

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題名
先天性 GPI 欠損症の調査研究

分担研究者： 村上良子（大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門教授）

研究要旨

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す遺伝性疾患で、今年度新規に 1 遺伝子の欠損症が見つかり現在 19 種類の遺伝子変異による IGD が報告されている。国内で約 40 例、海外を合わせると約 300 例の報告があり、その多くに我々が関わっている。SRL 社に FACS 解析を委託し全国的なスクリーニングを実施するとともに、遺伝子解析による責任遺伝子の同定を行った。

研究協力者氏名

井上徳光 公立大学法人和歌山県立医科大学
分子遺伝学講座 教授

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先天性 GPI 欠損症 (IGD) となる。今年度新規に 1 遺伝子の欠損症が見つかり現在 19 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。IGD は症状が多様なのでベッドサイドでの診断が難しい。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。疾患登録を推進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

効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用

平成 29 年度より指定難病、30 年度より小児慢性特定疾病に認定された。フローサイトメトリ

ーによる顆粒球上の CD16b の発現量の低下がスクリーニングに有効であることが今までの研究でわかってきた。この 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施行した。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スを行った。ターゲットシーケンスで責任遺伝子が同定できない症例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。また FACS 解析で有意な低下が見られるにも係わらず、全エクソーム検査にて原因遺伝子が同定できない症例については、RNAseq や全ゲノムシーケンスを試みている。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を作成したのでの患者登録を進めている。

（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。

C . 研究結果

海外との共同研究により、今年度新たにPIGS遺伝子変異によるIGDを報告した。これで19種の遺伝子異常によるIGDの症例が国内外で約300例報告されている。

SRLでの試験運用の結果、FACSにおける平均蛍光強度で、顆粒球上のCD16発現量を定量し、カットオフ値を

IGD probable <34492

44326> IGD possible >34492 とした。

今年度はコントロールを含め113件のSRLでのFACS解析を行い、69例の患者のうち4人がprobable 1人がpossibleであった。これらについて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った。その結果上記のうち2人にPIGA遺伝子に変異を認めた。

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く全国規模の調査研究が必要である。またAMEDが推進しているIRUDとの連携を図る必要がある。遺伝子解析から診断をするシステムが複数走り、診断がついても、その疾患の専門家である政策班に知らされていない。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 . 研究発表

1. 論文発表

- Wang Y, Hirata T, Maeda Y, Murakami Y, Fujita M, Kinoshita T. [Free, unlinked glycosylphosphatidylinositols on mammalian cell surfaces revisited](#). *J Biol Chem*. 2019 Feb 6. pii: jbc.RA119.007472.
- Nguyen, T. T. M., Y. Murakami, K. M. Wigby, N. V. Baratang, A. St-Denis, J. A. Rosenfeld, S. C. Laniewski, J. Jones, A. D. Iglesias, GeneDx analyst, M. Jones, D. Masser-Frye, R.n Taft, M. Thompson, F. Le Deist, T. Kinoshita and P. M. Campeau. Mutations in PIGS encoding a GPI transamidase protein cause a neurological syndrome ranging from fetal akinesia to epileptic encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2018 103(4):602-611.
- Kawamoto, M., Y. Murakami, T. Kinoshita and N. Kohara. Recurrent aseptic meningitis with *PIGT* mutations: a novel pathogenesis of recurrent meningitis successfully treated by eculizumab. *BMJ Case Reports*, 2018.doi: 10.1136/bcr-2018-225910.
- Pagnamenta, A. T. ⁺, Y. Murakami⁺, C. Anzilotti, H. Titheradge, A. J. Oates, J. Morton, The DDD Study, T. Kinoshita⁺, U. Kini⁺, J. C. Taylor⁺. A homozygous variant disrupting the *PIGH* start-codon is associated with developmental delay, epilepsy and microcephaly..*Hum Mutat*, 2018 39:822-826.
- Mogami, Y., Y. Suzuki, Y. Murakami, T. Ikeda, S. Kimura, K. Yanagihara, N. Okamoto and T. Kinoshita. Early infancy-onset stimulation-induced myoclonic seizures in three siblings with inherited glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency. *Epileptic Disord.*, 2018. 20:42-50.

- Hirata, T., S. K. Mishra, S. Nakamura, K. Saito, D. Motooka, Y. Takada, N. Kanzawa, Y. Murakami, Y. Maeda, M. Fujita, Y. Yamaguchi and T. Kinoshita. Identification of a Golgi GPI-N-acetylgalactosamine transferase with tandem transmembrane regions in the catalytic domain. *Nat. Commun.*, 2018. 9:405.

2. 学会発表

- 王 宜成、平田哲也、村上良子、前田裕輔、木下タロウ B3GALT4 による GPI アンカー側鎖へのガラクトース付加にはラクトシルセラミドが必要である。第 37 回日本糖質学会年会 2018-8-28～30 仙台国際センター
- 大里真幸子、村上良子、植田康敬、西村純一、金倉譲、木下タロウ PIGT 遺伝子欠損によるインフラマソーム活性化メカニズムの解明 第 55 回日本補体学会学術集会 2018-8-31～9-1 北九州国際会議場 北九州市
- Yoshiko Murakami, Makiko Osato, Yasutaka Ueda, Jun-ichi Nishimura, Yuzuru Kanakura and Taroh Kinoshita Mechanism of Autoinflammation in PIGT-PNH XXVII International Complement Workshop, 2018-9-16～20 Santa Fe, NM, USA

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし