

先天性 GPI 欠損症に合併する魚鱗癬の病態解析と治療法の開発

大阪大学微生物病研究所

村上 良子

Inherited GPI deficiency (IGD) is caused by the mutations of the genes involved in the GPI biosynthesis. There are at least 150 kinds of GPI anchored protein in the mammalian cell, and they play various important roles, such as neurological development. IGD patients are often suffered from developmental delay and intractable seizures and in severe cases, some of them have ichthyosis. In the skin specific *Piga* KO mice, secretion of glucosylceramide (GlcCer), packed into the lamellar bodies of keratinocytes was impaired, leading to disruption of skin barrier function, which caused the early neonatal death. *PIGA* is the catalytic component of the GPI-N-acetylglucosaminyltransferase, the first step enzyme of GPI biosynthesis. This phenotype is similar to *ABCA12* KO mouse model, in which GlcCer could not be packed into the lamellar body, leading to the defect in secretion of GlcCer. To elucidate the mechanism of the defect in the secretion of GlcCer in the *Piga* KO model, we made the *PIGA* knockout and its *PIGA* rescued HaCaT cell, a human keratinocyte cell line. We also made the *ABCA12* KO cell to compare the phenotypes. Anti-GlcCer antibody could not show the clear localization in the either cell, however anti-ceramide antibody showed difference in the localization of ceramide between in *Piga* KO and its rescued cells and more clearly in *ABCA12* KO cells. According to these evidences, we will further investigate the pathogenic mechanism of ichthyosis in *PIGA* deficiency and develop its treatment using synthesized GlcNAcPI, the first step product.

1. 緒言

哺乳細胞では GPI (glycosylphosphatidylinositol) という糖脂質で細胞膜につながれている GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) が約 150 種知られており、酵素や受容体、接着因子、補体制御因子など受精、個体発生、神経発達、免疫機能などにおいて重要な働きをしている。GPI-AP は小胞体 (ER) でタンパク質部分と GPI が別々に合成され、完成した GPI が GPI 付加シグナルを持つ前駆タンパク質のカルボキシル末端に付加される。その後も小胞体とゴルジ体で修飾を受け、細胞膜のコレステロールに富む領域に運ばれる。このような GPI-AP の生合成と修飾に 30 個の遺伝子が関与している¹⁾。先天性 GPI 欠損症 (IGD) は近年見つかった潜性遺伝性疾患で、これらの遺伝子に変異がおり重要な機能を担う種々の GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の細胞膜上の発現低下や構造異常により、精神運動発達の遅れ、てんかん、多臓器奇形などを来す^{2, 3)}。現在までに海外で約 400 例、国内で約 50 例の報告がある。厚生省難治性疾患の研究班により診療ガイドラインを作成し、2017 年より指定難病に認定され、2018 年より小児慢性特定疾病となっている。

本研究では重症例でしばしば見られる魚鱗癬様の皮膚病変³⁾の病態解析と治療法の開発を目的とした。以前我々は、

皮膚における GPI アンカーの役割を調べるために、K5-Cre マウスと *Pigafloxed* マウスを交配することにより表皮特異的な *Piga* ノックアウト (KO) マウスを作製した。完全欠損となるオスのマウスは乾燥した皺の多い皮膚を呈し、生後数日で死亡した。表皮のバリア機能の消失によって水分保持能が低下し、角質細胞の水和が阻害されて古い角質層がはがれないため、角質が著しく肥厚していた⁴⁾。その後の解析により角質細胞内に形成される層板顆粒 (lamellar body) の異常や分泌される lamellar body の消失など GPI-AP が、表皮の正常な分化に必須であることが明らかになった⁵⁾。この症状は、重篤な皮膚疾患である Harlequin-type ichthyosis の病態に極めて類似している。この疾患は脂質の lamellar body への輸送に関わる *ABCA12* (ATP Binding Cassette Subfamily A Member)¹²⁾ 遺伝子の変異によっておこることが知られている⁶⁾。角質層の直下にある顆粒層に存在する lamellar body は、TGN (trans Golgi network) に由来するとされているが、その内部にグルコシルセラミド (GlcCer) やスフィンゴミエリンを取り込み、角層と顆粒層の界面に放出する。放出されたグルコシルセラミド、スフィンゴミエリンは、酸性型の β -グルコセレブロシダーゼとスフィンゴミエリナーゼによりそれぞれ加水分解を受け、セラミドに変換される。生成したセラミドは脂肪酸やコレステロールとラメラ構造体を作り、表皮透過バリアを形成する⁷⁾。これらの脂質の合成と分泌過程に GPI-AP が何らかの形で関わっていると考えられ、表皮における GPI-AP の機能の解明が、両疾患の病態解明につながる可能性がある。



Pathological analysis of ichthyosis associate with Inherited GPI deficiency
Yoshiko Murakami
Research Institute for Microbial Diseases

2. 方法

2. 1.

PIGAはGPI生合成の最初のステップに関係するX染色体上の遺伝子で、その変異により機能が低下すると、すべてのGPI-APの細胞表面における発現が低下する¹⁾。ドイツのグループとの共同研究によりPIGAの産物であるGlcNAcPIを合成した(図1A)。PIGA欠損のHEK293細胞を無血清培地に2 μ MのGlcNAcPIを加えた培養液で24時間培養し、フローサイトメトリーによりGPI-APの発現の回復を解析した。GlcNAcPIは効率よく次のステップのPIGLの基質として使われGPI-APであるCD59とDAFの発現が正常の60%まで回復した(図1B)⁸⁾。フローサイトメトリー解析にはmouse anti-human CD59 (5H8), -DAF (IA10, Biolegend)と2次抗体としてPhycoerythrin conjugated anti-mouse IgGを使用した。

2. 2.

まずヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞を使ってin vitroの実験系を樹立した。Cas9とguideRNAを発現するベクター(px330 Addgene #42230)にPIGA遺伝子のターゲット配列(ACACTCTCTCGGGTTAGCCC)を挿入したプラスミドをリポフェクション(lipofectamine 2000, Thermo Fisher Scientific)によりHaCaT細胞に導入してPIGAをノックアウトし、PIGA KOクローン#11, 12を樹立した。フローサイトメトリー解析により、野生株の細胞表面に発現するGPI-APがKO細胞で欠損していることを確認した。さらにKO細胞にPIGA cDNAをレトロウイルスベクター(pLIB-hyg-FLAG-PIGA)を使って導入した後、ハイグロマイシン200 μ g/mlを含む選択培地で培養してレスキュー細胞を作製し、正常コントロールとした(図2)。次にGlcNAcPIの効果を確認するために、2.1.と同様の方法で培養液中に加えて細胞膜上のGPI-APの回復を

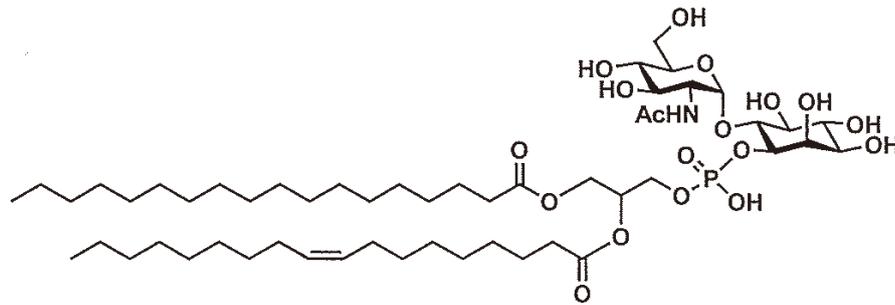


図1A 合成GlcNAcPI (18:0, 18:1)の構造

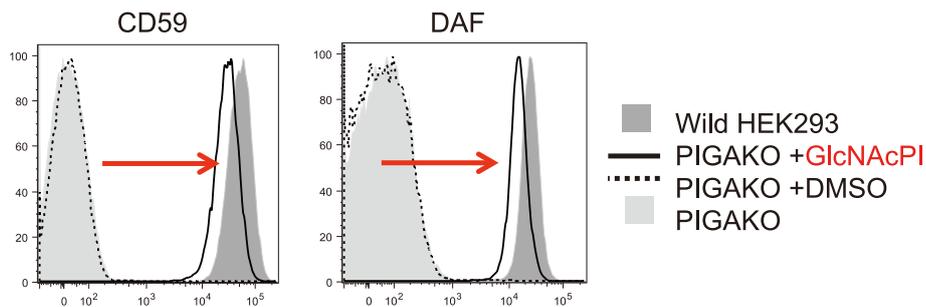


図1B PIGAKOのHEK 293細胞を無血清培地に2 μ MのGlcNAcPIを加えた培養液で24時間培養後フローサイトメトリーによりGPI-AP (CD59, DAF)の発現の回復を解析した。

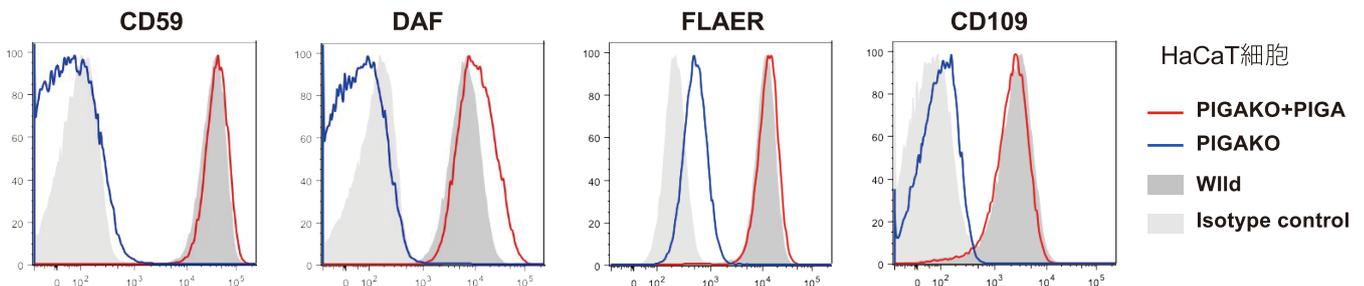


図2 PIGA KOとPIGAをレスキューしたHaCaT細胞のフローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーで解析した(図3)。FLAER (fluorescent-labeled inactive toxin aerolysin, CEDARLANE) は GPI-AP に結合する毒素の変異体に Alexa488 の蛍光ラベルを付加したプローブで、GPI-AP の発現量を示す。CD109 の発現は mouse anti-CD109 (Biolegend) を使用して解析した。

2. 3.

細胞内 GlcCer の蓄積を比較観察するため HaCaT 細胞の *ABCA12* 遺伝子の KO 細胞クローンを 2. 2. と同様の方法で作製した。ターゲットサイトは 2 箇所設計し (5'-CAAAGGATTTCG GGGCAATAT, 5'-AAACAGAAAAG TCGTCAAGC)、KO 細胞クローンを樹立したのちに、ゲノムの配列を読んで完全な KO 細胞であると確認できた細胞クローン #27, 30 を *ABCA12* KO 細胞として使用している。

2. 4.

この 3 種類の細胞 (*PIGA* KO + *PIGA* rescued, *PIGA* KO + empty vector, *ABCA12* KO) における GlcCer の局在を確認するために、角化細胞に分化させる条件を検討した。HaCaT 細胞は高 Ca の濃度で角化細胞に分化することが知られている⁹⁾。異なる Ca 濃度で細胞を培養して形態を観察した結果、角化細胞に分化させる高 Ca の条件を 2.8mM とし、分化しない低 Ca の条件を 0.03mM とした。低 Ca の条件は Ca 添加のない DMEM 培地に透析した FCS を 10% 加えたものに CaCl₂ を加えて final 0.03mM とした。

2. 5.

これらの 3 種の細胞を、poly-L-Lysine をコートしたカバーガラス上で培養し、高 Ca の条件で角化細胞に分化させた上で、rabbit anti-GlcCer (RAS_0011, Glycobiotech) mouse anti-ceramide (-Cer) (C8104, Sigma), rabbit anti-keratin1 (Biolegend), 2 次抗体として FITC conjugated

donkey anti-rabbit IgG (Jackson), Alexa488 conjugated goat anti-mouse IgG (Biolegend) を使って、その局在の違いを顕微鏡で観察した (KEYENCE BZ-X800)。メタノールあるいはパラホルムアルデヒド (PFA) で固定した細胞は Anti-GlcCer, -Cer による免疫染色に適さないことがわかったので、既報の手法を踏襲して無固定で 0.1% TritonX100, 1% donkey serum in PBS で処理して 1 次抗体、2 次抗体で 2 段階で染色し、4% PFA で後固定して観察した。

3. 結果

3. 1.

PIGA 欠損の HEK293 細胞の培養液に合成した GlcNAcPI を 2 μ M 加えたところ図 1B のように GPI-AP である CD59, DAF が、ともに正常の 60% まで発現量が回復した。これに関連する結果は報告した (ACS Chem Biol. 2021 19; 16 (11): 2297-2306)。

3. 2.

HaCaT 細胞膜上に発現する GPI-AP が *PIGA* KO クローンでは完全にその発現が消失し、さらに *PIGA* cDNA を導入することによって発現が完全に回復していることを示す(図 2)。

さらに 3. 1. と同様に合成基質 GlcNAcPI 3 μ M の添加により、GPI-AP である CD59 と DAF の発現が正常の 10% 程度まで回復することがわかった。回復の効率は HEK293 細胞に比べて低かったが、ピークとなる時間は 24 時間と同じであったことから、取り込みの効率、あるいは小胞体での利用の効率が HEK293 細胞に比べて低いと考えられる(図 3)。

3. 3.

ABCA12 KO の作製と完全なノックアウト細胞である

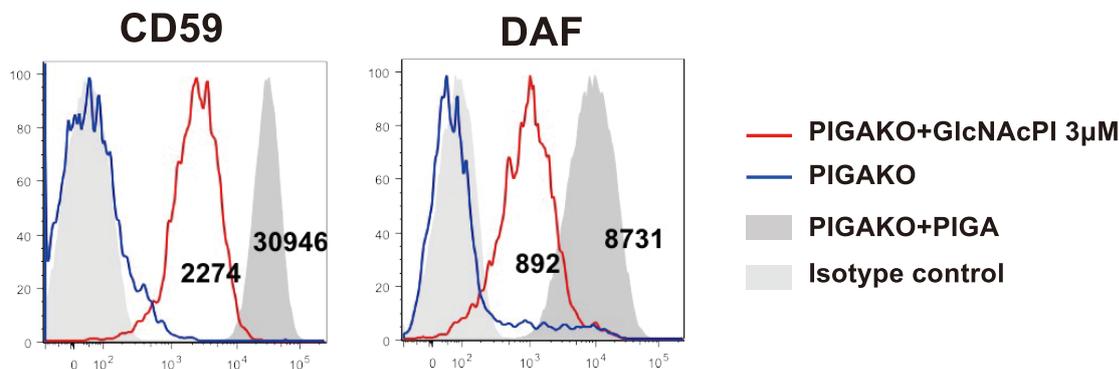


図 3 *PIGA* KO HaCaT 細胞を無血清培地に 3 μ M の GlcNAcPI を加えた培養液で 24 時間培養し、フローサイトメトリーにより GPI-AP (CD59, DAF) の発現を解析した。

ことをゲノム配列の解析により確認した(図4)。

3. 4.

文献によると正常の角質細胞ではGlcCerの分布が細胞質全体に分布しているのに対し、*ABCA12* 遺伝子に変異をもつ Harlequin-type ichthyosis の患者の角質細胞ではGlcCerがlamellar bodyに運ばれずに核の周囲の塊として存在し、分布に異常をきたしている。

作製した*ABCA12* KO細胞のGlcCerとセラミドの分布をpositive controlとして3種類の細胞の免疫染色のパターンを比較した。GlcCerは図5Aのように染色が弱く、

ABCA12 KOについては既報のデータの再現性は得られず、*PIGA* KOとレスキュー細胞の間にも局在のパターンに差は見られなかった。一方セラミドの分布については、*PIGA* レスキュー細胞では一部細かい繊維状の染色が目立つ細胞はあるが、主に細胞膜と細胞質にdot状に分布しているのに対し、*PIGA* KO細胞(#11, 12)では繊維状の染色パターンの細胞の割合が増加しており、*ABCA12* KO(#27, 30)ではほぼすべての細胞が網目状に伸びた荒い繊維状の染色パターンを示していた。*PIGA* KO細胞にGlcNAcPI 3μMを添加するも、明瞭な変化はみられなかった(data not shown)。

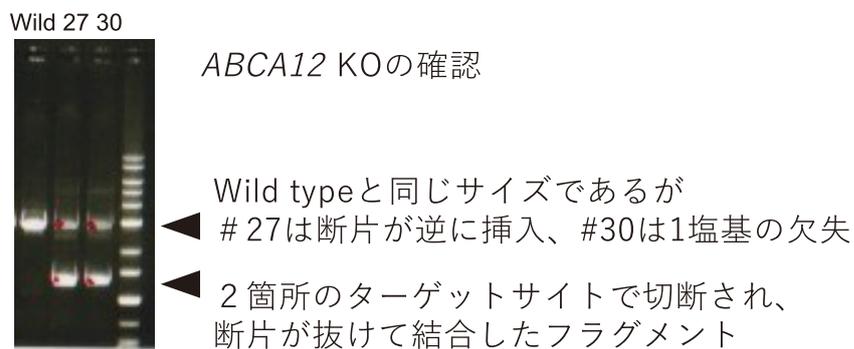


図4 *ABCA12* KO細胞のゲノムのターゲットサイトの解析

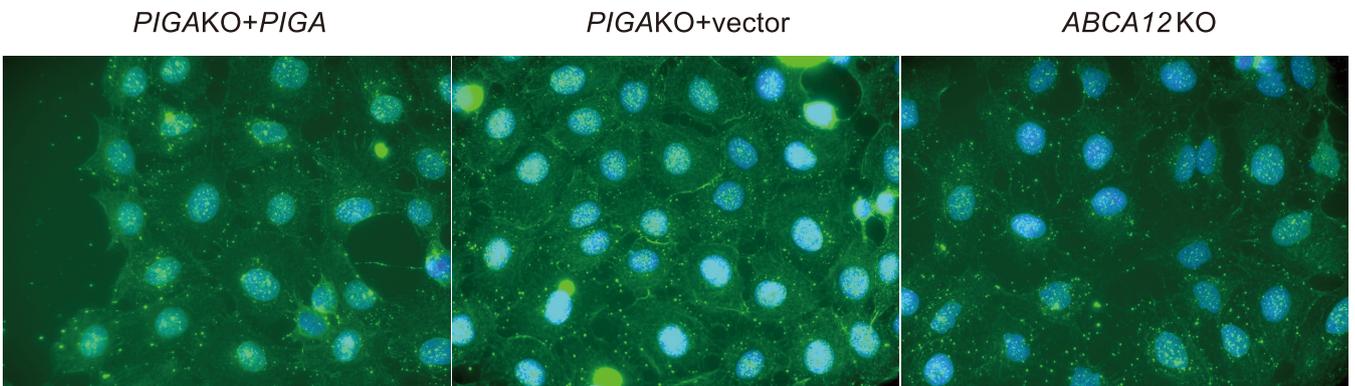


図5A *PIGA*KO 細胞(#11)、そのレスキュー細胞、*ABCA12*KO細胞(#27)を高Caの条件で分化させてanti- GlcCer 抗体でGlcCerの局在を確認した。他のクローンも同様であった。

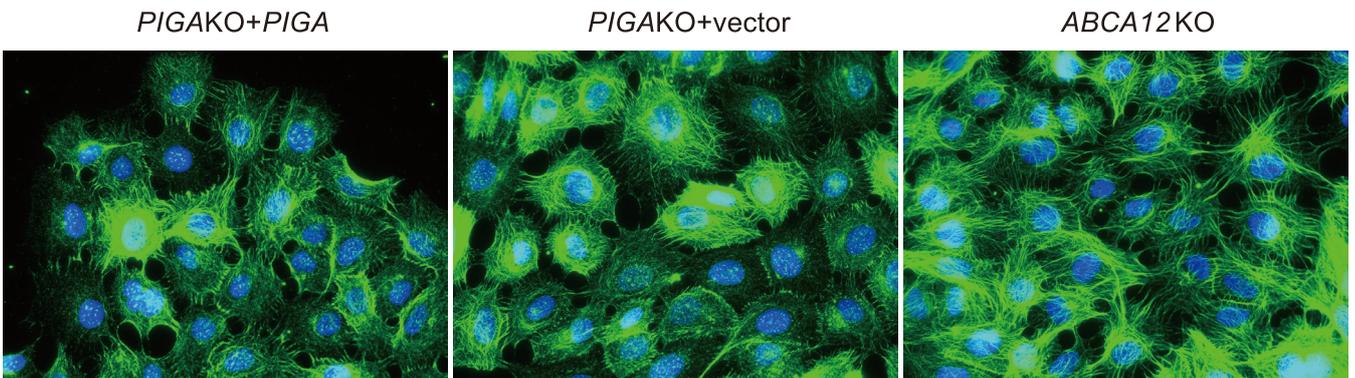


図5B *PIGA*KO 細胞(#11)とそのレスキュー細胞、*ABCA12*KO細胞(#27)を高Caの条件で分化させてanti- Cer antibodyでCerの局在を確認した。他のクローンも同様であった。

4. 考察および総括

セラミドは小胞体で合成され、多くは小胞輸送によりゴルジ体に運ばれ、細胞質側でGlcCerに合成されて細胞膜のラフトに運ばれる。一部のセラミドはCeramide Transport protein (CERT) により小胞体膜から引き抜かれてゴルジ体に運ばれ、内腔にフリップしたのちにスフィンゴリエリンに合成されて、同様に細胞膜のラフトに運ばれる¹⁰⁾。lamellar bodyはTGN由来の小胞であるとされているが、その内部にGlcCerやスフィンゴリエリンを蓄積しており角層に分泌されたのちに酵素により再びセラミドとなって皮膚のバリア機能を発揮する。ABCA12はlamellar bodyの膜上であってGlcCerのトランスポーター、あるいはGlcCerをゴルジ体膜の細胞質側から内腔側に移す働きがあるとされているが¹¹⁾、実証されておらず、その作用部位は明らかでない。ABCA12が欠損するとlamellar bodyにGlcCerが積み込まれず、その結果角層のセラミドが欠損し皮膚のバリア機能が障害される。本プロジェクトではヒトの皮膚の角質細胞から樹立された細胞株HaCaT細胞をモデル細胞として使用して前述のように3種の細胞株を樹立し、主にGlcCerとセラミドの局在を観察することでそのフェノタイプを解析した。GlcCerの局在に関しては、抗体に問題があり解析が困難であった。既報によるとABCA12変異角質細胞ではGlcCerは細胞の核周囲に局在するとされている⁶⁾。蛍光標識したセラミドを外から加えると、核周囲に集結することが報告されているが、その分布はCERTの分布に一致する¹²⁾。すなわち核周囲の集積はゴルジ体での蓄積の可能性が高い。TGNから生じる小胞、Lamellar bodyにGlcCerが積みこまれないせいであると考えられる。一方で荒い繊維状の染色パターンを示したceramideの局在は、ERの可能性が考えられるがERマーカーの局在と比較する必要がある。GlcCerの輸送障害のためにその前のステップのセラミドの輸送も障害されている可能性がある。角層に含まれる7種のセラミドは6種のグルコシルセラミドとアシルグルコシルセラミド(Epidermoside)から産生されるが、スフィンゴリエリンからは2種のセラミドの産生にとどまる。グルコセレブロシダーゼの異常によるゴーシェ病においてはグルコシルセラミドからセラミドを産生できず皮膚透化バリアの形成不全を起こす。一方スフィンゴリエナーゼの異常によるニーマン・ピック病においては皮膚症状は報告されていない。すなわちグルコシルセラミド由来のセラミドがバリア形成に重要であることがわかる⁷⁾。GlcCerから産生される角層のセラミドのアミド基に付加されている脂肪酸は多くがC22からC26の長鎖脂肪酸である⁷⁾。GPI生合成の初期の遺伝子の欠損細胞で長鎖脂肪酸を含むGlcCerが減少しているというリピドミクスのデータがあり、GPI-APある

いはGPI中間体とGlcCerのERからゴルジ体への輸送が連動している可能性を示唆している¹³⁾。

今後はHaCAT細胞におけるセラミドの分布の違いを、オルガネラマーカーを加えて解析しGPI欠損による病態を解明する。角化細胞は基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞と分化していくが、lamellar bodyを分泌するのは顆粒細胞である。HaCaT細胞はヒト角化細胞株で、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞のいずれにも分化できるとされている。それぞれの分化マーカーが知られているので顆粒細胞に分化させた上で、GlcCerやセラミド、ABCA12の分布を観察するとともに、western blotによりそれらの量を比較する。また電子顕微鏡によりlamellar bodyの形態を3者で比較する。NBDラベルのセラミドをこれらの細胞に投与し、その局在や運搬、GlcCerへの変換を確認する。HaCaT細胞は3次元培養できるので、マウスのフェノタイプが再現できるかを確認する。今回はin vitroでのGlcNAcPIの投与による効果が見えなかったため、マウスの実験までは進めなかったが、上記により病態解析が進めば、効果判定の指標がよりはっきりするので、それをもとにGlcNAcPIの投与による治療を試みる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝を申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kinoshita, T. Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Open Biol* **10**, 190290, doi: 10.1098/rsob.190290 (2020).
- 2) Kuki, I., Yukitoshi Takahashi, Shin Okazaki, Hisashi Kawawaki, Eiji Ehara, Norimitsu Inoue, Taroh Kinoshita and Yoshiko Murakami Case report on vitamin B6 responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency. *Neurology* **81**, 1467-1469., doi: DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a8411a (2013).
- 3) 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* **38**, 805-815, doi: 10.1002/humu.23219 (2017).
- 4) Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka,

- T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T. & Takeda, J. Tissue specific knock-out of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7400-7405 (1997).
- 5) Hara-Chikuma, M., Takeda, J., Tarutani, M., Uchida, Y., Holleran, W. M., Endo, Y., Elias, P. M. & Inoue, S. Epidermal-specific defect of GPI anchor in Pig-a null mice results in Harlequin ichthyosis-like features. *J Invest Dermatol* **123**, 464-469, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23227.x (2004).
- 6) Yanagi, T., Akiyama, M., Nishihara, H., Sakai, K., Nishie, W., Tanaka, S. & Shimizu, H. Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum Mol Genet* **17**, 3075-3083, doi: 10.1093/hmg/ddn204 (2008).
- 7) Hamanaka, S., Hara, M., Nishio, H., Otsuka, F., Suzuki, A. & Uchida, Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol* **119**, 416-423, doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01836.x (2002).
- 8) Guerrero, P. A., Murakami, Y., Malik, A., Seeberger, P. H., Kinoshita, T. & Varon Silva, D. Rescue of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Biosynthesis Using Synthetic Glycosylphosphatidyl inositol Oligosaccharides. *ACS Chem Biol* **16**, 2297-2306, doi: 10.1021/acscchembio.1c00465 (2021).
- 9) Wilson, V. G. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* **1195**, 33-41, doi: 10.1007/7651_2013_42 (2014).
- 10) Ishibashi, Y., Kohyama-Koganeya, A. & Hirabayashi, Y. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1475-1485, doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.06.001 (2013).
- 11) Mitsutake, S., Suzuki, C., Akiyama, M., Tsuji, K., Yanagi, T., Shimizu, H. & Igarashi, Y. ABCA12 dysfunction causes a disorder in glucosylceramide accumulation during keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci* **60**, 128-129, doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.08.012 (2010).
- 12) Charruyer, A., Bell, S. M., Kawano, M., Douangpanya, S., Yen, T. Y., Macher, B. A., Kumagai, K., Hanada, K., Holleran, W. M. & Uchida, Y. Decreased ceramide transport protein (CERT) function alters sphingomyelin production following UVB irradiation. *J Biol Chem* **283**, 16682-16692, doi: 10.1074/jbc.M800799200 (2008).
- 13) Loizides-Mangold, U., David, F. P., Nesatyy, V. J., Kinoshita, T. & Riezman, H. Glycosylphosphatidylinositol anchors regulate glycosphingolipid levels. *J Lipid Res* **53**, 1522-1534, doi: 10.1194/jlr.M025692 (2012).