

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～16年度 総合研究報告書

平成17(2005)年3月

主任研究者 中 尾 一 和

目 次

I. 総合研究報告

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 9

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 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 30

(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 1998)、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。われわれは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) 軟骨無形成症モデルマウスにするCNPの効果
軟骨無形成症は遺伝性四肢短縮型小人症の最大の原因疾患である。その原因遺伝子である機能獲得型変異FGF3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) は軟骨無形成症のモデルマウスである。FGFR3-Ach-Tgを用いて、CNPの軟骨無形成症における成長障害に対する効果を検討する。

2) CNP の内軟骨性骨化促進作用とその分子機構に関する検討

内軟骨性骨化障害による骨伸長障害は、FGF システムをはじめとする調節システムにより、STAT1 系や MAP キナーゼ系、p38 系などの細胞内シグナル伝達系を介して制御されているが、CNP/GC-B 系の内軟骨性骨化促進作用の分子メカニズムはほとんど未解明である。CNP による軟骨再生治療の対象となる軟骨無形成症、変形性関節症等はすべて慢性疾患であり、長期に渡り治療継続が必要と考えられる。CNP と他の内軟骨性骨化調節に関与する細胞内シグナル伝達系との相互作用を解析し、ペプチド製剤の長期慢性投与に代わる CNP 賦活化療法の開発につなげていく。

3) 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。CNPの成長板軟骨への作用、関節軟骨への作用を検討する。また、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。

4) 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、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。

5) 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) とコラーゲナーゼ処理モデルを用いて、膝関節腫脹を指標に、CNP の影響を観察した。

6) 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・医の倫理委員会への承認を得ている (G20-3)。

C. 研究結果

1) FGFR3-Ach-Tg マウスは対照野生型マウスと比較して、約 12%吻腎長の短縮を認めるが、この成長障害は軟骨特異的 CNP 過剰発現トランスジェニックマウス (CNP-Tg) との交配により成長板軟骨に CNP を過剰発現する CNP/FGFR3-Ach-Tg マウスにおいてほぼ正常まで改善した。また、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。FGFR3-Ach-Tg マウス において認められた成長板軟骨の短縮は CNP /FGFR3-Ach-Tg マウス 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。また、DXA 法、pQCT 法によりその骨が正常構造を保ち、骨量が野生型と同等であることを証明した(Nat Med, 10;80, 2004)。

2) CNP の軟骨細胞への作用機構は軟骨無形成症の原因である FGF 受容体の異常な MAP キナーゼ経路の活性化を抑制し基質産生増加により、軟骨細胞を増大させることにあることを明らかにした (Nat Med, 10;80, 2004)。BrdU 取込みにより解析した軟骨細胞の増殖能は FGFR3-Ach-Tg、CNP/FGFR3-Ach-Tg マウスともに低下していたことから CNP の軟骨細胞増殖への作用は少ないことを明らかにした。また、Na 利尿ペプチドクリアランス受容体アゴニストである C-ANF⁴²³ が CNP の軟骨増大作用を増強することを明らかにした。

3) 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 濃度依存性の成長板軟骨及び関節軟骨の肥大を観察し、血中 CNP が成長板軟骨及び関節軟骨に作用することを明らかにした。CNP/GC-B 系と 2 型コラーゲンの発現部位はほぼ一致し、関節軟骨に CNP/GC-B 系が発現し、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 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。

4) 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んら問題点を認めていない。

5) 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)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。

6) 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、先天性の内軟骨性骨化異常疾患の大部分を占める軟骨無形成症の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 FGFR3 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し、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。われわれはこれまで 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。さらに本研究は 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。われわれはこれまで ANP の臨床応用を世界に先駆けて実践しており、CNP の基本特許、CNP の骨、軟骨、関節疾患への用途特許は主任研究者と共同研究者によるものであり、我国の知的財産である。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と考えている。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。

CNP/GC-B系は成長板軟骨、関節軟骨とともに作用し、その作用機構として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が明らかになった。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が有効であることを明らかにした。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。

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ことを期待される。

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. Eleftheriou 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.
 19. 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. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 2004, 10:80-86.
 20. Yamahara K, Itoh H, Chun T, 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, Nakao K. Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 3404-3409.
 21. 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.
22. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Kishimoto I, Ogawa Y, Kawakami R, Nakagawa Y, Nakanishi M, Nakao K. Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation. **Hypertens Res** 2003, 26:847-853.
 23. 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, Nakao K. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. **Circulation** 2003, 107: 2085-2088.
 24. 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. Short title: ES cell differentiation and angiogenesis in adults. **Blood** 2003, 101: 2675-2678.
 25. 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** 2003, 22:6310-6321.
 26. 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** 2003, 544: 86-92.
 27. 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** 2003, 100: 4132-4137.
 28. 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** 2003, 14: 1154-1163.
- ## 2. 学会発表
- ### 国際学会
1. Nakao K, Translational Research of the Natriuretic Peptide Family. Seventh Trans-Pacific Symposium-Cardiovascular Endocrinology-. ENDO 2003, Jun 19-22, 2003, Philadelphia, U.S.A
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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

6. 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、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
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
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
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
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
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
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、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、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
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
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
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
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
14. 中尾一和、ANP 発見後 20 年間の進歩、京都ハンプ学術講演会 Introduction、2004/1/30、京都
15. 中尾一和、CNP について、つくしの会講演会、2004/1/31、東京
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
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
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
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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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
 30. 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
 31. 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
 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 -h ANP 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

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

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事が期待され、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. 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、逆相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 産生をラジオノム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ついて検討した。

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、右頸静脈と大腿骨静脈にカテーテルを留置し、 $0.1 \mu\text{g/kg/分}$ と $1.0 \mu\text{g/kg/分}$ 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 のア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。

5. 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。

6. 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. 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^{-10} ~ 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、0.1 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。と 1.0 μ g/kg/分の投与ではいずれも変化を認めなかった。

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

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. 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は 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。

5. 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。

6. 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 (400ng/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

G. 研究発表

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.
21. 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* 2004 109:351-356.
22. 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* 2004 109:242-248.

23. 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* 2004, 109:526-531.
24. 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* 2003 144:2279-2284.
25. 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* 2003 58:231-138.
26. 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* 2003 108:889-895.
27. 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* 2003, 285:2125-2131.
28. 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* 2003, 42:1034-1041.

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

国内学会

1. Tokudome T, Horio T, Suga S, Kishimoto I, Hino J, Okano I, Mori K, Yoshihara 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.
2. 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.
3. Suzuki Y, Horio T, Kitamura K, Eto T, Kangawa 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.
4. 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.
 5. 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
 6. 中里雅光、伊藤紫、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
 7. 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一、第 76 回日本内分泌学会学術総会 2003/5/9-11、横浜
 8. 片渕剛、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
 9. 十枝内厚次、伊達紫、村上昇、舟橋久幸、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
 10. 有安宏之、高屋和彦、細田洋司、篠谷雄二、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
 11. 金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、篠谷雄二、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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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 2003/5/9-11、横浜
 19. 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
 20. 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

21. 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ーショナルリサーチ、第 77 回日本内分泌学会学術総会、2004/6/24-26、京都
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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軀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 のメディアを満した 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 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 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 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 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)。

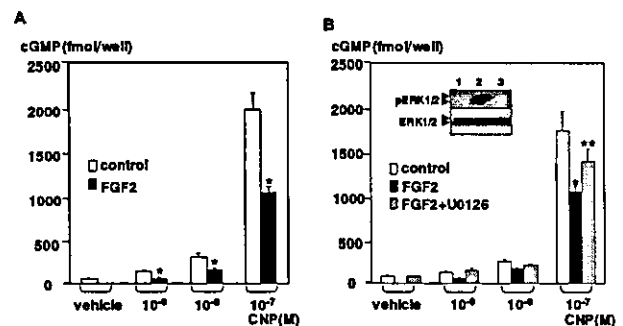


図 1. A; CNP 依存性の細胞内 cGMP 産生に対する FGF2 の影響、B; 特異的 MEK 阻害剤 (U0126) の影響、U0126 はリン酸化 ERK1/2 を抑制した(図内)。

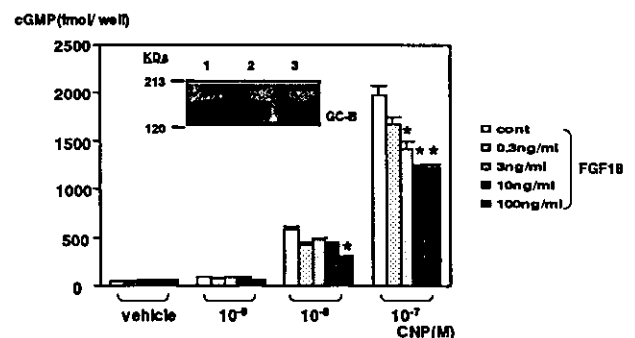


図 2. CNP 依存性の細胞内 cGMP 産生に対する FGF18 の影響、GC-B の発現は FGF18 による影響を受けなかった(図内)。

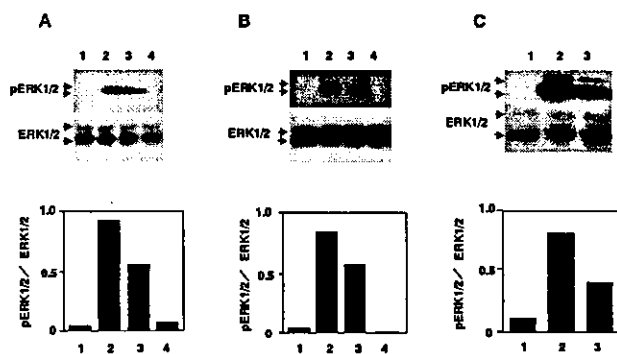


図 3. FGF 刺激による ERK1/2 のリン酸化に対する CNP/GC-B 系の影響

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

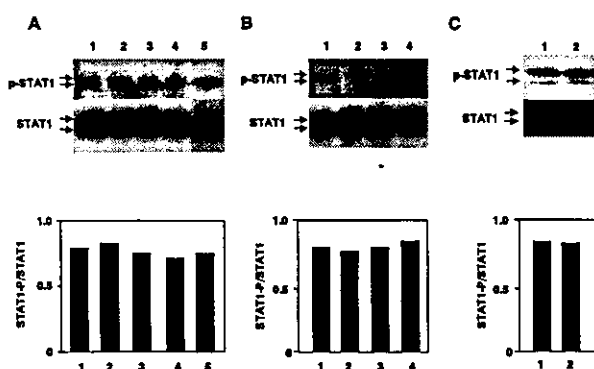


図 4. FGF 刺激による STAT-1 のリン酸化に対する CNP/GC-B 系の影響

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。

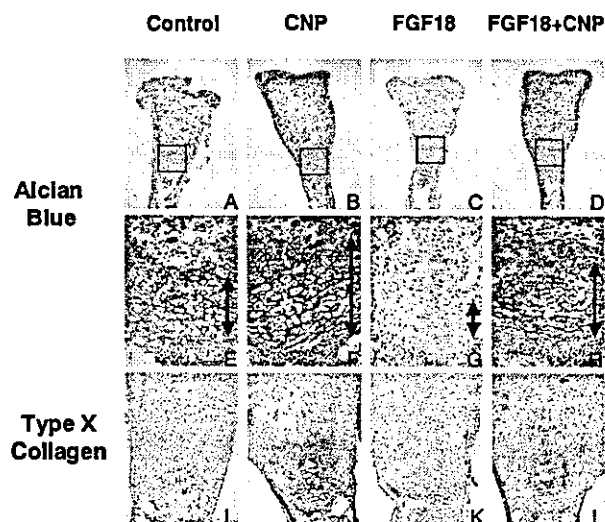


図 5. CNP と FGF18 のマウス脛骨器官培養への影響 A-H; アルーシアンブルーHE 染色、A-D; x4, E-H; x20, 矢印;肥大化軟骨細胞層、I-L; タイプ X コラーゲン染色

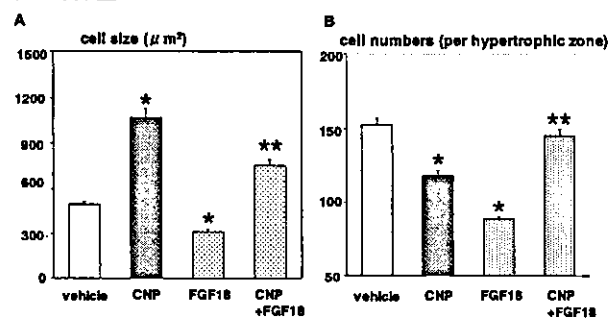


図 6. 肥大化軟骨細胞サイズ (A)、細胞数(B)に対する CNP と FGF18 の影響

mean±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ン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、肝臓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