

## 先天性 GPI 欠損症の治療法確立のための疾患モデルマウスの確立

大阪大学微生物病研究所 難本難病解明寄附研究部門

桑山 良子

### 1. 諸言

哺乳細胞には glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーという共通の糖脂質で細胞表面につながれている GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) が 150 種以上知られており、アルカリホスファターゼなどの酵素、受容体や接着因子として重要な働きをしている。GPI-AP の生合成と修飾に 27 個の遺伝子が必要で、これらの遺伝子の変異によりそれぞれがコードするタンパク質の発現や活性の低下が起こり、細胞膜表面の GPI-AP の発現低下や構造異常をきたすことにより先天性 GPI 欠損症 (inherited GPI deficiency : IGD) を発症する (図 1)。主な症状は、知的障害、運動発達の遅れ、てんかんであり、その他の症状として、高アルカリホスファターゼ血症、末節骨の短縮、爪の低形成などの手指・足趾の異常、難聴、Hirschsprung 病、肛門・直腸の奇形、水腎症などがある<sup>1)</sup>。現在までに GPI 生合成に関わる 27 個の遺伝子のうち、23 個の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症が報告されている。GPI 生合成遺伝子の完全欠損では胎生致死となるため、ほとんどの患者は活性が低下した部分欠損症である。GPI アンカーの合成不全により様々な GPI-AP が影響を受けるので、本疾患の主症状である知的障害や運動発達遅滞、てんかんなどの神経症状が主にどの GPI-AP に起因するのか不明であり、病因については解明されていない点も多く根本的な治療法はない。

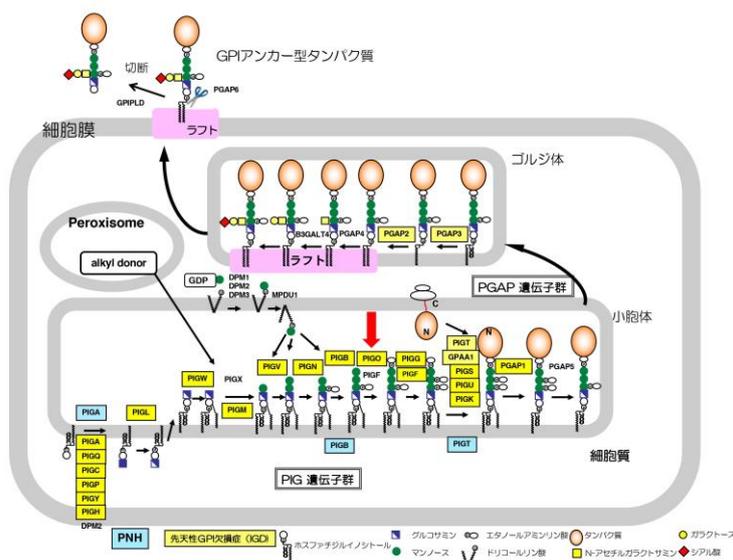


図 1 GPI アンカー型タンパク質の合成と輸送

## 2.方法

先天性 GPI 欠損症のモデルマウスについては、現在までに Cre/loxP システムを用いた Piga の神経特異的ノックアウトマウスを作製している。Piga は X 染色体上の遺伝子で、オスは生後 1 週間で、モザイクのメスは生後 3 週齢までに死亡する。運動発達の遅れ、知的障害やてんかんなどの神経症状を評価するには、より長期の経過を追跡できる疾患モデルマウスの作製が必要で、すでに報告されている 3 種類の患者<sup>2)</sup>の PIGO の変異を持つノックインマウス (A-line: p.Arg119Trp、B-line: p.Thr130Asn、C-line: p.Lys1051Glu) (表 1) を CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集により作製しているため、そのフェノタイプを解析した。胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) 作製の過程で、片方のアレルがノックアウトになったマウスも作製したので、これらの交配によってホモ接合のノックインマウス群、ヘテロ接合のノックインマウス群、複合ヘテロ接合のノックイン/ノックアウトマウス群、野生型群に分けて、解析を実施した。多くの患者は片方のアレルが null であるため、複合ヘテロ接合のマウスが患者の genotype を正確に反映していることになる。

表 1

マウス Line	A	B	C
患者の変異 (PIGO)	p.Arg119Trp	p.Thr130Asn	p.Lys1047Glu
対応するマウスの変異 (Pigo)	p.Arg119Trp	p.Thr130Asn	p.Lys1051Glu
患者の症状	発達の遅れ・難治 てんかん・手指と爪の異常・異常顔貌・口蓋裂心奇形・Hirschsprung 病・高 ALP・脳 MRI 異常・低緊張	発達の遅れ・難治 てんかん・脳 MRI 異常・低緊張	軽度の知的障害・口蓋裂・鎖肛・低緊張

患者の症状を反映しているかを確認するため、下記の項目について解析を行った。

1. 体重増加と生存率の評価、振戦の出現時期と程度の評価
2. 血漿中アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP) 活性
3. マウス血液の顆粒球表面に存在する GPI アンカー型タンパク質 Gr-1 の発現量をフローサイトメトリー (fluorescence activated cell sorter : FACS) による解析
4. 脳の構造や形態評価を目的とした頭部 MRI 検査
5. マウス頭部に電極を装着し長時間ビデオ脳波モニタリングによる、基礎波の評価とてんかん発作の有無の確認
6. 成体マウスを用いた、運動量、筋力、協調運動機能の指標となる行動解析

7. 免疫染色による脳の組織学的解析
8. 大脳および小脳における GPI アンカー型タンパク質の発現量のウェスタンブロットによる解析

### 3.結果

ヒトでの重症度は A>B>C の順であったが、同じ変異をノックインしたそれぞれのホモのマウスのフェノタイプは B>A>C であった。多くの PIGO 欠損症の患者は片方のアレルが null であるので、それぞれのマウスラインは Pigo ノックアウトのヘテロマウスと交配して複合ヘテロのマウスも作製した。マウスの神経細胞由来である Neuro2a で Pigo ノックアウト細胞を作製し、これらの変異を入れた Pigo cDNA を遺伝子導入をして GPI アンカー型タンパク質の回復の程度を FACS で解析して比較したが、その活性は C>A>B でありマウスのフェノタイプの重症度を反映していた。

#### 3.1 体重増加と生存率の評価

最も重症の B ラインのホモマウスについては生後 5 週ごろより雌雄ともに体重増加が止まり、オスは 16 週で同胞のコントロールマウスの 60%、メスは 75%の体重であった。片方のアレルが null の B ラインの複合ヘテロ接合のマウスではさらに成長の遅れが顕著で、オスではコントロールマウスの 40%、メスは 50%の体重であった。生存率はホモではやや低下傾向が見られたが、有意差はなく、複合ヘテロ接合のマウスでは有意に低下しており雌雄ともに 16 週で約半数が死亡した。ライン A 及び C のホモマウスは雌雄ともに同腹のヘテロマウスや野生型のマウスと体重増加、生存率共に差がなかった。

振戦については B ラインのホモマウスでは生後 7 週以降 100%のマウスに認められ、複合ヘテロマウスではその程度がひどく、生後 5 週以降 100%のマウスに認められた。A ラインではホモマウスは全く認められなかったが、複合ヘテロマウスでは生後 12 週以降 92%のマウスで振戦が認められた。C ラインではいずれのマウスも振戦は認めなかった。

#### 3.2 血漿中 ALP 活性

最もフェノタイプが重症の B ラインのマウスについて測定した。ホモマウスでは同胞のコントロールマウスより高めの傾向があり、複合ヘテロマウスでは有意に高値でコントロールマウスの約 2 倍の値であった。多くの PIGO 欠損症の患者は正常の 2 倍程度の高 ALP 血症を示すので、患者の症状を反映していると言える。

#### 3.3 顆粒球表面に存在する GPI アンカー型タンパク質 Gr-1 の発現量

最もフェノタイプが重症の B ラインマウスの血球の FACS 解析で測定した。ホモマウス、複合ヘテロマウスにおいて有意に顆粒球における Gr-1 の発現量がそれぞれコントロール

のマウスの約 75%、63%に低下していた。PIGO 欠損症の患者は顆粒球上の CD16 の発現が低下していることでスクリーニングが可能であるので、この結果も患者の症状を反映している。

### 3.4 脳の構造や形態評価を目的とした頭部 MRI 検査

最もフェノタイプが重症の B ラインの複合ヘテロマウスについて解析した。明らかな形態異常はみられなかったが、マイルドな脳梁の菲薄化と軽度の小脳の縮小がみられた。これも患者の病状を反映している。患者では気づかれていないこととして、複合ヘテロマウスでは頭部の筋肉量の減少が顕著であった。

### 3.5 脳波の観察および薬剤によるけいれんの誘発

A、B、C ラインのホモマウスについて 24 時間脳波観測を行なってコントロールマウスと比較した。A、B ラインともに、基礎波に高振幅のデルタ波が多く、発作間欠期でんかん性の spike and wave が出現していた。またビデオで観察した結果、ミオクローヌス発作や強直間代けいれんがみられ、B ラインで特に頻度・程度ともにひどかった。C ラインについては 3 匹中 2 匹で基礎波の徐波傾向がられたが発作波はみられなかった。さらにコントロールマウスでは影響を受けない低濃度の $\gamma$ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid : GABA) 受容体阻害薬 Pentylentetrazole (PTZ) をそれぞれのマウスの腹腔内に投与すると、B ラインでは全てのマウスで直後から強直間代発作を呈したのに対し、A ラインでは 3 匹中 1 匹のみで発作を呈し、C ラインでは脳波上のみで発作波が観察された。PIGO 欠損症の患者では発作間欠期には徐波傾向と spike and wave の出現がしばしば見られ、これらのマウスのフェノタイプは患者の症状とよく合致している。

### 3.6 マウスの行動解析

コントロールマウスとの体重差がなく振戦の軽い A ラインのホモマウスおよび複合ヘテロマウスについて同胞のコントロールマウスと比較した。複合ヘテロマウスについてバランスや協調運動能力の著明な低下 (ロータロッドテスト) と筋力の低下 (ハンギングテスト) を認めた。

### 3.7 マウスの脳組織の解析

最もフェノタイプが重症の B ラインの複合ヘテロマウスについて、脳切片の組織学的解析を行なった。ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin : HE) 染色による形態的な観察では特に異常は見られず、免疫染色による各グリア細胞の分布やシナプスや K チャンネルの分布についても変化は認められなかった。

脳ライセートのウェスタンブロットにより myelin basic protein (MBP) と GPI-AP である

Thy-1, Contactin-1 とを検出し、コントロールマウスと比較したところ、いずれも約 80%程度に低下していた。

#### 4.考察

各変異の重症度はヒトとマウスでは異なっていたが、マウスの神経症状は PIGO 欠損症患者によく合致していた。しかし臓器奇形や顔貌異常などの形態異常は観察されなかった。発生初期の形態形成に関わる GPI-AP の低下の程度や影響度がマウスとヒトでは異なっている可能性がある。C ラインのマウスは複合ヘテロの状態であっても、PTZ によるけいれんの誘発の際に脳波においてのみ発作波を呈したこと以外はフェノタイプが検出できなかった。同じ変異を持つ患者においては、鎖肛や口蓋裂といった形態異常があったものの、けいれんはなく、軽度の知能低下のみであった。C ラインについては行動解析を行っていないが認知機能や学習機能に焦点をあてた解析方法が必要だと考えられる。

#### 5.結語

先天性 GPI 欠損症のうち、PIGO 欠損症の患者の 3 種類の変異をノックインしたマウスを作製し、そのフェノタイプを解析したところ、患者の神経症状をよく反映していたことから、PIGO 欠損症の疾患モデルとして確立できたと考えている。このマウスは、遺伝子治療やその他の補充療法の効果の評価系として非常に有用であるので、現在このマウスを使って治療法の開発を進めている。

#### 6.文献

- 1) 村上良子 木下タロウ 知的障害とてんかんを主症状とする新しい疾患—先天性 GPI 欠損症—脳と発達 2015 Jan;47(1):5-13.
- 2) Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, et al. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. Hum Mutat. 2017;38(7):805-815.

#### 7.成果発表

論文投稿中。