

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））
総括研究報告書

「先天性GPI欠損症の疾患概念の確立と診断基準の制定：
発達障害・てんかんを主症状とする新しい疾患」に関する研究
研究代表者 村上良子 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨

原因不明の精神発達障害や難治性てんかん患者の中から先天性 GPI 欠損症 (Inherited GPI Deficiency, IGD) がみついている。末梢血のフローサイトメトリー検査でスクリーニング可能であり、GPI アンカー関連遺伝子 27 個のターゲットエクソーム解析で変異遺伝子を同定し、それぞれの遺伝子の欠損細胞株を利用した機能解析により責任遺伝子であるかどうかで確認できる。さらに診断が確定すればビタミン B₆ (ピリドキシン) による治療が奏効する可能性がある。今年度は 41 例の FACS 解析を行い、遺伝子解析により PIGO, PIGN, PIGT, PIGA 欠損症が新たに見つかった。疾患ホームページが完成したので、さらなる症例の集積と新たな疾患マーカーの検索を進め、診断基準の制定と診療ガイドラインの作成を進めている。

研究分担社

井上徳光 地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター研究所腫瘍免疫学部門長
高橋幸利 独立行政法人国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター 副院長

不明の精神発達障害や難治性てんかん患者から多くの IGD 患者を診断し、患者情報を集積し鋭敏な疾患マーカーを検索する。ビタミン B₆ (ピリドキシン) の投与が難治性てんかんに著効する症例があるので早期的確な診断が重要である

A. 研究目的

GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーは 150 種以上の蛋白質を細胞膜に繋ぐ糖脂質でその生合成と修飾に 27 個の遺伝子が必要である。これらの遺伝子に変異があると重要な機能を担う種々の GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の細胞膜上の発現が低下、あるいはアンカーの構造が異常となり、精神発達障害やてんかん、時に高アルカリホスファターゼ (ALP) 血症を来す。また重症例では脳の形成異常、聴覚障害等の神経症状、顔貌異常、四肢、心臓、腎・尿路系の奇形、鎖肛・ヒルシュブルング病等の腸管奇形、魚鱗癬等広範な症状を示す。本研究班ではまず、このように新しい疾患である先天性 GPI 欠損症 (IGD) の疾患概念を確立し診断基準を作成する。末梢血のフローサイトメトリー解析 (FACS) でスクリーニングを行い原因

B. 研究方法

(1) 患者の診断と患者情報の収集

精神発達障害、てんかんと特徴的な奇形や高 ALP 血症を伴う患者の末梢血を正常コントロール血とともに送付してもらい、フローサイトメトリー検査で顆粒球における GPI アンカー型タンパク質の発現を確認する。CD16b の発現低下が見られれば、IGD の診断は確定する。責任遺伝子同定の為に末梢血から抽出したゲノムを用いて GPI 関連遺伝子のターゲットエクソームシーケンシング、あるいは横浜市立大学の遺伝子解析拠点班と連携して全エクソームシーケンシングを行った。さらに患者情報の集積の為に現在大阪大学未来医療開発センターと共同して、米国 Vanderbilt 大学が開発したデータ集積管理システム REDCap を使ったデータベースの構築を開始した。

(2) 診療ガイドライン、疾患ホームページの作成

国内患者の詳細な観察をもとに診療ガイドラインの草稿を作成し、完成した疾患ホームページに掲載している。ホームページには今までに明らかになったことを一般向けと医療関係者向けに分けてわかりやすく紹介し、新しい疾患である IGD を特に一般臨床医に広く周知するため正確な情報を発信している。

(倫理面への配慮)

診断に遺伝子解析を伴うので、大阪大学におけるヒトゲノム倫理委員会に申請し承認されている。遺伝子診断に伴う利益、不利益などにつき書面提示し、患者の保護者に対して説明し同意を得た。また、診断や結果に対して、不安が生じた場合は、遺伝カウンセリングを提供できる体制を整えており、いつでも相談できる旨を併せて説明した。動物実験についても研究機関に計画書を提出し承認されている。

C . 研究結果

(1) 患者の診断と患者情報の集積

今年度は国内から 41 例のフローサイトメトリー解析を行い、全エクソーム解析による判明例を加えると遺伝子解析により PIGO, PIGN, PIGT, PIGA, PIGL 欠損症が新たに見つかった。また海外との共同研究により世界で初めて PIGQ 欠損症、PGAP1 欠損症を報告した。PIGQ 欠損症は早期発症型でてんかん性脳症である大田原症候群の症例から見つかっている。PGAP1 欠損症では細胞表面の GPI-AP の発現量は低下しないが、イノシトールにアシル基が付いた異常な構造で発現するので正常では切断される細菌由来の PIPLC (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C) 処理に抵抗性になることで血球の FACS 解析による確認が可能である。重度の精神運動発達障害を呈し、てんかんを認めたが活性がほとんどなくても生存可能で多発奇形はみとめられなかった。このように IGD はどの pathway のどのステップ

の遺伝子変異か、また活性低下の程度によっても非常にブロードな症状を呈する。最近では GPI pathway 以外の遺伝子変異による IGD も見つかっており、他の疾患とオーバーラップする症例も今後見つかってくると考えられる。多くの症例を集積してその特徴を詳細に観察することが重要である。患者情報の集積については大阪大学未来医療開発センターと共同して、米国 Vanderbilt 大学が開発したデータ集積管理システム REDCap を使ったデータベースの構築を開始し、まずエクセルベースで患者情報を収集する準備をしている。

(2) 診療ガイドライン、疾患ホームページの作成
11 月の本研究班の会議で、日本小児神経学会の会員と交流を持ち、学会と交流を持って進める事等を議論した。国内患者の詳細な観察をもとに診療ガイドラインの草稿を作成し、完成した疾患ホームページに掲載している。
(<http://igd.biken.osaka-u.ac.jp/>)

D . 考察

疾患ホームページを作成したので、そこで多くの臨床医に IGD の診療ガイドラインを示すことにより、多くの原因不明の疾患からスクリーニングにより IGD を抽出することが可能になる。さらには遺伝子解析に至る前にベッドサイドでより正確に診断する為に新規の疾患マーカーを検索する必要がある。現在はリン酸化のないビタミン B₆(ピリドキシン) の投与がけいれん発作に著効する症例があり、神経発達にも効果がある可能性がある。IGD の神経症状は生後も進行性で早期治療により症状の軽減が期待されるので、早期の的確な診断が重要である。

E . 結論

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は新しい疾患であるが最近原因不明の運動発達障害や難治性てんかんの症例の中から次々と見つかっている。末梢血のフローサイトメトリーでスクリーニングが可能であ

り、遺伝子解析で変異遺伝子を同定し、機能解析で確認できる系がある。またビタミン B₆ (ピリドキシン) の投与がけいれん発作に著効する症例がある。早期診断・早期治療を実現する為にベッドサイドでの鋭敏な疾患マーカーの検索と、新たな治療法の開発が重要である。

F . 健康危険情報
特記すべきことなし

G . 研究発表

1. 論文発表

- Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics*. 2014 May;15(2):85-92.
- Martin, H. C., G. Kim, A. T. Pagnamenta, Y. Murakami, G. Carvill, E. Meyer, R. Copley, A. Rimmer, G. Barcia, M. Fleming, J. Kronengold, M. R. Brown, K. A. Hudspith, J. Broxholme, A. Kanapin, J.-B. Cazier, T. Kinoshita, R. Nababout, The WGS600 Consortium, D. Bentley, G. McVean, S. Heavin, Z. Zaiwalla, T. McShane, H. Mefford, D. Shears, H. Stewart, M. A. Kurian, I. E. Scheffer, E. Blair, P. Donnelly, L. K. Kaczmarek and J. Taylor. Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Hum. Mol. Genet.*, 2014; 23: 3200-3211.
- Kato, M¹., H. Saitsu¹, Y. Murakami¹, K. Kikuchi, S. Watanabe, M. Iai, K. Miya, R. Matsuura, R. Takayama, C. Ohba, M. Nakashima, Y. Tsurusaki, N. Miyake, S. Hamano, H. Osaka, K. Hayasaka, T. Kinoshita and N. Matsumoto. *PIGA* mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology*, 2014.; 82:1587-1596. ¹Equal contribution
(In Focus の論文に採択、同号の表紙に掲載)
- Murakami, Y., H. Tawamie, Y. Maeda, C. Buttner, R. Buchert, F. Radwan, S. Schaffer, H. Sticht, M. Aigner, A. Reis, T. Kinoshita and R. A. Jamra. Null mutation in PGAP1 impairing Gpi-anchor maturation in patients with intellectual disability and encephalopathy. *PLoS Genet.*, 2014.;10(5):e1004320.
- Nakashima, M., H. Kashii, Y. Murakami, M. Kato, Y. Tsurusaki, N. Miyake, M. Kubota, T. Kinoshita, H. Saitsu, N. Matsumoto. Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenet.*, 2014; 15: 193-200.
- Ueda, Y., J. Nishimura, Y. Murakami, S. Kajigaya, T. Kinoshita, Y. Kanakura and N. S. Young. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with copy number-neutral 6pLOH in GPI (+) but not in GPI (-) granulocytes. *Eur. J. Haematol.*, 2014. 92:450-453. DOI: 10.1111/ejh.12253
- Stokes, M., Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita and Y. S. Morita. New insights to the functions of PIGF, a protein involved in the ethanolamine phosphate transfer steps of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem. J.*, 2014.463(2):249-256
- Fujiwara I, Murakami Y, Niihori T, Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K,

Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A*. 2015 Feb 23. doi: 10.1002/ajmg.a.36987.

- 村上良子 木下タロウ
知的障害とてんかんを主症状とする新しい疾患 先天性 GPI 欠損症
脳と発達誌 第 47 巻 1 号 2015

2. 学会発表

- Endosome-to-TGN retrograde transport mediated by GARP affects post-Golgi anterograde transport and glycosylation
Tetsuya Hirata, Morihisa Fujita, Shota Nakamura, Yoshiko Murakami, Yusuke Mada, Taroh Kinoshita (口頭) 第 15 回関西グライコサイエンスフォーラム
平成26年5月24日(土) 大阪市立大学 学術情報総合センター
- GPIアンカー型タンパク質の構造異常を原因とする先天性GPI欠損症---PGAP1欠損症とPGAP3欠損症---
村上良子、木下タロウ
(口頭) 発表は5月29日(木)
第56回日本小児神経学会学術集会
平成26年5月28日~31日
アクトシティ-浜松 他
- GPIアンカー欠損症研究の進展
木下タロウ、村上良子
(口頭、シンポジウム 11日発表)
第33回 日本糖質学会年会
平成26年8月10日-12日、 名古屋大学
- GARP複合体を介したTGNへの逆行輸送はゴルジ体以降の順行輸送や糖鎖修飾に必要である。
平田哲也、藤田盛久、後藤和義、元岡大祐、中村昇太、村上良子、前田裕輔、木下タロウ

(口頭、シンポジウム、11日発表)

第33回 日本糖質学会年会

平成26年8月10日-12日、 名古屋大学

- 先天性GPI欠損症について
村上良子、井上徳光、加藤光広、木下タロウ
(口頭発表 22日発表)
第51回補体シンポジウム
平成26年8月22日~23日 神戸常磐大学
- GPIアンカー型蛋白質の細胞膜遊離に関わるGPI切断酵素PGAP6
(口頭+ポスター、16日発表)
ゴンヒ リ、藤田盛久、村上良子、神澤範行、前田裕輔、木下タロウ (2T16a-08 ,3P-039)
第87回日本生化学会大会
平成26年10月15日~18日
国立京都国際会館
- GARP複合体を介したエンドソーム-TGN間の逆行輸送はゴルジ体以降の順行輸送や糖鎖修飾に必要である
平田哲也、藤田盛久、中村昇太、後藤和義、片岡大祐、村上良子、前田裕輔、木下タロウ
(口頭+ポスター、17日発表)
(3T14a-10、3P-265)
第87回日本生化学会大会
平成26年10月15日~18日国立京都国際会館
- GPIアンカー型蛋白質構造異常を原因とする先天性GPI欠損症-PGAP1欠損症とPGAP3欠損症
村上良子、栗屋智就、前田裕輔、木下タロウ
(口頭+ポスター、18日発表)
(4T15P-03、4P-416)
第87回日本生化学会大会
平成26年10月15日~18日国立京都国際会館
- Endosomes-to-TGN retrograde transport mediated by GARP is required for post-Golgi anterograde transport and glycosylation
Tetsuya Hirata, Morihisa Fujita, Shota

Nakamura, Kazuyoshi Gotoh, Daisuke
Motooka, Yoshiko Murakami, Yusuke
Maeda, Taroh Kinoshita, 2014年11月16
日 2014 SFG & JSCR JOINT MEETING
----Satellite Symposium IV –New Vistas in
Glycoscience; Challenges for Junior
Scientists” in Hawaii

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し