

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20898

研究課題名(和文) NANS変異患者の臨床的特徴および骨異形成性低身長発症機序の解明

研究課題名(英文) Analyses of clinical features and mechanism of skeletal dysplasia in patients with NANS mutations.

研究代表者

増永 陽平 (Masunaga, Yohei)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：20907795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：NANS-CDGの臨床所見として、(1)NANS-CDGの成長障害は生後に明瞭となること、(2)NANSが胎児期および出生後の脳の発達に重要であること、(3)出生時でも脊椎骨端骨幹端異形成(SEMD)は認識可能で骨所見は成長と共に変化すること、(4)NANS-CDG患者では血小板減少、血清シアル酸正常低値、血清タンパクの正常なグリコシル化がみられること、(5)NANS-CDGはCamera-Genevieve型と重症型であるFaye-Peterson型に分類されることを明らかにした。また、SEMD・成長障害の発症機序には、NANS機能低下に伴う軟骨細胞の増殖障害が関与する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シアル酸合成酵素の異常を原因とするN-acetylneuraminic acid synthetase-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG)は非常に稀な疾患であるため、臨床像や発症機序は未解明な点が多い。われわれはNANS-CDG患者3例の臨床および遺伝学的所見を詳細に検討し、NANS-CDG患者の新たな臨床的特徴を明らかにした。また、軟骨由来細胞株を用いた機能解析により、脊椎骨端骨幹端異形成・成長障害の発症機序には軟骨細胞の増殖障害が関与する可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed in the patients with N-acetylneuraminic acid synthetase-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG) that (1) growth failure in patients with NANS-CDG become severe after birth; (2) NANS plays an important role in postnatal growth and fetal brain development; (3) spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD) is recognizable at birth and shows remarkable postnatal evolution; (4) NANS-CDG is associated with low-normal serum sialic acid, obviously elevated urine N-acetylmannosamine, and normal N- and O-glycosylation of serum proteins; and (5) NANS-CDG is divided into classic Camera-Genevieve type and more severe Faye-Peterson type. Furthermore, we also revealed that impaired proliferation of chondrocyte may contribute to the pathogenesis of growth retardation and SEMD in patients with NANS-CDG.

研究分野：内分泌

キーワード：NANS NANS-CDG SEMD 脊椎骨端骨幹端異形

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シアル酸は、N アセチルノイラミン酸(NeuNAc)誘導体の総称であり、細胞膜上の糖鎖や分泌タンパクに付加された糖鎖の非還元末端に存在して生物学的機能を担う。また、N-acetylneuraminic acid synthase (NANS)は、NeuNAc 合成経路に関与する酵素である(図 1)。NANS-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG)は、NANS を原因遺伝子とする常染色体潜性遺伝疾患であり、脊椎骨端骨幹端異形成 (SEMD)、発達遅滞、成長障害などを呈する。しかし、NANS-CDG は非常に稀な疾患であるため、臨床所見の詳細は未解明である。また、シアル酸合成異常により脊椎骨端骨幹端異形成 (SEMD) および成長障害を来たす機序も未解明である。

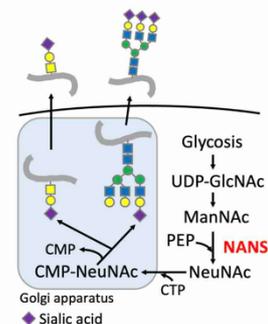


図 1 NeuNAc 合成経路

2. 研究の目的

本研究の目的は、NANS-CDG の臨床症状の解明と、NANS 機能喪失型変異に起因する SEMD・成長障害発症機序の解明である。

3. 研究の方法

(1) NANS-CDG 患者の臨床的特徴の解明

われわれは、これまでに低身長 of 遺伝的背景の探索において、四肢短縮型低身長症の 3 例で *NANS* バリエントを同定している(図 2)。症例 1 では c.979\_981dup:p.(Ile327dup)および c.207del:p.(Arg69Serfs\*57) (複合ヘテロ接合性)が、症例 2 では c.979\_981dup:p.(Ile327dup) (9 番染色体分節性母性ダイソミーに伴うホモ接合性)が、症例 3 では c.607T>C:p.(Tyr203His)および c.133-12t>a (スプライス異常を引き起こすもの) (複合ヘテロ接合性)が同定されている。これらの患者 3 例の臨床所見を詳細に検討し、NANS-CDG 患者の臨床的特徴を見出すために、既報の症例の臨床所見と比較した。

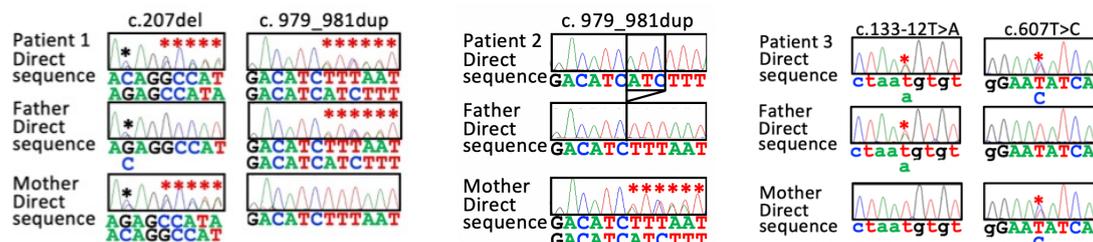


図 2 NANS-CDG 患者 3 例において同定された *NANS* バリエント

(2) *In vitro* における機能解析

ヒト軟骨由来細胞株 C20A4 細胞において、siRNA 法により *NANS* 発現をノックダウンした (NANS-KD 細胞)。24 時間後の NANS-KD 細胞において、*NANS* および *COL2A1* の発現を qPCR 法により評価した。また、48 時間後の NANS-KD 細胞において、細胞表面のシアル化状態をシアル酸末端糖鎖特異的レクチン様タンパクを用いて、細胞増殖能を CCK8 kit を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) NANS-CDG の臨床的特徴

症例 1 は著明な水頭、SEMD、血小板減少を呈し、Faye-Peterson らにより報告された乳児の臨床所見に合致した。一方、症例 2 および 3 は Camera-Genevieve らにより報告された SEMD および発達遅滞を特徴とする NANS-CDG の臨床所見に概ね合致した(表 1)。

本研究と過去の報告により、(1) NANS-CDG の成長障害は生後に明瞭となること、(2) NANS が胎児期および出生後の脳の発達に重要であること、(3) 出生時でも SEMD は認識可能で、骨所見は成長と共に変化すること、(4) NANS-CDG 患者では血小板減少、血清シアル酸正常低値、血清タンパクの正常な N-および O-グリコシル化がみられること、(5) NANS-CDG は Camera-Genevieve 型と重症型である Faye-Peterson 型に分類できることを明らかにした。

(2) *In vitro* における機能解析による SEMD・成長障害の発症機序の解明

NANS-KD 細胞では、*COL2A1* の発現量は野生株細胞と比較して有意な変化はなく、細胞表面のシアル化状態は野生株と同程度であった (図 3)。一方で、NANS-KD 細胞では、細胞増殖能は野生株と比較して若干ではあるものの有意な低下が認められた (図 4)。NANS 機能低下に伴う SEMD および成長障害の発症機序には、軟骨細胞の増殖障害が関与する可能性が示唆される。

表 1. NANS の-CDG 患者の臨床所見

	症例1	症例2	症例3	既報症例 (n=17)
年齢 (年:月)	1:08	8:11	7:04	0~40
性別	男児	女児	男児	男 7, 女 10
<b>&lt;周産期&gt;</b>				
胎児期異常所見	+	+	+	3/17
分娩週数 (週)	35	40	40	35~41
分娩形式	帝王切開	経膈分娩	経膈分娩	帝王切開 2/17
<b>&lt;成長・発達&gt;</b>				
胎児期成長障害	+	+	+	3/9
出生児身長 cm (SD)	40.5 (-2.0)	45.0 (-2.7)	45.1 (-2.4)	<0.4~50%ile
出生児体重 kg (SD)	2.30 (-0.1)	2.97 (-0.4)	2.65 (-1.4)	<2.5~97%ile
出生児頭囲 cm (SD)	39.0 (+5.3)	33.5 (-0.1)	32.0 (-1.1)	<2.5~98%ile
出生後成長障害	+	+	+	16/17
身長 cm (SD)	64.0 (-6.4)	95.0 (-6.0)	103.5 (-3.5)	<0.01~44%ile
体重 kg (SD)	9.3 (-1.5)	12.8 (-2.7)	15.9 (-1.9)	<0.01~95%ile
頭囲 cm (SD)	53.0 (+4.2)	46.0 (-4.4)	48.3 (-2.5)	<0.01~>95%ile
指極長 cm (SD)	51.0 (...)	93.0 (-4.9)	108.0 (-1.8)	...
	症例1	症例2	症例3	既報症例 (n=17)
発達遅滞	+	+	+	17/17
運動遅滞	+	+	+	15/15
言語遅滞	...	+	+	16/16
<b>&lt;血液検査&gt;</b>				
	基準値			
検査時年齢 (年:月)	0:07	4:04	6:01	
血小板減少	+	-	+	5/17
巨大血小板	+	...	+	...
血小板数 (10 <sup>4</sup> /μL)	15.0~35.0	0.6	24	3.5
IPF (%)	1.1~6.1	37.6	3.4	...
PA IgG (ng/10 <sup>7</sup> cells)	<46	342	...	...
血清シアル酸 (mg/dL)	44~71	48	49	50
<b>&lt;レントゲン検査&gt;</b>				
脊椎骨端骨幹端異形成 (SEMD)	+	+	+	14/17
<b>&lt;頭部MRI&gt;</b>				
検査時年齢 (年:月)	0:02	1:00	0:09	
透明中隔異常	+	+	+	8/17
脳室周囲白質病変	-	-	-	2/2
脳室拡大	+ (重度)	+	+	10/10

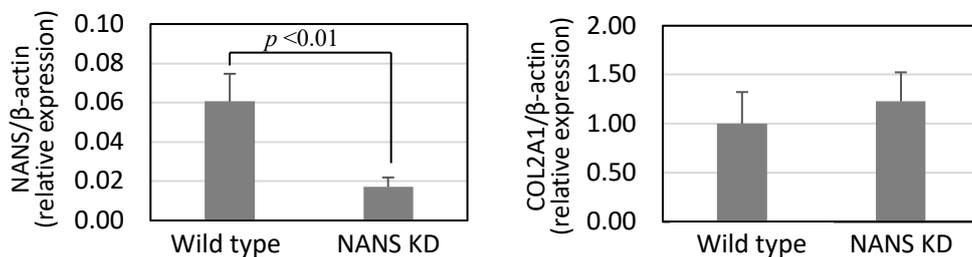


図 3 NANS-KD 細胞における *NANS* および *COL2A1* 発現

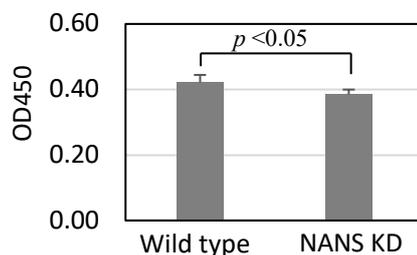


図 4 NANS-KD 細胞の細胞増殖能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yohei Masunaga, Gen Nishimura, Koji Takahashi, Tomiyuki Hishiyama, Masatoshi Imamura, Kenichi Kashimada, Machiko Kadoya, Yoshinao Wada, Nobuhiko Okamoto, Daiju Oba, Hirofumi Ohashi, Mitsuru Ikeno, Yuko Sakamoto, Maki Fukami, Hiroto Saito, Tsutomu Ogata	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical and molecular findings in three Japanese patients with N-acetylneuraminic acid synthetase-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-21751-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増永陽平、西村玄、高橋孝治、鹿島田健一、岡本伸彦、大場大樹、大橋博文、池野充、深見真紀、才津浩智、緒方勤
2. 発表標題 N-acetylneuraminic acid synthetase-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG) 3 例の臨床および遺伝学的所見
3. 学会等名 第37回 臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増永陽平、西村玄、高橋孝治、菱山富之、今村公俊、鹿島田健一、角谷真知子、和田芳直、岡本伸彦、大場大樹、大橋博文、池野充、坂本優子、深見真紀、才津浩智、緒方勤
2. 発表標題 N-acetylneuraminic acid synthetase-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG) 3 例の臨床および遺伝学的所見
3. 学会等名 第55回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増永陽平、西村玄、高橋孝治、鹿島田健一、岡本伸彦、大場大樹、大橋博文、池野充、深見真紀、才津浩智、緒方勤
2. 発表標題 N-acetylneuraminic acid synthetase-congenital disorder of glycosylation (NANS-CDG) 3 例の臨床および遺伝学的所見
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------