

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15362

研究課題名(和文)発作性夜間ヘモグロビン尿症における異常クローンの拡大を来す代謝異常

研究課題名(英文)Analysos of metabolic abnormality which causes clonal expansion in Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)はPIGA遺伝子の突然変異により発症する血液疾患である。PIGAはGPIアンカーというタンパク質を細胞表面につなぐ糖脂質の合成に必要な酵素で変異を起こした細胞はGPI欠損細胞となる。これが正常細胞を凌駕して増えるが機序は不明である。アルカリホスファターゼ(ALP)もGPIアンカー型タンパク質の一つでGPI欠損細胞で欠損する。ビタミンの取り込みに関わっており欠損すると細胞内ビタミン不足となるので代謝異常を起しそれが異常細胞の増殖を起すと考えている。細胞とモデルマウスのビタミンB6の濃度を解析しノックアウトマウスでは取り込みが減っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Paroxysmal Nocturnal hemoglobinuria (PNH) is the hematopoietic disease caused by the somatic mutation of PIGA gene. PIGA is essential enzyme for biosynthesis of GPI anchor, which anchor the various GPI anchored protein to the cell surface. So, PIGA deficient cells will be GPI negative cells. These GPI negative cells expand, however, the mechanism of which is unknown. Alkaline phosphatase (ALP) is one of the GPI-anchored proteins and it is defective in GPI negative cells. ALP is involved in taking up the vitamins into the cells and defect in ALP causes deficiency of vitamins in the cells, leading to various metabolic abnormalities. We speculate this causes clonal expansion of GPI negative cells. Analysis of concentration of vitamins in the cells or serum of the model mice indicated that mutant mice showed decrease in taking up vitamins.

研究分野：分子生物学・血液学

キーワード：アルカリホスファターゼ ビタミンB1 ビタミンB6 発作性夜間ヘモグロビン尿症 GPI アンカー clonal expansion PIGA

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に存在するタンパク質の中にはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質がある。アルカリフォスファターゼ (ALP) 等150種以上知られており、重要な働きを担っている。GPIアンカーの合成と修飾に27個の遺伝子が必要であることがわかっているがこれらの遺伝子異常により全身でGPIアンカーが欠損すると胎生致死となる。従ってGPI欠損症のうち、劣性遺伝形式をとる先天性GPI欠損症は遺伝子変異により活性の低下した部分欠損症であり、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は、造血幹細胞のPIGA遺伝子に後天的な体細胞突然変異がおこって発症する血液疾患で多くの場合、血球は完全欠損である。私たちは最近次々と見つかった先天性GPI欠損症患者の症状を通してALPの働きについて多くの知見を得ている。主症状は精神運動発達障害とてんかんであるが、このてんかんの発症機序として神経細胞内のビタミンB6の欠乏が関与している。神経細胞膜上に発現するALPはピリドキサルリン酸を脱リン酸化して細胞内に取り込めるようにする。先天性GPI欠損症では、ALPの発現が低下しているため細胞内のビタミンB6の欠乏が起こり、それを補酵素とするGABA合成の障害がおこりてんかんを発症する。実際リン酸化されていないビタミンB6 (ピリドキシン) の大量投与が痙攣発作に著効する患者がいる。またALPは腸管からのビタミンB1の吸収や細胞内の取り込みにも関与していることが知られており、実際先天性GPI欠損症でビタミンB1を補酵素とするTCA回路の酵素の機能低下により α ケトグルタル酸の蓄積がおこっていることがわかっている。このように先天性GPI欠損症ではALPの発現低下に起因するビタミンB6やビタミンB1の欠乏による代謝異常がおこっている。本研究ではPNHにおけるGPI欠損造血幹細胞

においては、完全欠損であるためにより重篤な代謝異常がおこっていると予想されるので血液細胞でそれを解析する。 α ケトグルタル酸の蓄積はこれを基質とするヒストン脱メチル化酵素や、DNAのメチル化シトシンを水酸化するTetファミリーの酵素を活性化しエピジェネティックな影響を起こす可能性がある。以前の研究で2/3のPNHの患者の血球において腫瘍性増殖に関わるHMGA2の転写が亢進していることがわかっている。網羅的な遺伝子のメチル化のプロフィールをPNH血球と正常血球で比べればその関係がわかると考えている。すなわちPNH血球において、特異的に脱メチル化がおこっている遺伝子を同定しそれが腫瘍性増殖に関わっているか確認する。PNHの細胞における代謝異常が、異常細胞のクローナルな増殖に関与していることが証明できれば、病態が解明されるとともにリン酸化されていないビタミンの補充療法により治療ができる可能性がある。

2. 研究の目的

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は造血幹細胞のPIGA遺伝子に後天的な突然変異がおこって発症する血液疾患である。PNHでは突然変異を起こした造血幹細胞はGPI欠損細胞となり正常細胞を凌駕して増殖するがその機序は明らかでない。GPI欠損細胞ではすべてのGPIアンカー型タンパク質が細胞表面に発現しないが、その1つであるアルカリフォスファターゼ(ALP)による脱リン酸化はビタミンB6やB1の細胞内への取り込みに必要である。従ってGPI欠損細胞では細胞内のビタミンB6,B1の欠乏と、それに起因する代謝異常がおこっていると予想される。ビタミンB1の欠乏下では α ケトグルタル酸が蓄積し、これを基質とする脱メチル化酵素の反応が進んで腫瘍性増殖を来す遺伝子の発現が亢進することに

より異常細胞の増殖を来すという仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) GPI 欠損細胞を使ってビタミン B6 の取り込みを解析する。

上記仮説を証明する為には GPI 欠損細胞に置いて ALP が発現しない為にリン酸化ビタミン B1, B6 の取り込みが欠損していること、それによる代謝異常が起きていることをまず検証する。本プロジェクトでは血球細胞におけるビタミン B1 の取り込みとその欠損による代謝異常の解析が本来の目的であったが、ビタミン B1 のリン酸化誘導体を測定できる国内唯一の施設（滋賀県立医大）が教授の退官により測定停止となったので急遽ビタミン B6 の取り込みとその欠損による代謝異常を解析することにした。

先天性 GPI 欠損症のモデル細胞として、ヒト神経細胞株 SH-SY5Y で PIGO および PIGT ノックアウト、マウス神経細胞 Neuro2a、ラット神経細胞 PC12 でそれぞれ Pigo ノックアウトを作製したので、まずアルカリホスファターゼの酵素活性を解析した。それぞれ責任遺伝子を戻して野生化した細胞と比較したところ SH-SY5Y 細胞の野生株において高値を示した ALP 活性が GPI 欠損細胞でその活性が消失しており最も適していると判断した。この SH-SY5Y 細胞のペアを使用しビタミン B6 欠損培地、それにリン酸化ビタミン B6 (PLP) を加えた培地、それにリン酸化のないピリドキシン (PN) を加えた培地で3日間培養し、培養上清および細胞を共同研究者の北海道医療大学薬学部の小林大祐先生に送付し、それぞれの PLP, PL, PN 濃度を測定した。

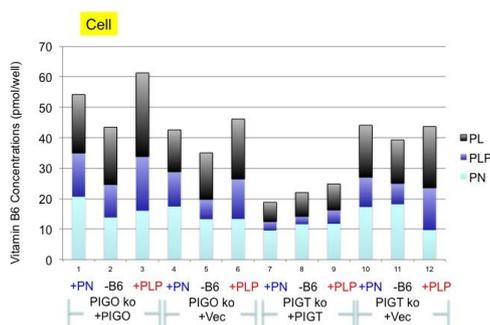
(2) PNH モデルマウスを使ったビタミン B6 の取り込みの解析

Tie2-Cre と Piga^{floxed} の両方をヘテロにもたしたマウスどうしを交配し血液細胞で

のみ Piga が欠損するマウスを作製した。このマウスのオスの Wild と KO を 5 匹ずつ、メス Wild 8, KO 7 について採血し、血漿中の PLP, PL, PN 濃度を測定した。またビタミン B2 誘導体である FAD, FMN, RF についても測定系が出来たので解析した。

4. 研究成果

(1) Wild, KO の細胞間で、培養上清および細胞内のビタミン B6 誘導体の濃度に大きな違いがみられなかった。ビタミン B6 培地で培養したのも細胞内に B6 誘導体が検出された

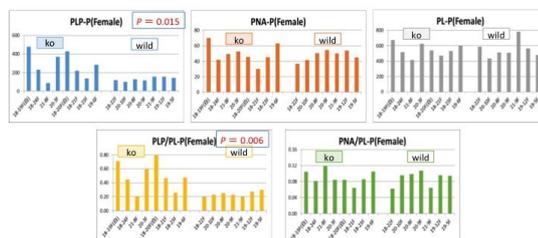


PIGT ko SH-SY5Y Cellsにおける細胞内VB6濃度およびPNならびにPLP処理の影響

のでさらに長期間培養する必要がある。

(2) 雌での血漿中ビタミン B6 濃度は、KO マウスで有意な PLP 濃度と PLP/PL 比の増加が観察された。これは Piga KO により、血球または内皮細胞膜上の ALP 活性が低下し、PLP から PL への変換活性が低下し、PLP が増加したと考えられる。

Plasma Concentration of Vitamin B6 in Female Mice



この状態で(1)の細胞と同様ビタミン B6 欠損の餌、PLP のみを補充した餌、PN を補充した餌を与えることにより血液細胞内（赤血球・リンパ球・多核球・骨髄細胞）のビタミン

ン B6 誘導体の濃度を測定する。同様のことを実際の PNH 患者の血漿について測定する。今後ビタミン B1 の測定系が復活すれば上記と同様にビタミン B1 欠損培地を作製して実験する予定である。またこれらの実験で実際にビタミン B1, B6, B2 の取り込みが GPI 欠損細胞で有意に減少している証拠が得られれば、メタボローム解析に進む。

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 3 件)

1. Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, Murakami Y. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. Hum Mutat. 2017 Mar 23. doi: 10.1002/humu.23219. [Epub ahead of print]

2. Inoue, N. and Kinoshita, T. Chapter 16, Pathogenesis of Clonal Dominance in PNH; Growth Advantage in PNH, In: Kanakura, Y., Kinoshita, T. and Nishimura, J. (Ed.) Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria - From bench to bedside, Springer-Japan, Tokyo, 229-251, **2017**

3. Makrythanasis P, Kato M, Zaki MS, Saitsu H, Nakamura K, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima M, Issa MY, Guipponi M, Letourneau A, Logan CV, Roberts N, Parry DA, Johnson CA, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, Murakami Y. Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia. Am J Hum Genet. 2016 Apr 7;98(4):615-26

[学会発表](計 10 件)

● Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations; Atypical PNH, ポスター Yoshiko Murakami, Norimitsu Inoue, Michi Kawamotoi, Nobuo Kohara, Taroh Kinoshita 58th ASH Annual Meeting and Exposition 2016.12.2 San Diego, USA.

● 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月14日 村上良子 教育講演「PNHの発症機序」

● Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations; Atypical PNH, (Poster) Yoshiko Murakami, Norimitsu Inoue, Michi Kawamotoi, Nobuo Kohara, Taroh Kinoshita
The 26th International Complement Workshop (XXVI ICW) 2016.9.5

● 第 68 回日本臨床化学会近畿支部例会 2016年7月9日 特別講演「補体関連の遺伝子異常について—補体制御因子の異常を中心に

● GPI アンカー型タンパク質の構造異常を原因とする先天性 GPI 欠損症—PGAP1 欠損症と PGAP3 欠損症—口頭 村上良子, 木下タロウ 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2016.5.29

● 第52回日本補体学会学術集会 優秀賞 2015年8月16日間延べ121回にわたる反復性無菌性髄膜炎にPIGT変異によるPNHを合併しEculizumabが著効した一例 その2 分子メカニズム

● 第 43 回日本小児神経学会東海地方会 特別講演 2015年8月1日 「先天性 GPI アンカー欠損症—精神運動発達遅滞とてんかんを主症状とする新しい疾患—」

● FASEB Summer Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains” 「Inherited GPI deficiency」 Saxtons River, Vermont, USA, July 21, 2015

● 第 57 回日本小児神経学会学術集会 特別企画 2015年5月29日 「先天性 GPI 欠損症：てんかん・知的障害を主症状とする新しい疾患」

● 第 118 回日本小児科学会学術集会 教育講演 2015年4月17日 「先天性 GPI 欠損症：知的障害・てんかんを呈する新しい疾患」

[その他]
疾患ホームページ
<http://igd.biken.osaka-u.ac.jp/>

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

(2)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

(3)連携研究者

井上徳光 (Inoue Norimitsu)
大阪府立成人病センター・部門長
研究者番号： 80252708

(4)連携研究者

西村純一 (Nishimura Junichi)
大阪大学医学部・助教
研究者番号： 80464246