

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16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)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

中尾一和 1

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

寒川賢治 7

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

小松弥郷 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 21

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）
平成 16 年度総括研究報告書

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

主任研究者：中尾一和（京都大学大学院医学研究科 教授）

主任研究者および分担研究者は 20 年間にわたり、一貫して新規生理活性ペプチドの単離同定と生理的・臨床的意義の解明に向けた研究を実践し、その成果を踏まえた臨床応用を展開してきた。特に Na 利尿ペプチドファミリー（ANP、BNP、CNP）の発見と心臓ホルモンとしての ANP、BNP の基礎研究の成果を踏まえた臨床応用は国際的にも最高レベルの評価を得ている。主任研究者によって達成された心不全の診断法としての ANP と BNP の測定法の開発、急性心不全の治療薬として ANP の臨床応用は、欧米諸国に比較して 5 年以上先行したものであり、基礎研究の成果を臨床応用に発展させるトランスレーショナルリサーチのわが国における成功の一例と考えられている。更に主任研究者はこれまでの遺伝子改変動物を用いた検討から、軟骨の形成において CNP とその受容体である guanylyl cyclase B (GC-B) が重要であり、CNP ノックアウトマウスでは成長板軟骨の発育障害の結果、四肢体幹の著しい短縮が起こること、逆に軟骨に CNP を過剰発現するトランスジェニックマウスでは成長板軟骨の増大の結果、四肢体幹の著しい伸張をきたすことを発見した。この発見を契機として四肢短縮型の低身長をきたす疾患である Maroteaux 型 acromesomelic dysplasia が GC-B の不活性型遺伝子変異が原因であることが発見され、ヒトの骨系統疾患における CNP/GC-B 系の重要性が認識されるに至っている。以上の知見を踏まえて、主任研究者は CNP/GC-B 系の軟骨再生への応用を検討し、主要な内軟骨性骨化異常疾患である軟骨無形成症モデルマウスの四肢体幹の短縮が軟骨における CNP の過剰発現により正常まで是正されることを明らかにした。更に CNP の軟骨細胞への作用は、軟骨無形成症の原因である 3 型 FGF 受容体の活性型遺伝子変異による MAP キナーゼ経路の活性化を抑制し、基質産生の増加により成長板軟骨を増大させることによることを明らかにした (Nat Med, 10;80, 2004)。また、CNP 投与モデルとして血中 CNP 濃度の上昇するトランスジェニックマウスを作製する過程で CNP は成長板軟骨のみならず関節軟骨の肥大作用を有することを発見した。更に、マウス、ラットの変形性関節症モデルを対象にして CNP 投与の有効濃度、投与方法、投与時期、安全性に関する検討を行い、CNP の有用性を証明する成果を得た。以上の研究成果から、成長板軟骨と関節軟骨における CNP/GC-B 系の機能的意義とその分子機構が明らかになり、骨、軟骨、関節を標的とする CNP/GC-B 系のトランスレーショナルリサーチが推進された。

分担研究者

寒川賢治

（国立循環器病センター研究所・生化学部長）

小松弥郷

（京都大学大学院医学研究科 助手）

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四肢、脊椎の骨の著しい過剰伸長の結果、骨格に異常をきたすことを発見し、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(J Biol Chem, 273; 11695-11698)、CNP ノックアウトマウスを作製、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 (Proc Natl Acad Sci USA 98; 4016, 2001)を明らかにした。以上より新規の軟骨成長因子として CNP 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) CNP投与モデルとしてのCNP過剰発現マウスの作製と発現型の解析

CNPの治療薬としての効果を検討する目的で、循環血液中のCNPを種々の濃度に上昇させるCNP過剰発現マウス(SAP-CNP-Tg)を作製し、CNPの全身投与と同様の状況を遺伝子改変動物で再現する。SAP-CNP-Tg の表現型を成長曲線、全身の軟レントゲン撮影にて解析する。SAP-CNP-Tgを用いてCNPの成長板軟骨への作用、関節軟骨への作用を組織学的、in situ hybridization による種々の軟骨細胞の分化マーカーの解析により検討する。また、SAP-CNP-Tg を用いてCNPを全身投与する場合の用量設定、有効性、軟骨以外の臓器への作用等全身への影響、安全性を検討する。

2) 合成CNPのマウス投与に関する検討

SAP-CNP-Tg マウスの解析から得られた結果からマウスに CNP の有効濃度に達するように合成ペプチド CNP22 を連日皮下投与、浸透圧ポンプ(Alzet infusion pump)を用いた持続皮下投与、ハーネス式フリームービングのカニキュレーションによる持続静脈投与を行い、吻腎長、血中 CNP、cGMP 濃度の測定、軟 X 線撮影による骨の形態学的検討、成長板軟骨の組織学的検討により、成長板軟骨成長に対し、有効な投与方法、濃度、投与開始時期、投与期間を決定する。

3) 変形性関節症モデルマウスに対するCNPの効果

マウス変形性関節症モデルとして外科的モデル(前十字靭帯切断+内側側副靭帯切断)とコラーゲンナーゼ処理モデルを用いて、膝関節腫脹、関節軟骨の組織解析を指標に、CNPの影響を観察する。

4) 軟骨疾患患者におけるCNP関連遺伝子変異の検討

軟骨無形成症は常染色体優性遺伝であり、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、類似の病態を示すが、FGFR3 の変異を認めない疾患群も存在し、その原因は不明である。ヒトにおいても CNP の機能不活化変異が存在し、軟骨に異常を呈する可能性があり、広く先天性の軟骨異常症患者において CNP 経路の遺伝子変異の有無を検討し、その病態生理的意義の解明につなげる。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては京都大学動物実験委員会に申請し、承認を得ている(MedKyo01094)。組み替え DNA 実験計画について京都大学の承認を得ている。ヒトの血液、関節液検体、CNP 関連遺伝子解析に関しては患者、その他関係者の人権及び利益の保護の取扱いについて十分配慮した研究計画書を作製し、京都大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得ている(G20-3)。

C. 研究結果

1) CNP 投与モデルとして血中 CNP 濃度の上昇したトランスジェニックマウス(SAP-CNP-Tg)を作製し CNP 濃度依存性の四肢、体幹の過剰伸長を観察した。組織学的には成長板軟骨及び関節軟骨の肥大を観察し、この発現型が軟骨に CNP を過剰発現するトランスジェニックマウス(col2-CNP-Tg)と同様であることから、血中 CNP が成長板軟骨及び関節軟骨に作用し、肥大化を引き起こすことを明らかにした。in situ hybridization の検討から CNP、GC-B の発現と 2 型コラーゲンの発現部位はほぼ一致していたこと、CNP 投与により cyclic GMP が上昇し、関節軟骨を肥大化することから、関節軟骨に CNP/GC-B 系が発現し、CNP が関節軟骨においても有効であることを明らかにした。成長板軟骨、関節軟骨において組織学的解析、軟骨分化マーカーとして 2 型コラーゲン、10 型コラーゲン、Runx2, Indian hedgehog の解析を行い、野生型と比較し、SAP-CNP-Tg マウスの肥大した成長板軟骨、関節軟骨が正常の構造を保っていること明らかにした。

2) マウスに合成CNPの全身投与を行い、骨・軟骨・関節軟骨に対し、有効濃度、投与方法、投与時期、安全性に関し検討した。CNP の持続静脈投与にて CNP-Tg マウスに観察されるのと同様に四肢、体幹の伸長を認め、出生後のマウスに対しても CNP の投与が骨伸長に有効であることを証明した。これまでのところ安全性に関してならんら問題点を認めていない。

3) マウス変形性膝関節症モデルとして外科的モデル(前十字靭帯切断+内側側副靭帯切断)において CNP 投与群では非投与群と比較して術後10日目より膝関節腫脹の軽減を認め、その効果は術後27日目まで持続した。コラーゲナーゼ処理によるマウス変形性関節症モデルにおいて CNP 投与群では非投与群と比較してコラーゲナーゼ処理1日目から7日目まで膝関節腫脹の軽減を認めた。膝関節軟骨は組織学的にはコラーゲナーゼ処理4週間後においてコントロール群ではサフラニンO染色にてプロテオグリカンの減少を認めるが、CNP群ではプロテオグリカン量が維持されていた。

4) ヒトの軟骨疾患における遺伝子変異についてはわれわれの研究成果である CNP ノックアウトマウスの表現型に類似していることに着目して、海外のグループから常染色体劣性遺伝による四肢短縮型の低身長をきたす疾患として知られていた Maroteaux 型 acromesomelic dysplasia において CNP の受容体である GC-B の不活性型遺伝子変異が同定され、初めて CNP/GC-B 系がヒトの骨系統疾患の原因であることが証明された(Bartels CF, Am J Hum Genet, 75;27, 2004)。

D. 考察

本研究により、CNP 投与モデルとして血中 CNP 濃度の上昇するトランスジェニックマウス(SAP-CNP-Tg)を作製し、四肢、体幹の過剰伸長、成長板軟骨及び関節軟骨の肥大を観察し、この発現型が軟骨に CNP を過剰発現するトランスジェニックマウス(col2-CNP-Tg)と同様であることから、血中 CNP が軟骨に作用し、肥大化を引き起こすことを明らかにした。今回の検討により、CNP は成長板軟骨のみならず関節軟骨に対しても肥大化作用を有することを発見した。さらに、マウスの骨、軟骨、関節疾患モデルを対象にして CNP 投与の有効濃度、投与方法、投与時期、安全性に関する検討を行い、CNP の有用性を証明する成果を得た。本研究は CNP/GC-B 系の極めて強力な成長板軟骨肥大化作用と、関節軟骨に対する肥大化作用の発見を踏まえて、骨、軟骨、関節疾患における CNP/GC-B 系の意義を解明し、新規治療薬としての臨床応用を実現するトランスレショナルリサーチである。これまでに CNP/GC-B 系の軟骨における作用機構として MAP キナーゼ経路の抑制による軟骨細胞の基質産生の増加を明らかにしており、また、軟骨無形成症、変形性関節症の疾患モデルマウスに対

し、CNP が有効であること、CNP/GC-B 系がヒトの骨系統疾患の原因遺伝子であることが証明されたことから、CNP/GC-B 系は骨・軟骨における新しい制御機構として注目されており、この分野の基礎的、臨床的研究が益々進歩することが予想される。本研究により、未だ有効な治療法の確立されていない軟骨無形成症を含む先天性骨軟骨疾患のみならず、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の開発につながるものが期待される。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、それを基にした新たな治療法の開発に直結する。内因性生理活性ペプチドは毒性や副作用の少ない生体内分子であることより、臨床応用が成功する可能性が極めて高い。CNP/GC-B 系の骨・軟骨・関節疾患に対する治療効果が確認できれば、CNP/GC-B 系を標的にした創薬研究、特に CNP/GC-B 系の賦活化治療への期待は大きくなる。ペプチド製剤である CNP の drug delivery system の開発、長時間作用型のペプチド製剤の開発、非ペプチド性 GC-B アゴニストの開発へと広範な臨床応用が期待される。

E. 結論

本研究により、成長板軟骨と関節軟骨における CNP/GC-B 系の機能的意義とその分子機構を解明し、軟骨再生を標的とする CNP/GC-B 系のトランスレショナルリサーチが推進され、軟骨無形成症を含む先天性骨軟骨疾患のみならず、変形性関節症等の関節軟骨病変に対する新規治療法の開発につながるものが期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Nakatsuru Y, Sakuma Y, Arai H, Itoh N, Nakao K. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. Bone 2005, in press.
2. Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G,

- Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K. Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem* 2005, in press.
3. Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 2005, 146: 355-364.
 4. Furuto-Kato S, Matsukura S, Ogata M, Azuma N, Manabe T, Shigeno C, Asato R, Tanaka K, Komatsu Y, Nakao K. Primary hyperparathyroidism presumably caused by chronic parathyroiditis manifesting from hypocalcemia to severe hypercalcemia. *Int Med* 2005, 44: 60-64.
 5. Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Nakagawa Y, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. *Circulation* 2004, 110:3306-3312.
 6. Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 2004, 53:2443-2448.
 7. Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Nishida T, Takigawa M, Sugawara A, Nakao K. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:1430-1440.
 8. Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 2004, 145:4144-4153.
 9. Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Mizuno Y, Harada E, Ito T, Nakamura S, Abe K, Yamamoto M, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic marker after acute myocardial infarction – A long-term follow-up analysis. *Circulation* 2004, 110: 1387-1391
 10. Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim C.A, Ogawa Y, Liu X, Ware S.M, Craigen W.J, Robert J.J, Vinson C, Nakao K, Capeau J, Karsenty G. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 101: 3258-3263.
 11. Ebihara K, Kusakabe T, Masuzaki H, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyanaga F, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Gene and phenotype analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japanese: a novel homozygous nonsense mutation in seipin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:2360-2364.
 12. Son C, Hosoda K, Ishihara K, Bevilacqua L, Masuzaki H, Fushiki T, Harper M.E, Nakao K. Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia* 2004, 47:47-54.
 13. Ebihara K, Masuzaki H, Nakao K. Efficacy of long-term leptin-replacement therapy for lipotrophic diabetes in Japan. *N Engl J Med* 2004, 351:615-616.
 14. Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 2004, 145: 4144-4153.
 15. Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, Yasue S, Tomita T, Okazawa K, Fujikura J, Chusho H, Ebihara K, Hayashi T, Hosoda K, Nakao K. An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2004, 576: 492-497.

16. Nuamah MA, Yura S, Sagawa N, Itoh H, Mise H, Korita D, Kakui K, Takemura M, Ogawa Y, Nakao K, Fujii S. Significant increase in maternal plasma leptin concentration in induced delivery: a possible contribution of pro-inflammatory cytokines to placental leptin secretion. *Endocr J* 2004, 51:177-187.
17. Takahashi JA, Shimatsu A, Nakao K, Hashimoto N. Early postoperative indicators of late outcome in acromegalic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004, 60:366-374.
18. 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 Y, Garbers D-L, Fukamizu A, Nakao K. Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* 2004, 145: 951-958.

2. 学会発表

国際学会

1. Nakao K, 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」, Feb 27-28, 2004 Tokyo, Japan
2. Nakao K, Yasoda A, Komatsu Y, Natriuretic peptide in cartilage and bone, International Symposium for 20th Anniversary of Discovery of Natriuretic Peptide Family, Aug 6-7, 2004, Tokyo, Japan
3. Nakao K, Yasoda A, Komatsu Y, Translational research of CNP/guanylyl cyclase B system on achondroplasia, I'FOPE 2004 Bone & Growth, Aug 19, 2004 Awaji, Japan
4. Nakao K, Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Nakatsuru Y, Sakuma Y, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Activation of CNP/GC-B system as a novel strategy for skeletal dysplasia., 12th International Congress of Endocrinology, Aug 31-Sept 4, 2004, Lisbon, Portugal

国内学会

1. 中尾一和, ANP 発見後 20 年間の進歩、京都ハンプ学術講演会 2004/1/30、京都
2. 中尾一和, CNP について、つくしの会講演会、2004/1/31、東京
3. 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
4. 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
5. 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
6. 中尾一和, 内分泌代謝学のトランスレーショナルリサーチ、第 77 回日本内分泌学会学術総会会長講演、2004/6/25、京都
7. 中尾一和, イントロダクション、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「ホルモンと市民生活」－生活習慣病対策市民講座－、2004/6/2、京都
8. 中尾一和, ナトリウム利尿ペプチドのトランスレーショナルリサーチ (展開研究)、ANP 発見 20 周年記念 HANP FORUM 2004 基調講演、2004/8/7、東京
9. 中尾一和, ナトリウム利尿ペプチドのトランスレーショナルリサーチ、第 36 回臨床体液研究会、2004/10/16、東京
10. 中尾一和, 骨軟骨を標的とした CNP (C-type Natriuretic Peptide) のトランスレーショナルリサーチ、第 19 回日本整形外科学会 基礎学術集会 教育研修講演 4、2004/10/22、東京
11. 中尾一和, CNP のトランスレーショナルリサーチ、第 18 回小児成長障害研究会 特別講演 II、2004/10/30、東京
12. 中尾一和, 新規ホルモン、ナトリウム利尿ペプチドとレプチン、の Translational Research、第 16 年度日本医師会医学賞受賞講演、2004/11/1、東京
13. 中尾一和, レプチンのトランスレーショナルリサーチ、日本内分泌学会東北支部 第 5 回宮城県北地方会 特別講演、2004/11/17、古川
14. 中尾一和, 内分泌代謝学とトランスレーショナルリサーチ (生命科学研究科高次生体統御

学)、2004/12/7、京都

15. 中尾一和、軟骨骨異常を標的とした CNP (C-type natriuretic peptide) のトランスレーショナルリサーチ、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会、2005/2/2、豊中
16. 中尾一和、内分泌代謝学とトランスレーショナルリサーチ(秋田大学医学部構造機能医学講座分子医科学分野)、2005/2/25、秋田
17. 中尾一和、内分泌代謝学と Translational Research、名和田新教授退官記念講演会、2005/3/19、北九州

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1. 特願 2004-107871
GC-B (guanyryl cyclase B)を活性化する分子を用いた身長増加用組成物
2. 特願 2004-107924
GC-B (guanyryl cyclase B)を活性化する分子を用いた変形性関節症および関節炎症治療剤または予防剤
3. 特願 2004-25631
内皮細胞分化増殖方法
4. 特願 2004-184138
霊長類動物胚性幹細胞から発生初期血管内皮細胞の製造方法及びその細胞の使用
5. 特願 2002-248232
NRSE及びNRSFの利用法
6. 特願 2001-310322
軟骨無形成症治療剤
7. 特願 2001-301586
軟骨無形成症治療剤
8. 特許 3267893
自己免疫疾患の診断薬
9. 特許 3343866
ハムスター脳のナトリウム利尿ペプチド
10. 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・生化学部長）

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、それを基にした新たな治療法の開発に直結する。内因性生理活性ペプチドは毒性や副作用の少ない生体内分子であることより、臨床応用が成功する可能性が極めて高い。CNP/GC-B 系の骨・軟骨・関節疾患に対する治療効果が確認できれば、CNP/GC-B 系を標的にした創薬研究、特に CNP/GC-B 系の賦活化治療への期待は大きくなる。ペプチド製剤である CNP の drug delivery system の開発、長時間作用型のペプチド製剤の開発、非ペプチド性 GC-B アゴニストの開発へと広範な臨床応用が期待される。分担研究者はこれまで Na 利尿ペプチド系のトランスレーショナルリサーチを展開し、ANP・BNP/GC-A 系の心臓血管ホルモンとしての意義の解明、診断薬、心不全治療薬としての臨床応用に成功してきた。本研究は CNP/GC-B 系の極めて強力な成長板軟骨肥大化作用と、関節軟骨に対する肥大化作用の発見を踏まえて、骨、軟骨、関節疾患における CNP/GC-B 系の意義を解明し、新規治療薬としての臨床応用を実現するトランスレーショナルリサーチである。CNP は 22 個のアミノ酸からなる内因性ペプチドであり、BMP-2, BMP-7, FGF 等の骨、軟骨増殖因子と比較して安価であり、医療経済的にも期待される。血中または関節液中 CNP 濃度の測定は軟骨マーカーとして骨系統疾患の診断、変形性関節症の進行度の診断へ臨床応用が期待できる。

A. 研究目的

分担研究者はこれまで Na 利尿ペプチド系のトランスレーショナルリサーチを展開し、ANP・BNP/GC-A 系の心臓血管ホルモンとしての意義の解明、診断薬、心不全治療薬としての臨床応用に成功してきた。更に本研究は CNP/GC-B 系の極めて強力な成長板軟骨肥大化作用と、関節軟骨に対する肥大化作用の発見を踏まえて、骨、軟骨、関節疾患における CNP/GC-B 系の意義を解明し、新規治療薬としての臨床応用を実現するトランスレーショナルリサーチである。本研究により、未だ有効な治療法の確立されていない軟骨無形成症を含む先天性骨軟骨疾患のみならず、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の開発につながることを期待され、社会的意義は極めて大きい。CNP は 22 個のアミノ酸からなる内因性ペプチドであり、BMP-2, BMP-7, FGF 等の骨、軟骨増殖因子と比較して安価であり、医療経済的にも期待される。血中または関節液中 CNP 濃度の測定は軟骨マーカーとして骨系統疾患の診断、変形性関節症の進行度の診断へ臨床応用が期待できる。また、CNP

の基本特許、CNP の骨、軟骨、関節疾患への用途特許は分担研究者と主任研究者によるものである。

B. 研究方法

1. 心筋梗塞モデルラットに対する CNP 持続投与の影響の検討
雄性 SD ラット(350-400g)を用い、冠状動脈を結さつにより、心筋梗塞モデルを作製した。この心筋梗塞モデルラットに対し、皮下に浸透圧ポンプを埋め込み、左頸静脈にカテーテルを留置し、左室カテーテルを挿入し、血行動態の計測、心エコーによる心機能の評価、心筋の組織学的解析を行った。
2. Dahl 食塩感受性ラットに対するアドレノメジュリン慢性投与の作用の検討
Dahl 食塩感受性ラットを用い、浸透圧ポンプにてアドレノメジュリン (400ng/時間) にて 4 週間投与し血圧、ナトリウム利尿、心機能に与える影響について検討した。
(倫理面への配慮)
動物実験に関しては国立循環器病センター研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 心筋梗塞モデルラットに対する CNP 持続投与の影響の検討

CNP は心筋梗塞モデルラットに発症する左室の拡大を著明に抑制した (sham: 6.7 ± 0.1 mm, vehicle: 8.3 ± 0.1 mm, CNP: 7.7 ± 0.1 mm)。血行動態では CNP 投与群で左室拡張終期圧の低下、心拍出量の増加を認めた。さらに CNP 投与群では非梗塞域でコラーゲン量の低下を認め、同部位の遺伝子解析から 1 型コラーゲン、3 型コラーゲン、ANP、ミオシン重鎖の発現抑制を認めた。CNP 持続投与が心筋梗塞後の心筋の線維化を抑制することが明らかとなった。

2. Dahl 食塩感受性ラットに対するアドレノメジュリン慢性投与の作用の検討

Dahl 食塩感受性ラットは 3 週間の高食塩負荷 (8.0% NaCl) により、高血圧を発症する。アドレノメジュリン (400 ng/時間) 4 週間投与にて Dahl 食塩感受性ラットにおける血圧上昇と蛋白尿の出現を一部抑制した。アドレノメジュリン投与により、低下した腎臓の集合管と macula densa における neuronal NOS (nNOS) の発現が回復していることが免疫染色により明らかとなった。アドレノメジュリンによる高血圧発症抑制の機序は一部、腎臓での nNOS の発現の回復による可能性が示唆された。

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

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

れを基にした新たな治療法の開発に直結する。内因性生理活性ペプチドは毒性や副作用の少ない生体内分子であることより、臨床応用が成功する可能性が極めて高い。CNP/GC-B 系の骨・軟骨・関節疾患に対する治療効果が確認できれば、CNP/GC-B 系を標的にした創薬研究、特に CNP/GC-B 系の賦活化治療への期待は大きくなる。ペプチド製剤である CNP の drug delivery system の開発、長時間作用型のペプチド製剤の開発、非ペプチド性 GC-B アゴニストの開発へと広範な臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

1. 論文発表

1. Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke* 2005, Epub ahead of print
2. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl-modification of ghrelin. *Endocrinology* 2005, Epub ahead of print
3. Yoshihara F, Suga S, Yasui N, Horio T, Tokudome T, Nishikimi T, Kawano Y, Kangawa K. Chronic administration of adrenomedullin attenuates the hypertension and increases renal nitric oxide synthase in Dahl salt-sensitive rats. *Regul Pept* 2005, 128:7-13.
4. Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005, 45:608-616.
5. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of

- bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2005, 111:356-362.
6. Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J* 2005, 24:325-335.
 7. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2005, 25:136-146.
 8. Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2004,110:3674-3679.
 9. Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 288:H1444-1450.
 10. Nagaya N, Kangawa K. Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension. *Peptides* 2004, 25:2013-2018.
 11. Takeno R, Okimura Y, Iguchi G, Kishimoto M, Kudo T, Takahashi K, Takahashi, Y, Kaji H, Ohno M, Ikuta H, Kuroda Y, Obara T, Hosoda H, Kangawa K, Chihara K. Intravenous administration of ghrelin stimulates growth hormone secretion in vagotomized patients as well as normal subjects. *Eur J Endocrinol* 2004, 151:447-450.
 12. Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, Fukue Y, Serino R, Fujihara H, Ueta Y, Ikawa M, Okabe M, Murakami N, Shirai M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Kojima M. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med* 2004,10:1067-1073.
 13. Itoh T, Nagaya N, Murakami S, Fujii T, Iwase T, Ishibashi-Ueda H, Yutani C, Yamagishi M, Kimura H, Kangawa K. C-Type natriuretic peptide ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:1204-1211.
 14. Takami Y, Horio T, Iwashima Y, Takiuchi S, Kamide K, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Inenaga T, Kangawa K, Kawano Y. Diagnostic and prognostic value of plasma brain natriuretic peptide in non-dialysis-dependent CRF. *Am J Kidney Dis* 2004, 44:420-428.
 15. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Fujii T, Iwase T, Hamada K, Kimura H, Kangawa K. C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 287:L1172-1177.
 16. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 287:H2670-2676.
 17. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Cao Y, Marutsuka K, Asada Y, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats. *Circulation* 2004, 110:426-431.
 18. Hino J, Kangawa K, Matsuo H, Nohno T, Nishimatsu S. Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front Biosci* 2004, 9:1520-1529.
 19. Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 2004, 109:1789-1794.
 20. Tokudome T, Horio T, Soeki T, Mori K, Kishimoto I, Suga S, Yoshihara F, Kawano Y,

Kohno M, Kangawa K. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology* 2004,145:2131-2140.

2. 学会発表

国際学会

1. Kangawa K, Novel peptide discovery. 12th International Congress of Endocrinology, Aug 31-Sept 4, 2004, Lisbon, Portugal
2. Kangawa K, Discovery of bioactive peptides: Ghrelin. JSPS International Meeting "Frontiers of Proteomics -Aims and Perspective-", 2004, Osaka, Japan
3. Horio T, Suzuki Y, Kamide K, Takiuchi S, Kangawa K, Kawano Y, Adrenomedullin as a sensitive marker for coronary and peripheral arterial complications in patients with atherosclerotic risk. The 77th Scientific Sessions American Heart Association, 2004/11/24, New Orleans, LA, USA
4. Soeki T, Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Kangawa K, C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic agent, attenuates cardiac remodeling and improves left ventricular dysfunction in dilated cardiomyopathy. ACC 54th Annual Scientific Session, 2005, Orlando, FL, USA
5. Soeki T, Kishimoto I, Hosoda H, Yoshida M, Tokudome T, Horio T, Schwenke D, Pearson J, Shirai M, Kangawa K, Ghrelin Suppresses Cardiac Sympathetic Activity and Attenuates Early Left Ventricular Remodeling in Rats with Myocardial Infarction. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
6. Soeki T, Kishimoto I, Tokudome T, Mori K, Horio T, Kangawa K, C-type Natriuretic Peptide, a Novel Antifibrotic Agent, Attenuates Cardiac Remodeling and Improves Left Ventricular Dysfunction in Dilated Cardiomyopathy. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
7. Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K, Calcineurin-NFAT Pathway-Dependent Cardiac Remodeling in Mice Deficient for GC-A, a Receptor for Atrial and Brain Natriuretic Peptides. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
8. Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi H, Kangawa K, Funahashi T, Ogihara T, Kawano Y, Plasma Adiponectin and Adrenomedullin Levels in Peripheral Arterial Occlusive Disease. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜

国内学会

1. 寒川賢治、新規ペプチドホルモンの発見・構造決定とその基盤的研究、第 77 回日本内分泌学会学術総会（学会賞受賞講演）、2004/6/24-26、京都
2. 永谷憲歳、宮武邦夫、寒川賢治、内因性循環調節ペプチドのトランスレシヨナルリサーチ、第 77 回日本内分泌学会学術総会、2004/6/24-26、京都
3. Moriya J, Nagaya N, Kangawa K, Chronic Administration of Ghrelin Improves Endothelial Function in Humans with Heart Failure. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
4. Ishimura K, Nishikimi T, Ishikawa Y, Mori Y, Tadokoro K, Koshikawa S, Kangawa K, Matsuoka H, Chronic Administration of

Combined Vasopeptidase Inhibition and Adrenomedullin has Renoprotective Effect in Dahl Salt-sensitive Rat via Inhibition of Oxidative Stress. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜

5. Soeki T, Kishimoto I, Hosoda H, Yoshida M, Tokudome T, Horio T, Schwenke D, Pearson J, Shirai M, Kangawa K, Ghrelin Suppresses Cardiac Sympathetic Activity and Attenuates Early Left Ventricular Remodeling in Rats with Myocardial Infarction. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
6. Soeki T, Kishimoto I, Tokudome T, Mori K, Horio T, Kangawa K, C-type Natriuretic Peptide, a Novel Antifibrotic Agent, Attenuates Cardiac Remodeling and Improves Left Ventricular Dysfunction in Dilated Cardiomyopathy. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
7. Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K, Calcineurin-NFAT Pathway-Dependent Cardiac Remodeling in Mice Deficient for GC-A, a Receptor for Atrial and Brain Natriuretic Peptides. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜
8. Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi H, Kangawa K, Funahashi T, Ogihara T, Kawano Y, Plasma Adiponectin and Adrenomedullin Levels in Peripheral Arterial Occlusive Disease. 第 69 回日本循環器学会学術総会、2005/3/19-21、横浜

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）

遺伝子改変動物を用いた検討から、軟骨において CNP とその受容体である guanylate cyclase B (GC-B) が重要であり、CNP ノックアウトマウスでは、成長板軟骨の発育障害の結果、四肢体幹の著しい短縮を認めること、逆に軟骨局所に CNP を過剰発現するトランスジェニックマウスが成長板軟骨の増大の結果、四肢、体幹の伸張を示すことを報告した。さらに、軟骨形成不全症の疾患モデルマウスにおいて、CNP の軟骨での過剰発現によりこのマウス短躯がほぼ正常まで改善されること、改善した成長板軟骨においては成熟肥大化軟骨細胞層の拡大が認められた。これらの CNP による軟骨細胞への作用は CNP/GC-B 系の細胞内情報伝達系の下流に位置する cGMP dependent kinase-II (cGK-II) を介し、チロシンキナーゼ型受容体の MAP キナーゼ経路を抑制することにより、細胞増殖よりむしろ、主に基質産生増加により、軟骨細胞の細胞間質肥大化作用によることを明らかにした。これらの結果から CNP/GC-B 系を賦活化することにより軟骨細胞の基質産生を増加させ、生体材料を用いずとも生体の軟骨細胞基質容量の増加により、軟骨そのものを増大することができる新しい軟骨再生を目的として、CNP/GC-B 系賦活化の軟骨細胞における作用機構について検討し、CNP/GCB 系と FGFR3 の細胞内情報伝達機構が相互に拮抗することを明らかにした。

A. 研究目的

関節軟骨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。基礎研究により、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化調節に *sox9* が初期段階で重要であること等一部が明らかになったが、後期分化に関しては不明であり、幹細胞からの軟骨再生実現には課題が多く残されている。このような軟骨細胞の特徴を考慮し、再生医療への応用を考えると、全く新しいアプローチを提案すべきである。これまでの検討から CNP/GC-B 系の賦活化が軟骨細胞の肥大化を引き起こすことを明らかにしており、その肥大化のメカニズムについて培養軟骨細胞である ATDC 細胞とマウス脛骨器官培養を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 軟骨培養細胞(ATDC 細胞)における CNP/GC-B 系の細胞内情報伝達に対する FGFR3 の影響
内軟骨性骨化過程においては、前駆軟骨細胞が分裂を繰り返した後、凝集し軟骨細胞に分化する(軟骨初期分化)。軟骨細胞は細胞外基質を産生しながら増殖し、分化成熟する。さらに、軟骨細胞が肥大化し

(軟骨後期分化)、細胞外基質が石灰化し最終的に骨組織に置換される。ATDC5 細胞は軟骨初期分化から後期分化に至る過程を *in vitro* で再現できる前駆軟骨細胞株である。ATDC 細胞は Confluent 後 1 週間で成長板の増殖層マーカーである II 型コラーゲン、前肥大化層マーカーである PTH/PTHrP 受容体及び、肥大化層マーカーである X 型コラーゲンを順に発現し、軟骨細胞の性質を獲得する。CNP 10^{-9} ~ 10^{-7} M を添加し、細胞内 cGMP 産生を RIA 法にて測定する。ATDC5 細胞の CNP 依存性細胞内 cyclic GMP 産生に対する FGFR3 の軟骨細胞における特異的リガンドである FGF18 の影響について検討する。

2) FGFR3 刺激による MAP キナーゼ経路に対する CNP/GC-B 系賦活化の影響の検討

ATDC5 細胞に対し FGF18(10ng/ml)を添加し、リン酸化 ERK1/2 抗体を用いたウエスタンブロット法にて MAP キナーゼの活性化を検討する。ATDC5 細胞に CNP、または 8-bromo cyclic GMP にて一時間刺激後、FGF18 を添加し、FGFR3 による MAP キナーゼの活性化を検討する。

3) FGFR3 刺激による STAT-1 経路に対する CNP/GC-B 系賦活化の影響の検討

ATDC5 細胞に対し FGF18(10ng/ml)を添加し、リン酸

化 STAT-1 抗体を用いたウエスタンブロット法にて STAT-1 の活性化を検討する。ATDC5 細胞に CNP、または 8-bromo cyclic GMP にて一時間刺激後、FGF18 を添加し、FGFR3 による STAT-1 の活性化を検討する。

4) マウス胎仔脛骨における CNP と FGFR3 の相互作用の検討

妊娠 ICR マウスより、胎生 16.5 日齢胎仔を取り出し、脛骨を実体顕微鏡下に無菌的に取り出し、10mL のメディウムを満たした 50mL のペニシリンバイアルに移し、CNP (10^{-7} M) 添加、または FGFR3 の軟骨における特異的リガンドである FGF18 (10ng/mL) 添加する。バイアルは回転装置を用いて、37°C で 4 日間培養し、培養終了後、脛骨全長の形態計測及び、alcian blue, HE 染色により成長板軟骨の変化を組織学的に解析する。

5) 成長板の軟骨細胞分化に対する CNP と FGFR3 の相互作用の検討

培養脛骨における肥大化軟骨細胞を同定するため、タイプ X コラーゲンの発現を免疫染色にて検討する。肥大化軟骨細胞サイズをカールツァイツ社製 KS400 イメージングシステムにて自動定量し、肥大化軟骨細胞数についても計測する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては京都大学動物実験委員会に申請し、承認を得ている(MedKyo01094)。

C. 研究結果

1) 軟骨培養細胞(ATDC 細胞)における CNP/GC-B 系の細胞内情報伝達に対する FGFR3 の影響既報通り ATDC 細胞は濃度依存性の細胞内 cGMP 産生の亢進を認めた。CNP 依存性の細胞内 cGMP 産生は FGF2 添加により 50%程度まで抑制された(図 1A)。また、この抑制は特異的 MEK 阻害剤により ERK1/2 のリン酸化を抑制することによりほぼ解除された(図 1B)。FGF18 刺激による CNP 依存性の細胞内 cGMP 産生の抑制は FGF18 の濃度依存性が認められた(図 2)

2) ATDC 細胞は基礎状態ではほとんど ERK1/2 のリン酸化を認めないが、FGF2、FGF18 (10ng/mL) 添加 3 分後には ERK1/2 のリン酸化の亢進を認めた。FGF2、FGF18 刺激による ERK1/2 のリン酸化は CNP 10^{-7} ~ 10^{-6} M により濃度依存性に抑制された(図 3A、B)。さらに FGF18 刺激による ERK1/2 のリン酸化は 10^{-4} M 8-bromo cGMP により抑制された(図 3C)。

3) ATDC 細胞は基礎状態にて STAT-1 のリン酸化を認めるが、FGF2、FGF18 (10ng/mL) 添加 3 分後には STAT-1 のリン酸化の亢進を認めた。FGF2、FGF18 刺激による STAT-1 のリン酸化は CNP 10^{-7} ~ 10^{-6} M により有意な変化を受けなかった(図 4A、B)。また FGF18 刺激による STAT-1 のリン酸化は 10^{-4} M 8-bromo cGMP により有意な変化を受けなかった(図 4C)。

4) CNP (10^{-7} M) 添加により培養後脛骨長は 12%増加した (CNP 添加群: 3.99 ± 0.07 mm vs. 非添加群: 3.56 ± 0.05 mm)。一方、FGF18 (10ng/mL) 添加により培養後脛骨長は 6%増加した (FGF18 添加群: 3.37 ± 0.04 mm vs. 非添加群: 3.57 ± 0.03 mm)。また、CNP (10^{-7} M) と FGF18 (10ng/mL) の共添加により 8%増加した (CNP + FGF18 添加群: 3.84 ± 0.06 mm vs. 非添加群: 3.55 ± 0.04 mm) (図 5) 組織学的検討とタイプ X コラーゲンの発現を認める肥大化軟骨細胞層は CNP 添加により増大し、FGF18 添加により縮小し、CNP と FGF18 の共添加により増大を認めた(図 5)。

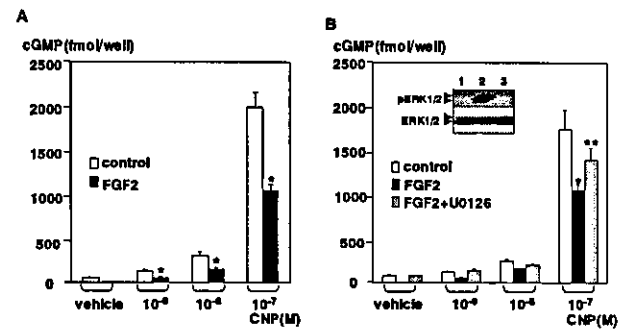


図 1. A; CNP 依存性の細胞内 cGMP 産生に対する FGF2 の影響; B; 特異的 MEK 阻害剤 (U0126) の影響、U0126 はリン酸化 ERK1/2 を抑制した(図内)。

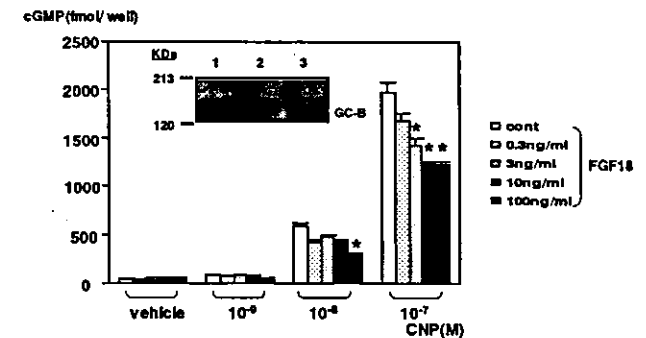


図 2. CNP 依存性の細胞内 cGMP 産生に対する FGF18 の影響、GC-B の発現は FGF18 による影響を受けなかった(図内)。

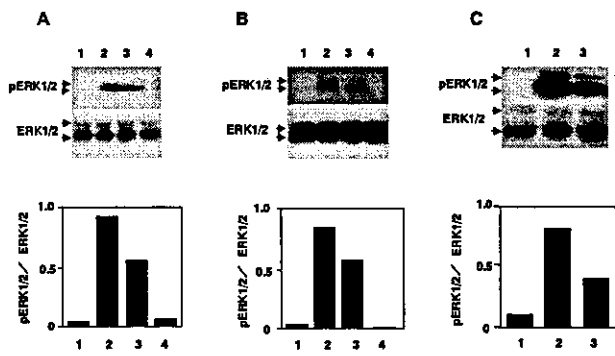


図 3. FGF 刺激による ERK1/2 のリン酸化に対する CNP/GC-B 系の影響

A, B, 1; vehicle, 2, 3, 4; FGF2 (10ng/mL) (A), FGF18 (10ng/mL) (B), 3; CNP 10^{-7} M, 4; CNP 10^{-6} M, C, 1; vehicle, 2, 3; FGF18 (10ng/mL), 3; 8-bromo cGMP 10^{-4} M

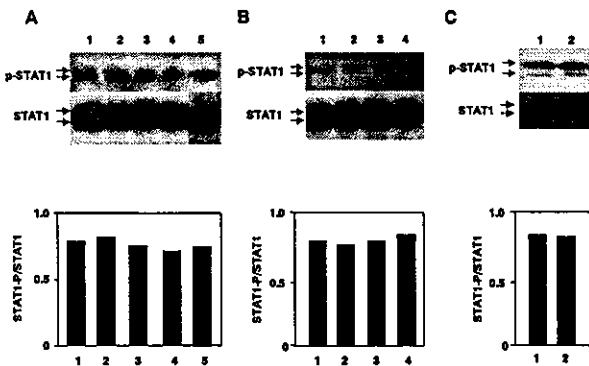


図 4. FGF 刺激による STAT-1 のリン酸化に対する CNP/GC-B 系の影響

A, B, 1; vehicle, 2, 3, 4; FGF2 (10ng/mL) (A), FGF18 (10ng/mL) (B), 3; CNP 10^{-7} M, 4; CNP 10^{-6} M, C, 1; vehicle, 2, 3; FGF18 (10ng/mL), 3; 8-bromo cGMP 10^{-4} M

肥大化軟骨細胞サイズは CNP 添加により増大し、FGF18 添加により縮小し、CNP と FGF18 の共添加により増大を認めた(図2)。肥大化軟骨細胞数は FGF18 添加により減少し、CNP と FGF18 の共添加により非添加群と同程度まで回復を認めた(図6)。以上の結果から成長板軟骨において CNP が脛骨の伸長を促進し、FGF18 による伸長抑制作用と拮抗することが明らかとなった。

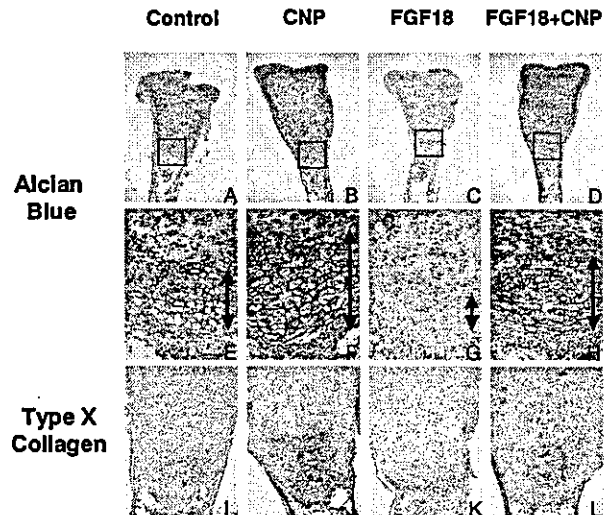


図 5. CNP と FGF18 のマウス脛骨器官培養への影響 A-H; アルジーランブルー-HE 染色、A-D; x4, E-H; x20, 矢印;肥大化軟骨細胞層、I-L; タイプ X コラーゲン染色

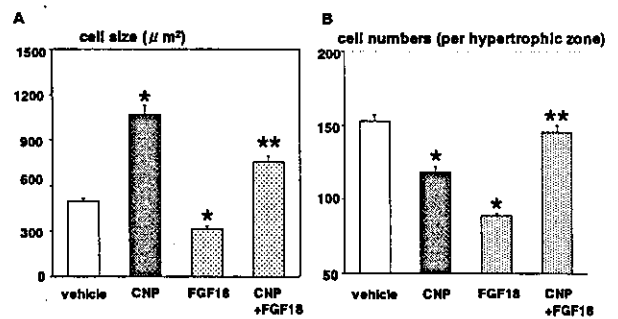


図 6. 肥大化軟骨細胞サイズ (A)、細胞数(B)に対する CNP と FGF18 の影響

mean \pm SE (n=10, each), *p<0.01 vs. vehicle, ** p<0.01 vs. FGF18.

D. 考察

今回の実験結果から CNP による軟骨肥大化作用は FGFR3 刺激による軟骨成長抑制に対して拮抗することが示された。FGFR3 の活性型変異が内軟骨性骨化を障害し、軟骨無形成症の原因であり、疾患モデルマウスを用いた検討において CNP が軟骨無形成症の四肢体幹の短縮を改善したことの、メカニズムが明らかとなった。また、常染色体劣性遺伝による四肢短縮型の低身長をきたす疾患として知られていた Maroteaux 型 acromesomelic dysplasia において GC-B の不活性型遺伝子変異が同定され、初めて CNP/GC-B 系がヒトの骨系統疾患の原因であることが証明された。CNP/GC-B 系がヒトの骨・軟骨における重要性が確認されたことから、CNP/GC-B 系は骨・軟骨における新しい制御機構として注目されている。

E. 結論

本研究により、成長板軟骨と関節軟骨における CNP/GC-B 系の機能的意義とその分子機構を解明し、軟骨再生を標的とする CNP/GC-B 系のトランスレーショナルリサーチが推進され、軟骨無形成症を含む先天性骨軟骨疾患のみならず、変形性関節症等の関節軟骨病変に対する新規治療法の開発につながる事が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

1. 論文発表

1. Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Nakatsuru Y, Sakuma Y, Arai H, Itoh N, Nakao K, Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone in press*.
2. Majima T, Doi K, Komatsu Y, Itoh H, Fukao A, Shigemoto M, Takagi C, Corners J, Mizuta N, Kato R, Nakao K, Papillary thyroid carcinoma without metastases manifesting as an autonomously functioning thyroid nodule, *Endocrin J*, in press
3. Furuto-Kato S, Matsukura S, Ogata M, Azuma N, Manabe T, Shigeno C, Asato R, Tanaka K, Komatsu Y, Nakao K. Primary hyperparathyroidism presumably caused by chronic parathyroiditis manifesting from hypocalcemia to severe hypercalcemia. *Intern Med*. 2005, 44:60-64.
4. Majima T, Komatsu Y, Yamada T, Koike Y, Shigemoto M, Takagi C, Hatanaka I, Nakao K Decreased bone mineral density at the distal radius, but not at the lumbar spine or the femoral neck, in Japanese type 2 diabetic patients. *Osteoporosis Int* 2004, Epub ahead of print

2. 学会発表

国際学会

1. Komatsu Y, Yasoda A, Nakao K, Natriuretic peptide in cartilage and bone, International Symposium for 20th Anniversary of Discovery of Natriuretic Peptide Family, Aug 6-7, 2004, Tokyo,

Japan

2. Komatsu Y, Yasoda A, Nakao K, Translational research of CNP/guanylyl cyclase B system on achondroplasia, I'FOPE 2004 Bone&Growth, Aug 19, 2004, Awaji, Japan
3. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Nakatsuru Y, Sakuma Y, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Nakao K, Activation of CNP/GC-B system as a novel strategy for skeletal dysplasia., 12th International Congress of Endocrinology, Aug 31-Sept 4, 2004, Lisbon, Portugal

国内学会

1. 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、荒井宏司、小川佳宏、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、第 101 回日本内科学会、2004/4/6、東京
2. 八十田明宏、小松弥郷、中尾一和、C 型ナトリウム利尿ペプチドの骨伸長促進作用 – 低身長治療への期待 –、第 5 回 Aging Science Forum、2004/4/10、東京
3. 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、肝腺腫に骨粗鬆症を合併し、術後著明な骨量回復を認めた多嚢胞性卵巣症候群 (PCO) の一症例、第 52 回関西カルシウム懇話会、2004/4/17、大阪
4. 小松弥郷、Women's Health 骨粗鬆症を中心に、京都産婦人科研究会 4 月例会、2004/4/17、京都
5. 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 47 回日本糖尿病学会、2004/5/13-15、東京
6. 馬場 理、小松弥郷、八十田明宏、小笹亜美、中津留有子、佐久間陽子、南部拓央、森山賢治、荒井宏司、中尾一和、マクロ CK 血症を伴ったシルバーラッセル症候群の 1 例、第 173 回日本内科学会近畿地方会、2004/6/5、大阪
7. 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、アレンドロネートにて治療を行った骨粗鬆症患者の骨代謝マーカーと骨密度の変化率の関

係についての検討、第 77 回日本内分泌学会
学術総会、2004/6/24-26、京都

8. 小笹亜美、小松弥郷、八十田明宏、佐久間陽子、中津留有子、荒井宏司、中尾一和、培養軟骨細胞における CNP の MAP キナーゼ経路抑制に関する検討ークリアランス受容体の関与について、第 77 回日本内分泌学会学術総会、2004/6/24-26、京都
9. 小松弥郷、SERM による骨粗鬆症治療の新展開、第 77 回日本内分泌学会学術総会 サテライトシンポジウム、2004/6/24-26、京都
10. 宮澤崇、小川佳宏、中所英樹、八十田明宏、田村尚久、小松弥郷、Franz Homann、中尾一和、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の内軟骨性骨化促進作用には 2 型 cGMP 依存性蛋白キナーゼが必須である、第 77 回日本内分泌学会学術総会、2004/6/24-26、京都
11. 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、佐久間陽子、田村尚久、荒井宏司、小川佳宏、中尾一和、CNP は MAPK シグナルを介して軟骨形成不全症における骨伸長障害を改善する、第 77 回日本内分泌学会学術総会、2004/6/24-26、京都
12. 八十田明宏、小松弥郷、中尾一和、CNP の軟骨形成不全症治療への展開、第 77 回日本内分泌学会学術総会 メインシンポジウム 3 内分泌代謝領域のトランスレーションリサーチ、2004/6/24-26、京都
13. 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、荒井宏司、小川佳宏、中尾一和、モデルマウスを用いて検討した軟骨無形成症に対する CNP の効果、第 41 回日本臨床分子医学会学術集会、2004/7/16-17、福岡
14. 小松弥郷、八十田明宏、小笹亜美、中津留有子、佐久間陽子、荒井宏司、中尾一和、骨粗鬆症患者におけるアレンドロネート投与前後の骨代謝マーカーの変化率と骨密度についての検討、第 22 回日本骨代謝学会学術集会、2004/8/4、大阪
15. 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、佐久間陽子、田村尚久、荒井宏司、小川佳宏、中尾一和、CNP-GC-B 系の内軟骨骨化促進作用と低身長症治療への展開研究、第 22 回日本骨代謝学会学術集

会、2004/8/5-7、大阪

16. 八十田明弘、小松弥郷、小笹亜美、佐久間陽子、中津留有子、田村尚久、荒井宏司、小川佳宏、中尾一和、モデルマウスを用いた軟骨無形成症の治療に対する CNP の効果、第 28 回骨・カルシウム代謝研究会、2004/9/10、京都
17. 小松弥郷、骨、軟骨におけるナトリウム利尿ペプチドシステム、第 10 回 CCB カンファレンス、2005/1/27、大阪
18. 小松弥郷、八十田明宏、小笹亜美、中津留有子、佐久間陽子、荒井宏司、中尾一和、塩酸ベニジピンの高齢高血圧症患者の骨代謝に対する影響についての検討、第 11 回近畿骨粗鬆症研究会、2005/2/19、大阪
19. 八十田明弘、小松弥郷、中所英樹、小笹亜美、中津留有子、田村尚久、荒井宏司、小川佳宏、中尾一和、軟骨無形成症に対する C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の効果ーモデルマウスを用いた検討ー、第 18 回日本軟骨代謝学会、2005/3/18-19、大阪

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
Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Nakatsuru Y, Sakuma Y, Arai H, Itoh N, <u>Nakao K</u>	Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells.	Bone			2005, in press
Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, <u>Nakao K</u>	Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice.	J Biol Chem			2005, in press
Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, <u>Nakao K</u>	Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype.	Endocrinology	146	355-364	2005
Furuto-Kato S, Matsukura S, Ogata M, Azuma N, Manabe T, Shigeno C, Asato R, Tanaka K, Komatsu Y, <u>Nakao K</u>	Primary hyperparathyroidism presumably caused by chronic parathyroiditis manifesting from hypocalcemia to severe hypercalcemia.	Int Med	44	60-64	2005
Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Nakagawa Y, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, <u>Nakao K</u>	Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction.	Circulation	110	3306-3312	2004
Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, <u>Nakao K</u> , Ogawa Y, Yoshimura N	Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells.	Diabetes	53	2443-2448	2004
Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Nishida T, Takigawa M, Sugawara A, <u>Nakao K</u>	Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis.	J Am Soc Nephrol	15	1430-1440	2004

Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K	Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene.	Endocrinology	145	4144-4153	2004
Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Mizuno Y, Harada E, Ito T, Nakamura S, Abe K, Yamamoto M, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H	Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic marker after acute myocardial infarction – A long-term follow-up analysis.	Circulation	110	1387-1391	2004
Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim C.A, Ogawa Y, Liu X, Ware S.M, Craigen W.J, Robert J.J, Vinson C, Nakao K, Capeau J, Karsenty G	Serum leptin level is a regulator of bone mass.	Proc Natl Acad Sci USA	101	3258-3263	2004
Ebihara K, Kusakabe T, Masuzaki H, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyanaga F, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K	Gene and phenotype analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japanese: a novel homozygous nonsense mutation in seipin gene.	J Clin Endocrinol Metab	89	2360-2364	2004
Son C, Hosoda K, Ishihara K, Bevilacqua L, Masuzaki H, Fushiki T, Harper M.E, Nakao K	Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle.	Diabetologia	47	47-54	2004
Ebihara K, Masuzaki H, Nakao K	Efficacy of long-term leptin-replacement therapy for lipoatrophic diabetes in Japan.	N Engl J Med	351	615-616	2004
Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K	Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene	Endocrinology	145	4144-4153	2004
Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, Yasue S, Tomita T, Okazawa K, Fujikura J, Chusho H, Ebihara K, Hayashi T, Hosoda K, Nakao K	An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes.	FEBS Lett	576	492-497	2004
Nuamah MA, Yura S, Sagawa N, Itoh H, Mise H, Korita D, Kakui K, Takemura M, Ogawa Y, Nakao K, Fujii S	Significant increase in maternal plasma leptin concentration in induced delivery: a possible contribution of pro-inflammatory cytokines to placental leptin secretion.	Endocr J	51	177-187	2004

Takahashi JA, Shimatsu A, Nakao K, Hashimoto N	Early postoperative indicators of late outcome in acromegalic patients.	Clin Endocrinol (Oxf)	60	366-374	2004
--	---	-----------------------	----	---------	------

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
Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats.	Stroke			2005, Epub ahead of print
Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M	Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl-modification of ghrelin.	Endocrinology			2005, Epub ahead of print
Yoshihara F, Suga S, Yasui N, Horio T, Tokudome T, Nishikimi T, Kawano Y, Kangawa K	Chronic administration of adrenomedullin attenuates the hypertension and increases renal nitric oxide synthase in Dahl salt-sensitive rats.	Regul Pept	128	7-13	2005
Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K	C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction.	J Am Coll Cardiol	45	608-616	2005
Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K	Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia.	Circulation	111	356-362	2005
Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K	Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system.	EMBO J	24	325-335	2005
Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N	Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway.	Mol Cell Biol	25	136-146	2005
Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K	Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure.	Circulation	110	3674-3679.	2004