

201128052A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

高グリシン血症の **実態** 把握と治療法開発に関する研究

(H22-難治-一般-091)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 呉 繁夫

平成 24 年 (2012年) 3月

目 次

I. 総合研究報告		
高グリシン血症の実態把握と治療法開発に関する研究		
呉 繁夫	-----	5
II. 分担研究報告		
タンデムマスによる高グリシン血症の新生児スクリーニング		
大浦敏博、山口清次、遠藤文夫、花井潤師	-----	15
モデルマウスを用いた高グリシン血症の新しい治療法の開発		
松原洋一、呉 繁夫	-----	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		
	-----	19
VI. 研究成果の刊行物・別刷		
	-----	25

I . 総括研究報告

高グリシン血症の実態把握と治療法開発に関する研究

研究代表者 呉 繁夫 東北大学・大学院医学研究科・教授

研究要旨

高グリシン血症は「グリシン脳症」とも呼ばれる小児神経難病の一つで、筋緊張低下、無呼吸、けいれん、などの重篤な中枢神経症状を呈する。本症は遺伝子変異によりグリシン開裂酵素(GCS)の活性が低下し、血中や髄液中のグリシン濃度が上昇することが特徴である。本症の多くは新生児期に発症し、水頭症や脳梁欠損などの脳形成異常を高率に合併する。現在の課題は、患者数の把握と有効な治療の確立である。患者数把握のため、新生児スクリーニングにおける血中グリシン濃度データを16,431症例（平成23年度分）のを測定し（平成21-23 合計96,822検体）、その濃度分布を明らかにした。また、新しい治療法を見出すためのモデル動物を作成する目的でGCS活性を全く欠くノックアウト・マウス(KO)を作製し、その表現型を解析した。ホモ接合体KOマウスは、脳梁欠損、水頭症、脱脳症のような神経管欠損症を高率に呈した。GCSは葉酸代謝に関与するため、妊娠マウスに葉酸やその代謝物の投与実験を行ったところ、葉酸、ヌクレオチドは無効であったが、代謝産物のひとつであるメチオニンを投与すると脳形成異常の発生が有意に低下することを見出し、本症の治療薬として可能性を示した(Narisawa et al, Hum Mol Genet, 2012 ; 21 : 1496-1503)。

<分担研究者>

遠藤文夫（熊本大学・教授）
山口清次（島根大学・教授）
松原洋一（東北大学・教授）
大浦敏博（東北大学・非常勤講師）

A. 研究目的

高グリシン血症は、筋緊張低下、無呼吸、けいれん、などの重篤な中枢神経症状を特徴とする神経難病で、遺伝子変異によりグリシン開裂酵素(GCS)の活性が低下し、アミノ酸の一つであるグリシンが体液中に蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症の一つである。本症の多くは新生児期に新生児脳症様の症状で発症し、水頭症や脳梁欠損などの

脳形成異常を高率に合併する。現在の課題は、患者数の把握が十分でないことと有効な治療が確立されていない点である。最近申請者らは、非侵襲的酵素診断を可能にする安定同位体 ^{13}C グリシン呼気試験の開発(Kure, Ann Neurol, 2006)を行い、呼気試験を取り入れた本症の新しい診断基準の作成を行なった。一連の研究により、本症の診断技術や遺伝的背景の解明に関しては長足の進歩を遂げた。

本研究では①患者数把握、②新治療の開発、という進展が乏しい二点を目的とする。

①患者数把握

今までの発生頻度はすべて医療機関への受診者数を基にしている。本症では、新生

児期の突然死や、未診断の成人例などが存在するため、医療機関のアンケート調査のみでは、患者数把握は困難と考えられる。そこで、新生児スクリーニングとして最近旧壱国普及しているタンデムマス試験による新生児における血中グリシン濃度の測定を試みた。平成 21-23 年度の 3 年間、解析を実施し、多数の新生児の血中グリシン濃度分布を測定し、その濃度分布を明らかにする。

②新治療の開発

本研究では、発牛工学的手法を用い GCS 遺伝子をノックアウトし、これを新生児型（古典型）高グリシン血症モデル動物として利用することで研究を進めた。以前、GCS 部分欠損マウスを作成し、これを軽症型モデルマウスとして薬物投与実験を行い、NMDA 型グルタミン酸受容体のグリシン結合部位のアンタゴニストが多動などの症状の改善に有効である事を示した実績がある（Kojima-Ishii, *Pediatr Res*, 2008）。頻度の多い新生児型（古典型）はこれまでの研究により、GCS 残存酵素活性がほぼゼロであり、モデル動物の作成には、null mutation の導入が必要と考えられる。今回は、GCS 活性を全く欠くモデルマウスを作成し、その表現型を明らかにし、その表現型を指標として、前臨床試験を行い、有効な薬剤を見出す。特に、GCS は葉酸代謝酵素として機能している事に着目し、葉酸やその代謝産物の有効性を検討する。

B. 研究方法

1) タンデムマス試験による新生児スクリーニングにおける血中グリシン濃度解析に基づく患者数把握

タンデムマス試験による新生児スクリーニングは、北海道地方は札幌市衛生研究

所の花井潤師（研究協力者）、東北地方は東北大学の大浦敏博（研究分担者）、中国四国地方は山口清次（研究分担者）、九週地方は遠藤文夫（研究分担者）が担当する。平成 22~23 年の 3 年間、新生児期の血中グリシン濃度のデータを収集・解析し、グリシン濃度の平均、標準偏差、ヒストグラムを明らかにする。メチルマロン酸血症やプロピオン酸血症といった有機酸代謝血症においても血中グリシン濃度が上昇することが知られている（二次性高グリシン血症）。有機酸血症の除外のため、各症例で、プロピオニル CoA に由来する C3 値、及び C3/C2 比を同時に測定した。

2) 高グリシン血症のモデルマウスの作成と表現型の解析

GCS のノックアウト・マウスは、構成酵素の一つをコードする Amt 遺伝子をエクソン・トラップ法で作成した。機能喪失を検証するために、変異のホモ接合体を作成し、GCS 残存酵素活性を [1-¹⁴C]グリシンを用いた脱炭酸法により測定した。脳、肝臓におけるグリシン含量をホモジェネートの遠心上清をアミノ酸分析機にて測定した。変異ホモ接合体マウスを多数作成し、表現型を解析した。

3) 高グリシン血症モデルマウスの薬物治療に関する前臨床試験

3) で作成したホモ接合体をモデルマウスとして、治療実験を行なった。治療の指標には、このマウスで高率に認められる脳形成異常を用いた。具体的には、産仔の脱脳症の発生頻度を観察する。GCS は補酵素として、テトラヒドロ葉酸を利用し、葉酸の活性化反応を行なっている。今回の治療実験には葉酸やその代謝産物（チミジル酸、

メチオニン) を妊娠マウスへ投与し、産仔における脱脳症の有無を胎生 18 日に検討した。

(倫理面への配慮)

高グリシン血症の遺伝子診断は、東北大学医学部倫理委員会の承認を受けている。診断確定のために遺伝子検査が必要な場合は、書面でインフォームド・コンセントを確認後、検査を実施した。モデルマウスに関する実験は、東北大学医学部動物実験施設にて行い、本研究計画は平成 23 年度の東北大学動物実験委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1) 新生児の血中グリシン濃度分布

現在急速に普及しつつあるタンデムマス試験で血中グリシン濃度を測定可能である点に着目し、平成 21~23 年の 3 年間、新生児の血中グリシン濃度データを計 80,391 名分を収集した。平均グリシン濃度は 387.8 μ M、標準偏差(SD)は 126.7 μ Mであった。新生児 80,391 名分の血中グリシン濃度のヒストグラムを図 1 に示す。血中グリシン濃度は、かなり広範囲に分布し、本症に罹患していなくても 1,000 μ M を超す値を示す新生児が少数ながら存在することが判明した。今回の検索により、平均値の 4 倍以上の高値(+11SD)を示す 4 症例を見出した。これらの症例では C3, C3/C2 は高値を示さず、有機酸血症は否定された。

2) 治療法開発のためのモデル動物作成

GCS 活性を全く欠くノックアウト・マウスを作製した。機能欠失を確認するため、ホモ接合体 KO マウスの GCS 酵素活性を測定し、残存酵素活性が測定感度以下であった。

次に、ヘテロ接合体 KO マウス同士の掛け合わせるによりホモ接合体を産出し、その表現型を解析した。GCS の完全欠損マウスは、血中や脳に多量のグリシンの蓄積を認めた。更に、脳梁欠損、水頭症、脱脳症のような神経管欠損症(NTD)など、種々の脳形成異常が 129sv 系統と C57/B6 系統の雑種において認められた。遺伝的背景を均一にするため、C57/B6 マウスに戻し交配を 10 回行い、コンジェニック・マウスを作成した。このヘテロ接合体 KO マウス同士を交配し、ホモ接合体マウスの観察を行なったところ、脱脳症を 87%に認めた(図 2A と 2B の無処置の項を参照)。脱脳症の程度は様々で、頭蓋の一部のみに認められるものから、顔面~脊椎に及ぶ広範な部位で中枢神経が露出しているもの(脳脊髄破裂)まで存在した。最も高頻度に認められるのは、頭部に限局した脱脳症であった。

3) 治療法開発に関する研究

GCS ノックアウト・マウスは、図 2A で示す様な脳形成異常を高率に呈し、高グリシン血症の症状に似ることが判明し、本症のモデル動物として優れていると考えた。

そこで、この KO マウスを疾患モデルマウスとして利用し、治療法の検索を行なった。具体的には、ホモ接合体 KO マウスに高頻度脱脳症の出現頻度を指標として、治療実験を実施した(図 2B)。投与した薬剤は、GCS は葉酸代謝に関与するため、葉酸やその代謝物(チミジル酸、メチオニン)を試した。妊娠マウスにこの薬剤を投与し、産仔の脱脳症頻度を観察すると、メチオニンを投与した場合に、脱脳症の出現頻度が 87%から 58%へと有意に低下した($p < 0.05$)。葉酸やチミジル酸を投与した場合、脱脳症の出現頻度に有意の低下は認められなかった。

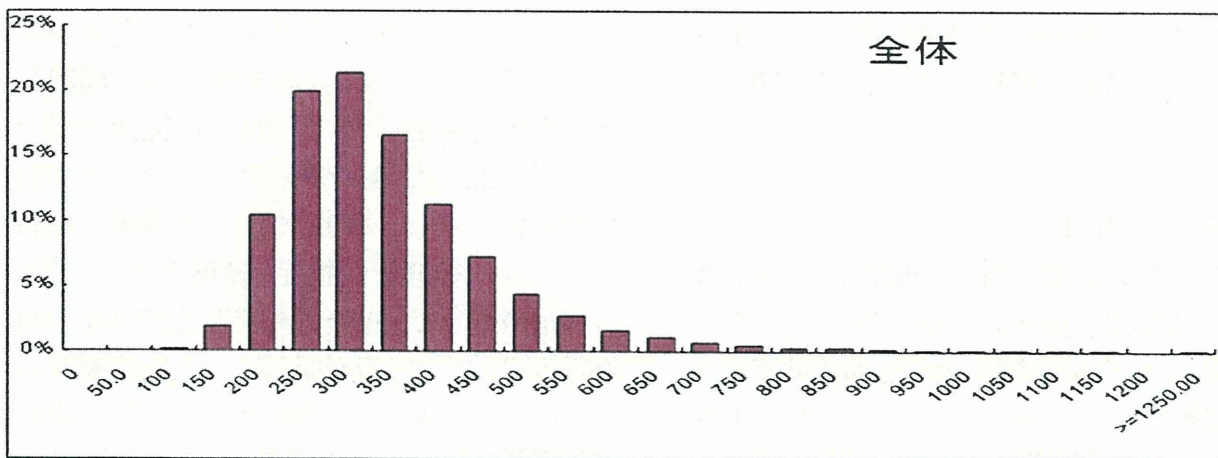


図1 新生児 80,391 名の血中グリシン濃度分布
平均グリシン濃度は 387.8 μ M、標準偏差(SD)は 126.7 μ Mであった。

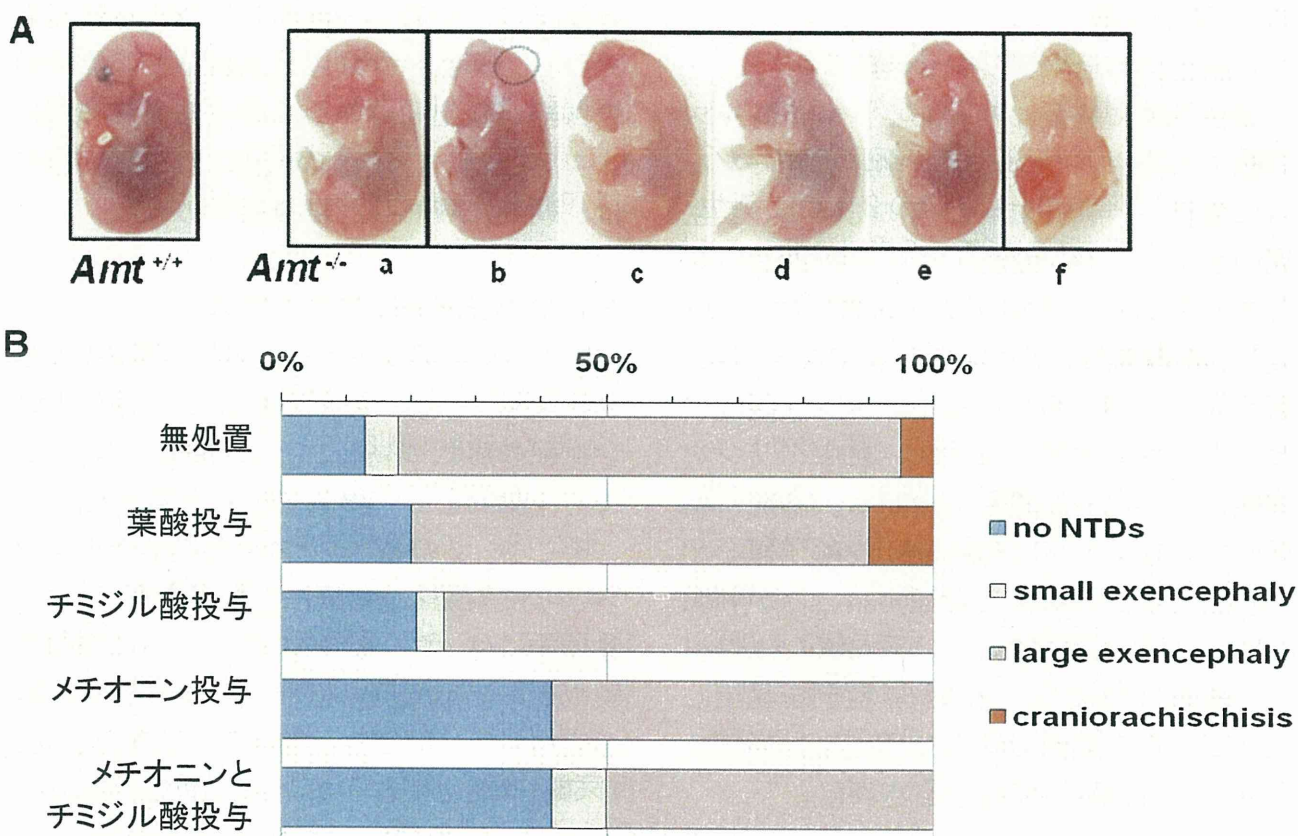


図2 葉酸及びその代謝産物の脳形成異常の発症抑制効果
A. GCS ノックアウト・マウスに認められる神経管欠損症. グリシン解裂酵素のノックアウト・マウスのホモ接合体マウスの 87%は脱脳症などの神経管欠損症を示す。
B. 妊娠マウスを対象とした全臨床試験. メチオニンの投与で神経管欠損症の発症頻度が有意に低下する事が判明した (メチオニン投与群とメチオニンとチミジル酸群参照)。
Narisawa A, Kure S, et al. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. *Hum Mol Genet* (in press)より引用。

D. 考察

新生児 80,391 名分の血中グリシン濃度の分布を解析すると、1,000 μ M 以上の値を示す本症に非罹患の新生児が少数ながら存在するなど非常に広範囲であった。今後、高グリシン濃度を示す個体の調査により本症の真の患者数が判明すると期待される。

GCS ノックアウト・マウスは、新生児発症（古典型）に高率に認められる脳形成異常を示すことから、本症のモデル動物として類似性が高いと考えられる。GCS は葉酸の活性化反応に関与するため、妊娠マウスに葉酸や葉酸代謝産物（メチオニン、チミンなど）の投与実験を行った。その結果、メチオニンを投与するとホモ接合体 KO マウスにおける脱脳症の発生が有意に低下することを見出し、本症治療における有効性が示唆された。

E. 結論

新生児血中グリシン濃度の検索を行いその濃度分布を明らかにし、更にモデルマウスの作成及び薬剤治療実験を行い、候補薬剤を同定した。

F. 研究発表

1. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2012;21:1496-1503

2. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, and Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant in *RNF213* is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology* 2012;78:803-810

3. Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, Ohtake A, Harashima H, Abukawa D, Takeyama J, Haginoya K, Miyabayashi S, Kure S. Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria by novel mutations in the *SUCLG1* gene. *Pediatr Int* 2011;53:921-925.

4. Tsuyusaki Y, Shimbo H, Wada T, Iai M, Tsuji M, Yamashita S, Aida N, Kure S, Osaka H. Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. *Brain Dev* 2011;34:72-75

5. Kure S. Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia) *Brain Dev*. 2011;33;753-7.

6. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies *RNF213* as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2011;56:34-40.

G. 知的財産権の出願、登録状況
該当なし

II. 分担研究報告

「タンデムマスによる高グリシン血症の新生児スクリーニング」

研究分担者	大浦敏博	（東北大学・大学院医学研究科・非常勤講師）
	山口清次	（島根大学。医学部小児科・教授）
	遠藤文夫	（熊本大学・医学部小児科・教授）
研究協力者	花井潤師	（札幌市衛生研究所・部長）

研究要旨

高グリシン血症は、昏睡などの重篤な中枢神経症状を特徴とする小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、グリシンが体液中に蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。本症は主に新生児期に発症する。本症は、常染色体劣性遺伝病である。稀少遺伝病であるため、発症率、治療内容、予後などの実態が不明のままであるそこで、患者数把握のため、タンデムマス試験による血中グリシン濃度データの収集を行っている。平成23年度は、16,431検体分の収集を行った（これまで収集した合計96,822検体）。血中グリシン濃度の分布を分析したところ、血中グリシン濃度の平均値は387.8 μM であり、標準偏差は126.9 μM であった。

A. 研究目的

高グリシン血症は、筋緊張低下、無呼吸、けいれん、などの重篤な中枢神経症状を特徴とし、「グリシン脳症」とも呼ばれる小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、基質であるグリシンが蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。有効な治療法は未確立で、新生児期に発症し、生命予後は悪い。未解決の課題は、出生早期に突然死したり、非典型的な症状を示したりする未診断症例があり、患者実数が不明である点である。今までの発生頻度はすべて医療機関への受診者数を基にしている。本症では、新生児期の突然死や、未診断の成人例などが存在するため、従来の方法では患者数把握は困難である。そこで、パイロット試験が始まっているタンデムマス試験による新生児ス

クリーニングに着目した。タンデムマス試験により、多数の新生児の血中グリシン濃度を測定し、診断の基盤となる血中グリシン濃度の分布を解析する。

B. 研究方法

タンデムマス試験による新生児スクリーニングのパイロット試験は既に幾つかの施設で開始されている。新生児スクリーニングにおけるタンデムマス試験においてグリシン濃度を測定することが可能である。この研究班では、新生児血中グリシン濃度データを収集し、その濃度分布、ヒストグラムを分析した。

C. 結果

平成23年度は、16,431名分収集した。平均グリシン濃度は387.8 μM 、標準偏差(SD)は126.8 μM であった。カットオフ値

を+8SD とすると、0.03%となる。有機酸代謝異常症でも血中グリシン濃度が上昇することが知っている。これらの新生児のC3濃度、およびC3/C2比を解析したところ、いずれの症例もC3値、C3/C2比は正常範囲にあった。C3値、C3/C2比はメチルマロン酸血症やプロピオン酸血症で高値となる。今回これらの値は正常範囲にあったことから、有機酸代謝異常症による二次性高グリシン血症は否定的であった。

D. 考 察

本症では、新生児期の突然死や、未診断の成人例が存在するため、患者数把握は困難が伴う。平成21-22年度で8万人を超える新生児の血中グリシン濃度を既に測定してきた。今年度は、更に16,431検体分のデータ解析した（これまでの合計96,822検体）。過去に経験した新生児期発症例では、する典型例の場合、血中グリシン濃度が正常の3~4倍以上に達している症例が多い。新生児の血中グリシン濃度は $387.8\mu\text{M}$ であるため、その3倍は $1163.4\mu\text{M}$ となる。これらの症例は、C3値やC3/C2比から有機

酸血症は否定的であったため、平均値+8SDを超える症例は高グリシン血症の検索する価値があると考えられる。タンデムマス試験による新生児スクリーニングは急速に普及しており、既存のシステムを利用できる点で費用便益が高い。

E. 結 論

平成23年度は、16,431検体分の新生児の血中グリシン濃度を収集し、新生児期の血中グリシン濃度分布を決定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

該当なし

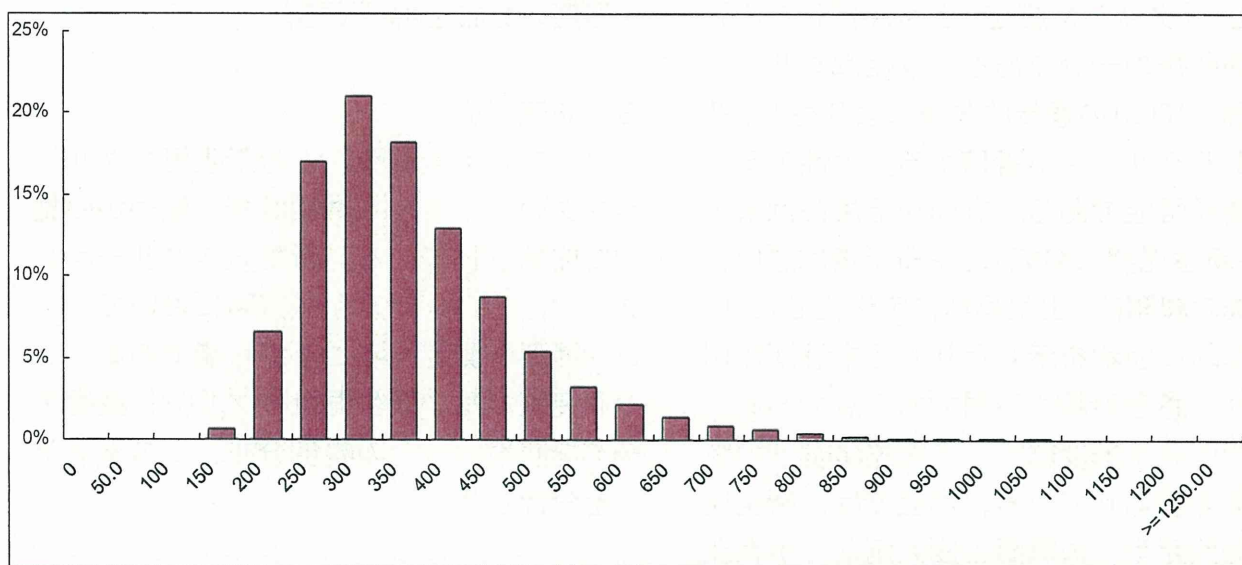


図 平成23年度に分析した16,431検体の新生児血中グリシン濃度のヒストグラム
 平均値は $387.8\mu\text{M}$ 、標準偏差は $126.8\mu\text{M}$ であった。

「モデルマウスを用いた高グリシン血症の新しい治療法開発」

研究分担者 松原洋一 東北大学・大学院医学研究科・教授
研究代表者 呉 繁夫 東北大学・大学院医学研究科・准教授

研究要旨

高グリシン血症は、重篤な中枢神経症状を特徴とする小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、グリシンが体液中に蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。本症は主に新生児期に発症し、有効な治療法は未確立で、生命予後は悪い。本症の特徴の一つは、水頭症、脳梁欠損、小脳低形成などの脳形成異常を高率に合併することである。高グリシン血症の新しい治療法の開発のために平成21年度よりモデル動物を作成し、前臨床試験を行っている。GCS活性を全く欠くノックアウト・マウスを高グリシン血症のモデルマウスとして作製し、その表現型を解析した。脳梁欠損、水頭症、脱脳症のような神経管欠損症(NTD)など、種々の脳形成異常を認めた。GCSは葉酸代謝に関与するため、妊娠マウスに葉酸やその代謝物の投与実験を行い、脱脳症の発生頻度を解析した。妊娠マウスに葉酸代謝産物であるメチオニンを投与すると脳形成異常の発生が有意に低下することを見出した。高グリシン血症の治療における有効性が示唆された。

A. 研究目的

高グリシン血症は、グリシン解裂酵素系(以下GCS)の遺伝的欠損により発症する先天代謝異常症の一つで、基質であるグリシンが体液中に蓄積することを特徴とする。典型例では、生後数日以内に始まる呼吸障害を伴う意識障害、筋緊張低下、けいれん重積など重篤な脳症様症状を呈するため、グリシン脳症とも呼ばれる。これらの中枢神経症状に加え、小頭症や脳梁欠損といった脳形成異常を高率に合併する。申請者らは、以前より本疾患の病態解明に関する研究を行い、原因遺伝子の同定・遺伝子発現・構造・高頻度変異を明らかにしてきた。

脳内に蓄積したグリシンは、NMDA型グルタミン酸受容体のグリシン結合部位からの過剰興奮、及び抑制性グリシン受容体の

過剰刺激を引き起こすと推測される。実際、軽症型モデルマウスに1)のアンタゴニストを投与すると多動などの症状が改善する事を既に見出している(Kojima-Ishii, *Pediatr Res*, 2008)。

昨年度の本研究で、GCSをコードする遺伝子のノックアウトマウスを作製した。このマウスには、小頭症、脳梁欠損、小脳低形成、水頭症といった脳形成異常を高率に合併していた。今年度は、このマウスのさらに詳細な病理学的及び生化学的解析を行った。

B. 研究方法

GCSをコードする遺伝子 *Amt* のノックアウトマウスを作製する。戻し交配によりその遺伝的背景を変化させ、病理学的解析を加える。更に代謝学的解析として、葉酸代

謝関連物質（チミジン、メチオニンなど）を妊娠マウスに腹腔内投与し、胎児の表現型を胎生 18 日に観察する。

C. 結果

Amt KO ホモ接合体マウスは、遺伝的背景により、水頭症、脳梁欠損、神経管欠損症、など種々の脳形成異常を認めた。戻し交配により遺伝的背景を C57BL/6 へ変えると、脱脳症、無脳症、脳脊髄破裂などの神経管欠損症を高率（87%）に認めた。ヘテロ接合体マウスには、野生型マウスと異なる症状は認めなかった。また、妊娠中にメチオニンを投与する事で神経管欠損症の発生が有意に減少した。一方、チミジンを投与した群では、神経管欠損症の発生頻度は野生型における発症頻度と有意差を認めなかった。

D. 考察

GCS はグリシンを分解し、二酸化炭素とアンモニアに分解する。その際に生じた 1 炭素単位 (C_1) を用い、葉酸の活性化反応が起こる。葉酸は、DNA 合成やメチル化に関与し、その代謝は、神経管欠損症の発生に関与していることが知られている。本症モデルマウスは、葉酸代謝酵素の欠損で神経管欠損症が生じた初めての動物モデルであり、高グリシン血症の脳形成異常の発生機序の解明に有用と考えられた。

E. 結論

GCS ノックアウトマウスで観察される脳形成異常には、葉酸代謝異常がその背景に存在する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

- 1 Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier

P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2012;21:1496-1503

- 2 Tsuyusaki Y, Shimbo H, Wada T, Iai M, Tsuji M, Yamashita S, Aida N, Kure S, Osaka H. Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. *Brain Dev* 2011;34:72-75

- 3 Kure S. Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia) *Brain Dev*. 2011;33;753-7.

- 4 Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2011;56:34-40.

- ### H. 知的財産権の出願、登録状況
- 該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuyusaki Y Shimbo H Wada T Iai M Tsuji M Yamashita S Aida N Kure S Osaka H	Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia	Brain Dev	34	72-75	2012
Kikuchi A Arai-Ichinoi N Sakamoto O Matsubara Y Saheki T Kobayashi K Ohura T Kure S	Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13	Mol Genet Metabol	105	553-558	2012
Miyatake S Miyake N Touho H Nishimura-Tadaki A Kondo Y Okada I Tsurusaki Y Doi H Sakai H Saitsu H Shimajima K Yamamoto T Higurashi M Kawahara N Kawauchi H Nagasaka K Okamoto N Mori T Koyano S Kuroiwa Y Taguri M Morita S Matsubara Y Kure S Matsumoto N	Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease	Neurology	78	803-810	2012

Uematsu M Haginoya K Kikuchi A Nakayama T Kakisaka Y Numata Y Kobayashi T Hino-Fukuyo N Fujiwara I <u>Kure S</u>	Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome	J Neurol Sci	315	77-81	2012
Narisawa A Komatsuzaki S Kikuchi A Niihori T Aoki Y Fujiwara K Tanemura M Hata A Suzuki Y Relton CL Grinham J Leung KY Partridge D Robinson A Stone V Gustavsson P Stanier P Copp AJ Greene NDE Tominaga T Matsubara Y <u>Kure S</u>	Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans	Hum Mol Genet	21	1496-1503	2012
Sakamoto O Ohura T Murayama K Ohtake A Harashima H Abukawa D Takeyama J Haginoya K Miyabayashi S <u>Kure S</u>	Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the SUCLG1 gene	Pediatr Int	53	921-925	2011
<u>Kure S</u>	Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycemia)	Brain Dev	33	753-757	2011

<u>Kamada F</u> <u>Aoki Y</u> <u>Narisawa A</u> <u>Abe Y</u> <u>Komatsuzaki S</u> <u>Kikuchi A</u> <u>Kanno J</u> <u>Niihori T</u> <u>Ono M</u> <u>Ishii N</u> <u>Owada Y</u> <u>Fujimura M</u> <u>Mashimo Y</u> <u>Suzuki Y</u> <u>Hata A</u> <u>Tsuchiya S</u> <u>Tominaga T</u> <u>Matsubara Y</u> <u>Kure S</u>	A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene	J Hum Genet	56	34-40	2011
---	--	-------------	----	-------	------

VI. 研究成果の刊行物・別刷

Case report

Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia

Yu Tsuyusaki^a, Hiroko Shimbo^a, Takahito Wada^a, Mizue Iai^a, Megumi Tsuji^a,
Sumimasa Yamashita^a, Noriko Aida^b, Shigeo Kure^c, Hitoshi Osaka^{a,*}

^a Division of Neurology, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

^b Division of Radiology, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

^c Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan

Received 31 July 2010; received in revised form 18 December 2010; accepted 10 January 2011

Abstract

Nonketotic hyperglycinemia (NKH), or glycine encephalopathy, is an autosomal recessive disorder caused by a defect in the glycine cleavage enzyme system. In neonatal-onset NKH, patients manifest lethargy, hypotonia, apnea, and intractable epileptic seizures that are not specific to this disease. We experienced a 6-year-old girl with spastic quadriplegia, intractable epilepsy, and mental retardation, all initially regarded as sequelae of neonatal meningitis. The seizure frequency was transiently increased when valproate was started. Head MRI revealed progressive brain atrophy and white matter loss with high intensity signals on T2-weighted and diffusion-weighted images, which prompted us to conduct further metabolic workups. High glycine levels led us to suspect NKH, and we confirmed this diagnosis by the non-invasive, ¹³C-glycine breath test. DNA sequencing revealed novel Leu885Pro/Trp897Cys mutations in the glycine decarboxylase gene that were transmitted from both parents. Sodium benzoate and dextromethorphan dramatically decreased her hypertonicity. Our case shows that paradoxical increases in seizure frequency following valproate can be a clue for a diagnosis of NKH, and that a correct diagnosis of NKH can greatly alter the quality of life in such patients. © 2011 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nonketotic hyperglycinemia; Glycine decarboxylase; Glycine encephalopathy; Glycine cleavage system

1. Introduction

Nonketotic hyperglycinemia (NKH), or glycine encephalopathy (MIM #605899), is an autosomal recessive disorder of glycine metabolism caused by a defect in the glycine cleavage enzyme system (GCS), a multi-enzyme complex located in the inner mitochondrial membrane of the liver, kidney, brain, and placenta. It consists of four individual protein components: P (a pyr-

idoxal phosphate-dependent glycine decarboxylase encoded by the GLDC gene), H (a lipoic acid-containing hydrogen carrier protein encoded by the GCSH gene), T (a tetrahydrofolate-dependent protein encoded by the AMT gene), and L (a lipoamide dehydrogenase encoded by the DLD gene). NKH results from defects only in the P, H, and T components of GCS that lead to high glycine concentrations in urine, plasma, and especially cerebrospinal fluid (CSF) [1,2]. In neonatal-onset NKH, patients manifest lethargy, hypotonia, apnea, and intractable epileptic seizures resulting in profound psychomotor disability [3]. We report the case of a 6-year-old girl with NKH, who was initially diagnosed with cerebral palsy due to neonatal meningitis, and who showed increased seizures following valproic acid (VPA) treatment.

* Corresponding author. Address: Division of Neurology, Clinical Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center, Mutsukawa 2-138-4, Minami-ku, Yokohama 232-8555, Japan. Tel.: +81 45 711 2351.

E-mail address: hosaka@kcmc.jp (H. Osaka).

2. Patient and methods

2.1. Case history

The patient, now a 6-year-old girl, was born to a healthy mother at 37 weeks of gestation with a birth weight of 3020 g. There is no family history of metabolic disease. The patient was not “doing-well” and showed hypotonia and difficulty in sucking after birth. During the neonatal period, she exhibited frequent seizures resulting in shock and disseminated intravascular coagulation that required mechanical ventilation. As leukocytes counts in the CSF were elevated and serum PCR was positive for type 4 echo-virus-related viruses, she was diagnosed with aseptic meningitis. A brain CT scan at the age of 14 days revealed no abnormalities, including in white matter, or brain destruction. She exhibited repeated generalized seizures and her EEG showed hypsarrhythmia at 1 month. Neither phenobarbital nor Vitamin B6 was effective and she was referred to our hospital for the control of seizures at 5 months. Her head circumference was 42.8 cm (1.57 SD above the mean) and CT revealed enlarged ventricles that were slightly reduced by a ventriculoperitoneal shunt. She was treated with VPA (30 mg/kg, for 2 weeks), after which she experienced fever, rash, and increased frequency of seizures. VPA was discontinued due to what we considered hypersensitivity although the drug lymphocyte stimulation test was negative. Her seizures were not controlled by zonisamide, carbamazepine, or topiramate. When VPA was restarted, the frequency of seizures again increased and the treatment was discontinued. From the age of four, her severe spasticity worsened and diazepam, eperisone, dantrolene, and baclofen were all ineffective; she was re-admitted for the control of hypertonicity and seizures. She could not smile, roll over, or control her head. Her posture was opisthotonic and she could not lie in a supine position. She had severe rigidity and spasticity of the

extremities, brisk deep tendon reflexes, a positive Babinski sign, and ankle clonus.

In search of the cause of her apparent regression, we re-evaluated her brain CT/MRI. CT revealed severely dilated ventricles and diffuse brain atrophy with dominantly affected white matter and relatively spared basal nuclei (Fig. 1A). This finding was compatible with post-meningitis hydrocephalus and brain atrophy. Brain MRI revealed progressive brain atrophy and white matter loss with a T2 prolongation of white matter (Fig. 1B). Surprisingly, on the diffusion-weighted image, there was a high intensity signal in the white matter (Fig. 1C).

2.2. Enzymatic analysis

GCS activity was investigated by the ^{13}C -glycine breath test as described previously [4]. Briefly, 10 mg/kg of ^{13}C -glycine was administered through a gastric tube. Breath samples were collected using a face mask equipped with a one-way air valve, and then transferred to a sampling bag. The $^{13}\text{CO}_2$ concentrations of the breath samples were measured as described [4].

2.3. RNA, genomic DNA extraction, RT-PCR, and sequencing

Total RNA was extracted from leukocytes using Trizol reagent and subjected to reverse transcription with PrimeScript reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) using oligo(dT) primers. RT-PCR was performed using primers that covered the translated region of *GLDC* mRNA (Table 1) and the Ex Taq PCR version 1.0 kit (Takara, Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions (Table 1). Genomic DNA was prepared from white blood cells using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI). PCR of exons 1, 22, and 23 of the *GLDC* gene were performed with specific

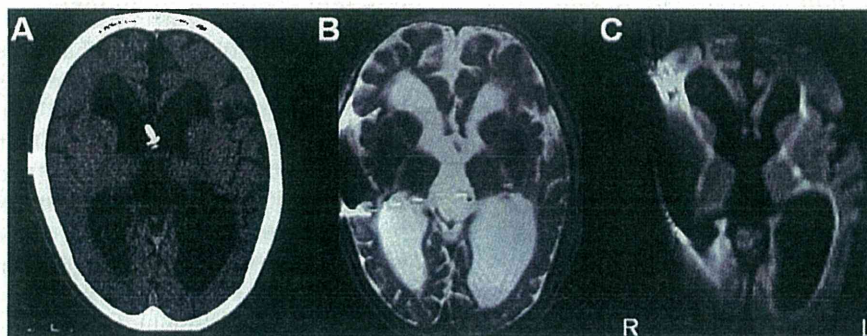


Fig. 1. (A) Brain CT showing severely dilated ventricles and diffuse brain atrophy with dominantly affected white matter and relatively spared basal nuclei, compatible with post-meningitis hydrocephalus and brain atrophy. A ventriculoperitoneal shunt tube was placed in the left lateral ventricle. (B) T2-weighted MRI also showing diffuse brain atrophy with dominantly affected white matter. The T2 prolongation and volume loss of white matter suggested white matter injury. (C) MRI diffusion-weighted image showing a high intensity signal in white matter, suggesting white matter degeneration. Please note that the ventriculoperitoneal shunt valve causes the defects and flaring of images.