

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

骨・軟骨・関節疾患を標的とした
CNP-guanylyl cyclase-B systemの
トランスレーショナルリサーチ

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18(2006)年3月

主任研究者 中 尾 一 和

目 次

I. 総括研究報告

骨・軟骨・関節疾患を標的とした CNP-guanylyl cyclase-B system の
トランスレーショナルリサーチに関する研究

中尾一和 ----- 1

II. 分担研究報告

CNP-guanylyl cyclase B system の作用機構に関する研究
—Maroteaux 型遠位中間肢異形成症モデルマウスの解析—

中尾一和 ----- 11

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 ----- 16

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 ----- 20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

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17年度総括研究報告書

骨・軟骨・関節疾患を標的とした CNP-guanylyl cyclase-B system のトランスレーショナルリサーチ
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。申請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。更に申請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低身長をきたす疾患であるMaroteaux型遠位中間肢異形成症が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、申請者らはヒトゲノム・再生医療研究費を得てCNP/GC-B系の軟骨再生への応用に関する研究を開始し、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。更に本年度は、マウス、ラットの骨、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ている。本研究は、以上の研究成果を踏まえて、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、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を推進した。

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

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申請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。長期的展望として、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 系を標的とした創薬研究、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。

B. 研究方法

マウス GC-B 遺伝子 exon3-7 をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成し、この導入遺伝子との相同組み換えによりノックアウトアレルが確認された ES 細胞を、C57BL/6 マウス胚へ移植、キメラマウスを得た。このキメラマウスの交配により、ヘテロおよびホモの遺伝子欠損マウスが得られた (*npr2*^{-/-})。小脳および軟骨における *npr2* 発現を RNA プロテクションアッセイにて検討したところ、野生型で認められる *npr2* 発現がホモ接合型である *npr2*^{-/-} では消失していた。*npr2*^{-/-} の骨、軟骨について形態学的、組織学的解析を行った。

雄性 SD ラット(180-220g)をペントバルビタール麻酔下に開胸し、冠状動脈を結さつし、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。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。

軟骨無形成症は四肢短縮型小人症の代表的疾患

で頻度は15,000~40,000出生に1人とされ、骨形成異常疾患の中では最も頻度が高い。治療として軟骨無形成症患者の著しい低身長に対し、脚延長術が行われることが多いが、現在では成長ホルモン治療も行われている。染色体4q13に位置する3型線維芽細胞増殖因子受容体 fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) の遺伝子の異常が原因であることが明らかになり、その変異部位は非常に均質で膜貫通領域の380番目のグリシンのアルギニンへの置換変異(G380R)が大部分の症例で観察された。この変異は日本人においても hot spot として認められ、この変異受容体はFGFリガンド非存在下で受容体の活性化がおこること、また同時にFGFリガンド刺激により、さらなる活性化がおこることが証明されている。われわれはマウス CNP 遺伝子翻訳領域全長を含む exon 1 と exon 2 をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成し、この導入遺伝子との相同組み換えによりノックアウトアレルが確認されたES細胞を、C57BL/6マウス胚へ移植し、キメラマウスを得た。このキメラマウスの交配により、ヘテロ及びホモのノックアウトマウスが得られた。小脳及び軟骨におけるCNP発現をRNA プロテクションアッセイにて検討したところ、野生型で認められるCNP遺伝子発現がホモ接合型である *Nppc*^{+/+} マウスでは消失していた。これまでの解析から *Nppc*^{+/+} マウスは四肢、体幹の著明な短縮を認め、組織学的にも成長板軟骨の短縮を認め、内軟骨性骨化により形成される長管骨の短縮を認めることから、四肢短縮型小人症のモデル動物となることを明らかにした。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。このSAP-CNP-Tgマウスを今回作成してCNP-KOマウス (*Nppc*^{-/-}) と交配させて、SAP-CNP-Tg / *Nppc*^{-/-} マウスを作製した。SAP-CNP-Tg およびSAP-CNP-Tg / *Nppc*^{-/-} マウス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

全性を検討した。

(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、および国立循環器病センター研究所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

npr2^{-/-}マウス雌性 10 週齢の外観は明らかな体長の短躯、四肢の短縮を認めた。一方、ヘテロ接合型 *npr2*^{+/-}マウスでは明らかな外観の変化を認めなかった。成長曲線においても *npr2*^{+/-}は野生型と差を認めないが、*npr2*^{-/-}は生後 1 週齢で体長の有意差を認め、その差は 10 週齢まで成長とともに拡大し、われわれが CNP 遺伝子欠損マウスで観察したのと同じ発現型を示した。軟 X 線写真においても *npr2*^{-/-}は椎体および四肢長管骨の短縮が認められた。骨計測値でも内軟骨性骨化において長さが規定される脛骨、大腿骨、腰椎の長軸長および頭蓋骨前後径が *npr2*^{-/-}において野生型に比較して 60-80%程度に短縮していた。一方、膜性骨化により長さが規定される頭蓋骨横径は有意差が認められず、*npr2*^{-/-}は内軟骨性骨化が選択的に障害されていることが示された。内軟骨性骨化の過程では軟骨細胞は骨端部から骨幹部に向かい、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、肥大化軟骨細胞層へと分化していくが、生後 8 日齢の脛骨成長板軟骨組織像において、*npr2*^{-/-}では増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、および肥大化軟骨細胞層の短縮が認められた。抗 PCNA 抗体による免疫染色にて増殖期の細胞に変化はなかった。さらに、10 型コラーゲン、インディアンヘッジホッグ等の軟骨分化マーカーの発現についても *in situ hybridization* 法により検討したが、いずれも *npr2*^{-/-}では発現部位の縮小が認められた。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では、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±0.1mm, vehicle: 8.3±0.1mm, CNP: 7.7±0.1mm)。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 (図 2)。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。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では、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。雌性 10 週齢のホモ接合型の CNP^{-/-}マウスの外観は明らかな体長の短躯、四肢の短縮を認めた。一方、ヘテロ接合型は明らかな外観の変化を認めなかった。成長曲線においてもヘテロ接合型においては野生型と差を認めないが、ホモ接合型の CNP^{-/-}マウスにおいては生後 1 週齢において体長の有意差を認め、その差は 10 週齢まで成長とともに拡大を認めた。軟 X 線写真においても CNP^{-/-}マウスでは椎体および四肢長管骨の短縮が認められた。骨計測値でも内軟骨性骨化において長さが規定される脛骨、大腿骨、腰椎の長軸長および頭蓋骨前後径が CNP^{-/-}マウスにおいて野生型に比較し、約 50~80%に短縮していた。一方、膜性骨化により長さが規定される頭蓋骨横径には有意差は認められず、CNP^{-/-}マウスでは内軟骨性骨化が障害されていることが示唆された。内軟骨性骨化の過程では軟骨細胞は骨端部から骨幹部に向かい、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、肥大化軟骨細胞層へと分化していくが、生後 7 日齢の脛骨成長板軟骨組織像において、CNP^{-/-}マウスでは増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、および肥大化軟骨細胞層の短縮が認められた。さらに、2 型コラーゲン、X 型コラーゲン等の軟骨分化マーカーの発現についても *in situ hybridization* 法により検討したが、いずれも CNP^{-/-}マウスでは発現部位の縮小が認められた。われわれはさらに 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。CNP ノックアウトマウスにおいて SAP プロモーターにて軟骨特異的に CNP 過剰発現させたところ、椎体および四肢長管骨の短縮、成長板における増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、および肥大化軟骨細胞層の短縮が完全に是正され、正常マウスと同等の表現型を示すことを証明した。また、CNP が変異 FGFR3(G380R) を持つ軟骨異栄養症のモデルマウスにおいても同様の効果を持つことを明らかにしており、CNP/GC-B 系の賦活化が軟骨異栄養症に対する新しいカテゴリーの治療法となる可能性が示された。

D. 考察

以上の *npr2*^{-/-}マウスの解析の結果、CNP/GC-B 系が内軟骨性骨化調節機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。成長板軟骨における CNP、GC-B 遺伝子の発現はともに増殖軟骨細胞層から前肥大化軟骨細胞層にかけて認められることから、同様の部位に発現を認める 3 型線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR3) と CNP/GC-B 系が相互に細胞レベルで影響して内軟骨性骨化を調節していることを証明したわれわれの報告とあわせて、これらの異なる細胞内情報伝達を介した調節機構は興味深い。さらに、FGFR3 の活性化型変異が軟骨形成不全症の原因であることから、CNP/GC-B 系の活性化を軟骨形成不全症の新しい治療法として応用することが期待される。

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, Sakuma Y, Nakatsuru Y, Arai H, Itoh N, Nakao K. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone*. **2005**, 36:1056-64.
2. Natsui K, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Ozaki S, Nakao K. High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. *Osteoporos Int*. **2005**, 17: 105-108.
3. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, Kojima M, Tamaki H, Ito J, Nakao K. Anaplastic thyroid carcinoma associated with graves' disease. *Endocr J*. **2005**, 52:551-7.
4. Nambu T, Arai H, Komatsu Y, Yasoda A, Moriyama K, Itoh H, Nakao K. Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue. *Regul Pept*. **2005**, 132:17-22.
5. Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*. **2005**, 1:371-8.
6. 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. *Endocr J*. **2005**, 52:309-16.
7. Nakanishi M, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Kawakami R, Nakagawa Y, Tanimoto K, Yasuno S, Usami S, Li Y, Adachi Y, Fukamizu A, Garbers DL, Nakao K. Role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A in myocardial infarction evaluated using genetically engineered mice. *Hypertension*.

- 2005, 46:441-7.
8. Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Nagae T, Yokoi H, Kawachi H, Shimizu F, Sugawara A, Nakao K. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental Nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2005, 16:2690-701.
 9. Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, Kohno M, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation*. 2005, 111:3095-104.
 10. Abe K, Nakayama M, Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Yamamuro M, Sakamoto T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 2005, 15:329-36.
 11. 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, 44:60-4.
 12. 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, 280:15247-56.
 13. Saito T, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Tanaka T, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Tojo K, Tajima N, Hosoya T, Nakao K. Angiotensin II suppresses growth arrest specific homeobox (Gax) expression via redox-sensitive mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Regul Pept*. 2005, 127:159-67.
 14. Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Nakao K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. *Eur J Pharmacol*. 2005, 508:255-65.
 15. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A, Nakao K. Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005, 38:185-92.
 16. 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. *Osteoporos Int*. 2005, 16:907-13.
 17. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, Kojima M, Tamaki H, Ito J, Nakao K. Anaplastic thyroid carcinoma associated with graves' disease. *Endocr J*. 2005, 52:551-7.
 18. Tanaka T, Masuzaki H, Ebihara K, Ogawa Y, Yasue S, Yukioka H, Chusho H, Miyanaga F, Miyazawa T, Fujimoto M, Kusakabe T, Kobayashi N, Hayashi T, Hosoda K, Nakao K. Transgenic expression of mutant peroxisome proliferator-activated receptor gamma in liver precipitates fasting-induced steatosis but protects against high-fat diet-induced steatosis in mice. *Metabolism*. 2005, 54:1490-8.
 19. Tanimoto K, Saito Y, Hamanaka I, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Kawakami R, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi Y, Shirakami G, Fukuda K, Yoshimura A, Nakao K. SOCS1/JAB likely mediates the protective effect of cardiotrophin-1 against lipopolysaccharide-induced left ventricular dysfunction in vivo. *Circ J*. 2005, 69:1412-7.
 20. Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Nakao K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. *Eur J Pharmacol*. 2005, 508:255-65.
 21. 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 : 355-64.
 22. 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, 45:608-16.
 23. 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**, 25:136-46.
24. 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**, 24:325-35.
25. Ishimura K, Nishikimi T, Akimoto K, Ono H, Kangawa K, Matsuoka H. Renoprotective effect of long-term combined treatment with adrenomedullin and omapatrilat in hypertensive rats. *J Hypertens* **2005**, 23:2287-96.
26. Yoshihara F, Horio T, Nakamura S, Yoshii M, Ogata C, Nakahama H, Inenaga T, Kangawa K, Kawano Y. Adrenomedullin reflects cardiac dysfunction, excessive blood volume, and inflammation in hemodialysis patients. *Kidney Int* **2005**, 68:1355-63.
27. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* **2005**, 112:1128-35.
28. Makino T, Matsumoto M, Suzuki Y, Kitajima Y, Yamamoto K, Kuramoto M, Minamitake Y, Kangawa K, Yabuta M. Semisynthesis of human ghrelin: Condensation of a Boc-protected recombinant peptide with a synthetic O-acylated fragment. *Biopolymers* **2005**, 79:238-47.
29. Ida T, Mori K, Miyazato M, Egi Y, Abe S, Nakahara K, Nishihara M, Kangawa K, Murakami N. Neuromedin s is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology* **2005**, 146:4217-23.
30. Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Niiijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* **2005**, 146:3518-25.
31. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* **2005**, 20:790-8.
32. 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**, 36:853-8.
33. Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology* **2005**, 146:2709-15.
34. 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.
35. 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**, 146:2255-64.
36. 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**, 111:356-62.
37. Nishida N, Komatsu Y, Komeda T, Fukuda Y. Interferon- α improves bone resorption and osteopenia in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Res.* **2006**, 34:222-227.

2. 学会発表 国際学会

1. Kangawa K, Ghrelin: discovery and physiological significance. 196th Meeting of the Society for Endocrinology (Plenary lecture), 2005, London.
2. Kangawa K, Ghrelin: Structure and Physiological Significance. The 10th Adiposcience Symposium, 2005, Osaka.
3. Kangawa K, Ghrelin: discovery and physiological significance. The 65th Scientific Sessions American Diabetes Association, 2005, San Diego.
4. Kangawa K, Discovery of ghrelin: physiological significance and translational research. The 2nd International Symposium of the Tohoku University 21st Century COE Program, 2005, Sendai.
5. Komatsu Y, Yasoda A, Tamura N, Nakatsuru Y, Arai H, Nakao K, CNP/guanylyl cyclase B (GC-B) system regulates endochondral

ossification – the analysis of GC-B null mice, 27th American Society for Bone and Mineral Research, Sept23-27, 2005, Nashville, Tennessee, USA.

6. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Nakao K, Reduced bone mineral density in male patients with untreated graves' Disease, 27th American Society for Bone and Mineral Research, Sept23-27, 2005, Nashville, Tennessee, USA.

国内学会

1. 中尾一和、生活習慣病のトピックス、第8回一糖会 特別講演、2005年4月9日(北九州市)
2. 中尾一和、メタボリック症候群を標的としたレプチンのトランスレーショナルリサーチ、第27回熊本「腎と高血圧」研究会 特別講演、2005年5月24日(熊本市)
3. 中尾一和、ゲノム科学と内分泌代謝学、大学院シンポジウム、2005年6月17日(京都市)
4. 中尾一和、内分泌代謝疾患を合併する高血圧ーメタボリック症候群と高血圧ー、学術講演会ー高血圧治療ガイドライン 2004 を検証するー、2005年7月15日(札幌市)
5. 中尾一和、肥満症の病態、第3回肥満症サマーマナーセミナー、2005年8月27日(大阪市)
6. 中尾一和、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのトランスレーショナルリサーチ、第41回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 岡本国際賞受賞記念講演、2005年9月2日(札幌市)
7. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー群馬 生活習慣病セミナー 特別講演、2005年10月21日(前橋市)
8. 中尾一和、Metabolic Syndrome の診断と治療の新戦略、第6回奈良高血圧学術集会 特別講演、2005年10月22日(奈良市)
9. 中尾一和、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのトランスレーショナルリサーチ、第9回日本心血管内分泌代謝学会総会 高峰譲吉賞受賞講演、2005年11月18日(東京都)
10. 中尾一和、メタボリックシンドロームと肥満症、第1回腹腔鏡下肥満外科フォーラム 特別講演、2005年12月9日(東京都)
11. 中尾一和、肥満症とメタボリックシンドローム、第2回神戸成人血管病シンポジウム 特別講演、2005年12月10日(神戸市)
12. 中尾一和、我国のメタボリックシンドロームの現状と診断・治療戦略、第一製薬SRP共同研究打合せ、2006年1月20日(東京都)
13. 中尾一和、生活習慣病とメタボリック症候群、平成17年度京都大学第二内科新春講演会、2006年1月21日(京都市)
14. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー、「FIELD」発売記念講演会 in Osaka 特別講演、2006年1月28日(大阪市)
15. 中尾一和、メタボリック症候群ー診断及び治療の新戦略ー、大分県リバロ発売2周年記念講演会 特別講演、2006年2月2日(大分市)
16. 中尾一和、生活習慣病とメタボリックシンドローム、2005年度武庫川女子大学生生活習慣病オープン・リサーチ・センター公開シンポジウム 特別講演、2006年2月4日(西宮市)
17. 中尾一和、21世紀の臨床研究ートランスレーショナルリサーチとEBMー、平成18年度純仁会総会 特別講演、2006年2月4日(大阪市)
18. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー、第10回北九州先端医療研究会、2006年2月7日(北九州市)
19. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー、第8回心樹糖尿病研修会 特別講演、2006年2月24日(札幌市)
20. 中尾一和、メタボリックシンドロームと高血圧 東北大学21世紀COE・CRESCENDOフォーラム、第11回東北臨床血圧測定研究会 特別講演、2006年3月4日(仙台市)
21. 中尾一和、肥満症と Metabolic Syndrome、第6回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 特別講演、2006年3月5日(東京都)
22. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ーCLINICAL HYPERTENSION UPDATE 2006ー、ミカルディス発売3周年講演会ー特別講演、2006年3月17日(幕張市)
23. 中尾一和、メタボリック症候群の診断と治療、京都府医師会学術講演会 Key note lecture、2006年3月18日(京都市)
24. 寒川賢治、新たな循環調節ペプチドによる展開医療、第78回日本内分泌学会学術総会(教

- 育講演), 2005, 東京
25. 寒川賢治: 心血管作動性ペプチドの発見とその生理的意義. 第 35 回日本心脈管作動物質学会学術総会 (特別講演), 2005, 宇都宮.
 26. 寒川賢治: 新しい生理活性ペプチドの発見とその臨床応用. 日本薬剤学会創立 20 周年記念シンポジウム, 2005, 横浜
 27. Kishimoto I, Kangawa K: Molecular mechanism of cardiac protection via natriuretic peptide system. 第 70 回日本循環器学会学術総会, 2005, 名古屋
 28. Soeki T, Fukuda Y, Koshiha K, Yamaguchi K, Kawano T, Yamada H, Wakatsuki T, Nomura M, Kangawa K, Itoh S: Ghrelin protects myocardium against ischemia/reperfusion injury via inhibiting myocardial apoptosis. 第 70 回日本循環器学会学術総会, 2005, 名古屋
 29. Yoshihara F, Ernst A, Bergmann A, Horio T, Nakamura S, Kishimoto I, Kangawa K, Kawano Y: Midregional proadrenomedullin (MR-ProAM) reflects cardiac dysfunction and predicts mortality in hemodialysis patients with cardiovascular disease. 第 70 回日本循環器学会学術総会, 2005, 名古屋
 30. Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Suzuki C, Kohno M, Nakao K, Kawano Y, Kangawa K: Antihypertrophic effect of atrial natriuretic peptide is mediated by activation of regulator of G-protein signaling-4 in cardiac myocytes. 第 70 回日本循環器学会学術総会, 2005, 名古屋
 31. 八十田明宏, 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, 骨系統疾患に対する CNP/GC-B 系の治療的意義, 第 102 回日本内科学会総会, 2005/4/7-9, 大阪
 32. 小松弥郷, 骨粗鬆症と糖尿病, 講演 (万有製薬), 2005/4/13, 京都
 33. 真嶋隆文, 高木千恵子, 本田久子, 重本道香, 土居健太郎, 小松弥郷, 初診時男性バセドウ病患者の骨密度の検討, 第 3 回臨床骨代謝懇話会, 2005/4/23, 京都
 34. 真嶋隆文, 土居健太郎, 高木千恵子, 重本道香, 深尾篤嗣, 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 48 回日本糖尿病学会, 2005/5/12-14, 大阪
 35. 南部拓央, 荒井宏司, 八十田明宏, 森山賢治, 小松弥郷, 中尾一和, 高脂肪食負荷マウスにおける脂肪組織由来アドレノメデュリン, 第 48 回日本糖尿病学会, 2005/5/12-14, 大阪
 36. 小松弥郷, SERM による骨粗鬆症治療の新展開, 産婦人科診療内容向上会, 2005/5/21, 京都
 37. 小松弥郷, 病診連携としての骨粗鬆症外来の取り組み, KOCP~内科医のための骨粗鬆症カンファレンス~, 2005/5/28, 京都
 38. 真嶋隆文, 小松弥郷, 高木千恵子, 重本道香, 土居健太郎, 中尾一和, 2 型糖尿病女性における低用量ピオグリタゾン の有用性の検討, 第 6 回糖尿病と生活習慣病治療研究会, 2005/5/28, 京都
 39. 小松弥郷, 拡大する骨粗鬆症治療薬選択の現状と展望, 福井県病院薬剤師講演会, 2005/6/28, 福井
 40. 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, Risedronate 投与後の骨粗鬆症患者の骨代謝マーカーと骨密度の変化についての検討 -Cyclic Etidronate との比較, 第 78 回日本内分泌学会学術総会, 2005/7/1-3, 東京
 41. 八十田明宏, 小松弥郷, 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, マウス生体に対する CNP 投与による骨伸長促進作用の検討, 第 78 回日本内分泌学会学術総会, 2005/7/1-3, 東京
 42. 中津留有子, 小松弥郷, 八十田明宏, 小笹亜美, 佐久間陽子, 荒井宏司, 中尾一和, 成長版軟骨における Na 利尿ペプチド系の意義 -BNP トランスジェニックマウスを用いた検討, 第 78 回日本内分泌学会学術総会, 2005/7/1-3, 東京
 43. 小松弥郷, 高カルシウム血症の臨床アップデート, 第 78 回日本内分泌学会学術総会クリニカルアワー, 2005/7/1-3, 東京
 44. 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, CNP/guanylyl cyclase B(GC-B)系による内軟骨性骨化調節機構の検討- GC-B 遺伝子欠損マウスを用いた解析, 第 23 回日本骨代謝学会, 2005/7/21-23, 大阪
 45. 八十田明宏, 小松弥郷, 中所英樹, 小笹亜美,

- 中津留有子、藤井寿人、田村尚久、荒井宏司、小川佳宏、中尾一和、CNP-GC-B 系の賦活化による骨伸長障害治療への展開研究、第 42 回日本臨床分子医学会学術集会、2005/7/22-23、京都
46. 小笹亜美、小松弥郷、八十田明宏、中津留有子、荒井宏司、伊藤信行、中尾一和、培養軟骨細胞における CNP と FGF18 との相互作用についての検討、第 42 回日本臨床分子医学会学術集会、2005/7/22-23、京都
47. 平田雅一、荒井宏司、藤井寿人、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、有安宏之、森山賢治、八十田明宏、小松弥郷、田上哲也、臼井健、島津章、中尾一和、甲状腺ホルモン不応症の一例、第 38 回間脳下垂体疾患研究会、2005/8/27、京都
48. 小鳥真司、小松弥郷、森山賢治、八十田明宏、金本巨哲、南部拓央、中津留有子、藤井寿人、荒井宏司、中尾一和、後腹膜線維症を合併したリンパ球性下垂体炎の一例、第 69 回京都内分泌同好会プログラム、2005/9/3、京都
49. 小松弥郷、骨粗鬆症とカルシウム代謝の臨床アップデート、中京東部医師会学術講演会、2005/9/15、京都
50. 小松弥郷、八十田明宏、田村尚久、中津留有子、藤井寿人、荒井宏司、中尾一和、CNP/guanylyl cyclase B(GC-B)系による骨形成作用の検討-GC-B 遺伝子欠損マウスを用いた解析、第 7 回日本骨粗鬆症学会、2005/10/13-15、大阪
51. 真嶋隆文、小松弥郷、高木千恵子、重本道香、土居健太郎、中尾一和、2 型糖尿病患者における骨密度減少と HbA1c との関係についての検討、第 7 回日本骨粗鬆症学会、2005/10/13-15、大阪
52. 八十田明宏、小松弥郷、小笹亜美、中津留有子、藤井寿人、田村尚久、荒井宏司、中尾一和、マウスに対する CNP 投与による骨伸長促進作用の検討、第 55 回関西カルシウム懇話会、2005/10/22、大阪
53. 小松弥郷、平田雅一、八十田明宏、金本巨哲、森山賢治、南部拓央、中津留有子、藤井寿人、荒井宏司、安里亮、松本繁己、中尾一和、塩酸アムルピジンと放射線照射により約 1 年間治療した甲状腺未分化癌の 1 例、第 48 回日本甲状腺学会、2005/11/21-23、東京
54. 真嶋隆文、小松弥郷、高木千恵子、重本道香、土居健太郎、深尾篤嗣、中尾一和、男性バセドウ病患者の初診時骨密度の検討、第 48 回日本甲状腺学会、2005/11/21-23、東京
55. 小松弥郷、カルシウム代謝異常症と骨粗鬆症の臨床 Update、KOCP~内科医のための骨粗鬆症カンファレンス~、2005/12/10、京都
56. 中川和彦、吉田健司、八十田明宏、田村尚久、藤井寿人、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、森山賢治、小松弥郷、荒井宏司、細田公則、向山政志、伊藤裕、中尾一和、中枢性交感神経抑制薬が著効を奏したレニン性高血圧症の一例、第 33 回関西高血圧研究会、2005/1/27、京都
57. 西城さやか、荒井宏司、田部有香、伴健二、藤井寿人、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、森山賢治、八十田明宏、小松弥郷、中尾一和、東達也、抗甲状腺薬による薬剤性血小板減少症と特発性血小板減少性紫斑病を合併した Graves' disease の一例、第 28 回京都甲状腺研究会、2005/1/28、京都
58. 髭 秀樹、伴健二、八十田明宏、藤井寿人、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、森山賢治、原田昌樹、小松弥郷、荒井宏司、丹原圭一、三上幸雄、中尾一和、下垂体機能低下症と腹部大動脈瘤をきたした Multifocal Systematic Fibrosis の一例、第 70 回京都内分泌同好会、2006/2/25、京都
59. 小松弥郷、パネルディスカッション「ステロイド骨粗鬆症への対応」、第 12 回近畿骨粗鬆症学研究会、2006/2/25、大阪
60. 平田雅一、小松弥郷、金本巨哲、南部拓央、中津留有子、荒井宏司、森徹、安里亮、松本繁己、中尾一和、甲状腺未分化癌に対し塩酸アムルピジンと放射線照射により約 1 年間フォローしえた一例、第 16 回臨床内分泌代謝 Update、2006/2/25-26、石川
61. 藤澤武、小松弥郷、八十田明宏、金本巨哲、南部拓央、中津留有子、藤井寿人、森山賢治、荒井宏司、細田公則、中尾一和、検診にて偶然発見された家族性褐色細胞腫の一例、第 16 回臨床内分泌代謝 Update、2006/2/25-26、石川
62. 小松弥郷、八十田明宏、金本巨哲、南部拓央、

中津留有子、藤井寿人、森山賢治、荒井宏司、中尾一和、副腎偶発腫を契機に診断された神経線維腫症 I 型の一例、第 16 回臨床内分泌代謝 Update、2006/2/25-26、石川

63. 小鳥真司、小松弥郷、森山賢治、八十田明宏、金本巨哲、南部拓央、中津留有子、藤井寿人、荒井宏司、中尾一和、リンパ球性下垂体炎、後腹膜線維症、肥大型心筋症を合併した稀な一例、第 16 回臨床内分泌代謝 Update、2006/2/25-26、石川
64. 小鳥真司、小松弥郷、森山賢治、八十田明宏、金本巨哲、南部拓央、中津留有子、藤井寿人、荒井宏司、中尾一和、リンパ球性下垂体炎、後腹膜線維症、肥大型心筋症を合併した稀な一例、16th 臨床内分泌 update、2006/3/25-26、金沢

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 -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
11. 寒川賢治、国内特許 4 件、国際特許 3 件

2. 実用新案登録

なし

CNP-guanylyl cyclase B system の作用機構に関する研究
—Maroteaux 型遠位中間肢異形成症モデルマウスの解析—
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。

A. 研究目的

Na 利尿ペプチドファミリーは心房性 Na 利尿ペプチド (ANP)、脳性 Na 利尿ペプチド (BNP)、C 型 Na 利尿ペプチド (CNP) の 3 種の内因性リガンドから構成される。その受容体は膜型グアニル酸シクラーゼそのものである GC-A, GC-B であり、ANP, BNP は GC-A に、CNP は GC-B に結合してその生物作用を発揮する。Na 利尿ペプチドファミリーは、これまで水電解質代謝調節など循環器系における重要性が証明されており、特に ANP・BNP/GC-A システムについては、ANP、

BNP がそれぞれ心房および心室から分泌される循環ホルモンとして心不全や心肥大の最も鋭敏な生化学的マーカーとなること、さらに ANP および BNP が急性心不全の治療薬として有効であることが報告されてきた。われわれは CNP/guanylyl cyclase B (GC-B) 系が内軟骨性骨化に重要な役割を果たすことを CNP 遺伝子欠損マウスの解析により明らかにした。最近、常染色体劣性遺伝による四肢短縮型低身長をきたす疾患として知られていた遠位中間肢異形成症、Maroteaux 型において 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、CNP/GC-B系がヒトの骨・軟骨における重要性が確認された。今回、GC-B 遺伝子欠損マウスを用いて内軟骨性骨化の調節機構について検討した。

B. 研究方法

マウス GC-B 遺伝子 exon3-7 をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成し、この導入遺伝子との相同組み換えによりノックアウトアレルが確認された ES 細胞を、C57BL/6 マウス胚へ移植、キメラマウスを得た。このキメラマウスの交配により、ヘテロおよびホモの遺伝子欠損マウスが得られた(*npr2*^{-/-})。小脳および軟骨における *npr2* 発現を RNA プロテクションアッセイにて検討したところ、野生型で認められる *npr2* 発現がホモ接合型である *npr2*^{-/-}では消失していた。*npr2*^{-/-}の骨、軟骨について形態学的、組織学的解析を行った。

(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充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

npr2^{-/-}マウス雌性 10 週齢の外観は明らかな体長の短躯、四肢の短縮を認めた(図 1A, B)。一方、ヘテロ接合型 *npr2*^{+/-}マウスでは明らかな外観の変化を認めなかった。成長曲線においても *npr2*^{+/-}は野生型と差を認めないが、*npr2*^{-/-}は生後 1 週齢で体長の有意差を認め、その差は 10 週齢まで成長とともに拡大し(図 1C)、われわれが CNP 遺伝子欠損マウスで観察したのと同じ発現型を示した。軟 X 線写真においても *npr2*^{-/-}は椎体および四肢長管骨の短縮が認められた(図 1B)。骨計測値でも内軟骨性骨化において長さが規定される脛骨、大腿骨、腰椎の長軸長および頭蓋骨前後径が *npr2*^{-/-}において野生型に比較して 60-80%程度に短縮していた。一方、膜性骨化により長さが規定される頭蓋骨横径は有意差が認められず、*npr2*^{-/-}は内軟骨性骨化が選択的に障害されていることが示された。

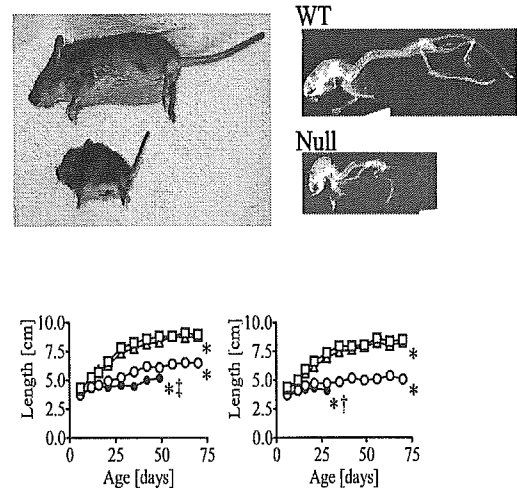


図 1 GC-B 欠損マウスの外観、軟レントゲン写真、および成長曲線。

A:90 日齢マウスの外観。WT, 野生型、Null, GC-B 欠損マウス。B: 21 日齢マウスの軟レントゲン写真。WT, 野生型、Null, GC-B 欠損マウス。C:成長曲線。□野生型、△GC-B ヘテロ接合型、○GC-B ホモ接合型、●GC-B ホモ接合型、死亡群。*; $p < 0.0001$ vs. 野生型、+, $p < 0.05$, ++, $p < 0.01$ vs. GC-B ホモ接合型、長期生存群。

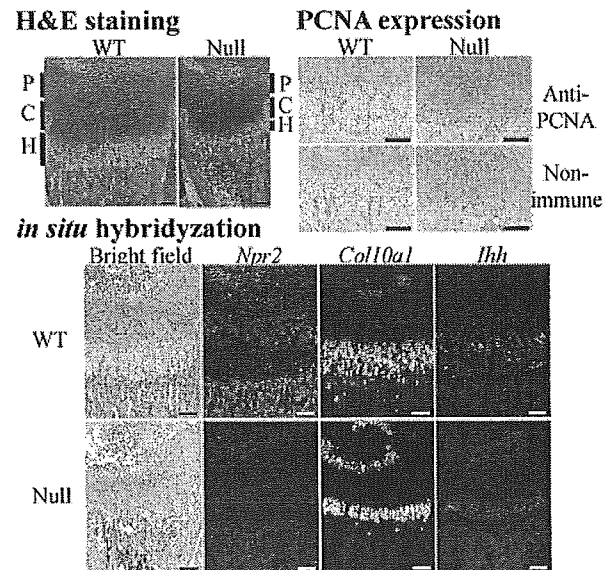


図 2 GC-B 欠損マウスの成長板軟骨の組織像。生後 8 日齢、脛骨、WT; 野生型、Null; GC-B 遺伝子欠損マウス、H&E 染色、P; 関節周囲軟骨細胞層、C; 柱状増殖軟骨細胞層、H; 前肥大化、および肥大化軟骨細胞層、抗 PCNA 抗体による免疫染色、Npr2; GC-B、Col10a1; 10 型コラーゲン、

Ihh; インディアンヘッジホッグの in situ hybridization.

内軟骨性骨化の過程では軟骨細胞は骨端部から骨幹部に向かい、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、肥大化軟骨細胞層へと分化していくが、生後 8 日齢の脛骨成長板軟骨組織像において、*npr2*^{-/-}では増殖軟骨細胞層、前肥大化軟骨細胞層、および肥大化軟骨細胞層の短縮が認められた。抗 PCNA 抗体による免疫染色にて増殖期の細胞に変化はなかった。さらに、10 型コラーゲン、インディアンヘッジホッグ等の軟骨分化マーカーの発現についても in situ hybridization 法により検討したが、いずれも *npr2*^{-/-}では発現部位の縮小が認められた(図 2)。

D. 考察

以上の *npr2*^{-/-}マウスの解析の結果、CNP/GC-B 系が内軟骨性骨化調節機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。成長板軟骨における CNP、GC-B 遺伝子の発現はともに増殖軟骨細胞層から前肥大化軟骨細胞層にかけて認められることから、同様の部位に発現を認める 3 型線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR3)と CNP/GC-B 系が相互に細胞レベルで影響して内軟骨性骨化を調節していることを証明したわれわれの報告とあわせて、これらの異なる細胞内情報伝達を介した調節機構は興味深い。さらに、FGFR3 の活性化型変異が軟骨形成不全症の原因であることから、CNP/GC-B 系の活性化を軟骨形成不全症の新しい治療法として応用することが期待される。

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 系のトランスレシヨ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, Sakuma Y, Nakatsuru Y, Arai H, Itoh N, Nakao K. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone*. **2005**, 36:1056-64.
2. Natsui K, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Ozaki S, Nakao K. High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. *Osteoporos Int*. **2005**, *Epub ahead of print*
3. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, Kojima M, Tamaki H, Ito J, Nakao K. Anaplastic thyroid carcinoma associated with graves' disease. *Endocr J*. **2005**, 52:551-7.
4. Nambu T, Arai H, Komatsu Y, Yasoda A, Moriyama K, Itoh H, Nakao K. Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue. *Regul Pept*. **2005**, *Epub ahead of print*
5. Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*. **2005**, 1:371-8.
6. 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. *Endocr J*. **2005**, 52:309-16.
7. Nakanishi M, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Kawakami R, Nakagawa Y, Tanimoto K, Yasuno S, Usami S, Li Y, Adachi Y, Fukamizu A, Garbers DL, Nakao K. Role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A in myocardial infarction evaluated using genetically engineered mice. *Hypertension*. **2005**, 46:441-7.
8. Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Nagae T, Yokoi H, Kawachi H, Shimizu F, Sugawara A, Nakao K. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental Nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. **2005**, 16:2690-701.
9. Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, Kohno M, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation*. **2005**, 111:3095-104.
10. Abe K, Nakayama M, Yoshimura M, Nakamura

- S, Ito T, Yamamuro M, Sakamoto T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. **2005**, 15:329-36.
11. 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**, 44:60-4.
 12. 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**, 280:15247-56.
 13. Saito T, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Tanaka T, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Tojo K, Tajima N, Hosoya T, Nakao K. Angiotensin II suppresses growth arrest specific homeobox (Gax) expression via redox-sensitive mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Regul Pept*. **2005**, 127:159-67.
 14. Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Nakao K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. *Eur J Pharmacol*. **2005**, 508:255-65.
 15. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A, Nakao K. Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. **2005**, 38:185-92.
 16. 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. *Osteoporos Int*. **2005**, 16:907-13.
 17. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, Kojima M, Tamaki H, Ito J, Nakao K. Anaplastic thyroid carcinoma associated with graves' disease. *Endocr J*. **2005**, 52:551-7.
 18. Tanaka T, Masuzaki H, Ebihara K, Ogawa Y, Yasue S, Yukioka H, Chusho H, Miyana F, Miyazawa T, Fujimoto M, Kusakabe T, Kobayashi N, Hayashi T, Hosoda K, Nakao K. Transgenic expression of mutant peroxisome proliferator-activated receptor gamma in liver precipitates fasting-induced steatosis but protects against high-fat diet-induced steatosis in mice. *Metabolism*. **2005**, 54:1490-8.
 19. Tanimoto K, Saito Y, Hamanaka I, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Kawakami R, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi Y, Shirakami G, Fukuda K, Yoshimura A, Nakao K. SOCS1/JAB likely mediates the protective effect of cardiotrophin-1 against lipopolysaccharide-induced left ventricular dysfunction in vivo. *Circ J*. **2005**, 69:1412-7.
 20. Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Nakao K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. *Eur J Pharmacol*. **2005**, 508:255-65.
 21. 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**, 146:355-64.
2. 学会発表
- 国内学会
1. 中尾一和、生活習慣病のトピックス、第8回一糖会 特別講演、2005年4月9日(北九州市)
 2. 中尾一和、メタボリック症候群を標的としたレプチンのトランスレーショナルリサーチ、第27回熊本「腎と高血圧」研究会 特別講演、2005年5月24日(熊本市)
 3. 中尾一和、ゲノム科学と内分泌代謝学、大学院シンポジウム、2005年6月17日(京都市)
 4. 中尾一和、内分泌代謝疾患を合併する高血圧ーメタボリック症候群と高血圧ー、学術講演会ー高血圧治療ガイドライン 2004 を検証するー、2005年7月15日(札幌市)
 5. 中尾一和、肥満症の病態、第3回肥満症セミナー、2005年8月27日(大阪市)
 6. 中尾一和、ナトリウム利尿ペプチドファミリー

- 一のトランスレーショナルリサーチ、第41回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 岡本国際賞受賞記念講演、2005年9月2日(札幌市)
7. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー群馬 生活習慣病セミナー特別講演、2005年10月21日(前橋市)
 8. 中尾一和、Metabolic Syndrome の診断と治療の新戦略、第6回奈良高血圧学術集会 特別講演、2005年10月22日(奈良市)
 9. 中尾一和、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのトランスレーショナルリサーチ、第9回日本心血管内分泌代謝学会総会 高峰譲吉賞受賞講演、2005年11月18日(東京都)
 10. 中尾一和、メタボリックシンドロームと肥満症、第1回腹腔鏡下肥満外科フォーラム 特別講演、2005年12月9日(東京都)
 11. 中尾一和、肥満症とメタボリックシンドローム、第2回神戸成人血管病シンポジウム 特別講演、2005年12月10日(神戸市)
 12. 中尾一和、我国のメタボリックシンドロームの現状と診断・治療戦略、第一製薬 SRP 共同研究打合せ、2006年1月20日(東京都)
 13. 中尾一和、生活習慣病とメタボリック症候群、平成 17 年度京都大学第二内科新春講演会、2006年1月21日(京都市)
 14. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー、「FIELD」発売記念講演会 in Osaka 特別講演、2006年1月28日(大阪市)
 15. 中尾一和、メタボリック症候群ー診断及び治療の新戦略ー、大分県リバロ発売2周年記念講演会 特別講演、2006年2月2日(大分市)
 16. 中尾一和、生活習慣病とメタボリックシンドローム、2005年度武庫川女子大学生活習慣病オープン・リサーチ・センター公開シンポジウム 特別講演、2006年2月4日(西宮市)
 17. 中尾一和、21世紀の臨床研究ートランスレーショナルリサーチとEBMー、平成18年度純仁会総会 特別講演、2006年2月4日(大阪市)
 18. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー、第10回北九州先端医療研究会、2006年2月7日(北九州市)
 19. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ー、第8回心樹糖尿病研修会特別講演、2006年2月24日(札幌市)
 20. 中尾一和、メタボリックシンドロームと高血圧 東北大学 21世紀 COE・CRESCENDO フォーラム、第11回東北臨床血圧測定研究会特別講演、2006年3月4日(仙台市)
 21. 中尾一和、肥満症と Metabolic Syndrome、第6回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 特別講演、2006年3月5日(東京都)
 22. 中尾一和、メタボリックシンドロームー診断と治療の新戦略ーCLINICAL HYPERTENSION UPDATE 2006ー、ミカルデイス発売3周年講演会ー特別講演、2006年3月17日(幕張市)
 23. 中尾一和、メタボリック症候群の診断と治療、京都府医師会学術講演会 Key note lecture、2006年3月18日(京都市)
- 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

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17年度分担研究報告書

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）

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. 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(180-220g)をペントバルビタール麻酔下に開胸し、冠状動脈を結さつし、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±0.1mm, vehicle: 8.3±0.1mm, CNP: 7.7±0.1mm)。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 (図1)。

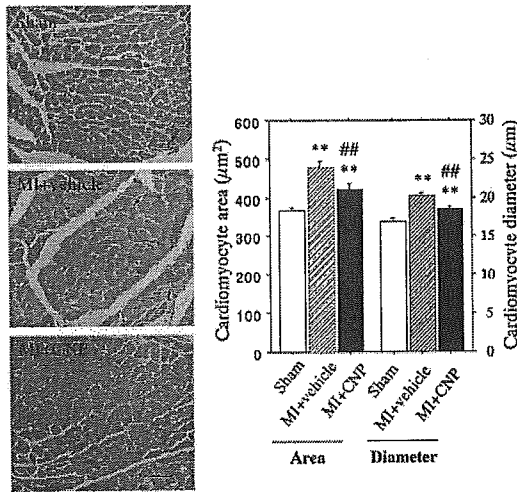


図1. 心筋梗塞モデルラットに対する CNP 持続投与の影響。左、心筋の組織像 (HE 染色)。右、心筋細胞の形態計測。

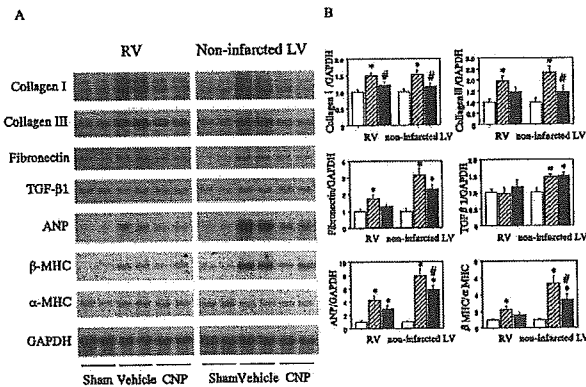


図2. 心筋梗塞モデルラットに対する CNP 持続投与の各種遺伝子発現に対する影響。A; ノーザンブロット解析による遺伝子発現、B; 定量化。

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 (図2)。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 (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

38. 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**, 45:608-16.
39. 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**, 25:136-46.
40. 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**, 24:325-35.
41. Ishimura K, Nishikimi T, Akimoto K, Ono H, Kangawa K, Matsuoka H. Renoprotective effect of long-term combined treatment with adrenomedullin and omapatrilat in hypertensive rats. *J Hypertens* **2005**, 23:2287-96.
42. Yoshihara F, Horio T, Nakamura S, Yoshii M, Ogata C, Nakahama H, Inenaga T, Kangawa K, Kawano Y. Adrenomedullin reflects cardiac dysfunction, excessive blood volume, and inflammation in hemodialysis patients. *Kidney Int* **2005**, 68:1355-63.
43. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* **2005**, 112:1128-35.
44. Makino T, Matsumoto M, Suzuki Y, Kitajima Y, Yamamoto K, Kuramoto M, Minamitake Y, Kangawa K, Yabuta M. Semisynthesis of human ghrelin: Condensation of a Boc-protected recombinant peptide with a synthetic O-acylated fragment. *Biopolymers* **2005**, 79:238-47.
45. Ida T, Mori K, Miyazato M, Egi Y, Abe S, Nakahara K, Nishihara M, Kangawa K, Murakami N. Neuromedin S is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology* **2005**, 146:4217-23.
46. Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, Kohno M, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation* **2005**, 111:3095-104.
47. Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Niiijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* **2005**, 146:3518-25.
48. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* **2005**, 20:790-8.
49. 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**, 36:853-8.
50. Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology* **2005**, 146:2709-15.
51. 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.
52. 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**, 280:15247-56.
53. 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**, 146:2255-64.
54. 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**, 111:356-62.
55. Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K.