

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

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

平成28年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上良子

平成 29（2017）年 5月

目 次

I . 総括研究報告

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	-----	1
村上良子		
(資料) 指定難病 診断基準改変版		

II . 分担研究報告

1 . 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	-----	11
井上徳光		
2 . 先天性 GPI 欠損症の早期診断法の確立: 血清葉酸受容体蛋白濃度に関する研究	-----	14
高橋幸利		

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19
----------------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 村上良子 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は GPI アンカーの生合成遺伝子群の変異により重要な機能を担う GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の発現が低下し精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す。現在 15 種類の遺伝子変異による (IGD) が報告されており、国内で 30 例、海外を合わせると約 200 例の報告があり、その多くに我々が関わっている。生後も病態が進行する症例もあるので効率的なスクリーニング体制を構築し、早期に的確に診断し、痙攣に有効とされているピリドキシン投与などの早期治療を行うことが患者の QOL を改善することがわかってきた。一方では FACS で GPI-AP の発現低下を呈し IGD と診断した症例のなかに GPI 遺伝子以外を責任遺伝子とする症例が見つかる等症状が多彩で診断が難しいため、鋭敏な疾患マーカーの検索も進めている。平成 29 年度より指定難病に認定されたので、それに向けて診療ガイドラインを改訂した。スクリーニングに用いる顆粒球の FACS 解析をベッドサイドで行えるよう SRL 社に委託し、患者検体のみで判定できるようカットオフ値を設定する試験運用を準備している。

研究分担者

井上徳光 大阪府立成人病センター・
研究所・腫瘍免疫学部門長

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

A．研究目的

GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーは 50 種以上の蛋白質を細胞膜につなぐ糖脂質でその生合成に 27 個の遺伝子が関与する。これら GPI 遺伝子群の変異により重要な機能を担う GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の発現が低下し精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す。現在 15 種類の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症 (IGD) が報告されているが、責任遺伝子が今後も拡大する可能性があり他疾患と診断されたものも病態から IGD に分類されるもの

があると予想される。旧研究班で IGD の診療ガイドラインを作成したが症状が多彩で、最近 GPI 遺伝子以外を責任遺伝子とする IGD も見つかり正確な診断が難しい。さらに生後も病態が進行する症例もあるので早期診断が必要である。新研究班では疾患登録を構築して多症例の臨床像・検査所見を詳細に解析し、より鋭敏な疾患マーカーを見つけそれらを診療ガイドラインに反映させ、より早期の正確な診断を目指す

B．研究方法

(1) 効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用開始

精神発達障害、てんかんと特徴的な奇形や高 ALP 血症を伴う患者の末梢血を正常コントロール血とともに送付してもらい、フローサイトメトリー検査で顆粒球における GPI アンカー型タンパク質の発現を確認する。CD16b の発現低下が見ら

れば、IGD の診断は確定する。責任遺伝子同定の為に末梢血から抽出したゲノムを用いて GPI 関連遺伝子のターゲットエクソームシーケンスを行う。FACS で低下の見られない症例、あるいはターゲットシーケンスで責任遺伝子が同定できない場合は横浜市立大学の遺伝子解析拠点班と連携して全エクソームシーケンスを行った。さらに大阪大学未来医療開発センターと共同して、米国 Vanderbilt 大学が開発したデータ集積管理システム REDCap を使ったデータベースが完成したので患者登録を開始している。

(2) 診療ガイドラインの改訂と検査の委託

平成 29 年度より指定難病に認定されたので、それに向けて厚生労働省の指導を受け、診療ガイドラインを改訂した。スクリーニングに用いる顆粒球の FACS 解析をベッドサイドで行えるよう SRL 社に委託し、患者検体のみで判定できるようカットオフ値を設定する試験運用を準備している。

(3) 疾患マーカーの検索

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。他の GPI-AP タンパク質について疾患特異性を解析した。また IGD ではアルカリホスファターゼの発現低下に由来する、ビタミン B6 の取り込み低下による代謝異常が起きていると考えられる。その測定システムを確立した。

(倫理面への配慮)

診断に遺伝子解析を伴うので、大阪大学におけるヒトゲノム倫理委員会に申請し承認されている。遺伝子診断に伴う利益、不利益などにつき書面提示し、患者の保護者に対して説明し同意

を得た。また、診断や結果に対して、不安が生じた場合は、遺伝カウンセリングを提供できる体制を整えており、いつでも相談できる旨を併せて説明した。

C. 研究結果

(1) 効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用開始

今年度は国内から 30 例のフローサイトメトリ解析を行い、5 人で CD16 の明らかな低下を認め、IGD と診断した。うち 3 人がターゲットシーケンスで責任遺伝子が同定でき、他の 2 例については現在横浜市立大学にて全エクソーム解析を施行中であるが、まだ責任遺伝子が判明していない。また海外との共同研究により世界で初めて PIGP 欠損症と PIGC 欠損症を報告した。日本で症例数が多い PIGO 欠損症について、変異 PIGO の活性低下の度合いと患者の臨床症状の重症度が相関すること、また同じ GPI 生合成遺伝子の中でも PIGA 欠損症と PIGO 欠損症では共通の症状以外にそれぞれ特徴的な症状があることを報告した。また最近では GPI pathway 以外の遺伝子変異による IGD も見つかり、他の疾患とオーバーラップする症例も今後見つかると思われる。多くの症例を集積してその特徴を詳細に観察することが重要である。

(2) 診療ガイドラインの改訂と検査の委託

診療ガイドラインを改訂し、日本小児神経学会のホームページに掲載される予定である。また作製済みの疾患ホームページに公開している。

(<http://igd.biken.osaka-u.ac.jp/>)

SRL 社と委託契約を結び、プロトコルを作成して、患者検体のみ CD16 の発現量でカットオフ値を決め、病的な低下を判定するシステムを構築した。まもなく運用の予定である。

(3) 疾患マーカーの検索

分担者の報告にあるように、FOLR1 と FOLR2 が特異的に IGD で上昇していたので ALP 値と組み合わせで疾患マーカーになることがわかった。代謝異常については尿中有機酸分析を島根大学に、血清中のビタミン B 誘導体の濃度を北海道医療大学、髄液中活性化葉酸濃度を岡山大学で測定したが、まだ症例数が少ないので今後多症例を解析して有意性を確認する予定である。

D . 考察

疾患マーカーの検索のためには症例数を増やす必要があるが、希少疾患であるので難しい。全国規模の調査研究が必要である。FACS 解析を SRL 社に委託したので、このシステムを使って調査研究を実施したいと考えている。また AMED が推進している IRUD との連携を図るため、データシェアリングのシステムが早く構築されることを期待している。

E . 結論

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は新しい疾患であるが最近原因不明の運動発達障害や難治性てんかんの症例の中から次々と見つかっている。末梢血のフローサイトメトリーでスクリーニングが可能であり、遺伝子解析で変異遺伝子を同定し、機能解析で確認できる系がある。またビタミン B₆ (ピリドキシン) の投与がけいれん発作に著効する症例がある。早期診断・早期治療を実現する為にベッドサイドでの鋭敏な疾患マーカーの検索と、新たな治療法の開発が重要である。

F . 健康危険情報

特記すべきことなし

G . 研究発表

1. 論文発表

- Makrythanasis P, Kato M, Zaki MS, Saitsu H, Nakamura K, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima M, Issa MY, Guipponi M, Letourneau A, Logan CV,

Roberts N, Parry DA, Johnson CA, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, Murakami Y. Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia. Am J Hum Genet. 2016 Apr 7;98(4):615-26.

- Knaus A, Awaya T, Helbig I, Afawi Z, Pendziwiat M, Abu-Rachma J, Thompson MD, Cole DE, Skinner S, Annese F, Canham N, Schweiger MR, Robinson PN, Mundlos S, Kinoshita T, Munnich A, Murakami Y, Horn D, Krawitz PM. Rare Noncoding Mutations Extend the Mutational Spectrum in the PGAP3 Subtype of Hyperphosphatasia with Mental Retardation Syndrome. Hum Mutat. 2016 Aug;37(8):737-44.
- Hoglebe M, Murakami Y, Wild M, Ahlmann M, Biskup S, Hörtnagel K, Grüneberg M, Reunert J, Linden T, Kinoshita T, Marquardt T. A novel mutation in PIGW causes glycosylphosphatidylinositol deficiency without hyperphosphatasia. Am J Med Genet A. 2016 Dec;170(12):3319-3322.
- Edvardson S, Murakami Y, Nguyen TT, Shahrour M, St-Denis A, Shaag A, Damseh N, Le Deist F, Bryceson Y, Abu-Libdeh B, Campeau PM, Kinoshita T, Elpeleg O. Mutations in the phosphatidylinositol glycan C (*PIGC*) gene are associated with epilepsy and intellectual disability. J Med Genet. 2017 Mar;54(3):196-201
- Lee GH, Fujita M, Takaoka K, Murakami Y, Fujihara Y, Kanzawa N, Murakami KI, Kajikawa E, Takada Y, Saito K, Ikawa M,

Hamada H, Maeda Y, Kinoshita T. A GPI processing phospholipase A2, PGAP6, modulates Nodal signaling in embryos by shedding CRIPTO. *J Cell Biol.* 2016 Dec 5;215(5):705-718.

- Kolicheski AL, Johnson GS, Mhlanga-Mutangadura T, Taylor JF, Schnabel RD, Kinoshita T, Murakami Y, O'Brien DP. A homozygous PIGN missense mutation in Soft-Coated Wheaten Terriers with a canine paroxysmal dyskinesia. *Neurogenetics.* 2017 Jan;18(1):39-47.
- Ihara S, Nakayama S, Murakami Y, Suzuki E, Asakawa M, Kinoshita T, Sawa H. PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis. *J Cell Sci.* 2017 Feb 1;130(3):602-613.
- Pagnamenta AT, Murakami Y, Taylor JM, Anzilotti C, Howard MF, Miller V, Johnson DS, Tadros S, Mansour S, Temple IK, Firth R, Rosser E, Harrison RE, Kerr B, Popitsch N; DDD Study., Kinoshita T, Taylor JC, Kini U. Analysis of exome data for 4293 trios suggests GPI-anchor biogenesis defects are a rare cause of developmental disorders. *Eur J Hum Genet.* 2017 Mar 22. doi: 10.1038/ejhg.2017.32. [Epub ahead of print]
- Johnstone DL, Nguyen TT, Murakami Y, Kernohan KD, Tétreault M, Goldsmith C, Doja A, Wagner JD, Huang L, Hartley T, St-Denis A, le Deist F, Majewski J, Bulman DE; Care4Rare Canada Consortium., Kinoshita T, Dymont DA, Boycott KM, Campeau PM. Compound

heterozygous mutations in the gene PIGP are associated with early infantile epileptic encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 2017 Mar 7. doi: 10.1093/hmg/ddx077. [Epub ahead of print].

- Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, Murakami Y. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. *Hum Mutat.* 2017 Mar 23. doi: 10.1002/humu.23219. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 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 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2016.5.29 国内
- 第 68 回日本臨床化学会近畿支部例会 2016 年 7 月 9 日 **特別講演**「補体関連の遺伝子異常について—補体制御因子の異常を中心に—」 国内
- Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations; Atypical PNH, (Poster) Yoshiko Murakami, Norimitsu Inoue, Michi Kawamotoi, Nobuo Kohara, Taroh Kinoshita The 26th International Complement Workshop (XXVI ICW) 2016.9.5 国内
- 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月14日 村上良子 **教育講演**「PNHの発症機序」国内

- Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations; Atypical PNH,
ポスター Yoshiko Murakami,
Norimitsu Inoue, Michi Kawamotoi,
Nobuo Kohara, Taroh Kinoshita 58th
ASH Annual Meeting and Exposition
2016.12.2 San Diego, USA. 海外

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
該当無し
3. その他
該当無し

320 先天性グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)欠損症

概要

1. 概要

糖脂質からなる GPI アンカーは、ほ乳類の細胞においては 150 種以上の蛋白質の膜結合に用いられている。GPI が欠損するとこれらの全ての蛋白質が細胞表面に発現できない。現在までに 27 個の遺伝子が GPI アンカー型蛋白質の生合成や、修飾に必要であることがわかっている。最近、これらの遺伝子の変異による先天性グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)欠損症(Inherited GPI deficiency: IGD)が次々と見つかっており、現在までに 15 種類の遺伝子による IGD が報告されている。従来 Mabry 症候群として知られていた、高アルカリホスファターゼ(ALP)血症、精神運動発達遅滞・てんかんを呈する疾患が IGD であることが明らかになっているが、今後もオーバーラップする疾患が見つかると思われる。

2. 原因

GPI が欠損すると 150 種以上の GPI アンカー型蛋白質が細胞表面に発現できないので GPI 生合成遺伝子の完全欠損は胎生致死になる。IGD は 27 個の GPI 生合成や修飾に関わる遺伝子のうちのどれかが様々な程度に活性が低下した部分欠損症である。症状は細胞膜上の GPI アンカー型蛋白質の発現低下や構造異常によって起こり、変異遺伝子やその活性低下の程度により多様な症状を示す。症状のうち、てんかんの原因の一つとして GPI アンカー型蛋白質である ALP の発現低下が挙げられる。

3. 症状

必須症状は、精神・運動発達の遅れで、多くはてんかンを伴う。大田原症候群・ウエスト症候群など乳児早期発症の難治性てんかんと診断された患者のなかにも見つかっている。他によく見られる特徴として顔貌異常(両眼解離、テント状の口)、手指・足趾の異常(末節骨の短縮、爪の欠損等)、難聴、その他の奇形(肛門・直腸の異常、ヒルシュスプルング病、水腎症等)等がある。一部の患者では高 ALP 血症がみられるので、診断の良い指標となっている。末梢血顆粒球のフローサイトメトリー検査で GPI アンカー型タンパク質である CD16 の発現低下があることで診断が確定するが、責任遺伝子の同定のためにターゲットエクソームあるいは全エクソーム解析による遺伝子解析を必要とする。

4. 治療法

IGD にみられるてんかんの原因の一つとして、神経細胞表面に発現する ALP の発現低下によりビタミン B₆ の脱リン酸化がおこらないため、細胞内に取り込めないことがあげられる。細胞内のビタミン B₆ が欠乏すると、神経細胞の興奮を押さえる GABA 合成が低下するので痙攣発作がおこる。リン酸化のないビタミン B₆ (ピリドキシン)の投与がてんかん発作に有効な症例がある。その他にも有効な補充療法の開発にむけて研究が行われている。

5. 予後

遺伝子異常による疾患で、発生初期からの発達異常を伴うので根本治療は今のところない。症状の程度

は軽度の知的障害等から、最重度は多臓器の奇形や難治性てんかん、重度の精神・運動発達の遅れを呈して新生児・乳児期に死亡する。また胎内死亡の症例も報告されている。最重度の症例以外の多くは成人期まで生存し、痙攣のコントロール等の対症療法を中心とする長期の療養を要する。

要件の判定に必要な事項

1. 患者数
100 人未満
2. 発病の機構
未解明(遺伝子異常による疾患であるが病態については未解明)
3. 効果的な治療方法
未確立(根本的な治療法はない。種々の対症療法。ピリドキシンの補充療法が有効な症例がある。)
4. 長期の療養
必要(発症後、生涯にわたって治療の継続を要する。)
5. 診断基準
あり(学会承認の診断基準)
6. 重症度分類
Barthel Index を用いて、85 点以下を対象とする。

情報提供元

「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」

代表者 大阪大学微生物病研究所 准教授 村上良子

「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」

代表者 大阪大学微生物病研究所 准教授 村上良子

< 診断基準 >

Definite、Probableを対象とする。

A. 症状

1. 主症状

周産期異常を伴わない知的障害があり、多くは運動発達の遅れ、てんかんを伴い時に家族性に見られる。

2. 他に頻度の高い症状として以下の症状がある。

新生児期、乳児期早期発症の難治性てんかん

顔貌異常：両眼解離、幅の広い鼻梁、長い眼裂・テント状の口、口唇・口蓋裂、耳介の形態異常

手指、足趾の異常：末節骨の短縮、爪の欠損・低形成¹

その他の奇形：肛門・直腸の異常、無ガングリオン性巨大結腸、水腎症、心奇形など

難聴、眼・視力の異常

皮膚の異常：魚鱗癬など

筋緊張低下、関節拘縮、四肢の短縮

高アルカリホスファターゼ(ALP)血症

B. 検査所見

1. 多くは末梢血顆粒球のフローサイトメーター解析によりCD16の発現低下を示す。

2. 以下の検査所見が見られることがある。

高アルカリホスファターゼ(ALP)血症(年齢別正常値の上限を超える。)

手指・足趾のX線写真で末節骨欠損

聴性脳幹反応(ABR)の異常

脳MRIの拡散強調画像(DWI)にて基底核に高信号、進行性の小脳萎縮、髄鞘化の遅延

C. 遺伝学的検査

GPIアンカー型タンパク質の生合成および発現・修飾・輸送に関与する遺伝子(*PIGA*, *PIGY*, *PIGQ*, *PIGH*, *PIGC*, *PIGP*, *PIGL*, *PIGW*, *PIGM*, *PIGX*, *PIGV*, *PIGN*, *PIGB*, *PIGO*, *PIGF*, *PIGG*, *PIGZ*, *PIGK*, *PIGT*, *PIGS*, *GPAA1*, *PIGU*, *PGAP1*, *PGAP2*, *PGAP3*, *PGAP5*, *PGAP6* 等のいずれかに変異を認める。)

D. 鑑別診断

先天性GPI欠損症が原因でない大田原症候群、ウエスト症候群、ヒルシュスプルング病

< 診断のカテゴリー >

Definite:

(1) Aの1 + Bの1 + Cを満たすもの

(2) Bの1を満たさないが、Aの1 + Aの2のうち1項目以上 + Cを満たすもの*

Probable: Aの1 + Bの1を満たすもの

*備考: 病型によっては(PGAP1、PGAP3、PIGG 欠損症など) Bの1を満たさないものがあるので、

Aの1に加え、Aの2のうち1項目以上を満たしていれば遺伝子診断を行う。

この病型については診断のために遺伝子解析が必須である。

<重症度分類>

Barthel Index で 85 点以下を対象とする。

	質問内容	点数
1 食事	自立、自助具などの装着可、標準的時間内に食べ終える	10
	部分介助(たとえば、おかずを切って細かくしてもらう)	5
	全介助	0
2 車椅子からベッドへの移動	自立、ブレーキ、フットレストの操作も含む(歩行自立も含む)	15
	軽度の部分介助または監視を要する	10
	座ることは可能であるがほぼ全介助	5
	全介助または不可能	0
3 整容	自立(洗面、整髪、歯磨き、ひげ剃り)	5
	部分介助または不可能	0
4 トイレ動作	自立(衣服の操作、後始末を含む、ポータブル便器などを使用している場合はその洗浄も含む)	10
	部分介助、体を支える、衣服、後始末に介助を要する	5
	全介助または不可能	0
5 入浴	自立	5
	部分介助または不可能	0
6 歩行	45m以上の歩行、補装具(車椅子、歩行器は除く)の使用の有無は問わず	15
	45m以上の介助歩行、歩行器の使用を含む	10
	歩行不能の場合、車椅子にて 45m以上の操作可能	5
	上記以外	0
7 階段昇降	自立、手すりなどの使用の有無は問わない	10
	介助または監視を要する	5
	不能	0
8 着替え	自立、靴、ファスナー、装具の着脱を含む	10
	部分介助、標準的な時間内、半分以上は自分で行える	5
	上記以外	0
9 排便コントロール	失禁なし、浣腸、坐薬の取り扱いも可能	10
	ときに失禁あり、浣腸、坐薬の取り扱いに介助を要する者も含む	5
	上記以外	0
10 排尿コントロール	失禁なし、収尿器の取り扱いも可能	10
	ときに失禁あり、収尿器の取り扱いに介助を要する者も含む	5
	上記以外	0

診断基準及び重症度分類の適応における留意事項

- 1 . 病名診断に用いる臨床症状、検査所見等に関して、診断基準上に特段の規定がない場合には、いずれの時期のものを用いても差し支えない(ただし、当該疾病の経過を示す臨床症状等であって、確認可能なものに限る)。
- 2 . 治療開始後における重症度分類については、適切な医学的管理の下で治療が行われている状態で、直近6か月間で最も悪い状態を医師が判断することとする。
- 3 . なお、症状の程度が上記の重症度分類等で一定以上に該当しない者であるが、高額な医療を継続することが必要な者については、医療費助成の対象とする。

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 大阪府立成人病センター研究所・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ため、原因不明の知的障害やてんかんを持つ患者から、IGD を鑑別診断する事は極めて重要である。今回、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、第 2 回患者の会を行った。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から、先天性 GPI 欠損症 (IGD) を鑑別診断することは、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おうと共に、簡単にスクリーニングしたり、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。そこで、今回、研究代表者と協力して、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検討した。

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は、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、髄液中葉酸、
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 の啓発への取り組み

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
テムの構築を行った。

(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

第 2 回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が、より、
簡便に臨床データや遺伝子異常を入力できるよ
う改善した。

(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来たが、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、今回、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つた。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

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 Science in press*

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.

Roy, N., Ohtani, K., Matsuda, Y., Mori, K., Hwang, I., Suzuki, Y., Inoue, N., Wakamiya, N. Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 2016, 1860(6), 1118-1128.

Nakanishi, K., Kukita, Y., Segawa, H., Inoue, N., Ohue, M., Kato, K. Characterization of the T cell receptor beta chain repertoire in tumor infiltrating lymphocytes *Cancer Med.* 2016, 5(9), 2513-2521

Kojima-Kita, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Ogonuki, N., Ogura, A., Hasuwa, H., Akazawa, T., Inoue, N., Nakano, T. MIWI2 as an effector of DNA methylation and gene silencing in embryonic male germ cells *Cell Rep.* 2016, 16(11), 2819-2828.

2. 学会発表

がんが放出する乳酸によるヒストン修飾制御機構, 口頭, 井上徳光, 赤澤隆 第20回がん免疫学会, 2016/7/29, 国内

Application of CR4-targeting antitumor immunoadjuvant for an advanced dendritic cell therapy (Poster) Akazawa, T., Sugiura, K., Inaba, T., Inoue, N. XXVI International Complement Workshop 2016/9/6 Kanazawa, Japan

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations: Atypical PNH (Poster) Murakami, Y., Inoue, N., Kawamotoi, M., Kohara, N., Kinoshita, T. XXVI International Complement Workshop 2016/9/6 Kanazawa, Japan

Collectin CL-P1 is involved in C-reactive protein-mediated complement activation (Poster) Roy, N., Ohtani, K., Yasuyuki Matsuda, Y., Kenichiro Mori, K., Hwang, I., Suzuki, Y., Inoue, N., Wakamiya, N. XXVI International Complement Workshop 2016/9/6 Kanazawa, Japan

Establishment of a comprehensive complement examination system for complement-related diseases by the Japanese Association for Complement Research (Poster) Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Osawa, I., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Takahashi, M., Tsukamoto, H., Nakao, M., Nonaka, M., Matsushita, M., Yamamoto, T., Horiuchi, T., Wakamiya, N. XXVI International Complement Workshop 2016/9/6 Kanazawa, Japan

G. 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

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

先天性 GPI 欠損症の早期診断法の確立：血清葉酸受容体蛋白濃度

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) 欠損症の早期診断法を確立するために、末梢血のフローサイトメトリー (FACS) 解析によるスクリーニング陰性例について、偽陰性の可能性を検討した。

阪大微研での FACS スクリーニング陰性例は 10 例で、男性 3 例、女性 7 例、平均検査時年齢は 9.4 ± 5.8 歳であった。GPI アンカー型蛋白質(GPI-AP)の FOLR1 (Folate receptor)と FOLR2(Folate receptor)の血清中濃度を ELISA で測定した。

FOLR2 濃度は 10 例中 2 例 (5.77、5.56 ng/ml) でわずかにカットオフ値 (5.55 ng/ml) を超えていた。一方、FOLR1 の値は 10 検体ともカットオフ値より低値であった。

血清 FOLR2 の値は PIGA や PIGN ではカットオフより低い症例もあり、今後 FOLR2 軽度高値の 2 例について、他の血清 GPI アンカー蛋白の定量、遺伝子解析を行い、早期診断の精度向上につなげたい。

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おり、先天性 GPI 欠損症として認知されるようになり、14 疾患 97 例以上の報告がある。

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 欠損症の診断は末梢血のフローサイトメトリーによる解析 (FACS) で顆粒球表面の GPI-AP の低下で確定するが、低下が認められない場合でも否定はできないので、その場合の確定診断はターゲットシーケンスあるいはエクソ

ーム解析による遺伝子診断によっている。

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。2015 年度、我々は、先天性 GPI 欠損症の診断マーカーを見出すため、GPI-AP の中から主に神経系に発現している蛋白 5 種類 (H-Cad、CNTN4、EFNA4、OMG、RTN4RL2) と、神経系以外に主に発現している蛋白 4 種類 (SEMA7A、FOLR2、HYAL2、ITGB1) を選び、それらの血清濃度を ELISA で測定した。その中で、FOLR2 (Folate receptor)は PIGW、PIGQ、PIGL で高値となり、感度が 100% で診断マーカーの候補として報告した。

今回我々は、FACS で顆粒球表面の GPI-AP の低下が認められない症例で、血清 FOLR2 と FOLR1 の測定を行い、先天性 GPI 欠損症の診断における FACS 解析陰性例をレスキューできるか？検討した。FOLR2 は GPI-AP 型の葉酸受容体の一つで、葉酸を

細胞内に取り込み、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している。FOLR1 (Folate receptor) は、GPI-AP型葉酸受容体の一つで、葉酸の細胞内取り込みに関与しDNA合成促進に寄与する。肺、腎、気管、甲状腺、網膜、胎児期、他に発現している。

B. 研究方法

FOLR2はELISA Kit (DY5697, R and D systems, MN, USA) を用いて測定した。FOLR1はElisa Kit (LS-F26542-1, LifeSpan BioSciences, Seattle, USA) を用いた。

先天性 GPI 欠損症を疑われ、FACS解析によるスクリーニングを大阪大学微生物研究所にて施行され、顆粒球表面の GPI-AP の低下がないとされた症例 10 例の血清または血漿を用いた。男性 3 例、女性 7 例、検査時年齢は 9.4 ± 5.8 歳 (平均 \pm SD) であった。

疾病対照は、てんかん、不随意運動または脳腫瘍症例で、原因不明で正常発達または原因明確で GPI-AP 異常をきたさないと推定できる 47 例の血清を用いた。

(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、FOLR1 は年齢とともに低下した ($p=0.0430$)。FOLR2 には年齢による変化は認めなかった。カットオフ値は、疾病対照と先天性 GPI 欠損症の診断が確定している症例の値を用いて ROC 解析で決定し、FLOR2 は 5.55 ng/ml 、FLOR1 は 0.85 ng/ml であった。

表に示すように、FOLR2 濃度がわずかにカットオフ値を超える検体が 2 検体あった。一方、FOLR1 の値は全検体ともカットオフ値より低値であっ

た。今後 FLOR2 軽度高値の 2 例について、他の血清 GPI アンカー蛋白の定量、遺伝子解析を行い、臨床症状等の確認を進める予定である。

D. 考察

先天性 GPI 欠損症の診断は、臨床症状および画像所見等による臨床診断、末梢血顆粒球の CD59 などの細胞表面マーカー FACS 解析、遺伝子検査による確定診断と進められる。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先天性 GPI 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。

次の診断ステップである末梢血顆粒球の CD59 などの細胞表面マーカー FACS 解析では、全ての先天性 GPI 欠損症症例が GPI-AP の発現低下を示すとは限らないとされており、FACS での症例の見落としを防ぐ補完的な診断法が必要である。今回、FACS 陰性の 10 例中 2 例で FLOR2 の血清濃度がカットオフ (5.55 ng/ml) をわずかに超えていた (5.77 、 5.56 ng/ml)。血清 FLOR2 の値は PIGA では 4.40 ng/ml 、PIGN では 4.27 ng/ml とカットオフより低い症例もあり、今回の 2 例が先天性 GPI 欠損症を完全に否定できるかどうか？全エクソーム解析を含めて検討し、FLOR2 などの ELISA 測定が、FACS 偽陰性例のレスキューになり、早期診断に寄与できるか？検討していきたい。現在の全エクソーム解析では、診断確定までに数か月を待たねばならないこともあるが、血清 FLOR2、FLOR1 は多くの施設で測定可能である。先天性 GPI 欠損症を早期に見落としなく診断し、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、正確で迅速な診断法を確立することは重要である。

E. 結論

先天性 GPI 欠損症の FACS 解析による診断の補完的診断法として、GPI-AP である血清 FLOR2・FLOR1

濃度測定の有用性を検討した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yukitoshi Takahashi, Takashi Matsudaira, Hitoshi Nakano, Hirosato Nasu, Hitoshi Ikeda, Kentaro Nakaoka, Rumiko Takayama, Masayasu Oota, Immunological studies of cerebrospinal fluid from patients with CNS symptoms after human papillomavirus vaccination, *Journal of Neuroimmunology*, 2016; 298: 71-78.
2. Akihiko Miyauchi, Yukifumi Monden, Hitoshi Osaka, Yukitoshi Takahashi, Takanori Yamagata, A case of anti-NMDAR encephalitis presented hypotensive shock during plasma exchange, *Brain & Development*, 2016; 38(4): 427-430.
3. Yoshiaki Yamamoto, Kiyohito Terada, Yukitoshi Takahashi, Katsumi Imai, Yoshiyuki Kagawa, Yushi Inoue, Influence of antiepileptic drugs on serum lipid levels in adult epilepsy patients, *Epilepsy Research*, 2016; 127: 101-106.
4. Tatsuo Mori, Yukitoshi Takahashi, Nami Araya, Taikan Oboshi, Hirokazu Watanabe, Kazuki Tsukamoto, Tokito Yamaguchi, Shinsaku Yoshitomi, Hirosato Nasu, Hiroko Ikeda, Hideyuki Otani, Katsumi Imai, Hideo Shigematsu, Yushi Inoue, Antibodies against peptides of NMDA-type GluR in cerebrospinal fluid of patients with epileptic spasms, *European Journal of Paediatric Neurology*, 2016; 20: 865-873.
5. Takashi Matsudaira, Yukitoshi Takahashi, Kazumi Matsuda, Hitoshi Ikeda, Keiko Usui, Tomokazu Obi, Yushi Inoue, Cognitive dysfunction and regional cerebral blood flow changes in Japanese females following human papillomavirus vaccination, *Neurology and Clinical Neuroscience*, 2016; 4(6): 220-227.
6. Kazuyuki Inoue, Yoshiaki Yamamoto, Eri Suzuki, Toshiki Takahashi, Akiko Umemura, Yukitoshi Takahashi, Katsumi Imai, Yushi Inoue, Keita Hirai, Daiki Tsuji, Kunihiro Itoh, Factors that influence the pharmacokinetics of lamotrigine in Japanese patients with epilepsy, *Eur J Clin Pharmacol*. 2016; 72(5): 555-562.
7. Mori T, Imai K, Oboshi T, Fujiwara Y, Takeshita S, Saito H, Matsumoto N, Takahashi Y, Inoue Y. Usefulness of ketogenic diet in a girl with migrating partial seizures in infancy. *Brain & Development*, 2016; 38(6): 601-604.
8. Yuko Sato, Yurika Numata-Uematsu, Mitsugu Uematsu, Atsuo Kikuchi, Tojo Nakayama, Yosuke Kakisaka, Tomoko Kobayashi, Naomi Hino-Fukuyo, Hiroyoshi Suzuki, Yukitoshi Takahashi, Yoshiaki Saito, Naoyuki Tanuma, Masaharu Hayashi, Masaki Iwasaki, Kazuhiro Haginoya, Shigeo Kure, Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures: Pathological findings and a new therapeutic approach using tacrolimus, *Brain & Development*, 2016; 38(8): 772-776.
9. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, Katsumi Imai, Yoshiyuki Kagawa, Yushi Inoue, Effect of CYP inducers/inhibitors on the topiramate concentration: Clinical value of therapeutic drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 2017; 39: 55-61.
10. Hidenori Kido, Osamu Kano, Asami Hamai, Hiroyuki Masuda, Yutaka Fuchinoue, Masaaki Nemoto, Chiaki Arai, Teppei Takeda, Fumihito Yamabe, Toshihiro Tai, Mizuki Kasahara, Kenichi Suzuki, Nobuyuki Shiraga, Sota Sadamoto, Megumi Wakayama, Yukitoshi Takahashi, Yasuo Iwasaki, Kazutoshi Shibuya, Yoshihisa Urita, Kikuchi-Fujimoto disease (histiocytic necrotizing lymphadenitis) with atypical encephalitis and painful testitis: a case report, *BMC Neurology* 2017 17:22.
11. Kimizu T, Takahashi Y, Oboshi T, Horino A, Koike T, Yoshitomi S, Mori T, Yamaguchi T, Ikeda H, Okamoto N, Nakashima M, Saito H, Kato M, Matsumoto N, Imai K., A case of early onset epileptic encephalopathy with de novo mutation in SLC35A2: Clinical features and treatment for epilepsy, *Brain & Development*, 2017; 39: 256-260.
12. Ryuki Matsuura, Shin-ichiro Hamano, Satoru Ikemoto, Yuko Hirata, Kotoko Suzuki, Kenjiro Kikuchi, Yukitoshi Takahashi, Epilepsy with myoclonic atonic seizures and chronic cerebellar symptoms associated with antibodies against glutamate receptors N2B and D2 in serum and cerebrospinal fluid, *Epileptic disorders*, 2017; 19(1): 94-98.
13. Yuki Nagasako, Yasuhisa Sakurai, Izumi Sugimoto, Yukitoshi Takahashi, Keiko Tanaka, Subacute lobar encephalitis presenting as cerebellar ataxia and generalized cognitive impairment with positive anti-glutamate receptor antibodies, *Neurology and Clinical Neuroscience*, in press.
14. Yamaguchi Y, Torisu H, Kira R, Ishizaki Y, Sakai Y, Sanefuji M, Ichiyama T, Oka A, Kishi T, Kimura S, Kubota M, Takanashi J, Takahashi Y, Tamai H, Natsume J, Hamano S, Hirabayashi S, Maegaki Y, Mizuguchi M,

- Minagawa K, Yoshikawa H, Kira J, Kusunoki S, Hara T, A Nationwide Survey of Pediatric Acquired Demyelinating Syndromes in Japan, *Neurology*, in press.
15. John C Kingswood, Guillaume B d' Augères, Elena Belousova, José C Ferreira, Tom Carter, Ramon Castellana, Vincent Cottin, Paolo Curatolo, Maria Dahlin, Petrus J de Vries, Martha Feucht, Carla Fladrowski, Gabriella Gislimberti, Christoph Hertzberg, Sergiusz Jozwiak, John A Lawson, Alfons Macaya, Rima Nabbout, Finbar O' Callaghan, Mirjana P Benedik, Jiong Qin, Marques Ruben, Valentin Sander, Matthias Sauter, Yukitoshi Takahashi, Renaud Touraine, Sotiris Youroukos, Bernard Zonnenberg, Anna C Jansen on behalf of TOSCA consortium and TOSCA investigators, Tuberous Sclerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) - baseline data on 2093 patients, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, in press.
 16. Ikura T, Katsuse O, Chiba Y, Takahashi Y, Fujishiro H, Kamada A, Saito T, Hirayasu Y. Evaluation of titers of antibodies against peptides of subunits NR1 and NR2B of glutamate receptor by enzyme-linked immunosorbent assay in psychiatric patients with anti-thyroid antibodies. *Neurosci Lett*. 2016 Aug 15; 628: 201-6. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.028. Epub 2016 Jun 16.
 17. Gon J, Takehisa Y, Yada Y, Kishi Y, Oshima E, Takahashi Y, Takaki M. Encephalitis With Antibodies to GluN2B During Administration of Clozapine. *Clin Neuropharmacol*, in press.
 18. Toshihiro Jogamoto, Yoshiaki Yamamoto, Mitsumasa Fukuda, Yuka Suzuki, Katsumi Imai, Yukitoshi Takahashi, Yushi Inoue, Yoko Ohtsuka, Add-on stiripentol elevates serum valproate levels in patients with or without concomitant topiramate therapy, *Epilepsy Research*, in press.
 19. Taku Omata, Kazuo Kodama, Yoshimi Watanabe, Yukiko Iida, Yoshiaki Furusawa, Akiko Takashima, Yukitoshi Takahashi, Hiroshi Sakuma, Keiko Tanaka, Katsunori Fujii, and Naoki Shimojo, Ovarian Teratoma Development after Anti-NMDA Receptor Encephalitis Treatment, *Brain & Development*, in press.
 20. Shin-Seok Lee, D. Park, Y. Takahashi, J. Kang, Y. Yim, J. Kim, J. Lee, K. Lee, J. Lee, S. Lee, Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies are associated with fibromyalgia in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study, *Clinical and Experimental Rheumatology*, in press.
 21. Oikawa Y, Okubo Y, Numata-Uematsu Y, Aihara Y, Kitamura T, Takayanagi M, Takahashi Y, Kure S, Uematsu M, Initial vasodilatation in a child with reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *J Clin Neurosci*. 2017 Feb 10. pii: S0967-5868(16)31065-7. doi: 10.1016/j.jocn.2017.01.010. [Epub ahead of print]
 22. 四家達彦、高橋幸利、木村暢佑、今井克美、山下行雄、山本俊至、高橋孝雄、治療戦略の変更によりADLを改善し得たCDKL5異常症による難治性てんかんの女児例、*脳と発達*、2017; 49: 28-31.
 23. 西口奈菜子、里龍晴、原口康平、井上大嗣、渡邊聖子、渡邊嘉章、高橋幸利、森内浩幸、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の補助診断法としての脳血流シンチグラフィの有用性、*脳と発達*、2017; 49: 46-50.
 24. 束本和紀、高橋幸利、高山留美子、Rufinamideが長期に奏功しているLennox-Gastaut症候群の3小児例、*脳と発達*、2017; 49: 54-56.
 25. 山本路華、古谷剛、高橋幸利、羽鳥浩三、N-Methyl-D-Aspartate型グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎患者の一例における、認知機能の回復過程とリハビリテーション経過、*運動障害* 2016; 26(2): 91-98.
 26. 金子知香子、ノーシャリナ・シェークスピア、土屋真理夫、久保仁、山本悌司、片山宗一、高橋幸利、NMDA型GluRサブユニット抗体陽性脳炎5症例の臨床的解析、*Brain and Nerve*、2016; 68(9):1099-1107.
 27. 元木崇裕、中川栄二、小一原玲子、高橋幸利、竹下絵里、石山昭彦、齋藤貴志、小牧宏文、須貝研司、佐々木征行、免疫グロブリン治療が奏功したてんかん性脳症例、*脳と発達*、2016; 48(4):277-281.
 28. 千葉悠平、勝瀬大海、齋藤知之、須田顕、鎌田鮎子、伊倉崇浩、阿部紀絵、戸代原奈央、山口博行、佐藤由佳、高橋幸利、平安良雄、慢性自己免疫性脳炎を疑った際の検査、治療についての取り組みの紹介、*精神科治療学*、印刷中。
 29. 月田和人、下竹昭寛、中谷光良、高橋幸利、池田昭夫、高橋良輔、辺縁系脳炎で発症した神経梅毒の1例、*臨床神経*、印刷中。
2. 学会発表
 1. Yukitoshi Takahashi, Early clinical diagnosis & evidence for treatment in immune-mediated encephalitis with antibodies to NMDA-type GluRs, The 18 th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, July 1-3, 2016, Tokyo.
 2. Yukitoshi Takahashi, Akiko Oota, Yushi Inoue, Jun Tohyama, Hiroshi Fujita, Nishizato Chizuru, Jyunya Takahashi, Shigeki Tanaka, Nagao Masayoshi, Shiraga

Hiroshi, Hideo Kaneko, Yasuko Sawai, West syndrome NHO-Japan 342 ACTH cases study: Developmental outcome of the initial ACTH therapy, 第 58 回日本小児神経学会、2016 年 6 月 2-5 日、東京.

3. 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、村上良子、木下タロウ、井上徳光、九鬼一郎、鈴木保宏、谷河純平、田中総一郎、高山留美子、血清 GPI アンカー蛋白定量による先天性 GPI 欠損症スクリーニング、第 58 回日本小児神経学会学術集会、2016 年 6 月 3-5 日 東京.
4. 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：発作時脳波・SPECT を主体に、第 58 回日本小児神経学会、2016 年 6 月 2-5 日、東京.
5. 高橋幸利、太田晶子、井上有史、遠山潤、藤田浩史、池田ちづる、高橋純哉、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：結節性硬化症 27 症例、第 9 回日本てんかん学会東海・北陸地方会、2016 年 7 月 9 日、福井.

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
 - 2016 年 9 月 26 日：認知症モデル動物の製造方法及び認知症モデル動物、発明者：高橋幸利 特願 2016-186813 号、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団.
 - 2016 年 12 月 22 日：人体用エアバック装置、発明人：株式会社 プロップ 代表取締役・内田光也、東京都立産業技術高等専門学校、吉村拓巳、高橋幸利、他 特許第 6063110 号
 - 2017 年 3 月？日（未確定）：人体用送風装置、発明人：株式会社プロップ 市村良子、早稲田大学 田村 俊世、首都大学東京 東京都立産業技術高等専門学校 吉村 拓巳、大阪大学 大野 優子、静岡てんかん・神経医療センター、高橋幸利、特願 2017-PA00305 号、出願：株式会社 プロップ.
2. 実用新案登録
該当なし.
3. その他
該当なし.

表

FACS 解析スクリーニング陰性例の血清 FOLR1・FOLR2 濃度 (ELISA)

患者	性	検査時年齢	FOLR2 (ng/ml)	FOLR1(ng/ml)
IGD 130	F	11	5.25	0.70
IGD 107	M	22	3.84	0.51
IGD 102	M	9	3.68	0.67
IGD 133	F	10	5.77	0.73
IGD 101	F	2	4.20	0.60
IGD 131	F	2	5.56	0.82
IGD 97	F	6	4.87	0.69
IGD 118	F	8	4.00	0.58
IGD 98	M	11	4.32	0.52
IGD 105	F	13	4.44	0.57
Cut off level			5.55	0.85

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出 版 社 名	出版地	出版年	ページ
Inoue, N Kinoshita, T	Pathogenesis of Clonal Dominance in PNH; Growth Advantage in PNH.	Kanakura, Y., Kinoshita, T. and Nishimura, J.	<i>Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria-From bench to bedside</i>	Springer Japan	Tokyo	2017	229-251
<u>Yukitoshi Takahashi</u> et al.,	Autoimmune-mediated encephalitis with antibodies to NMDA-type GluRs: Early clinical diagnosis.	Yamanouchi H, et al.,	Acute Encephalopathy and Encephalitis in Infancy and Its Related Disorders.	Elsevier		2017 in press	
Kiyoshi Egawa, <u>Yukitoshi Takahashi</u>	Epilpepsy in Dentato-rubro-pallido-luysian atrophy (DRPLA).	Shorvon et al.,	The Causes of Epilepsy.	Cambridge University Press		in press	
高橋幸利	診断（免疫・その他の診断）	日本てんかん学会	てんかん白書～てんかん医療・研究のアクションプラン	南江堂	東京	2016年 10/20	39-40
丸栄一、岡田元宏、兼子直、柿田明美、高橋幸利	基礎研究とトランスレーショナル研究	日本てんかん学会	てんかん白書～てんかん医療・研究のアクションプラン	南江堂	東京	2016年 10/20	157-162
高橋幸利	臨床研究(小児期)	日本てんかん学会	てんかん白書～てんかん医療・研究のアクションプラン	南江堂	東京	2016年 10/20	163-165
高橋幸利、堀野朝子	Rasmussen脳炎（症候群）		稀少てんかん診療指標	診断と治療社	東京	印刷中	
高橋幸利、小池敬義	その他の内科的薬物治療		稀少てんかん診療指標	診断と治療社	東京	印刷中	
高橋幸利、大松泰生	免疫とてんかん		稀少てんかん診療指標	診断と治療社	東京	印刷中	
高橋幸利	免疫介在性てんかん/抗体介在性てんかん（てんかんの自己抗体を含む）	須貝研司	てんかん学用語事典	診断と治療社	東京	印刷中	

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
Makrythanasis P, Kato M, Zaki MS, Saitsu H, Nakamura K, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima M, Issa MY, Guipponi M, Letourneau A, Logan CV, Roberts N, Parry DA, Johnson CA, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, <u>Murakami Y.</u> (Correspondence)	Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia	<i>Am J Hum Genet.</i>	98(4)	615-26	2016
Knaus A, Awaya T, Helbig I, Afawi Z, Pendziwiat M, Abu-Rachma J, Thompson MD, Cole DE, Skinner S, Annese F, Canham N, Schweiger MR, Robinson PN, Mundlos S, Kinoshita T, Munnich A, Murakami Y,	Rare Noncoding Mutations Extend the Mutational Spectrum in the PGAP3 Subtype of Hyperphosphatasia with Mental Retardation Syndrome.	<i>Hum Mutat.</i>	37(8)	737-44	2016

Hogrebe M, Murakami Y, Wild M, Ahlmann M, Biskup S, Hörtnagel K, Grüneberg M, Reunert J, Linden T, Kinoshita T, Marquardt T.	A novel mutation in PIGW causes glycosylphosphatidylinositol deficiency without hyperphosphatasia.	Am J Med Genet A.	170(12)	3319-3322	2016
Edvardson S, Murakami Y, Nguyen TT, Shahrour M, St-Denis A, Shaag A, Damseh N, Le Deist F, Bryceson Y, Abu-Libdeh B, Campeau PM, Kinoshita T, Elpeleg O.	Mutations in the phosphatidylinositol glycan C (<i>PIGC</i>) gene are associated with epilepsy and intellectual disability.	J Med Genet.	54(3)	196-201	2016
Lee GH, Fujita M, Takaoka K, Murakami Y, Fujihara Y, Kanzawa N, Murakami KI, Kajikawa E, Takada Y, Saito K, Ikawa M, Hamada H, Maeda Y, Kinoshita T.	A GPI processing phospholipase A2, PGAP6, modulates Nodal signaling in embryos by shedding CRIPTO.	J Cell Biol.	215(5)	705-718.	2016

Kolicheski AL, Johnson GS, Mhlanga-Mutangad ura T, Taylor JF, Schnabel RD, Kinoshita T, <u>Murakami Y</u> , O'Brien DP.	A homozygous PIGN missense mutation in Soft-Coated Wheaten Terriers with a canine paroxysmal dyskinesia.	Neurogenetics.	18(1)	39-4720 16	
Pagnamenta AT, <u>Murakami Y</u> , Taylor JM, Anzilotti C, Howard MF, Miller V, Johnson DS, Tadros S, Mansour S, Temple IK, Firth R, Rosser E, Harrison RE, Kerr B, Popitsch N DDD Study., Kinoshita T, Taylor JC, Kini U.	Analysis of exome data for 4293 trios suggests GPI-anchor biogenesis defects are a rare cause of developmental disorders.	Eur J Hum Genet.	doi: 1 0.1038 /ejhg.2 017.32		2017
Ihara S, Nakayama S, <u>Murakami Y</u> , Suzuki E, Asakawa M, Kinoshita T, Sawa H.	PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis.	J Cell Sci.	1 ; 1 3 0 (3)	602-613	2017
Johnstone DL, Nguyen TT, <u>Murakami Y</u> , Kernohan KD, Tétreault M, Goldsmith C, Doja A, Wagner JD, Huang L, Hartley T, St-Denis A, le Deist F, Majewski J, Bulman DE;	Johnstone DL, Nguyen TT, <u>Murakami Y</u> , Kernohan KD, Tétreault M, Goldsmith C, Doja A, Wagner JD, Huang L, Hartley T, St-Denis A, le Deist F, Majewski J, Bulman DE;	Hum Mol Genet.	doi: 1 0.1093 /hmg/d dx077. [Hum M utat	2017

Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, <u>Murakami Y.</u>	Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties.	Hum Mutat.			
Kojima-Kita, K., Kuramochi-Miyaga wa, S., Ogonuki, N., Ogura, A., Hasuwa, H., Akazawa, T., <u>Inoue, N., Nakano, T.</u>	MIWI2 as an effector of DNA methylation and gene silencing in embryonic male germ cells	MIWI2 as an effector of DNA methylation and gene silencing in embryonic male germ cells			
Nakanishi, K., Ku kita, Y., Segawa, H., <u>Inoue, N.</u> , Ohu e, M., Kato, K.	Characterization of the T cell receptor beta chain repertoire in tumor infiltrating lymphocytes	<i>Cancer Med.</i>	5(9)	2513-2521	2016
Roy, N., Ohtani, K., Matsuda, Y., M ori, K., Hwang, I., Suzuki, Y., <u>Inoue, N., Wakamiya, N.</u>	Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation.	<i>Biochim Biophys Acta - General Subjects</i>	1860(6)	1118-1128	2016
Roy, N., Ohtani, K., Hidaka, Y., Am ano, Y., Matsuda, Y., Mori, K., Hwan g, I., <u>Inoue, N., W akamiya, N.</u>	Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1	<i>Biochim Biophys Acta - General Subjects</i>	861(2)	1-14	2017

Ohashi, T., Aoki, M., Tomita, H., Akazawa, T., Sato, K., Kuze, B., Mizuta, K., Hara, A., Nagaoaka, H., Inoue, N., and Ito, Y.	M2-like macrophage polarization in high lactate acid-producing head and neck cancer	<i>Cancer Science</i>				2017 <i>in press</i>
Yukitoshi Takahashi et al.,	Immunological studies of cerebrospinal fluid from patients with CNS symptoms after human papillomavirus vaccination.	Journal of Neuroimmunology	298	71-78		2016
Akihiko Miyauchi, Yukitoshi Takahashi et al.,	A case of anti-NMDAR encephalitis presented with hypotensive shock during plasma exchange.	Brain & Development.	38(4)	427-430		2016
Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi et al.,	Influence of antiepileptic drugs on serum lipid levels in adult epilepsy patients.	Epilepsy Research	127	101-106		2016
Tatsuo Mori, Yukitoshi Takahashi et al.,	Antibodies against peptides of NMDA-type GluR in cerebrospinal fluid of patients with epileptic spasms.	European Journal of Pediatric Neurology.	20	865-873		2016
Takashi Matsudaira, Yukitoshi Takahashi et al.,	Cognitive dysfunction and regional cerebral blood flow changes in Japanese females following human papillomavirus vaccination.	Neurology and Clinical Neuroscience	4(6)	220-227		2016
Kazuyuki Inoue, Yukitoshi Takahashi et al.,	Factors that influence the pharmacokinetics of lamotrigine in Japanese patients with epilepsy.	Eur J Clin Pharmacol.	72(5)	555-562		2016
Mori T, Takahashi Y et al.,	Usefulness of ketogenic diet in a girl with migrating partial seizures in infancy.	Brain & Development.	38(6)	601-604		2016
Yuko Sato, Yukitoshi Takahashi et al.,	Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures: Pathological findings and a new therapeutic approach using tacrolimus.	Brain & Development	38(8)	772-776		2016
Yuki Nagasako, Yukitoshi Takahashi et al.,	Subacute lobar encephalitis presenting as cerebellar ataxia and generalized cognitive impairment with positive anti-glutamate receptor antibodies.	Neurology and Clinical Neuroscience	4(6)	239-242		2016
Yamaguchi Y, Takahashi Y et al.,	A Nationwide Survey of Pediatric Acquired Demyelinating Syndromes in Japan.	Neurology	87(19)	2006-2015		2016
Ikura T, Takahashi Y et al.,	Evaluation of titers of antibodies against peptides of subunits NR1 and NR2B of glutamate receptor by enzyme-linked immunosorbent assay in psychiatric patients with anti-thyroid antibodies.	Neurosci Lett.	628	201-206		2016

Gon J, <u>Takahashi Y</u> et al.,	Encephalitis With Antibodies to GluN2B During Administration of Clozapine.	Clin Neuropharmacol.	39(6)	320-321	2016
John C Kingswood, <u>Yukitoshi Takahashi</u> et al.,	Tuberous Sclerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) – baseline data on 2093 patients.	Orphanet Journal of Rare Diseases	12(1)		2017
Yoshiaki Yamamoto, <u>Yukitoshi Takahashi</u> et al.,	Effect of CYP inducers/inhibitors on the topiramate concentration: Clinical value of therapeutic drug monitoring.	Therapeutic Drug Monitoring	39(1)		2017
Toshihiro Jogamoto, <u>Yukitoshi Takahashi</u> et al.,	Add-on stiripentol elevates serum valproate levels in patients with or without concomitant topiramate therapy.	Epilepsy Research	130	7-12	2017
Kimizu T, <u>Takahashi Y</u> et al.,	A case of early onset epileptic encephalopathy with de novo mutation in <i>SLC35A2</i> : Clinical features and treatment for epilepsy.	Brain & Development			in press
Taku Omata, <u>Yukitoshi Takahashi</u> et al.,	Ovarian Teratoma Development after Anti-NMDA Receptor Encephalitis Treatment.	Brain & Development			in press
Ryuki Matsuura, <u>Yukitoshi Takahashi</u> et al.,	Epilepsy with myoclonic atonic seizures and chronic cerebellar symptoms associated with antibodies against glutamate receptors N2B and D2 in serum and cerebrospinal fluid.	Epileptic disorders			in press
Shin-Seok Lee, D. Park, <u>Y. Takahashi</u> , J. Kang, Y. Yim, J. Kim, J. Lee, K. Lee, J. Lee, S. Lee	Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies are associated with fibromyalgia in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study	Clinical and Experimental Rheumatology			in press
Oikawa Y, Okubo Y, Numata-Uematsu Y, Aihara Y, Kitamura T, Takayanagi M, <u>Takahashi Y</u> , Kure S, Uematsu M,	Initial vasodilatation in a child with reversible cerebral vasoconstriction syndrome	J Clin Neurosci.			in press
高橋幸利、西村成子、高尾恵美子、笠井理沙、榎田かおる、窪田美佐子	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.	Neuroinfection	21	121-127	2016
高橋幸利、木水友一、小池敬義、堀野朝子	自己免疫性脳炎/脳症.	神経治療学	33	19-26	2016

高橋幸利、木水友一、 小池敬義、堀野朝子、 山口解冬、吉富晋作	免疫介在性てんかん.	Modern Physician	36(7)	785-789	2016
村上綾、中村正孝、 金子鋭、高橋幸利、 日下博文	髄膜炎症状で発症後に視神経炎を呈し、抗グルタミン酸受容体抗体が検出された急性辺縁系脳炎の一例.	Brain and Nerve	68(3)	283-288	2016
小松稔典、渡部理恵、 佐藤俊一、高橋幸利、 矢彦沢裕之	急性精神病症状で発症し、常同運動をきたした非腫瘍合併抗 NMDA 受容体脳炎の 1 例.	内科	118(5)	999-1003	2016
金子知香子、高橋幸利、他	NMDA型GluRサブユニット抗体陽性脳炎5症例の臨床的解析.	Brain and Nerve	68(9)	1099-1107	2016
元木崇裕、中川栄二、 小一原玲子、高橋幸利、 竹下絵里、石山昭彦、 齋藤貴志、小牧宏文、 須貝研司、佐々木征行	免疫グロブリン治療が奏功したてんかん性脳症例.	脳と発達	48	277-281	2016
高橋幸利	先生の知りたい最新医学がここにある： 「小児てんかん」	健	45(10)	48-50	2017
四家達彦、高橋幸利、 木村暢佑、今井克美、 山下行雄、山本俊至、 高橋孝雄	治療戦略の変更により ADL を改善し得た CDKL5 異常症による難治性てんかんの女児例.	脳と発達	49	28-31	2017
西口奈菜子、里龍晴、 原口康平、井上大嗣、 渡邊聖子、渡邊嘉章、 高橋幸利、森内浩幸	非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の補助診断法としての脳血流シンチグラフィの有用性.	脳と発達	49	46-50	2017
束本和紀、高橋幸利、 高山留美子	Rufinamideが長期に奏功しているLennox-Gastaut症候群の3小児例.	脳と発達	49	54-56	2017
月田和人、下竹昭寛、 中谷光良、高橋幸利、 池田昭夫、高橋良輔	辺縁系脳炎で発症した神経梅毒の1例.	臨床神経学	57	37-40	2017

千葉悠平、勝瀬大海、 斎藤知之、須田顕、 鎌田鮎子、伊倉崇浩、 阿部紀絵、戸代原奈 央、山口博行、佐藤 由佳、高橋幸利、平 安良雄	慢性自己免疫性脳炎を疑った際の検査、治療に ついての取り組みの紹介.	精神科治療学			印刷中
高橋幸利、西村成子、 高尾恵美子、笠井理 沙、榎田かおる	非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の分子病態.	Neuroinfection			印刷中
高橋幸利、松平敬史	ヒトパピローマウイルス（子宮頸がん）ワクチ ン後にみられる中枢神経関連症状.	日本内科学会雑誌			印刷中