

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 欠損症の症例登録システムの構築と実態調査及び早期診断法の確立
研究分担者 井上 徳光 大阪国際がんセンター研究所・腫瘍免疫学・部門長

先天性 GPI 欠損症の症例登録システムの構築と疾患マーカーの検索に関する研究

研究要旨

先天性 GPI 欠損症 (IGD) のてんかん発作のコントロールに、ビタミン B6 が有効である症例があることから、原因不明の知的障害やてんかんを持つ患者から、IGD を鑑別診断するシステムを確立することは極めて重要である。私たちは、研究代表者のグループと協力して、疾患データベースの構築、診療ガイドラインの改訂、患者会の実施を行った。また、ビタミン B6、髄液中葉酸、ビタミン B1 の測定システム、臨床的な診断システムとしての CD16 発現低下を解析するシステムの構築を行った。

A．研究目的

今まで原因不明とされてきた知的障害、運動発達障害、てんかんをきたす疾患の中で、先天性 GPI 欠損症 (IGD) を鑑別診断するシステムを構築することは、ビタミン B6 投与が、少なくとも一部の IGD の難治性てんかん発作のコントロールに極めて有効な症例がある事から、重要である。しかし、IGD の原因遺伝子としての候補遺伝子が少なくとも 27 遺伝子存在するにもかかわらず、未だ、遺伝子異常の見つかっていない GPI 生合成関連遺伝子もあり、私たちのこれまでの取り組みによって急増してはいるが、未だ診断されず、てんかん発作がコントロールできずに苦しんでいる患者が存在すると予想される。また、これらの症例を早期に診断する事により、発達の遅れを軽減または回復させられる可能性もある。約 150 種類の GPI アンカー型タンパク質が知られており、異常な GPI アンカー型タンパク質の種類、発現の低下の程度、GPI 生合成のステップによって、IGD は、知的障害、けいれんや運動発達障害に加えて、多様な症状を呈していると考えられる。また、その多様な症状を持つ上、症例数が限られるため、多くの知的障害、てんかんや運動発達障害をきたす疾患から、IGD

を見つけ出すのは、容易ではない。そこで、私たちは、研究代表者と共に、IGD に遭遇する多くの小児科医に本疾患を知ってもらうと共に、簡単にスクリーニングシステムを構築し、鑑別する方法を開発する事を目的とする。そのためには、よりよい診断マーカーの探索が重要である。FACS 解析は確実であるが、正常と比較して低下が微妙である事も多く、また、常に正常コントロールが必要となることや、好中球で測定するため、安定性に問題もある。正常検体を解析する事なく、臨床検査では通常解析していない CD16 の発現低下を解析するシステムを構築することは重要である。

また、GPI アンカー型タンパク質の細胞表面の発現が低下しない IGD も存在する。血清アルカリホスファターゼの高値は、IGD の診断に重要ではあるが、乳幼児では、年齢による変化が大きく、また、骨疾患など他の疾患でも上昇するため、より効果的な診断マーカーが必要である。さらに、IGD 原因遺伝子の関わる生合成ステップによっては、血清アルカリホスファターゼに変化が無い事もあり、それらを疑う事のできる診断マーカーが必要となる。今回、研究代表者と協力して、ビタミン B6、ビタミン B1 の測定シス

テムの構築を検討した。

B．研究方法

(1) IGD 啓発への取り組み

昨年に引き続き、研究代表者、大阪大学小児科と共同して、患者会を開催する。

(2) CD16 発現低下解析システムの構築

CD16 発現は、通常臨床検査では、陽性細胞の比率のみしか検討されていないため、発現量を検討するには、システム構築が必要である。そこで、検査会社と共同で、正常コントロールを使用せずに解析できる CD16 発現低下解析システムの構築を行う。

(3) 新規診断方法の開発

新規診断マーカー候補として、リン酸化および脱リン酸化ビタミン B6 の末梢血および髄液中の量、ビタミン B1 を補酵素とする酵素活性低下による代謝産物の変化、還元型葉酸代謝産物の髄液中での量が、診断や治療効果のマーカーとなる可能性がある。そこで、研究代表者と共同で、北海道医療大学の小林大祐先生、島根大学医学部の山口清次先生、岡山大学の秋山倫之先生と共同で、これらの物質の中で有効なマーカーを検索した。

(倫理面への配慮)

当センター研究所では、本研究がヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき行われる研究計画である事が審査され、承認されている。

C．研究結果

(1) IGD の啓発への取り組み

患者会を研究代表者および大阪大学小児科のグループと開催し、患者家族と交流した。昨年度、Web 上で患者情報を入れられるよう大阪大学未来医療開発部データセンターと、REDCap システムサービスを利用して作製した。

(2) CD16 発現低下解析システムの構築

現在、患者の CD16 の発現低下を解析するために、正常サンプルと一緒に測定している。そこ

で、臨床検査会社と共同で、正常サンプルの代わりに、IMMUNO-TROL Cells を使用して、標準化するプロトコールを作成した。また、患者ごとの蛍光強度を比較検討する為に、

Negative Control Compensation Particles Set の Anti-Mouse Ig beads を使用して、CD16 抗体で染色し蛍光強度を毎回調整する事によって、蛍光強度の標準化も行えるようにした。

(3) 新規診断方法の開発

研究代表者や共同研究者と共同して、まだ、症例数は少ないが、遺伝子変異が同定され GPI 欠損症と確定診断された症例、GPI アンカー型蛋白の発現低下が検出された症例、その他、GPI 欠損症が疑われたが GPI 欠損症ではないと考えられた症例に関して、ビタミン B1 欠乏による酵素活性の低下により、異常となる尿中代謝産物の測定、リン酸化および脱リン酸化ビタミン B6 の血漿中濃度の測定、活性型葉酸代謝産物濃度測定を行い、解析した。

D．考察

システムは構築されてきたが、まだまだ、発達障害やけいれんをきたす疾患から IGD 患者を選び出す事は難しい。それ故、もう少し、大掛かりな調査研究が必要と考えられた。そのために、臨床検査会社と共同で、CD16 の発現を臨床検査で測定できるシステムの構築を行った。今後、このシステムを用いて、多くの患者のスクリーニングを行いたい。本スクリーニングにより、より簡便な診断マーカーを構築する。

E．結論

CD16 測定システムを用いて、より広い症例の中からスクリーニングし、新規患者を同定する事が必要である。また、大阪大学小児科や静岡てんかん・神経医療センターと協力して、ビタミンの補充療法の臨床研究に協力していきたい。

代謝マーカーに関しては、症例数がまだ少なく、現在まだ有効性の判断はできなかった。新たなマーカーも含め、網羅的で大規模スクリー

ニングが必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Roy, N., Ohtani, K., Hidaka, Y., Amano, Y., Matsuda, Y., Mori, K., Hwang, I., Inoue, N., Wakamiya, N. Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1 *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 2017, 861(2), 1-14.

Ohashi, T., Aoki, M., Tomita, H., Akazawa, T., Sato, K., Kuze, B., Mizuta, K., Hara, A., Nagaoka, H., Inoue, N., and Ito, Y. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer *Cancer Sci* 108(6): 1128-1134, 2017

Akazawa, T.*, Ohashi, T., Wijewardana, V., Sugiura, K., Inoue, N.*: Development of a vaccine based on bacteria-mimicking tumor cells coated with novel engineered TLR2 ligands *Cancer Science in press*

2. 学会発表

補体関連疾患に対する網羅的な補体検査システムの構築, 口頭, 井上徳光、日高義彦、大谷克城、大塚泰史、澤井俊宏、宮田敏行、大澤勲、岡田秀親、木下タロウ、関根英治、塚本浩、中尾実樹、水野正司、村上良子、堀内孝彦、若宮伸隆 第54回日本補体学会学術集会、2017/9/2 国内

補体関連疾患に対する網羅的な補体検査システムの構築 口頭, 井上徳光、日高義彦、大谷克城、大澤勲、岡田秀親、木下タロウ、関根英治塚本浩、中尾実樹、水野正司、村上良子、堀内孝彦、若宮伸隆

第1回日本免疫不全・自己炎症学会学術集会、東京、2018/1/21 国内

Establishment of a comprehensive

complement examination system for complement-related diseases by the Japanese Association for Complement Research (JACR) Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Ohsawa, I., Ohtani, K., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Tsukamoto, H., Nakao, M., Mizuno, M., Murakami, Y., Horiuchi, T., Wakamiya, N.

16th European Meeting on Complement in Human Disease, Copenhagen, Denmark, Sep. 8-12, 2017

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他 該当なし