

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）

分担研究報告書

先天性 GPI 欠損症の疾患概念の確立と診断基準の制定：
発達障害・てんかんを主症状とする新しい疾患 に関する研究

先天性 GPI 欠損症の疾患マーカーの検索：血清 GPI アンカー蛋白

研究分担者 高橋 幸利

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター副院長

研究要旨

先天性 Glycosylphosphatidylinositol (GPI) 欠損症の効率的なスクリーニング・診断システムを確立するために、血清 GPI アンカー型蛋白質(GPI-AP)の中で診断マーカーとなる GPI-AP を検討した。

測定した蛋白は神経系に発現する蛋白として Cadherin-13、Contactin-4、Ephrin-A4、Oligodendrocyte-myelin glycoprotein、Reticulon-4 receptor-like 2 を、免疫系等末梢蛋白として Semaphorin-7A、Folate receptor、Hyaluronidase-2、Integrin -1 を選択し、それぞれ ELISA にて測定した。患者 9 例の血清 10 検体 (PIGA 欠損症、1 例；PIGL 欠損症、3 例 4 検体；PIGW 欠損症、1 例；PIGO 欠損症、4 例) を測定し、疾病対照は、周産期障害などを原因とするてんかん症例 (25 例、0.7 歳-26 歳) の血清を用い、疾病対照の平均+2SD 以上を高値とした。

Folate receptor は、先天性 GPI 欠損症の全例で高値であった。Semaphorin-7A と Ephrin-A4 は、PIGL の 2/4 例で高値、Hyaluronidase-2 と Contactin-4 は、PIGL の 1/4、PIGO の 2/4 例で高値であった。Contactin-4 は PIGA の 1/1 例で高値、Integrin -1 は、PIGL の 2/4 例で高値であった。

血清 Folate receptor は PIGA、PIGL、PIGW、PIGO 欠損症の全検体で平均+2SD 以上の高値をとり、感度が 100% で先天性 GPI 欠損症のスクリーニングに有用と思われた。

A．研究目的

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーは 150 種以上の蛋白質を細胞膜に繋ぐ糖脂質で、その生合成と修飾に 27 個の遺伝子が必要である。GPI アンカー型蛋白質(GPI-AP)の細胞膜上の発現が低下すると、精神発達遅滞、てんかん、緊張異常、不随意運動、四肢の奇形、血栓症など広範な臨床症状が出現することが分かってきて、先天性 GPI 欠損症として認知されるようになり、14 疾患 97 例の報告がある。

先天性 GPI 欠損症の中には重度の発達遅滞・難治てんかんを呈する症例が多く含まれるが、ビタミン B6、ビタミン B1、活性化葉酸（ホリナート）

補充療法の有効性が推測されている疾患もあり、早期診断・治療による予後改善が期待されている。

現在、先天性 GPI 欠損症のマーカーとなりうる血清 GPI-AP としては、アルカリホスファターゼ (ALP) が知られているが、先天性 GPI 欠損症全例で ALP が上昇する訳ではなく、時期変動も大きく、小児期では対照でも比較的高値のため、感度・特異度が低い。我々は、先天性 GPI 欠損症診断スキームを確立するため、より感度・特異度に優れた血清 GPI-AP を見つけるために、血清 GPI-AP の測定を、患者および疾病対照の血清で行った。

B．研究方法

GPI-AP として知られている 136 種類の GPI-AP

中から主に神経系に発現する蛋白として Cadherin-13 (細胞骨格再構成に関与し、心、大血管、神経細胞、脊髄などに発現)、Contactin-4 (神経発生における軸索の接合に関与し、胎児期脳、心、末梢血などに発現)、Ephrin-A4 (神経系発生、赤血球発生に関与し、前立腺、心、樹状細胞などに発現)、Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (神経突起伸長抑制に関与し、視床下部、前頭葉、後頭葉などに発現)、Reticulon-4 receptor-like 2 (軸索損傷後の再生を阻害、脳内の学習と記憶のプロセスを強化する、大脳、小脳、心、腎などに発現)を選択した。免疫系等末梢発現優位の蛋白として Semaphorin-7A (免疫セマフォリン分子で、活性化リンパ球、延髄、大脳などに発現)、Folate receptor (葉酸受容体 葉酸による DNA 合成促進に関与し、胎盤、心、肺、骨髄、胸腺、単球由来の細胞などに発現)、Hyaluronidase-2 (ヒアルロン酸分解 組織透過性高進に関与し、肺、心、などに発現)、Integrin -1 (細胞-細胞外マトリックスの接着、細胞-細胞の接着に関与し、リンパ球、血小板、肺、腎、精嚢などに発現)を選択した。

血清蛋白測定は ELISA により、神経系蛋白は以下のキット、Cadherin-13 (CSB-E13817H, CUSABIO, Hubei, China)、Contactin-4 (SEB210HU, USCN Life Science, Cologne, Germany)、Ephrin-A4 (SEE110HU, USCN Life Science, Cologne, Germany)、Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (CSB-EL016334HU, CUSABIO, Hubei, China)、Reticulon-4 receptor-like 2 (CSB-EL020576HU, CUSABIO, Hubei, China) を用いた。免疫系等末梢発現優位の蛋白は、Semaphorin-7A (CSB-EL021000HU, CUSABIO, Hubei, China)、Folate receptor (DY5697, R and D systems, MN, USA)、Hyaluronidase-2 (CSB-EL010919HU, CUSABIO, Hubei, China)、Integrin -1 (CSB-EL011880HU, CUSABIO, Hubei, China) を用いた。

先天性 GPI 欠損症 9 例の血清 10 検体 (PIGA 欠損

症、1 例; PIGL 欠損症、3 例 4 検体; PIGW 欠損症、1 例; PIGO 欠損症、4 例) を測定した。疾病対照は周産期障害などを原因とするてんかん症例 (25 例、0.7 歳-26 歳) を選んだ。

(倫理面への配慮)

静岡てんかん・神経医療センター倫理委員会にて、「てんかん・高アルカリフォスファターゼ血症・精神運動発達遅滞等を呈する患者における GPI アンカー型蛋白質の生合成および修飾に関わる遺伝子の変異の検索」及び「自己免疫介在性脳炎・脳症に関する多施設共同研究 201504」研究の承認を得たのち、患者同意を得た。

C. 研究結果

疾病対照血清では、Reticulon-4 receptor-like 2 は年齢とともに増加 ($p=0.0455$)、Hyaluronidase-2 は低下する傾向 ($p=0.0276$) があり、Cadherin-13 は全例感度以下であった。

疾病対照の平均+2SD以上を高値とすると、Folate receptor は、PIGLの4/4、PIGOの2/4、PIGWの1/1、PIGAの1/1例で高値であり、4疾患で感度100%であった。Semaphorin-7AとEphrin-A4は、PIGLの2/4例で高値と、感度50%であった。Hyaluronidase-2とContactin-4は、PIGLの1/4、PIGOの2/4例で高値であった。Contactin-4はPIGAの1/1例で高値、感度100%であった。Integrin -1は、PIGLの2/4例で高値であった。Cadherin-13とOligodendrocyte-myelin glycoproteinは、全例感度以下で、Reticulon-4 receptor-like 2は、全例平均+2SD以内であった。

D. 考察

先天性 GPI 欠損症の臨床症状には、発達遅滞、てんかん、特異顔貌などのある程度共通してみられる症状と、血栓症、爪や骨格の異常、難聴、口蓋裂といった一部の酵素欠損症でのみみられる症状がある。このように症状は幅広く、多様性があるため、先天性 GPI 欠損症の臨床診断は難しい。さらに、末梢血顆粒球の CD59 などの細胞表面マーカーのスクリーニングで先天性 GPI 欠損症が疑わ

れても、27種類の亜型を臨床的に診断（推測）することはほぼ困難である。そのため、現在では、臨床的に疑われる症例は末梢血顆粒球の表面マーカーのCD59などの発現量でスクリーニングし、発現低下症例では、全エクソーム解析に進み、遺伝子診断されている。しかし、生きた細胞を研究施設に送らねばならない末梢血顆粒球の表面マーカーの解析に躊躇する臨床医が多いこともあって、診断症例数は増加が乏しい。

現在の全エクソーム解析に頼る診断スキームでは、診断確定までに数か月を待たねばならないこともある。先天性 GPI 欠損症を早期に診断し、ビタミン B6 や葉酸の治療を試みることは、予後改善につながる可能性があり、診断の迅速化は重要である。今回我々が検討した血清 GPI-AP の中で、Folate receptor は PIGA、PIGL、PIGW、PIGO の全検体で平均+2SD 以上の高値をとり、感度が 100% で先天性 GPI 欠損症のスクリーニングに有用と思われた。臨床症状に血清 Folate receptor のスクリーニングを加えることで、先天性 GPI 欠損症の確立が高まり、生きた細胞を送らねばならない末梢血顆粒球の表面マーカーの解析を積極的に依頼する臨床医が増加する可能性がある。

先天性 GPI 欠損症の検体が 9 例 10 検体と少なかったので必ずしも断定はできないが、血清 Folate receptor 高値で PIGA、PIGL、PIGO、PIGW 欠損症が疑われ、Contactin-4 がさらに高値であると PIGA、PIGL、PIGO に絞られ、さらに Hyaluronidase-2 が高値であると PIGL、PIGO に絞られ、Ephrin-A4 と Integrin α -1 が高値であると、PIGL に絞られるというアルゴリズムが成立する。このように複数の GPI-AP のスクリーニングで亜型の診断も可能になるかもしれない。

血清の送付は比較的簡便で、スクリーニングの検体としては集めやすく、凍結保存もしやすく、海外からも輸送が可能である。その結果、全世界から、昔の保存検体もも含めて、効率よくスクリーニングできる可能性がある。今後は、症例を増

やし、今回測定した以外の血清 GPI-AP の測定なども行い、病院レベルでスクリーニングができないか？ 検討していきたい。

E. 結論

先天性 GPI 欠損症のスクリーニングの一つとして、GPI-AP である Folate receptor の有用性を見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Norimichi Higurashi, Yukitoshi Takahashi, et al., Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy, *Seizure*, 2015; 27: 1-5.
2. Hiroshi Sakuma, Takahashi, et al., Intrathecal overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in febrile infection related refractory status epilepticus, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 2015; 86: 820-822.
3. Tetsuhiro Fukuyama, Yukitoshi Takahashi, et al., Semi-quantitative analyses of antibodies to N-methyl-D-aspartate type glutamate receptor subunits (GluN2B & GluN1) in the clinical course of Rasmussen syndrome, *Epilepsy Research*, 2015; 113: 34-43.
4. Amiko Hakuta, Yukitoshi Takahashi, et al., Reduction of IL-10 production by B cells in intractable toxic epidermal necrolysis, *J Dermatol*, 2015; 42(8): 804-808.
5. Kaori Morimoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Analysis of a child who developed abnormal neuropsychiatric symptoms after administration of oseltamivir: a case report, *BMC Neurol*. 2015; 15: 130. doi: 10.1186/s12883-015-0393-2.
6. Daisuke Kurita, Yukitoshi Takahashi, et al., Deterioration of clinical features of a patient with autism spectrum disorder after anti-NMDA-receptor encephalitis, *Psychiatry Clin Neurosci*. 2015; 69(8): 507. doi: 10.1111/pcn.12323.
7. Ryohei Takahashi, Yukitoshi Takahashi, et al., Determination of stiripentol in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Japanese Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 2015; 41(9): 643-650.
8. Takashi Hosaka, Yukitoshi Takahashi, et al., Opsoclonus associated with autoantibodies

- to glutamate receptors 2, *Neurological Sciences*, 2015; 36(9): 1741-1742.
9. Takahiro Furukawa, Yukitoshi Takahashi, et al., CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015; 2(5): e138.
 10. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, et al., Pathogenic role of human herpesvirus 6B infection in mesial temporal lobe epilepsy, *Journal of Infectious disease*, 2015; 212(7): 1014-1021.
 11. Shinsaku Yoshitomi, Yukitoshi Takahashi, et al., Three patients manifesting early infantile epileptic spasms associated with 2q24.3 microduplications, *Brain & Development*, 2015; 37(9): 874-879.
 12. Tomoyuki Saito, Yukitoshi Takahashi, et al., Brain FDG-PET reflecting clinical course of depression induced by systemic lupus erythematosus: two case reports, *Journal of the Neurological Sciences*, 2015; 358(1-2): 464-466.
 13. Morimoto K, Takahashi Y, et al., Analysis of a child who developed abnormal neuropsychiatric symptoms after administration of oseltamivir: a case report. *BMC Neurol.* 2015 Aug 5; 15: 130.
 14. Akiko Tamasaki, Yukitoshi Takahashi, et al., Effects of donepezil and serotonin re-uptake inhibitor on acute regression during adolescence in Down syndrome, *Brain & Development*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2015.06.006>.
 15. Akihiko Miyauchi, Yukitoshi Takahashi, et al., A case of anti-NMDAR encephalitis presented hypotensive shock during plasma exchange, *Brain & Development*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2015.10.009>.
 16. Hiroko Ikeda, Yukitoshi Takahashi, et al., Characteristic phasic evolution of convulsive seizure in PCDH19-related epilepsy, *Epileptic Disord*, in press.
 17. Mori T, Takahashi Y, et al., Usefulness of ketogenic diet in a girl with migrating partial seizures in infancy. *Brain & Development*, 2016 Jan 11. pii: S0387-7604(15)00280-6. doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.012.
 18. Yuko Sato, Yukitoshi Takahashi, et al., Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures: Pathological findings and a new therapeutic approach using tacrolimus, *Brain & Development*, in press.
2. 学会発表
 1. Yukitoshi Takahashi, et al., Autoimmune-mediated Epilepsy in Children, 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), May 14th to 17 th 2015. Taipei.
 2. Yukitoshi Takahashi, Photosensitivity in population & epileptic patients, The 17th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, September 25-26, 2015, Tokyo.
 3. Takako Fujita, Yukitoshi Takahashi, et al., Neurological complications of in-patients with exanthem subitum, 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), May 14th to 17 th 2015. Taipei.
 4. Jun Mine, Yukitoshi Takahashi, et al., Clinical manifestations of non-herpetic acute limbic encephalitis in four pediatric cases, 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), May 14th to 17 th 2015. Taipei.
 5. Hiromi Yamaguchi, Yukitoshi Takahashi, et al., A case of Hashimoto Encephalopathy with Grave's disease, 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), May 14th to 17 th 2015. Taipei.
 6. Norimichi Higurashi¹, Yukitoshi Takahashi, Shinichi Hirose, Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy, 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), May 14th to 17 th 2015. Taipei.
 7. Kazuyuki Nakamura, Yukitoshi Takahashi, et al., A Case of Rapid-progressive Bilateral Rasmussen's Encephalitis, 13th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN), May 14th to 17 th 2015. Taipei.
 8. Y. Yamamoto, Y. Takahashi, et al., Therapeutic drug monitoring for lamotrigine in pediatric epilepsy patients, The 12th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics Madrid, Spain, 27-30 June, 2015.
 9. Yukitoshi Takahashi, et al., Function of antibodies to n-terminal of GluN2B in vivo, The inaugural Asia-Pacific School of Neuroimmunology Meeting, August 30th 2015, Tokyo.
 10. Petrus J de Vries, Yukitoshi Takahashi, et al., TSC-Associated Neuropsychiatric Disorders (TAND): Baseline data from the TOSCA international disease registry, The Society for the Study of Behavioural Phenotypes 2015 conference, 4-5 September 2015. London.

11. Takeo Saito, Yukitoshi Takahashi, et al., Pharmacogenomics analysis identifies HLA-DRB1 as a risk for Lamotrigine-induced cutaneous adverse drug reactions in a Japanese population. The 2015 World Congress of Psychiatric Genetics, 16-20, Oct, 2015, Tronto.
 12. Mazereeuw-Hautier, Yukotoshi Takahashi, et al., Dermatological manifestations of TSC in TOSCA - TuberOus SCLerosis registry to increase disease Awareness, 11th European Association of Dermato-Oncology (EADO) Congress, 28-31 October, 2015, Marseille.
 13. Anna Jansen, Yukotoshi Takahashi, et al., TOSCA - TuberOus SCLerosis registry to increase disease Awareness: Second interim analysis results with a focus on neurologic manifestations, 20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, November 19-22, 2015, San Antonio.
 14. Yuhei Chiba, Yukitoshi Takahashi, et al., Four cases of probable dementia with Lewy bodies with anti N-methyl-D-aspartic acid type receptor antibodies, International Dementia with Lewy Bodies Conference 2015, December 1-4, 2015, Florida.
 15. Rima Nabbout, Yukotoshi Takahashi, et al., TOSCA - TuberOus SCLerosis registry to increase disease Awareness: Second Interim analysis results with a focus on epilepsy, 69th annual meeting of AES, Dec 4-8, 2015, Philadelphia.
 16. 高橋幸利、荒谷菜海、森達夫、東本和紀、吉富晋作、渡辺陽和、宮 一志、今村淳、木村暢佑、美根潤、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の早期診断：先行症状期髄液検査値の検討、第 118 回 日本小児科学会学術集会、2015 年 4 月 17 日-4 月 19 日、大阪。
 17. Yukitoshi Takahashi, Takashi Matsudaira, Hitoshi Nakano, Hirosato Nasu a, Hitoshi Ikeda, Kentaro Nakaoka, Yushi Inoue, Rumiko Takayama, Masayasu Oota, Immunological studies of blood from patients with CNS-symptom after human papillomavirus vaccination, 第 57 回日本小児神経学会、2015 年 5 月 28-30 日、大阪。
 18. 高橋幸利、山口解冬、伊藤智城、九鬼一郎、臼井大介、木村暢佑、保立麻美子、池上真理子、大谷早苗、向田壮一、那須裕郷、山崎悦子、秋山倫之、高山留美子、最上友紀子、大谷英之、池田浩子、久保田裕子、重松秀夫、今井克美、井上有史、難治性 West 症候群での新規抗てんかん薬治療効果：TPM&LEV、第 8 回日本てんかん学会東海北陸地方会、2015 年 7 月 11 日、富山。
 19. 高橋幸利、西村成子、高尾恵美子、笠井理沙、平松宏実、井上有史、ウサギ抗ヒト NMDA 型 GluR 抗体のマウス passive transfer 研究：記憶等の行動解析、第 27 回日本神経免疫学会学術集会、2015 年 9 月 15-16 日、岐阜。
 20. 高橋幸利、西村成子、高尾恵美子、笠井理沙、平松宏実、井上有史、ウサギ抗ヒト NMDA 型 GluR 抗体のマウス海馬遺伝子発現変化に及ぼす影響の解析、日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月 14-17 日、東京。
 21. 高橋幸利、西村成子、高尾恵美子、笠井理沙、平松宏実、井上有史、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 157 例の検討：急性期治療と予後、第 20 回日本神経感染症学会、2015 年 10 月 22-23 日、長野。
 22. 高橋幸利、太田晶子、井上有史、遠山潤、藤田浩史、西里ちづる、田中茂樹、長尾雅悦、白神浩史、金子英雄、澤井康子、West 症候群 NHO-Japan 342 ACTH cases study：初回 ACTH 短期・長期発作抑制効果、第 49 回日本てんかん学会、2015 年 10 月 29 -11 月 1 日、長崎。
 23. 小池敬義、高橋幸利、堀野朝子、小関直子、山口解冬、大星大観、木水友一、吉富晋作、大谷英之、池田浩子、今井克美、重松秀夫、鈴木保宏、村上良子、井上有史、PIGL 遺伝子異常による先天性 GPI 欠損症の 1 例、第 64 回静岡小児神経研究会、2015 年 11 月 14 日、静岡。
 24. 高橋幸利、西村成子、高尾恵美子、笠井理沙、榎田かおる、井上有史、Rasmussen 症候群の早期診断・効果的免疫調節治療選択に向けた研究、てんかん治療研究振興財団第 27 回研究報告会、2016 年 3 月 5 日、千里。
3. 書籍の刊行
該当なし。
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 2015 年 8 月 28 日、NMDA 型グルタミン酸受容体抗体による記憶障害モデルマウスの開発、発明者：高橋幸利 特願 2015-168646、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし