

特別講演

主催 埼玉医科大学病院内分泌内科・糖尿病内科 ・ 後援 埼玉医科大学卒業教育委員会
平成16年10月14日 於 埼玉医科大学第四講堂

遺伝性アロマターゼ発現異常症

生水 真紀夫

(金沢大学大学院医学研究科産婦人科・周産母子センター)

1. はじめに

エストロゲンは、子宮・乳腺・膣・脳下垂体などに作用して女性の性機能を調節する重要なホルモンである。その欠乏は、性徴の欠如・不妊といった生殖機能の障害を招くだけでなく、動脈硬化・骨粗鬆症や卵巣欠落症状など、代謝性・全身性の障害の発生にも関与する。さらに、エストロゲンは男性においても骨端閉鎖や脂質代謝に極めて重要な役割を担っていることが最近明らかになってきた。

これらのエストロゲンの生理機能の解明には、エストロゲン合成酵素(アロマターゼ)とエストロゲンレセプターのloss-of-function mutation症例の発見が大きな役割を果たした。アロマターゼ欠損症の生児が生まれてくるという発見は、胎盤性エストロゲンが妊娠分娩に必須である、とするそれまでの常識を覆した。さらに、成人男性患者の臨床像の観察により、男性ではアンドロゲンにより骨端が閉鎖する、という常識も完全に否定された。このようにアロマターゼのヒト“knock out model”は、動物モデルに先んじて観察され、エストロゲン作用の解明に貢献してきた。

本稿では、これらのエストロゲンの作用の解明の端緒となったアロマターゼ欠損症と過剰症を取り上げ、著者自身の症例を中心に発見の経緯・臨床所見・病態について解説する。さらに、これらの症例を通じて明らかにされたエストロゲンの意義についての新たな視点も紹介して、ヒト以外の多く動物の胎盤には発現していないアロマターゼがヒトの胎盤に大量に発現していることの意義について、著者の考えを紹介したい。

2. アロマターゼとその遺伝子構造

アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンに転換するステロイド代謝酵素である(図1)。活性部位にヘムが結合しており、チトクロームP450スーパーファ

ミリーに属する。アミノ酸503個よりなり、糖蛋白の形で細胞のミクロソームに局在していると考えられている。卵巣の顆粒膜細胞、精巣のライディック細胞、胎盤の合胞体細胞などに高いレベルで発現している。

アロマターゼをコードしている遺伝子(CYP19)は、15q21.1にテロメアからセントロメア方向にむかって(マイナスストランド上に)単一遺伝子として存在している(図2)。10個のエクソンよりなり、蛋白質はエクソンIIからエクソンXにコードされている¹⁾。エクソンIIの上流に、少なくとも9つの異なるエクソンIIが存在しており、おのおののエクソンIはそ

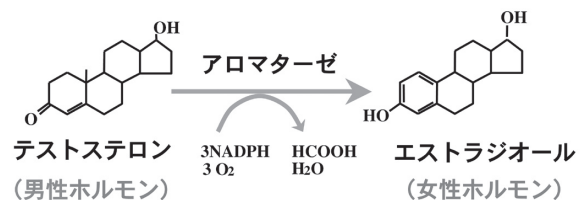


図1. エストロゲン合成反応。

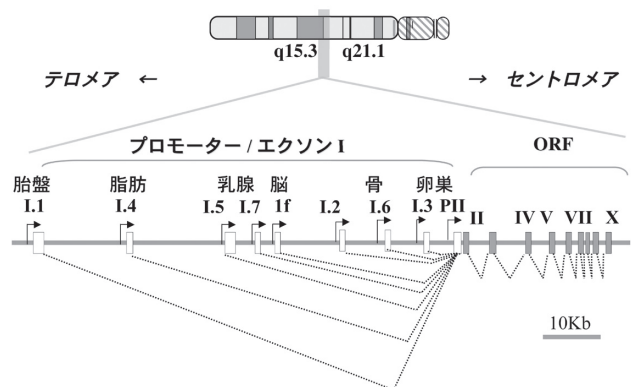


図2. アロマターゼ 遺伝子の構造。

の上流にそれぞれ独自のプロモーター領域を有している。いずれのエクソンIから転写が開始された場合も、スプライシングによりエクソンIIに接続されるため、合成される蛋白はまったく同一となる。これに対して、各プロモーターのシスエレメント（転写因子結合配列）はプロモーターごとに異なっているため、転写制御はエクソンIごとに全く異なっている。

胎盤・脂肪・脳・卵巣などアロマターゼ発現臓器・細胞では、それぞれ特定のエクソンI（プロモーター）を選択的に使用してアロマターゼの転写を行っている。すなわち、胎盤・脂肪・脳・卵巣ではそれぞれエクソンI.1 (1a), I.4 (1b), I.6 (1f), PII (1d) を選択的に使用して転写を行っている。その結果、単一遺伝子でありながらこれらの臓器ではそれぞれ異なるアロマターゼの転写制御が行われている。この多重エクソンI構造が、アロマターゼ遺伝子の特徴づけている。

アロマターゼ遺伝子の多重エクソン支配と疾患の関連は、乳癌において最もよく研究されている。正常乳腺では、アロマターゼはおもにI.4により転写されているが、乳癌ではPIIからの転写産物が増加する²⁾。この悪性化に伴うプロモーター・スイッチングには、癌組織で産生されるプロスタグランディンE2が関与している可能性がある³⁾。また、エクソンI.6とI.7は著者らによって発見されたプロモーターである^{4,7)}。それぞれ骨・乳癌組織のRNAからクローニングされたが、いずれも癌組織に発現量が高い傾向がある。このように、アロマターゼ遺伝子の発現の異常には、プロモーターの選択が深く関わっている例がある。

3. アロマターゼ欠損症

アロマターゼ欠損症は、患児の母親が妊娠中に男性化症状を示したことを手掛かりとして著者らにより発見された疾患である⁸⁾。母親は24歳の初妊・初産婦であった。妊娠中期から、顔貌の変化・声の低音化・肝障害・陰核の肥大・色素沈着などの男性化症状が出現し、分娩まで進行性に悪化した。妊娠中には母体血中エストロゲンが著明に上昇するのが正常であるが、この母親の血中エストラジオール値は正常者の1/100以下と極めて低値を示した。妊娠38週の時に前期破水となり、その後自然陣痛が発来して3210gの児を経膈自然分娩した。児は、染色体核型が46, XXで尿道下裂を示す男児様の外陰を有していたことから、女性仮性半陰陽と診断された。

本例のように、アロマターゼ欠損症では、①母親と胎児（患者）が妊娠中とともに男性化を示し、かつ②エストロゲンが極めて低値を示すのが特徴である。この特有の病態は、胎児・胎盤系におけるエストロゲン産生経路から説明できる（図3）。すなわち、胎児副腎は大量の副腎性アンドロゲン（dehydroepiandrosterone, DHEA）を合成するが、このDHEAは硫酸抱合体

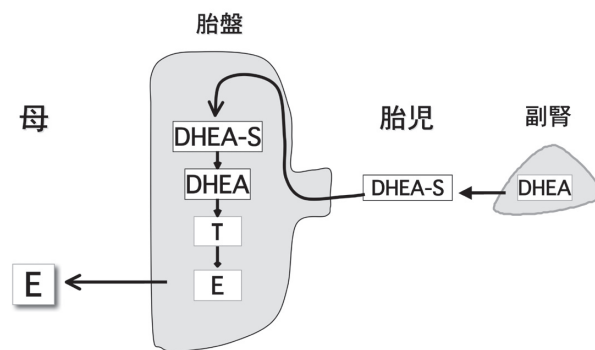


図3. 胎児胎盤系によるエストロゲン産生。

(DHEA-sulfate, DHEA-S)として胎児血中に分泌される。DHEAは弱いながらも男性ホルモン作用を有しているため、硫酸抱合体にすることで男性ホルモン作用を消去して血中に放出していると考えられる。このDHEA-Sは胎盤に達して、胎盤に発現している一連の代謝酵素により、DHEAを経て活性型アンドロゲンであるテストステロンにまで転換される。産生されたテストステロンは、アロマターゼによりエストロゲン（エストリオール）に転換されて極性（水溶性）が増し、母体血中を経て尿中へとすみやかに排泄される。正常胎盤には十分量のアロマターゼが発現しているため、中間代謝産物であるアンドロゲン（テストステロン）はすべてエストロゲンに転換され、血中に出現することはない。これに対して、アロマターゼ欠損症の児では、胎盤でのエストロゲンへの転換が起こらないため、エストロゲンの前駆物質であるテストステロンが蓄積することになる。この活性型アンドロゲン（テストステロン）が母親と胎児の血中に放出されて、強い男性化をもたらす。

アロマターゼ活性の欠損は、妊娠中のアンドロゲン負荷試験（in vivo）、および出生後の胎盤組織を用いた酵素測定（in vitro）により証明された。胎盤機能が正常な妊婦に一過性に多量のDHEA-S（200 mg）を静脈内投与すると、DHEA-Sは胎盤に達して順に代謝され、DHEAとテストステロン濃度の一過性上昇を引き続き、エストロゲン濃度の著明な上昇を引き起こす。これに対し、患児を妊娠していた母親には、DHEA-S投与後のエストロゲン濃度の上昇は見られず、エストロゲンの前駆体であるテストステロンの著明な蓄積が観察された（図4）。出生後に胎盤組織を用いてin vitroで胎盤の酵素活性を測定したところ、アロマターゼ活性のみに異常がみられ、正常胎盤の1/500と極めて低値であることが確認された。

本症例の発見後にアロマターゼ遺伝子（CYP19）がクローニングされた。そこで、保存しておいた胎盤と患者血液を用いて遺伝子解析を行った（図5）^{9,10)}。その結果、患児では、アロマターゼ遺伝子エクソン6とイ

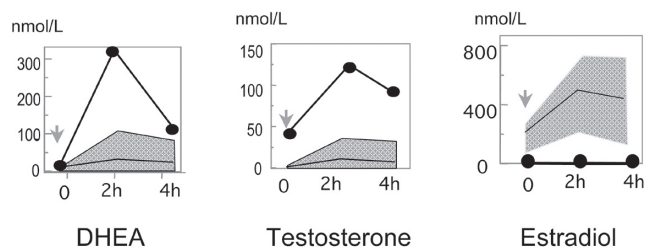


図 4. DHEA-S 負荷試験 (妊娠 36 週).

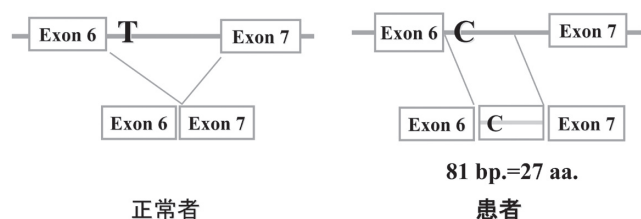


図 5. アロマターゼ欠損症の遺伝子解析.

イントロン6との間のスプライシングコードに一塩基置換 (T to C) が生じていることが明らかとなった。この塩基置換により一次転写産物のスプライシングに異常が生じて、イントロン6の一部がエクソン6とエクソン7の間に挿入された mRNA が作られていた。挿入塩基は 87 塩基で、29 アミノ酸挿入に相当するものであった。29 アミノ酸挿入の結果、アロマターゼ活性は、正常の 0.1% 以下と著明に低下していた。患児はこの変異のホモであり、両親はヘテロであった。したがって、本疾患は常染色体劣性の遺伝性疾患であることが明らかとなった。患児の両親は 5 親等の血族であったことから、両親に共通の祖先の一人が、変異アリルをヘテロで有していたものと推定された。

本症例の報告後、女性仮性半陰陽を手掛かりとしてアロマターゼ欠損症が診断されるようになり、これまでに約 10 家系が報告された。成人女性の症例では、2 次性徴の欠如や multi-cystic ovary をともなう不妊などが認められる。これらの女性患者の兄弟から、アロマターゼ欠損症の男性患者がみいだされた¹¹⁾。この男性患者では、高身長・骨粗鬆症・脂質代謝異常といった特徴的な症状が認められた。患者は 24 歳であったが骨端が閉鎖しておらず、患者の身長は思春期以降も伸び続けて 204 cm に達していた。同時に、強い骨粗鬆症が認められた。これらの代謝異常は、いずれもエストロゲンの投与により速やかに改善し、エストロゲン欠乏との因果関係が確認された。この結果、エストロゲンが、男性において、骨端の閉鎖や骨化・脂質代謝にきわめて重要な役割を果たしていることが示された。従来、男性における骨端の閉鎖はアンドロゲン作用と考えられていたが、実はアンドロゲンはエストロゲンに転換されて作用していたのである。思春期前に精巣

を切除しても骨端の閉鎖がみられることから、男性では性腺外 (おそらく骨組織自身) で産生されたエストロゲンが骨端閉鎖に働いているもの、と推定される。

われわれの症例が報告される以前には、エストロゲンは妊娠分娩に必須のホルモンであり、アロマターゼ欠損症は致死的で、生まれてくることはない、と漠然と信じられていた。ところがわれわれのアロマターゼ欠損症の患者では、妊娠は維持され分娩もほぼ正常に進行した。したがって、エストロゲンは妊娠分娩に必須ではないことが明らかになった。一方で、われわれの症例は、胎盤におけるアロマターゼの発現の意義を明瞭に示している。アロマターゼ活性を失うと、ヒト胎児 (女児) は、自ら産生する DHEA-S により男性化してしまう。すなわち、胎盤に大量に発現したアロマターゼは、DHEA-S の代謝過程で産生される活性型アンドロゲンを水酸化して解毒し、胎児自身を守っている。ヒトを含む一部の霊長類では、副腎から大量の DHEA-S が分泌されるためアロマターゼによる解毒が必要となったと考えられる。これに対し、マウスなどヒト以外の動物の多くは、副腎からのアンドロゲン分泌がほとんどなく、胎盤にアロマターゼは発現していても問題は生じないものと考えられる。しかし、マウスの新生仔を子細に観察すると、雌の外性器はアンドロゲンの影響を受けており、生殖結節肛門間距離の短縮など、ある程度男性化徴候を示している。このため、これらの動物では出生直後に外性器の雄雌の別がわかりにくい。

胎盤におけるアロマターゼは、DHEA-S を解毒するための酵素であり、胎生でかつ副腎性アンドロゲン分泌がみられる霊長類以降になって初めて必要になったという考えは、アロマターゼ遺伝子の構造からも支持される。すなわち、胎盤のアロマターゼはプロモーター I.1 により転写されが、このプロモーターはプロモーターのなかで最も上流にあって、系統発生的にも最も後に獲得されたプロモーターと考えられる。このプロモーターは強力な発現プロモーターで、胎盤特異的因子により制御されるものの、各種のシグナルによる細かな発現調節は軽微で、胎盤ではむしろ constitutive に発現している。この点で、胎盤のプロモーター I.1 は、ほかのアロマターゼのプロモーターと一線を画しており、胎盤におけるアロマターゼの意義に呼応しているように思われる。

4. 遺伝性女性化乳房症, Familial gynecomastia

30 年ほど前から、男性で血中のエストロゲンが異常高値となり、進行性で高度の女性化乳房を来す患者の存在が知られていた¹²⁾。これまでに 6 家系ほどが知られている。家系内の男性に症状がみられることから伴性劣性遺伝と推定されていたが、一部の家系ではエストロゲン過剰が疑われる女性がみられ、遺伝形式も

はっきりしなかった。

本症の患者では、全身の臓器・細胞でアロマターゼが発現しているため、血中エストロゲンが高値となる。アロマターゼ遺伝子がクローニングされた後、分子生物学的手法を用いて本疾患の原因検索が続けられていたが成功しなかった。1998年になって著者らによってようやくその原因の一部が明らかになった。

患者は17歳の男性で、思春期前期以降進行性再発性の女性化乳房に悩まされていた¹³⁾。血中エストロゲンは正常対照の10倍と高く、逆に血中のテストステロン値は低値を示した。皮膚の線維芽細胞のアロマターゼ活性は正常対照者の10~20倍と高く、無調節にアロマターゼが発現していた。

患者リンパ球を不死化して得られた細胞のcDNAおよびgenome DNAを詳細に検討した結果、アロマターゼ遺伝子近傍に生じた染色体微小逆位が本疾患の原因であることが明らかになった(図6)。すなわち、アロマターゼ遺伝子の近傍で反対鎖(プラスストランド)上に Tropomodulin 3 という遺伝子が存在する。この遺伝子は細胞骨格に関連した蛋白をコードしており、housekeeping gene に属する。5'-非翻訳領域よりなるエクソン1と、その下流の蛋白をコードする9個のエクソンからなる。患者ゲノムDNAでは、このエクソン1とその上流のプロモーター領域を含む比較的狭い領域に逆位が生じていた。この結果、tropomodulin エクソン1とその上流のプロモーター領域とが、アロマターゼ側に向かうことになり、あたかもアロマターゼの最上流のプロモーターとして機能するようになっていた。Tropomodulin 3は、本来全身の細胞で非調節性に発現しているhousekeeping geneであり、そのプロモーターと融合(微小逆位)したアロマターゼ遺伝子は、患者の全身の細胞で非調節性に発現するようになったのである。この逆位を有する染色体からは無調節にアロマターゼが発現するため、この変異遺伝子を有する染色体を一本でも持つ個体には、アロマターゼ

が過剰に発現して症状があらわれる。すなわち、本疾患は常染色体優性の遺伝形式をとる疾患であることが明らかとなった。

著者らは、別の家系でも家族性女性化乳房症の遺伝子解析を行い、アロマターゼ近傍にある Tropomodulin 3 とは異なる遺伝子の微小逆位が原因となっていることを確認した。Tropomodulin 3のプロモーターは、乳癌細胞であるMCF-7細胞において、アロマターゼ遺伝子とは異なる遺伝子との融合が生じており、なんらかの理由で組み替えの起こりやすい領域になっている可能性がある。アロマターゼ近傍になぜ微小逆位が生じやすいのか、また、微小逆位がアロマターゼ過剰症に一般的な原因なのかどうかなどについては、今後の検討結果を待つ必要がある。

本症の遺伝子解析から、染色体微小逆位がgain-of-function mutationの原因となりうることはじめて明らかとなった。この逆位は、小さな領域に生じているため通常の染色体分析で見つけることはできず、理論的にはサザン解析によっても検出できない可能性が高い。微小逆位の可能性を念頭においたcDNAの検討が手掛かりとなる。今後、癌を含め様々な疾患において、本症に認められたように微小逆位が関与したgain-of-functionあるいはloss-of-function mutationの疾患が発見されてくるのではないかと期待される。また、先にのべたように、アロマターゼ遺伝子は系統発生の過程で新たなプロモーターを次々と獲得してきた可能性があり、微小逆位もプロモーター獲得機序の一つであった可能性があり興味深い。

実は、優性遺伝形式を示すアロマターゼ過剰発現症は、鶏にも存在することが以前から知られていた¹⁴⁾。鶏ではウイルスプロモーターの挿入が原因となってアロマターゼの過剰発現が生じることが明らかにされていた¹⁵⁾。これが、結果的に、ヒトでの病因の解明を遅らせたひとつの要因となった。すなわち、鶏での結果を念頭において患者DNAの組換えの可能性がサザン解析により調べられた。サザン解析でアロマターゼ遺伝子の組み替えの可能性は否定され、次にアロマターゼ遺伝子のシーケンス解析が行われた。蛋白コード領域・プロモーター領域が順に解析されたが、アロマターゼ遺伝子は約100 kbと大きく、全領域がクローニングされていなかったため、研究は中断していた。著者らは、患者ゲノムをシーケンスするという戦略をとらず、患者cDNAを検討するという戦略をとることで、本症の遺伝子解析に成功した。この結果、それまで10年近くに渡って成功しなかった遺伝子解析を、わずか数週間程度で終えることができた。

5. おわりに

アロマターゼ異常に関連した疾患のうち、遺伝性2疾患について発見の経緯や臨床像について解説

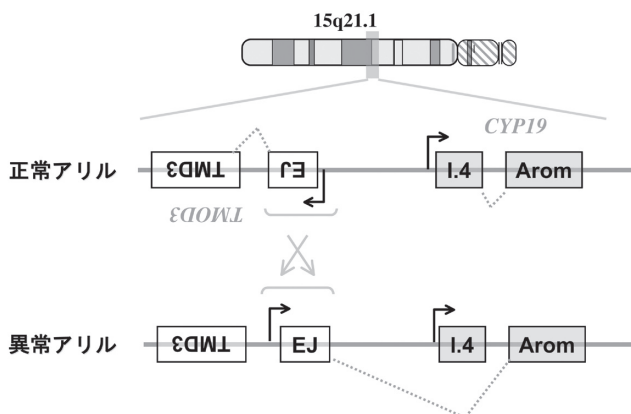


図6. 微小染色体逆位によるアロマターゼ過剰発現。

した。アロマターゼ欠損症は一塩基置換による loss-of-function mutation が原因であり、アロマターゼ過剰症は染色体微小逆位による gain-of-function mutation が原因であった。これらは、エストロゲンの欠損と過剰といった両極端にある疾患で、それぞれ特徴的な症状を示す。このような顕著な症状を示す疾患は稀であるが、アロマターゼ遺伝子の変異に基づく軽度の活性変調が病態に関与している可能性が想定されている。すなわち、polymorphism やアミノ酸置換などが関連した酵素活性の亢進や低下が病態に関与している例として、乳癌や子宮癌などでアロマターゼ遺伝子の polymorphism との関連が検討されている。

参考文献

- 1) Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994;15:342-55.
- 2) Harada N, Honda S. Molecular analysis of aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49: S15-21; discussion S33-7.
- 3) Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, et al. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1997;52:185-213.
- 4) Shozu M, Zhao Y, Simpson ER. Estrogen biosynthesis in THP1 cells is regulated by promoter switching of the aromatase (CYP19) gene. *Endocrinology* 1997;138:5125-35.
- 5) Sebastian S, Takayama K, Shozu M, Bulun SE. Cloning and Characterization of a Novel Endothelial Promoter of the Human CYP19 (Aromatase P450) Gene that is Up-Regulated in Breast Cancer Tissue. *Mol Endocrinol* 2002;16:2243-54.
- 6) Shozu M, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER. Multiple splicing events involved in regulation of human aromatase expression by a novel promoter, I.6. *Endocrinology* 1998;139:1610-7.
- 7) Shozu M, Simpson ER. Aromatase expression of human osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998;139:117-29.
- 8) Shozu M, Akasofu K, Harada T, Kubota Y. A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:560-6.
- 9) Harada N, Ogawa H, Shozu M, Yamada K. Genetic studies to characterize the origin of the mutation in placental aromatase deficiency. *Am J Hum Genet* 1992;51:666-72.
- 10) Harada N, Ogawa H, Shozu M, Yamada K, Suhara K, Nishida E, et al. Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. *J Biol Chem* 1992;267:4781-5.
- 11) Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689-98.
- 12) Hemsell DL, Grodin JM, Brenner PF, Siiteri PK, MacDonald PC. Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;38:476-9.
- 13) Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, et al. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med* 2003;348:1855-65.
- 14) Somes RG Jr, George FW, Baron J, Noble JF, Wilson JD. Inheritance of the henny-feathering trait of the Sebright bantam chicken. *J Hered* 1984; 75:99-102.
- 15) Matsumine H, Herbst MA, Ou SH, Wilson JD, McPhaul MJ. Aromatase mRNA in the extragonadal tissues of chickens with the henny-feathering trait is derived from a distinctive promoter structure that contains a segment of a retroviral long terminal repeat. Functional organization of the Sebright, Leghorn, and Campine aromatase genes. *J Biol Chem* 1991;266:19900-7.