

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
総括研究報告書

先天性GPI欠損症の症例登録システムの構築と実態調査及び早期診断法の確立

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

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は GPI アンカーの生合成遺伝子群の変異により重要な機能を担う GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の発現が低下し精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す。現在 15 種類の遺伝子変異による (IGD) が報告されており、国内で 30 例、海外を合わせると約 200 例の報告があり、その多くに我々が関わっている。生後も病態が進行する症例もあるので効率的なスクリーニング体制を構築し、早期に的確に診断し、痙攣に有効とされているピリドキシン投与などの早期治療を行うことが患者の QOL を改善することがわかってきた。一方では FACS で GPI-AP の発現低下を呈し IGD と診断した症例のなかに GPI 遺伝子以外を責任遺伝子とする症例が見つかる等症状が多彩で診断が難しいため、鋭敏な疾患マーカーの検索も進めている。平成 29 年度より指定難病に認定されたので、それに向けて診療ガイドラインを改訂した。スクリーニングに用いる顆粒球の FACS 解析をベッドサイドで行えるよう SRL 社に委託し、患者検体のみで判定できるようカットオフ値を設定する試験運用を準備している。

研究分担者

井上徳光 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

A. 研究目的

GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーは 50 種以上の蛋白質を細胞膜につなぐ糖脂質でその生合成に 27 個の遺伝子が関与する。これら GPI 遺伝子群の変異により重要な機能を担う GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の発現が低下し精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す。現在 15 種類の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症 (IGD) が報告されているが、責任遺伝子が今後も拡大する可能性があり他疾患と診断されたものも病態から IGD に分類されるもの

があると予想される。旧研究班で IGD の診療ガイドラインを作成したが症状が多彩で、最近 GPI 遺伝子以外を責任遺伝子とする IGD も見つかり正確な診断が難しい。さらに生後も病態が進行する症例もあるので早期診断が必要である。新研究班では疾患登録を構築して多症例の臨床像・検査所見を詳細に解析し、より鋭敏な疾患マーカーを見つけそれらを診療ガイドラインに反映させ、より早期の正確な診断を目指す

B. 研究方法

(1) 効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用開始

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スを行う。FACS で低下の見られない症例、あるいはターゲットシーケンスで責任遺伝子が同定できない場合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スを行った。さらに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が完成したので患者登録を開始している。

(2) 診療ガイドラインの改訂と検査の委託

平成 29 年度より指定難病に認定されたので、それに向けて厚生労働省の指導を受け、診療ガイドラインを改訂した。スクリーニングに用いる顆粒球の FACS 解析をベッドサイドで行えるよう SRL 社に委託し、患者検体のみで判定できるようカットオフ値を設定する試験運用を準備している。

(3) 疾患マーカーの検索

マーカーとなりうる血清 GPI-AP としては、アルカリホスファターゼ (ALP) が知られているが、先天性 GPI 欠損症全例で ALP が上昇する訳ではなく、時期変動も大きく、小児期では対照でも比較的高値のため、感度・特異度が低い。他の GPI-AP タンパク質について疾患特異性を解析した。また IGD ではアルカリホスファターゼの発現低下に由来する、ビタミン B6 の取り込み低下による代謝異常が起こっていると考えられる。その測定システムを確立した。

(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。

C. 研究結果

(1) 効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用開始

今年度は国内から 30 例のフローサイトメトリ解析を行い、5 人で CD16 の明らかな低下を認め、IGD と診断した。うち 3 人がターゲットシーケンスで責任遺伝子が同定でき、他の 2 例については現在横浜市立大学にて全エクソーム解析を施行中であるが、まだ責任遺伝子が判明していない。また海外との共同研究により世界で初めて PIGP 欠損症と PIGC 欠損症を報告した。日本で症例数が多い PIGO 欠損症について、変異 PIGO の活性低下の度合いと患者の臨床症状の重症度が相関すること、また同じ GPI 生合成遺伝子の中でも PIGA 欠損症と PIGO 欠損症では共通の症状以外にそれぞれ特徴的な症状があることを報告した。また最近では GPI pathway 以外の遺伝子変異による IGD も見つかり、他の疾患とオーバーラップする症例も今後見つかると思われる。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。

(2) 診療ガイドラインの改訂と検査の委託

診療ガイドラインを改訂し、日本小児神経学会のホームページに掲載される予定である。また作製済みの疾患ホームページに公開している。

(<http://igd.biken.osaka-u.ac.jp/>)

SRL 社と委託契約を結び、プロトコルを作成して、患者検体のみでの CD16 の発現量でカットオフ値を決め、病的な低下を判定するシステムを構築した。まもなく運用の予定である。

(3) 疾患マーカーの検索

分担者の報告にあるように、FOLR1 と FOLR2 が特異的に IGD で上昇していたので ALP 値と組み合わせで疾患マーカーになることがわかった。代謝異常については尿中有機酸分析を島根大学に、血清中のビタミン B 誘導体の濃度を北海道医療大学、髄液中活性化葉酸濃度を岡山大学で測定したが、まだ症例数が少ないので今後多症例を解析して有意性を確認する予定である。

D . 考察

疾患マーカーの検索のためには症例数を増やす必要があるが、希少疾患であるので難しい。全国規模の調査研究が必要である。FACS 解析を SRL 社に委託したので、このシステムを使って調査研究を実施したいと考えている。また AMED が推進している IRUD との連携を図るため、データシェアリングのシステムが早く構築されることを期待している。

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

- Makrythanasis P, Kato M, Zaki MS, Saitsu H, Nakamura K, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima M, Issa MY, Guipponi M, Letourneau A, Logan CV,

Roberts N, Parry DA, Johnson CA, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, Murakami Y. Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia. Am J Hum Genet. 2016 Apr 7;98(4):615-26.

- Knaus A, Awaya T, Helbig I, Afawi Z, Pendziwiat M, Abu-Rachma J, Thompson MD, Cole DE, Skinner S, Annese F, Canham N, Schweiger MR, Robinson PN, Mundlos S, Kinoshita T, Munnich A, Murakami Y, Horn D, Krawitz PM. Rare Noncoding Mutations Extend the Mutational Spectrum in the PGAP3 Subtype of Hyperphosphatasia with Mental Retardation Syndrome. Hum Mutat. 2016 Aug;37(8):737-44.
- Hoglebe M, Murakami Y, Wild M, Ahlmann M, Biskup S, Hörtnagel K, Grüneberg M, Reunert J, Linden T, Kinoshita T, Marquardt T. A novel mutation in PIGW causes glycosylphosphatidylinositol deficiency without hyperphosphatasia. Am J Med Genet A. 2016 Dec;170(12):3319-3322.
- Edvardson S, Murakami Y, Nguyen TT, Shahrour M, St-Denis A, Shaag A, Damseh N, Le Deist F, Bryceson Y, Abu-Libdeh B, Campeau PM, Kinoshita T, Elpeleg O. Mutations in the phosphatidylinositol glycan C (*PIGC*) gene are associated with epilepsy and intellectual disability. J Med Genet. 2017 Mar;54(3):196-201
- Lee GH, Fujita M, Takaoka K, Murakami Y, Fujihara Y, Kanzawa N, Murakami KI, Kajikawa E, Takada Y, Saito K, Ikawa M,

Hamada H, Maeda Y, Kinoshita T. A GPI processing phospholipase A2, PGAP6, modulates Nodal signaling in embryos by shedding CRIPTO. *J Cell Biol.* 2016 Dec 5;215(5):705-718.

- Kolicheski AL, Johnson GS, Mhlanga-Mutangadura T, Taylor JF, Schnabel RD, Kinoshita T, Murakami Y, O'Brien DP. A homozygous PIGN missense mutation in Soft-Coated Wheaten Terriers with a canine paroxysmal dyskinesia. *Neurogenetics.* 2017 Jan;18(1):39-47.
- Ihara S, Nakayama S, Murakami Y, Suzuki E, Asakawa M, Kinoshita T, Sawa H. PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis. *J Cell Sci.* 2017 Feb 1;130(3):602-613.
- Pagnamenta AT, Murakami Y, Taylor JM, Anzilotti C, Howard MF, Miller V, Johnson DS, Tadros S, Mansour S, Temple IK, Firth R, Rosser E, Harrison RE, Kerr B, Popitsch N; DDD Study., Kinoshita T, Taylor JC, Kini U. Analysis of exome data for 4293 trios suggests GPI-anchor biogenesis defects are a rare cause of developmental disorders. *Eur J Hum Genet.* 2017 Mar 22. doi: 10.1038/ejhg.2017.32. [Epub ahead of print]
- Johnstone DL, Nguyen TT, Murakami Y, Kernohan KD, Tétreault M, Goldsmith C, Doja A, Wagner JD, Huang L, Hartley T, St-Denis A, le Deist F, Majewski J, Bulman DE; Care4Rare Canada Consortium., Kinoshita T, Dymont DA, Boycott KM, Campeau PM. Compound

heterozygous mutations in the gene PIGP are associated with early infantile epileptic encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 2017 Mar 7. doi: 10.1093/hmg/ddx077. [Epub ahead of print].

- Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, Murakami Y. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. *Hum Mutat.* 2017 Mar 23. doi: 10.1002/humu.23219. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 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---口頭 村上良子、木下タロウ 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2016.5.29 国内
- 第 68 回日本臨床化学会近畿支部例会 2016 年 7 月 9 日 **特別講演**「補体関連の遺伝子異常について—補体制御因子の異常を中心に—」 国内
- Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations; Atypical PNH, (Poster) Yoshiko Murakami, Norimitsu Inoue, Michi Kawamotoi, Nobuo Kohara, Taroh Kinoshita The 26th International Complement Workshop (XXVI ICW) 2016.9.5 国内
- 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月14日 村上良子 **教育講演**「PNHの発症機序」国内

- Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations; Atypical PNH,
ポスター Yoshiko Murakami,
Norimitsu Inoue, Michi Kawamotoi,
Nobuo Kohara, Taroh Kinoshita 58th
ASH Annual Meeting and Exposition
2016.12.2 San Diego, USA. 海外

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

320 先天性グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)欠損症

概要

1. 概要

糖脂質からなる GPI アンカーは、ほ乳類の細胞においては 150 種以上の蛋白質の膜結合に用いられている。GPI が欠損するとこれらの全ての蛋白質が細胞表面に発現できない。現在までに 27 個の遺伝子が GPI アンカー型蛋白質の生合成や、修飾に必要であることがわかっている。最近、これらの遺伝子の変異による先天性グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)欠損症(Inherited GPI deficiency: IGD)が次々と見つかっており、現在までに 15 種類の遺伝子による IGD が報告されている。従来 Mabry 症候群として知られていた、高アルカリホスファターゼ(ALP)血症、精神運動発達遅滞・てんかんを呈する疾患が IGD であることが明らかになっているが、今後もオーバーラップする疾患が見つかると思われる。

2. 原因

GPI が欠損すると 150 種以上の GPI アンカー型蛋白質が細胞表面に発現できないので GPI 生合成遺伝子の完全欠損は胎生致死になる。IGD は 27 個の GPI 生合成や修飾に関わる遺伝子のうちのどれかが様々な程度に活性が低下した部分欠損症である。症状は細胞膜上の GPI アンカー型蛋白質の発現低下や構造異常によって起こり、変異遺伝子やその活性低下の程度により多様な症状を示す。症状のうち、てんかんの原因の一つとして GPI アンカー型蛋白質である ALP の発現低下が挙げられる。

3. 症状

必須症状は、精神・運動発達の遅れで、多くはてんかんを伴う。大田原症候群・ウエスト症候群など乳児早期発症の難治性てんかんと診断された患者のなかにも見つかっている。他によく見られる特徴として顔貌異常(両眼解離、テント状の口)、手指・足趾の異常(末節骨の短縮、爪の欠損等)、難聴、その他の奇形(肛門・直腸の異常、ヒルシュスプルング病、水腎症等)等がある。一部の患者では高 ALP 血症がみられるので、診断の良い指標となっている。末梢血顆粒球のフローサイトメトリー検査で GPI アンカー型タンパク質である CD16 の発現低下があることで診断が確定するが、責任遺伝子の同定のためにターゲットエクソームあるいは全エクソーム解析による遺伝子解析を必要とする。

4. 治療法

IGD にみられるてんかんの原因の一つとして、神経細胞表面に発現する ALP の発現低下によりビタミン B₆ の脱リン酸化がおこらないため、細胞内に取り込めないことがあげられる。細胞内のビタミン B₆ が欠乏すると、神経細胞の興奮を押さえる GABA 合成が低下するので痙攣発作がおこる。リン酸化のないビタミン B₆ (ピリドキシン)の投与がてんかん発作に有効な症例がある。その他にも有効な補充療法の開発にむけて研究が行われている。

5. 予後

遺伝子異常による疾患で、発生初期からの発達異常を伴うので根本治療は今のところない。症状の程度

は軽度の知的障害等から、最重度は多臓器の奇形や難治性てんかん、重度の精神・運動発達の遅れを呈して新生児・乳児期に死亡する。また胎内死亡の症例も報告されている。最重度の症例以外の多くは成人期まで生存し、痙攣のコントロール等の対症療法を中心とする長期の療養を要する。

要件の判定に必要な事項

1. 患者数
100 人未満
2. 発病の機構
未解明(遺伝子異常による疾患であるが病態については未解明)
3. 効果的な治療方法
未確立(根本的な治療法はない。種々の対症療法。ピリドキシンの補充療法が有効な症例がある。)
4. 長期の療養
必要(発症後、生涯にわたって治療の継続を要する。)
5. 診断基準
あり(学会承認の診断基準)
6. 重症度分類
Barthel Index を用いて、85 点以下を対象とする。

情報提供元

「先天性 GPI 欠損症の症例登録システムの構築と実態調査及び早期診断法の確立」

代表者 大阪大学微生物病研究所 准教授 村上良子

「先天性 GPI 欠損症の診療ガイドラインの整備と病態解析及び治療法の開発」

代表者 大阪大学微生物病研究所 准教授 村上良子

< 診断基準 >

Definite、Probableを対象とする。

A. 症状

1. 主症状

周産期異常を伴わない知的障害があり、多くは運動発達の遅れ、てんかんを伴い時に家族性に見られる。

2. 他に頻度の高い症状として以下の症状がある。

新生児期、乳児期早期発症の難治性てんかん

顔貌異常：両眼解離、幅の広い鼻梁、長い眼裂・テント状の口、口唇・口蓋裂、耳介の形態異常

手指、足趾の異常：末節骨の短縮、爪の欠損・低形成¹

その他の奇形：肛門・直腸の異常、無ガングリオン性巨大結腸、水腎症、心奇形など

難聴、眼・視力の異常

皮膚の異常：魚鱗癬など

筋緊張低下、関節拘縮、四肢の短縮

高アルカリホスファターゼ(ALP)血症

B. 検査所見

1. 多くは末梢血顆粒球のフローサイトメーター解析によりCD16の発現低下を示す。

2. 以下の検査所見が見られることがある。

高アルカリホスファターゼ(ALP)血症(年齢別正常値の上限を超える。)

手指・足趾のX線写真で末節骨欠損

聴性脳幹反応(ABR)の異常

脳MRIの拡散強調画像(DWI)にて基底核に高信号、進行性の小脳萎縮、髄鞘化の遅延

C. 遺伝学的検査

GPIアンカー型タンパク質の生合成および発現・修飾・輸送に関与する遺伝子(*PIGA*、*PIGY*、*PIGQ*、*PIGH*、*PIGC*、*PIGP*、*PIGL*、*PIGW*、*PIGM*、*PIGX*、*PIGV*、*PIGN*、*PIGB*、*PIGO*、*PIGF*、*PIGG*、*PIGZ*、*PIGK*、*PIGT*、*PIGS*、*GPAA1*、*PIGU*、*PGAP1*、*PGAP2*、*PGAP3*、*PGAP5*、*PGAP6* 等のいずれかに変異を認める。)

D. 鑑別診断

先天性GPI欠損症が原因でない大田原症候群、ウエスト症候群、ヒルシュスプルング病

< 診断のカテゴリー >

Definite:

(1) Aの1 + Bの1 + Cを満たすもの

(2) Bの1を満たさないが、Aの1 + Aの2のうち1項目以上 + Cを満たすもの*

Probable: Aの1 + Bの1を満たすもの

*備考: 病型によっては(PGAP1、PGAP3、PIGG 欠損症など) Bの1を満たさないものがあるので、

Aの1に加え、Aの2のうち1項目以上を満たしていれば遺伝子診断を行う。

この病型については診断のために遺伝子解析が必須である。

<重症度分類>

Barthel Index で 85 点以下を対象とする。

	質問内容	点数
1 食事	自立、自助具などの装着可、標準的時間内に食べ終える	10
	部分介助(たとえば、おかずを切って細かくしてもらう)	5
	全介助	0
2 車椅子からベッドへの移動	自立、ブレーキ、フットレストの操作も含む(歩行自立も含む)	15
	軽度の部分介助または監視を要する	10
	座ることは可能であるがほぼ全介助	5
	全介助または不可能	0
3 整容	自立(洗面、整髪、歯磨き、ひげ剃り)	5
	部分介助または不可能	0
4 トイレ動作	自立(衣服の操作、後始末を含む、ポータブル便器などを使用している場合はその洗浄も含む)	10
	部分介助、体を支える、衣服、後始末に介助を要する	5
	全介助または不可能	0
5 入浴	自立	5
	部分介助または不可能	0
6 歩行	45m以上の歩行、補装具(車椅子、歩行器は除く)の使用の有無は問わず	15
	45m以上の介助歩行、歩行器の使用を含む	10
	歩行不能の場合、車椅子にて 45m以上の操作可能	5
	上記以外	0
7 階段昇降	自立、手すりなどの使用の有無は問わない	10
	介助または監視を要する	5
	不能	0
8 着替え	自立、靴、ファスナー、装具の着脱を含む	10
	部分介助、標準的な時間内、半分以上は自分で行える	5
	上記以外	0
9 排便コントロール	失禁なし、浣腸、坐薬の取り扱いも可能	10
	ときに失禁あり、浣腸、坐薬の取り扱いに介助を要する者も含む	5
	上記以外	0
10 排尿コントロール	失禁なし、収尿器の取り扱いも可能	10
	ときに失禁あり、収尿器の取り扱いに介助を要する者も含む	5
	上記以外	0

診断基準及び重症度分類の適応における留意事項

- 1 . 病名診断に用いる臨床症状、検査所見等に関して、診断基準上に特段の規定がない場合には、いずれの時期のものを用いても差し支えない(ただし、当該疾病の経過を示す臨床症状等であって、確認可能なものに限る)。
- 2 . 治療開始後における重症度分類については、適切な医学的管理の下で治療が行われている状態で、直近6か月間で最も悪い状態を医師が判断することとする。
- 3 . なお、症状の程度が上記の重症度分類等で一定以上に該当しない者であるが、高額な医療を継続することが必要な者については、医療費助成の対象とする。