

- al., Intrathecal overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in febrile infection related refractory status epilepticus, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, in press.
23. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Influence of uridine diphosphate glucuronosyltransferase inducers and inhibitors on the plasma lamotrigine concentration in pediatric patients with refractory epilepsy, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, in press.
  24. Masaki Yoshimura, Yukitoshi Takahashi, et al., An analysis of epileptic negative myoclonus by magnetoencephalography, *Epilepsy Research*, in press.
  25. Norimichi Higurashi, Yukitoshi Takahashi, et al., Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy, *Seizure*, in press.
  26. Matsumoto R, Takahashi Y, et al., Possible induction of multiple seizure foci due to parietal tumour and anti-NMDAR antibody. *Epileptic Disord.* 2015 Feb 3, in press.
  27. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, et al., Pathogenic role of human herpesvirus 6B infection in mesial temporal lobe epilepsy, *Journal of infectious disease*, in press.
  28. 高橋幸利、東本和紀、てんかん、編集、山崎麻美、坂本博昭、小児脳神経外科学（改訂2版）、金芳堂、p、印刷中。
  29. 高橋幸利、渡辺陽和、2脳炎-1総論、編集：兼本浩祐、他、「臨床てんかん学」、医学書院、p、印刷中。
  30. 高橋幸利、大星大観、2脳炎-2免疫介在性脳炎（小児）、編集：兼本浩祐、他、「臨床てんかん学」、医学書院、p、印刷中。
  31. 高橋幸利、西田拓司、山口解冬、自己免疫性脳炎、編集：辻省次、吉良潤一、アクチュアル脳・神経疾患の臨床、免疫性神経疾患 病態と治療のすべて、中山書店、印刷中。
  32. 高橋幸利、山口解冬、難治性てんかんの病態を探る-脳炎後てんかんと免疫、脳と発達、2014；46：195-201。
  33. 高橋幸利、他、てんかん-基礎・臨床研究の最新知識-III-10. 抗てんかん薬の副作用、*日本臨床*、2014；72：908-919。
  34. 神里尚美、高橋幸利、他、両手指の麻痺性拘縮を呈した抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎の一例、*沖縄県立南部医療センター・こども医療センター雑誌*、2014；7：13-17。
  35. 戸島 麻耶、高橋幸利、他、急性無菌性髄膜脳炎の経過中に局所性皮質反射性ミオクローヌスを呈し抗グルタミン酸受容体抗体が検出された2例、*臨床神経学*、2014；54：543-549。
  36. 高橋幸利、他、抗てんかん薬の薬物動態・薬剤相互作用、*小児内科*、2014；46：1238-1241。
  37. 横山桃子、高橋幸利、他、水痘に続発して起こった非ヘルペス性辺縁系脳炎の4歳女児例、*小児科臨床*、2014；67(9)：1481-1486。
  38. 高橋幸利、他、免疫介在性神経疾患、*小児感染免疫*、2014；26：403-414。
  39. 関谷芳明、高橋幸利、他、甲状腺クリーゼに抗 NMDA 受容体脳炎を併発した1例、*日本集中治療医学会雑誌*、2014；21：659-660。
  40. 許全利、高橋幸利、他、高齢男性に発症した抗 NMDA 受容体脳炎の症例、*老年精神医学雑誌*、2014；25(10)：1153-1159。
  41. 真野ちひろ、高橋幸利、他、subclinical seizure が観察された非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の1症例、*小児科臨床*、2014；67：2153-2158。
  42. 長濱明日香、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の症状を呈した橋本脳症の1小児例、*小児科臨床* 2014；67(11)：2145-2151。
  43. 高橋幸利、他、小児の慢性進行性持続性部分てんかん・非進行性持続性部分てんかん：Rasmussen 症候群を主体に、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、2014；31：41-46。
  44. 高橋幸利、他、神経疾患と NMDA 型グルタミン酸受容体抗体、*日本小児科学会誌*、2014；118(12)：1695-1707。
  45. 高橋幸利、他、新しい抗てんかん薬の適応と使い方、*小児科診療*、2015；78：207-214。
  46. 朱膳寺圭子、高橋幸利、他、前頭葉に病変が及んだ非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の1例、*東京女子医科大学雑誌*、2014；84(s1)：197-203。
  47. 保坂孝史、高橋幸利、他、先行感染後に opsoclonus-myoclonus syndrome を認め、髄液中の抗 GluR  $\delta$  2 抗体と GluR  $\epsilon$  2 抗体が陽性であった1例、*運動障害*、2014；24(1)：1-6。
  48. 出口健太郎、高橋幸利、他、卵巣奇形腫摘出術後に痙攣重積状態をきたした抗 NMDA 受容体脳炎の1例、*ICUとCCU*、2014；38(9)：648-651。
  49. 宮城哲哉、高橋幸利、他、失語発作を主症状とする成人型ラスムッセン症候群の一例、*てんかん研究*、2015；32：556-563。
  50. 西口 亮、高橋幸利、他、両側耳介軟骨炎に抗グルタミン酸受容体 (GluR  $\epsilon$  2) 抗体陽性の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎を合併した1例、*臨床神経学*、印刷中。
  51. 高橋幸利、他、自己免疫性脳炎、*Medical Practice*、印刷中。
  52. 上野弘恵、高橋幸利、他、めまいで発症し亜急性に四肢の筋力低下・歩行障害が進行した橋本脳症の1男児例、*脳と発達*、印刷中。
  53. 高橋幸利、他、増刊号：免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見- Rasmussen 症

候群（脳炎）、日本臨床、印刷中。

## 2. 学会発表

1. 高橋幸利、難治てんかんの病態・治療 - 脳炎後てんかんとスパズム-、Shizuoka-Kumamoto collaboration meeting of epilepsy towards better community healthcare 第1回勉強会、2014年4月25日、熊本。
2. 高橋幸利、他、シンポジウム3 脳炎後てんかんの病態・治療を探る、免疫病態、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
3. 高橋幸利、薬事委員会主催セミナー、Rasmussen 症候群に対するタクロリムスの有効性、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
4. Yukitoshi Takahashi, Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome: Immunopathogenesis, The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society, Oct 1st-3rd 2014, Tokyo.
5. 高橋幸利、他、シンポジウム5 VGKC 複合体等に関連する免疫介在性亜急性脳炎とてんかん：VGKC 複合体抗体陽性例のNMDA型GluR抗体の意義、第48回日本てんかん学会学術集会、2014年10月2-3日、東京。
6. 高橋幸利、NMDA型GluR抗体の機能解明 in vitro & in vivo、第44回日本臨床神経生理学会学術大会 教育講演、2014年11月19-21日、福岡。
7. 高橋幸利、他、HPVワクチン後に中枢神経症状が出現した症例のステロイドパルス治療、ワークショップ「Human Papillomavirus (HPV) ワクチン関連神経免疫異常症候群 (HANS: ハンス症候群)」、第29回日本臨床リウマチ学会、2014年11月30日、福岡。
8. 高橋幸利、脳炎と脳炎後てんかんの病態・治療、第9回日本てんかん学会中国・四国地方会、2015年2月7日、徳島。
9. 高橋幸利、NMDA型GluR免疫と疾患、第49回慶應ニューロサイエンス研究会、2015年2月21日、東京。
10. 小池大輔、高橋幸利、他、早期の治療介入により良好な経過をたどったインフルエンザワクチン後非ヘルペス性辺縁系脳炎の1例、第93回山陰小児科学会、2014年4月6日。
11. 村田強志、高橋幸利、他、特異な橋病変を呈した自己免疫関連性脳炎の一例、日本内科学会総会、2014年4月11-13日、東京。
12. 高橋幸利、他、NMDAR抗体陽性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の早期診断：先行症状期血液検査値の検討、第117回日本小児科学会学術集会、2014年4月11-13日、名古屋。
13. 藤田貴子、高橋幸利、他、当院における突発性発疹症の神経合併症、第117回日本小児科学会学術集会、2014年4月11-13日、名古屋。
14. 河村吉紀、高橋幸利、他、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス6Bの役割、第117回日本小児科学会学術集会、2014年4月11-13日、名古屋。
15. 大久保真理子、高橋幸利、他、両側性のEpilepticus Partialis Continuaを呈した1例、第64回多摩小児神経懇話会、2014年4月19日、八王子。
16. 山田舞乃、高橋幸利、他、当院での自己免疫性脳炎の経過 抗NMDA受容体脳炎は再発に注意が必要である、第55回日本神経学会学術大会、2014年5月22-24日、福岡。
17. 上野弘恵、高橋幸利、他、橋本脳症の1男児例-小児における橋本脳症の臨床像の検討-、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
18. 鳥巢浩幸、高橋幸利、他、小児多発性硬化症における治療抵抗性の検討、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
19. 中野祐子、高橋幸利、大脳皮質に限局した病変を示した自己免疫性辺縁系脳炎の1例、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
20. 西倉紀子、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎7例の臨床的検討、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
21. 森山剣光、高橋幸利、他、RSウイルス感染関連NMDA受容体抗体陽性辺縁系脳炎の1例、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
22. 渡辺陽和、高橋幸利、他、Rasmussen症候群のステロイドパルス療法の検討、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
23. 佐久間啓、高橋幸利、他、難治頻回部分発作重積型急性脳炎の髄液中におけるインターフェロン誘導性ケモカインの増加、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
24. 平澤絢香、高橋幸利、他、WISC-IVで処理速度低下を示した軽症抗NMDA受容体脳炎の一例、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
25. 山口解冬、高橋幸利、他、シンポジウム3 脳炎後てんかんの病態・治療を探る、脳炎脳症後てんかんの慢性期におけるステロイドパルス治療の経験、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
26. 谷口祐子、高橋幸利、他、限局性の脳皮質病変を示した自己免疫性辺縁系脳炎の1例、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
27. 藤井裕士、小林良行、石川暢恒、高橋幸利、グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体が陽性であったLate onset Lennox-Gastaut 症候群の14歳女児例、第56回日本小児神経学会、2014年5月29-31日、浜松。
28. 庄司圭祐、高橋幸利、他、関節リウマチの免疫療法中に発症した抗グルタミン酸受容体抗体陽性の互急性白質脳症の一例、

- 第 204 回日本内科学会近畿地方会、2014 年 6 月 14 日、大阪。
29. 杉本精一郎、高橋幸利、他、うつ症状を呈した辺縁系脳炎の一症例、第 206 回日本神経学会九州地方会、2014 年 6 月 28 日、宮崎。
  30. 小野田 統、高橋幸利、他、単純ヘルペス脳炎に続発した抗 NMDA 受容体脳炎の 1 例、第 139 回日本神経学会東海北陸地方会、2014 年 7 月 5 日、名古屋。
  31. 元木崇裕、高橋幸利、他、免疫グロブリン治療が奏功した抗グルタミン酸受容体抗体陽性のてんかん性脳症の 1 例、第 8 回日本てんかん学会関東・甲信越地方会、2014 年 7 月 11 日。
  32. 浅田昌照、高橋幸利、他、抗 NMDA 受容体脳炎による意識障害を呈し診断に難渋した一例、近畿精神医学会、2014 年 7 月 26 日。
  33. 高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の病態解明：NMDAR 型 GluR 抗体の passive transfer 研究、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
  34. 高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の病態解明：正常対照の GluR 抗体と年齢、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
  35. 高橋幸利、他、HPV ワクチン後に中枢神経症状が出現した症例の検討：髄液の自己免疫学的検討、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
  36. 武久康、高橋幸利、他、NMDA 受容体脳炎の治療とその効果に対する検討、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
  37. 河村吉紀、高橋幸利、他、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 19 回日本神経感染症学会総会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
  38. 先浜大、高橋幸利、他、伝染性単核球症に続発した自己免疫介在性脳炎の 1 例、日本内科学会 第 205 回近畿地方会、2014 年 9 月 20 日、大阪。
  39. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, 他、Pathogenic role of human herpes virus 6B in mesial temporal sclerosis, 第 48 回日本てんかん学会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
  40. 福岡正隆、高橋幸利、他、左右大脳半球に再発性病変を呈し Rasmussen 脳炎が疑われた 1 例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
  41. Kazumi Matsuda, Yukitoshi Takahashi, 他、Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome : Update of Rasmussen syndrome : Neuroimaging and histopathology of Rasmussen syndrome, The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society, Oct 1st-3rd 2014, Tokyo.
  42. 宇田川紀子、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎後に難治てんかんを残した 1 男児例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
  43. 阿部圭市、高橋幸利、他、発作型、焦点、画像上の変化を認めた慢性肉芽腫性脳炎による難治性てんかんに対し側頭葉切除を行った一例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
  44. 東本和紀、高橋幸利、他、髄液中リンパ球表面マーカーの検討：疾病対照の年齢経過、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
  45. 山本達也、高橋幸利、他、リツキシマブによる治療を行ったオプソクロオノス・ミオクロオノス症候群の 1 例、第 20 回日本小児神経学会東北地方会、2014 年 10 月 18 日、盛岡。
  46. 池田光憲、高橋幸利、他、当センターで経験した非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (NHAE) 9 例の臨床的検討、日本救急医学会総会、2014 年 10 月 28 日。
  47. 村上丈伸、高橋幸利、他、特異な橋病変を呈した抗 NMDA 受容体抗体陽性脳炎の一例、臨床神経生理学、2014 年 11 月 19-21 日、福岡。
  48. 武久康、高橋幸利、他、NMDA 受容体脳炎における脳血流量 SPECT、第 26 回日本脳循環代謝学会、2014 年 11 月 21-22 日、岡山。
  49. 布施ひと美、高橋幸利、他、抗てんかん薬により認知機能が改善した抗 NMDA 受容体抗体陽性の側頭葉てんかん、第 27 回日本総合病院精神医学会、2014 年 11 月 28 日、つくば。
  50. 眞山英徳、高橋幸利、NMDA 型 GluR 抗体が検出された髄膜脳炎発症の混合性結合組織病の 1 例、神経学会関東地方会、2014 年 11 月 29 日、東京。
  51. 井上沙織、高橋幸利、他、抗 NR2 抗体陽性辺縁系脳炎に対するシクロフォスファミド大量静注療法が有効であったがループス腎炎が再燃した小児期発症 SLE の一例、日本リウマチ学会関東支部学術集会、2014 年 12 月 14 日、横浜。
  52. 伊藤弘道、高橋幸利、他、VNS により発作頻度、認知行動面に改善が認められた AERRPS の 1 例、第 9 回日本てんかん学会中国・四国地方会、2015 年 2 月 7 日、徳島。
  53. 関口由利子、高橋幸利、他、抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体陽性であった、非ヘルペス性急性脳炎の 1 女児例、第 32 回日本小児科学会神奈川県地方会、2015 年 2 月 21 日、横浜。
  54. 永迫友規、高橋幸利、他、口唇のけいれんで始まり、失調性構音障害、失読失書・失名辞を呈した抗グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎、第 212 回神経学会地方会、2015 年 3 月 14 日、東京。
3. 書籍の刊行  
該当なし。

幸利⇒特願 2014-221632、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 2014年8月29日、NMDA型グルタミン酸受容体抗体による不安モデルマウスの開発、発明者：高橋幸利⇒特願 2014-174749、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。
- 2014年10月30日、プライマーセット及び免疫介在性てんかんの診断方法、発明者：高橋

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

### Ⅲ 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「先天性GPI欠損症の診療ガイドラインの整備と病態解析及び治療法の開発」

機関名 大阪大学 微生物病研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Endosome-to-TGN retrograde transport mediated by GARP affects post-Golgi anterograde transport and glycosylation (口頭)	Tetsuya Hirata, Morihisa Fujita, Shota Nakamura, Yoshiko Murakami, Yusuke Mada, Taroh Kinoshita	大阪市立大学 学術情報総合センター (第15回関西グライコサイエンスフォーラム)	2014年5月24日	国内
GPIアンカー型タンパク質の構造異常を原因とする先天性GPI欠損症…PGAP1欠損症とPGAP3欠損症…(口頭)	村上良子、木下タロウ	アクトシティー浜松 第56回日本小児神経学会 学術集会	2014年5月29日	国内
GPI anchor deficiency is associated with West syndrome. (ポスター)	Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y.	Turkey 16th Annual Meeting of Infatle Seizure Society	2014. 6. 23-25	国外
GPIアンカー欠損症研究の進展 (口頭)	木下タロウ、村上良子	名古屋大学 第33回 日本糖質学会年会	2014年8月11日	国内
GARP複合体を介したTGNへの逆行輸送はゴルジ体以降の順行輸送や糖鎖修飾に必要である (口頭)	平田哲也、藤田盛久、後藤和義、元岡大祐、中村昇太、村上良子、前田裕輔、木下タロウ	名古屋大学 第33回 日本糖質学会年会	2014年8月11日	国内
先天性PIGA欠損症(口頭)	村上良子 井上徳光 加藤光広、木下タロウ	神戸 第51回補体シンポジウム	2014年8月22日	国内
GPIアンカー型蛋白質の細胞膜遊離に関わるGPI切断酵素PGAP6 (口頭+ポスター)	ゴンヒリ、藤田盛久、村上良子、神澤範行、前田裕輔、木下タロウ	国立京都国際会館 第87回日本生化学会大会	2014年10月16日	国内
GARP複合体を介したTGNへの逆行輸送はゴルジ体以降の順行輸送や糖鎖修飾に必要である (口頭+ポスター)	平田哲也、藤田盛久、後藤和義、元岡大祐、中村昇太、村上良子、前田裕輔、木下タロウ	国立京都国際会館 第87回日本生化学会大会	2014年10月17日	国内
GPIアンカー型蛋白質構造異常を原因とする先天性GPI欠損症・PGAP1欠損症とPGAP3欠損症 (口頭+ポスター)	村上良子、栗屋智就、前田裕輔、木下タロウ	国立京都国際会館 第87回日本生化学会大会	2014年10月18日	国内

Inherited GPI anchor deficiency: biochemical, molecular, and clinical presentation of a patient with PIGW mutations. (ポスター)	Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y.	San Diego, California, USA The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics,	2014. 10. 18-22	国外
Endosomes-to-TGN retrograde transport mediated by GARP is required for post-Golgi anterograde transport and glycosylation (口頭+ポスター)	Tetsuya Hirata, Morihisa Fujita, Shota Nakamura, Kazuyoshi Gotoh, Daisuke Motooka, Yoshiko Murakami, Yusuke Maeda, Taroh Kinoshita,	Hawaii SFG & JSCR JOINT MEETING ---Satellite Symposium IV -New Vistas in Glycoscience; Challenges for Junior Scientists”	2014/11/16	国外
疾患特異的ヒトiPS細胞をもちいたダウン症候群の病態解析 (口頭)	北島 康司、坂野公彦、大森 早也佳、平田 克弥、那波 伸敏、和田和子、荒堀 仁美、谷口 英俊、大藪 恵一	名古屋 第37回日本小児遺伝学会 学術集会	2014年4月10日	国内
ダウン症候群における病態発症メカニズムの解明(口頭)	北島 康司、坂野公彦、平田 克弥、大森 早也佳、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、大藪 恵一	名古屋 第117回日本小児科学会 学術集会	2014年4月11日	国内
眼球運動異常、小脳萎縮を認めた先天性GPI欠損症(PIGN遺伝子異常症)の同胞例(口頭)	谷河純平、鈴木保宏、岡本信彦、才津浩智、村上良子、岡村隆行、池田妙、最上友紀子、柳原恵子、青天目信、下野九理子、木下タロウ、大藪 恵一	浜松 第56回日本小児神経学会 学術集会	2014年5月29-31日	国内
いまさら聞けないiPS細胞 なにができてなにが問題なのか - ダウン症候群研究をひとつの例として - (教育講演)	北島 康司	大阪 第38回日本遺伝カウンセリング学会学術集会	2014年6月28日	国内
Targeted genome editing-mediated cellular disease models reveal cooperative interaction of 21 trisomy and GATA1 on hematopoiesis (口頭)	北島 康司	広島 第4回ゲノム編集研究会	2014年10月6日	国内

Analysis of transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome using gene editing technologies	北島 康司、坂野公彦、大森 早也佳、平田 克弥、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、橋井 佳子、大高 真奈美、中西 真人、佐久間 哲史、山本 卓、大藪 恵一	大阪 第76回日本血液学会学術集会	2014年10月31日	国内
難治てんかんの病態・治療・ 脳炎後てんかんとスパズム (口頭)	高橋幸利	熊本 Shizuoka-Kumamoto collaboration meeting of epilepsy towards better community healthcare第 1回勉強会	2014年4月25日	国内
脳炎後てんかんの病態・治療を 探る、免疫病態	高橋幸利、他	浜松 第56回日本小児神経学会	2014年5月29-31日	国内
Rasmussen 症候群に対するタ クロリムスの有効性	高橋幸利	浜松 第56回日本小児神経学会	2014年5月29-31日	国内
Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome : Immunopathogenesis	Yukitoshi Takahashi	Tokyo The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society	2014年10月1-3日	国内
VGKC複合体等に関連する免疫 介在性亜急性脳炎とてんかん: VGKC複合体抗体陽性例の NMDA型GluR抗体の意義	高橋幸利、他	東京 第48回日本てんかん学会 学術集会	2014年10月2-3日	国内
NMDA型GluR抗体の機能解明 in vitro & in vivo (教育講演)	高橋幸利	福岡 第44 回日本臨床神経生理 学会学術大会	2014年11月19-21 日	国内
HPVワクチン後に中枢神経症状 が出現した症例のステロイドパ ルス治療、ワークショップ 「Human Papillomavirus (HPV) ワクチン関連神経免疫 異常症候群 (HANS: ハンス症 候群)」	高橋幸利、他	福岡 第29回日本臨床リウマチ 学会	2014年11月30日	国内
脳炎と脳炎後てんかんの病態・ 治療	高橋幸利	徳島 第9回日本てんかん学会 中国・四国地方会	2015年2月7日	国内
NMDA型GluR免疫と疾患	高橋幸利	東京 第49回慶應ニューロサイ エンス研究会	2015年2月21日	国内
NMDAR抗体陽性非ヘルペス性 急性辺縁系脳炎の早期診断: 先 行症状期血液検査値の検討	高橋幸利、他	名古屋 第117回日本小児科学会 学術集会	2014年4月11-13日	国内
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の 病態解明: NMDAR型GluR抗 体のpassive transfer研究	高橋幸利、他	金沢 第19回日本神経感染症学 会総会・第26回日本神経 免疫学会	2014年9月4-6日	国内
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の 病態解明: 正常対照のGluR抗 体と年齢	高橋幸利、他	金沢 第19回日本神経感染症学 会総会・第26回日本神経 免疫学会	2014年9月4-6日	国内

HPVワクチン後に中枢神経症状が出現した症例の検討：髄液の自己免疫学的検討	高橋幸利、他	金沢 第19回日本神経感染症学会総会・第26回日本神経免疫学会	2014年9月4-6日	国内
---------------------------------------	--------	------------------------------------	-------------	----

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy.	Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saito	<i>Neurogenetics.</i> 15(2)85-92	2014 May	国外
Whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis.	Martin, H. C., G. Kim, A. T. Pagnamenta, Y. Murakami, G. Carvill, E. Meyer, R. Copley, A. Rimmer, G. Barcia, M. Fleming, J. Kronengold, M. R. Brown, K. A. Hudspith, J. Broxholme, A. Kanapin, J. B. Cazier, T. Kinoshita, R. Nabbout, The WGS600 Consortium, D. Bentley, G. McVean, S. Heavin, Z. Zaiwalla, T. McShane, H. Mefford, D. Shears, H. Stewart, M. A. Kurian, I. E. Scheffer, E. Blair, P. Donnelly, L. K. Kaczmarek and J. Taylor. Clinical	<i>Hum. Mol. Genet.,</i> 23,3200-3211	2014 Jun	国外

<p><i>PIGA</i> mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features.</p>	<p>Kato, M<sup>1</sup>, H. Saitsu<sup>1</sup>, Y. Murakami<sup>1</sup>, K. Kikuchi, S. Watanabe, M. Iai, K. Miya, R. Matsuura, R. Takayama, C. Ohba, M. Nakashima, Y. Tsurusaki, N. Miyake, S. Hamano, H. Osaka, K. Hayasaka, T. Kinoshita and N. Matsumoto.</p>	<p><i>Neurology</i>,82,1587-1596</p>	<p>2014 May</p>	<p>国外</p>
<p>Null mutation in <i>PGAP1</i> impairs GPI-anchor maturation and causes severe non-syndromic recessive intellectual disability.</p>	<p>Murakami, Y., H. Tawamie, Y. Maeda, C. Buttner, R. Buchert, F. Radwan, S. Schaffer, H. Sticht, M. Aigner, A. Reis, T. Kinoshita and R. A. Jamra.</p>	<p><i>PLoS Genet.</i>10(5),e1004320.</p>	<p>2014 May</p>	<p>国外</p>
<p>Novel compound heterozygous <i>PIGT</i> mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3.</p>	<p>Nakashima, M., H. Kashii, Y. Murakami, M. Kato, Y. Tsurusaki, N. Miyake, M. Kubota, T. Kinoshita, H. Saitsu, N. Matsumoto.</p>	<p><i>Neurogenet.</i> 15,193-200</p>	<p>2014 Aug</p>	<p>国外</p>
<p>Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with copy number-neutral 6pLOH in GPI (+) but not in GPI (-) granulocytes.</p>	<p>Ueda, Y., J. Nishimura, Y. Murakami, S, Kajigaya, T. Kinoshita, Y. Kanakura and N. S. Young.</p>	<p><i>Eur. J. Haematol.</i>,92:450-453,DOI: 10.1111/ejh.12253</p>	<p>2014 May</p>	<p>国外</p>
<p>New insights to the functions of PIGF, a protein involved in the ethanolamine phosphate transfer steps of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis.</p>	<p>Stokes, M., Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita and Y. S. Morita.</p>	<p><i>Biochem. J.</i>,463(2)249-256</p>	<p>2014 Oct</p>	<p>国外</p>

Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome.	Fujiwara I, Murakami Y, Nihori T, Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y.	<i>Am J Med Genet A</i> . doi: 10.1002/ajmg.a.36987	2015 Feb	国外
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	村上良子 木下夕口ウ	脳と発達誌,第47巻1号,5-13	2015 Jan	国内
Prognostic factors for acute encephalopathy with bright tree appearance.	Azuma J, Nabatame S, Nakano S, Iwatani Y, Kitai Y, Tominaga K, Kagitani-Shimono K, Okinaga T, Yamamoto T, Nagai T, Ozono K.	<i>Brain Dev</i> Feb;37(2):191-9. doi: 10.1016/j	2015 Feb	国外
De novo WDR45 mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain.	Ohba C, Nabatame S, Iijima Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Ozono K, Saitsu H, Matsumoto N.	<i>J Hum Genet.</i> , 59(5)292-5	2014 May	国外
新しいゲノム編集技術(TALENおよびCRISPR/Cas9システム)とその可能性	北畠 康司	診断と治療社 再生医療シリーズ「脳神経の再生医学-発生と再生の融合的新展開-」155-160	2015	国内
いまさら聞けないiPS細胞 なにができてなにが問題なのか	北畠 康司	日本遺伝カウンセリング学会誌3559-65	2014	国内
IL17A (interleukin 17A).	Inoue N, Akazawa T.	<i>Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology</i> 19,18-27	2015	国外
Development of a dendritic cell-targeting lipopeptide as an immunoadjuvant that inhibits tumor growth without inducing local inflammation.	Akazawa T, Ohashi T, Nakajima H, Nishizawa Y, Kodama K, Sugiura K, Inaba T, Inoue N.	<i>Int. J. Cancer</i> ,135,2847-2856	2014 Dec	国外

<p>Developmental outcome after surgery in focal cortical dysplasia patients with early-onset epilepsy.</p>	<p>Nobusuke Kimura, Yukitoshi Takahashi, Hideo Shigematsu, Katsumi Imai, Hiroko Ikeda, Hideyuki Ootani, Rumiko Takayama, Yukiko Mogami, Noriko Kimura, Koichi Baba, Kazumi Matsuda, Takayasu Tottori, Naotaka Usui, Yushi Inoue</p>	<p>Epilepsy Research, 108(10),1845-1852</p>	<p>2014 Dec</p>	<p>国外</p>
<p>The serum level of HMGB1 (high mobility group box 1 protein) is preferentially high in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms.</p>	<p>Hiroyuki Fujita Hiroyuki, Matsukura S, Watanabe T, Komitsu N, Watanabe Y, Takahashi Y, Kambara T, Ikezawa Z, Aihara M</p>	<p>British Journal of Dermatology,171(6), 1585-1588</p>	<p>2014 Dec</p>	<p>国外</p>
<p>Lymphopenia Helps Early Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus for Patients with Psychosis as an Initial Symptom.</p>	<p>Chiba Yuhei, Katsuse Omi, Fujishiro Hiroshige, Kamada Ayuko, Saito Tomoyuki, Ikura Takahiro, Takahashi Yukitoshi, Kunii Misako, Takeno Mitsuhiro Hirayasu, Yoshio</p>	<p>Psycho-somatics. doi:pii:S0033-3182(13)00136-9. 10.1016/j.psym..</p>	<p>in press</p>	<p>国外</p>

<p>Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy.</p>	<p>Takahiro Furukawa, Naoko Matsui, Koji Fujita, Ai Miyashiro, Yuishin Izumi, Fumitaka Shimizu, Katsuichi Miyamoto, Yukitoshi Takahashi, Takashi Kanda, Susumu Kusunoki, Ryuji Kaj</p>	<p>J Neurol Sci. doi: 10.1016/j.jns.2014.07.059.</p>	<p>in press</p>	<p>国外</p>
<p>Intrathecal overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in febrile infection related refractory status epilepticus.</p>	<p>Hiroshi Sakuma, Naoyuki Tanuma, Ichiro Kuki, Yukitoshi Takahashi, Masashi Shiomi, Masaharu Hayashi</p>	<p>Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry</p>	<p>in press</p>	<p>国外</p>
<p>An analysis of epileptic negative myoclonus by magnetoencephalography.</p>	<p>Masaki Yoshimura, Zhang Shouwen, Yuki Ueda, Kazumi Matsuda, Katsumi Imai, Yukitoshi Takahashi, Yushi Inoue</p>	<p>Epilepsy Research</p>	<p>in press</p>	<p>国外</p>

<p>Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy.</p>	<p>Norimichi Higurashi, Yukitoshi Takahashi, Ayako Kashimada, Yuji Sugawara, Hiroshi Sakuma, Yuko Tomono, Takahito Inoue, Megumi Hoshina, Ruri Satomi, Masaharu Ohfu, Kazuya Itomi, Kyoko Takano, Tomoko Kirino, Shinichi Hirose</p>	<p>Seizure</p>	<p>in press</p>	<p>国外</p>
<p>神経疾患とNMDA型グルタミン酸受容体抗体</p>	<p>高橋幸利、森達夫、大星大観、東本和紀、渡辺陽和、吉富晋作、山口解冬</p>	<p>日本小児科学会誌 118(12)</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>免疫性神経疾患・基礎・臨床研究の最新知見・Rasmussen症候群(脳炎)</p>	<p>高橋幸利、木水友一、小池敬義、堀野朝子、中川直子</p>	<p>日本臨床増刊号</p>	<p>in press</p>	<p>国内</p>

## IV 研究成果の刊行物・別刷

## ***PIGN* mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy**

Chihiro Ohba · Nobuhiko Okamoto · Yoshiko Murakami · Yasuhiro Suzuki · Yoshinori Tsurusaki · Mitsuko Nakashima · Noriko Miyake · Fumiaki Tanaka · Taroh Kinoshita · Naomichi Matsumoto · Hirofomo Saitsu

Received: 2 November 2013 / Accepted: 10 November 2013 / Published online: 20 November 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Defects of the human glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthetic pathway show a broad range of clinical phenotypes. A homozygous mutation in *PIGN*, a member of genes involved in the GPI anchor-synthesis pathway, was previously reported to cause dysmorphic features, multiple congenital anomalies, severe neurological impairment, and seizure in a consanguineous family. Here, we report two affected siblings with compound heterozygous *PIGN* mutations [c.808T >C (p.Ser270Pro) and c.963G >A]

showing congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. The c.808C >T mutation altered an evolutionarily conserved amino acid residue (Ser270), while reverse transcription-PCR and sequencing demonstrated that c.963G >A led to aberrant splicing, in which two mutant transcripts with premature stop codons (p.Ala322Valfs\*24 and p.Glu308Glyfs\*2) were generated. Expression of GPI-anchored proteins such as CD16 and CD24 on granulocytes from affected siblings was

Chihiro Ohba, Nobuhiko Okamoto, and Yoshiko Murakami contributed equally

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10048-013-0384-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Ohba · Y. Tsurusaki · M. Nakashima · N. Miyake · N. Matsumoto · H. Saitsu (✉)  
Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, Yokohama City University, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan  
e-mail: hsaitsu@yokohama-cu.ac.jp

C. Ohba  
e-mail: t116017g@yokohama-cu.ac.jp

Y. Tsurusaki  
e-mail: tsurusak@yokohama-cu.ac.jp

M. Nakashima  
e-mail: mnakashi@yokohama-cu.ac.jp

N. Miyake  
e-mail: nmiyake@yokohama-cu.ac.jp

N. Matsumoto  
e-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp

C. Ohba · F. Tanaka  
Department of Clinical Neurology and Stroke Medicine, Yokohama City University, Yokohama 236-0004, Japan

F. Tanaka  
e-mail: ftanaka@yokohama-cu.ac.jp

N. Okamoto  
Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi 594-1101, Japan  
e-mail: okamoto@osaka.email.ne.jp

Y. Murakami · T. Kinoshita  
Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Y. Murakami  
e-mail: yoshiko@biken.osaka-u.ac.jp

T. Kinoshita  
e-mail: tkinoshi@biken.osaka-u.ac.jp

Y. Murakami · T. Kinoshita  
World Premier International Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Y. Suzuki  
Department of Pediatric Neurology, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Osaka, Japan  
e-mail: yasuzuki@mch.pref.osaka.jp

significantly decreased, and expression of the GPI-anchored protein CD59 in *PIGN*-knockout human embryonic kidney 293 cells was partially or hardly restored by transient expression of p.Ser270Pro and p.Glu308Glyfs\*2 mutants, respectively, suggesting severe and complete loss of *PIGN* activity. Our findings confirm that developmental delay, hypotonia, and epilepsy combined with congenital anomalies are common phenotypes of *PIGN* mutations and add progressive cerebellar atrophy to this clinical spectrum.

**Keywords** Cerebellar atrophy · Compound heterozygous mutation · Glycosylphosphatidylinositol anchor · *PIGN*

## Introduction

Defects of the biosynthetic pathway of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor cause broad clinical phenotypes [1]. The products of more than 20 genes in the phosphatidylinositol glycan (PIG) family are involved in GPI biosynthesis, whereas post-GPI-attachment to proteins (PGAP) gene products play a role in the structural remodeling of GPI glycan and lipid portions [2]. Mutations in eight genes involved in GPI biosynthesis and remodeling (*PIGA*, *PIGM*, *PIGN*, *PIGV*, *PIGL*, *PIGO*, *PIGT*, and *PGAP2*) have been identified in individuals with neurological abnormalities [1, 3–5], of which *PIGN* controls the addition of phosphoethanolamine to the first mannose in GPI [6]. To date, only one homozygous *PIGN* mutation has been reported to cause dysmorphic features, multiple congenital anomalies, severe neurological impairment, and seizures in a consanguineous family [7]. Here, we report a family with two affected siblings, possessing compound heterozygous *PIGN* mutations. Detailed clinical information and molecular and functional analyses are presented.

## Patients and methods

### Patients

We analyzed two affected siblings and their parents. Experimental protocols were approved by the Institutional Review Board of Yokohama City University School of Medicine. Clinical information and peripheral blood samples were acquired from the family members after obtaining written informed consent. Patient clinical features are summarized in Table 1. They showed dysmorphic facial features, developmental delay, intellectual disability, hypotonia, vertical nystagmus, and epilepsy.

### Patient 1

This 9-year-old girl was born to nonconsanguineous healthy parents as a second child after 39 weeks of gestation (Fig. 1a). Her birth weight was 3,390 g [+1.40 standard deviation (SD)], body length of 49 cm (−0.03 SD), and head circumference of 35 cm (+1.35 SD). At 1 month of age, she showed vertical nystagmus without eye pursuit. She was hypotonic, and severe developmental delay was evident from early infancy. She was unable to control her head or utter words at 9 years of age. Abdominal echogram revealed bilateral vesicoureteral reflux as a cause of repeated urinary tract infections. Complex partial seizures developed at 8 months of age and were controlled by antiepileptic drugs. Tube feeding by gastrostomy was necessary for poor appetite at the age of 2 years.

Several dysmorphic features (prominent occiput, bitemporal narrowing, epicanthal folds, open mouth, tented upper lip, high arched palate, micrognathia, and deep plantar groove) were noted (Fig. 1b), but hypoplasia was absent from fingers and fingernails. Initial brain magnetic resonance imaging (MRI) at 6 months of age was normal, but cerebellar atrophy was observed at 2 and 6 years of age (Fig. 1c–f).

At present, her height is 122 cm (+1.1 SD), weight of 18.4 kg (−1.2 SD), and head circumference of 51.4 cm (−0.3 SD). Generalized muscle weakness and nystagmus were neurologically recognized. Laboratory examination showed a normal profile, including blood cell count and blood smear, renal and liver function, total bilirubin, uric acid, albumin, serum electrolytes, lactate, pyruvate, ammonia, amino acids, blood gasses, thyroid function, and cerebrospinal fluid study. Her serum alkaline phosphatase (ALP) activity has been normal for her age since infancy. Metabolic disorder screening including organic acid analysis, lysosomal enzymes, and mass spectrometry of transferrin was normal. G-banded analysis showed a normal karyotype (46, XX).

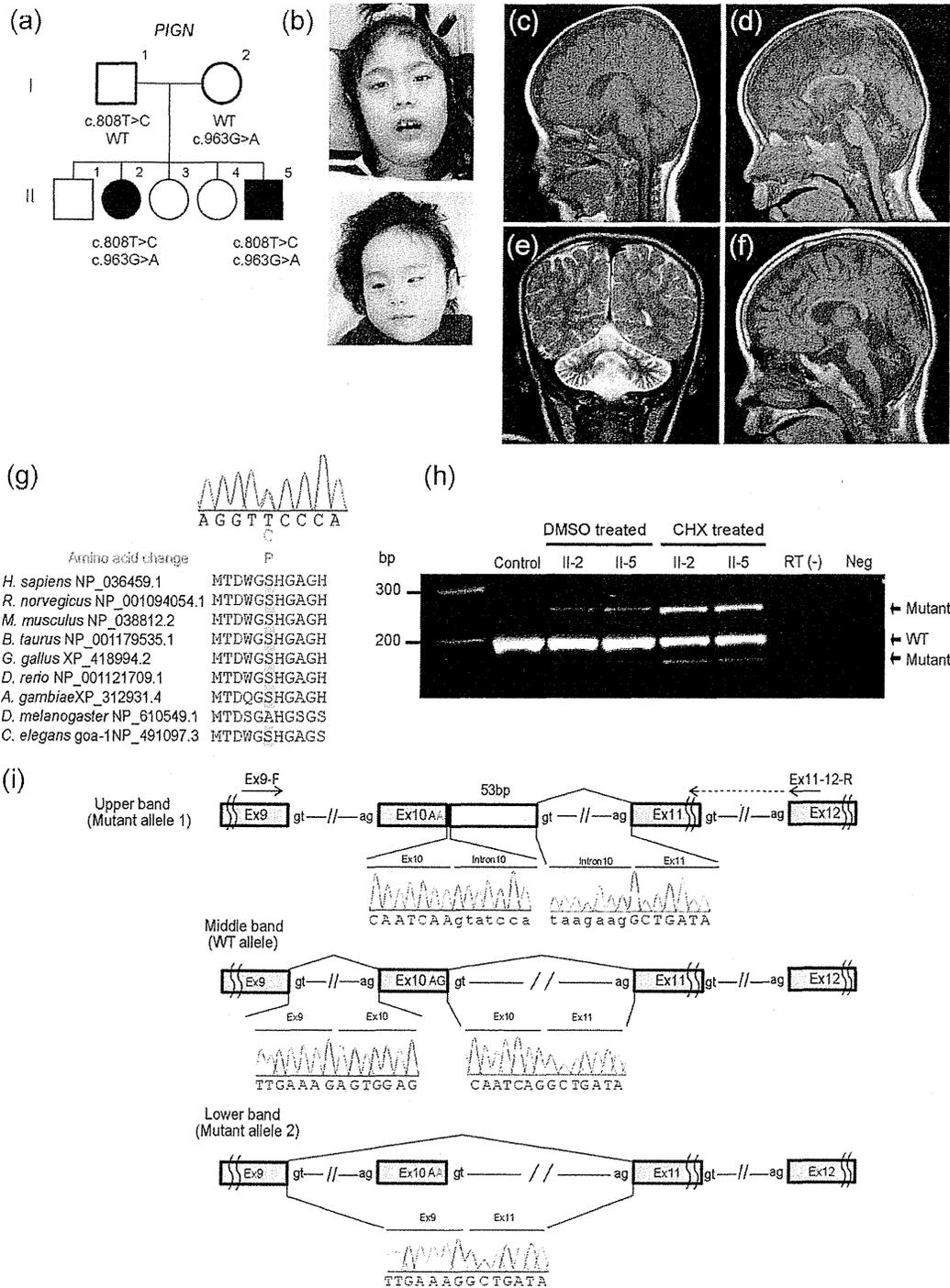
### Patient 2

This 2-year-old boy was born after 37 weeks of gestation as a younger brother to patient 1 (Fig. 1a). His birth weight was 3,252 g (+1.3 SD), body length of 50 cm (+1.2 SD), and head circumference of 35 cm (+1.6 SD). He also showed vertical nystagmus at 1 month of age. Complex partial seizures developed at 5 months of age. He was hypotonic, and his developmental milestones were severely delayed with no head control at 1 year and 10 months of age. At present, his height is 92.3 cm (+2.5 SD), weight of 10.9 kg (−0.6 SD), and head circumference of 48.8 cm (+0.4 SD). He showed similar dysmorphic features to patient 1. Brain MRI at 2 months of age revealed no significant abnormalities.

**Table 1** Clinical features of patients with *PIGN* mutations

Patient	1	2	Reported by Maydan et al. [7]							Total	
			V-1	V-2	V-4	V-5	V-8	V-9	V-10		
Age (years)	9	2	N.D.	Diseased at 14	Diseased at 1	Diseased at 5		Diseased at 3	Diseased at 17	Diseased at 39	
Sex	Female	Male	Male	Male	Male	Female		Female	Female	Male	
Size at birth (percentile)											
Weight (g)	3,390 (90–97)	3,252 (90–97)	3,566 (95)	4,065 (97)	3,850 (95)	3,410 (40)		4,250 (99)	4,300 (98)	4,800 (>99)	
Head circumference (cm)	35 (90)	35 (90–97)	37 (>97)	37 (97)	35.5 (75)	34.5 (10)		N.D.	N.D.	N.D.	
Abnormalities											
Facial features	+	+	+	+	+	+		+	+	+	9/9
Fingers/foot	+	+	+	+	+	-		-	+	+	6/9
Heart	-	-	+	+	+	+		-	+	-	5/9
Urinary tract	+	-	+	+	+	-		-	-	-	4/9
Gastrointestinal tract	GER	-	GER	GER	Anal stenosis	Imperforate anus, ano-vestibular fistula, GER		-	Feeding and swallowing difficulties	Feeding and swallowing difficulties	7/9
Neurological features											
Developmental delay	+	+	+	+	+	+		+	+	+	9/9
Hypotonia	+	+	+	+	+	+		+	+	+	9/9
Nystagmus	+	+	+	+	-	+		-	+	+	7/9
Tremor	+	+	+	+	+	+		+	-	-	7/9
Seizure	+	+	+	-	+	+		+	+	+	8/9
Brain CT	Normal	Normal	Normal	N.D.	Normal	Multiple small subdural hematomas		N.D.	N.D.	N.D.	1/5
Brain MRI				N.D.	N.D.			N.D.	N.D.	N.D.	
Delayed myelination	+	-	-			+					2/4
Thin corpus callosum	-	-	-			+					1/4
Cerebellar atrophy	+	-	Minimal loss of vermis parenchyma			-					1/4
Enlargement of the ventricle	+	-	-			+	(Mild)				2/4

GER Gastroesophageal reflux, N.D. not determined



Whole exome sequencing (WES)

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes, captured using the SureSelect Human All Exon v4 Kit (51 Mb;

Agilent Technologies, Santa Clara, CA), and sequenced on an Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) with 101 bp paired-end reads. Data processing, variant calling, and variant annotation were performed as previously described [8].

**Fig. 1** **a** Familial pedigree and mutations. **b** Photographs of the faces of patient 1 (*upper*) and patient 2 (*lower*). Frontal narrow temporal, frontal bossing, hypertelorism, epicanthal folds, down-slanting palpebral fissures, high nasal bridge, bilateral low set ears, thin philtrum, downturned mouth, and microretrognathia are noted in both patients. **c**, **d**, **f** T1-weighted midline sagittal images and **e** T2-weighted coronal images of patient 1 (**c** at 6 months, **d** and **e** at 2 years, and **i** at 6 years). Progressive vermis atrophy (**c**, **d**, **f**) and hemispheres atrophy (**e**) were observed. **g** Sequence chromatography showing heterozygous c.808C >T mutation, which alters an evolutionarily conserved amino acid. Homologous sequences were aligned using CLUSTALW. **h** RT-PCR analysis using cDNA of LCLs derived from two patients (II-2 and II-5) and a control. **i** Schematic representation of wild-type (WT) and mutant transcripts and primers used for the analysis. Primer of ex11-12-R spans exons 11 and 12. A single band (200 bp), corresponding to the WT allele, was amplified using control cDNA. Upper and lower bands were detected from patient cDNA. The upper band (253 bp) has a 53-bp insertion of intron 10 sequences, leading to a frameshift mutation. The lower band has a 41-bp deletion of the entire exon 10, also leading to a frameshift mutation

#### Reverse transcriptase-PCR

Lymphoblastoid cell lines (LCLs) were established from the two patients. RT-PCR using total RNA extracted from LCLs was performed as previously described [9].

Briefly, total RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) from LCLs with or without incubation in 30  $\mu$ M cycloheximide (CHX; Sigma, Tokyo, Japan) for 4 h. Four micrograms of total RNA was subjected to reverse transcription, and 2  $\mu$ l cDNA was used for PCR. Primer sequences were ex9-F (5'-TCCTTTAGTCACTTGGGGAGCTGGA-3') and ex11-12-R (5'-AATCCACAGGAA GGATTCCCCTGA-3') (Supplementary Table 1). PCR products were electrophoresed on a 10 % polyacrylamide gel and sequenced. PCR bands were purified by the E.Z.N.A. poly-Gel DNA Extraction kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA).

#### Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis

Surface expression of GPI-anchored proteins (GPI-APs) was determined by staining cells with Alexa 488-conjugated inactivated aerolysin [fluorescently-labeled inactive toxin aerolysin (FLAER); Protox Biotech, Victoria, BC, Canada] and appropriate primary antibodies: mouse anti-decay accelerating factor (DAF; IA10), -CD16 (3G8), -CD24 (ML5), -CD59 (5H8), and -CD48 (BJ40) followed by a PE-conjugated anti-mouse IgG antibody (3G8, ML5, BJ40, and secondary antibodies; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Cells were analyzed by flow cytometry (Cant II; BD Biosciences) with Flowjo software (v9.5.3, Tommy Digital, Tokyo, Japan).

#### Functional analysis in HEK293 cells

*PIGN*-knockout cells were generated from HEK293 cells using the CRISPR/Cas System [10]. We obtained the human codon-optimized *Streptococcus pyogenes* Cas9 and chimeric guide RNA expression plasmid pX330 from Addgene (Cambridge, MA). The seed sequence for the SpCas9 target site in *PIGN* exon 4 (CCA-GGTCATGTAGCTCTGATAGC) was selected and a pair of annealed oligos designed according to this sequence and cloned into the *Bbs* I sites of pX330. HEK293 cells were transfected with pX330 containing the target site using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were stained with anti-CD59 antibody 14 days after transfection, and *PIGN*-knockout clones were obtained by limiting dilution.

*PIGN*-knockout HEK293 cells (clone PIGNKO2-12) were transiently transfected with a wild-type or mutant (S290P or exon 10 skipping) *PIGN* cDNA cloned into the SR $\alpha$  promoter-driven expression vector pME HA-*PIGN*. Restoration of the surface expression of CD59, DAF, and GPI-APs was assessed 2 days later by flow cytometry.

#### Results

WES detected 288 and 292 rare protein-altering and splice-site variants in patients 1 and 2, respectively. We filtered out common single nucleotide polymorphisms (SNPs) that met the following two criteria: variants showing minor allele frequencies  $\geq 1$  % in dbSNP 135 and variants found in more than two of our in-house 406 control exomes (Supplementary Table 2). All genes were surveyed for compound heterozygous or homozygous mutations consistent with an autosomal recessive trait, and only *PIGN* (GenBank accession number NM\_176787.4) met this criterion, possessing compound heterozygous mutations in two patients. The missense mutation c.808T >C (p.Ser270Pro) was inherited from the patients' father, while c.963G >A is a synonymous mutation inherited from their mother but located at the last base of exon 10 (Fig. 1i). Neither of the two mutations was present in the 6,500 exomes sequenced by the National Heart, Lung, and Blood Institute exome project. In our 406 in-house control exomes, c.808T >C was absent, but c.963G >A was found in one, as a heterozygous mutation. c.808T >C occurred at evolutionary conserved amino acids (Fig. 1g) and was predicted to be pathogenic using online software (Supplementary Table 3). To examine the actual effects of c.963G >A on splicing, RT-PCR was performed (Fig. 1h, i) and a single band (200 bp) corresponding to the wild-type *PIGN* allele was amplified from control LCL cDNA template (Fig. 1h). By contrast, two aberrant faint bands were detected in addition to a wild-type band from patient cDNA (Fig. 1h). Sequencing of the upper aberrant band indicated a 53-bp insertion of intron 10 sequences that had