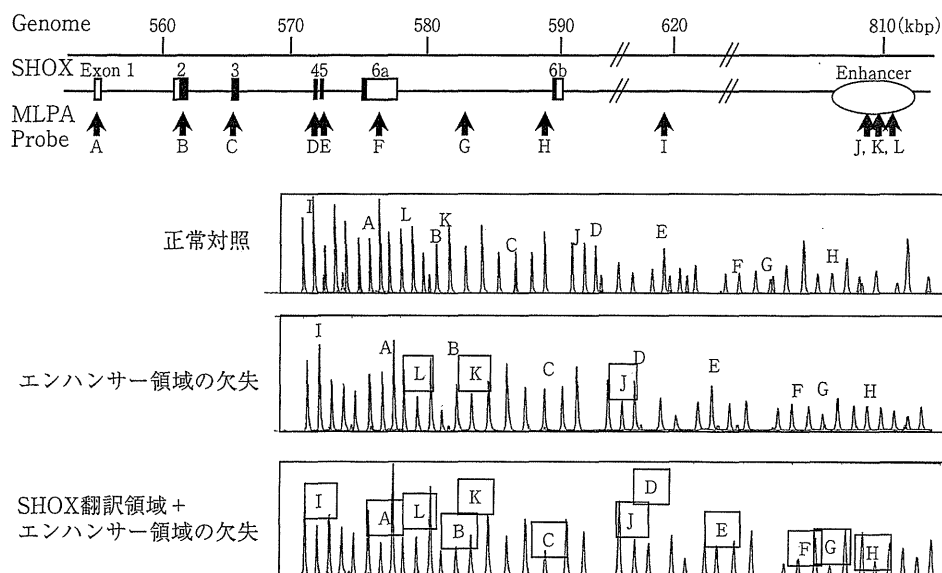


図 2 レリーワイル症候群患者における multiple ligation probe amplification (MLPA) 法による欠失の同定  
 四角で囲ったプローブのピークの減少が認められ、この領域を包含するヘテロ接合性欠失が示唆される。

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)<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(AECS)はアロマターゼ遺

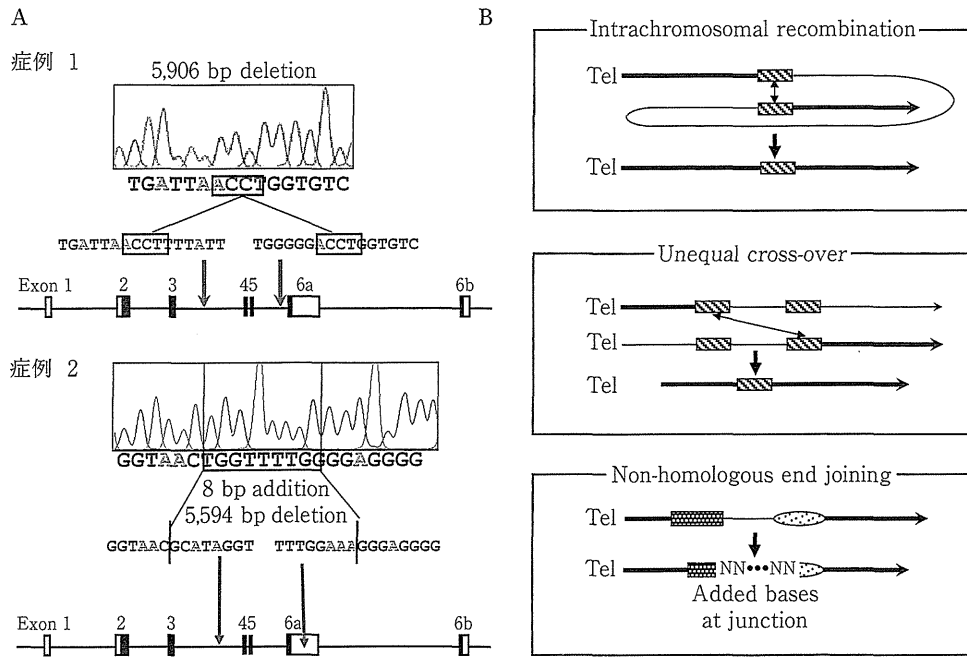


図 3 レリーワイル症候群患者 2 例における切断点の塩基配列解析

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中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10,983bp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のうちの一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141,758bp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のうちの一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)。

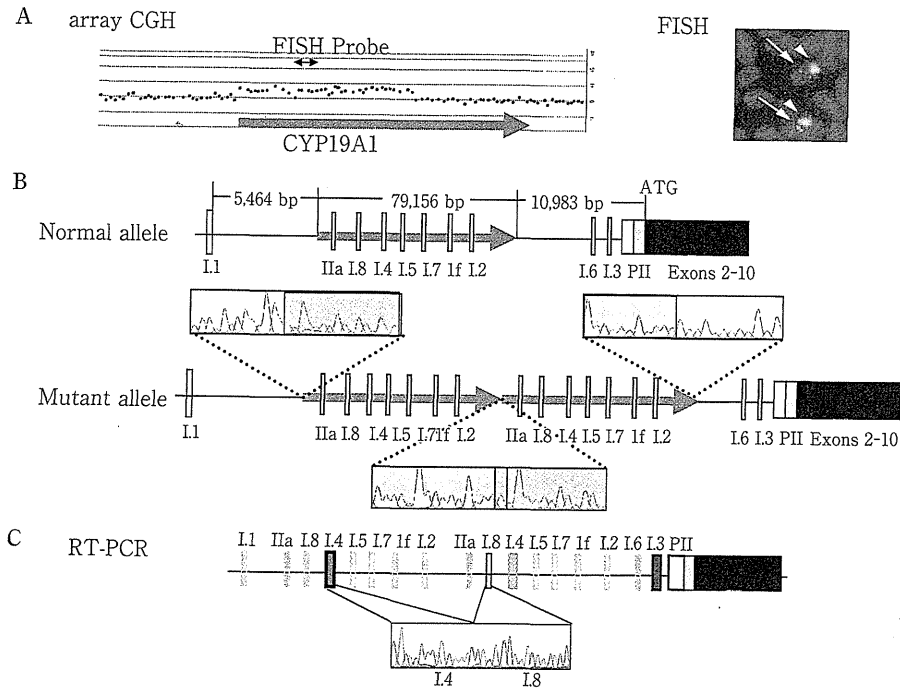


図 4 アロマトラーゼ過剰症家系 A と B における遺伝子異常

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。このクロンの存在は遠位に増えたエクソン I.4 から転写が生じていることを示唆する。

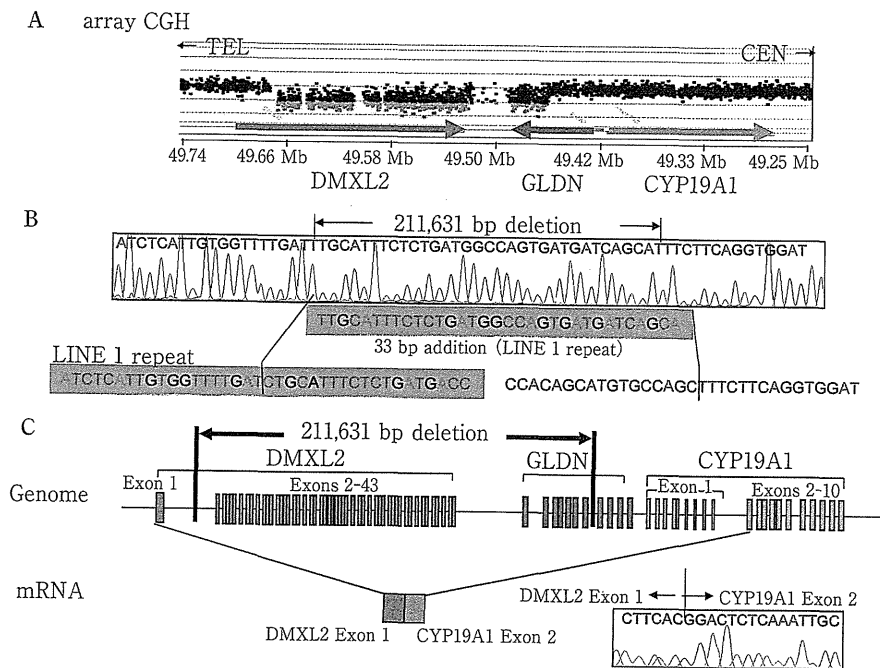


図 5 アロマトラーゼ過剰症家系 C における遺伝子異常

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。

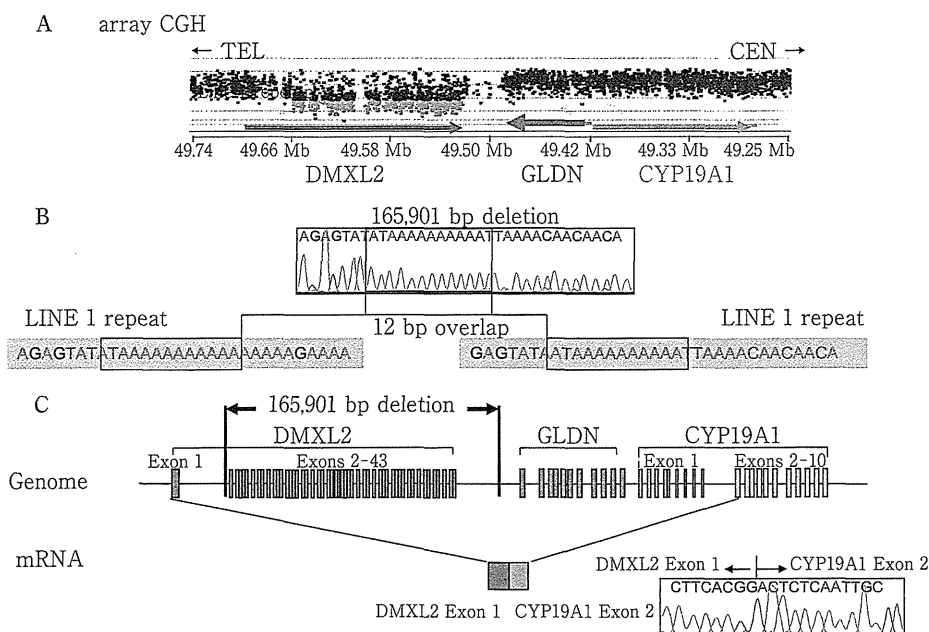


図 6 アロマトラーゼ過剰症家系 D-F における遺伝子異常

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。切断点とともに 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とともに 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、アロマトラ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 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トラ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、比較的少量のアロマトラ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持つ DMXL2-CYP19A1 キメラ遺伝子は、アロマトラーゼ蛋白のほかに 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トラーゼ蛋白のみが産生される。このため、アロマトラーゼ蛋白産生量は 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) Demura 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

## 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

国立成育医療研究センター<sup>1)</sup> 鳥取大学<sup>2)</sup> 山梨大学<sup>3)</sup> 大阪警察病院<sup>4)</sup>  
名古屋第二赤十字病院<sup>5)</sup> Tubingen 大学<sup>6)</sup> 千葉大学<sup>7)</sup>

深見 真紀<sup>1)</sup> 曾根田 瞬<sup>1)</sup> 加藤芙弥子<sup>1)</sup> 花木 啓一<sup>2)</sup> 神崎 晋<sup>2)</sup>  
大山 建司<sup>3)</sup> 佐野 友昭<sup>3)</sup> 西垣 敏紀<sup>4)</sup> 稲垣 朱実<sup>5)</sup> 高木 博史<sup>5)</sup>  
Gerhard Binder<sup>6)</sup> 横谷 進<sup>1)</sup> 堀川 玲子<sup>1)</sup> 生水真紀夫<sup>7)</sup> 緒方 勤<sup>1)</sup>

### 背景

アロマトラーゼは、エストロゲンをアンドロゲンへと変換する酵素である。アロマトラーゼ遺伝子(CYP19A1)は、15番染色体上に存在し、すくなくとも11個の非翻訳エクソン1と翻訳領域であるエクソン2-10から成る。各々のエクソン1は、組織特異的プロモーターとして機能している。通常、CYP19A1の発現は、胎盤や卵巣など一部の組織を除いて低いレベルに制御されている。

CYP19A1の過剰発現は、遺伝性女性化乳房(HG)を招く。HGは、男性患者における乳房腫大、骨年齢促進と最終身長低下、性腺機能低下を主徴とする常染色体性優性遺伝疾患である。女性患者の多くは無症状であるが、一部の症例では月経異常や思春期早発などが認められる。

2003年、Shozuらにより、HG患者において15番染色体逆位が同定された<sup>1)</sup>。その後、これまでに2家系と2孤発例の患者において逆位が同定されている<sup>2)</sup>。mRNAの解析から、これら逆位陽性患者では、CYP19A1と近隣に位置する広範囲発現遺伝子のキメラ形成がCYP19A1過剰発現の原因であることが明らかとなっている<sup>1), 2)</sup>。しかし、HG患者の詳細な臨床像、および、逆位陰性HG患者における発症機序は解明されていない。今回われわれは、HG患者6家系の分子遺伝学的/臨床的解析を行い、これらの点を解明した。

### 1. 対象

臨床的にHGと診断された男性6家系18例(家系A-F)。家系Eはドイツ人、他の家系は日本人である。乳房腫大の程度は、家系AとBにおいてやや軽度であった。一部の症例では、精巣容積低下など軽度の二次性徴進行不全を認めた。成人患者の妊孕性(精子形成)は保持されていた。血中ホルモン検査では、estrone(E<sub>1</sub>)高値、estradiol(E<sub>2</sub>)/testosterone(T)比高値、FSH優位のゴナドトロピン分泌不全が認められた。皮膚線維芽細胞の解析では、CYP19A1 mRNA量増加とアロマトラーゼ酵素活性亢進が確認された。

### 2. 方法

#### 1. CYP19A1 翻訳領域の塩基配列解析

本研究の遺伝子解析は、国立成育医療研究センター倫理委員会において承認されている。インフォームドコンセントを得たのち、ゲノムDNAを採取し、CYP19A1翻訳領域であるエクソン2-10をPCRで増幅した。直接塩基配列決定を行い、アミノ酸変化を伴う変異の有無について検討した。

#### 2. ゲノム構造異常解析

Comparative genomic hybridization (CGH)法により、CYP19A1近傍のゲノム構造異常の有無について検討した。本研究では、15q11.2-q26.3領域に対応する90,000のプロープと他の染色体領域に対応する約10,000のリファレンスプロープを搭載したカスタムマイクロアレイを作成し、解析に使用した(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)。欠失や重複が同定された場合は、確認のためlong-PCRでプロープを作成し、FISHを行った。また、切断点周辺に設計したプライマーを用いたlong PCR産物の直接塩基配列決定により、切断点の位置と構造を決定した。

#### 3. mRNA 解析

患者末梢血または皮膚線維芽細胞からmRNAを抽出し、5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE)法により、CYP19A1翻訳領域に結合しているプロモーターを同定した。

### 3. 結果

#### 1. CYP19A1 翻訳領域の塩基配列解析

全患者において、CYP19A1翻訳領域には変異が同定されなかった。

#### 2. ゲノム構造異常解析

家系A-Fにおいて、CYP19A1遺伝子翻訳領域上流にヘテロ接合性ゲノム構造異常が同定された。これらの異常は、CGHによって見出され、FISHで確認された。さらに、Long PCR産物の塩基配列決定により、切断点が決定された。

家系AとBではCYP19A1スタートコドンから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1A, B)。この領域は、CYP19A1の



11 の非翻訳エクソン 1 のうちの 7 つ(エクソン IIa, 1.8, 1.4, 1.5, 1.7, 1f, 1.2)を包含していた。この重複の切断点は、反復配列外にあり、1 塩基の相同性を有していた。

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 2A, 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 塩基の塩基配列の挿入を伴っていた。

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 3A, 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 2 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。

3. mRNA 解析

5'-RACE により、患者の *CYP19A1* mRNA について検討した。家系 A と B では、*CYP19A1* エクソン 1 のうちの 1 つを有する正常な mRNA クローンのみが検出さ

れた。一方、5'-RACE 産物をテンプレートとして、各エクソン 1 に位置するプライマーを用いて行った PCR では、5' 側にエクソン 1.4、3' 側にエクソン 1.8 が結合したクローンが得られた(図 1C)。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。このクローンの存在は、重複によって遠位に増えた 1.4 プロモーターから転写が生じていることを示すものである。

家系 C-F では、*CYP19A1* エクソン 1 のうちの 1 つを有するクローンのほか、*DMXL2* エクソン 1 を含む *DMXL2-CYP19A1* キメラクローンが得られた(図 2C, 3C)。このキメラ mRNA は、全 5'-RACE 産物の 2-5% を占めていた。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。

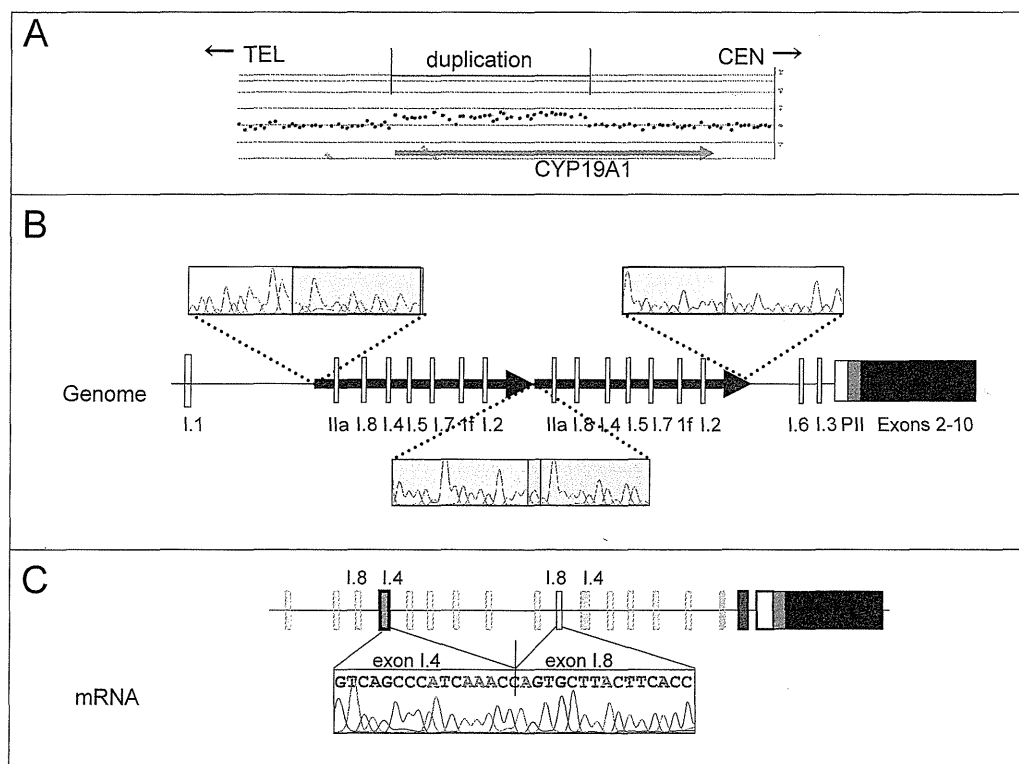


図 1. 家系 A と B における遺伝子異常

A: CGH アレイ解析。CYP19A1 の一部のヘテロ接合性重複。

B: ゲノム構造異常。CYP19A1 エクソン 1 のうち 7 つを包含するタンDEM重複。切断点は、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 1.4、3' 側にエクソン 1.8 が結合した mRNA クローン。

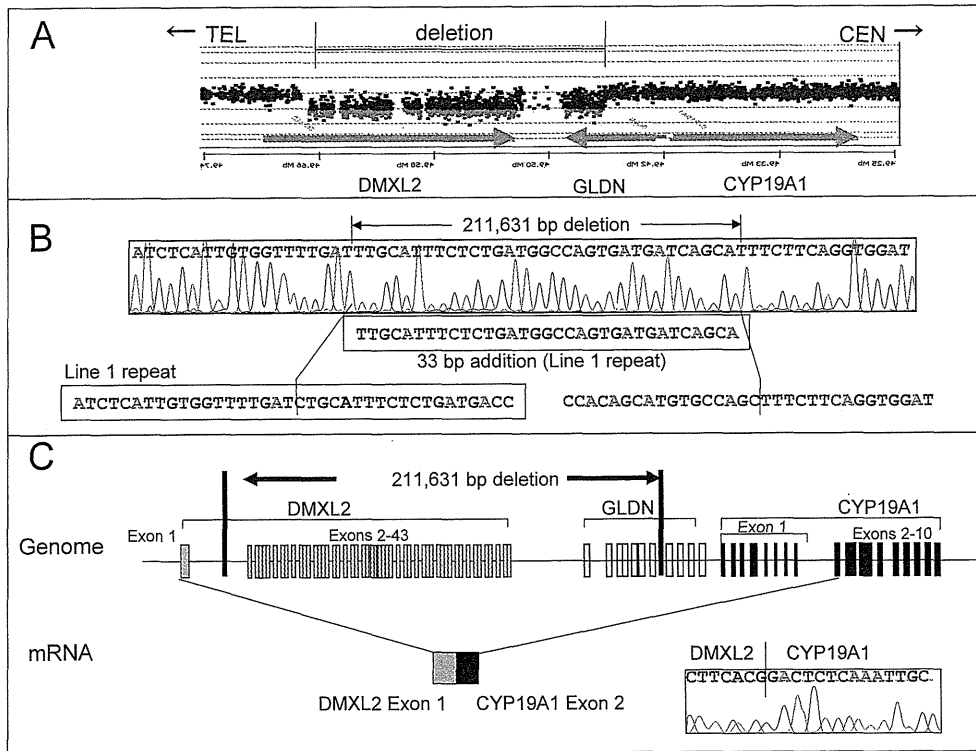


図 2. 家系 C における遺伝子異常  
 A: CGH アレイ解析。CYP19A1 上流領域のヘテロ接合性欠失。  
 B: ゲノム構造異常。DMXL2 エクソン 2-43 と GLDN エクソン 5-10 を包含する欠失。切断点は、一方は LINE 1 配列内、他方は反復配列外にあり、33 塩基の塩基配列の挿入を伴う。  
 C: mRNA 解析。5'-RACE で同定された DMXL2-CYP19A1 キメラ mRNA。

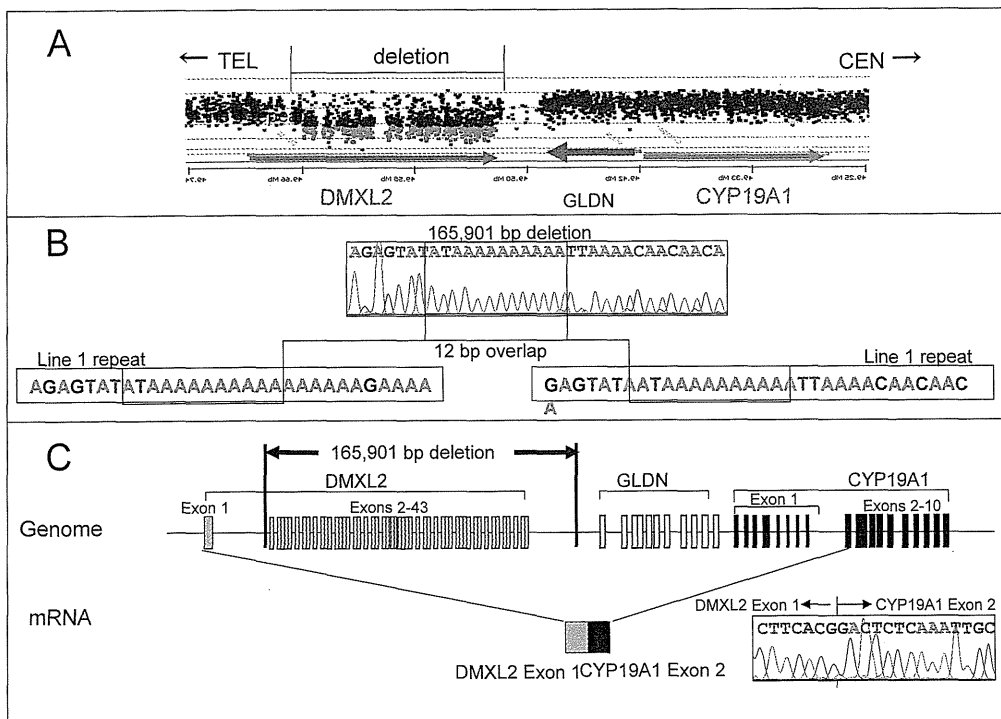


図 3. 家系 D-F における遺伝子異常  
 A: CGH アレイ解析。CYP19A1 上流領域のヘテロ接合性欠失。  
 B: ゲノム構造異常。DMXL2 エクソン 2-43 を包含する欠失。切断点はともに LINE 1 配列内にあり、12 塩基の重複を伴う。  
 C: mRNA 解析。5'-RACE で同定された DMXL2-CYP19A1 キメラ mRNA。

#### 4. 考 察

われわれは、HG 6 家系の解析を行い、2 家系で *CYP19A1* プロモーター領域の重複、4 家系で *CYP19A1* 上流の微小欠失を同定した。重複陽性患者では、*CYP19A1* プロモーター数増加に起因する転写効率増加によって、アロマターゼ過剰産生が生じたと推測される。一方、欠失陽性患者では、*DMXL2* プロモーターの獲得による *CYP19A1* の異所性発現とプロモーター数増加による転写効率増加がアロマターゼ過剰産生の原因であると推測される。この成績は、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。このようなゲノム構造異常は、他の遺伝疾患の発症にも関与している可能性がある。

本研究の成績は、HG の発症に DNA 複製エラーと組み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。すなわち、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 homologous recombination に一致する。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特異的モチーフが存在すると推測される。

なお、患者の乳房腫大と骨年齢促進の程度には症例間差異が存在し、重複陽性患者と欠失陽性患者の臨床症状は、既報の染色体逆位陽性患者と比較して軽度であった。とくに家系 A と B において軽度の臨床症状が認められた。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<sup>2)</sup>。

#### 結 語

本研究によって、プロモーター領域の重複と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がはじめて明らかとなった。HG の発症には多様な染色体微細構造異常が関与し、本症患者の重症度は当該患者において獲得されたプロモーターの機能と構造を反映すると推測される。

#### 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.* 2003; 348: 1855-65
- 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.* 2007; 16: 2529-41

## Aromatase Excess Syndrome: Identification of Cryptic Duplications and Deletions Leading to Gain of Function of *CYP19A1* and Assessment of Phenotypic Determinants

Maki Fukami, Makio Shozu, Shun Soneda, Fumiko Kato, Akemi Inagaki, Hiroshi Takagi, Keiichi Hanaki, Susumu Kanzaki, Kenji Ohyama, Tomoaki Sano, Toshinori Nishigaki, Susumu Yokoya, Gerhard Binder, Reiko Horikawa, and Tsutomu Ogata

Department of Molecular Endocrinology (M.F., S.S., F.K., T.O.), National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan; Department of Reproductive Medicine (M.S.), Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 206-8670, Japan; Department of Diabetes and Endocrinology (A.I., H.T.), Nagoya Second Red Cross Hospital Nagoya 466-8650, Japan; Department of Women's and Children's Family Nursing (K.H.) and Division of Pediatrics and Perinatology (S.K.), Tottori University, Yonago 683-8503, Japan; Department of Pediatrics (K.O., T.S.), Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Chuo 408-3898, Japan; Department of Pediatrics (T.N.), Osaka Police Hospital, Osaka 543-0035, Japan; Department of Medical Subspecialties (S.Y., R.H.), National Medical Center for Children and Mothers, Tokyo 157-8535, Japan; and Pediatric Endocrinology Section (G.B.), University Children's Hospital, Tuebingen 72076, Germany

**Context:** Aromatase excess syndrome (AEXS) is a rare autosomal dominant disorder characterized by gynecomastia. Although cryptic inversions leading to abnormal fusions between *CYP19A1* encoding aromatase and its neighboring genes have been identified in a few patients, the molecular basis remains largely unknown.

**Objective:** The objective of the study was to examine the genetic causes and phenotypic determinants in AEXS.

**Patients:** Eighteen affected males from six families participated in the study.

**Results:** We identified three types of heterozygous genomic rearrangements, *i.e.* a 79,156-bp tandem duplication involving seven of 11 noncoding *CYP19A1* exons 1, a 211,631-bp deletion involving exons 2–43 of *DMXL2* and exons 5–10 of *GLDN*, and a 165,901-bp deletion involving exons 2–43 of *DMXL2*. The duplicated exon 1 functioned as transcription start sites, and the two types of deletions produced the same chimeric mRNA consisting of *DMXL2* exon 1 and *CYP19A1* coding exons. The *DMXL2* exon 1 harbored a translation start codon, and the *DMXL2/CYP19A1* chimeric mRNA was identified in only 2–5% of *CYP19A1*-positive transcripts. This was in contrast to the inversion-mediated chimeric mRNA that had no coding sequence on the fused exon 1 and accounted for greater than 80% of *CYP19A1*-positive transcripts. *CYP19A1* was expressed in a limited number of tissues, whereas its neighboring genes involved in the chimeric mRNA formation were expressed widely.

**Conclusions:** This study provides novel mechanisms leading to gain of function of *CYP19A1*. Furthermore, it appears that clinical severity of AEXS is primarily determined by the tissue expression pattern of relevant genes and by the structural property of promoter-associated exons of chimeric mRNA. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: E1035–E1043, 2011)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-0145 Received January 18, 2011. Accepted March 22, 2011.

First Published Online April 6, 2011

Abbreviations: AEXS, Aromatase excess syndrome; CGH, comparative genomic hybridization; E<sub>2</sub>, estradiol; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; hCG, human chorionic gonadotropin; LCL, lymphoblastoid cell line; NMD, nonsense-mediated mRNA decay; RACE, rapid amplification of cDNA ends; SF, skin fibroblast; T, testosterone.