

平成25年度 卒業研究論文

アロマターゼ過剰症を招く新たな染色体構造異常の同定

東京バイオテクノロジー専門学校

バイオテクノロジー科 医療開発コース

志原 大蔵

## 要 旨

【背景】アロマターゼ過剰症は、アロマターゼ遺伝子 (*CYP19A1*) の過剰発現に起因する常染色体優性遺伝疾患である。本症男性患者は、思春期前/思春期から女性化乳房症（男性の胸部が女性の乳房のように隆起する疾患）を呈する。近年、Comparative genomic hybridization (CGH) マイクロアレイ解析による染色体の構造異常（欠失や重複）を明らかにすることで、アロマターゼ過剰症の発症機序を推定することが可能になった。これまでアロマターゼ過剰症患者において、11種類の*CYP19A1*近傍の染色体構造異常（*CYP19A1*プロモーター領域の重複、*CYP19A1*上流の逆位または欠失）が同定されている。

【患者家系】発端者は12歳男児。思春期前の9歳頃から両側の乳房腫大を認め、12歳時に乳腺切除術を受けた。弟は9歳頃から、姉は6歳頃から乳房腫大を認めた。父は9歳頃から乳房腫大を認め、13歳時に乳腺切除術を受けた。発端者、弟、姉において成長スパートの低年齢化（発端者と弟：6-7歳、姉：4-6歳）を認めた。

【遺伝子解析】発端者の*CYP19A1* 翻訳領域に変異は同定されなかった。CGH マイクロアレイ解析により、発端者、弟、姉、父の*CYP19A1*の上流領域にヘテロ接合性染色体構造異常（微小欠失）が同定された。この欠失は、*CYP19A1* スタートコドンから154,688塩基離れた198,662塩基の範囲であり、隣接遺伝子*DMXL2*エクソン2-43と*GLDN*エクソン7-10を包含していた。微小欠失周辺の塩基配列解析の結果、本家系の欠失の切断点は既報の切断点とは異なっていた。さらに、患者の乳腺および皮膚組織RNAを用いたRT-PCR法により、*CYP19A1* 翻訳領域に*DMXL2*のプロモーターが結合した*DMXL2*エクソン1-*CYP19A1*エクソン2のキメラmRNAが同定された。

【考察】アロマターゼ過剰症を招く新たな染色体構造異常を同定した。本家系では、広範囲に発現する*DMXL2*遺伝子のプロモーターと*CYP19A1*翻訳領域からなるキメラ遺伝子が形成されたことが*CYP19A1*遺伝子の過剰発現を招いたと推測される。また、融合点の塩基配列から、本家系

の微小欠失はDNA複製エラーによって生じたことが示唆される。これは、15番染色体の *CYP19A1* 近傍領域にはゲノム不安定性を招くモチーフが存在するという仮説を支持する。さらに、本家系において認められた臨床情報と疾患発症年齢から、思春期前におけるアロマターゼ過剰症の患者では、副腎由来のアンドロゲンがエストロゲンの主要な供給源であることが示唆される。

## Abstract

[Background] Aromatase excess syndrome (AEXS) is an autosomal dominant disorder caused by overexpression of *CYP19A1* at 15q21.2. Salient clinical features of AEXS are gynecomastia and advanced bone age resulting from estrogen excess. To date, 11 genomic rearrangements at 15q21.2 have been identified in 27 male patients of AEXS. These rearrangements include duplications involving the promoter region of *CYP19A1*, and deletions and inversions that create chimeric genes consisting of coding exons of *CYP19A1* and promoter-associated exons of neighboring genes.

[Patients] We identified a family with clinically diagnosed AEXS. The proband was a 12-year-old boy ascertained by gynecomastia. His brother and father also exhibited gynecomastia. Assessment of growth records revealed that the proband and his brother had a peak growth velocity at 6–7 years of age.

[Molecular analysis] Copy-number analysis identified heterozygous deletion of 198,662 bp involving exons 2–43 of *DMXL2* and exons 7–10 of *GLDN* in the proband, the father and the brother. The fusion junction was accompanied by 3 bp microhomology, indicating that the deletion results from a replication-based error. This deletion produced a chimeric mRNA consisting of *DMXL2* exon 1 and *CYP19A1* coding exons. The breakpoints of the deletion were apart from those of previously reported deletions.

[Discussion] This study provides evidence of allelic heterogeneity in AEXS. Furthermore, our results indicate that adrenal androgens rather than gonadal androgens serve as the major sources of estrogens in pre-pubertal children with AEXS. Given the small number of reported patients, further studies are necessary to clarify molecular basis and phenotypes of AEXS.

## 略 語

cDNA: complementary DNA

CGH: comparative genomic hybridization

CYP19A1: cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1

E<sub>1</sub>: Estrone

E<sub>2</sub>: Estradiol

E<sub>3</sub>: Estriol

FSH: Follicle stimulating hormone

LINE: long interspersed nuclear element

## 目 次

第1章	序 論.....	1
第2章	女性化乳房症 1 家系 .....	4
第3章	方 法.....	8
第1節	染色体構造異常解析.....	8
第2節	染色体構造異常領域の塩基配列解析.....	15
第3節	<i>CYP19A1</i> 翻訳領域に結合するプロモーター領域の塩基配列解析 .....	17
第4章	結 果.....	21
第1節	15 番染色体の構造異常（微小欠失）の同定.....	21
第2節	欠失の切断点および欠失範囲の同定.....	21
第3節	<i>CYP19A1</i> 翻訳領域に結合するプロモーター領域の塩基配列の同定 ....	21
第5章	考 察.....	26
第6章	参考文献 .....	31
第7章	インターン期間中の研究活動 .....	32
第8章	謝 辞.....	33

## 第1章 序論

性ホルモンは、アンドロゲン（男性ホルモン）とエストロゲン（女性ホルモン）に分類される。この性ホルモンのバランスが保たれることにより、体や心の性差が作られる。アンドロゲンは、思春期以降の男性では主に精巣において産生されるが、男女ともに副腎においても産生されていることが知られている<sup>1)</sup>。アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であり、15番染色体長腕の15q21.2に位置するアロマターゼ遺伝子（*CYP19A1*）によってコードされている<sup>2)</sup>。*CYP19A1* 遺伝子は、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。これらのエクソン1は、*CYP19A1* 遺伝子の発現を組織特異的に制御するプロモーターとして機能している。そのため、*CYP19A1* 遺伝子の翻訳領域に結合するプロモーターの種類により、*CYP19A1* 遺伝子が発現する組織および発現量は制御される。通常、*CYP19A1* 遺伝子の発現は、胎盤や卵巣などの一部の組織を除いて低いレベルに制御されている。

アロマターゼ過剰症は、*CYP19A1* の過剰発現に起因する稀な常染色体優性遺伝疾患である<sup>2)</sup>~<sup>5)</sup>。顕著な臨床症状として、男性患者では、乳房腫大、骨年齢の促進、最終身長低下、性腺機能低下などが認められる<sup>2)</sup>~<sup>5)</sup>。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報告されている<sup>2)</sup>~<sup>5)</sup>。これまで27人のアロマターゼ過剰症男性患者において、11種類の*CYP19A1* 近傍の染色体構造異常が同定されている<sup>2)</sup>~<sup>5)</sup>。これらの染色体構造異常は、*CYP19A1* プロモーター領域の重複、*CYP19A1* 上流領域を含む欠失、*CYP19A1* 上流領域の染色体逆位である<sup>2)</sup>~<sup>5)</sup>。*CYP19A1* 上流領域における欠失例では、広範囲に発現する遺伝子のプロモーターと*CYP19A1* 翻訳領域からなるキメラ遺伝子の形成が*CYP19A1* 遺伝子の過剰発現を招くと推測されている<sup>2),5)</sup>。

これまでに、*CYP19A1* 上流領域欠失の成立にはDNA複製エラー、非相同末端結合、組み換え異常が関与することが示唆されている<sup>1),5),6)</sup>。しかし、報告されている患者数が少ないことから、アロマターゼ過剰症の発症機序には不明な点が多い。

本研究では、女性化乳房症1家系について分子遺伝学的解析を行い、アロマターゼ過剰症の新

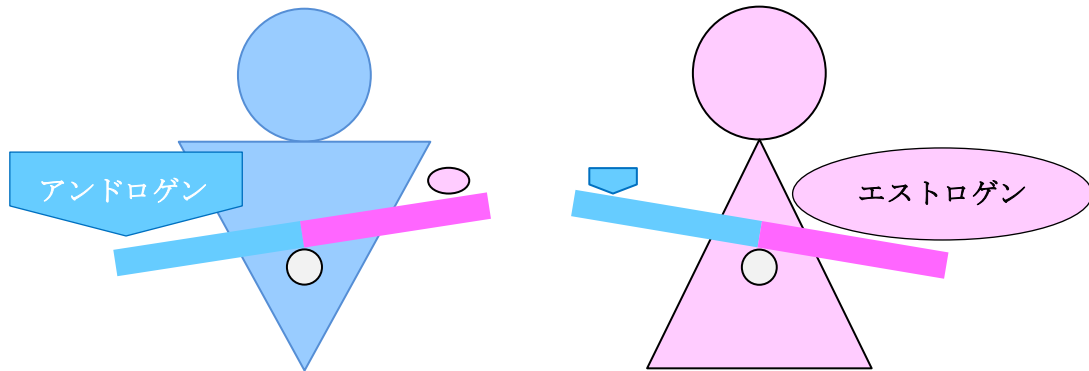
規発症機序を明らかにした。さらに、小児期のアロマターゼ過剰症患者においてエストロゲン過剰産生が生じるメカニズムについて検討を行った。



A

性ホルモン  $\left[ \begin{array}{l} \text{アンドロゲン (男性ホルモン)} \\ \text{エストロゲン (女性ホルモン)} \end{array} \right.$

男性、女性ともに両方の性ホルモンを持っている。



B

アロマターゼ：

アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素である。

15番染色体長腕に位置する *CYP19A1* 遺伝子によってコードされている。

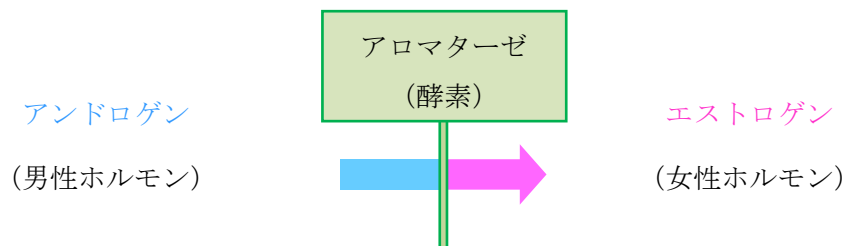


図 1 性ホルモンとアロマターゼの関係

A：性ホルモンの分類

B：アロマターゼの働き

## 第2章 女性化乳房症1家系

本研究は、臨床的に女性化乳房症と診断された1家系について分子遺伝学的解析を行い、疾患発症機序について検討を行った。

発端者を含む家系図を図2Aに示す。発端者(III-2)は12歳男児であり、9歳頃から両側の乳房腫大を認め、12歳時に乳腺切除術を受けた(図2)。弟(III-3)は9歳頃から、姉(III-1)は6歳頃から乳房腫大を認めた。父(II-1)は9歳頃から乳房腫大を認め、13歳時に乳腺切除術を受けた。発端者と弟において低身長は認められなかった(図3)。また、発端者と弟の身体的所見において、精巣、陰毛、陰茎の変化は思春期男児として矛盾せず、女性化乳房症以外の異常所見は確認されなかった。肥満も認められなかった。

乳房発達に作用するエストロゲンは、エストロン( $E_1$ )、エストラジオール( $E_2$ )、エストリオール( $E_3$ )の3種類が知られており、その中で最も強い生理活性を持つのが $E_2$ である。また、エストロゲンは、脳下垂体における卵胞刺激ホルモン(FSH)分泌に対してネガティブフィードバック作用を示す。内分泌検査の結果、父親の $E_2$ はやや高値であり、弟、父のFSHはやや低値であった(表1)。

本家系は、家族歴およびその身体的所見からアロマターゼ過剰症が疑われた。そこで、本家系についてCGHマイクロアレイ解析を行い、*CYP19A1*近傍の染色体構造異常の有無について検討を行った。

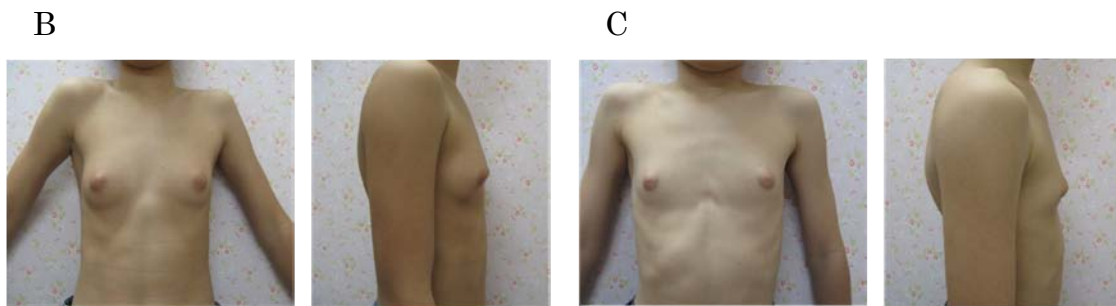
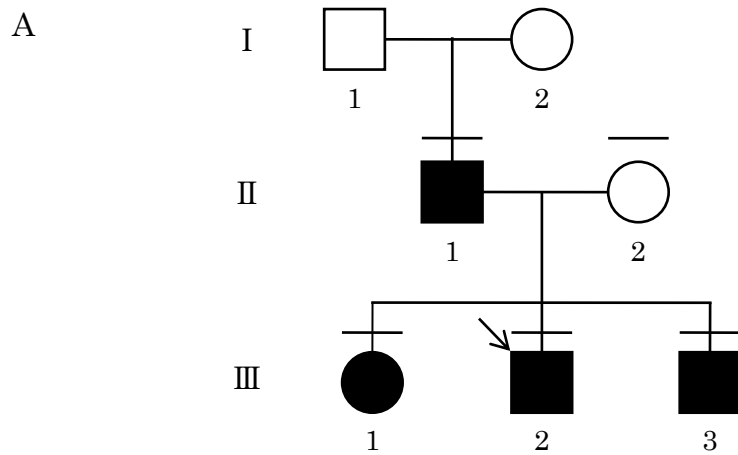


図 2 女性化乳房症を発症した患者の家系図および身体所見

本家系発端者と弟は思春期前から明らかな女性化乳房症を発症した。

A : 家系図

□ : 男性

○ : 女性

■、● : 罹患者

矢印 : 発端者

短い横棒 : 解析を受けた人

B : 発端者 11 歳時の画像 (左 : 正面、右 : 側面)

C : 弟 10 歳時の画像 (左 : 正面、右 : 側面)

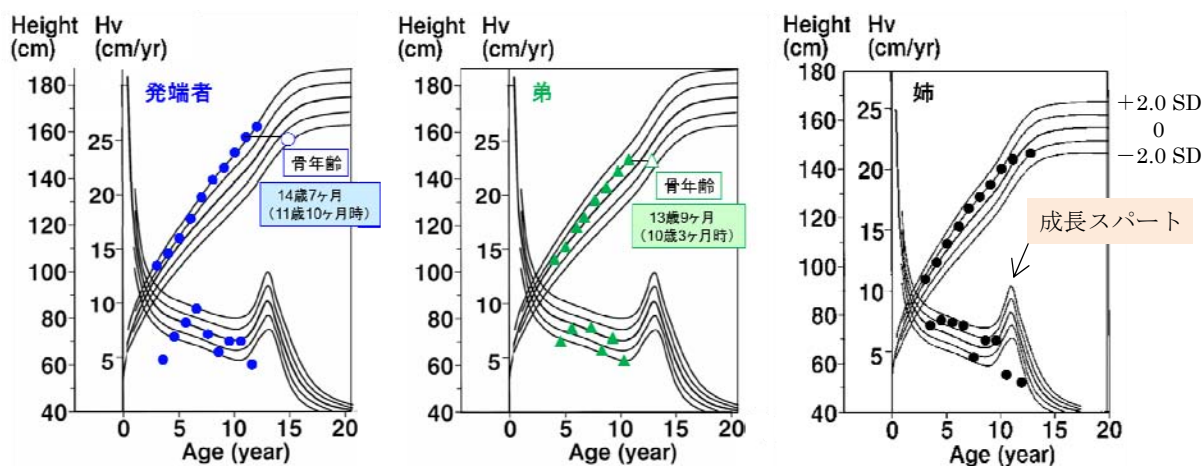


図 3 成長曲線および成長率曲線

発端者、弟、姉において成長スパートの低年齢化（発端者と弟：6-7 歳、姉：4-6 歳）が認められた。

- （青色丸）：発端者の身長および成長率
- ▲（緑色三角）：弟の身長および成長率
- （黒色丸）：姉の身長および成長率
- （白抜き青色丸）：発端者の骨年齢
- △（白抜き緑色三角）：弟の骨年齢

Hv（Height velocity）：1 年間の身長の伸び、成長率

SD（Standard Deviation）：標準偏差

通常、「+2.0 SD」と「-2.0 SD」の間に、全体の約 95%の子どもの身長が入る。

成長スパート：思春期にホルモン量の増加により急速に身長が伸びる。

骨年齢：上段に骨年齢、下段（ ）内に測定年齢を示す。

表 1 臨床所見と内分泌所見

	発端者	弟	父	姉
検査時の年齢	12 歳	10 歳	38 歳	14 歳
臨床所見				
乳房腫大 (Tanner breast stage)	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>Post mastectomy</u>	5
乳房腫大の発症年齢	<u>9 歳</u>	<u>9 歳</u>	<u>9 歳</u>	6 歳
乳腺切除の年齢	<u>12 歳</u>	...	<u>13 歳</u>	...
精巣容量 (ml)	6-8	2-3	未検	...
陰毛 (Tanner stage)	2	1	未検	4
初経年齢	...	...	...	<u>9 歳 3 ヶ月</u> <sup>a</sup>
内分泌所見				
	測定値 (基準値)			
LH (mIU/ml)	< 0.6 (< 0.6-3.6)	< 0.6 (< 0.6-1.8)	1.7 (0.8-5.7)	6.8 (0.2-14.2)
FSH (mIU/ml)	2.3 (0.7-5.8)	<b>&lt; 0.4</b> (0.5-4.7)	<b>1.6</b> (2.0-8.3)	2.4 (1.4-10.1)
Testosterone (ng/ml)	2.83 (< 5.13)	1.64 (< 3.17)	2.87 (1.31-8.71)	0.37 (0.09-0.76)
Estradiol (pg/ml)	< 25 (< 25)	< 25 (< 25)	<b>49</b> (15-35)	246 <sup>b</sup>
Prolactin (ng/ml)	5.2 (1.3-10.8)	8.0 (1.3-10.9)	未検	未検
DHEA-S (ng/ml)	1060 (248-2260)	945 (151-1750)	未検	未検

低値を青文字、高値を赤文字、異常所見を太字下線で示す。

<sup>a</sup> 日本人の初経年齢：12.25 ± 1.25 歳

<sup>b</sup> 非妊期における血中 Estradiol 値：卵胞期 (11-230 pg/ml)、排卵期 (120-390 pg/ml)、黄体期 (9-230 pg/ml)

## 第3章 方法

本研究は、(独) 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、患者の血液由来ゲノム DNA、乳腺および皮膚組織由来 RNA を抽出し、実験に使用した。

### 第1節 染色体構造異常解析

#### (1) 血液由来ゲノム DNA の抽出および精製

本家系（発端者、弟、姉、父、母）の血液からゲノム DNA の抽出および精製を行った。ゲノム DNA の抽出および精製は、Gentra Puregene Cell Kit (QIAGEN®) を用いた。実験手順の詳細を下記に示す。

50 ml のチューブに、3 ml の血液と 30 ml の RBC Lysis Solution を加えて転倒混和し、氷上にて 10 分間静置後、4°C、3,500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、風乾により白血球細胞のペレットを得た。得られた白血球細胞ペレットに 1.5 ml の Cell Lysis Solution と 15  $\mu$ l の 4 mg/ml RNase A Solution を加えて転倒混和し、37°C にて 30 分間振とうした。そこに、7.5  $\mu$ l の 20 mg/ml Protein K を加えて転倒混和後、37°C にて 24 時間振とうした。翌日、0.5 ml の Protein Precipitation Solution を加えて転倒混和後、4°C、3,500 rpm で 15 分間遠心した。遠心により得られた上清を 15 ml のチューブに移し、1.5 ml のイソプロパノール (2-propanol) を加えて転倒混和後、4°C、3,500 rpm で 15 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、得られたゲノム DNA ペレットに 1 ml の 70%エタノールを加えて転倒混和後、4°C、14,000 rpm で 20 分間遠心した。70%エタノール洗浄の工程を 2 回行った。遠心後、上清を捨て、風乾後、250  $\mu$ l の TE Buffer を加え、37°C にて 24 時間保温してゲノム DNA 溶液を得た。得られたゲノム DNA 溶液は、ナノドロップにてゲノム DNA 濃度の測定を行い、次の解析 (CGH マイクロアレイによる染色体構造異常の解析、塩基配列解析) に使用するまで 4°C で保存した。

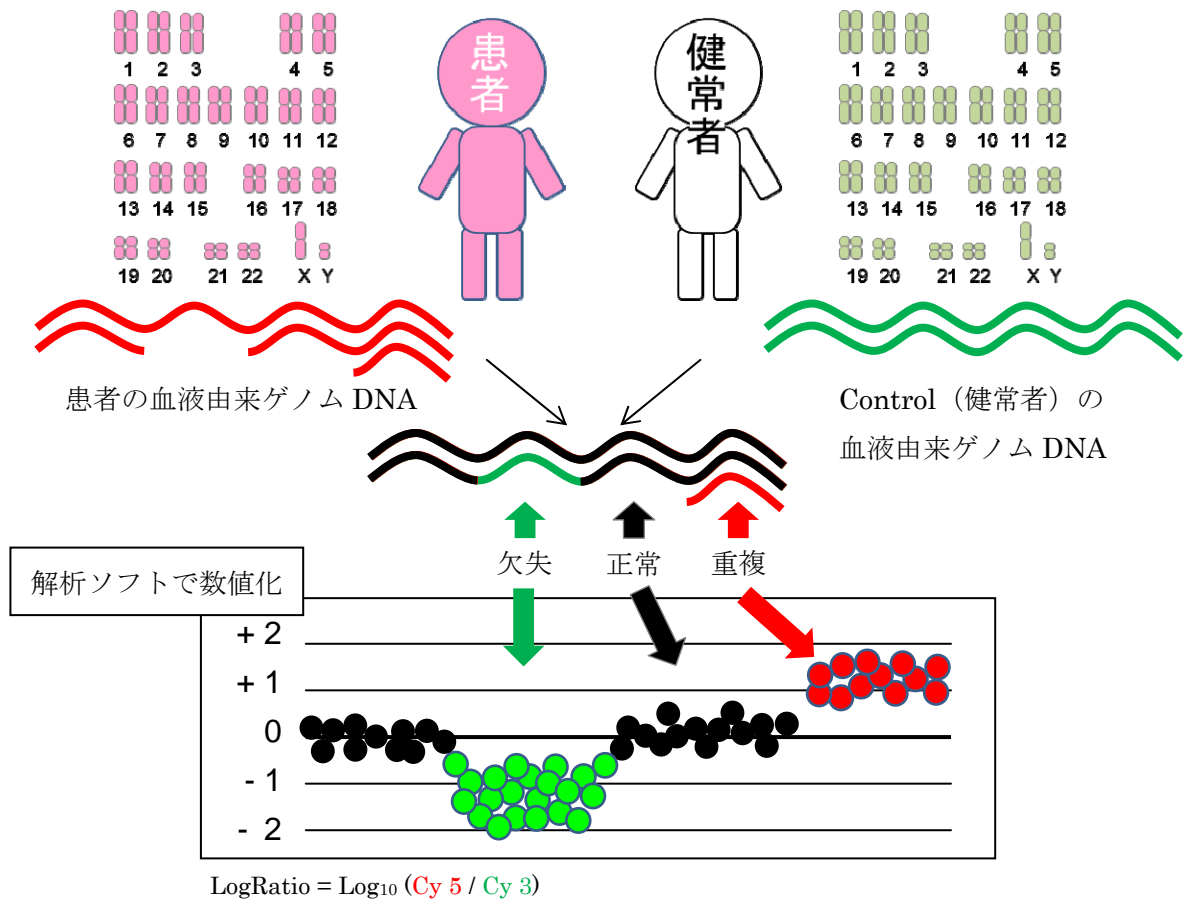


図 4 CGH マイクロアレイによる染色体構造異常の解析方法

全染色体を対象にしてゲノム DNA の欠失、重複などの染色体構造の異常を解析できる。

Cyanine 5 と Cyanine 3 の色素強度の比 (LogRatio) を数値化し、患者と Control (健常者) の染色体構造の比較を行う。

患者ゲノム DNA : Cyanine 5-dUTP でラベル化

Control (健常者) ゲノム DNA : Cyanine 3-dUTP でラベル化

- (黒の点) : 患者染色体の正常領域
- (緑の点) : 患者染色体の欠失領域
- (赤の点) : 患者染色体の重複領域

## (2) CGH マイクロアレイによる染色体構造異常の解析

CGH マイクロアレイにより、*CYP19A1* 近傍の染色体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 8 x 60 K フォーマットの CGH カスタムマイクロアレイ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を解析に使用した。

本解析は、アジレント社の In-situ オリゴ DNA マイクロアレイキット、アレイ CGH (aCGH) 法 Enzymatic ラベル化法 (血液、細胞、組織サンプル) 操作テキスト Protocol Ver. 7.1 (2012 年 8 月改訂) に従い、実験を行った。実験手順の詳細を下記に示す。

### 1. ゲノム DNA サンプルの準備

8 x 60 K フォーマットに基づき、0.2 ml のチューブに、10.1  $\mu$ l の患者検体サンプル (500 ng の患者血液由来ゲノム DNA に蒸留水を加えて調製) と、10.1  $\mu$ l の Control サンプル (500 ng の検体と同じ性別の健常者血液由来ゲノム DNA に蒸留水を加えて調製) をそれぞれ準備した。

### 2. ゲノム DNA の制限酵素反応

0.2 ml のチューブにそれぞれ入っている患者検体サンプル、Control サンプルについて制限酵素反応を行い、適切な長さにゲノム DNA を切断した。制限酵素の反応条件および使用した試薬を表 2A に示す。

### 3. ゲノム DNA のラベル化

制限酵素反応後のそれぞれのサンプルに 2.5  $\mu$ l の Random Primer を加え、95°C で 3 分間インキュベート後、氷上にて 5 分静置した。患者検体サンプルは Cyanine 5-dUTP、Control サンプルは Cyanine 3-dUTP でラベル化を行った。ラベル化の反応条件および使用した試薬を表 2B に示す。



#### 4. ラベル化 DNA の精製

ラベル化 DNA の精製の操作手順を図 5A~D に示す。430  $\mu\text{l}$  の 1 x TE Buffer が入った 1.5 ml のチューブに、ラベル化されたそれぞれの DNA サンプルを加えた (図 5A)。ピペッティングでよく混和したラベル化 DNA 溶液 (455  $\mu\text{l}$ ) を 2 ml のコレクションチューブにセットした精製用カラム (SureTag Labeling Kit Cat 5190-3400) に移し、室温、14,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、精製用カラムを素通りした溶液を捨て (図 5B)、精製用カラムを元のチューブにセットし、480  $\mu\text{l}$  の 1 x TE Buffer を加えて、室温、14,000 rpm で 30 分間遠心した (図 5C)。遠心後、新しい 2 ml のコレクションチューブに精製用カラムを逆さまにセットし、室温、1,000 rpm で 1 分間遠心し、ラベル化 DNA を回収した (図 5D)。回収した液量を測り、9.5  $\mu\text{l}$  となるように 1 x TE Buffer を加え、ナノドロップにてラベル化 DNA 濃度を測定し、ラベル化 DNA の収量および蛍光取り込み率を計算した。

#### 5. ラベル化 DNA のハイブリダイゼーション

1.5 ml のチューブに、精製後のラベル化 DNA サンプル (Cyanine 5-dUTP でラベル化した患者検体サンプルと、Cyanine 3-dUTP でラベル化した Control サンプル) および試薬を加えて、45  $\mu\text{l}$  のハイブリダイゼーション溶液の調製を行った。反応条件および使用した試薬を表 2C に示す。そこから 40  $\mu\text{l}$  をチャンバーベースにセットされたガスケットスライド上のウェル (図 5E) にアプライした。8 x 60 K フォーマットの CGH カスタムマイクロアレイスライドをアレイ搭載面が下向きになるようにガスケットスライド上に載せて密封し、チャンバーカバーをセットしてクランプアセンブリで固定した (図 5F)。ハイブリダイゼーション溶液がガスケットスライドの全体に行きわたっていることを確認し、65°C のハイブリダイゼーションオープンにセットし、24 時間のハイブリダイゼーションを行った。

#### 6. CGH マイクロアレイの洗浄

ハイブリダイゼーションオープンからハイブリダイゼーションチャンバーを取り出し、温度の

下降、空気および光に触れる時間を最小限に抑えるように洗浄作業を行った。アレイが搭載されている面に触れないように注意しながら、洗浄バッファ 1（室温）の中で CGH マイクロアレイスライドとガスケットスライドにピンセットの先端を差し込み、緩やかにスライド同士を離した。CGH マイクロアレイスライドをスライドラックにセットし、新たな洗浄バッファ 1（室温）で 5 分間、洗浄バッファ 2（37°C）で 1 分間の洗浄を行い、洗浄バッファ 2 から CGH マイクロアレイスライドをゆっくり取り出した。

#### 7. Agilent スキャナを用いたスキヤニング、ソフトウェアによる数値化

CGH マイクロアレイスライドをスライドホルダーにセットし、Agilent スキャナを用いてスキヤニングした。Feature Extraction ソフトウェアによる tif 画像（スキャン画像データ）の確認後、数値化データに変換、Agilent Genomic Workbench 7.0（Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA）にて解析した。

表 2 CGH マイクロアレイの実験手順

A ゲノム DNA の制限酵素反応

1 反応あたり	
ゲノム DNA サンプル	10.1 $\mu$ l
Nuclease-Free Water	1.0 $\mu$ l
10 x Buffer C	1.3 $\mu$ l
BSA	0.1 $\mu$ l
Alu I (10 U/ $\mu$ L)	0.25 $\mu$ l
Rsa I (10 U/ $\mu$ L)	0.25 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>13.0 <math>\mu</math>l</b>

反応条件

37°C	2 hour
65°C	20 min
12°C	Forever

B ゲノム DNA のラベル化

1 反応あたり	
ゲノム DNA 制限酵素反応済サンプル (Random Primer を含む)	15.5 $\mu$ l
5 x Reaction Buffer	5.0 $\mu$ l
10 x dNTPs	2.5 $\mu$ l
Cyanine 5-dUTP (患者サンプル) or Cyanine 3-dUTP (Control サンプル)	1.5 $\mu$ l
Exo (-) Klenow fragment	0.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>25.0 <math>\mu</math>l</b>

反応条件

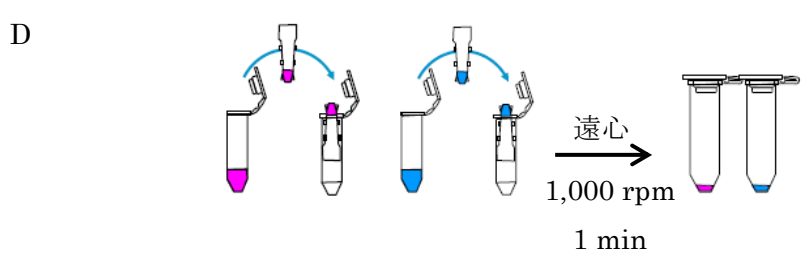
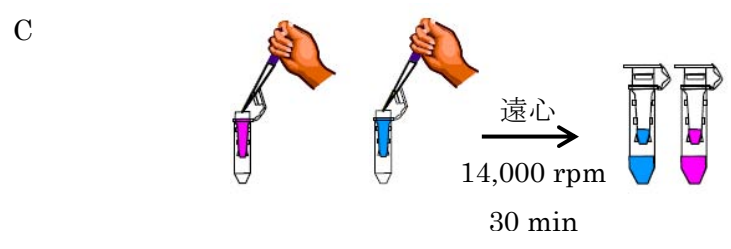
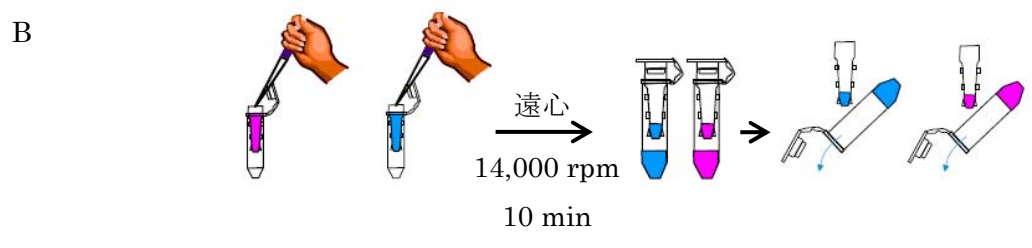
37°C	2 hour
65°C	10 min
12°C	Forever

C ハイブリダイゼーション溶液の調製

1 反応あたり	
ラベル化 DNA (患者サンプル)	8.0 $\mu$ l
ラベル化 DNA (Control サンプル)	8.0 $\mu$ l
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)	2.0 $\mu$ l
10 x aCGH Blocking Agent	4.5 $\mu$ l
2 x HI-RPM Hybridization Buffer	22.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>45.0 <math>\mu</math>l</b>

反応条件

95°C	3 min
37°C	30 min



アジレント In-situ オリゴ DNA マイクロアレイキット  
アレイ CGH (aCGH)法 Enzymatic ラベル化法 (血液、細胞、組織サンプル)  
操作テキスト Protocol Ver. 7.1 (2012年8月改訂) より改変



図 5 ラベル化 DNA の精製手順とラベル化 DNA のハイブリダイゼーション時に使用する道具

## 第2節 染色体構造異常領域の塩基配列解析

### (1) 切断点を含む PCR 産物の増幅

CGH マイクロアレイ解析により欠失が同定された発端者のゲノム DNA 溶液を用いて、欠失の切断点を含む領域について PCR 産物の増幅を行った。欠失の切断点周辺に設計したプライマーを用いて Long-PCR を行い、切断点を含む領域の PCR 産物（約 3,500 塩基）を得た。PCR の反応条件および使用したプライマーを表 3A、表 3C に示す。

### (2) 切断点を含む PCR 産物の塩基配列解析

得られた約 3,500 塩基の PCR 産物を用いて、サンガー法による直接塩基配列決定法を行い、切断点を含む塩基配列の情報を得た。直接塩基配列決定には、GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit を用い、ベックマン CEQ8000 シークエンサーを使用した。PCR の反応条件および使用したプライマーを表 3B、表 3C に示す。得られた塩基配列は、NCBI BLAST Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で解析し、切断点の位置と構造を決定した。

表 3 PCR 条件および Primers

A Long-PCR 条件

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/ $\mu$ l)	1.6 $\mu$ l
5 x PrimeSTAR GXL Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	4.0 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	0.8 $\mu$ l
P1 Primer (10 pmol/l)	2.0 $\mu$ l
P2 Primer (10 pmol/l)	2.0 $\mu$ l
DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8.6 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20.0 $\mu$ l

	RCR	
98°C	10 sec	} 35 cycles
64°C	15 sec	
68°C	1 min	
12°C	Forever	

B Direct sequencing 条件

DTCS Quick Start Master Mix	4.0 $\mu$ l
5M Betain	4.0 $\mu$ l
Direct sequencing Primer (10 pmol/l)	1.0 $\mu$ l
Long-PCR Template	2.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9.0 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20.0 $\mu$ l

	RCR	
96°C	20 sec	} 35 cycles
55°C	20 sec	
60°C	4 min	
12°C	Forever	

C Primers

Name	Sequence (5'→3')
P1	TCAGAGGGGAGGCAAACTA
P2	CGCAGATGTTCTCAAACA
P3	CAGTCCCACCAGCAGTGTA

P1, P2: Long-PCR primers, P3: Direct sequencing primer

### 第3節 *CYP19A1* 翻訳領域に結合するプロモーター領域の塩基配列解析

#### (1) 患者乳腺および皮膚組織由来 RNA の抽出および精製

RNA 安定化溶液である RNAlater Solution (Life Technologies) 中に、保存されていた発端者の乳腺および皮膚組織から RNA の抽出および精製を行った。RNA の抽出および精製は、ISOGEN (Nippon gene) と TURBO DNA-free Kit (Life Technologies) と QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) を用いた。実験手順の詳細を下記に示す。

#### 1. RNA の粗精製および DNase 処理

2 ml の組織破碎用専用チューブに、発端者の組織（乳腺または皮膚）の一部と 100  $\mu$ l の ISOGEN と直径 5 mm のビーズ 1 個を加え、ビーズ式細胞破碎装置 (Micro smash™ MS-100R) を用いて、4°C、3,800 rpm、30 秒の破碎操作を 2 回行い、組織を完全に破碎した。破碎後の溶液を 1.5 ml のチューブに移し、600  $\mu$ l の ISOGEN と 200  $\mu$ l のクロロホルムを加えて 15 秒間転倒混和し、室温にて 3 分間静置した。次に、4°C、14,000 rpm で 15 分間遠心を行い、得られた上層を新しい 1.5 ml のチューブに移し、500  $\mu$ l のイソプロパノール (2-propanol) を加えて転倒混和後、室温にて 10 分間静置した。次に、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、得られた RNA ペレットに 1 ml の 70%エタノールを加えて転倒混和後、4°C、14,000 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、風乾後、100  $\mu$ l の RNase フリー水を加え、RNA 粗精製溶液を得た。得られた RNA 粗精製溶液は、TURBO DNA-free Kit を用いて、DNase 処理を行った。DNase 処理後、ナノドロップにて RNA 濃度の測定を行い、収量をもとに RNase フリー水で 100  $\mu$ l の RNA 溶液に調製し、クリーンアップに使用した。

#### 2. RNA のクリーンアップ

1.5 ml のチューブに、100  $\mu$ l の RNA 溶液 (DNase 処理済み) と 350  $\mu$ l の Buffer RLT mix (Buffer RLT :  $\beta$ -メルカプトエタノール = 1 ml : 10  $\mu$ l) を加えて転倒混和した。そこに 250  $\mu$ l

の 100%エタノールを加えて、ピペッティングでよく混和した RNA 溶液 (700  $\mu$ l) を 2 ml のコレクションチューブにセットした QIAamp スピнкаラムに移し、室温、14,000 rpm で 15 秒間遠心した。全ての作業は、スピнкаラムの縁を濡らさないように注意して行った。遠心後、QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、500  $\mu$ l の Buffer RPE を加えて、室温、14,000 rpm で 15 秒間遠心した。遠心後、QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、500  $\mu$ l の Buffer RPE を加えて、室温、14,000 rpm で 3 分間遠心した。遠心後、QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、室温、14,000 rpm で 1 分間遠心した。遠心後、QIAamp スピнкаラムを新しい 1.5 ml のチューブにセットし、QIAamp スピнкаラムのメンブレン上に 30  $\mu$ l の RNase フリー水を添加し、室温 14,000 rpm で 1 分間遠心し、RNA クリーンアップ溶液を得た。得られた RNA 溶液は、ナノドロップにて RNA 濃度の測定を行い、次の解析 (ワンステップ RT-PCR による cDNA の合成および PCR 産物の増幅) に使用するまで -80°C で保存した。

## (2) ワンステップ RT-PCR による cDNA の合成および PCR 産物の増幅

本実験は、逆転写反応により非常に不安定な RNA から cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として PCR を行う。今回は、これらの反応をワンステップで行った。cDNA の合成および PCR 産物の増幅は、SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies) を用いた。

発端者の乳腺または皮膚組織由来 RNA 溶液と、*DMXL2* エクソン 1 と *CYP19A1* エクソン 2 に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行い、*CYP19A1* 翻訳領域に結合するプロモーター領域を含む PCR 産物 (約 120 塩基) を得た。ワンステップ RT-PCR の反応条件および使用したプライマーを表 4A、B に示す。

## (3) *CYP19A1* 翻訳領域に結合するプロモーター領域を含む RT-PCR 産物の塩基配列解析

得られた約 120 塩基の RT-PCR 産物を用いて、サンガー法による直接塩基配列決定法を行い、



*CYP19A1* 翻訳領域に結合するプロモーター領域の塩基配列の情報を得た。直接塩基配列決定には、GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit を用い、ベックマン CEQ8000 シークエンサーを使用した。RT-PCR の反応条件および使用したプライマーを表 3B、表 4B に示す。得られた塩基配列は、NCBI BLAST Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で解析し、*CYP19A1* 翻訳領域に結合するプロモーター領域の塩基配列を決定した。

表 4 RT-PCR 条件および Primers

A RT-PCR PCR 条件

2 x Reaction Mix	6.25 $\mu$ l
Template RNA (100 ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Nuclease-Free Water	4.75 $\mu$ l
<i>DMXL2</i> E1 For new Primer (10 pmol/l)	0.25 $\mu$ l
<i>CYP19A1</i> RACE Rev Primer (10 pmol/l)	0.25 $\mu$ l
SuperScript® III RT/ Platinum® Taq Mix	0.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>12.5 <math>\mu</math>l</b>

RCR	
50°C	30 min
94°C	2 min
94°C	30 sec
64°C	30 sec
72°C	90 sec
72°C	5 min
4°C	10 min

} 35 cycles

B RT-PCR および Direct sequencing Primers

Name	Sequence (5'→3')
<i>DMXL2</i> E1 For	CAACCCTGGAGACAACCTGCTA
<i>CYP19A1</i> E2 Rev	CAAACCATCTTGTGTTTCCTTGA

## 第4章 結果

### 第1節 15番染色体の構造異常（微小欠失）の同定

CGH マイクロアレイ解析の結果を図6に示す。発端者の15番染色体にヘテロ接合性染色体構造異常（微小欠失）が同定された（図6A、緑色の点の集まり）。また、弟、父、姉にも、発端者と同じ領域にヘテロ接合性微小欠失が同定された（図6B~D、緑色の点の集まり）。しかし、母親の同じ領域に欠失は確認されなかった（図6E）。このことから、発端者の染色体微小欠失は、父親由来であることが明らかになった。

### 第2節 欠失の切断点および欠失範囲の同定

欠失の切断点を含む領域について、サンガー法による塩基配列解析を行い、得られた結果を図7に示す。実験の結果、CGH マイクロアレイ解析によって同定された欠失の切断点を同定した（図7の塩基と塩基）。切断点の配列から、本家系では、*CYP19A1*のスタートコドンから154,688塩基離れた領域に、198,662塩基の欠失範囲が存在することが明らかになった。この欠失は、*CYP19A1*の上流にある隣接遺伝子 *DMXL2*のエクソン2-43と *GLDN*のエクソン7-10を包含していた（図7中段）。それぞれの切断点について詳細な解析の結果、*DMXL2*イントロン1はLINE1配列内であり、*GLDN*エクソン6は反復配列外であった（図7中段）。また、欠失範囲の融合点は3塩基の重複を伴っていた（図7下段）。

### 第3節 *CYP19A1* 翻訳領域に結合するプロモーター領域の塩基配列の同定

患者乳腺および皮膚組織で発現している *CYP19A1* mRNA の塩基配列解析の結果を図8に示す。塩基配列から、*CYP19A1* 翻訳領域に *CYP19A1* のプロモーターが結合した本来の *CYP19A1* mRNA が同定された（データ未掲載）。さらに、*CYP19A1* 翻訳領域に *DMXL2* のプロモーターが結合した *DMXL2* エクソン1 - *CYP19A1* エクソン2 のキメラ mRNA の塩基配列が得られた（図8下段）。このキメラ mRNA の存在は、欠失によって *DMXL2* エクソン1 -

*CYP19A1* エクソン 2 の間でスプライスが生じ (図 8 中段)、その結果 *CYP19A1* 翻訳領域が *DMXL2* の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。

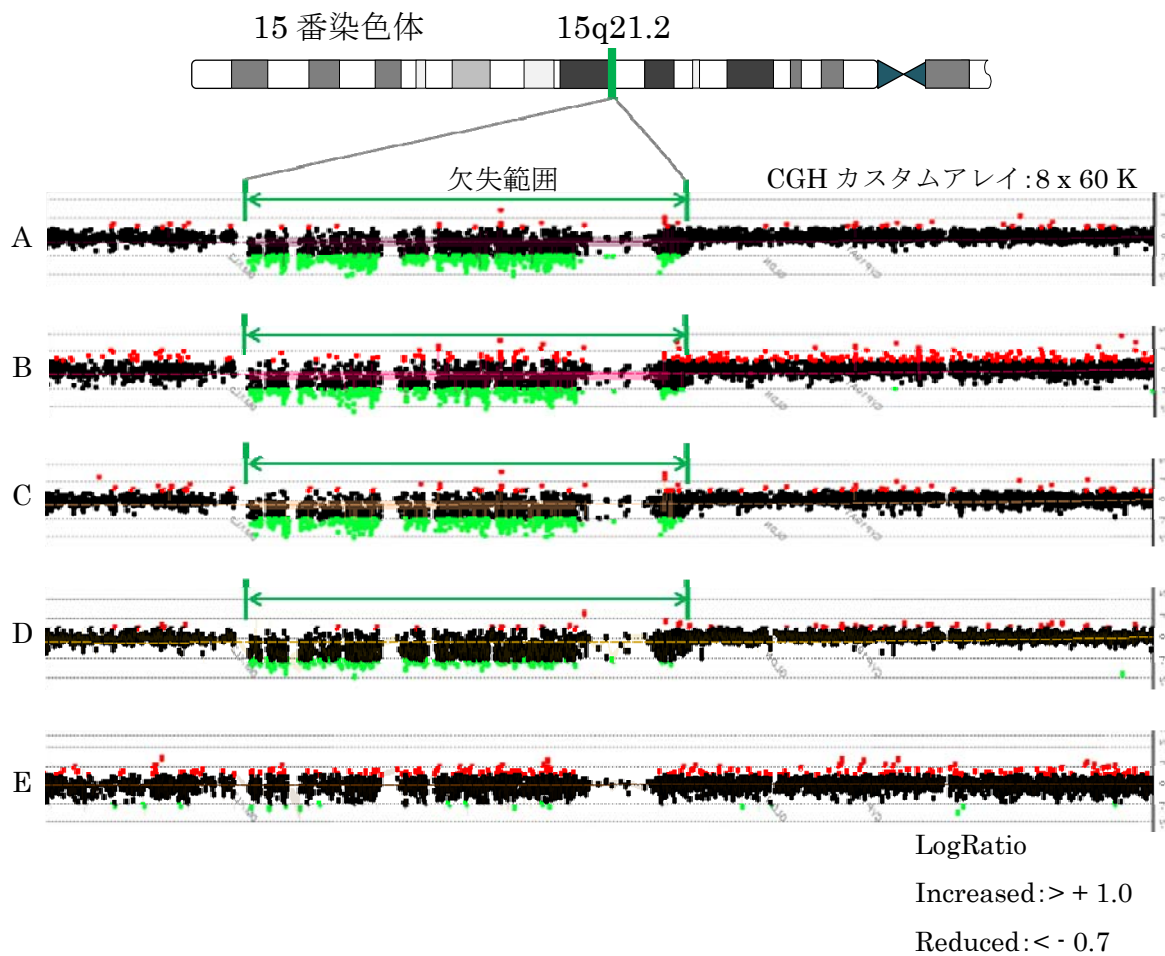


図 6 CGH マイクロアレイ解析結果および欠失範囲

発端者、弟、父、姉において、15 番染色体の同じ領域にヘテロ接合性染色体構造異常（微小欠失）が同定された。

A：発端者

B：弟

C：父

D：姉

E：母

緑色の点の集まり：健常者と比較した時に示される解析対象者の欠失範囲

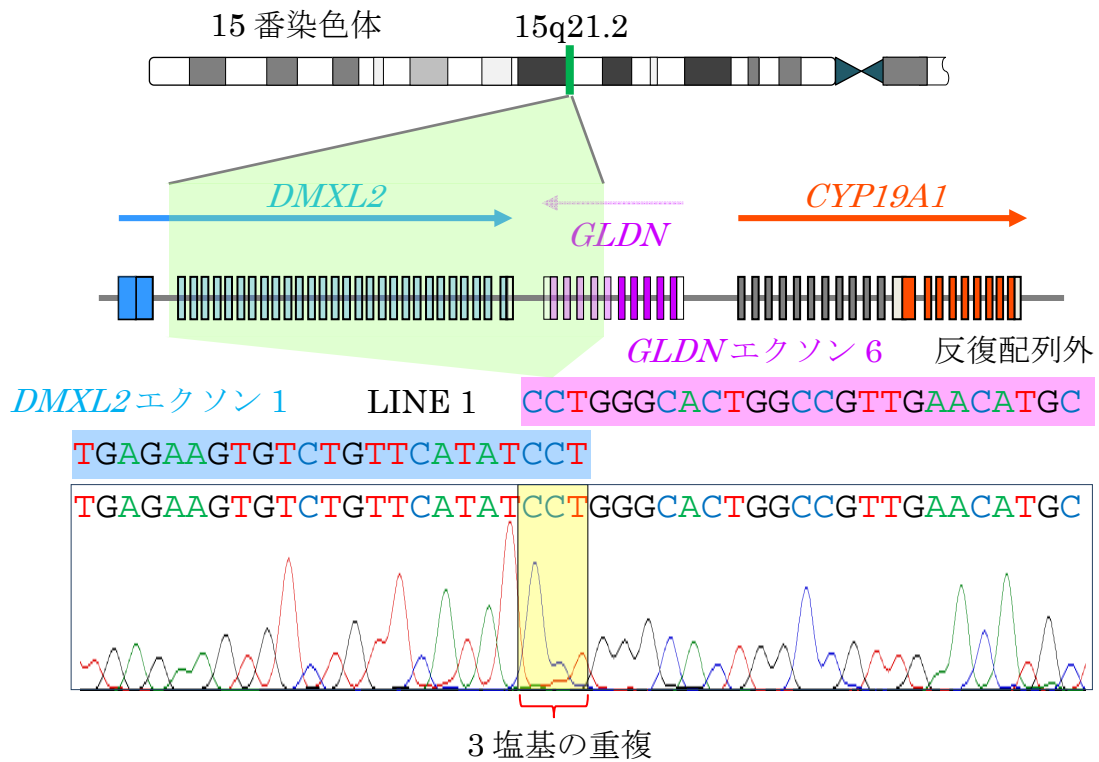


図 7 欠失の切断点および欠失範囲の同定

本家系の欠失は、*CYP19A1* の上流にある隣接遺伝子 *DMXL2* のエクソン 2 - 43 と *GLDN* のエクソン 7 - 10 を包含していた。

緑色：欠失領域

LINE 1：反復配列

塩基：*DMXL2*エクソン 1 の塩基配列

塩基：*GLDN*エクソン 6 の塩基配列

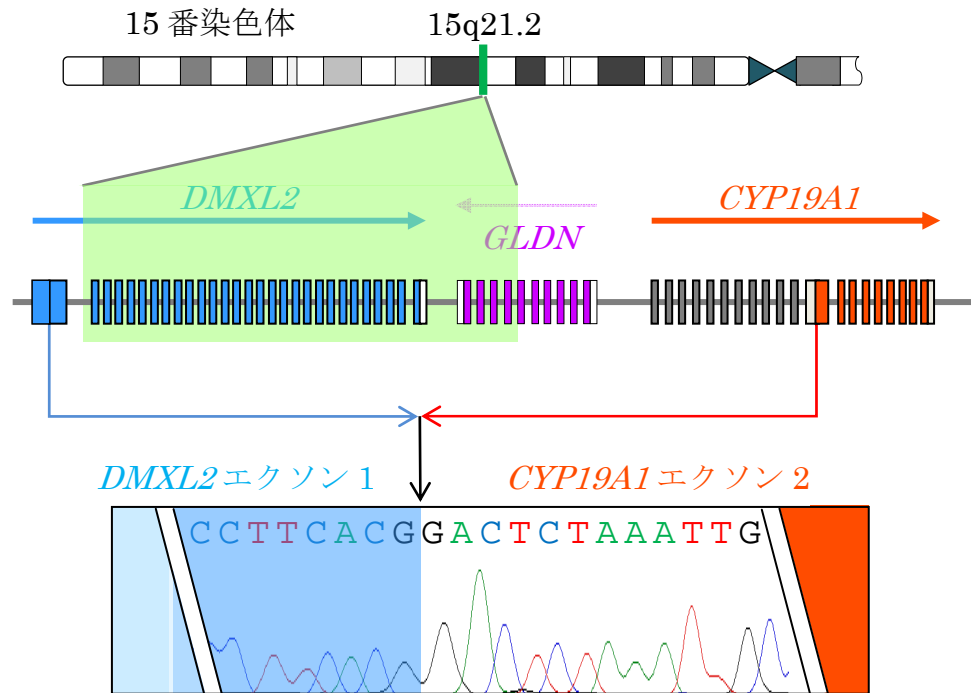


図 8 *DMXL2*エクソン 1 - *CYP19A1*エクソン 2 のキメラ mRNA の同定

*CYP19A1* 翻訳領域に *DMXL2* のプロモーターが結合した *DMXL2* エクソン 1 - *CYP19A1* エクソン 2 のキメラ mRNA の塩基配列が得られた。

- 薄い青色 : *DMXL2* エクソン 1 非翻訳領域
- 濃い青色 : *DMXL2* エクソン 1 翻訳領域
- 白 色 : *CYP19A1* エクソン 2 非翻訳領域
- 赤 色 : *CYP19A1* エクソン 2 翻訳領域

## 第5章 考 察

女性化乳房症1家系の解析を行い、15番染色体の構造異常（微小欠失）を同定した<sup>7)</sup>。これまでにアロマトラーゼ過剰症において、3種類の *CYP19A1* 上流領域を含む欠失が報告されている<sup>2)~5)</sup>。そこで、本家系の欠失範囲と既報告の3種類の欠失範囲を比較したところ、本家系の欠失範囲は既報告の3種類とは異なっていることが明らかになった（図9）<sup>5),7)</sup>。本研究により、アロマトラーゼ過剰症を招く新たな染色体構造異常が同定された<sup>7)</sup>。これまでに、欠失陽性のアロマトラーゼ過剰症患者では、*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の増加による転写効率増加が疾患発症の原因であると報告されている<sup>2),5)</sup>。また、*DMXL2* 遺伝子は、多くの組織で発現していることが知られている<sup>2)</sup>。実際、本家系発端者の乳腺および皮膚組織を用いた解析から、*DMXL2* エクソン1 - *CYP19A1* エクソン2 キメラ mRNA が同定された（図8）<sup>7)</sup>。したがって、本家系では、*CYP19A1* 翻訳領域に本来のプロモーターが結合した *CYP19A1* 遺伝子の発現のほかに、広範囲に発現する *DMXL2* 遺伝子のプロモーターと *CYP19A1* 翻訳領域からなるキメラ遺伝子が形成されたことが *CYP19A1* 遺伝子の過剰発現を招いたと推測される（図11）<sup>2),5),7)</sup>。

本家系における欠失の切断点は、一方が LINE 1 配列内、他方が反復配列外にあり、3塩基の重複を伴っていた<sup>7)</sup>。このことから、本家系の微小欠失は、DNA 複製エラーによって生じたことが示唆される（図10 上段）<sup>6),7)</sup>。また、既報告の家系 C の欠失は非相同末端結合、家系 D - F の欠失は組み換え異常、家系 2 の欠失は DNA 複製エラーにより生じることに一致する（図10）<sup>2),5),6)</sup>。このように、欠失陽性のアロマトラーゼ過剰症患者において、*CYP19A1* 上流領域に多様な染色体構造異常の存在が報告されており、本研究の成績は15番染色体領域にはゲノム不安定性を招くモチーフが存在するという仮説を支持する<sup>2),5)</sup>。

さらに、本家系発端者と弟は思春期前から明らかな女性化乳房症を発症し、発端者、弟、姉において成長スパートの低年齢化（発端者と弟：6 - 7歳、姉：4 - 6歳）が認められた（図3）<sup>7)</sup>。このことから、思春期前におけるアロマトラーゼ過剰症の患者では、副腎由来のアンドロゲンがエ



ストロゲンの主要な供給源であることが示唆される<sup>1)</sup>。また、アジアの子供たちの副腎性アンドロゲン産生の増加は通常 6 - 7 歳で起こること、精巣でのアンドロゲン分泌は思春期まで開始されていないことが知られている<sup>1)</sup>。実際、アロマターゼは主要な副腎アンドロゲンの 1 つであるアンドロステンジオンをエストロン ( $E_1$ ) に変換する。思春期前の男児において体内循環するエストラジオール ( $E_2$ ) より  $E_1$  が女性化乳房症の発症に関与していると仮定すれば、明らかな女性化乳房症を発症していたにもかかわらず、発端者と弟の血中  $E_2$  濃度が検出感度以下であったことは説明可能である。本家系では血中  $E_1$  濃度の測定を行っていないため、この仮説は推測の域を出ていない。しかし、これまでにアロマターゼ過剰症患者において、アンドロステンジオンの代謝産物である  $E_1$  が高値であったと報告されている<sup>2)</sup>。

本研究の結果をもとに、アロマターゼ過剰症であると確定診断された発端者の弟は、アロマターゼ阻害剤を用いた治療が行われ、女性化乳房症の症状が抑えられている。本研究の成果は、アロマターゼ過剰症患者の診断と治療法の決定に貢献する。

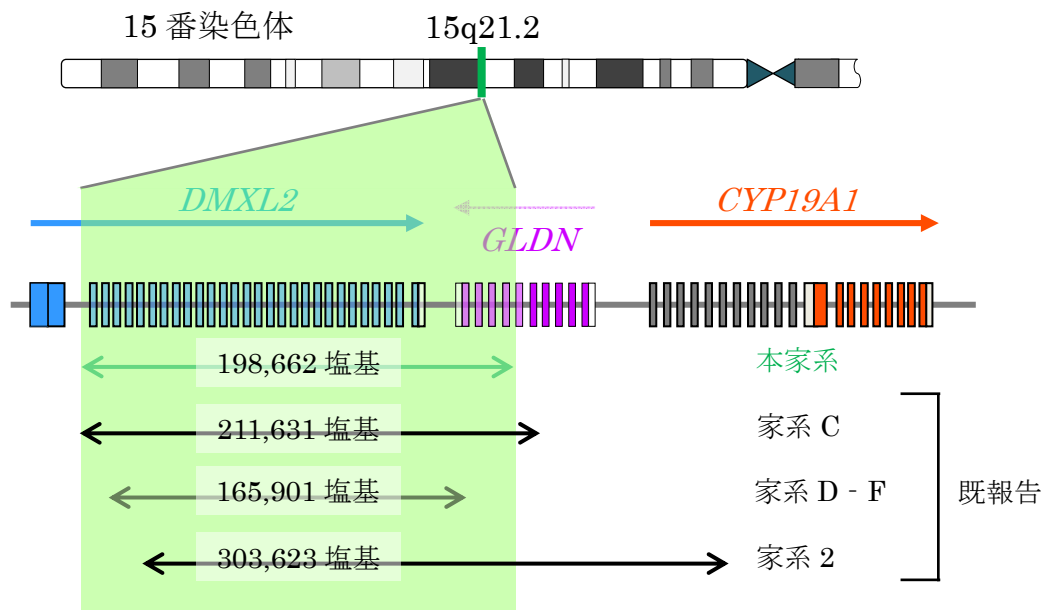


図 9 本家系と既報告の欠失範囲の比較

本家系の欠失範囲は、既報告の3種類とは異なっていた。

家系 C : 参考文献 2

家系 D - F : 参考文献 2

家系 2 : 参考文献 5

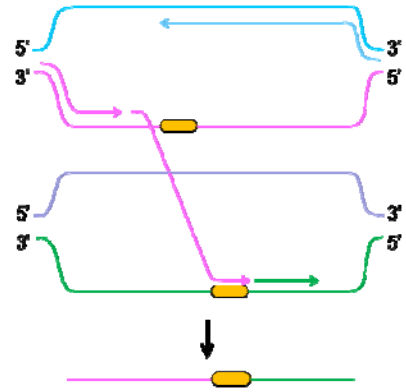
## DNA複製エラー

### FoSTeS

(Fork Stalling and Template Switching)

#### 特徴

- ・ 反復配列とは無関係である。
- ・ 通常、1 - 4 塩基程度の相同領域を有する。
- ・ Complex rearrangements だけでなく、単純な欠失や重複の原因にもなる。
- ・ 染色体の特定の部位に起こりやすい。
- ・ 家系 2、本家系



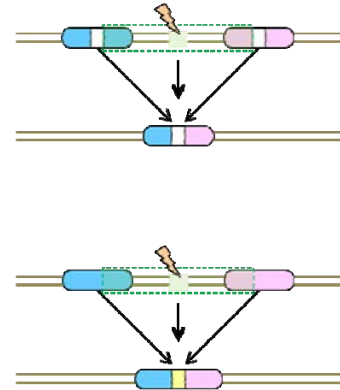
## 非相同末端結合

### NHEJ

(Non-homologous end joining)

#### 特徴

- ・ DNA 末端を直接つなぎ合わせる。
- ・ DNA 末端の接合部において変異が起こりやすい。
- ・ 家系 C



## 組み換え異常

### NAHR

(Non-allelic homologous recombination)

#### 特徴

- ・ 切断点は、同一の反復配列内に存在する。
- ・ 同一染色体上、あるいは異なる染色体上において起こる。
- ・ 家系 D - F

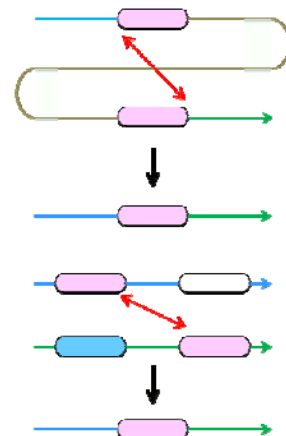


図 10 染色体構造異常 (ゲノム再編成) を生じるメカニズム

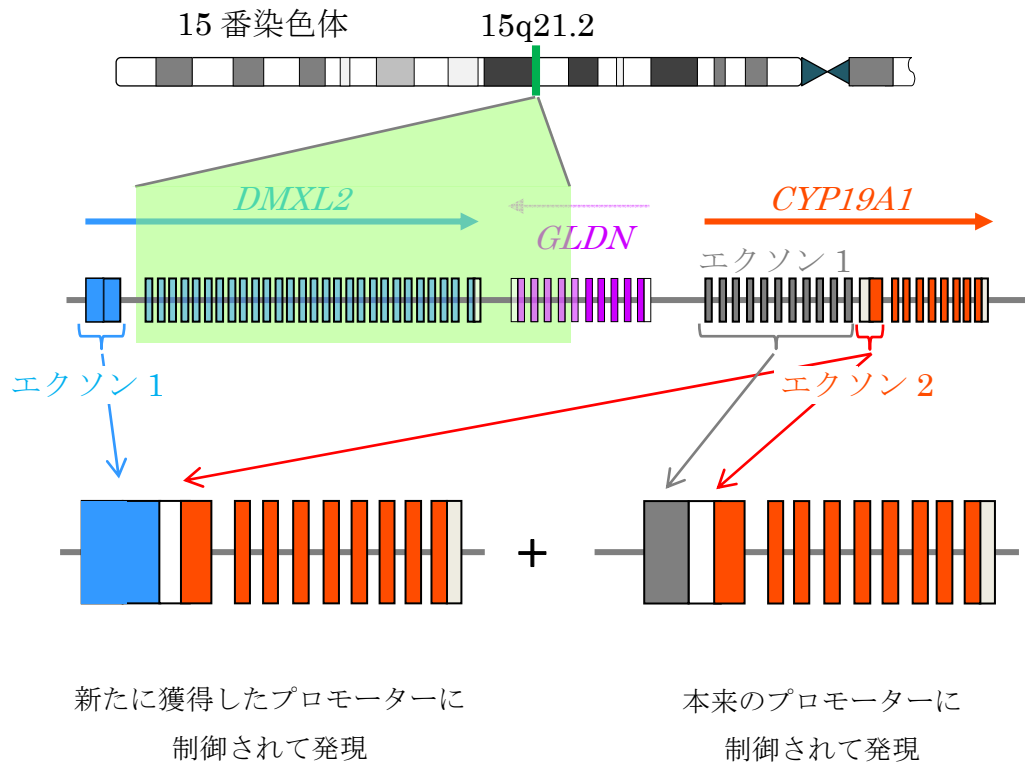


図 11 *CYP19A1* 翻訳領域と結合するプロモーター領域

*CYP19A1* 翻訳領域に本来のプロモーターが結合した *CYP19A1* 遺伝子の発現のほかに、広範囲に発現する *DMXL2* 遺伝子のプロモーターと *CYP19A1* 翻訳領域からなるキメラ遺伝子の形成が *CYP19A1* 遺伝子の過剰発現を招いたと推測される。

薄い青色：*DMXL2* エクソン 1 非翻訳領域

濃い青色：*DMXL2* エクソン 1 翻訳領域

灰色：*CYP19A1* エクソン 1 非翻訳領域

白色：*CYP19A1* エクソン 2 非翻訳領域

赤色：*CYP19A1* エクソン 2 翻訳領域

## 第6章 参考文献

- 1 Tung YC, Lee JS, Tsai WY and Hsiao PH. Physiological changes of adrenal androgens in childhood. *Journal of the Formosan Medical Association*, 103: 921–924, 2004.
- 2 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 and Ogata T. 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*, 96: E1035–E1043, 2011.
- 3 Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, Bryant M and Bulun SE. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *New England Journal of Medicine*, 348: 1855–1865, 2003.
- 4 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 and Bulun SE. Regional rearrangements in chromosome 15q21 chromosome 15q21 cause formation of cryptic promoters for the CYP19 (aromatase) gene. *Human Molecular Genetics*, 16: 2529–2541, 2007.
- 5 Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Burger H, Simpson ER, Umezawa A, Shihara D, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M and Ogata T. Genomic Basis of Aromatase Excess Syndrome: Recombination- and Replication-Mediated Rearrangements Leading to *CYP19A1* Overexpression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98: 2013-2021, 2013.
- 6 Gu W, Zhang F and Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 1: 4 (Online Journal), 2008.
- 7 Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Ogata T, Nagasaki K and Fukami M. Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clinical Endocrinology*, in press.

## 第7章 インターン期間中の研究活動

### [原著論文]

- 1 **Shihara D**, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Ogata T, Nagasaki K and Fukami M. Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clinical Endocrinology*, in press.
- 2 Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Burger H, Simpson ER, Umezawa A, **Shihara D**, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M and Ogata T. Genomic Basis of Aromatase Excess Syndrome: Recombination- and Replication-Mediated Rearrangements Leading to *CYP19A1* Overexpression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98: 2013-2021, 2013.

### [筆頭演者として学会発表]

- 1 **志原大蔵**, 長崎啓祐, 五十嵐麻希, 緒方 勤, 宮戸真美, 深見真紀. 女性化乳房 14 例における遺伝子解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 兵庫, 2013 年 12 月 4 日
- 2 **志原大蔵**, 長崎啓祐, 佐藤英利, 小川洋平, 菊池 透, 緒方 勤, 宮戸真美, 深見真紀. アロマトラーゼ過剰症 1 家系における新たな染色体微小構造異常の同定. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2013 年 10 月 11 日 (若手優秀ポスター賞候補演題に選出)
- 3 **志原大蔵**, 長崎啓祐, 緒方 勤, 宮戸真美, 深見真紀. 女性化乳房症の疾患発症機序の検討. 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第 5 回領域会議, 佐賀, 2013 年 9 月 6 日

### [受賞]

- 1 **志原大蔵**. アロマトラーゼ過剰症を招く新たな染色体構造異常の同定. 講師特別賞, 平成 25 年度東京バイオテクノロジー専門学校 卒業研究学内発表会, 東京, 2014 年 1 月 23 日
- 2 宮戸真美, **志原大蔵**, 深見真紀. 生後の精巣における MAMLD1/Mamld1 機能の解明. ノボノルディスク成長・発達研究賞, 2013 年 5 月

## 第8章 謝 辞

本論文を作成するにあたり、(独)国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部 部長 深見 真紀先生にご支援を頂きました。深く感謝申し上げます。

また、患者さんの貴重な検体を御提供いただきました新潟大学医学部 小児科学教室 長崎 啓祐先生をはじめ、多くの施設の先生方に深く感謝致します。

さらに、このような機会を与えていただきました東京バイオテクノロジー専門学校の先生方、ならびに御助言・御協力いただきました(独)国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部の皆さまに深く感謝いたします。

最後に、これまで支えていただいた 父 今朝夫、母 悦子、姉 美香、祖母 よし子に感謝いたします。