

## 臨床医として考えることを愉しむ

著者	生水 真紀夫
著者別表示	Shozu Makio
雑誌名	金沢大学十全医学会雑誌
巻	128
号	3
ページ	109-111
発行年	2019-11
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00057134">http://doi.org/10.24517/00057134</a>



【研究紹介】

臨床医として考えることを愉しむ

Thinking is fun for a physician

千葉大学大学院医学研究院生殖医学  
生 水 真 紀 夫

はじめに

医学部2年の時に解剖学第二講座の山田致知教授に誘われて、解剖学教室に入出入りすることになった。与えられた仕事は、ヒト胎児の連続組織切片から立体視可能な画像を作成するというものであった。複数の顕微鏡像を手作業でトレースして作図するという単調な作業であったが、この研究(作業)を通じて山田致知教授から「考えることの愉しさ」、そして華やかにみえる研究にもバックヤードがあることを教えられた。当時、教室には生き物好きのスタッフ(熊木克治新潟大学教授、児玉公道熊本大学教授ほか)が多くおられて活気があった。動物園でも見かけない珍しい生物も含め、たくさんの生き物が飼われていた。学生時代に生き物に触れ、研究の愉しさと地道な面(バックヤード)とに触れることができたことは幸運であった。発生学への興味から、卒業後に産婦人科を選択した。

アロマトラーゼ欠損症

大学院生の時に、出張先の病院で「自分の顔つきが変わってきた」と訴える妊婦さんを診ることになった。訴えは男性化症状で、妊娠の進行に伴って男性化の症状が強くなった。同時に、妊娠中に増加するはずのエストロゲンが極めて低いことに気づいた。文献を渉猟したが、アンドロゲンが高くエストロゲンが低いという病態の報告は見当たらなかった。

妊娠中には、胎児副腎が分泌する副腎性アンドロゲン(デヒドロエピアンドロステロン, DHEA)が胎盤で活性型アンドロゲンに転換された後、アロマトラーゼ酵素によりエストロゲンに転換される(図1A)。アロマトラーゼが

欠損したと仮定すると、エストロゲンが低値、その前駆体であるアンドロゲンが高値となり、病態を説明できる(図1B)のではないかと考えた。しかし、エストロゲンは妊娠分娩に必須であり、アロマトラーゼ欠損症が存在するとしても胎生致死となりうるので、アロマトラーゼ欠損症の報告はないと教科書に記載されていた。

超音波検査で、胎児は女児で外性器に男性化が疑われることが判明した。胎児が男性化する疾患としては、コルチゾール合成酵素の欠損による副腎性器症候群が知られている。副腎性器症候群では胎児副腎が過剰に産生するアンドロゲンにより、児に男性化が生じる。しかし、副腎性器症候群では母体に男性化は生じない。本患者と副腎性器症候群の患者にみられる母体の男性化の違いは、胎盤のアロマトラーゼにより説明できることに気づいた。すなわち、「副腎性器症候群では、副腎性アンドロゲンが胎盤のアロマトラーゼによりエストロゲンに転換されるため母体の男性化は生じない。一方、アロマトラーゼ欠損症ではエストロゲンへの転換がおこらず母体に男性化が生じる」と説明できる(図1)。私は、この時点でこの症例が「アロマトラーゼ欠損」であると確信した。

そこで、母体にDHEA硫酸抱合体を投与して母体血中ホルモンを測定し、DHEA硫酸抱合体が活性型アンドロゲンにまで代謝されるが、エストロゲンには転換されないことを確認した(検査に用いたDHEA硫酸抱合体は子宮頸管熟化目的の治療薬であるが、この薬が実際に発売されていたのはこの時期の日本だけであった。この時期でなければこの検査は施行出来なかった)。分娩後に胎盤のアロマトラーゼ活性を測定し、対照の0.2%以下と低値であることを確認した。5年後に藤田医科大学の原田信宏教授によりアロマトラーゼ遺伝子(CYP19)がクローニングされ、漸く患者ゲノムの解析が可能となった。原田信宏教授のグループにより患者ゲノムライブラリーからCYP19をクローニングしてシーケンシングするという手間と時間のかかる作業が行われ、患者がCYP19イントロン5のスプライシングコドンの一塩基置換のホモ、両親がヘテロであることが判明した。この時点で、臨床経過をJ Clin Endocrinol Metab (1)に、遺伝子解析の結果をJ Biol Chem(2)およびAm J Hum Genet (3)に発表した。

先にも述べたように「アロマトラーゼ欠損症」は胎生致死と推定されていたこともあり、最初の論文は容易にはアクセプトされなかった。査読者は当時アロマトラーゼ研究のトップにいた人物で、査読中に外性器に男性化を示す女性のスクリーニングを行って、実際にエストロゲン低値の患者が存在することを確認していたことを後に知った。アメリカの研究インフラの実力に感心した。最初の論文発表の後、査読者となってきていた研究者から留学してアロマトラーゼ欠損症患者の遺伝子解析をするよう誘われた。しかし、このとき既にわれわれの症例の遺伝子解析を日本で終えており、留学はしなかった。

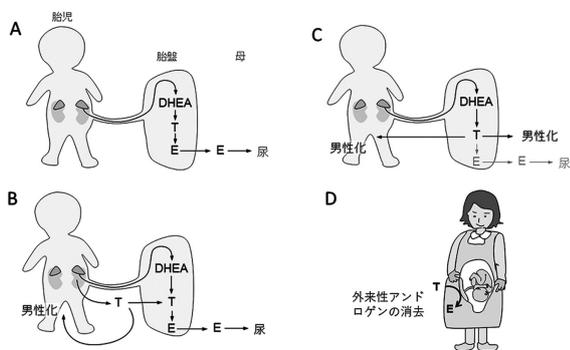


図1. 胎盤におけるエストロゲン産生の生理と病態  
A: 生理的なステロイド代謝, 副腎から分泌されたDHEAは胎盤でEに代謝される。B: 副腎性器症候群, 副腎が合成するTは、胎盤でエストロゲンに代謝されるので母体の男性化を生じさせない。C: アロマトラーゼ欠損症の病態, DHEAは胎盤でTまで代謝され、児と母に男性化を生じさせる。D: 胎盤のアロマトラーゼの意義: 外来性アンドロゲンを不活性化し、胎児にアンドロゲンフリーの環境を提供する。  
DHEA, デヒドロエピアンドロステロン; T, テストステロン; E, エストロゲン。

その後アロマターゼ欠損症の女性が相次いで発見され、その兄弟から男性患者が見つかった。男性患者の表現型は、それまで明らかにされていなかったエストロゲンの生理的役割を明らかにした(女性患者ではアロマターゼ欠損症の診断がつかないままエストロゲン投与が行われていたため、表現型がみえにくくなっていた)。その一つが、エストロゲンが男性の骨成長と骨端閉鎖、骨量の増加に必須であるという発見であった。それまでも、女性においてエストロゲンの骨に対する役割が認識されていたが、男性におけるエストロゲンの役割はこの男性患者の発見により初めて認識された。

#### アロマターゼ過剰症

産婦人科に入局して14年目に、留学の許可を得ることが出来た。留学先には、かつて留学を誘ってくれたアロマターゼ研究者のラボを選んだ。分子生物学が輝かしい成果を出し始めた時代であった。私自身には分子生物学の知識やテクニックは全くなかったが、アロマターゼ欠損症の発見者として一定のリスペクトを受けることができたことに加え、アロマターゼ欠損症の研究で習得した生化学的な知識が役立ち比較的スムーズに研究を始めることができた。分子生物学の知識と手技は、研究遂行に必要なものをその都度習得した。ヒト胎児の長幹骨から骨細胞を分離してエストロゲンを産生することを確認し、骨細胞のアロマターゼ発現に関わるプロモーターを新たにクローニングしてその制御を明らかにした(4-6)。1年半ほどの短い期間であったが研究に没頭することができた。その間に、ラボのボスは海外に移りラボには誰もいなくなっていた。大ボスからstay foreverと誘われ、そのまま研究を続ける決心をした。そんなとき、留学を終え日本に帰国する知人から、彼のプロジェクト(アロマターゼ過剰症患者の遺伝子解析)の継承を依頼された。そのプロジェクトは彼より前に幾人かの研究者が挑戦したが解決できなかったプロジェクトであった。当時、彼は患者の細胞で奇妙なプロモーター(EJ)がアロマターゼ過剰発現に関わっていることを突き止めていた。このプロモーター配列の一部はMCF-7(乳がん細胞)の転写産物からも見つかっていたが、どのようにしてアロマターゼ過剰と結びつくのかは謎であった。

私はまず、この奇妙なプロモーター(EJ)がヒトの新規遺伝子(後にTMOD3と命名された)のプロモーターであることを突き止めた。このTMOD3とアロマターゼ遺伝子(CYP19)との間のゲノム組み替えがアロマターゼ過剰発現の原因と推定した。そこで、このゲノム組み替えにより生じる異常cDNAが他にもあると考え、患者細胞の発現ライブラリーをスクリーニングして、解析の手がかりとなるcDNAクローンを一つ発見した。このcDNAでは、EJ配列の下流に、当時登録が始まったばかりのcDNAコンソーシアムデータベースに登録されたcDNA配列(SPL)の一部が逆相補鎖となって存在していた。この奇妙なcDNA配列の解析の結果、患者ゲノムではTMOD3のエクソンIの下流にSPLが逆向きに存在していると推定できた。(このような解析ができたのは、まだまだ登録数の少なかったデータベースにたまたまSPL配列が既に登録されていたこと、さらにSPL逆相補配列の5'端側よりsplicing acceptor siteが、3'端側にpoly A signal類似の配列が存在していたという偶然が重なったことによる)。これらの奇妙なcDNAを説明できるゲノム組み替えは、理論上1つしか存在しなかった。それは、TMOD3、SPL、CYP19がこの順で並び、患者ゲノムでTMOD3のプロモーター(EJ)が微細逆位をきたしたというものであ

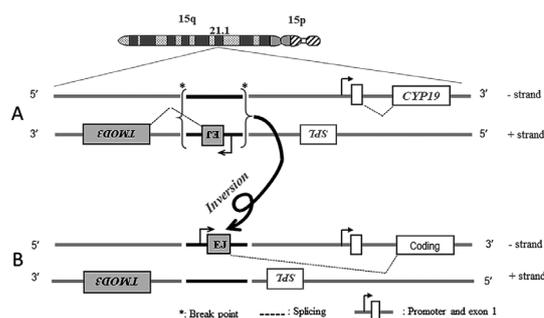


図2. 微細染色体逆位によるアロマターゼ過剰症

A: 正常アリル。CYP19は-鎖に、SPLとTMOD3は+鎖上にある。CYP19とTMOD3は、それぞれプロモーター(およびexon 1)と蛋白コード領域(exon 2以降)とよりなる。B: TMOD3のプロモーター(およびexon 1=EJ配列)を含む微細な領域でゲノムが切断され、逆位を起こす。このEJ周囲領域にはinsulatorがないため、EJプロモーターからCYP19までの一次転写産物が生成される。

る(図2)。この仮説を証明するためには、アロマターゼからTMOD3までのゲノム配列を決定し、患者ゲノムにおける切断端を同定する必要があった。当時は、ヒトゲノムプロジェクトが進行しており、ショットガンシーケンスが発明され解読が加速され始めた時期であった。早速BACクローンを入手してシーケンスを始めた。しかし、CYP19とTMOD3の距離は数Mbあり、一人が手作業でシーケンスするのは不可能であることが分り断念した。シーケンスの代わりに、in situ hybridizationにより微細逆位を証明して一旦実験を終了した。3つの遺伝子のゲノム上の順序の決定は、ゲノムプロジェクトの完成を待つことにして帰国した。日本では腫瘍のアロマターゼ発現などの研究を行った(7-20)。

2003年にゲノムプロジェクトが完了しヒトゲノムシーケンスが解読されて、漸く3遺伝子のゲノム上の順序を確定することが出来た。その結果、仮説に誤りがないことが確認できたので発表した(New Engl J Med) (21)。

その後、緒方勤博士(浜松医科大学教授)・深見真紀博士(生育医療センター部長)とともにわが国におけるアロマターゼ過剰症症例についての共同研究を行い、アロマターゼ過剰症はわが国に比較的多いこと、プロモーター領域の逆位の他にも様々なタイプのプロモーター獲得機序が存在することを明らかにした(22)。また、厚労省の班研究「遺伝性女性化乳房の実態把握と診断基準の作成に関する研究」を担当した。

#### プロラクチン受容体欠損症

千葉大学に移ってから、不思議な症状の患者さんを探る機会があった。紹介状には高プロラクチン(PRL)血症が記載されていたが、患者さんの訴えは分娩後に母乳が全く出なかったためその原因を知りたいというものであった。産褥期の母乳分泌が少ない褥婦はしばしばみかけますが、全く出ないという訴えは聞いたことがなかった。

PRLは母乳を分泌させるホルモンで、高PRL血症では乳漏症となるはずであるが、この患者さんの症状はその逆であった。自己抗体によりPRL作用が低下する特殊な高PRL血症は否定され、PRLの活性低下が原因ではないと考えられた。一方で、PRLが上昇しているながらその作用がみられないことから、PRL受容体(PRLR)の変異を疑った。しかし、PRLR変異による乳汁分泌欠如の報告は見当たらなかった。PRLRと同じファミリーに属する成長ホルモン受容体には、多くの変異が報告されているのに、なぜPRLRに変異の報告がないのか不思議であっ

た。PRLRのシークエンスを行ったところ、患者はPRLR複合ヘテロ変異（ノンセンスとミスセンス）を有することが判明した。両変異が機能喪失変異であることを確認して報告した（New Engl J Med.）(23)。このうちミスセンス変異は既に変異データベースに意義不明のまま登録されており、そのアリル頻度からホモとなって発症する確率は1/128億と計算された。地球上には一人もいない低確率であった。

本症の発見はヒトにおけるPRLの作用の理解に寄与した。PRLには魚類の浸透圧調節に始まり、両生類の変態抑制、鳥類の営巣や渡り行動、齧歯類の妊娠維持などさまざまな役割があり、ヒトにおいても多くの機能があると考えられていた。しかしながら、本患者の症状は母乳分泌の欠如のみであったことから、ヒトでは泌乳作用のみに進化したことが示唆された。泌乳は哺乳類の本質に関わる機能であり、その欠如は個体の保存に関わらないものの種の保存に関わるともいえる。これが、PRLR変異がこれまで発見されてこなかったり理由なのかもしれない。また、本患者家系から、PRLRがhaplo-sufficiencyであること、両アリの機能喪失により高プロラクチン血症を来すことが明らかになった。機能喪失が高プロラクチン血症をもたらしたことから、プロラクチンがプロラクチン自身の血中濃度を制御していることが確認された。PRL以外の下垂体ホルモン（TSHなど）は、末梢の標的臓器から分泌されるホルモン（T3など）により long loop feedback制御を受けている。ところが、PRLの場合、標的である乳腺からホルモンが分泌されておらず制御機構は明瞭ではなかった。今回の観察から、PRLが自らの血中濃度の制御（short loop feedback）を担っているとの考えが支持された。

#### おわりに

医者になってすぐの頃に診たアロマトーゼ欠損症を契機に、長くアロマトーゼに関わってきた。アロマトーゼ欠損症では遺伝子複製のエラーという単純な理解をしていたが、アロマトーゼ過剰症を調べていく中で、CYP19が新たに発現プロモーターを獲得する過程、すなわち遺伝子としての進化の試みを見ているのかもしれないと思うようになった。CYP19の役割も進化しており、同じ有胎盤類（哺乳類）のなかでもヒトに近い霊長類（広鼻猿類）で大きくその役割を変えていったことに気づき、そのメカニズムの巧妙さに驚いた（本稿では紹介しきれなかった）。一方で、CYP19が産生するエストロゲンの骨への作用は、脊椎動物が最初にステロイドホルモンを発明したときからの古い作用であると理解できることが分かってきた。生き物を対象とする以上当然とはいえ、進化が常に見え隠れしていた。PRLR変異の発見時もPRLの進化について考えさせられた。疾患の発見や研究の進展にはいつも偶然と、そして必然があったように思う。臨床医として貴重な経験をさせていただいた。協力して下さった患者さん、そして一緒に研究を進めてくれた共同研究者に深く感謝している。研究を深化させて、患者さんに還元したいと考えている。

#### 文 献

- 1) Shozu M, Akasofu K, Harada T, Kubota Y. A New Cause of Female Pseudohermaphroditism - Placental Aromatase Deficiency. J Clin Endocr Metab. 1991; 72(3): 560-6.
- 2) Harada N, Ogawa H, Shozu M, Yamada K, et al. Biochemical and Molecular Genetic Analyses on Placental Aromatase (P-450arom) Deficiency. J Biol Chem. 1992; 267(7): 4781-5.
- 3) 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(3): 666-72.

- 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(12): 5125-35.
- 5) Shozu M, Simpson ER. Aromatase expression of human osteoblast-like cells. Mol Cell Endocrinol. 1998; 139(1-2): 117-29.
- 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(4): 1610-7.
- 7) Shozu M, Zhao Y, Simpson ER. TGF-beta 1 stimulates expression of the aromatase (CYP19) gene in human osteoblast-like cells and THP-1 cells. Mol Cell Endocrinol. 2000; 160(1-2): 123-33.
- 8) Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, et al. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. Endocrinology. 2000; 141(10): 3852-61.
- 9) Shozu M, Sumitani H, Murakami K, Segawa T, et al. Regulation of aromatase activity in bone-derived cells: possible role of mitogen-activated protein kinase. J Steroid Biochem. 2001; 79(1-5): 61-5.
- 10) Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang HJ, et al. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprorelin acetate. J Clin Endocr Metab. 2001; 86(11): 5405-11.
- 11) Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang HJ, et al. Overexpression of aromatase P450 in leiomyoma tissue is driven primarily through promoter I.4 of the aromatase P450 gene (CYP19). J Clin Endocr Metab. 2002; 87(6): 2540-8.
- 12) Yang HJ, Shozu M, Murakami K, Sumitani H, et al. Spatially heterogeneous expression of aromatase P450 through promoter II is closely correlated with the level of steroidogenic factor-1 transcript in endometrioma tissues. J Clin Endocr Metab. 2002; 87(8): 3745-53.
- 13) Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Inoue M. Successful treatment of a symptomatic uterine leiomyoma in a perimenopausal woman with a nonsteroidal aromatase inhibitor. Fertil Steril. 2003; 79(3): 628-31.
- 14) Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Inoue M. Successful treatment of a symptomatic uterine leiomyoma in a perimenopausal woman with a nonsteroidal aromatase inhibitor. Fertil Steril. 2003; 79(3): 628-31.
- 15) Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, et al. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. New Engl J Med. 2003; 348(19): 1855-65.
- 16) Kasai T, Shozu M, Murakami K, Segawa T, et al. Increased expression of type I 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase enhances in situ production of estradiol in uterine leiomyoma. J Clin Endocr Metab. 2004; 89(11): 5661-8.
- 17) Shozu M, Murakami K, Inoue M. Aromatase and leiomyoma of the uterus. Semin Reprod Med. 2004; 22(1): 51-60.
- 18) Segawa T, Shozu M, Murakami K, Kasai T, et al. Aromatase expression in stromal cells of endometrioid endometrial cancer correlates with poor survival. Clin Cancer Res. 2005; 11(6): 2188-94.
- 19) Segawa T, Shozu M, Teramoto S, Kato K, Inoue M, Kato O. Effects of aromatase inhibitor letrozole in PCO infertile patients for moderate ovulation. Fertil Steril. 2005; 84: S323-S.
- 20) Zhang B, Shozu M, Okada M, Ishikawa H, et al. Insulin-Like Growth Factor I Enhances the Expression of Aromatase P450 by Inhibiting Autophagy. Endocrinology. 2010; 151(10): 4949-58.
- 21) 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(19): 1855-65.
- 22) Shozu M, Fukami M, Ogata T. Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for clinical diagnosis. Expert Rev Endocrinol Metab. 2014; 9(4): 397-409.
- 23) Kobayashi T, Usui H, Tanaka H, Shozu M. Variant Prolactin Receptor in Agalactia and Hyperprolactinemia. N Engl J Med. 2018; 379(23): 2230-6.