

## PIGA 以外の遺伝子異常を原因とする 発作性夜間ヘモグロビン尿症の新規診断法開発

大阪大学微生物病研究所 蘆本難病解明寄附研究部門

王 宜成

### 1.緒言

指定難病である発作性夜間ヘモグロビン尿症 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : PNH) は体細胞突然変異による後天的な血液疾患で、大多数の患者は数ある GPI 生合成遺伝子のうち PIGA を責任遺伝子とする (PIGA-PNH)。これは PIGA が X 染色体上の遺伝子で男女とも機能する遺伝子が 1 つなので、造血幹細胞における一度の突然変異によって GPI 欠損細胞になることに起因する。他の 26 個の遺伝子はすべて常染色体上にあるので、2つのアレルの両方に突然変異が起こる確率は非常に小さい。しかしながら最近 PIGT、あるいは PIGB を責任遺伝子とする PNH が見つかった (PIGT-PNH<sup>1-3</sup>, PIB-PNH)。これらは一方のアレルに生殖系列の変異があり、造血幹細胞においてもう一方のアレルに突然変異が起こって GPI 欠損細胞になり、PNH を発症していた。また臨床症状においても PNH 共通にみられる溶血発作の他に PIGA-PNH に見られない強い自己炎症症状が特徴的で、特に日本の PIGT-PNH 症例では頻回の無菌性髄膜炎を来し血清中の炎症性サイトカインが高値となり、自己炎症性疾患と同様インフラマソームの活性化が起こっていることを強く示唆していた<sup>2,3</sup>。この症状の違いは PIGA が GPI 生合成の最初のステップに関与するのに対し、PIGT は完成した GPI アンカーを前駆タンパク質に付加する最終ステップに関与するためだと考えられる。つまり前者は GPI 中間体が合成されないのに対し、後者では完成した GPI アンカーが利用されないで小胞体に蓄積され、一部がフリーGPI として細胞表面に発現する。このフリー GPI が GPI 欠損に起因する補体の活性化と協同してインフラマソームの活性化を来し自己炎症を呈していると考えられる<sup>3</sup>。我々の最近の研究で GPI アンカーの 1 つ目のマンノースに N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の側鎖が PGAP4 によって付加されることがわかっており、フリーGPI もこの修飾を受け、GalNAc 側鎖を認識する抗体 (T5) によってフローサイトメトリー (FACS) やウェスタンブロットで発現を確認することができる<sup>4,5</sup>。この側鎖にさらにガラクトースが付加されると T5 では認識されなくなるが、GM1 合成酵素  $\beta$ 3GalT4 がこの GalNAc 側鎖にガラクトースを付加する酵素であることをわれわれが報告した<sup>6</sup>。PIGT-PNH の患者血球はフリーGPI を発現しており、その一部は T5 で認識され

るので FACS により PIGA-PNH と区別することができるが、上述のように側鎖構造の異なるフリーGPIは検出できない。また PIGB-PNH の症例も蕁麻疹や関節痛、心内膜炎などの炎症症状を呈している。PIGB は GPI の 3 個目のマンノースを付加する酵素であるが、PIGB 欠損細胞においても蓄積した GPI 中間体が細胞表面に発現していると考えられる。異なる側鎖構造をもつフリーGPIや、GPI 中間体を認識する抗体がないため、実際 PIGT 欠損細胞や、PIGB 欠損細胞上に発現するフリーGPI や GPI 中間体のレパートリーは不明である。PIGT-PNH では抗補体薬であるエクリズマブの投与により溶血発作だけでなく自己炎症症状も消失する<sup>2),3)</sup>。患者は PNH の診断に至るまでに長期間の自己炎症症状を呈するので、早期診断、早期治療が患者の QOL を劇的に改善する。本研究課題では PIGB-PNH の発症機序の解析と並行して昨年度に引き続き未発見の患者のスクリーニング系の構築を目指した。

## 2.方法

GPI アンカーには 1 個目のマンノースに GalNAc の側鎖がありフリー GPI もこの修飾を受け、GalNAc 側鎖を認識する抗体 (T5) によってフローサイトメトリーで発現を確認することができる。実際 PIGT-PNH の患者は T5 抗体によりスクリーニングが可能である<sup>1)</sup>。しかしながら他の GPI 生合成酵素の欠損による PNH においては、細胞表面に発現している GPI 中間体を認識する抗体がないのでスクリーニングができない。そこで昨年度より継続しているファージディスプレイ法を使って、1 本鎖抗体ファージライブラリの中から様々な GPI 生合成遺伝子を欠損した HEK293 細胞にそれぞれ特異的に結合する抗体ファージを様々な工夫を重ねて濃縮し、その配列をもとに抗体の作製を行う試みを繰り返し行った。それに加えて今年度は細胞に GPI アンカー型タンパク質を高発現させてそれを PIPLC で切断して分離精製し、ウサギに免疫して糖鎖部分を認識する抗体を取る方法を追加した。具体的にはマウスの CD59 と DAF の配列の N 末に 10xHis タグを付けてタンパク精製の Expi293F 細胞に遺伝子導入してホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PIPLC) で切断し、その培養上清から Talon ビーズを使ってタンパク質を精製する。それをウサギ 3 匹に免疫し、CD59 と DAF の両者を認識する抗体を選択する。さらに GPI アンカー型でない分泌型の CD59 と DAF も同様に精製し、これらを認識せず GPI の糖鎖部分を特異的に認識する抗体を選択する。これらと並行して各 GPI 生合成遺伝子のノックアウト細胞で蓄積している GPI 中間体の構造を、質量分析により解析する試みを始めた。さらに細胞分画して解析することにより細胞膜に発現する GPI 中間体の構造を解析する予定である。

## 3.結果

PIGA は GPI 生合成の最初のステップに必須の因子で、PIGA 欠損細胞には GPI 中間体やフリーGPIは発現しなかった。そこで、昨年から継続している方法の中で反応条件を様々に振りながら最適な方法を模索した。ファージライブラリーから非特異的に結合するファージ

を除くために大量の PIGA 欠損細胞と混ぜて、細胞に結合するファージを除去（プレクリア）したのちに、PIGS 欠損細胞に結合するファージを抽出（パンニング）して大腸菌に感染させ増殖させたのちにファージ分子を作らせた。このパンニングを2回繰り返したファージを、さらに PIGA 欠損細胞に1/100量の緑色蛍光タンパク質（GFP）で標識した PIGS 欠損細胞を混ぜたものと反応させ、PIGS 欠損細胞に特異的に結合するファージを細胞ごとセルソーターで回収した。そのファージを感染させた大腸菌のコロニーを200~400個ピックアップして培養し、IPTGによって1本鎖抗体分子を誘導した。PIGS細胞をGFPで標識しておき、PIGA細胞と混ぜた細胞を400クローンの1本鎖抗体分子で染色しPIGSのみに特異的に結合するクローンをフローサイトメトリーで選択した。しかしながら2年間にわたり複数のライブラリーで条件を最適化しつつ試みたが、この方法ではフリーGPIに特異的な抗体は得られなかった。GPIアンカーは正常でも発現しており真核生物の間ではその構造がよく保存されているので、通常の方法では抗体を取りにくい。使用したファージライブラリーは合成ライブラリーなので、抗体を得られる可能性が高いと考えたが、残念ながら得られなかった。一方GPIアンカー型タンパク質を大量に精製して、ウサギに免疫し通常の方法で抗体を取る方法を試みることにした。Expi293F細胞での大量精製の系は確立できたので、今後各々のタンパク質約3リットル分の培養上清を作製し、精製する予定である。

質量分析では各GPI欠損細胞の欠損ステップに応じた中間体が検出された。後期ステップの中間体については検出感度が低く、解析条件の工夫が必要であることがわかった。

#### 4.考察

糖鎖に対する抗体の作製は非常に難しいと言われている。精力的にファージディスプレイ法で工夫を重ねたが、GPIアンカー特異的に結合するファージクローンは得られなかった。もう一方の従来法でウサギの抗体を得られることを期待している。質量分析によるGPI中間体の構造決定には期待がもてる。患者のPNH細胞をソートして解析できれば、質量分析により変異ステップが同定できる。細胞膜分画を抽出して同様の解析を行えば細胞表面のGPI中間体の構造が確認できる。抗体取得と構造解析を同時に進めて行きたいと考えている。

#### 5.結語

GPI中間体を認識する抗体が作製できればそれを使って種々のGPI生合成遺伝子の欠損を原因とするPNHの早期診断が可能になる。

## 6.文献

- 1) Krawitz PM, Höchsmann B, Murakami Y, Teubner B, Krüger U, Klopocki E, Neitzel H, Hoellein A, Schneider C, Parkhomchuk D, Hecht J, Robinson PN, Mundlos S, Kinoshita T, Schrezenmeier H. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood*. 2013 Aug 15;122(7):1312-5.
- 2) Kawamoto M, Murakami Y, Kinoshita T, Kohara N. Recurrent aseptic meningitis with PIGT mutations: a novel pathogenesis of recurrent meningitis successfully treated by eculizumab. *BMJ Case Rep*. 2018;2018.
- 3) Hoechsmann, B.\*, Y. Murakami\*, M. Osato\*, A. Knaus, M. Kawamoto, N. Inoue, T. Hirata, S. Murata, M. Anliker, T. Eggermann, M. Jaeger, R. Floettmann, A. Hoellein, S. Murase, Y. Ueda, J. Nishimura, Y. Kanakura, N. Kohara, H. Schrezenmeier, P. M. Krawitz and T. Kinoshita. Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation. *J. Clin. Invest.*, 2019.129(12):5123-5136
- 4) Wang Y, Hirata T, Maeda Y, Murakami Y, Fujita M, and Kinoshita T. Free, unlinked glycosylphosphatidylinositols on mammalian cell surfaces revisited. *J Biol Chem*. 2019;294(13):5038-5049.
- 5) Hirata T, Mishra SK, Nakamura S, Saito K, Motooka D, Takada Y, Kanzawa N, Murakami Y, Maeda Y, Fujita M, Yamaguchi Y, Kinoshita T. Identification of a Golgi GPI-N-acetylgalactosamine transferase with tandem transmembrane regions in the catalytic domain. *Nat Commun*. 2018 Jan 26;9(1):405.
- 6) Wang, Y., Y. Maeda, Y.-S. Liu, Y. Takada, A. Ninomiya, T. Hirata, M. Fujita, Y. Murakami, and T. Kinoshita. Cross-talks of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis with glycosphingolipid biosynthesis and ER-associated degradation. *Nat. Commun.*, 2020.11:860.