

配布先: 文部科学記者会、科学記者会、名古屋教育記者会

2024年3月13日

報道機関 各位

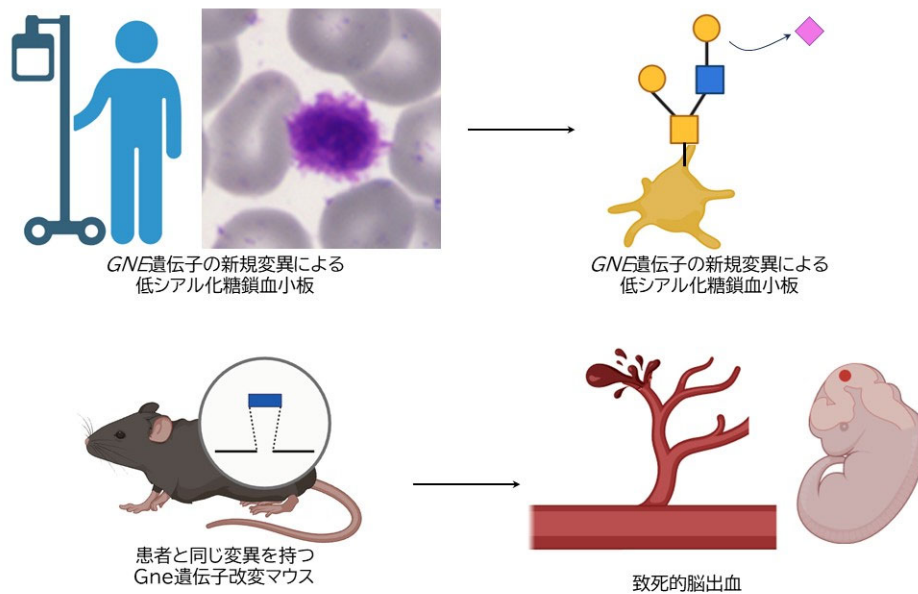
## シアル酸合成不全が血小板減少症の原因であることを発見 ～治療抵抗性の血小板減少症患者の解析から解明～

### 【本研究のポイント】

- ・治療抵抗性<sup>注1)</sup>の血小板減少症患者において、シアル酸<sup>注2)</sup>合成酵素を作る遺伝子(GNE<sup>注3)</sup>)に変異があることを発見した。
- ・その変異によりシアル酸をほとんど合成できないことがわかった。
- ・その患者と同じ変異を持つマウスは異常な血管構造及び致死的な脳出血を示し、GNE 遺伝子の新たな機能が明らかとなった。
- ・シアル酸異常が血小板や筋肉に影響を及ぼすメカニズムの解明が期待される。

### 【研究概要】

名古屋大学糖鎖生命コア研究所の近藤 裕史 講師らの研究グループは、The First Affiliated Hospital of Soochow University(中国)のルル・ホアン大学院生、Oklahoma Medical Research Foundation(アメリカ)のリジュン・シャ博士との共同研究で、血小板減少症を呈す患者において両親に由来する GNE 遺伝子に、これまでに報告のない 2 つの変異を発見しました。GNE は酸性糖であるシアル酸を作る酵素であり、GNE に変異のあるヒトでは骨格筋機能異常を示すことが報告されていました。しかし、今回の症例は血小板に限局した異常を示しており、これまでに例の少ないユニークな患者です。本研究では GNE 遺伝子異常が血小板減少症の原因となるかを、患者と同じ遺伝子変異のうち一方を持つマウスおよび GNE 遺伝子欠損細胞を解析することで、変異 GNE の機能解析を行いました。その結果、患者の GNE は酵素としての働きをほとんど失っており、シアル酸の合成能が著しく低下していました。また、変異マウスは致死的な脳出血を認め、産まれてくることさえできませんでした。このことから、働きをほとんど失ったがほんの少し働く変異 GNE により患者は生存できるものの、血小板機能には不十分であることが示唆されました。本研究は、シアル酸合成不全に基づく血小板異常症の治療法開発や、GNE 異常に基づく骨格筋異常の発症メカニズムの解明への貢献が期待されます。本研究成果は、2024 年 2 月 27 日付で、国際学術誌「Blood Advances」に掲載されました。



## 【研究背景と内容】

血液を流れる血小板には、血管に生じた傷をふさぎ、出血を停止させる働きがあります。しかし、酷い出血や遺伝的に血小板の働きが低いヒトでは、献血で得られた血小板の輸血が必要となります。また、抗がん剤治療が血液を造る骨髄を障害してしまうため、がん患者さんにおいても、血小板輸血は生命の維持に不可欠です。しかし、献血で得られた血小板の寿命は数日と短く、献血者数が横ばいかつ少子高齢化の進む今、安定的な血小板の確保や血小板の寿命延長法の開発が社会的に求められています。

全ての細胞はその表面に糖鎖<sup>注4)</sup>と呼ばれる構造があります。その構造や大きさは様々な局面で柔軟に形を変え、その糖鎖変化には一定の法則性も存在します。血小板も例外なく、その表面には糖鎖が存在しますが、血小板が老化する3-4日の間に、脱シアル化と呼ばれる糖鎖の構造変化が起こります。脱シアル化とは、糖鎖の末端に存在する酸性糖のシアル酸がその切断酵素により切除されることです。そのような血小板は、脱シアル化糖鎖を認識する肝臓の貪食細胞により、血液中から速やかに排除されます。すなわち、脱シアル化糖鎖を持つ血小板はその血中での寿命が短く、老化血小板として考えることができます。

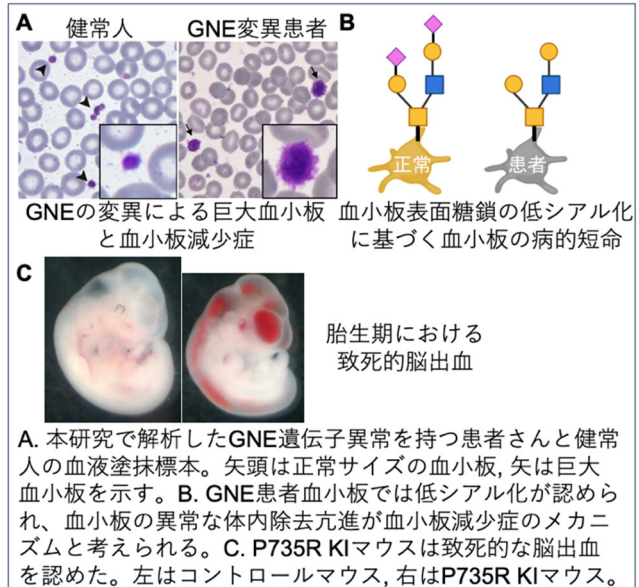
本研究では、血小板数が少ない血小板減少症を示す患者さんを解析し、GNE 遺伝子にこれまでに報告のない異常を発見しました。GNE はシアル酸合成に必須な遺伝子であることから、GNE 変異によりシアル酸のない血小板(すなわち、脱シアル化 ”老化” 血小板

と同じもの)が遺伝的に生じ、患者さんの血小板が常に肝臓にて急速に除去されていることが血小板減少症の原因と考えられました。しかし、これまでに報告のある GNE 遺伝子異常では血小板減少症を示す例はごくわずかであり、ほとんどが筋肉の萎縮を示すなど骨格筋にユニークな病態を示します。そこで本研究では、GNE 遺伝子異常が血小板減少症の原因であるかを検証することにしました。

まず、患者さんの血小板表面糖鎖を MAL-II というシアル酸認識レクチン<sup>注5)</sup>を利用してその量を検討したところ、健康人に比べて低下していることが分かりました。血小板特異的タンパク質である CD42a はその表面発現にシアル酸を必要としますが、今回の患者さんの血小板では予想通り、CD42a の発現も著しく低下していました。このことから、患者さんの GNE 遺伝子異常は確かに血小板においてシアル酸の合成不全を引き起こしていることが分かりました(図 1A, B)。

次に、患者さんで見つかった C594Y と P735R の遺伝子変異のうち、P735R をマウス Gne 遺伝子に持つノックイン (KI) マウス<sup>注6)</sup>を作製し、患者さんと同様の表現型が現れるかを検証しました。予想外なことに、P735R KI マウスは母親の子宮内にて胎生期 (E)<sup>注7)</sup>11.5 日目に明らかな脳出血を示し、死亡しました。死亡する直前の E11 の脳切片を観察すると、血管の起始部である perineural vascular plexus (PNVP) から脳室に向けての新生血管の内腔構造が膨張しており、その内部に胎生期特有の巨核球様細胞<sup>注8)</sup>(embryonic megakaryocytes, eMKs)が多く存在していました(図1C, D)。おそらく、膨張した血管内腔構造がやがて破裂することが、脳出血の原因であることが示唆されました。また、異常な eMKs の増加は、同じ致命的脳出血を認めるシアル酸含有タンパク質であるポドプラニンの欠失マウスでも認められることから、P735R KI マウスで見られる脳出血は、ポドプラニンタンパク質のシアル酸修飾の低下が原因の 1 つとして考えられます。

図1. 血小板特異的な表現型を示す GNE 患者さんの発見



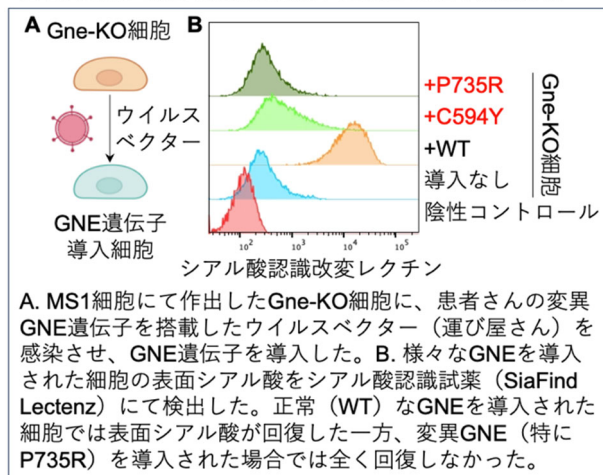
続いて、より詳細に遺伝子変異が GNE の活性に与える影響を検討することにしました。GNE はシアル酸合成において2つの異なる酵素反応<sup>注9)</sup>を担っています。一つ目は、UDP-GlcNAcをManNAcへと異性体化し、二つ目はそのManNAcをManNAc-6-リン酸へとリン酸化します。ManNAc-6-リン酸はその後シアル酸へと変換されます。今回の患者さんで見つかった、C594YとP735Rの遺伝子変異はいずれもその場所からGNEのリン酸化活性に影響を与えることが示唆されました。そこで初めに、マウス血管内皮細胞株 MILE SVEN1 (MS1)にて、遺伝子編集技術を用いて Gne 遺伝子を破壊(ノックアウト, KO)することにしました。その細胞では予想通り、細胞表面からシアル酸が著しく低下していました。次に、遺伝子の運搬役となるウイルスベクターを利用して、患者さんの変異であるC594YとP735Rを持ったGNEを遺伝子導入し、細胞表面のシアル酸の程度が回復するかを検証しました。その結果、P735Rを持つGNEを遺伝子導入しても、Gne-KO MS1細胞で見られる細胞表面の低シアル化が回復は全く見られなかったのに対し、C594Yを持つGNEを遺伝子導入すると、細胞表面のシアル化に僅かながらの回復が見られました(図2A, B)。続いて、患者さんのGNE遺伝子変異がGNEのリン酸化活性に影響を与えているかをクリックケミストリー<sup>注10)</sup>を用いて検証することにしました。初めに、自然界に存在しない人工的なシアル酸前駆体 ManNAz を上記細胞に取り込ませ、変異GNEによってManNAz-6-リン酸、その後SiaNAzとして細胞表面の糖鎖に組み込まれるかを調べました。その結果、正常なGNEを持つ細胞ではManNAzに由来するSiaNAzは細胞表面に検出されました。一方、患者さんの変異を持ついずれのGNEを持つ細胞では、細胞表面にSiaNAzは検出されませんでした。このことはC594YとP735Rのいずれの変異もGNEのリン酸化活性を著しく低下させていることを示唆するものです。

これらのことから、患者さんのGNE遺伝子は確かにその酵素活性に大きく影響を与えており、P735Rは完全な機能欠失であることが明らかとなりました。本研究で明らかとなった、P735R KIマウスの胎生期における致死は、その活性が完全欠失であること、また以前に報告されているGne-KOマウスも胎生致死であることを踏まえると、辻褃の合う結果になったと考えられます。

## 【成果の意義】

本研究は、血小板異常を呈する患者さんにおいて新しい2つのGNE遺伝子変異を同定し、そのうちの1つは細胞やマウスを使った実験においてシアル酸合成能は完全な機能欠失であり、患者さんの血小板や変異導入マウス組織においてシアル酸の量も低下し

図2. 遺伝子改変培養細胞を用いた変異GNEの機能解析





ていることが分かりました。本患者さんは2024年2月現在、17歳で、出血傾向以外は問題なく過ごせていることから、おそらく、C594Y変異を持つGNEのわずかに残る酵素活性でも、患者さんの生存や基本的な生理機能には十分であることが示唆されます。また、本患者さんはGNE変異で共通に認められる骨格筋異常を示さないことから、GNEの変異や残存活性の有無による症状の多様さ(筋異常、血小板異常など)が示唆されました。

本研究は、シアル酸量による生物機能制御機構、GNEタンパク質自身の未知の機能などの可能性、シアル酸代謝の重要性の証明とシアル酸が関わる各種疾患の発症機構解明・治療応用に貢献することが期待されます。

## 【研究支援】

本研究は、令和4年度糖鎖生命コア研究所「共同研究」の支援のもとで行われたものです。

## 【用語説明】

注1)治療抵抗性:

ある疾患や症状が既存の治療法に対して反応しづらい状態を指す。

注2)シアル酸:

炭素数9の酸性糖の総称で、通常、細胞表面の糖鎖の最外端に付加している。シアル酸は、細胞間相互作用、認識、シグナル伝達など、様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている。

注3)GNE:

シアル酸の生合成 (de novo biosynthesis) に必須な細胞質に存在する酵素であり、2つの酵素活性を持っている。正式名称はUDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (UDP-GlcNAc 2-epimerase)/N-acetylmannosamine kinase (ManNAc kinase)。GNEの機能不全は骨格筋異常を引き起こすことが知られている。

注4)糖鎖:

糖単位が結合した複合分子である。単純な単糖であることもあれば、複数の糖分子からなる複雑な構造であることもある。糖鎖は様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしており、多くの場合、タンパク質や脂質と共有結合して、それぞれ糖タンパク質や糖脂質を形成している。

注5)レクチン:

糖鎖と結合することができるタンパク質の多様なグループのこと。レクチンは植物、動物、微生物など様々な生物に存在し、特定の糖分子に選択的に結合する能力を強調している。本研究で用いたレクチンMAL-IIは $\alpha$ 2,3結合様式のシアル酸の一部を認識する。また、レクチンを遺伝子改変してその反応性を上げたSiaFind Lectenzもシアル酸認識プローブとして本研究では用いている。

## 注 6)ノックインマウス:

特定の遺伝子を別の遺伝子に置き換えたり、改変したりした遺伝子操作マウスのことである。この技術は、分子生物学や遺伝学の研究において、特定の遺伝子の機能を研究したり、特定の突然変異を導入したりするために広く用いられている。本研究では、患者さんで見つかった遺伝子変異(GNE タンパク質の 735 番目のプロリン(P)がアルギニン(R)に変異した P735R)を導入したマウスを作出した。

## 注 7)胎生期 (E):

オスとメスを夕方方に交配し、翌朝にメスの膣栓(プラグ)が確認できれば、その日を E0.5 としてカウントする。マウス(ハツカネズミ)は E19-20 で誕生する。本研究で明らかとなった E11.5 の脳出血は、膣栓が確認されてから 11 日目ということになる。

## 注 8)胎生期特有の巨核球様細胞:

ヒトやマウスを含む哺乳類の初期胚発生において、巨核球はまず卵黄嚢内の原始造血から発生する。これらの胚性巨核球(eMKs)は胎児血管系を循環して胎児期血小板を産生する。これら eMKs は二倍体である。一方、出生したマウスの血液循環には巨核球が認められることはまずなく、骨髄と肺に基本的には存在し、それらは多核である。

## 注 9)GNE の(シアル酸合成において)2つの異なる酵素反応:

UDP-GlcNAc (ウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミン)を ManNAc (N-アセチルマンノサミン)に異性体化する活性と、ManNAc をリン酸化する活性の 2 つを GNE 酵素は持っている。これら異なる酵素活性は、GNE タンパク質のそれぞれ N 末側と C 末側に認められる。

## 注 10)クリックケミストリー:

高効率で選択性が高く、温和な条件下で実施できる化学反応を指す。この概念は 2001 年に K. Barry Sharpless によって導入されたもので、シンプルで信頼性が高く、糖鎖研究を含む、さまざまな場面に広く適用できる反応であり、様々な分野の研究者にとって貴重なツールとなっている。その発見と応用が認められ、2022 年のノーベル化学賞を K. Barry Sharpless や Carolyn Bertozzi 博士らが受賞している。本研究では ManNAc に azide 基を付加した ManNAz を細胞へ取り込ませ、azide 基と選択的に反応するクリックケミストリーを利用して ManNAz の糖鎖への取り込みを検出している。

## 【論文情報】

雑誌名: Blood Advances

論文タイトル: Novel GNE missense variants impair de novo sialylation and cause defective angiogenesis in the developing brain in mice

著者: Lulu Huang\*, Yuji Kondo\*, Lijuan Cao, Jingjing Han, Tianyi Li, Bin

## Press Release

---

Zuo, Fei Yang, Yun Li, Zhenni Ma, Xia Bai, Miao Jiang, Changgeng Ruan,  
and Lijun Xia(下線は本学教職員)

DOI: 10.1182/ bloodadvances.2023011490

URL:

<https://ashpublications.org/bloodadvances/article/8/4/991/514638/Novel-GNE-missense-variants-impair-de-novo>