

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

国内では3例の新規 IGD 症例（PIGW, PIGA, PGAP3 欠損症）と6例の新規 CDG 症例（RFT1, DPAGT1, ATP6AP2, SLC35A2, NGLY1 欠損症）の機能解析を行った。いずれも遺伝子解析で見つかった症例であった。海外からは8件の IGD の疑い症例の相談があり（PIGN, PIGM, PGAP1, 2 件, PIGO, PIGG, 3 件）機能解析を行って診断した。N 型およびムチン型糖鎖解析のエス・アール・エル社への技術移転が完了した。SRL に委託運営していたフローサイトメトリー検査が来年度より保険収載されることになった。疾患登録にも力を入れている。

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 名誉院長・小児科非常勤医師

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、臨床症状も類似しているため、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 に対するフローサイトメトリー検査の保険収載の申請をしていたが、ようやく来年度より詳細されることが決まった。質量分析による糖鎖解析検査についても SRL への技術移転が完了したので運営実績を積み重ねて、保険収載を目指す。

B. 研究方法

IGDを含めたCDGのスクリーニングについては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た。網羅的な遺伝子解析から見つかる例については、IGDについては末梢顆粒球のフローサイトメトリーによるCD16の発現解析とともに、ノックアウト細胞を用いたレスキュー実験により、機能解析を行った。CDGについては血清タンパク質の糖鎖解析を行った。昨年度に引き続き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、カットオフ値の設定が完了した。現在は委託検査の始動に向けて事務的な手続きを進めている。IGDについては非臨床での遺伝子治療の有効性が証明されたので、将来に向けて、新生児マススクリーニングにおける質量分析による診断開発を進めている。CDGについてはすでに濾紙血での解析が確立できている。さらに CDG患者の集積と疾患登録の促進のため、IRUDとの連携を模索している。村上自身がメンバーでもある大阪大学IRUD解析拠点が中心となり、IRUD運営会議でアナウンスして全国で見つかる CDG関連遺伝子の変異症例の情報共有の協力体制を呼びかけている。

(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

スクリーニングについてIGDについては陽性例がなく、CDGについては2例の明らかな糖鎖異常を確認し、現在遺伝子解析中である。遺伝子解析からは国内のIGDでは PIGW欠損症(既知変異)、PIGA欠損症(スプライシング異常)、PGAP3欠損症(フレームシフト、UPD)の新規症例が見つかり、フローサイトメトリー検査を行った。海外からは8件のIGDの疑い症例の相談があり (PIGN, PIGM, PGAP1, 2件, PIGO, PIGG, 3件) それぞれ機能解析を行って診断した。今まで見つかったPIGM欠損症はプロモーター部分のSp1結合部位の変異で、難治性けいれんはみられたが知能低下がなく血栓症など他のIGDには見られない症状を呈していた。今回見つかったPIGM欠損症は初めてのコーディング部分の変異で他のIGDと同様の症状であった。CDGでは6例の新規症例があり、そのうちNGLY1欠損症は国内初の症例であった。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の保険収載の申請をしていたが、ようやく来年度より収載されることが決まった。質量分析による糖鎖解析検査についてもSRLへの技術移転が完了したので運営実績を積み重ねて、保険収載を目指す。疾患登録については、難病プラットフォーム、REDCap, JaSMInの3者について、臨床医の負担をなるべく軽くする工夫をして、登録に協力してもらえるようなシステムを作ったので、今後に期待したい。令和6年3月3日に第8回IGD患者会を開催し、今後の運営と会則の作成などについて話し合った。これからは患者家族主体で運営していくことになる。

D. 考察

遺伝子解析が多くの施設で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

。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、既知の責任遺伝子変異については、網羅的な遺伝子解析が威力を発揮する。疾患登録の必要性もあるので各IRUD拠点に呼びかけてCDG関連遺伝子の変異症例を、阪大に集積してもらえようように依頼しているが、なかなか伝わっていない。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

網羅的な遺伝子解析によって見つかった国内外のIGD症例について機能解析を行い、多数の新規症例の確定診断を行った。また国内のCDG症例についても糖鎖解析による機能解析を行った。IGDに対するフローサイトメトリー検査が保険収載されることが決まった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Liu, Y.-S.#, Y. Wang#, X. Zhou, L. Zhang, X.-D. Gao, Y. Murakami, M. Fujita and T. Kinoshita. 2023. Accumulated precursors of specific GPI-anchored proteins upregulate GPI biosynthesis with ARV1. *J. Cell Biol.*, 222: e202208159.
2. Thompson, M. D., X. Li, M. Spencer-Manzon, D. M. Andrade, Y. Murakami, T. Kinoshita and T. Carpenter. 2023. Excluding digenic inheritance of PGAP2 and PGAP3 for Mabry syndrome (OMIM 239300) patient: phenotypic spectrum associated with mutations of PGAP2 in hyperphosphatasia with mental retardation syndrome-3 (HPMRS3). *Genes*, 14(2), 359.
3. Ben Ayed, I., O. Jallouli, Y. Murakami, A. Souissi, S. Mallouli, A. Bouzid, F. Kamoun, I. Elloumi, F. Frikha, A. Tlili, S. Weckhuysen, T. Kinoshita, C. Charfi Triki and S. Masmoudi. 2023. Functional analysis of p.Arg507Trp variant of PIGT gene supporting the moderate epilepsy

phenotype of mutations in the C-terminal region. *Front. Neurol.*, 14:1092887.

4. Murakami, Y., S. Umeshita¹, K. Imanishi¹, Y. Yoshioka, A. Ninomiya, T. Sunabori, S. Likhite, M. Koike, K. C. Meyer, and T. Kinoshita. 2023. AAV-based gene therapy ameliorated central nervous system specific GPI defect in mouse models. *J. Mol. Therapy-Methods Clin. Dev.*, 32(1):101176.
5. Murakami, Y. and T. Kinoshita. 2023. GPI anchor and its deficiency. *J. Trends Glycosci and Glycotech.*, in press
6. Sonoda Y, Fujita A, Torio M, Mukaino T, Sakata A, Matsukura M, Yonemoto K, Hatae K, Ichimiya Y, Chong PF, Ochiai M, Wada Y, Kadoya M, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki T, Isobe N, Shigeto H, Matsumoto N, Sakai Y, Ohga S. 2024. Progressive myoclonic epilepsy as an expanding phenotype of NGLY1-associated congenital deglycosylation disorder: A case report and review of the literature *Eur J Med Genet.*:104895.
2. 学会発表
1. 村上良子 先天性グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 欠損症の診断と治療 分野別シンポジウム 第126回日本小児科学会 東京 2023 4月
2. 村上良子 先天性糖鎖異常症の治療開発—先天性 GPI 欠損症を中心に— 第7回神経代謝病研究会 宇都宮 2023年6月
3. 村上良子 先天性 GPI 欠損症の遺伝子治療に向けて 第4回分子遺伝学セミナー—遺伝子治療特集 和歌山 2023年8月
4. Xueying Li, Tiantian Lu, Yoshiko Murakami, and Taroh Kinoshita Importance

of peroxisome-derived 1-alkyl-2-acyllipids for GPI biosynthesis 第42回日本糖質学会年会 鳥取 2023年9月

5. 村上良子 先天性糖鎖異常症 (CDG) : 先天性 _GPI 欠損症 _ (IGD) を中心に 第16回東海地区小児神経セミナー 名古屋 2023年9月
6. 村上良子 Establishment of a mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy 第29回日本遺伝子細胞治療学会 学術集会 シンポジウム 大阪 2023年9月
7. 村上良子 先天性 GPI 欠損症の診断検査 第64回日本先天代謝異常学会学術集会 特別企画 大阪 2023年10月
8. 村上良子 Congenital disorder of glycosylation (CDG) - Focusing on Inherited GPI deficiency (IGD) - 4th Asia Pacific course: Early diagnosis and early treatment of inherited metabolic disease 東京 2023年11月
9. 村上良子 先天性グリコシル化異常症—GPI 欠損症を中心に— 第20回糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム 東京 2023 11月

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
1件申請中
2. 実用新案登録
3. その他