

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590363

研究課題名(和文) GPIアンカー欠損症の分子病態の解明

研究課題名(英文) Analysis for the molecular mechanism of Inherited GPI Deficiency

研究代表者

村上 良子 (Murakami, Yoshiko)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：00304048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：GPIアンカーはタンパク質を細胞膜に繋ぎ止めるアンカーの役割をする糖脂質であるが、その生合成には27個の遺伝子が関与している。GPIアンカーが全く作られないと150種以上のGPIアンカー型タンパク質が細胞表面からなくなるので致死となって生まれない。最近これらの遺伝子変異によるGPIアンカーの部分欠損症を外国の共同研究者の協力により発見した。精神発達遅滞、てんかん、時に高アルカリフォスファターゼ血症を来たしていた。国内でも現在までに27例の先天性GPI欠損症が見つかり、血液のフローサイトメトリーが診断に有効でビタミンB6が痙攣発作に著効する症例があることがわかった。新疾患として認知されつつある。

研究成果の概要(英文)：Glycosylphosphatidylinositol (GPI) is a glycolipid, which anchors 150 proteins to the cell surface. There are at least 27 genes involved in the biosynthesis and transport of GPI-anchored proteins (GPI-APs). Many inherited GPI deficiencies (IGDs) have been found using whole-exome sequencing. Patients with IGD have only a partial deficiency because complete GPI deficiency causes embryonic death. The major symptoms of IGDs include intellectual disability, epilepsy, and multiple organ anomalies. These symptoms vary in severity depending upon the degree of the defect and/or position in the pathway of the affected gene. Hyperphosphatasia is observed in some patients with IGDs. The possibility of IGD should be considered in patients with seizures and intellectual disability. The presence of hyperphosphatasia is strong evidence of IGD. Flow cytometric analysis of GPI-APs on granulocytes is useful for the detection of IGD. It should be noted that Vitamin B6 is sometimes effective for seizures.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 病態医化学

キーワード：先天性GPI欠損症 てんかん 精神運動発達障害 高アルカリフォスファターゼ血症

1. 研究開始当初の背景

他のグループとの共同研究によって責任遺伝子をそれぞれPIGM, PIGV とする2種の先天性 GPI 欠損症の解析に係わった。PIGM 欠損症の2家系ではてんかんと門脈血栓症が主症状で、PIGV 欠損症の4家系では高アルカリフォスファターゼ血症・精神発達障害・てんかんが主症状であった。一方後天性GPI 欠損症である発作性夜間血色素尿症 (PNH) では血液細胞のみでのGPI 完全欠損で溶血発作・骨髄不全・深部静脈血栓症の3主徴を示す。

2. 研究の目的

多くの先天性GPI欠損症症例を集積することによりPNHとの症状の違いや類似点を解析し、それに係わるGPIアンカー型蛋白質を同定しその分子メカニズムを明らかにする

3. 研究の方法

国内において精神発達障害・てんかんを主症状とし、高アルカリフォスファターゼ血症や手指の異常、奇形、顔貌異常などを呈する患者を選び、スクリーニングを行った。患者の末梢血よりゲノムを抽出し検体とした。GPI 生合成と修飾に関与する27個の遺伝子のエクソン部位にプライマーを設計し、患者ゲノムを鋳型としてPCRでフラグメントライブラリーを作製して次世代シーケンサー (Ion PGM) で変異を解析した。見出した変異を持つ遺伝子に関しては遺伝子欠損のCHO細胞を使って機能解析を行った。また末梢血のフローサイトメトリーにより、GPI アンカー型蛋白質の発現を解析した。

4. 研究成果

国内で初めて、高アルカリフォスファターゼ(ALP)血症、重度精神運動発達障害、難治性てんかんを呈する先天性 GPI 欠損症、PIGO 欠損症を発見した。父母からそれぞれPIGO 遺伝子の変異をもつアリル (R119W, A834fs\*)を受け継いでいたがPIGO欠損CHO細胞を使ったこれらの変異の機能解析により活性低下を確認した。また好中球のFACS解析ではCD59, DAF, CD16等のGPIアンカー型蛋白質の発現が著明に低下しており、血液のFACSがスクリーニングに有用であることがわかった。また診断後、患者にビタミンB6(ピリドキシン)の投与を行ったところけいれん発作が消失した。赤血球のCD59は低下しておらず、溶血も認められなかった。また早期発症てんかん性脳症の患者150人からも9例の先天性GPI欠損症が見つかっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Howard, M. F., Y. Murakami, A. T. Pagnamenta, C. Daumer-Haas, B. Fischer, J. Hecht, D. A. Keays, S. J. L. Knight, U. Kölsch, U. Krüger, S. Leiz, Y. Maeda, D. Mitchell, S. Mundlos, J. A. Phillips III, P. N. Robinson, U. Kini, J. C. Taylor, D. Horn, T. Kinoshita, P. M. Krawitz. 2014. Mutations in PGAP3 impair GPI-anchor maturation causing a new subtype of hyperphosphatasia with intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, 査読有 94:278-287. DOI:10.1016/j.ajhg.2013.12.012

Chiyonobu, T., N. Inoue, M. Morimoto, T. Kinoshita and Y. Murakami. 2014. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in *PIGW* is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *J. Med. Genet.*, 査読有 51:203-207. DOI:10.1136/jmedgenet-2013-102156

Kuki, I., Y. Takahashi, S. Okazaki, H. Kawawaki, E. Ebara, N. Inoue, T. Kinoshita and Y. Murakami. 2013. Case report on vitamin B6 responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency. *Neurology*, 査読有 81:1467-1469. DOI:10.1212/WNL.0b013e3182a8411a

Krawitz, P. M., B. Höchsmann, Y. Murakami, B. Teubner, U. Krüger, E. Klopocki, H. Neitzel, A. Höllein, D. Parkhomchuk, J. Hecht, P. N. Robinson, S. Mundlos, T. Kinoshita and H. Schrezenmeier. 2013. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) caused by a germline mutation and a somatic mutation in *PIGT*. *Blood*, 査読有 122:1312-1315. DOI:10.1182/blood-2013-01-481499

Krawitz, P. M., Y. Murakami, A. Riess, M. Hietala, U. Krueger, N. Zhu, T. Kinoshita, S. Mundlos, J. Hecht, P. N. Robinson and D. Horn. 2013. *PGAP2* mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis-pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 査読有 92:584-589. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.03.011

Hansen, L., H. Tawamie, Y. Murakami, Y. Mang, S. ur Rehman\*, R. Buchert, S. Schaffer, S. Muhammad, M. Bak, M. M. Noethen, E. P. Bennett, Y. Maeda, M.

Aigner, A. Reis, T. Kinoshita, N. Tommerup, S. M. Baig, R. A. Jamra. 2013. Hypomorphic mutations in *PGAP2*, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, 査読有 92:575-583.

DOI:10.1016/j.ajhg.2013.03.008

Hanaoka, N., Y. Murakami, M. Nagata, K. Horikawa, S. Nagakura, Y. Yonemura, S. Murata, T. Sonoki, T. Kinoshita and H. Nakakuma. 2013. Occupancy of whole blood cells by a single *PIGA*-mutant clone with *HMG2* amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands. *Br. J. Haematol.*, 査読有 160:114-116.

DOI: 10.1111/bjh.12093

Krawitz, P. M., Y. Murakami, J. Hecht, U. Krüger, S. E. Holder, G. R. Mortier, B. delle Chiaie, M. D. Thompson, T. Roscioli, S. Kielbasa, T. Kinoshita, S. Mundlos, P. N. Robinson and D. Horn. 2012. Mutations in *PIGO*, a member of the GPI anchor synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.*, 査読有 91:146-151.

DOI:10.1016/j.ajhg.2012.05.004

Hanaoka, N., Y. Murakami, M. Nagata, S. Nagakura, Y. Yonemura, T. Sonoki, T. Kinoshita and H. Nakakuma. 2012. Persistently high quality of life conferred by coexisting congenital deficiency of terminal complement C9 in a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patient. *Blood*, 査読有 119:3866-3868.

DOI: 10.1182/blood-2012-02-408161

Murakami, Y., N. Kanzawa, K. Saito, P. M. Krawitz, S. Mundlos, P. N. Robinson, A. Karadimitris, Y. Maeda and T. Kinoshita. 2012. Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia-mental retardation syndrome. *J. Biol. Chem.*, 査読有 287:6318-6325.

DOI: 10.1074/jbc.M111.331090

Murakami, Y., N. Inoue, T. Shichishima, R. Ohta, H. Noji, Y. Maeda, J. Nishimura, Y. Kanakura and T. Kinoshita. 2012. Deregulated

expression of *HMG2* is implicated in clonal expansion of *PIGA* deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.*, 査読有 156:383-387.

DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08914.x

[学会発表](計 13 件)

Inherited GPI-anchor deficiencies caused by the hypomorphic mutations in *PIGA* gene: comparison to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria  
Yoshiko Murakami, Mitsuhiro Kato, Hiroto Saito, Kenjiro Kikuchi, Shuei, Watanabe, Mizue Iai, Ryuki Matsuura, Rumiko Takayama, Chihiro Ohba, Shin-ichiro Hamano, Hitoshi Osaka, Kiyoshi Hayasaka, Naomichi Matsumoto, Taroh Kinoshita, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition 2013年12月9日 New Orleans, LA USA. Inherent resistance to eculizumab in PNH.

Masaki Yamamoto, Jun-ichi Nishimura, Shin Hayashi, Kazuma Ohyashiki, Kiyoshi Ando, Hedeyuki Noji, Kunio Kitamura, Tetsuya Eto, Toshihiko Ando, Masayuki Masuko, Tutomu Shichishima, Hirohiko Shibayama, Masakazu Hase, Johji Inazawa, Taroh Kinoshita, Yuzuru Kanakura,

第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11日 札幌

先天性GPI欠損症—発達障害・てんかんを主症状とする新たな疾患—  
村上良子

第7回南大阪遺伝診療研究会 2013年9月27日 堺市

GPIアンカー生合成に関与する遺伝子群の解析

藤田盛久、中村昇太、平田哲也、村上良子、前田裕輔、木下タロウ

第86回日本生化学会大会 2013年9月12日 横浜市

精神発達遅滞・てんかんを主症状とする疾患

村上良子、井上徳光、九鬼一郎、高橋幸利、木下タロウ 第50回補体シンポジウム 2013年7月6日 旭川市

精神発達遅延・てんかんを主症状とする疾患:先天性 GPI 欠損症の疾患概念の確立に向けて

村上良子、井上徳光、九鬼一郎、高橋幸利、木下タロウ

第 55 回日本小児神経学会学術集会

2013年5月31日 大分市  
高アルカリフォスファターゼ血症を呈  
する先天性GPI欠損症 - 肢根型点状軟  
骨異形成症との関連についての最近の  
知見も含めて-

村上良子

第17回大阪小児骨系統疾患研究会

2013年2月16日 大阪市

先天性 GPI 欠損症-疾患概念の確率に向  
けて - Screening patients with  
inherited GPI anchor deficiency to  
establish concept of the new disease.

村上良子、井上徳光、高橋幸利、木  
下タロウ

第35回日本分子生物学会年会 2012年  
12月12日 福岡市

Screening patients with inherited GPI  
anchor deficiency to establish  
concept of the new disease.

Yoshiko Murakami, Norimitsu Inoue,  
Yusuke Maeda, Yukitoshi Takahashi,  
Taroh Kinoshita

XXIV International Complement  
Workshop 2012年10月12日 クレタ島  
ギリシャ

先天性 GPI 欠損症 てんかん・発達障害  
を主症状とする新たな疾患

村上良子

第60回関西ディスモルフォロジー研究  
会 2012年9月1日 大阪市

先天性 GPI 欠損症-てんかん・発達障害  
を主症状とする新たな疾患概念の確立

村上良子

第78回大阪小児神経懇話会

2012年6月28日 大阪市

特別企画シンポジウム：補体研究：基礎  
から臨床へ 発作性夜間血色素尿症  
をはじめとする GPI 欠損症について

村上良子、井上徳光、七島勉、太田里永  
子、野地秀義、前田裕輔、西村純一、木  
下タロウ

第48回補体シンポジウム 2011年  
9月2日 名古屋市

Release of alkaline phosphatase  
caused by PIGV mutations in patients  
with Hyperphosphatasia-Mental  
Retardation syndrome (HPMR), a  
recently found second inherited GPI  
anchor deficiency.

Yoshiko Murakami, Peter M. Krawitz,  
Peter N. Robinson, Stefan Mundlos,  
Noriyuki Kanzawa, Yusuke Maeda and  
Taroh Kinoshita.

Glyco 21 (21th International  
Symposium on Glyconjugates) 2011年  
8月22日、ウィーン、オーストリア

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 良子 (MURAKAMI, Yoshiko)

大阪大学・微生物病研究所・准教授  
研究者番号：00304048

(3)連携研究者

木下 タロウ (KINOSHITA, Taroh)

大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号：10153165