

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461535

研究課題名(和文) HPMR症候群(高アルカリフォスファターゼ血症-発達遅滞症候群)の原因遺伝子解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of HPMR syndrome

研究代表者

藤原 幾磨 (Fujiwara, Ikuma)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10271909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的にHPMR症候群(高アルカリフォスファターゼ血症-発達遅滞症候群、Mabry症候群)と診断された症例において、全エクソンシーケンスによりPIGL遺伝子に2つのフレームシフト変異を認めた。DAF、FLARE、CD24、CD16などのGPIアンカー蛋白の発現は、患者顆粒球細胞表面においても、また変異PIGL導入CHO細胞においても低下していたことから、患者のPIGLの2つの変異はGPIアンカー生合成異常の原因であることが示唆された。これまでPIGLの変異はCHIME症候群患者で見出されていたが、同遺伝子のフレームシフト変異はHPMR症候群の原因ともなりうるということが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found two heterozygous frameshift mutations in PIGL gene in a patient with Mabry syndrome, or hyperphosphatasia mental retardation syndrome (HPMRS) by whole-exome sequencing. Surface expression of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, such as DAF, FLARE, CD24 and CD16, were decreased both in granulocytes from the patient and PIGL-deficient CHO cells expressing the mutated cDNA. Nonsynonymous changes or frameshift mutations in PIGL have been identified in patients with CHIME syndrome. These results suggest that frameshift mutations that result in premature termination in PIGL cause a phenotype that is consistent with HPMRS.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：高アルカリフォスファターゼ血症 GPI 発達遅滞 Mabry症候群 HPMR症候群 全エクソンシーケンス

1. 研究開始当初の背景

(1)HPMR (hyperphosphatasia-mental retardation、高アルカリフォスファターゼ血症-発達遅滞)症候群は新規に提唱された疾患群であり、発達遅滞、数百~数千 IU/L に及ぶ高い血清アルカリフォスファターゼ値に加え、特異的な顔貌(大きな眼裂、テント状の上唇、広い鼻梁、指の末節骨低形成を伴う)。現在本疾患は、かつて Mabry らが報告した疾患概念と同じと考えられている。Krawitz らは HPMR 症候群の原因が、GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) アンカー生合成に関わる酵素の一つである PIGV 遺伝子異常であることを報告した。

GPI アンカーは、フォスファチジルイノシトールにグルコサミン、マンノース、エタノールアミンリン酸が結合した糖脂質の一種であり、数多くのタンパク質(哺乳類では 100 以上)が GPI アンカーを介して細胞膜に結合し、免疫系や細胞間情報伝達など、様々な生体の重要な機能を果たしている。GPI アンカーの生合成には 20 以上の遺伝子が関わっており、10 以上もの段階を経て合成される。

(2)研究代表者らは、5歳の女児で著明な高アルカリフォスファターゼ血症(3000~5000 IU/L)と高度の発達遅滞を伴う患者を経験し、その児は HPMR 症候群様の特徴的な顔貌(大きな眼裂、テント状上唇)と両手指末節骨の低形成を伴っていた。

HPMR 症候群では GPI アンカー生合成に障害を来し、血液細胞(顆粒球や赤血球)の細胞表面マーカーの発現が低下している。当該患者でも FLARE など細胞表面マーカーの発現を検索したところ、明らかな異常パターンであったことから、GPI アンカーの異常が強く疑われた。そこで、本患者の PIGV 遺伝子の直接シーケンシングを行ったが、同遺伝子には変異は認めなかった。

<引用文献>

Horn D, et al. Eur J Med Genet 2010, 53:85. Mabry CC, et al. J Pediatr 1970; 77:74. Krawitz PM, et al. Nat Genet 2010;42:827.

2. 研究の目的

(1)研究代表者は、本患者の臨床症状が HPMR 症候群に酷似していること、表面マーカー発現が異常パターンであったこと、Krawitz らが報告した HPMR 症候群の患者の中にも PIGV

遺伝子異常を認めなかった者がいたことなどから、本患者の疾患原因が PIGV 遺伝子以外の GPI アンカーの生合成に関わる因子の異常であると推察した。そこで、本研究では HPMR 症候群の新たな原因を明らかにし、本疾患の病態解明を目的とする。

(2) GPI アンカー関連因子は 20 種以上あり、それら全ての遺伝子解析を従来の直接シーケンシング法で実施するには膨大な時間と手間を要する。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた全エクソームシーケンシングで遺伝子解析を行う。また全エクソームシーケンシングでは、通常数十個以上の変異遺伝子が発見されることが多く、解析する患者数が少ない場合にはその変異が真の疾患原因であるかどうかの判断は、しばしば難しい。しかし本患者の場合は、GPI アンカー関連因子の何れかに遺伝子変異が発見されれば、それが HPMR 症候群の新たな病因遺伝子である可能性が非常に高くなる。本研究開始時点において PIGV 遺伝子以外に HPMR 症候群の原因として同定された因子は報告されておらず、当該患者の原因遺伝子変異を明らかにすることは、非常に有意義である。また当該患者の原因を明らかにすることにより、HPMR 症候群の病態解明および GPI アンカー型タンパク質の機能解析につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1)次世代シーケンシングによる GPI アンカー関連因子の遺伝子解析

患者より採血、DNA 抽出を行った後、患者ゲノム DNA を断片化し、GPI 生合成に関わる PIG-V 以外の蛋白の遺伝子 (PIG-A、PIG-C、PIG-H、PIG-P、PIG-Q、PIG-Y、DPM2、PIG-L、PIG-W、PIG-M、PIG-X、PIG-N、PIG-B、PIG-O、PIG-F、PIG-G、PIG-Z、PIG-K、GAA1、PIG-S、PIG-T、PIG-U) および GPI アンカーの小胞体からゴルジ体への移動に関わる蛋白の遺伝子 (PGAP1、PGAP5、PGAP3、PGAP2) についてプライマー設定を行い、次世代シーケンサー (illumina HiSeq2000) にて解析を行う。

上記にて GPI アンカー関連因子のいずれかに変異を認めた場合、キャピラリーシーケンシング法 (ABI-7500 システム) により、患者ゲノム DNA における遺伝子変異を確認する。この際患者の両親についても同様にキャピラリーシーケンシング法にて遺伝子解析を行い、

常染色体劣性遺伝かどうかを確認する。

(2) CHO 細胞への変異遺伝子導入および表面マーカー解析

上記(1)で当該患者の原因遺伝子を明らかに出来た場合、CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞を使用して、変異遺伝子導入実験を行う。CHO 細胞は通常 GPI アンカーを有しているため、細胞毒の一種である aerolysin で CHO 細胞を処理する。具体的には 3nM の proaerolysin 存在下で CHO 細胞を培養、proaerolysin は aerolysin となり GPI アンカー蛋白と結合、CHO 細胞から GPI アンカーは消失する。

上記で作成した CHO 細胞にプラスミド (SR α プロモーターを有する) を用いて正常あるいは変異遺伝子を導入した後、CHO 細胞にそれぞれ GPI アンカー蛋白である各種の細胞表面マーカー (CD59、CD16、FLAER など) に対する抗体を用い、フローサイトメーター (FACSCANTO2) にて FACScan を行う。変異遺伝子導入細胞で、各種細胞表面マーカーの発現が低下していることを確認する。これら表面マーカーの発現が低下していることは、すなわち GPI アンカーの細胞膜への結合が障害されていることを示す。

同様の表面マーカー解析は、患者より採取した顆粒球でも実施する。

(3) 変異遺伝子導入 CHO 細胞における当該因子の蛋白発現

遺伝子変異が認められた因子に対する抗体を用いて、変異遺伝子導入した CHO 細胞においてウェスタンブロットを行い、その因子の蛋白発現を確認する。

4. 研究成果

(1) GPI アンカー関連因子の遺伝子解析

患者 DNA のエクソーム解析により、8,883 個の変異 (非同義、ナンセンス、スプライス異常、挿入、欠失) を認めた。これらを 3 種類の変異データベース (dbSNP123、1,000 Genome Project、ESP 5,400) を用いてフィルタリングを行ったところ、216 個の変異が存在することが分かった。

これら 216 変異の中に、これまで報告のない *PIGL* におけるフレームシフト変異を 2 種類認めた (c.36_48del [p.Leu13Alafs*11]、c.254_255del [p.Glu86Aspfs*2])。PIGL 以外の GPI 生合成に関わる他の因子や GPI アンカーの

細胞内移動に関わる各蛋白の遺伝子には、いずれも変異を認めなかった。直接シーケンスにより、患者では 2 つの変異をそれぞれヘテロ接合性に有することが確定され、また両親の解析により c.36_48del 変異は父由来、c.254_255del 変異は母由来であることが判明した。*PIGL* の c.36_48del 変異及び c.254_255del 変異は、いずれも dbSNP123、1,000 Genome Project、ESP 5,400 のデータベースでは報告されていないが、c.254_255del 変異は日本人 1,000 エクソーム (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) に 1 つ、さらに当研究室の日本人対照 192 人のうち 1 人に認められた。これは、本変異 (c.254_255del) が日本人 200~1,000 人に一人の頻度で存在することを示唆する。

(2) 変異 *PIGL* 遺伝子の機能解析

患者顆粒球における表面マーカー解析

患者より採取した末梢血の顆粒球で FACScan を行ったところ、各種表面マーカー (DAF、FLAER、CD24、CD16) の発現は正常対照の 2%~51% と明らかに低下していた (図 1; CD24、CD16 のみ提示)。これらの結果は、患者細胞において GPI アンカー蛋白が減少していることを示唆する。

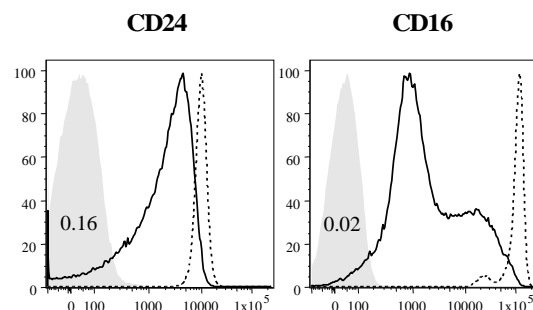


図 1. 患者顆粒球における GPI アンカー蛋白の発現 (実線: 患者、点線: 正常対照、淡色範囲はコントロール)

CHO 細胞への変異 *PIGL* 遺伝子導入及び同細胞における表面マーカー解析

PIGL を欠損させた CHO 細胞に *PIGL* の c.36_48del 変異及び c.254_255del 変異をそれぞれ導入し、FACScan により表面マーカーの発現を検討した。c.36_48del 変異及び c.254_255del 変異いずれを導入した CHO 細胞においても、GPI アンカー蛋白である各種表面マーカー (CD59、DAF、FLAER) の発現は、野生型 *PIGL* を導入した細胞に比べて著明に低下

していた。以上より、*PIGL*のc.36_48del変異及びc.254_255del変異によってGPIアンカー蛋白の発現が障害されることが明らかとなった。

(3) 変異遺伝子導入 CHO 細胞における *PIGL* 蛋白発現

(2) で作成した変異*PIGL*導入CHO細胞を破碎し、SDS-PAGEで泳動した後*PIGL*蛋白のウェスタンブロットを行った。c.254_255del変異を導入した細胞では、*PIGL*蛋白の発現は認めなかったが、c.36_48del変異を導入した細胞では、微かな2本のバンドを認めた(図2、2レーンの*印及び**印)。

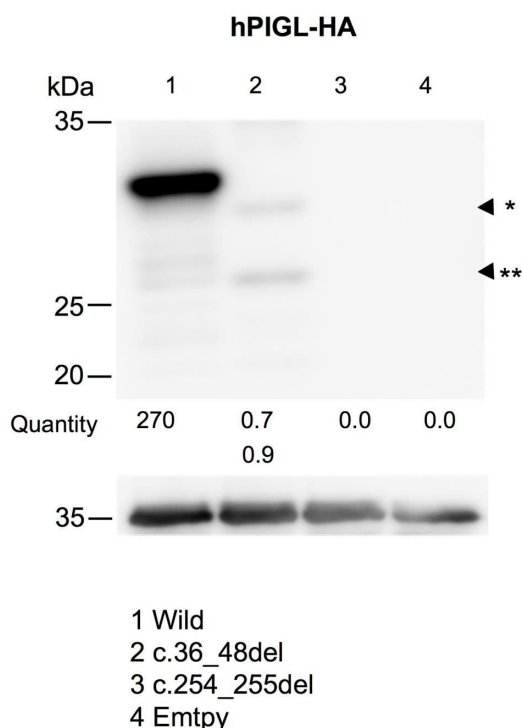


図2 .CHO細胞破碎後のSDS-PAGE及びウェスタンブロット(Quantityの数値はGAPDHに対する*PIGL*蛋白の発現強度を表す)

*PIGL*では、c.36_48del変異の下流にメチオニン残基が2ヶ所あり、それらを転写開始点とするisoformが存在すると考えられる。図2で見られた2本の微かなバンドは、それらに相当すると思われ、*PIGL*の活性が残存していることが予想される。

(4)本研究の成果は、*PIGL*の変異でもHMPR症候群を来たしうることを示したことである。これまで*PIGV*、*PIGQ*、*PGAP2*、*PGAP3*、*PIGW*の遺伝子変異がHMPR症候群患者で報告されていたが、今回新たな原因遺伝子が判明したことになる。また*PIGL*はCHIME症候群(眼こロボーマ、

心奇形、魚鱗せん様皮膚病変、発達遅延、耳奇形を特徴とする)の原因遺伝子として2012年に報告されており、本症例の症状とは異なる。(3)で示されたように、本症例ではc.36_48del変異で僅かながら活性の残存した変異*PIGL*蛋白が発現しているため、CHIME症候群ではなくHMPR症候群と同様の臨床徴候を示したものと考えられる。

<引用文献>

Ng BG, et al. Am J Hum Genet 2012, 90:685.

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1件)

Fujiwara I, Murakami Y, Niihori T, Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Mutations in *PIGL* in a patient with Mabry syndrome, Am J Med Genet Part A, 査読有、167巻、2015、777-785
DOI:10.1002/ajmg.a.36987

[学会発表](計1件)

藤原幾磨、村上良子、新堀哲也、菅野潤子、箱田明子、木下タロウ、松原洋一、青木洋子、*PIGL* 遺伝子変異は hyperphosphatasia mental retardation(HMPR)症候群(Mabry症候群)の原因となる、第49回日本小児内分泌学会、2015年、東京(タワーホール船堀)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 幾磨 (FUJIWARA, Ikuma)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10271909

(2)研究分担者

菅野 潤子 (KANNO, Junko)

東北大学・大学病院・講師
研究者番号：30509386

箱田 明子 (HAKODA, Akiko)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：70509398

(3)連携研究者

新堀 哲也 (NIIHORI, Tetsuya)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40436134

(4)研究協力者

村上 良子 (MURAKAMI, Yoshiko)