

令和元年6月13日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09620

研究課題名(和文) Glut-1欠損症の新規診断法・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic and therapy for glucose transporter 1 deficiency syndrome

研究代表者

青天目 信 (Nabatame, Shin)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30570072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：グルコーストランスポーター1欠損症は、脳にグルコースを取り込むGLUT1の機能低下により、難治てんかん、種々の運動異常や知的障害などを呈する。代替エネルギー源となるケトン食療法が有効だが厳格な調整が必要で、診断は遺伝子診断や輸送体活性検査だが、後者は可能な地域が少ない。

簡便な輸送体活性検査と新たな薬物治療の開発を目指したが、検査は再現性を得られず、薬物治療は、臨床研究法の改正後に必要な研究の質を保てる体制になく、断念した。

自然歴研究に目的を切り替え、重度の遺伝子変異を有する患者では重症になり、髄液糖や髄液糖/血糖比が発達や小脳運動失調などの重症度と相関することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルコーストランスポーター1欠損症の自然歴を研究して、重症度を規定する因子を明らかにした。遺伝子変異型により重症度が異なることは、以前から指摘されていたが、髄液糖や髄液糖/血糖比といった生化学的指標が、発達指数や小脳運動失調の重症度スケールといった定量的指標と相関することを示したのは、初めてである。このことにより、患者の重症度を予測することが可能となった。稀少疾患であるため、大規模な介入研究はできないため、早期介入の効果判定や新規治療を開発した時の対照データとして、こうした生化学的指標を基準に用いることができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Glucose transporter 1 deficiency syndrome is caused by a decrease of glucose uptake by the brain and causing refractory epilepsy, various movement disorders, and intellectual disability. A ketogenic diet is effective but it requires strict control. It is diagnosed via genetic analysis or transporter activity assay, although the latter is not available in most countries.

We aimed to develop a concise transporter activity assay, however, the assay failed to demonstrate reproducibility. Further, we aimed to develop a novel drug therapy system; however, we failed to construct a system with adequate quality of monitoring.

Therefore, we studied the natural history of the syndrome and we found that mutation type influenced the disease severity. Biochemical properties, including cerebrospinal fluid glucose levels and the ratio of cerebrospinal fluid to blood glucose correlated well with clinical severity, including developmental quotient and cerebellar ataxia scale.

研究分野：小児神経学

キーワード：グルコーストランスポーター1欠損症 小児神経学 先天代謝異常 神経科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血液から中枢神経に、脳の主たるエネルギー源であるグルコースを取り込む際には、脳内の血管内皮に発現しているグルコーストランスポーター 1 (GLUT1) が必須である。GLUT1 欠損症では、この GLUT1 の機能低下により、知的障害、難治性てんかん、種々の運動異常を呈する。

GLUT1 欠損症では、髄液糖が低値で、髄液糖/血糖比が低下している。GLUT1 欠損症の確定診断は、GLUT1 の輸送体活性を測定する検査か、遺伝子検査により行う。遺伝子検査は、GLUT1 をコードする SLC2A1 遺伝子の塩基配列を調べるが、古典例でも 1-2 割の患者で変異を検出できない。輸送体活性の測定は、放射性同位元素 (RI) で標識された [14C]3-O-methyl glucose (3OMG) の赤血球取り込み能力を測定するが、RI を用いるため、簡便に検査することは難しかった。世界的にも、3OMG 赤血球取り込み能を検査できる地域は少なく、日本国内でも、現在 3OMG 赤血球取り込み能を検査できる施設はない。したがって、典型例でも、遺伝子検査が陰性の場合、髄液糖が低値で、症状が典型的であれば、GLUT1 欠損症と暫定診断して、食事療法を開始することが勧められている。

また、脳はグルコース以外に、GLUT1 ではない別の輸送体を介して脳内に取り込まれるケトン体もエネルギー基質として用いることができる。ケトン体を効率的に産生するために有用なのは、ケトン食療法や修正アトキズ食といった食事療法で、GLUT1 欠損症では有用な食事療法となっている。ケトン食療法は、炭水化物を制限し、脂質を多く摂取する食事、修正アトキズ食は、高度に炭水化物を制限する食事である。これらの食事療法で、てんかんや小脳運動失調、易疲労性などの症状は改善する。しかし、炭水化物は通常食に多く含まれる栄養素であり、それを制限した食品を調理するためには、かなりの学習と熟練を必要とし、家族の負担が大きい。特に、保護者が高齢化した時、疾病罹患時の対応は、困難である。以上から、食事療法に変わる簡便な治療法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

この研究には 2 つの目的がある。

- (1) 放射性同位元素を用いずに輸送体活性を測定できる、簡便な診断方法の確立
- (2) ケトン食療法・修正アトキズ食に代わる、もしくは食事療法を緩和可能な新たな治療法の確立

### 3. 研究の方法

#### (1) 赤血球のグルコース輸送体活性測定系

赤血球の膜表面に存在するグルコーストランスポーターも GLUT1 のみであり、赤血球の糖取り込み能を測定することで、GLUT1 の活性を測定できる。非 RI によるグルコースの代謝を調べる方法が報告され、我々は、それらを順次試すこととした。

赤血球が浮遊した培養液の糖濃度を測定する方法

洗浄赤血球を DMEM 培養液に浮遊させ、経時的に培養液中のグルコース濃度を測定した。

2-NBDG を用いる方法

NBDG は蛍光分子をグルコースに結合させた物質であり、475nm の励起光を照射すると 550nm の蛍光を発する (Yamada K, et al. 2007)。

2DG 代謝速度測定キット (コスモバイオ社) を使用する方法

2DG は、グルコースと同様に細胞内に取り込まれ、G6PDH により酸化されるが、酸化反応速度は、通常のグルコースの 1000 倍程度遅い (Chi MM et al. 1987)。先に細胞内に生理的に存在している G6P は、低濃度の G6PDH で酸化すると分解され、2DG6P のみが残る。次いで高濃度の G6PDH で 2DG6P を酸化させると、その結果 NADPH が生じ、そこから酵素反応を進めてできた DTNB を発光させて吸光度分析で定量するという方法で、取り込まれた 2DG の量を測定できる。

#### (2) 代替療法の確立

ケトン体と同様に MCT1 により取り込まれる物質で、経口摂取可能で、先行研究における患者使用時に、大きな副作用のない物質として、ピルビン酸を候補として考えた。投与量は、先行研究で用いられた 0.5g/kg/日とした。試験方法は、前方視的非対称非無作為化被盲検試験、患者や患者家族に試験内容について説明して同意を取得することとした。投与開始前に、神経学的診察、画像検査、脳波検査、電気生理検査、知能検査を行い、治療開始後 2 週間、1 か月、3 か月、1 年で評価することとした。

#### (3) 自然歴研究

後述のように、代替療法ができなかったため、別の研究を行うことに目的を切り替えた。もともと、国内でも 100 名以下しか診断されていない疾患であり、患者の年齢もまちまちである。また、食事療法が有効であることは明らかのため、既に治療が開始されている。また、統一した基準で経過観察されているとは限らない。そこで、新規に介入試験を行って臨床像に変化が出現しても、介入の結果が、自然経過によるものか不明であり、患者間で重症度に差があっても、それが本人の重症度によるものか、介入を経た結果なのか判断できないと考えられた。そこで、重症度を予測する因子を決定し、臨床像と相関関係を認められるような因子を探すこととした。

大阪大学医学部附属病院で診療歴のある患者について、後方視的に診療録から臨床情報を抽

出した。生化学的な重症度を示すと考えられる髄液糖値や髄液糖/血糖比や、遺伝子変異の型と、診療の過程で得られた重症度を示す所見(発達指数と異常運動のスコアリングシステム)との対応を検討し、有意差があるか、相関関係が成立するものがあるかを検討した。

異常運動の評価は、GLUT1 欠損症で常時出現している異常運動で、観察・評価をしやすい小脳運動失調を選択し、Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) (Schmitz-Hübisch T, et al. 2006)を用いた。

遺伝子変異の型と重症度の対応については、Mann-Whitney U テスト、生化学的異常と重症度の相関関係の検討については、Pearson の相関係数を用いた。統計ソフトは、SPSS ver25.0 (IBM Corp, New York)と用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 赤血球のグルコース輸送活性測定系

赤血球が浮遊した培養液の糖濃度を測定する方法

健常人で行った予備実験では、一定の速度で低下していたが、再検以降は不安定となり、再現性が得られなかったため、断念した。

2-NBDG(Wako 社)を用いる方法

この実験は、蛍光が極めて弱く、測定できずに、成功しなかった。

2DG 代謝速度測定キット(コスモバイオ社)を使用する方法

この実験に取り組んだ時点では、キットが高価であり、実用化するのは困難と考えられて、行わなかった。

以上、工夫しながら実験を行ったが、断念した。

##### (2) 代替療法の確立

本研究を計画した後、臨床研究法の見直し行われ、しかも新臨床研究法が制定されるまでは、臨床研究の制度は確定しないということとなり、本研究を遂行するためには、十分なモニタリングを行う必要があり、それを実行する内部の人的資源がなく、依頼可能な研究資金もなく、実行することを断念した。

##### (3) 自然歴研究

大阪大学医学部附属病院の受診歴のある患者は、39 名であった。SLC2A1 遺伝子検査にて変異を見出した患者は 35 名で、うちナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異、エクソン単位の大規模欠失といった、重症変異のものは 15 名、ミスセンス変異は 20 名であった。また、生化学的な指標として、髄液検査を行っていた患者は 36 名であった。発達の評価は、多くの患者で施行されていた新版 K 式発達指数で行い、新版 K 式を施行した患者が 19 名であった。

遺伝子変異が同定された患者で、重症変異を有するものとミスセンス変異を有する患者で、発達指数について  $p=0.002$ 、SARA について  $p=0.002$ 、双方ともに有意差があると考えられた。

次いで、決定係数( $R^2$ )は、髄液糖値と発達指数では 0.494、髄液糖/血糖比と発達指数では 0.476、髄液糖値と SARA では 0.570、髄液糖/血糖比と SARA では 0.604 であり、発達指数については予測精度は高くないが、SARA については予測精度が高いと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

青天目信、グルコーストランスポーター 1 欠損症、小児内科、査読無、50 巻、2018、772-773.

青天目信、てんかん食の調整と副作用、Epilepsy、査読無、10 巻、2016、111-112.

青天目信、けいれんを呈する代謝異常増悪期の治療、小児科診療、査読無、78 巻、2015、183-190

[学会発表](計 13 件)

松重 武志、井上 裕文、星出 まどか、岡 桃子、林 良子、青天目 信、長谷川 俊史、グルコーストランスポーター1 欠損症としてフォロー中に白質信号異常を呈した 1 例、第 61 回日本小児神経学会学術集会 2019 年 5 月

Shin NABATAME, Rie NAKAI, Ryoko Hayashi, Junpei TANIGAWA, Koji TOMINAGA, Kuriko KAGITANI-SHIMONO, Keiichi OZONO. Genetic, Biochemical and Clinical Characteristics Correlations in Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome in a Single Center Study. AAN2019, the 71st American Academy of Neurology Annual Meeting 2019 年 5 月

青天目信、平野賢一、MCT を利用したケトン食療法を長期間施行した GLUT1 欠損症の脂質プロフィール、第 3 回 TG 学会 2018 年 11 月

青天目信、グルコーストランスポーター1 欠損症を含む代謝性てんかんとケトン食療法、第 52 回日本てんかん学会学術集会 2018 年 10 月

西川 由衣、三牧 正和、青天目 信、石井 淳子、水野 雄太、佐々木 亜希子、永井 佳美、堀江 豪、佐々木 元、本村 あい、小田 洋一郎、発作性異常眼球運動から診断に至ったグルコーストランスポーター1 欠損症、第 29 回日本小児神経学会中国・四国地方会 2018 年 7 月

Shin Nabatame, Hidehito Kondo, Ryoko Hayashi, Mika Hirotsune, Junpei Tanigawa,

Yoshiko Iwatani, Koji Tominaga, Kuriko Kagitani-Shimono, Keiichi Ozono. The effect of missense mutation sites on the phenotype of glucose transporter-1 deficiency syndrome. 第 60 回日本小児神経学会学術集会 2018 年 6 月

Shin Nabatame, Tomoyo Yamashita, Mika Hirotsune, Akito Watanabe, Junpei Tanigawa, Yoshiko Iwatani, Koji Tominaga, Kuriko Kagitani-Shimono, Keiichi Ozono. Adult cases of glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第 59 回日本小児神経学会 2017 年 6 月

豊野 美幸、沢石 由記夫、青天目 信、下野 九理子、小國 弘量 . 修正アトキンス食と TRH 療法により認知機能が向上したグルコーストランスポーター1 欠損症候群の 1 例 第 59 回日本小児神経学会 2017 年 6 月

保科 めぐみ、三島 博、青天目 信、下野 九理子 . 修正アトキンス食療法の継続が困難だったグルコーストランスポーター1 欠損症の姉妹例 . 第 59 回日本小児神経学会 2017 年 6 月

青天目信 .ケトン食療法の有効性:先天代謝異常 第 59 回日本小児神経学会学術集会 2017 年 6 月

Shin Nabatame, Tomoyo Yamashita, Mika Hirotsune, Akito Watanabe, Junpei Tanigawa, Yoshiko Iwatani, Koji Tominaga, Kuriko Kagitani-Shimono, Keiichi Ozono. The Ratio of Cerebrospinal Fluid Glucose / Blood Glucose is Correlated with the Severity of Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome. 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology 2017 年 5 月

Shin Nabatame, Akito Watanabe, Kanako Kishimoto, Junpei Tanigawa, Yoshiko Iwatani, Kouji Tominaga, Kuriko Shimono, Keiichi Ozono. Prognostic factor of seizures in glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第 58 回日本小児神経学会 2016 年 6 月

Shin Nabatame, Kuriko Kagitani-Shimono, Kouji Tominaga, Kanako Kishimoto, Junpei Tanigawa, Sanae Yamazaki, Yoshiko Iwatani, Yoko Miyoshi, Keiko Yanagihara, Toshisaburo Nagai, Keiichi Ozono. A Causative Factor of Growth Hormone Defect in Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome. 第 57 回日本小児神経学会 2015 年 5 月

〔図書〕(計 5 件)

青天目信、古典的ケトン食、藤井達哉編、ケトン食の基礎から実践まで~ケトン食に関わるすべての方へ~第 2 版、診断と治療社、東京、2017、20-49

青天目信、MCT ケトン食、藤井達哉編、ケトン食の基礎から実践まで~ケトン食に関わるすべての方へ~第 2 版、診断と治療社、東京、2017、50-55

青天目信、体調不良時の対応、藤井達哉編、ケトン食の基礎から実践まで~ケトン食に関わるすべての方へ~第 2 版、診断と治療社、東京、2017、167-170

青天目信、藤井達哉、熊田知浩、高田美雪、Q&A、藤井達哉編、ケトン食の基礎から実践まで~ケトン食に関わるすべての方へ~第 2 版、診断と治療社、東京、2017、188-202

青天目信、藤井達哉、てんかん治療におけるケトン食療法導入簡易マニュアル、藤井達哉編、ケトン食の基礎から実践まで~ケトン食に関わるすべての方へ~第 2 版、診断と治療社、東京、2017、203-207

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：富永 康仁

ローマ字氏名：Tominaga, Koji

所属研究機関名：大阪大学

部局名：連合小児発達学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：20599245

研究分担者氏名：岩谷 祥子

ローマ字氏名：Iwatani, Yoshiko

所属研究機関名：大阪大学

部局名：連合小児発達学研究科

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：60724903

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：下野 九理子

ローマ字氏名：Shimono, Kuriko

研究協力者氏名：酒井 規夫

ローマ字氏名：Sakai, Norio

研究協力者氏名：難波 範行

ローマ字氏名：Namba, Noriyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。