

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）は欧米では先天性糖鎖異常症（CDG）の 1 型とされており、知的障害やてんかんなど共通した症状を呈する。両者を共通のラインで、FACS (IGD) と糖鎖解析（CDG）によるスクリーニング系を構築し、FACS に続いて糖鎖解析も検査会社での委託検査を進めている。超希少疾患で症状が他疾患とオーバーラップするので、診断のためには網羅的な遺伝子解析のデータのシェアリングや網羅的なスクリーニングが必要である。今期の成果としては 45 名の CDG 新規症例 (IGD 含む) の診断と 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こと、IGD の遺伝子パネル検査が保険収載されたことがあげられる。

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 研究部長

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

イトメトリ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。根本的な治療はないが、ピリドキシン（ビタミン B6）や活性化葉酸の補充療法が試みられている。

B. 研究方法

AMED 班（代表村上良子）と協力して CDG の実態調査としてアンケート調査を行った。また IGD を含めた CDG の共通のスクリーニング系を以下のように構築した。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よる N 型糖鎖解析と apo-CIII タンパク質の糖鎖解析によるムチン型糖鎖の解析についてエス・アール・エル社に技術移転を行い、正常コントロールを測定し、カットオフ値の設定を行なった。

（倫理面への配慮）

大阪大学における倫理委員会に申請し承認されている。検体の解析、保管、データベースへの登録、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

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昨年度同定された、新規の遺伝子 CLPTM1L と ARV1 が加わり、その生合成に 30 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潜性遺伝性疾患、先天性 GPI 欠損症 (IGD) が報告されている。現在までに国内症例は 55 例あり、海外症例を含めて約 600 例の報告がある。IGD は先天性糖鎖異常症 (CDG) の 1 病型で、臨床症状も類似しているので、国内では共通のラインで、FACS (IGD) と糖鎖解析 (CDG) によるスクリーニングを実施している。一方国内外の網羅的な遺伝子解析から見つかる例についてはその機能解析を実施している。症例を集積して疾患登録することにより、鋭敏な疾患マーカーを見つけ、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

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

国内のCDGの実態調査では、IGDは49例、その他のCDGは44例でこれらはほぼ阪大および母子医療センターが把握している症例と重なっていた。このことは積極的にスクリーニングが必要であることを示唆するとともに、超希少疾患で症状が他疾患とオーバーラップするので、網羅的なスクリーニング方法を使って検体数を増やさないとなかなか見つからないことがわかる。CDGについてはこの3年間に700人の糖鎖解析を行い、33名の新規CDG症例を診断したが、そのほとんどは網羅的な遺伝子解析で先に変異が見つかり、糖鎖解析により確定診断できた症例である。IGDについても85例についてスクリーニングをおこなったが新規症例は見つからず、IRUDなど網羅的な遺伝子解析で見つかった12例についてフローサイトメトリーによる機能解析を行った。以前のデータであるが2017-2019年度は107例検査して4例、2012-2016年度142例検査して15例の新規症例がスクリーニングで見つかっている。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。またIGDの遺伝子パネル検査が保険収載された。

D. 考察

IGDを含め、CDGは症状が広範で、症状から診断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、顆粒球におけるCD16のフローサイトメトリー検査の保険収載を目指している。新規の原因遺伝子を見つける上ではスクリーニングは重要であるが、既知の責任遺伝子については、網羅的な遺伝子解析が威力を発揮する。遺伝子解析が多くの施設で実施されているが依然としてデータのシェアが進んでいないので、我々のもとに連絡が届くのは一部の症例のみである。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。また将来的には遺伝子治療が実施できる可能性があり、マススクリーニングを視野に入れた網羅的なスクリーニング系の構築が必要にな

ると考えられ、準備を進めている。

E. 結論

IGDとCDGに共通のスクリーニングシステムを構築して運営している。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。ま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よるN型糖鎖解析とapo-CIIIタンパク質の糖鎖解析によるムチン型糖鎖の解析についてエス・アール・エル社に技術移転を行い、正常コントロールを測定し、カットオフ値の設定を行なった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Fatima A, Hoeber J, Schuster J, Koshimizu E, Maya-Gonzalez C, Keren B, Mignot C, Akram T, Ali Z, Miyatake S, Tanigawa J, Koike T, Kato M, Murakami Y, Abdullah U, Ali MA, Fadoul R, Laan L, Castillejo-López C, Liik M, Jin Z, Birmir B, Matsumoto N, Baig SM, Klar J, Dahl N. Mono-allelic and bi-allelic variants in NCDN causeneurodevelopmental delay, intellectual disability, and epilepsy Am J Hum Genet. 2021 doi: 10.1016/j.ajhg.2021.02.015
- Salian S, Benkerroum H, Nguyen TTM, Nampoothiri S, Kinoshita T, Félix TM, Stewart F, Sisodiya SM, Murakami Y, Campeau PM. PIGF deficiency causes a phenotype overlapping with DOORS syndrome. Hum Genet. 2021 doi: 10.1007/s00439-020-02251-2
- Langemeijer S, Schaap C, Preijers F, Jansen JH, Blijlevens N, Inoue N, Muus P, Kinoshita T, Murakami Y. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by CN-LOH of constitutional PIGB mutation and 70-kbp microdeletion on 15q Blood Adv. 2020 Nov 24;4(22):5755-5761.
- Lee GH, Fujita M, Nakanishi H, Miyata H, Ikawa M, Maeda Y, Murakami Y, Kinoshita T. PGAP6, a GPI-specific phospholipase A2, has narrow substrate specificity against GPI-anchored proteins J Biol Chem. 2020 Oct

- 16;295(42):14501-14509.
- Nguyen TTM, Murakami Y, Mobilio S, Niceta M, Zampino G, Philippe C, Moutton S, Zaki MS, James KN, Musaev D, Mu W, Baranano K, Nance JR, Rosenfeld JA, Braverman N, Ciolfi A, Millan F, Person RE, Bruel AL, Thauvin-Robinet C, Ververi A, DeVile C, Male A, Efthymiou S, Maroofian R, Houlden H, Maqbool S, Rahman F, Baratang NV, Rousseau J, St-Denis A, Elrick MJ, Anselm I, Rodan LH, Tartaglia M, Gleeson J, Kinoshita T, Campeau PM. Bi-allelic Variants in the GPI Transamidase Subunit PIGK Cause a Neurodevelopmental Syndrome with Hypotonia, Cerebellar Atrophy, and Epilepsy *Am J Hum Genet.* 2020 Apr 2;106(4):484-495.
 - Thompson MD, Knaus AA, Barshop BA, Caliebe A, Muhle H, Nguyen TTM, Baratang NV, Kinoshita T, Percy ME, Campeau PM, Murakami Y, Cole DE, Krawitz PM, Mabry CC.
A post glycosylphosphatidylinositol (GPI) attachment to proteins, type 2 (PGAP2) variant identified in Mabry syndrome index cases: Molecular genetics of the prototypical inherited GPI disorder *Genet.* 2020; 63(4): 103822.
 - 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.
 - Thompson MD, Li X, Spencer-Manzon M, Andrade DM, Murakami Y, Kinoshita T, Carpenter TO. Excluding Digenic Inheritance

- of *PGAP2* and *PGAP3* Variants in Mabry Syndrome (OMIM 239300) Patient: Phenotypic Spectrum Associated with *PGAP2* Gene Variants in Hyperphosphatasia with Mental Retardation Syndrome-3 (HPMRS3) *Genes* (Basel). 14(2):359. 2023
- Liu YS, Wang Y, Zhou X, Zhang L, Yang G, Gao XD, **Murakami Y**, Fujita M, Kinoshita T. Accumulated precursors of specific GPI-anchored proteins upregulate GPI biosynthesis with ARV1 *J Cell Biol.* 222(5) :e202208159. 2023
 - Salinas-Marín R, **Murakami Y**, González-Domínguez CA, Cruz-Muñoz ME, Mora-Montes HM, Morava E, Kinoshita T, Monroy-Santoyo S, Martínez-Duncker I. Case report: Functional characterization of a *de novo* c.145G>A p.Val49Met pathogenic variant in a case of PIGA-CDG with megacolon *Front Genet.* 13:971473. 2022
 - Loong L, Tardivo A, Knaus A, Hashim M, Pagnamenta AT, Alt K, Böhrer-Rabel H, Carollopis A, Cole T, Distelmaier F, Edery P, Ferreira CR, Jezela-Stanek A, Kerr B, Kluger G, Krawitz PM, Kuhn M, Lemke JR, Lesca G, Lynch SA, Martinez F, Maxton C, Mierzevska H, Monfort S, Nicolai J, Orellana C, Pal DK, Płoski R, Quarrell OW, Rosello M, Rydzanicz M, Sabir A, Śmigiel R, Stegmann APA, Stewart H, Stumpel C, Szczepanik E, Tzschach A, Wolfe L, Taylor JC, **Murakami Y**, Kinoshita T, Bayat A, Kini U. Biallelic variants in PIGN cause Fryns syndrome, multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome, and neurologic phenotypes: A genotype-phenotype correlation study *Genet Med.* 25(1):37-48. 2023
 - Shichinohe N, Kobayashi D, Izumi A, Hatanaka K, Fujita R, Kinoshita T, Inoue N, Hamaue N, Wada K, **Murakami Y**. Sequential hydrolysis of FAD by ecto-5' nucleotidase CD73 and alkaline phosphatase is required for uptake of vitamin B₂ into cells *J Biol Chem.* ;298(12):102640 2022
 - Kuwayama R, Suzuki K, Nakamura J, Aizawa E, Yoshioka Y, Ikawa M, Nabatame S, Inoue I, Shimmyo Y, Ozono K, Kinoshita T, **Murakami Y** Establishment of mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy *Nat Commun* 13:3107 doi.org/10.1038/s41467-022-30847-x 2022
 - Ishida M, Maki Y, Ninomiya A, Takada Y, Campeau P, Kinoshita T, **Murakami Y** The ethanolamine phosphate on the second mannose as an alternative bridge in GPI anchored proteins: Implications in the study of inherited GPI deficiency *EMBO Rep*, e54352.doi: 10.15252/embr.202154352 2022
 - Wang Y, Menon AK, Maki Y, Liu YS, Iwasaki Y, Fujita M, Guerrero PA, Varón Silva D, Seeberger PH, **Murakami Y**, Kinoshita T Genome-wide CRISPR screen reveals CLPTM1L as a lipid scramblase required for efficient glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 119(14): e2115083119 2022
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
- 村上良子 GPI 異常症 : 先天性 GPI 欠損症と

発作性夜間ヘモグロビン尿症 第 63 回日本
神経学会シンポジウム 東京 2022 5 月

村上良子 先天性 GPI 欠損症 第 18 回先天
代謝学会セミナー 東京 2022 7 月

村上良子 鈴木啓一郎 木下タロウ 先天性
PIGO 欠損症のモデルマウスの作製とその遺
伝子治療 第 41 回日本糖質学会 大阪 2022 9
月

Yoshiko Murakami, Tian Tian Lu, Xueying Li,
Yicheng Wang, Taroh Kinoshita ARV1 works
as a component of the first step complex of GPI
biosynthesis facilitating the recruitment of the
substrate; phosphatidylinositol.
第 95 回生化学会 名古屋 2022 11 月

村上良子 先天性 GPI 欠損症の診断と治療
第 45 回分子生物学会 ワークショップオー
ガナイザー 千葉 2022 11-12 月

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