

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

C型ナトリウム利尿ペプチド賦活化による
軟骨欠損修復のための新しい治療法の開発と
その臨床応用に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16(2004)年3月

主任研究者 中 尾 一 和

目 次

I. 総括研究報告	
C型ナトリウム利尿ペプチドによる軟骨形成不全症の成長 板軟骨発育不全修復に関する研究	----- 1
中尾一和	
II. 分担研究報告	
1. C型ナトリウム利尿ペプチド賦活化療法の開発と DDSに関する研究	----- 6
寒川賢治	
2. 軟骨細胞におけるC型ナトリウム利尿ペプチド賦活 化による作用機構に関する研究	----- 10
小松弥郷	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 18

C型ナトリウム利尿ペプチドによる軟骨形成不全症の成長板軟骨発育不全修復に関する研究

主任研究者：中尾一和（京都大学大学院医学研究科 教授）

軟骨組織は血管、神経を欠き、損傷や変性に対し創傷治癒、自己修復能に乏しいため、再生医療の重要な標的である。軟骨組織は少数の軟骨細胞とその周囲の豊富な細胞外基質に覆われて存在し、他の組織を構成する細胞には無い特徴を持つ。本研究ではわれわれが発見した新規の軟骨成長因子としてC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の作用を軟骨組織の欠損修復へ応用できるかについて、1) 軟骨形成不全症モデルマウスの短躯症に対するCNP過剰発現の影響、2) 脛骨器官培養を用いたCNPの軟骨細胞に対する作用機序、3) 軟骨細胞におけるCNPとFGFの細胞内シグナル伝達、に関する研究を行い、以下の結果を得た。CNPは軟骨形成不全症モデルマウスであるFgfr3-Ach-Tgの四肢、体幹の短縮を対照野生型マウスと同程度まで改善し、軟骨形成不全症の成長板軟骨発育不全を修復することを明らかにした。CNPの軟骨形成不全症に対する作用は容量依存性であり、CNPの直接作用であることを証明した。CNPの軟骨細胞に対する作用は細胞増殖には影響を与えないが、軟骨細胞のグリコサミノグリカン合成、コラーゲン合成等の細胞外基質産生を増加させ、細胞の増大、細胞間基質を増大させることによるものであることが明らかとなった。軟骨形成不全症においては軟骨細胞の細胞外基質産生の低下を認め、FGF 3 型受容体の機能獲得型変異による MAPキナーゼ経路の活性化異常がその原因であり、CNPはMAPキナーゼ経路の活性化異常に拮抗的に作用することが明らかとなった。今回の軟骨形成不全症を対象にした研究からCNPの軟骨細胞への作用機序が明らかになり、全く新しい軟骨再生への応用の可能性が示された。

A. 研究目的

組織工学や分子生物学の進歩により、再生医学の臨床応用に関する研究が盛んとなっている。軟骨組織は血管、神経を欠き、損傷や変性に対し創傷治癒、自己修復能に乏しいため、再生医療の重要な標的である。軟骨組織は少数の軟骨細胞とその周囲の豊富な細胞外基質に覆われて存在し、他の組織を構成する細胞には無い特徴を持つ。未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化はまだ解明されていない点が多く、幹細胞からの軟骨再生の実現には課題が多く残されている。われわれはこのような軟骨細胞の特徴を考慮し、軟骨再生医療への応用に全く新しいアプローチを提案した。BNP過剰発現トランスジェニックマウスが骨格に異常をきたすことから、主に血圧、水電解質代謝調節に作用すると考えられてきたナトリウム利尿ペプチドの骨・軟骨での意義に注目した。培養軟骨細胞、脛骨器官培養系においてC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)とその受容体であるGC-Bが重要であり、マウス、ヒトの軟骨に強く発現していること、CNPが強力な軟骨増加作用を持つことを明らかにした。CNPノックアウトマウスを作成、

解析し、成長板軟骨の発育障害をきたし、四肢体幹の短縮を認めることを明らかにした。われわれは新規の軟骨成長因子としてC型ナトリウム利尿ペプチドの作用を発見し、この作用を軟骨組織の欠損修復へ応用できるか検討を行った。

B. 研究方法

1. 軟骨形成不全症モデルマウスの短躯症に対するCNP過剰発現の影響

軟骨形成不全症は1万人に1人という高頻度に発症する先天異常症であり、その原因遺伝子はあるFGF 3 型受容体の機能獲得型変異(G380R変異型)であることが明らかになっている。軟骨形成不全症に対し骨切り術による脚延長術等が行われているが、根本的治療はないのが現状である。この変異FGF 3 型受容体を軟骨特異的に発現させたトランスジェニックマウス(Fgfr3-Ach-Tg)は軟骨形成不全症のモデルマウスであり、著しい四肢、躯幹の伸長抑制をきたす。一方われわれはCNPを軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス(Nppc-Tg)の作成について報告し、Nppc-Tgにおいて内軟

骨性骨化により形成される椎骨や長管骨の伸長が促進することを示した。今回、CNPの軟骨成長作用が軟骨形成不全症の軟骨発育不全に対し有効であるか検討するため、Fgfr3-Ach-TgとNppc-Tgを交配して軟骨にCNPを過剰発現するFgfr3-Ach-Tg (Nppc/Fgfr3-Ach-Tg) を作製し、F1マウスにおける表現型を比較した。

2. Fgfr3-Ach-Tg脛骨器官培養を用いたCNPの軟骨細胞に対する作用機序の検討

胎生16.5日齢のFgfr3-Ach-Tgより脛骨を単離し、4日間CNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M)存在下で培養し、培養終了後、脛骨の形態計測、組織学的解析を行った。また、CNPの軟骨の基質産生への影響について、グリコサミノグリカン合成を 35 Sの取り込みにて、コラーゲン合成を 3 Hプロリンの取り込みにて検討した。

3. 軟骨細胞におけるCNPとFGFの細胞内シグナル伝達に関する検討

FGFR3の細胞内情報伝達機構として、MAPKを介する経路とSTAT-1を介する経路が存在し、軟骨細胞における両者の重要性がこれまで報告されている。今回、CNPがこれらのFGFR3の細胞内情報伝達機構に影響を与えるか検討を行った。胎生16.5日齢の脛骨を用いて、1時間CNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M)、またはcGMP (10^{-6} M)存在下で培養後、FGF-2 (1ng/ml)を添加し、タンパクを抽出し、ウエスタンブロット法にて、ERK1/2、リン酸化ERK1/2、STAT-1、リン酸化STAT-1の発現について検討した。また、MAPキナーゼ経路の阻害剤であるPD98059を用いて軟骨の基質産生への影響について、グリコサミノグリカン合成を 35 Sの取り込みにて、コラーゲン合成を 3 Hプロリンの取り込みにて検討した。

C. 研究結果

1. 軟骨形成不全症モデルマウスの短軀症に対するCNP過剰発現の影響

Fgfr3-Ach-Tgは対照野生型マウスと比較して、約12%吻髯長の短縮を認めるが、この成長障害はNppc/Fgfr3-Ach-Tgにおいて著しく改善を認めた。また、軟X線撮影による骨計測から内軟骨性骨化により形成される四肢長管骨及び椎骨の伸長抑制も改善した。また、軟骨におけるFgfr3-Ach遺伝子発現がFgfr3-Ach-TgとNppc/Fgfr3-Ach-Tgにおいて同レベルであることからCNPの過剰発現はFgfr3-Ach遺伝子の発現に影響を与えないことを示した。さらに、ヘテロNppc-TgとホモNppc-Tgでは軟骨におけるCNP発現がホモNppc-Tgにおいて亢進しており、ホモNppc/Fgfr3-Ach-Tgにおいてはヘテロ

Nppc/Fgfr3-Ach-Tgと比較して四肢長管骨の改善がさらに著しいことから、CNPが容量依存性に作用していることを示した。組織学的解析ではFgfr3-Ach-Tgにおいて認められた成長板軟骨の短縮はNppc/Fgfr3-Ach-Tgにおいて改善し、増殖、前肥大化軟骨細胞層の細胞間基質の増大、及び*in situ* hybridizationの検討からX型コラーゲンを発現する肥大化軟骨細胞層の厚さの回復を認めた。一方、BrdU取込みにより解析した軟骨細胞の増殖能はFgfr3-Ach-Tg、Nppc/Fgfr3-Ach-Tgともに低下していた。

2. Fgfr3-Ach-Tg脛骨器官培養を用いたCNPの軟骨細胞に対する作用機序の検討

胎生16.5日齢のFgfr3-Ach-Tg脛骨はCNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M)添加により濃度依存性に伸長促進を観察し、CNP (10^{-7} M)添加群は対照の野生型マウス脛骨と同じ程度まで伸長促進を認めた。組織学的にはFgfr3-Ach-Tg脛骨で認める肥大化軟骨層の短縮、強拡大では特に増殖軟骨細胞層と前肥大化軟骨層における細胞外基質の減少が、CNP (10^{-7} M)添加群においては対照の野生型マウス脛骨と同程度まで回復を認めた。 35 Sの取り込みはFgfr3-Ach-Tg脛骨において低下を認めたが、CNP (10^{-7} M)添加群においては対照の野生型マウス脛骨と同程度まで回復を認めた。 3 Hプロリンの取り込みはFgfr3-Ach-Tg脛骨において低下を認めたが、CNP (10^{-7} M)添加群においては対照の野生型マウス脛骨と同程度まで回復を認めた。

3. 軟骨細胞におけるCNPとFGFの細胞内シグナル伝達に関する検討

胎仔脛骨においてリン酸化ERK1/2の発現はほとんど認められないが、FGF-2 (1ng/ml)の刺激により著しく発現が増強した。このFGF-2によるリン酸化ERK1/2の発現はCNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M)、またはcGMP (10^{-6} M)による前処置にて濃度依存性の減少を認めた。一方、リン酸化STAT-1の発現についてはCNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M)、またはcGMP (10^{-6} M)による前処置にてほとんど影響を認めなかった。今回作成したNppc/Fgfr3-Ach-Tg脛骨を用いて同様の検討を行ったところ、Fgfr3-Ach-Tg脛骨においてはリン酸化ERK1/2の発現が亢進していたが、Nppc/Fgfr3-Ach-Tg脛骨においてはリン酸化ERK1/2の発現の減弱を認めた。PD98059添加にて対照野生型マウス脛骨、Fgfr3-Ach-Tg脛骨はともに伸長促進を認めた。また、 35 Sの取り込みはPD98059添加にて対照野生型マウス脛骨、Fgfr3-Ach-Tg脛骨はともに増加した。 3 Hプロリンの取り込みもPD98059添加にて対照野生型マウス脛骨、Fgfr3-Ach-Tg脛骨は

ともに増加した。

D. 考察

本年度の研究により、軟骨形成不全症モデルマウスである *Fgfr3-Ach-Tg* の四肢、体幹の短縮を対照野生型マウスと同程度まで改善し、軟骨形成不全症の成長板軟骨発育不全を修復することを明らかにした。CNP の軟骨形成不全症に対する作用は容量依存性であり、CNP の直接作用であることを証明した。CNP の軟骨細胞に対する作用は細胞増殖には影響を与えないが、軟骨細胞のグリコサミノグリカン合成、コラーゲン合成等の細胞外基質産生を増加させ、細胞の増大、細胞間基質を増大させることによるものであることが明らかとなった。軟骨形成不全症においては軟骨細胞の細胞外基質産生の低下を認め、FGF 3 型受容体の機能獲得型変異による MAP キナーゼ経路の活性化異常がその原因であり、CNP は MAP キナーゼ経路の活性化異常に拮抗的に作用することが明らかとなった。今回の軟骨形成不全症を対象にした研究から CNP の軟骨細胞への作用機序が明らかになり、全く新しい軟骨再生への応用の可能性が示された。現在、ナトリウム利尿ペプチドのなかで ANP, BNP はそれぞれ既に日本及び米国で心不全治療薬として静注の形で臨床において使用されている。更に臨床使用された際のナトリウム利尿ペプチドの血中濃度は、今回見いだされた軟骨肥大化作用を発現する濃度に一致している。従って、軟骨再生への応用へ向け、分担研究者寒川らとドラッグデリバリー、CNP とその受容体である GC-B を賦活化する療法を今後開発していきたい。

E. 結論

CNP が軟骨形成不全症の成長板軟骨発育不全、骨伸長障害修復を改善することが示され、軟骨形成不全症に対する新しい治療法となりうることを示された。CNP が関節軟骨欠損の再生への作用についても同様の手法を用いて検討を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Yasoda, Y. Komatsu, H. Chusho, T. Miyazawa, A. Ozasa, M. Miura, T. Kurihara, T. Rogi, S. Tanaka, M. Suda, N. Tamura, Y. Ogawa, K. Nakao. Overexpression of CNP in

chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 10:80-86, 2004.

2. K. Yamahara, H. Itoh, T. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D. L. Garbers, F. Hofmann, K. Nakao. Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 3404-3409, 2003.
3. Y. Li, I. Kishimoto, Y. Saito, M. Harada, K. Kuwahara, T. Izumi, I. Hamanaka, N. Takahashi, R. Kawakami, K. Tanimoto, Y. Nakagawa, M. Nakanishi, Y. Adachi, D. L. Garbers, A. Fukamizu, K. Nakao. Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* 145:951-958, 2004.
4. N. Takahashi, Y. Saito, K. Kuwahara, M. Harada, I. Kishimoto, Y. Ogawa, R. Kawakami, Y. Nakagawa, M. Nakanishi, K. Nakao. Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation. *Hypertens Res* 26:847-853, 2003.
5. M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Sasaki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, M. Shibuya, S. Nito, S. Nishikawa, K. Nakao. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* 107: 2085-2088, 2003.
6. T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Nakao. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. Short title: ES cell differentiation and angiogenesis in adults. *Blood* 101: 2675-2678, 2003.
7. K. Kuwahara, Y. Saito, M. Takano, Y. Arai, S. Yasuno, Y. Nakagawa, N. Takahashi, Y. Adachi, G. Takemura, M. Horie, Y. Miyamoto, T. Morisaki, S. Kuratomi, A. Noma, H. Fujiwara, Y. Yoshimasa, H. Kinoshita, R. Kawakami, I. Kishimoto, M. Nakanishi, S. Usami, Y. Saito, M. Harada, K. Nakao. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and

- maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J* 22:6310-6321, 2003.
8. K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi-Kobayashi, K. Park, K. Nakao. Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 544: 86-92, 2003.
 9. Y. Matsuoka, T. Furuyashiki, H. Bito, F. Ushikubi, Y. Tanaka, T. Kobayashi, S. Muro, N. Satoh, T. Kayahara, M. Higashi, A. Mizoguchi, H. Shichi, Y. Fukuda, K. Nakao, S. Narumiya. Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4132-4137, 2003.
 10. K. Sawai, K. Mori, M. Mukoyama, A. Sugawara, T. Suganami, M. Koshikawa, K. Yahata, H. Makino, T. Nagae, Y. Fujinaga, H. Yokoi, T. Yoshioka, A. Yoshimoto, I. Tanaka, K. Nakao. Angiogenic protein Cyr61 is expressed by podocytes in anti-thy-1 glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 14: 1154-1163, 2003.
2. 学会発表
- 国際学会
1. Kazuwa Nakao, Translational Research of the Natriuretic Peptide Family. Seventh Trans-Pacific Symposium-Cardiovascular Endocrinology-. ENDO 2003, June 19-22, 2003, Philadelphia, U.S.A
 2. Kazuwa Nakao, Translational Medicine in Endocrinology and Metabolism IMSUT International COE Symposium Translational Research. 21世紀 COE プログラム「ゲノム医学の展開による先端医療開発拠点」February 27-28, 2004, Tokyo, Japan
- 国内学会
1. 中尾一和, 肥満症の最近のトピックス、第 1 回 肥満症カンファレンス 特別講演、2003/2/7(仙台市)
 2. 中尾一和, 内分泌代謝学と展開医療 (Translational Medicine)、第 3 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会—サテライトシンポジウム I—、2003/2/14(東京都)
 3. 中尾一和, 成人病における心臓血管ホルモンの血管保護作用・血管再生作用とその分子機構の解明: 報告 VI、日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業平成 14 年度研究成果公開シンポジウム「成人病-遺伝素因と環境因子の解明」、2003/2/15(東京都)
 4. 中尾一和, 肥満症発症の分子メカニズム、第 26 回日本医学会総会学術講演会 柱 4-11 注目される疾患の病因・病態と治療: 肥満症の病因・病態と治療—ここまでわかった分子メカニズム—、2003/4/4(福岡市)
 5. 中尾一和, ナトリウム利尿ペプチドファミリーとレプチンの病態生理学的意義と臨床応用に関する研究、第 76 回日本内分泌学会学術総会学会賞受賞講演、2003/5/10(横浜市)
 6. 中尾一和, 我国の Physician Scientist(臨床科学者)と Translational Research の困難な現状、文部科学省科学技術政策研究所講演会、2003/7/16(東京都)
 7. 中尾一和, レプチンの基礎研究と臨床応用、第 21 回内分泌・代謝学サマーセミナー講演、2003/7/25(神奈川県箱根)
 8. 中尾一和, 肥満の分子機構…レプチンを中心に、第 124 回日本医学会シンポジウム 肥満の科学、2003/8/30(神奈川県箱根)
 9. 中尾一和, ナトリウム利尿ペプチド研究の最前線、日本臨床検査自動化学会 第 35 回大会 サテライトセミナー「心疾患診療におけるBNP研究の最前線」、2003/9/18(横浜市)
 10. 中尾一和, 糖尿病とレプチン-脂肪萎縮性糖尿病のトランスレーショナルリサーチ、第 37 回日本小児内分泌学会 学術講演会、2003/10/3(札幌市)
 11. 中尾一和, メタボリックシンドロームと高血圧、第 26 回日本高血圧学会総会 ランチョンセミナー2.4 「肥満と高血圧」、2003/10/31(宮崎市)
 12. 中尾一和, 臨床医における高血圧治療を考える—大規模試験、各種ガイドラインから—、京都府医師会学術講演会、2003/11/6(京都市)
 13. 中尾一和, メタボリック症候群のトピックス、第 3 回動脈硬化フロンティア 2003 特別講演、2003/11/27(福岡市)
 14. 中尾一和, ANP発見後 20 年間の進歩、京都ハンブ学術講演会 Introduction、2004/1/30(京都市)
 15. 中尾一和, CNP について、つくしの会講演会、2004/1/31(東京都)
 16. 中尾一和, Metabolic Syndrome の治療戦略、第 37 回日本痛風・核酸代謝学会総会「教育講演」、2004/2/6(米子市)
 17. 中尾一和, メタボリック症候群のトピックス、学術講演会、2004/2/12(岐阜市)

18. 中尾一和、ホルモンと生活習慣病、特定非営利活動法人日本ホルモンステーション市民公開講座 ホルモンを知るつどい、2004/2/15(新潟市)
19. 中尾一和、メタボリックシンドロームのトピックス、第 69 回東京女子医大高血圧研究会特別講演、2004/3/1(東京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1. 特願 2002-248283
NRSE 及び NRSF の利用法
2. 特願 2001-301586
軟骨無形成症治療薬
3. 特願 2001-310322
軟骨無形成症治療薬
4. 特許 3267893
自己免疫疾患の診断薬
5. 特許 3343866
ハムスター脳ナトリウム利尿ペプチド
6. 特許 3050424
ヒトエンドセリンリセプター
7. 特許 2036732
 α -hANPを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ

2. 実用新案登録

なし

C型ナトリウム利尿ペプチド賦活化療法の開発とDDSに関する研究

分担研究者：寒川賢治（国立循環器病センター研究所・生化学部部長）

特に内因性生理活性ペプチドの意義の解明は、種々の疾患の病態の理解に寄与するばかりではなく、それを基にした創薬への発展という極めて重要な意義を有する。内因性生理活性ペプチドは副作用の少ない生体分子であること、合成又は遺伝子組み換え等による生産が比較的容易であるため、臨床応用が成功する可能性が高いと考えられる。われわれはこれまで、一貫して新規生理活性ペプチドの探索、生理的、臨床的意義の解明を行ってきた。本研究では、ペプチドの慢性疾患治療への応用は実際の臨床では対象が限定されることが予想されるため、よりすぐれたDrug Delivery System (DDS)の構築を含めた創薬研究を行った。本年度の研究により、線維芽細胞においても軟骨細胞、脛骨器官培養と同様にCNPはコラーゲン産生を抑制することが明らかになった。軟骨の周囲の結合組織には線維芽細胞が存在することから軟骨細胞と線維芽細胞の関係についても検討が必要と考えられる。種々の投与実験の結果から、ラットに対するCNPの持続投与の有効性が示された。CNPと同様にペプチドホルモンであるアドレノメジュリンについて浸透圧ポンプを用いた長期慢性投与、ネブライザーを用いた吸入投与がいずれも有効であったことから、同様の手法を用いて、CNPの慢性投与による軟骨への影響が検討できることが明らかとなった。

A. 研究目的

生体の機能調節とその破綻のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは、疾患の成り立ちを理解し、かつ新たな治療法を開発する上で重要である。特に内因性生理活性ペプチドの意義の解明は、種々の疾患の病態の理解に寄与するばかりではなく、それを基にした創薬への発展という極めて重要な意義を有する。内因性生理活性ペプチドは副作用の少ない生体分子であること、合成又は遺伝子組み換え等による生産が比較的容易であるため、ANPやBNPが心不全等の循環器疾患の病態の診断及び、治療薬となっているように、臨床応用が成功する可能性が高いと考えられる。われわれはこれまで、一貫して新規生理活性ペプチドの探索、生理的、臨床的意義の解明を行ってきた。本研究の目的は、ペプチドの慢性疾患治療への応用は実際の臨床では対象が限定されることが予想されるため、非ペプチド受容体アゴニスト、ペプチド分解酵素阻害剤等の開発やよりすぐれたDrug Delivery System (DDS)の構築を含めた創薬研究を行い、その成果をこれまでに用いてきた疾患動物モデルにて検証する。

B. 研究方法

1. 線維芽細胞におけるCNPの発現、分泌、作

用の検討

軟骨細胞と同じ間葉系細胞であるラット線維芽細胞を用いて、培養上清中のCNPをRIA法にて測定した。さらに、逆層クロマトグラフィーを用いてCNP免疫活性の同定を行った。ノーザンブロット法にてCNPとGC-Bの発現を検討した。CNP (10^{-10} ~ 10^{-7} M)にて刺激後、細胞内cGMP産生をラジオイムノアッセイにて測定した。CNP (10^{-10} ~ 10^{-7} M)にて刺激後コラーゲン産生について 3 Hプロリンの取り込みにて、DNA合成能について 3 Hサイミジンの取り込みにて検討した。

2. ラットに対するCNP持続投与の影響の検討

雄性SDラット(350-400g)を用い、右頸静脈と大腿静脈にカテーテルを留置し、0.1 μ g/kg/分と1.0 μ g/kg/分のCNPを24時間持続投与した。左室カテーテルを挿入し、CNP投与開始5分後の左室圧を測定した。

3. 浸透圧ポンプを用いたアドレノメジュリン慢性投与の作用の検討

雄性SDラット(350-400g)を用い、浸透圧ポンプにてアドレノメジュリン(500ng/時間)にて7週間投与し心機能に与える影響について検討した。

4. ネブライザーを用いたアドレノメジュリンの吸入による投与の検討

雄性Wistarラット(80-100g)を用い、0.5 μ gのA

ドレノメジュリンを30分間、ネブライザーにて1日4回吸入させた。3週間継続後、右大腿動脈と臍静脈よりカテーテルを挿入し、血圧、心拍数、右心圧、肺動脈圧を測定した。モノクロタリン投与による肺高血圧モデルラットに対して同様の検討を行った。

C. 研究結果

1. 線維芽細胞におけるCNPの発現、分泌、作用の検討

ラット線維芽細胞培養上清中にCNP様免疫活性を同定し、逆層クロマトグラフィーにてCNPであることを確認した。ノーザンブロット法にてラット線維芽細胞はCNPとGC-Bの発現を確認した。ラット線維芽細胞における細胞内cGMP産生はCNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M) 添加により濃度依存性に上昇し、その作用はANP, BNPより強力だった。CNP (10^{-10} ~ 10^{-7} M) にてコラーゲン産生は濃度依存性に抑制され、CNP (10^{-7} M) にて30%程度抑制を受けた。CNP (10^{-10} ~ 10^{-7} M) にてDNA合成能は濃度依存性に抑制され、CNP (10^{-7} M) にて30%程度抑制を受けた。

2. ラットに対するCNP持続投与の影響の検討

ラットに対し0.1 μ g/kg/分と1.0 μ g/kg/分のCNPを24時間持続投与した結果、1.0 μ g/kg/分の投与により、左室収縮期圧は有意に低下を認めしたが、心拍数、左室拡張期圧については変化を認めなかった。0.1 μ g/kg/分の投与ではいずれも変化を認めなかった。

3. ラットに対する浸透圧ポンプを用いたアドレノメジュリン慢性投与の作用の検討

浸透圧ポンプにてアドレノメジュリン(500ng/時間)7週間投与群において、左室拡張期圧、右室収縮期圧、右房圧、左室重量体重比はいずれも有意に低下を認め、浸透圧ポンプによるアドレノメジュリンの長期投与が有効であることが示された。

4. ラットに対するネブライザーを用いたアドレノメジュリンの吸入による投与の検討

3週間連日吸入によりアドレノメジュリン吸入群では平均肺動脈圧と総肺抵抗が有意に低下した。また、モノクロタリン投与による肺高血圧モデルラットにおいてアドレノメジュリン吸入は末梢肺動脈の中膜肥厚を改善し、6週間生存率を生食吸入群で10%に対し、アドレノメジュリン吸入群では70%と著明に改善し、ネブライザーを用いた吸入が有効な投与方法であることが示された。

D. 考察

本年度の研究により、線維芽細胞においても軟骨細胞、脛骨器官培養と同様にCNPはコラーゲン産生を抑制することが明らかになった。軟骨の周囲の結合組織には線維芽細胞が存在することから軟骨細胞と線維芽細胞の関係についても検討が必要と考えられる。種々の投与実験の結果から、ラットに対するCNPの持続投与の有効性が示された。CNPと同様にペプチドホルモンであるアドレノメジュリンについて浸透圧ポンプを用いた長期慢性投与、ネブライザーを用いた吸入投与がいずれも有効であったことから、同様の手法を用いて、CNPの慢性投与による軟骨への影響が検討できることが明らかとなった。

E. 結論

現在でもインスリン、バソプレッシン、カルシトニン始めいくつかのペプチド製剤が実際に臨床応用されているが、今後益々ペプチド製剤の医療に占める割合は大きいと思われる。このような中、ペプチド製剤共通の弱点を克服するDDSの開発や持続型ペプチド剤の開発が医療産業全体としてのニーズに繋がると考え、CNPの軟骨再生への最も効率的な投与方法を検討していく計画である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Horio T, Tokudome T, Maki T, Yoshihara F, Suga S, Nishikimi T, Kojima M, Kawano Y, Kangawa K. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology* 144:2279-2284, 2003.
- Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, Oshita A, Shinomiya K, Yu Y, Takagi Y, Mizushige K, Kangawa K, Kohno M. Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats. *Cardiovasc Res* 58:231-138, 2003.
- Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:889-895, 2003.
- Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, Shirai M, Mori H, Miyatake K, Kangawa K. Effects of

- adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 109:351-356, 2004
5. Nagaya N, Okumura H, Uematsu M, Shimizu W, Ono F, Shirai M, Mori H, Miyatake K, Kangawa K. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:2125-2131, 2003.
 6. Nishikimi T, Yoshihara F, Horinaka S, Kobayashi N, Mori Y, Tadokoro K, Akimoto K, Minamino N, Kangawa K, Matsuoka H. Chronic administration of adrenomedullin attenuates transition from left ventricular hypertrophy to heart failure in rats. *Hypertension* 42:1034-1041, 2003.
 7. Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 109:242-248, 2004.
 8. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 109:526-531, 2004.
- 塩田清二、井上修二、寒川賢治、中里雅光、視床下部腹内側核破壊ラットにおけるグレリン発現、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
6. 有安宏之、高屋和彦、細田洋司、笹谷雄二、金本巨哲、五十子大雅、荒井宏司、赤水尚史、寒川賢治、中尾一和、グレリンの分泌調節の解明とグレリン過剰発現トランスジェニック (Tg) マウスの作製、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 7. 金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、笹谷雄二、有安宏之、李玉妹、森山賢治、荒井宏司、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和、ヒトグレリン遺伝子 5'上流領域の構造とその機能解析、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 8. 伊達紫、寒川賢治、中里雅光、胃グレリンの神経系を介する作用機構に関する研究、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 9. 高田真人、本間保、細田洋司、寒川賢治、ELA法による血漿グレリンの直接測定系の開発と血液検体測定への適用、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 10. 岩倉浩、細田公則、孫徹、藤倉純二、冨田努、野口倫生、高屋和彦、伊藤裕、赤水尚史、小川佳宏、林達也、井上元、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和、ラットグルカゴンプロモーターおよびラットインスリン2プロモーターを用いたグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの解析、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 11. 北村聖子、小谷裕美子、松田純子、横田一郎、細田洋司、寒川賢治、周生期におけるグレリンの動態—胎児、新生児発育との相関—、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 12. 嶋田充志、伊達紫、中里雅光、寒川賢治、吉松博信、ソマトスタチンによるグレリン分泌調節に関する研究、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 13. 高村昇、濱田亜衣子、大津留晶、古市哲、永田康浩、円城寺昭人、兼松隆之、下川功、細田洋司、寒川賢治、山下俊一、胃切除後におけるグレリン分泌と体重調節、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
 14. 西芳寛、佐藤貴弘、寺西仁志、花田礼子、馬田敏幸、細田洋司、寒川賢治、児島将康、胃器官培養を用いたグレリン分泌調節機構の検討、第76回日本内分泌学会学術総会

2. 学会発表 国内発表

1. 児島将康、寒川賢治、グレリンとニューロメジンU、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
2. 中里雅光、伊達紫、寒川賢治、グレリンの局在と生理作用、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
3. 花田礼子、寺西仁、佐藤貴弘、西芳寛、上田陽一、白井幹康、吉松博信、寒川賢治、児島将康、Neuromedin Uの内分泌代謝ならびに睡眠・覚醒における役割の解明—NMU欠損マウスを用いた検討—、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
4. 片瀨剛、菊本克郎、濱野一将、寒川賢治、松尾壽之、南野直人、新規生理活性ペプチド・カルシトニン受容体刺激ペプチドの生理機能の解明、第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
5. 十枝内厚次、伊達紫、村上昇、舟橋久幸、

2003/5/9-11 (横浜)

15. 竹野亮子、置村康彦、岸本正彦、大野伯和、生田肇、細田洋司、工藤工、高橋健太郎、井口元三、高橋裕、加治秀介、寒川賢治、黒田嘉和、千原和夫、胃切除後の患者におけるグレリンの成長ホルモン (GH) 分泌促進作用、第 76 回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
16. Tokudome T, Horio T, Suga S, Kishimoto I, Hino J, Okano I, Mori K, Yosihara F, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K, Endogenous Endothelin-1 Secreted from cultured rat cardiac nonmyocytes inhibits doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis via ERK-dependent CREB activation. The 67th Annual Japanese Circulation Society, 3/28-30, 2003, Fukuoka.
17. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Asada Y, Kangawa K, Eto T, Beneficial effects of recombinant human adrenomedullin(hAM) on left ventricular (LV) remodeling after myocardial infarction (MI) in Rats. The 67th Annual Japanese Circulation Society, 3/28-30, 2003, Fukuoka.
18. Suzuki Y, Horio T, Kitamura K, Eto T, Kanagawa K, Kawano Y, Plasma adrenomedullin concentration is increased in Patients with arteriosclerosis obliterans associated with vascular inflammation. The 67th Annual Japanese Circulation Society, 3/28-30, 2003, Fukuoka.
19. Nagaya N, Kanda M, Fukuyama N, Horio T, Uematsu M, Miyatake K, Kanagawa K, Mori H, Hybrid Cell-Gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. The 67th Annual Japanese Circulation Society, 3/28-30, 2003, Fukuoka.

H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許 4 件

国際特許 3 件

軟骨細胞におけるC型ナトリウム利尿ペプチド賦活化による作用機構に関する研究

分担研究者：小松弥郷（京都大学大学院医学研究科 助手）

本研究では CNP/GC-B 系の全く新しい軟骨細胞肥大化作用を応用し、長寿社会において増加している変形性関節症等の関節軟骨病変に対する新規治療法へ応用するため、CNPの軟骨細胞に対する作用機構を明らかにすることを目的としている。本年度の研究により、軟骨形成不全症においては軟骨細胞の細胞外基質産生の低下を認め、FGF 3 型受容体の機能獲得型変異による MAP キナーゼ経路の活性化異常がその原因であり、CNP は MAP キナーゼ経路の活性化異常に拮抗的に作用することが明らかとなった。一方、CNP の細胞内 cGMP 産生に対し FGF18 が MAP キナーゼ経路を介し、抑制作用を有することから、軟骨細胞において CNP/GC-B 系と FGFR3/MAPK 経路が相互に拮抗的に作用していることが明らかとなった。また、CNP とその受容体である GC-B を賦活化する療法の1つとしてクリアランス受容体アゴニストである C-ANF₄₋₂₃ の作用を検討したが、ATDC 細胞、脛骨器官培養いずれの系においても CNP の作用を増強することが明らかとなり、今後 in vivo の実験系でも検討を進めていく計画である。

A. 研究目的

本研究では CNP/GC-B 系の全く新しい軟骨細胞肥大化作用を応用し、長寿社会において増加している変形性関節症等の関節軟骨病変に対する新規治療法へ応用するため、CNPの軟骨細胞に対する作用機構を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. 軟骨培養細胞を用いた CNP/GC-B 系と FGFR3 の細胞内情報伝達機構の相互作用の検討

変異型 FGFR3 (G380R) は機能獲得型変異であることが、In vitro の実験で証明されており、FGFR3 の活性化に伴う STAT1, MAP キナーゼのリン酸化が軟骨細胞の分化、増殖調節に重要であることが明らかとなっている。CNP/GC-B 系の下流のシグナルは cyclic GMP/CGK-II であり、これまで CNP/GC-B 系と FGFR3 及び、STAT1, MAP キナーゼのリン酸化との相互作用については不明である。両者の細胞内情報伝達機構の相互作用について解明するために、軟骨培養株である ATDC 細胞を用いて 1 時間 CNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M); または cGMP (10^{-6} M) 存在下で培養後、FGFR3 の agonist である FGF-2 (1ng/ml), FGF18 (1ng/ml) を添加し、タンパクを抽出し、ウエスタンブロット法にて、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2、STAT-1、リン酸化 STAT-1 の発現について検討した。また、これまでのわれわれの検討から ATDC 細胞は CNP の受容体である GC-B を発現しており、

CNP 依存性の cGMP 産生を認める。1 時間 FGF-2 (10ng/ml)、または FGF18 (1~100ng/ml) 存在下で培養後、CNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M) にて刺激後、細胞内 cGMP 産生をラジオイムノアッセイにて測定した。MAP キナーゼ経路の阻害剤である PD98059 を用いて CNP 依存性細胞内 cGMP 産生に対する影響についても検討した。

2. 脛骨器官培養を用いた CNP と FGF18 の軟骨細胞に対する作用の検討

胎生 16、5 日齢のマウス脛骨を単離し、4 日間 CNP (10^{-7} M)、FGF18 (1ng/ml) 存在下で培養し、培養終了後、脛骨の形態計測、組織学的解析を行った。

3. 軟骨培養細胞を用いたクリアランス受容体アゴニストである C-ANF₄₋₂₃ の影響の検討

クリアランス受容体ノックアウトマウスが CNP 過剰発現マウスと同様に脊椎の湾曲と長管骨の伸長した発現型を示すことから、クリアランス受容体が CNP の軟骨作用調節に重要である可能性が示唆されていた。そこで、ATDC 細胞において 1 時間 C-ANF₄₋₂₃ 存在下で培養後、CNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M) にて刺激し、細胞内 cGMP 産生をラジオイムノアッセイにて測定した。

4. 軟骨形成不全症患者における CNP 関連遺伝子変異の検討

軟骨形成不全症は常染色体優性遺伝であり、その 95% 以上の患者は FGFR3 の細胞内ドメインの変異 (G380R) を認めるが、残りの 5% では変異を

認めない。また、より四肢の程度が穏やかで FGFR3 の変異を認めない chondrodysplasia という疾患群も存在し、その原因は不明である。CNP ノックアウトマウスが軟骨形成不全症にみられるような四肢、体幹の短縮を認めることから、ヒトにおいても CNP の不活化変異が存在し、軟骨形成不全症を呈する可能性が考えられる。そこで、FGFR3 の変異のない軟骨形成不全症患者において CNP、GC-B、2 型 cGMP 依存性タンパクキナーゼ (CGK-II) の遺伝子変異の有無を検討した。

C. 研究結果

1. 軟骨培養細胞を用いた CNP/GC-B 系と FGFR3 の細胞内情報伝達機構の相互作用の検討

ATDC 細胞においてリン酸化 ERK1/2 の発現はほとんど認められないが、FGF-2 (1ng/ml)、FGF18 (1ng/ml) の刺激により著しく発現が増強した。この FGF のよるリン酸化 ERK1/2 の発現は CNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M)、または cGMP (10^{-5} M) による前処置にて濃度依存性の減少を認めた。一方、リン酸化 STAT-1 の発現については CNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M)、または cGMP (10^{-5} M) による前処置にてほとんど影響を認めなかった。一方、CNP による細胞内 cGMP 産生は CNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M) 添加により濃度依存性に上昇し、CNP 10^{-7} M により基礎値の 50 倍に上昇した。この上昇は FGFR3 の特異的リガンドである FGF18 (1ng/ml) 添加にて約 60% 程度にまで抑制された。この時、Western Blot 法による解析では ATDC5 細胞における CNP 受容体である GC-B の発現量は変化しなかった。さらに、PD98059 の前処置により FGF18 (1ng/ml) 添加による cGMP 産生の抑制は正常まで回復した。

2. 脛骨器官培養を用いた CNP と FGF18 の軟骨細胞に対する作用の検討

胎生 16.5 日齢のマウス脛骨は CNP (10^{-7} M) 添加により伸長促進を認めた。一方、FGF18 (1ng/ml) 添加群では伸長抑制を認め、Fgfr3-Ach-Tg 脛骨の器官培養と同様の結果を示した。組織学的に FGF18 (1ng/ml) 添加群は肥大化軟骨層の短縮、強拡大では特に増殖軟骨細胞層と前肥大化軟骨層における細胞外基質の減少を認めた。CNP (10^{-7} M) と FGF18 (1ng/ml) の同時添加群においては添加群においては FGF18 添加群に認めた肥大化軟骨層の短縮、特に増殖軟骨細胞層と前肥大化軟骨層における細胞外基質の減少の著しい改善を認めた。

3. クリアランス受容体アゴニストである C-ANF₄₋₂₃ の影響の検討

ATDC 細胞において C-ANF₄₋₂₃ (10^{-9} M) 添加にて CNP による細胞内 cGMP 産生は約 30% の増強を認め

た。マウス胎仔脛骨器官培養による解析では CNP (10^{-7} M) による骨伸長作用に対し C-ANF₄₋₂₃ (10^{-9} M) 添加により 10% 程度増強された。

4. 軟骨形成不全症患者における CNP 関連遺伝子変異の検討

現在軟骨形成不全症患者から遺伝子を収集しており、引き続き症例を増やして CNP、GC-B、2 型 cGMP 依存性タンパクキナーゼ (CGK-II) の遺伝子変異の有無を検討している。

D. 考察

本年度の研究により、軟骨形成不全症においては軟骨細胞の細胞外基質産生の低下を認め、FGF3 型受容体の機能獲得型変異による MAP キナーゼ経路の活性化異常がその原因であり、CNP は MAP キナーゼ経路の活性化異常に拮抗的に作用することが明らかとなった。一方、CNP の細胞内 cGMP 産生に対し FGF18 が MAP キナーゼ経路を介し、抑制作用を有することから、軟骨細胞において CNP/GC-B 系と FGFR3/MAPK 経路が相互に拮抗的に作用していることが明らかとなった。また、CNP とその受容体である GC-B を賦活化する療法の 1 つとしてクリアランス受容体アゴニストである C-ANF₄₋₂₃ の作用を検討したが、ATDC 細胞、脛骨器官培養いずれの系においても CNP の作用を増強することが明らかとなり、今後 *in vivo* の実験系でも検討を進めていく計画である。

E. 結論

クリアランス受容体ノックアウトマウスが CNP 過剰発現マウスと同様に脊椎の湾曲と長管骨の伸長した発現型を示すことから、クリアランス受容体が CNP の軟骨作用調節に重要である可能性が示唆されていた。今回のわれわれの検討より、C-ANF が CNP の軟骨成長作用を増強することが明らかになり、CNP/GC-B 賦活化作用として軟骨再生治療への応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 発表論文

1. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M., Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K, Targeted overexpression of C-type natriuretic peptide in chondrocytes rescues dwarfism in achondroplasia. *Nat Med*, 10:80-86, 2004.

2. Kaihara S, Bessho K, Okubo Y, Sonobe J, Komatsu Y, Miura M, Miyatake S, Nakao K, Iizuka T, Over expression of bone morphogenetic Protein-3b (BMP-3b) using an adenoviral vector promote the osteoblastic differentiation in C2C12 cells and augment the bone formation induced by bone morphogenetic protein-2(BMP-2) in rats. *Life Science* 72:1683-1693, 2003.
3. Komatsu Y, Nakajima R, Yasoda A, Ozasa A, Nakatsuru Y, Arai H, Nakao K, Shigeno C, A Case of Parathyroid Carcinoma with Suppression of Serum Parathyroid Hormone (PTH) Level After Pulse Therapy of Vitamin D3. *Osteoporosis Japan* 11:595, 2003.
4. Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, Nakao K, C-Type Natriuretic Peptide Negatively Cross-Talks with Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Signaling in ATDC5 Cells. *Osteoporosis Japan* 11:55, 2003.

2. 学会発表 国際学会

1. Komatsu Y, Yasoda A, Chusho H, T. Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Suda S, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K, Targeted overexpression of C-Type Natriuretic Peptide in Chondrocytes Rescues Dwarfism in Achondroplasia., 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Resarch. 3-7 June 2003, Osaka, Japan

国内学会

1. 小松弥郷, 八十田明宏, 小笹亜美, 中津留有子, 荒井宏司, 中尾一和, 原発性骨粗鬆症患者におけるアレンドロネート治療後の血清 β -CTxの推移, 第100回日本内科学会 2003/4/3 (福岡)
2. 中嶋蘭, 小松弥郷, 八十田明宏, 小笹亜美, 中津留有子, 荒井宏司, 中尾一和, ビタミンDパルス療法にて血中PTHの低下を認めた副甲状腺癌術後再発の一例, 第50回関西カルシウム懇話会 2003/4/19 (大阪)
3. 小松弥郷, 八十田明宏, 小笹亜美, 中津留有子, 荒井宏司, 中尾一和, 未治療原発性骨粗鬆症患者におけるアレンドロネート治療前後の血清 β -CTx値の推移の検討, 第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
4. 八十田明宏, 小松弥郷, 中所英樹, 宮澤崇, 小笹亜美, 中津留有子, 田村尚久, 小川佳宏, 荒井宏司, 中尾一和, C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の軟骨形成不全症モ

デルマウスの骨伸長障害に対する効果 — 器官培養を用いた検討 —, 第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)

5. 小笹亜美, 小松弥郷, 八十田明宏, 中津留有子, 荒井宏司, 中尾一和, 培養軟骨細胞におけるC型ナトリウム利尿ペプチドとFGF18との相互作用についての検討, 第76回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11 (横浜)
6. 小松弥郷, 内科医としての骨粗鬆症治療への取り組み, 学術講演会 2003/5/31 (大津)
7. 小松弥郷, Workshop to Review and Analyze a Key Osteoporosis Study, Japanese Osteoporosis Investigators Meeting 2003/4/26-27
8. 八十田明宏, 小松弥郷, 佐久間陽子, 小笹亜美, 中津留有子, 荒井宏司, 中尾一和, C型ナトリウム利尿ペプチドは軟骨形成不全症モデルマウスの骨密度を維持したまま骨伸長障害を改善する, 第5回骨粗鬆症学会 2003/10/9 (福岡)
9. 金本巨哲, 荒井宏司, 南部拓央, 中津留有子, 旗谷雄二, 有安宏之, 小笹亜美, 西條美佐, 佐久間陽子, 八十田明宏, 森山賢治, 小松弥郷, 濾胞性腫瘍との鑑別が困難であった転移性甲状腺癌の1例, 第26回京都甲状腺研究会, 2003/7/19 (京都)
10. 小松弥郷, 八十田明宏, 佐久間陽子, 小笹亜美, 中津留有子, 中尾一和, 原発性骨粗鬆症 Etidronate にて治療を行った原発性骨粗鬆症患者の各種骨代謝マーカーと骨密度の変化率との関係についての検討, ビスフォスフォネートフォーラム 2003/8/30
11. 真嶋隆文, 小池雄太, 重本道香, 高木千恵子, 山田敏行, 小松弥郷, DXA 使用における2型糖尿病患者の骨密度の検討, 第51回関西カルシウム懇話会 2003/10/25 (大阪)
12. 南部拓央, 荒井宏司, 森山賢治, 小松弥郷, 中尾一和, Adrenomedullin 遺伝子の高血圧肥満モデルラット脂肪組織における発現, 第26回日本高血圧学会 2003/10/30 (宮崎)
13. 小松弥郷, 西田直生志, 八十田明宏, 佐久間陽子, 小笹亜美, 中津留有子, 米田俊貴, 西村貴文, 伊藤照明, 荒井宏司, 福田善弘, 中尾一和, インターフェロン投与による骨代謝, 骨量への影響, 第10回近畿骨粗鬆症研究会, 2004/2/21 (大阪)
14. 八十田明宏, 小松弥郷, 中所英樹, 宮澤崇, 小笹亜美, 中津留有子, 田村尚久, 小川佳宏, 荒井宏司, 中尾一和, 軟骨形成不全症の骨伸長障害に対するCNPの効果 モデルマウスを用いた検討, 第101回日本内科学会 2004/4/6 (東京)

15. 太田真紀子、小松弥郷、八十田明宏、佐久間陽子、小笹亜美、中津留有子、荒井宏司、中尾一和、骨量減少と下腿部紫斑を呈したクッシング症候群の一例、第27回京滋骨・カルシウム代謝研究会、2004/3/5
16. 小松弥郷、健やかに生きるために④ー骨粗鬆症一、京都桂川ロータリークラブ第695回例会 2004/2/5 (京都)
17. 佐野陽平、荒井宏司、山野 言、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、安里 亮、田中信三、小杉真司、旗谷雄二、有安宏之、小笹亜美、西條美佐、佐久間陽子、森山賢治、八十田明宏、小松弥郷、中尾一和、MEN type1の1症例、第66回京都市内分泌同好会、2004/3/6 (京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (中尾一和)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, <u>Nakao K</u>	Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway.	Nat Med	10	80-86	2004
Yamahara K, Itoh H, Chun Y-H, Ogawa Y, Yamashita J, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yurugi-Kobayashi T, Miyashita K, Tsujimoto H, Kook H, Feil R, Garbers D. L, Hofmann F, <u>Nakao K</u>	Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides /cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration.	Proc Natl Acad Sci USA	100	3404-3409	2003
Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Tanimoto K, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi M, Garbers D. L., Fukamizu A, <u>Nakao K</u>	Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A.	Endocrinology	145	951-958	2004
Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Kishimoto I, Ogawa Y, Kawakami R, Nakagawa Y, Nakanishi M, <u>Nakao K</u>	Angiotensin II -induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation.	Hypertens Res	26	847-853	2003
Sone M, Itoh H, Yamashita J, Yurugi-Kobayashi T, Sasaki Y, Kondo Y, Nonoguchi A, Sawada N, Yamahara K, Miyashita K, Park K, Shibuya M, Nito S, Nishikawa S, <u>Nakao K</u>	Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells.	Circulation	107	2085-2088	2003

Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, Yamahara K, Hirai H, Kobayashi T, Ogawa M, Nishikawa S, Nishikawa S, Nakao K	Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage.	Blood	101	2675-2678	2003
Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K	NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function.	EMBO J	22	6310-6321	2003
Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Nakao K	Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo.	FEBS Lett	544	86-92	2003
Matsuoka Y, Furuyashiki T, Bito H, Ushikubi F, Tanaka Y, Kobayashi T, Muro S, Satoh N, Kayahara T, Higashi M, Mizoguchi A, Shichi H, Fukuda Y, Nakao K, Narumiya S	Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes.	Proc Natl Acad Sci USA	100	4132-4137	2003
Sawai K, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Suganami T, Koshikawa M, Yahata K, Makino H, Nagae T, Fujinaga Y, Yokoi H, Yoshioka T, Yoshimoto A, Tanaka I, Nakao K	Angiogenic protein Cyr61 is expressed by podocytes in anti-thy-1 glomerulonephritis.	J Am Soc Nephrol	14	1154-1163	2003

雑誌 (寒川賢治)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Horio T, Tokudome T, Maki T, Yoshihara F, Suga S, Nishikimi T, Kojima M, Kawano Y, Kangawa K	Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts.	Endocrinology	144	2279-2284	2003

Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, Oshita A, Shinomiya K, Yu Y, Takagi Y, Mizushige K, <u>Kangawa K</u> , Kohno M	Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats.	Cardiovasc Res	58	231-138	2003
Nagaya N, <u>Kangawa K</u> , Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H	Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells.	Circulation	108	889-895	2003
Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, Shirai M, Mori H, Miyatake K, <u>Kangawa K</u>	Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.	Circulation	109	351-356	2004
Nagaya N, Okumura H, Uematsu M, Shimizu W, Ono F, Shirai M, Mori H, Miyatake K, <u>Kangawa K</u> .	Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	285	2125-2131	2003
Nishikimi T, Yoshihara F, Horinaka S, Kobayashi N, Mori Y, Tadokoro K, Akimoto K, Minamino N, <u>Kangawa K</u> , Matsuoka H	Chronic administration of adrenomedullin attenuates transition from left ventricular hypertrophy to heart failure in rats.	Hypertension	42	1034-1041	2003
Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, <u>Kangawa K</u>	Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway.	Circulation	109	242-248	2004
Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, <u>Kangawa K</u> , Mori H	Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin.	Circulation	109	526-531	2004

雑誌 (小松弥郷)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasoda A, <u>Komatsu Y</u> , Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K	Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway.	Nat Med	10	80-86	2004
Kaihara S, Bessho K, Okubo Y, Sonobe J, <u>Komatsu Y</u> , Miura M, Miyatake S, Nakao K, Iizuka T	Over expression of bone morphogenetic Protein-3b(BMP-3b) using an adenoviral vector promote the osteoblastic differentiation in C2C12 cells and augment the bone formation induced by bone morphogenetic protein-2(BMP-2) in rats.	Life Sci	72	1683-1693	2003
<u>Komatsu Y</u> , Nakajima R, Yasoda A, Ozasa A, Nakatsuru Y, Arai H, Nakao K, Shigeno C	A Case of Parathyroid Carcinoma with Suppression of Serum Parathyroid Hormone (PTH) Level After Pulse Therapy of Vitamin D3.	Osteoporosis Japan	11	595	2003
Ozasa A, <u>Komatsu Y</u> , Yasoda A, Nakao K	C-Type Natriuretic Peptide Negatively Cross-Talks with Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Signaling in ATDC5 Cells.	Osteoporosis Japan	11	55	2003

20030386

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。