

発作性夜間ヘモグロビン尿症をめぐる最近の知見

村上 良子

大阪大学・微生物病研究所・難本難病解明寄附研究部門、同・免疫学フロンティアセンター・糖鎖免疫

Recent progress in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Yoshiko Murakami

Yabumoto Department of Intractable Disease Research, Research Institute for Microbial Disease
and Laboratory of Immunoglycobiology, Immunology Frontier Research Center, Osaka University

1. はじめに

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) は 1882 年 Strübing が就寝後の血管内容血によるヘモグロビン尿症として詳細な症例の報告をした。免疫学において血清中の殺菌能を持つ易熱性要素としての補体の発見が 1890 年代であったことから PNH 研究は補体研究とともに歩んできたといえる。1939 年 Ham によって酸性化血清による PNH 血球の溶血は赤血球の補体感受性亢進によることが指摘された^{1,2)}。その後 Dacie と Rosse は PNH では補体易感受性の異常赤血球と正常赤血球がモザイクで存在することを示し³⁾、さらに Luzzatto らは異常赤血球がクローンであることを証明した⁴⁾。これらの発見は PNH が体細胞突然変異によって発症するという仮説の基礎となった。C3 転換酵素の解離を促進する decay-accelerating factor (DAF) が発見されると⁵⁾、1983 年には PNH 血球の溶血は DAF の欠損によることが報告された⁶⁾。しかし PNH 血球の membrane attack complex (MAC) 形成を介する溶血は DAF 補填により阻害されなかったことから、他の阻害因子が PNH 血球では欠損していることが示唆された⁷⁾。そんな中、岡田ら、杉田ら、Parker らは正常赤

血球膜上に発現する CD59 を発見し、このタンパク質が MAC 形成の阻害因子であることを示した。⁸⁻¹⁰⁾

一方同じ頃 GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーの概念が 1980 年代に確立された。1970 年代から細胞表面タンパク質がホスファチジルイノシトール (PI) 特異的バクテリアホスホリパーゼ C (PIPLC) によって切断され分泌されることから、ある種のタンパク質が PI によって修飾され膜にアンカーされていることが示唆されていたが 1988 年にラット Thy-1¹¹⁾ とトリパノソーマの VSG 分子の GPI アンカーの完全構造がはじめて決定され、翌年には GPI 生合成経路がトリパノソーマで報告された¹²⁾。その後の 10 年間で種々のタンパク質分子で GPI アンカーの構造が解析され、真核生物で保存された基本骨格が決定された。1986 年には Medof らが PNH 血球で欠損している DAF とアセチルコリンエステラーゼがこの共通構造を持つことを報告している¹³⁾。こうして PNH は GPI アンカーの生合成の異常に起因することが明らかになった。1993 年木下らは PNH 患者から樹立した B リンパ芽球株の詳細な解析から GPI 生合成の最初のステップに異常があることを報告し¹⁴⁾、その原因遺伝子 *PIGA* (phosphatidylinositol glycan class A) を同定した¹⁵⁾。

16)。この発見は PNH の責任遺伝子が *PIGA* であることを示すのみにとどまらず、GPI アンカーの生合成経路の遺伝子を初めて同定することになった。以降同じ手法で GPI 生合成遺伝子が次々と同定された。

しかしながら PNH は 19 世紀の症例報告から始まり、補体の関与、補体制御因子の欠損、GPI アンカーの欠損、*PIGA* の同定という数々のブレイクスルーとなる発見を経てもなお 21 世紀の今日、未だ完全な発症機序の解明に至っていない。また最近の遺伝子解析技術によってさらに新しい疾患への広がりをみせている。本稿では古くて新しい PNH という疾患について最近の知見を紹介したい。

2. PNH の発症機序

PNH の発症頻度は国内で10万人に1.2人で男女比はほぼ同じ、診断年齢は20~60代である。前述したように PNH は1個あるいは数個の造血幹細胞の *PIGA* 遺伝子の突然変異を原因とし、溶血性貧血・深部静脈血栓症・骨髄不全を3主徴とする血液疾患である。*PIGA* は GPI アンカー生合成の最初のステップに必須の遺伝子で、遺伝子変異により機能がなくなると GPI 欠損細胞となり、細胞表面上のすべ

ての GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) が欠損する。補体制御因子である CD59 や DAF が GPI-AP であるために、PNH では欠損しており感染などを契機とした赤血球上の自己補体の活性化を制御できず溶血発作を来す。白血球や血小板上でも補体活性化は起こるが、赤血球と異なり CD59 や DAF の他に membrane cofactor protein (MCP) という膜貫通型補体制御因子が発現しているので破壊から免れる。CD59 は C5b-8 あるいは C5b-9 に結合して MAC (C5b-9n) 形成を阻害することにより、DAF は膜上の C3 転換酵素 (C4bC2a, C3bBb) から C2a, Bb を遊離させて失活させることにより赤血球を保護している (図1)。どちらがより溶血発作の阻止に重要であるかは、それぞれの単独欠損症が報告されて明らかになった。先天性 CD59 欠損症は5家系について報告されており、PNH と同様血管内溶血を主症状とするがその他に反復性末梢神経炎や脳血管血栓症がみられる^{17,18)}。先天性 DAF 欠損症は以前から Inab タイプという血液型抗原として知られ、蛋白漏出性胃腸症の報告もあったが、最近8家系11人の症例報告が有り、10人が蛋白漏出性胃腸症を呈し、一部で血栓症を起していた¹⁹⁾。いずれも抗 C5 抗体薬、エクリズマブの投与で症状が軽減されるので、局所での補体の活性

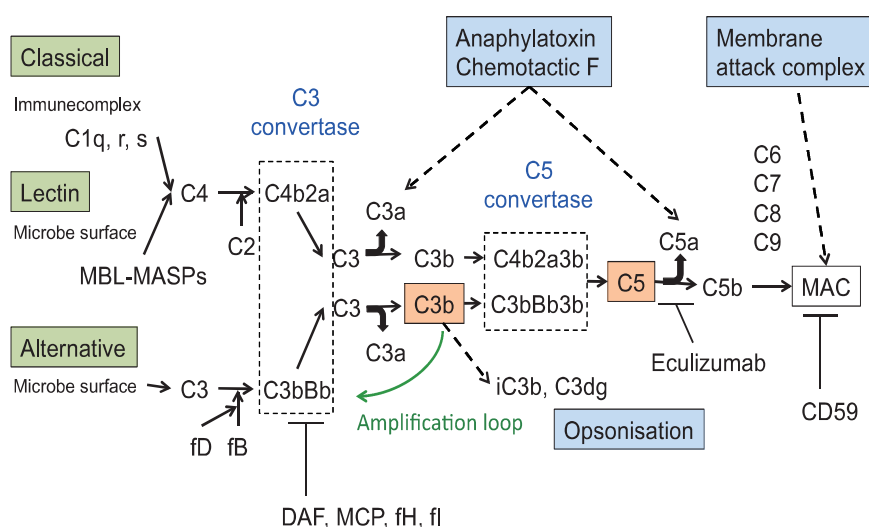


図 1 補体活性化経路

活性化経路には Classical, Lectin, Alternative の 3 経路ありいずれも C3 convertase の形成を経て Opsonisation や Membrane attack complex による病原体の排除や Anaphylatoxin によるエフェクター細胞の活性化に働く。制御因子として DAF、MCP、factor H (fH)、fI、CD59 がある。Eculizumab は補体因子 C5 に対する抗体薬で C5 に結合しその活性化を抑制する。

化が原因と考えられる。先天性DAF欠損症では溶血発作がみられないことから、溶血発作の阻止に関してはCD59が重要であることがわかる。

GPI生合成と修飾に関わる遺伝子は現在までに27個同定されているが、ほとんどのPNH患者の原因遺伝子は *PIGA* である。変異様式は多種多様でhot spot は存在せず、変異の結果フレームシフトを起こす例が大部分を占める²⁰⁾。また少なくとも20%以上の患者では複数の異常クローンが同定されることが多く、PNH は従来理解されていたような単クローン性というよりはむしろオリゴクローン性の疾患であることが判っている²¹⁾。PNHの原因遺伝子がほとんどの場合 *PIGA* である理由は、GPI生合成遺伝子のうち *PIGA* のみがX染色体上の遺伝子であり、女性も発生初期のX染色体不活化が起こるので男女とも機能的アレルは1本で1回の体細胞突然変異でGPI欠損細胞になるためと考えられる。他の遺伝子はすべて常染色体上にあるので、ある造血幹細胞の遺伝子の2つのアレルに同時にヒットが起こる確率は非常に低い。しかしながら最近、次世代シーケンサーを用いた解析によって *PIGT* を責任遺伝子とするPNHが見つかった^{22, 23)}。報告例の2例とも遺伝的に1本のアレルに変異があるところに、造血幹細胞において体細胞突然変異が起こり20番染色体の *PIGT* 周辺領域の欠損が起こって発症したものであった。これについては後述する。このように今後まれではあるが生殖系列の変異が重なれば、他の遺伝子を責任遺伝子とするPNHが見つかる可能性がある。

3. 異常細胞のクローナルな拡大

PIGA の突然変異でGPI欠損細胞となった1個から数個の造血幹細胞は、正常細胞を凌駕してクローナルに拡大しPNHを発症するが、その拡大機序はまだ完全には解明されていない。健常者にも少数の (~0.003%) GPI欠損細胞がみつき、しかも同じクローンが長期間存在するが拡大はしない²⁴⁾。また

PIGA 欠損の造血幹細胞を骨髄移植したPNHモデルマウスの血液でも GPI欠損クローンは拡大しない^{25, 26)}。すなわち *PIGA* の変異のみでは異常クローンの拡大はおこらず、PNH発症の為には他の因子が必要である。現在考えられているのがGPI欠損細胞は自己免疫的な攻撃から逃れることにより選択されるという説と、更なる遺伝子変異やエピジェネティックな機序により腫瘍性増殖を来すという説がある。前者は再生不良性貧血の患者の中にはPNH血球が顕在化している場合があり、そのような場合には免疫抑制療法がよく効くという指標になっていることから支持されている^{27, 28)}。上述のPNHマウスモデルにアロのCD4⁺T細胞を入れるとGPI欠損細胞が拡大して100%占めるようになる²⁹⁾。またPNH患者ではCD1dに提示されたGPIを特異的に認識するT細胞クローンが拡大しているという報告や³⁰⁾、PNH患者の正常骨髄細胞にはNK細胞の機能を増強するGPIアンカー型のリガンドが発現しており選択的に正常細胞が攻撃を受けるという報告³¹⁾があるが両者とも実際の患者の体内でどの程度関与しているか不明である。一方後者については、一部の患者で、GPI欠損細胞において、染色体異常により胎児期に発現する *HMGA2* という転写因子の3'UTRが切断されmiRNAである *let7* の制御を免れて高発現し腫瘍性増殖を獲得した例が挙げられる³²⁾。また染色体異常のないPNH患者の70%以上の末梢血で *HMGA2* の発現が上がっていたが、原因となる遺伝子異常は見つかっていない³³⁾。ShenらはPNH患者の末梢血をGPI欠損細胞と正常細胞に分けてそれぞれのゲノムについて、12例で全エクソーム解析を行ない、そのデータをもとにさらに36例で61遺伝子についてターゲットエクソーム解析を行ったところ、それぞれのPNH症例でmyelodysplastic syndromes (MDS) で変異が認められる様々な遺伝子について平均2個の体細胞変異が見つかったがクローン拡大の共通機序を示すデータは得られていない³⁴⁾。今後はRNAseqや全ゲノムシーケンス等などを使ってエ

ピジェネティックな変異について解析する必要がある。

4. PNH の治療について

第一選択薬は補体因子 C5 に対するヒト化単クローン抗体、エクリズマブであるが、その適応については PNH 診療ガイドラインに詳細に示されている（http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H28/05.pdf）。エクリズマブは C5 に結合しその活性化を阻害することによりアナフィラトキシン C5a の遊離と MAC 形成を阻害する。関節リウマチや SLE の治療薬として開発されたが、PNH に対しては 2002 年からイギリスにおいて始まりその有効性が確認された³⁵⁾。以降 15 年に渡って PNH の治療薬として、貧血のみならず、溶血に由来する血栓症、平滑筋調節障害、倦怠感などを改善し患者の QOL を劇的に向上させた。しかしながらいくつかの課題も残されている。根本治療ではなく溶血を抑えるのみなので、かえって異常赤血球が増加しそれに C3b が蓄積することにより血管外溶血が顕在化し輸血を要する症例がある³⁶⁾。また C5 多型 (Arg885His) によるエクリズマブ不応例が国内では約 3% の頻度で見られる³⁷⁾。さらに補体活性を抑制することによる重篤な副作用としてナイセリア菌による重症感染のリスクがあることを忘れてはならない。エクリズマブ投与前にはワクチン接種が義務づけられているが、接種をしても国内外で死亡例が報告されている³⁸⁾。自己免疫疾患の中には補体活性化がその病態に深く関与しているものがあり最近是非典型溶血性尿毒症症候群や全身型重症筋無力症が追加されエクリ

ズマブの適応疾患が広がっている。そのため製薬各社が様々な補体阻害薬を開発している。中外製薬はリサイクリング抗 C5 抗体 RO7112689 の治験を行っており、Alexion 社はエクリズマブを改変してロングアクティング抗体とし体内寿命の長い ALXN1210 を FDA に申請中である。Alnylam 社は C5 をターゲットにした siRNA, ALN-CC5 を、Akari 社はダニの唾液から発見された C5 阻害剤 Coversin を開発しており³⁹⁾それぞれ治験を進めている。また Apellis 社は C3 と C3b に結合して以降の補体活性化を阻害する Compstatin を開発している⁴⁰⁾。C3 阻害薬は上記の血管外溶血を防ぐことはできるが、補体の古典、第二、レクチン経路のすべてを阻害するので感染の危険が増す。これらに対して、補体の第二経路のみの阻害剤の開発も進んでいる。factor D はセリンプロテアーゼで C3b に結合した factor B を切断して活性化し C3 転換酵素 C3bBb を形成する。Factor D は血漿中の濃度が最も低く補体活性経路の律速段階なので、格好のターゲットである。第二経路のみの阻害剤なので感染のリスクも軽減され、C3 の活性化も抑制するので血管外溶血のリスクも減ると考えられる。Achillion 社が小分子阻害剤 ACH-4471 を開発している⁴¹⁾。その他 factor B, properdin の阻害薬や factor H-CR2 融合タンパク質 (TT30)⁴²⁾が開発されている。このように開発が進み、適応症が拡大されることにより低価格でより安全な補体阻害剤が実用化されると期待されるが、PNH においては骨髄不全に対する改善効果は認められないので、症例によっては免疫抑制療法を必要とする。

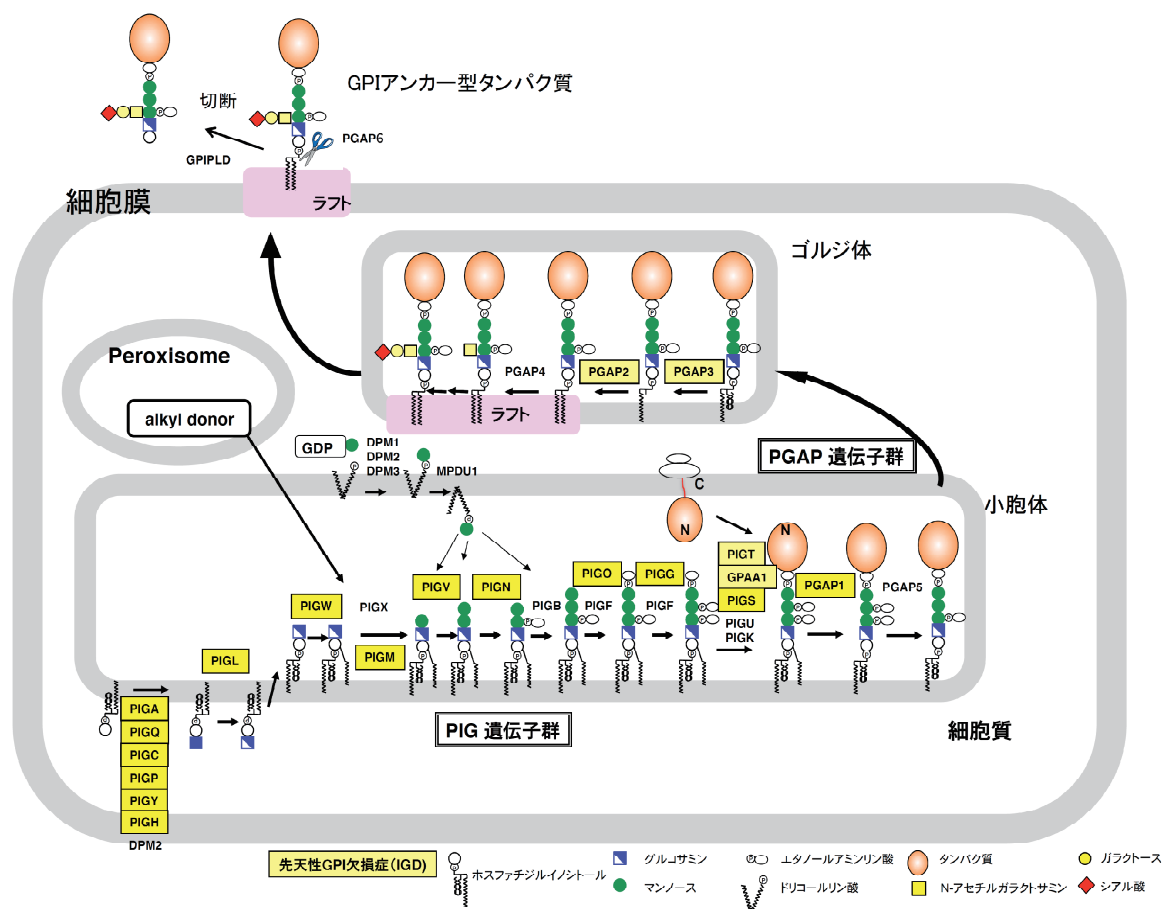


図2 GPIアンカー型タンパク質の生合成と輸送

5. GPI 生合成遺伝子とその生殖系列の変異について

GPI-AP は小胞体で前駆タンパク質と GPI アンカー部分が別々に合成される。GPI の基本構造はホスファチジルイノシトール (PI)、グルコサミン (GlcN)、3 つのマンノース (Man)、2 つのエタノールアミンリン酸 (EtNP) から成り立っており、全ての真核生物でよく保存され、図 2 に示すように複数のステップにより合成される。最初のステップは、PI に N アセチルグルコサミン (GlcNAc) が転移され GlcNAc-PI が生成される反応で PIGA を触媒因子とし 7 個のタンパク質からなる酵素複合体によって担われている。この第 1 ステップと次の PIGL が担う第 2 ステップは小胞体の細胞質側で行われ、その後小胞体内腔にフリップして生合成が進む。5 つのタンパク

質からなる GPI トランスアミダーゼ複合体は前駆タンパク質の C 末端の GPI 付加シグナルを認識して切断し、完成した GPI アンカーを付加する。その後も GPI-AP は GPI アンカー部分の脂質や糖鎖の修飾を受けて、ゴルジ体に運ばれさらに脂質部分が不飽和脂肪酸から飽和脂肪酸に入れ替わることによりラフトと呼ばれるコレステロールに富んだ細胞膜上のドメインに局在できるようになる。以前から GPI アンカーの糖鎖に側鎖がついていることが知られていたが、最近ゴルジ体において一つ目のマンノースに N アセチルガラクトサミン (GalNAc) を付加する酵素 PGAP4 が同定され、さらにガラクトース (Gal) とシアル酸が付加されて細胞膜に運ばれる⁴³⁾。こうして運ばれた GPI-AP の一部は PGAP6 によってリゾ体となって遊離され⁴⁴⁾、あるいは血清中

のリパーゼによって切断遊離されて機能を発揮したり、機能制御を受けている。

GPI 生合成と輸送に関与する遺伝子は 27 個あり、それらの変異で発症する劣性遺伝性疾患、先天性 GPI 欠損症 (Inherited GPI deficiency, IGD) が次々と見つかった。現在までに 19 遺伝子の変異による症例が国内で約 35 例、海外を合わせると約 250 例報告されている。変異する遺伝子のステップや変異による活性低下の程度によって病態が異なるが知的障害、運動発達障害、小脳障害、てんかんなどの神経症状を中心に特異顔貌、手指や足趾の異常、難聴、内臓奇形等広汎な症状を示す⁴⁵⁾。個体発生には GPI は必須であるので IGD においては多くは変異によって活性の低下した部分欠損症である。一方 GPI が完全欠損しても血液細胞の増殖や分化には影響しないので PNH における PIGA 欠損細胞は、完全欠損細胞であることが多い。診断は両者とも血液のフローサイトメトリーで GPI-AP の発現を測定するが、そのパターンは全く異なる。PNH では赤血球に発現する CD59 や DAF の発現が欠損している細胞の分画が正常細胞と混在して存在することを確認するが、IGD では部分欠損症であるため赤血球は全く正常で、顆粒球上の CD16b, CD24 の発現が正常者と比べて減少していることで診断する。CD59 や DAF の発現は低下しないことが多いので溶血発作は起こらない。前述した *PIGT* を責任遺伝子とする PNH は一方のアレルの *PIGT* 遺伝子に生殖系列の変異をもつ造血幹細胞において、もう一方のアレルの体細胞突然変異によってそれぞれ Chr. 20q の *PIGT* を含む 8Mb, 18Mb の欠損が起こって発症した症例である。興味深いことに 2 例とも PNH の診断前 15 年以上にわたって蕁麻疹、発熱、関節痛、腹痛、無菌性髄膜炎などの慢性炎症症状を来していたが PNH 診断後エクリズマブの投与によりこれらの

慢性炎症も治まった^{22, 23)}。*PIGT* は GPI トランスアミダーゼ複合体の 1 因子で、その欠損により前駆タンパク質への GPI アンカーの付加が起こらないので細胞表面の GPI-AP の発現が欠損する。前駆タンパク質は小胞体で分解されるが、完成した GPI アンカーはタンパク質が付加されないまま修飾を受けて、細胞表面に運ばれることがわかっている⁴³⁾ (図 3)。このフリー GPI の *PIGT* 欠損細胞上の発現が補体活性化とともに慢性炎症に関わっていると考えられる。このタンパク質が付加されていない GPI は GPI トランスアミダーゼ欠損細胞のみならず、各ステップの欠損細胞でそれぞれ小胞体に蓄積されている GPI 中間体が細胞表面に発現していることが知られている。一方 *PIGA* は生合成の最初のステップなのでそのような発現はない。今後さらに他の遺伝子を責任遺伝子とする PNH が見つかる可能性があるが、欠損細胞表面に発現する GPI 中間体によってそれぞれ多彩な症状を来すことが予想される。PNH の新しいサブタイプとして従来の *PIGA* を責任遺伝子とする PNH と区別する必要がある。

6. 終わりに

細胞表面のフリー GPI はその側鎖の GalNAc を認識する抗体で染めることによりフローサイトメトリー (FACS) で確認できる。すなわち *PIGT*-PNH を従来の *PIGA*-PNH と区別することができる。我々は原因不明の慢性炎症を呈する症例について FACS によるスクリーニングを実施している。

利益相反

筆者は、日本補体学会の委託研究費をいただきました。本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある他の企業はありません。

	PIGA-PNH	PIGT-PNH
原因遺伝子	PIGA	PIGT
突然変異	Somatic mutation	Germline mutation + Somatic mutation
GPI生合成のステップ	最初のステップ	最終ステップ タンパク質付加のステップ
遺伝子座	X染色体	20q
自己免疫性骨髄不全	多くは伴う	伴わない
溶血発作	ある	ある
先行する炎症症状	ない	慢性炎症が長期間先行した後に発症する。

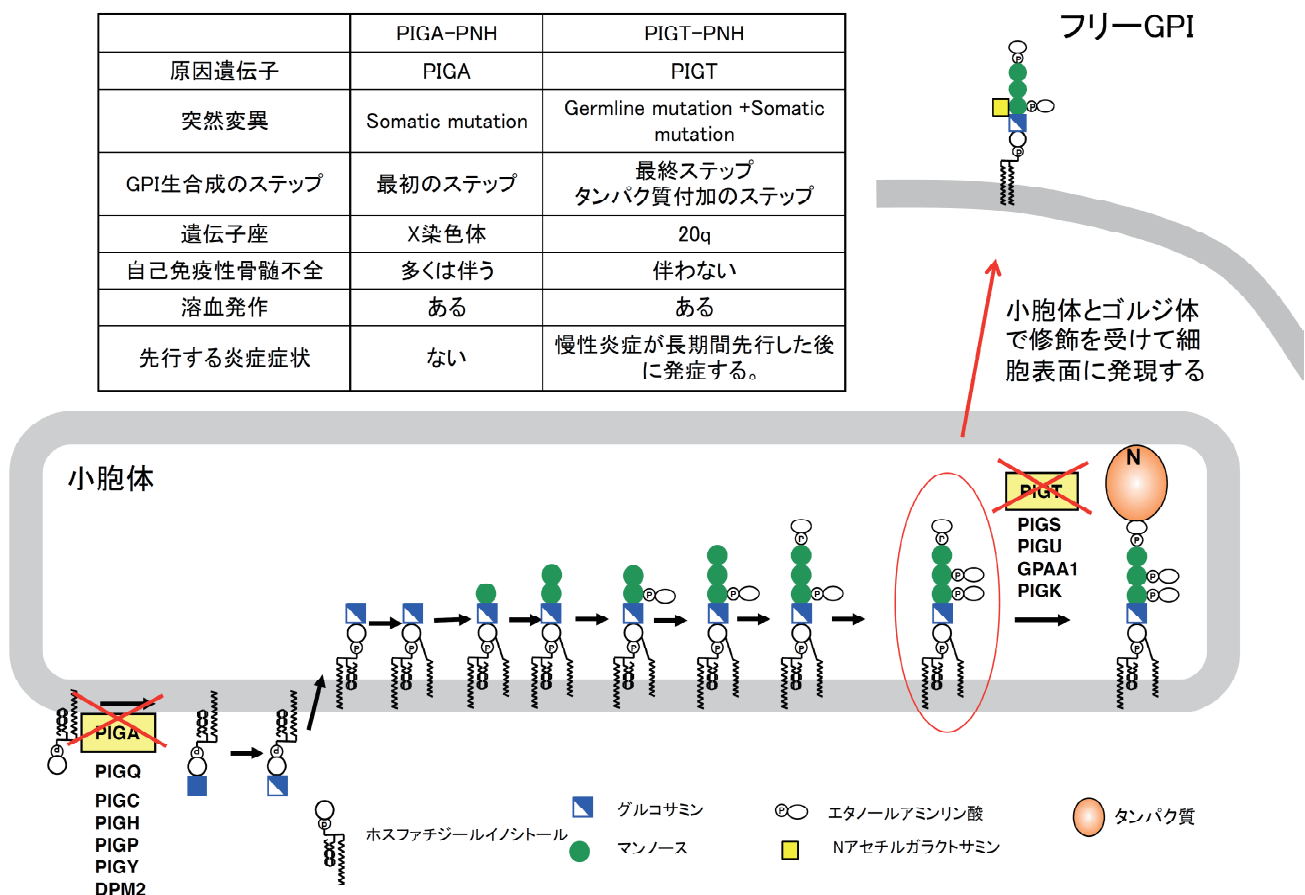


図3 PIGA-PNHとPIGT-PNHの違い

【文献】

- 1) Ham TH and Dingle JH. Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest* 18, 657-672 (1939)
- 2) Ham TH. Studies on destruction of red blood cells I Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - An investigation of the mechanism of hemolysis, with observations on five cases. *Arch Intern Med* 64, 1271-1305 (1939)
- 3) Rosse WF and Dacie JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 45, 736-748 (1966)
- 4) Oni SB, Osunkoya BO and Luzzatto L. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Evidence for Monoclonal Origin of Abnormal Red Cells. *Blood* 36, 145-152 (1970)
- 5) Burge J, Nicholson-Weller A and Austen KF. Isolation of C4-binding protein from guinea

- pig plasma and demonstration of its function as a control protein of the classical complement pathway C3 convertase. *J Immunol* 126, 232-235 (1981)
- 6) Nicholson Weller A, March JP, Rosenfeld SI, et al. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5066-5070 (1983)
 - 7) Medof ME, Gottlieb A, Kinoshita T, et al. Relationship between decay accelerating factor deficiency, diminished acetylcholinesterase activity, and defective terminal complement pathway restriction in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes. *J Clin Invest* 80, 165-174 (1987)
 - 8) Sugita Y, Tobe T, Oda E, et al. Molecular cloning and characterization of MACIF, an inhibitor of membrane channel formation of complement. *J Biochem (Tokyo)* 106, 555-557 (1989)
 - 9) Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, et al. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 84, 7-17 (1989)
 - 10) Okada N, Harada R, Fujita T, et al. A novel membrane glycoprotein capable of inhibiting membrane attack by homologous complement. *Int Immunol* 1, 205-208 (1989)
 - 11) Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, et al. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature* 333, 269-272 (1988)
 - 12) Masterson WJ, Doering TL, Hart GW, et al. A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell* 56, 793-800 (1989)
 - 13) Medof ME, Walter EI, Roberts WL, et al. Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal glycolipid. *Biochemistry* 25, 6740-6747 (1986)
 - 14) Takahashi M, Takeda J, Hirose S, et al. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 177, 517-521 (1993)
 - 15) Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73, 703-711 (1993)
 - 16) Miyata T, Takeda J, Iida Y, et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 259, 1318-1320 (1993)
 - 17) Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 323, 1184-1189 (1990)

- 18) Haliloglu G, Maluenda J, Sayinbatur B, et al. Early-onset chronic axonal neuropathy, strokes, and hemolysis: inherited CD59 deficiency. *Neurology* 84, 1220-1224 (2015)
- 19) Ozen A, Comrie WA, Ardy RC, et al. CD55 Deficiency, Early-Onset Protein-Losing Enteropathy, and Thrombosis. *N Engl J Med* 377, 52-61 (2017)
- 20) Nafa K, Mason PJ, Hillmen P, et al. Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are mainly of the frameshift type. *Blood* 86, 4650-4655 (1995)
- 21) Nishimura J, Inoue N, Wada H, et al. A patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria bearing four independent PIG-A mutant clones. *Blood* 89, 3470-3476 (1997)
- 22) Krawitz PM, Höchsmann B, Murakami Y, et al. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* 122, 1312-1315 (2013)
- 23) Kawamoto M, Murakami Y, Kinoshita T, et al. Recurrent aseptic meningitis with PIGT mutations: a novel pathogenesis of recurrent meningitis successfully treated by eculizumab. *BMJ Case Reports*, in press (2018)
- 24) Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, et al.: PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 105, 3848-3854 (2005)
- 25) Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchor deficient mice: Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87, 3600-3606 (1996)
- 26) Murakami Y, Kinoshita T, Maeda Y, et al. Different roles of glycosylphosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by model mice of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 94, 2963-2970 (1999)
- 27) Schubert J, Vogt HG, Zielinska-Skowronek M, et al. Development of the glycosylphosphatidylinositol-anchoring defect characteristic for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood* 83, 2323-2328 (1994)
- 28) Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, et al. Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 66, 200-205 (2001)
- 29) Murakami Y, Kosaka H, Maeda Y, et al. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 100, 4116-4122 (2002)
- 30) Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 121, 2753-2561 (2013)
- 31) Nagakura S, Ishihara S, Dunn DE, et al. Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural killer cells in vitro. *Blood* 100, 1031-1037 (2002)
- 32) Inoue N, et al. HMG1-C, a candidate protein involved in clonal expansion of PNH cells. *Blood* 98, 221a (2001)

- 33) Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, et al. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 156, 383-387 (2012)
- 34) Shen W, Clemente MJ, Hosono N, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 124, 4529-4538 (2014)
- 35) Hillmen P, Hall C, Marsh JC, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 350, 552-559 (2004)
- 36) Risitano AM, Notaro R, Marando L, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 113, 4094-4100 (2009)
- 37) Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, et al. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med* 370, 632-639 (2014)
- 38) Reher D, Fuhmann V, Kluge S, et al. A rare case of septic shock due to *Neisseria meningitidis* serogroup B infection despite prior vaccination in a young adult with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria receiving eculizumab. *Vaccine* 36, 2507-2509 (2018)
- 39) Roversi P, Lissina O, Johnson S, et al. The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *J Mol Biol* 369, 784-793 (2007)
- 40) Risitano AM, Ricklin D, Huang Y, et al. Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 123, 2094-2101 (2014)
- 41) Yuan X, Gavriilaki E, Thanassi JA, et al. Small-molecule factor D inhibitors selectively block the alternative pathway of complement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Haematologica* 102, 466-475 (2017)
- 42) Schmidt CQ, Harder MJ, Nichols EM, et al. Selectivity of C3-opsonin targeted complement inhibitors: A distinct advantage in the protection of erythrocytes from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. *Immunobiology* 221, 503-511 (2016)
- 43) Hirata T, Mishra SK, Nakamura S, et al. Identification of a Golgi GPI-N-acetylgalactosamine transferase with tandem transmembrane regions in the catalytic domain. *Nat Commun* 9, 405 (2018)
- 44) Lee GH, Fujita M, Takaoka K, et al. A GPI processing phospholipase A2, PGAP6, modulates Nodal signaling in embryos by shedding *CRIPTO*. *J Cell Biol* 215, 705-718 (2016)
- 45) Murakami Y and Kinoshita T. [Inherited GPI deficiencies:a new disease with intellectual disability and epilepsy]. *No To Hattatsu* 47, 5-13 (2015)