

分担研究課題名

先天性 GPI 欠損症をはじめとする先天性糖鎖異常症に関する研究

分担研究者： 村上良子（大阪大学微生物病研究所 特任教授）

研究要旨

先天性 GPI 欠損症(IGD)について今年度は PIGV, PIGK 欠損症が見つかり、そのうちの PIGK 欠損症は国内で初めての症例であった。GPI 生合成に関わる遺伝子として ARV1 と CPLTM1L が新たに同定されて 30 遺伝子となりそのうち 24 種類の遺伝子変異による IGD が報告されている。先天性糖鎖異常症について SRL 社での FACS 解析と母子医療センターでの糖鎖分析によるスクリーニングを実施し、陽性例についてかずさ DNA 研究所での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

所属機関名及び所属機関における職名

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

岡本伸彦 大阪府立病院機構大阪母子医療セン

ター・遺伝診療科 研究所長

高橋幸利 国立病院機構 静岡てんかん・神経

医療センター 院長

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、今年度同定された新規の遺伝子 CLPTM1L と ARV1 が加わり、その生合成に 29 個の遺伝子が関与する。これら GPI 遺伝子群の変異により精神・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。現在 24 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 は先天性糖鎖異常症 (CDG) の 1 病型で、今年度は CDG の IGD を含めた CDG の昨年度構築した系を用いて、スクリーニングを実施し、診断基準の制定を目標とした。CDG 症例を集積し、多症例の臨床像・検査所見を詳細に解析し、鋭敏な疾患マーカーを見つけ、より早期の正確な診断を

目指す。また検査の継続性を担保するために検査会社に技術移転をして IGD に対するフローサイトメトリー検査と質量分析による糖鎖解析検査の保険収載を目指している。

B. 研究方法

IGDを含めたCDGのスクリーニングについてはAMED班（代表村上良子）と協力して構築済みの系を運用した。IGDはエス・アール・エル社に委託しているフローサイトメトリー検査による顆粒球上CD16の発現レベルがカットオフ値以下になった症例を陽性としてさらに疾患マーカーとしてCEA値を参考とした。残余血清を母子医療センターに送り、質量分析による糖鎖解析を実施し、これらの検査のいずれかが陽性の症例はかずさDNA研究所での遺伝子パネル解析を実施した。母子医療センターで実施しているトランスフェリンの糖鎖解析についてエス・アール・エル社に技術移転を行い、委託検査の準備を行った。

（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

スクリーニング系にて29症例の解析を行い、IGDの疑いが4例、CDG 疑いが3例あり、遺伝子解析中である。また他機関での遺伝子解析によりIGDではPIGV, PIGK 欠損症が見つかりそれぞれの遺伝子のノックアウト細胞を用いて機能解析を行い、病的変異であることを確認した。PIGK 欠損症は日本では初めての症例である。これらはフローサイトメトリーでは異常が見られなかったため、マイルドなケースはスクリーニングで診断できない場合があり注意が必要である。CDG では SLC35A2 欠損症が見つかり糖鎖解析とノックアウト細胞を使った機能解析により病的変異であることを確認した。CDG のうちN型・ムチン型糖鎖異常症について診断基準を制定し、先天性グリコシル化異常症(狭義)として小児慢性特定疾病に認定された。

IGD については遺伝子パネル検査による遺伝子解析が保険収載された。今後スクリーニングに必要な検査を保険収載するために、トランスフェリンの糖鎖解析検査のエス・アール・エル社への技術移転を進め、ほぼ完了した。今後実際に患者サンプルの検査を委託する予定である。

D. 考察

IGD を含め、CDG は症状が広範で、症状から診断をすることが困難である。IGD の遺伝子パネル検査が保険収載されたことは、一歩前進であるが、症例を絞り込むためにはスクリーニング検査が必須である。残念ながら IGD のフローサイトメトリー検査の保険収載が今年度も叶わなかったため、3度目の次回にむけて準備を進める。CDG についても同様に、検査の委託を進めて実績を

積み重ね、保険収載の手続きを進める予定である。

また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。IRUD をはじめとす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、その疾患の研究班である政策班に知らされていない。誰でも登録すれば検索できる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

構築したスクリーニングシステムを使ってIGDとCDGの疑い例を抽出した。遺伝子解析から見つかった症例3例について機能解析を行い、病的変異であることを確認した。CDGのうちN型・ムチン型糖鎖異常症について診断基準を制定し、先天性グリコシル化異常症として小児慢性特定疾病に認定された。IGDについては遺伝子パネル検査による遺伝子解析が保険収載された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okuda, T., T. Yonekawa, Y. Murakami, T. Kinoshita, K. Matsushita, Y. Koike, M. Inoue, K. Uchida, N. Yodoya, H. Ohashi, H. Sawada, S. Iwamoto, Y. Mitani and M. Hirayama. 2021. PIGO variants in a boy with features of Mabry syndrome who also exhibits Fryns syndrome with peripheral neuropathy. *Am. J. Med. Genet.*, 185A:845-849.

Salian, S., H. Benkerroum, T. T. M. Nguyen, S. Nampoothiri, T. Kinoshita, T. M. Félix, F. Stewart, S. M. Sisodiya, Y. Murakami and P. M. Campeau. 2021. PIGF deficiency causes a phenotype overlapping with DOORS syndrome. *Hum. Genet.*, 140(6):879-884.

Tremblay-Laganière, C., Thi Tuyet Mai Nguyen, R. Maroofian, E. Ghayoor

Karimiani, S. Kirmani, F. Akbar, S. Ibrahim, B. Afroze, M. Doosti, F. Ashrafzadeh, M. Babaei, S. Efthymiou, T. Sultan, R. L. Ladda, H. M. McLaughlin, R. Truty, S. Mahida, J. Cohen, K. Baranano, F. Ismail, M. S. Patel, A. Lehman, A. C. Edmondson, A. Nagy, M. A. Walker, S. Mercimek-Andrews, Y. Maki, R. Sachdev, R. Macintosh, E. E. Palmer, G. M. S. Mancini, T. Stefan Barakat, R. Steinfeld, C. Rüscher, G. Stettner, M. Wagner, S. B. Wortmann, U. Kini, A. F. Brady, K. L. Stals, N. Ismayilova, S. Ellard, H. Houlden, T. Kinoshita, P. M. Campeau and Y. Murakami. 2021. PIGG variant pathogenicity assessment reveals characteristic features within 19 families. *Genet. Med.*, 23(10):1873-1881.

Tanigawa, J., S. Nabatame, K. Tominaga, Y. Nishimura, Y. Maegaki, T. Kinoshita, Y. Murakami and K. Ozono. 2021. High-dose pyridoxine treatment for inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Brain Dev.*, 43:680-687.

Duval, R., G. Nicolas, A. Willemetz, Y. Murakami, M. Mikdar, C. Vrignaud, H. Megahed, J.-P., Cartron, C. Masson, S. Wehbi, B. Koehl, M. Hully, K. Siquier, N. Chemlay, A. Rotig, S. Lyonnet, Y. Colin, G. Barcia, V. Cantagrel, C. Le Van Kim, O. Hermine, T. Kinoshita, T. Peyrard and S. Azouzi. 2021. Inherited glycosylphosphatidylinositol defects cause the rare Emm-negative blood phenotype and developmental disorders. *Blood*, 137(26):3660-3669.

Liu, S.-S., Y.-S. Liu, X.-Y. Guo, Y. Murakami, G. Yang, X.-D. Gao, T. Kinoshita and M. Fujita. 2021. A knockout cell library of GPI biosynthetic genes for functional studies of GPI-anchored proteins. *Commun. Biol.*, 4:777.

Guerrero Muñoz, P. A.,* Y. Murakami,* A. Malik, P. H. Seeberger, T. Kinoshita and D. Varón Silva. 2021. Rescue of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein biosynthesis using synthetic

glycosylphosphatidylinositol oligosaccharides. *ACS Chem. Biol.*, 16:2297-2306.

Wang, Y., A. K. Menon, Y. Maki, Y.-S. Liu, Y. Iwasaki, M. Fujita, P. A. Guerrero, D. Varón Silva, P. H. Seeberger, Y. Murakami and T. Kinoshita. 2022. Genome-wide CRISPR screen reveals CLPTM1L as a lipid scramblase required for efficient glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 119: in press.

2. 学会発表

村上良子 第57回日本補体学会学術集会 集会長 大阪 2021 9月

村上良子 PNHの発症機序 第87回日本血液学会学術集会 教育講演 仙台(リモート)2021 9月

村上良子、真木勇太、木下タロウ GPI アンカー型タンパク質の第2マンノースを介した結合の発見: PIGG 欠損症の発症原理 第40回日本糖質学会 鹿児島 口頭発表 2021 10月

村上良子 PIGT, PIGB 変異による発作性夜間嫁グロビン尿症の自己炎症病態 第30回日本小児リウマチ学会学術集会 シンポジウム招待公演 2021 10月

村上良子 先天性 GPI 欠損症 第62回日本先天代謝異常学会学術集会 教育講演 2021. 11月
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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