

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19(2007)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

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. マウスを用いた CNP/GC-B 系賦活化の基礎検討に関する研究

八十田明宏 ----- 10

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

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18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その生理的・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。特にナトリウム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 の基礎研究ならびにその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、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、骨の伸長において CNP とその受容体である guanylyl cyclase B (GC-B) が重要であり、CNP および GC-B 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、主任および分担研究者はヒトゲノム・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た。まず、内軟骨性骨化の異常によりおこる代表的疾患、軟骨無形成症のモデルマウスにおける四肢体幹の短縮が、軟骨における CNP の過剰発現により正常レベルまで改善す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ている。これらの結果を受けた本研究は、骨・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するものである。

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）

八十田明宏

（京都大学大学院医学研究科 助手）

A. 研究目的

主任および分担研究者は、これまで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 系の極めて強力な骨伸長促進作用と、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主任および分担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、臨床応用に際する安全性が極めて高い。昨年度までの骨軟骨系におけるCNP/GC-B系の生理的意義のさらなる詳細な解明に引き続き、今年度はCNP/GC-B系賦活化の骨伸長促進作用を臨床展開するためのより具体的な方法についての研究を推進した。

B. 研究方法

1. CNP/GC-B系賦活化のための血中CNP濃度上昇モデルの解析

昨年度に引き続き、CNP投与モデルとしての遺伝子改変マウスとして、循環血液中のCNP濃度を上昇させる serum amyloid P component (SAP) promoterを用いたCNP過剰発現トランスジェニック(SAP-CNP-Tg)マウスを用いた解析をおこない、CNPの治療薬としての効果を検討した。すなわち、SAP-CNP-TgマウスをCNP-KOマウス(*Nppc*^{-/-})と交配させてSAP-CNP-Tg/*Nppc*^{-/-}マウスを作成し、表現型を成長曲線、全身の軟X線写真撮影にて解析し、さらに成長板軟骨の組織学的解析をおこなって、その効果を検討した。さらに野生型マウスに対して実際CNP投与をおこない、骨伸長促進効果を軟X線写真による解析、成長板の組織的解析により確認した。

2. CNP-GC-B系の賦活化に関する基礎検討

今年度は成長板軟骨局所におけるCNPのクリアランスシステムについてマウス胎仔脛骨器官培養を用いた解析をおこなった。CNPのクリアランスとして、クリアランス受容体(C受容体)およびNeutral endopeptidaseを介するシステムが知られているが、今年度は特にC受容体に関して、その特異的アゴニストを用いた解析をおこなった。

3. 骨系統疾患におけるCNP/GC-B系遺伝子変異の検討

四肢短縮型小人症をきたす常染色体劣性遺伝疾患 acromesomelic dysplasia, type Maroteux (AMDM)においてGC-Bの不活性型変異が同定されたことから、GC-B全翻訳領域のシーケンスによる遺伝子変異の解析をおこなった。

(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、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、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/GC-B系賦活化のための血中CNP濃度上昇モデルの解析

昨年までにCNP投与モデルとしてのSAP-CNP-Tgマウスの作成をおこない、CNP濃度依存性の四肢、体幹の過剰伸長、さらに組織学的には成長板軟骨の増大を報告した。今年度はCNPノックアウトマウスに対する効果を交配実験により確認したが、CNPノックアウトマウスにおける短躯、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および肥大化軟骨細胞層の短縮の改善が認められた。さらに、体外式ポンプによるCNPの持続静注により、野生型マウスの躯幹(吻臀長および吻尾長)、長管骨および椎骨の伸長促進、さらに組織学的に成長板幅の拡大が確認された。

2. CNP-GC-B系の賦活化に関する基礎検討

RT-PCRにより培養脛骨成長板軟骨におけるC受容体の遺伝子発現を確認したのち、以下の結果を得た。すなわち、C受容体の特異的アゴニストC-ANF(4-23)は濃度依存的に野生型成長板軟骨におけるCNP/GC-B系のセカンドメッセンジャーcGMPを増加させ(10⁻⁶M添加により約1.7倍)、野生型マウス培養脛骨の全長における伸長を約7%促進した。さらに、組織学的解析により成長板軟骨層の伸長促進が明らかとなった。一方、CNP欠損マウス培養脛骨において、C-ANF添加による骨伸長促進は認められなかった。

3. 骨系統疾患における CNP/GC-B 系遺伝子変異の検討

GC-B 全翻訳領域のシーケンスによる遺伝子変異の解析をおこなった。臨床診断された骨系統疾患患者に対して CNP/GC-B 系の遺伝子変異の有無を検討している。

D. 考察

前年度までの CNP/GC-B 系の骨伸長メカニズムに対する詳細な検討を受け、本年度はより臨床応用に繋がる研究を展開した。まず、CNP/GC-B 系賦活化のためのもっとも直裁な方法として CNP の全身投与を想定し、その薬物動態的基盤である血中濃度上昇状態を 1. 遺伝子改変動物を用いたトランスジェニックアプローチ、および 2. 直接的な CNP 投与 の 2 種類のモデルによって解析し、これまで局所因子として考えられていた CNP が循環血中を介して骨伸長に効果を持つことを証明した。この結果を受けて、次年度は投与方法や治療量の最適化など、より臨床応用に則した諸条件の同定が加速度的に進むことが期待される。一方で CNP/GC-B 系賦活化のための基礎検討も継続しており、本年度はクリアランス系の意義に対する解析をおこなった。直接投与の最適化と併せて、賦活化亢進の基礎解析が実際に応用されることが好ましい。

最後にヒトにおける骨伸長に対する CNP/GC-B 系の意義についても、海外の報告を受けて進行中である。

E. 結論

本研究によって CNP/GC-B 系の機能的意義とその分子機構が解明され、骨軟骨疾患をターゲットとした CNP/GC-B 系のトランスレーショナルリサーチが推進されて、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. Ebihara K, Kusakabe T, Hirata M, Masuzaki H, Miyanaga F, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H,

Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, DePaoli AM, Fukushima M, Nakao K. Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92:532-41.

2. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, Corners J, Nakao K. Safety and efficacy of low-dose pioglitazone (7.5 mg/day) vs. standard-dose pioglitazone (15 mg/day) in Japanese women with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J.* 2006, 53:325-30.
3. Nishimura T, Nishida N, Komeda T, Fukuda Y, Ikai I, Yamaoka Y, Nakao K. Genome-wide semiquantitative microsatellite analysis of human hepatocellular carcinoma: discrete mapping of smallest region of overlap of recurrent chromosomal gains and losses. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006, 167:57-65.
4. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa S, Yamashita JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26:1977-1984.
5. Toyoda T, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Sato K, Fushiki T, Nakao K, Hayashi T. Low-density contraction activates the α 1-isoform of 5' -AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006, 290:E583-E590.
6. Moriyama K, Kanamoto N, Hataya Y, Nanbu T, Hosoda K, Arai H, Nakao K. A case of type 2 diabetes mellitus developing hypothyroidism discovered as a result of a discrepancy between glycated hemoglobin and glycated albumin values. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2006, 71:227-232.
7. Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Yoshioka T, Takeda R, Sugawara A, Kuwahara T, Saleem MA, Ogawa O, Nakao K. Redistribution of connexin43 expression in glomerular podocytes predicts poor renal prognosis in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21:2472-7.
8. Makino H, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Kasahara M, Yahata K, Nagae T, Yokoi H, Sawai K, Ogawa Y, Suga S, Yoshimasa Y, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K. Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia*

- 2006, 49:2514-24.
9. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Takagi C, Shigemoto M, Fukao A, Morimoto T, Corners J, Nakao K. Negative correlation between bone mineral density and TSH receptor antibodies in male patients with untreated Graves' disease. *Osteoporos. Int.* 2006, 17:1103-1110.
 10. Nakano M, Hamada T, Hayashi T, Yonemitsu S, Miyamoto L, Toyoda T, Tanaka S, Masuzaki H, Ebihara K, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Otaka A, Fushiki T, Nakao K. alpha2 Isoform-specific activation of 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-d-ribose nucleoside at a physiological level activates glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle. *Metabolism.* 2006, 55:300-8.
 11. Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Shono M, Suzuki S, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium. *Endocrinology* 2006, 147:1314-1321.
 12. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Takagi C, Shigemoto M, Fukao A, Morimoto T, Corners J, Nakao K. Clinical significance of risedronate for osteoporosis in the initial treatment of male patients with Graves' disease. *J. Bone Miner. Metab.* 2006, 24:105-113.
 13. Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, Nakao K. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia* 2006, 49:962-968.
 14. Fujikura J, Hosoda K, Iwakura H, Tomita T, Noguchi M, Masuzaki H, Tanigaki K, Yabe D, Honjo T, Nakao K. Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas. *Cell Metab.* 2006, 3:59-65.
 15. Miyashita K, Itoh H, Arai H, Suganami T, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tsujimoto H, Chao TH, Tamura N, Mukoyama M, Nakao K. The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential. *Endocrinology* 2006, 147:1642-1653.
2. 学会発表
- 国内学会
1. 中尾一和、ホルモンと肥満症、特定非営利活動 (NPO) 法人日本ホルモンステーション市民公開講座「ホルモンと内分泌代謝疾患」－生活習慣病対策市民講座－、2006年(平成18年)5月21日(神戸市)
 2. 中尾一和、The Metabolic Syndrome - Implication of Obesity and Adipocytokines -、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム1、2006年(平成18年)5月25日(東京都)
 3. 中尾一和、生活習慣病 メタボリック症候群と腎疾患、第1回内科医のための腎疾患研究会－糖尿病性腎症を考える－、2006年(平成18年)6月1日(京都市)
 4. 中尾一和、心臓血管ホルモンのトランスレショナルリサーチ、第一製薬 SRP 共同研究報告会、2006年(平成18年)7月10日(京都市)
 5. 中尾一和、21世紀の臨床研究－Translational Research と Evidence Based Medicine－、第43回日本臨床分子医学会学術集会 特別講演、2006年(平成18年)7月20日(札幌)
 6. 中尾一和、メタボリックシンドロームのトピックス、インスリン抵抗性と高血圧、2006年(平成18年)8月2日(岡山市)
 7. 中尾一和、肥満症と内臓脂肪蓄積、第2回日本臨床内科医学会、2006年(平成18年)9月17日(東京都)
 8. 中尾一和、肥満とメタボリックシンドローム、第49回京大白菊会総会、2006年(平成18年)10月20日(京都市)
 9. 中尾一和、京都大学 EBM 共同研究センターと大規模臨床研究 CASE-J、製薬協、2006年(平成18年)10月21日(大阪市)
 10. 中尾一和、トランスレショナルリサーチと Evidence Based Medicine、第7回日本内分泌学会近畿支部学術集会、2006年(平成18年)10月21日(豊中市)
 11. 中尾一和、肥満症とその心臓血管合併症に関する臨床研究、日本肥満学会学会賞受賞講演、2006年(平成18年)10月28日(神戸市)
 12. 中尾一和、大規模臨床試験 CASE-J からの学習と新たな展開、カンデサルタン大規模臨床試

- 験研究会、2006年(平成18年)10月29日(東京都)
13. 中尾一和、CASE-Jの大規模臨床試験としてのQuality、全国CASE-Jサミット、2006年(平成18年)11月4日(東京都)
 14. 中尾一和、メタボリックシンドロームの概念とその意義、第16回倉敷アンジオテンシンII研究会、2006年(平成18年)11月7日(倉敷市)
 15. 中尾一和、大規模臨床試験CASE-Jからの学習と新たな展開、第10回日本心血管内分泌代謝学会学術集会ランチョンセミナー、2006年(平成18年)11月17日(福井市)
 16. 中尾一和、Metabolic Syndromeと糖尿病-MONK研究とCASE-J研究から学んだこと、第43回日本糖尿病学会近畿地方会シンポジウム「糖尿病の予防-私の提案-」、2006年(平成18年)11月18日(京都市)
 17. 中尾一和、メタボリックシンドロームとCASE-J研究の意義、久留米医師会学術講演会、2006年(平成18年)11月20日(久留米市)
 18. 中尾一和、Clinical Research in 21st Century 21世紀の臨床研究、「創薬共同開発における長期大型の産学連携戦略」京都大学国際フォーラム、2006年(平成18年)12月5日(京都市)
 19. 中尾一和、抗肥満ホルモン「レプチン」とメタボリックシンドローム、第5回杉田玄白賞記念講演会、2006年(平成18年)12月17日(小浜市)
 20. 中尾一和、肥満高血圧症へのアプローチ、プロプレスTV講演会 高齢者高血圧症、肥満合併高血圧症に対するCASE-Jからのメッセージ、2007年(平成19年)1月22日(大阪市)
 21. 中尾一和、肥満高血圧症へのアプローチ、プロプレスTV講演会 高齢者高血圧症、肥満合併高血圧症に対するCASE-Jからのメッセージ、2007年(平成19年)1月29日(大阪市)
 22. 中尾一和、21世紀の臨床研究トランスレーショナルリサーチとEBM-日本人の降圧治療を考える in 秋田、2007年(平成19年)2月1日(秋田市)
 23. 中尾一和、メタボリックシンドロームの臨床的意義と問題点、第4回血管研究会、2007年(平成19年)2月2日(名古屋市)
 24. 中尾一和、生活習慣病とメタボリックシンドローム、日本フラボノイド研究会第9回全国大会、2007年(平成19年)2月11日(東京都)
 25. 中尾一和、何故、内科医(内分泌代謝内科)になったか。-今日までの歩み-、内分泌代謝内科レクチャー 内分泌代謝内科学のABC、2007年(平成19年)2月13日(京都市)
 26. 中尾一和、レニンアンジオテンシン系とメタボリックシンドローム、高血圧治療学術講演会、2007年(平成19年)2月23日(徳島市)
 27. 中尾一和、CASE-Jの結果から今後の降圧治療を考える、CASE-J Meeting in GIFU、2007年(平成19年)2月24日(岐阜市)
 28. 中尾一和、日本人高血圧症のエビデンス-JATOSとCASE-J-、循環器フォーラム2007 in NAGOYA、2007年(平成19年)2月24日(名古屋市)
 29. 中尾一和、心血管内分泌代謝学の使命と未来、日本内分泌学会創設80周年記念式典・講演会 内分泌代謝フォーラム、2007年(平成19年)3月9日(東京都)
 30. 中尾一和、レニンアンジオテンシン系とメタボリックシンドローム、第5回心血管疾患とRA系フォーラム、2007年(平成19年)3月9日(宇部市)
 31. 中尾一和、Metabolic Syndrome and JASSO、The 1st Workshop on Metabolic Surgery for Morbid Obesity and Diabetes、2007年(平成19年)3月10日(横浜市)
 32. 中尾一和、メタボリックシンドロームの意義と問題点、ミカルデイス学術講演会、2007年(平成19年)3月10日(大阪市)
 33. 中尾一和、メタボリックシンドロームの臨床的意義と問題点、平成18年度山梨総合医学会、2007年(平成19年)3月11日(甲府市)
 34. 中尾一和、CASE-Jの意義と今後の展望、第71回日本循環器学会総会・学術集会ランチョンセミナー、2007年(平成19年)3月17日(神戸市)
 35. 中尾一和、21世紀の臨床研究トランスレーショナルリサーチとEBM-CASE-Jを中心に、糖尿病と高血圧研究会、2007年(平

成 19 年) 3 月 17 日 (大阪市)

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18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・副所長）

内因性生理活性ペプチドは生体内分子であり、臨床応用にあたって毒性や副作用が少ないという利点を持つ。一方、生体内において分解を受けやすい等の問題点もあり、その delivery system の開発はペプチド創薬における重要なポイントである。CNP/GC-B系の極めて強力な骨伸長促進作用を臨床応用するにあたり、長時間作用型ペプチド製剤の開発、非ペプチド性GC-Bアゴニストの開発とならんでペプチド製剤であるCNPのdrug delivery systemの開発が期待される所以である。分担研究者はこれまでナトリウム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。本研究においては、もうひとつのナトリウム利尿ペプチド系であるCNP/GC-B系の骨伸長促進作用および関節軟骨肥大化作用を骨、軟骨、関節疾患に臨床展開するにあたってのdrug delivery systemの開発を担当する。本年度は昨年度の成果を受け、心筋炎モデルラットに対するCNP持続静注法の検討、およびマウス器官培養法を用いたCNPクリアランス系の意義についての検討をおこなった。

A. 研究目的

分担研究者はこれまでナトリウム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系の極めて強力な骨伸長促進作用と、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. 心筋炎モデルラットに対するCNP持続投与の影響の検討
ペントバルビタール麻酔下にてラットに精製ブタ心筋ミオシンを注入し、心筋炎モデルラットを作成した。この心筋炎モデルラットに対し、浸透圧ポンプを用いてCNPを0.05 μg/kg/minで持続皮下注射し、心機能を心エコーにて、血行動態をカテーテルにて評価した。さらに心筋の組織学的解析を行った。
2. マウス器官培養法を用いたCNPクリアランス系の意義についての検討
CNPのクリアランスにはneutral endopeptidaseとクリアランス受容体（C受容体）が関与することが知られているが、今回、成長板局所におけるナトリウム利尿ペプチドのクリアランス受容体（C受容体）によるCNPのクリアランスが、内軟骨性骨化による骨伸長に及ぼす効果について、器官培養を用いて検討した。野生型およびCNP欠損マウス胎仔脛骨器官培養系を用いて、CNPに対するC受容体のアゴニストC-ANF（4-23）を添加し、解析をおこなった。

（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. 心筋炎モデルラットに対する CNP 持続投与の影響の検討

CNP は心筋炎モデルラットに認められた%FS の低下を有意に改善した。さらに、心筋炎モデルラットに認められた心臓重量/体重比の増加を減少させた。また、組織学的検討により、心筋炎モデルラット心筋に認められた炎症細胞の浸潤や浮腫は CNP 投与により改善傾向を示した。特に組織球浸潤のマーカーである CD68 陽性細胞は CNP 投与に取り著しく減少した。また組織中、あるいは血中 MCP-1 も CNP 投与により減少を認めた。

2. マウス器官培養法を用いた CNP クリアランス系の意義についての検討

まず RT-PCR にて培養脛骨成長板軟骨における C 受容体の遺伝子発現を確認したのち (図 1)、以下の結果を得た。すなわち、C-ANF は濃度依存的に野生型成長板軟骨における CNP/GC-B 系のセカンドメッセンジャー cGMP を約 1.7 倍に増加させ、野生型マウス培養脛骨の全長における伸長を約 7% 促進した (図 2)。

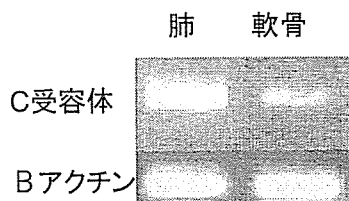


図 1. 軟骨における C-受容体の発現

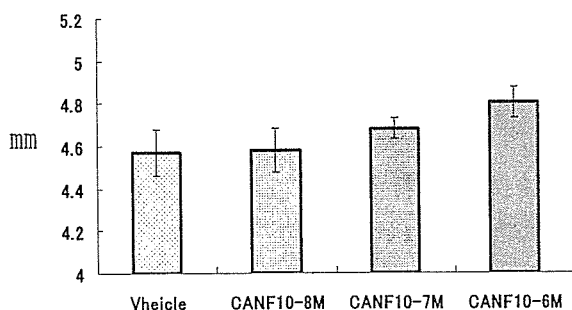


図 2. C-ANF 添加によるマウス胎仔脛骨培養体の伸長促進

さらに、組織学的解析により成長板軟骨層の伸長促進が明らかとなった (図 3)。一方、CNP 欠損マウス培養脛骨において C-ANF 添加による骨伸長促進は認められなかった。

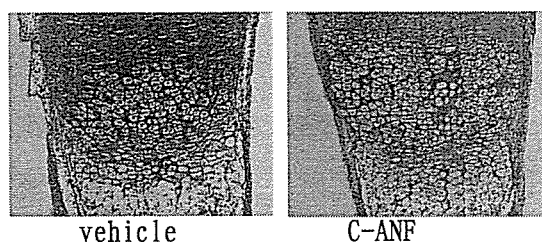


図 3. C-ANF 添加による成長板軟骨の組織学的変化

D. 考察

本年度の研究により、昨年度に引き続き、投与実験の結果からラットに対する CNP の浸透圧ポンプを用いた持続投与の有効性が示された。さらに器官培養を用いた C-ANF の添加実験により、成長板軟骨局所において、C 受容体が CNP 濃度を調節するクリアランス系として内軟骨性骨化による骨の伸長を調節していることが示され、CNP クリアランスの抑制が骨系統疾患に対する GC-B 賦活化のターゲットとなりうることを示された。

E. 結論

内因性生理活性ペプチドは生体内分子であり、臨床応用にあたって毒性や副作用が少ないという利点を持つ。一方、生体内において分解を受けやすい等の問題点もあり、その delivery system の開発はペプチド創薬における重要なポイントである。CNP/GC-B 系の極めて強力な骨伸長促進作用を臨床応用するにあたり、長時間作用型ペプチド製剤の開発、非ペプチド性 GC-B アゴニストの開発とならんでペプチド製剤である CNP の drug delivery system の開発が期待されるが、今回の検討にて CNP 持続投与の有効性についてさらに検証がおこなわれ、また新たな創薬ターゲットとして CNP クリアランス系の調節が CNP/GC-B 系の賦活化に有効である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

1. 論文発表

1. Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin

- enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*. 2006, 55:3486-93.
2. Obata H, Yanagawa B, Tanaka K, Ohnishi S, Kataoka M, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Kodama M, Aizawa Y, Kangawa K, Nagaya N. CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 356:60-66.
 3. Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Murakami N. Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 350:598-603.
 4. Date Y, Shimbara T, Koda S, Toshinai K, Ida T, Murakami N, Miyazato M, Kokame K, Ishizuka Y, Ishida Y, Kageyama H, Shioda S, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. *Cell Metab*. 2006, 4:323-31.
 5. Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 349:1242-9.
 6. Kojima M, Kangawa K. Drug insight: The functions of ghrelin and its potential as a multitherapeutic hormone. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006, 2:80-8.
 7. Tachibana T, Kaiya H, Denbow DM, Kangawa K, Furuse M. Central ghrelin acts as an anti-dipsogenic peptide in chicks. *Neurosci Lett*. 2006, 405:241-5.
 8. Fujikawa K, Nagayama T, Inoue K, Minamino N, Kangawa K, Niuro M, Miyata A. C-type natriuretic peptide is specifically augmented by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rat astrocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006, 1070:282-5.
 9. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides*. 2006, 27:2321-5.
 10. Chen T, Zhou M, Walker B, Harriot P, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Shaw C. Structural and functional analogs of the novel mammalian neuropeptide, neuromedin S (NmS), in the dermal venoms of Eurasian bombinid toads. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 345:377-84.
 11. Yada T, Kaiya H, Mutoh K, Azuma T, Hyodo S, Kangawa K. Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *J Endocrinol*. 2006, 189:57-65.
 12. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci*. 2006, 100:398-410.
 13. Nagaya N, Kangawa K. Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure. *Drugs*. 2006, 66:439-48.
 14. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006, 12:459-65.
 15. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 2006, 147:2306-14.
 16. Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*. 2006, 147:1333-42.
 17. Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, Sata M, Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, Kangawa K, Kitamura T, Nagai R, Hirata Y. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2006, 17:113-21.
 18. Shousha S, Nakahara K, Sato M, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Effect of neuromedin S on feeding regulation in the Japanese quail. *Neurosci Lett*. 2006, 391:87-90.
2. 学会発表
なし
- 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

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18年度分担研究報告書

マウスを用いた CNP/GC-B 系賦活化の基礎検討に関する研究

分担研究者：八十田 明宏（京都大学大学院医学研究科 助手）

ナトリウム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。以前よりナトリウム利尿ペプチドファミリーのうち CNP は骨軟骨由来の細胞にも存在し、作用することが知られていたが、serum amyloid P-component promoter を用いて肝臓で BNP を過剰発現し、血中 BNP 濃度が上昇するトランスジェニックマウスが予想しなかった著明な骨伸長を呈したことから、はじめてナトリウム利尿ペプチドファミリーの全く新しい作用としての骨伸長促進作用が明らかとなった。その後、器官培養系を用いて直接ナトリウム利尿ペプチドファミリーの骨伸長に対する作用を検討した結果、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのうち CNP が最も強い骨伸長促進作用をもち、実際、骨軟骨組織に CNP のみが発現していることが確認された。続いて作成された CNP 遺伝子欠損マウスでは骨の伸長障害が、軟骨特異的に CNP を過剰発現するトランスジェニックマウスでは骨の伸長促進が認められ、ANP、BNP、GC-A の各遺伝子欠損マウスに骨格異常が認められないこととあわせて骨の伸長促進には CNP/GC-B 系が重要であることが明らかとなった。本年度、以上のように明らかにされた CNP/GC-B 系賦活化の骨伸長促進作用に関して、それを臨床展開するためのより具体的な方法についての研究を推進した。

A. 研究目的

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは3種類の内因性リガンド、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)によって構成される。ANP、BNPはそれぞれ主に心房、心室から合成、分泌され、共通の受容体であるA型グアニル酸シクラーゼ(guanylyl cyclase-A, GC-A)を介して、利尿作用、ナトリウム利尿作用、

血管平滑筋弛緩作用に基づく血圧降下作用、さらにはアルドステロン分泌抑制作用など、多彩な生物作用を発現する。一方、局所因子として作用する CNP およびその受容体 B 型グアニル酸シクラーゼ(guanylyl cyclase-B, GC-B)は重要な内軟骨性骨化調節因子であり、その賦活化により骨伸長を強力に促進することが遺伝子改変マウスを用いた解析から明らかとなってきた。昨年度までの骨軟骨系における CNP/GC-B 系の

生理的意義の解析に引き続き、今年度は CNP/GC-B 系賦活化の骨伸長促進作用を臨床展開するためのより具体的な方法についての研究を推進した。

B. 研究方法

1. 血中CNP濃度上昇モデルSAP-CNP-Tgマウスを用いた解析

昨年度に引き続き、CNP投与モデルとしての遺伝子改変マウスとして、循環血液中のCNP濃度に上昇させるserum amyloid P component (SAP) promoterを用いたCNP過剰発現トランスジェニック(SAP-CNP-Tg)マウスを用いた解析をおこない、CNPの治療薬としての効果を検討した。すなわち、SAP-CNP-TgマウスをCNP-KOマウス(*Nppc*^{-/-})と交配させてSAP-CNP-Tg/*Nppc*^{-/-}マウスを作成し、表現型を成長曲線、全身の軟X線写真撮影にて解析し、さらに成長板軟骨の組織学的解析をおこなった。

2. CNP投与による骨伸長促進効果の検討
昨年度に引き続き、野生型マウスに対するCNP投与を行って、骨伸長に対する効果を軟X線写真による巨視的解析や成長板の組織的解析により確認した。

(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. 血中CNP濃度上昇モデルSAP-CNP-Tgを用いた解析

昨年までに CNP 投与モデルとしてのSAP-CNP-Tgマウスの作成をおこない、CNP濃度依存性の四肢、体幹の過剰伸長、さらに組織学的には成長板軟骨の増大を報告した。CNPノックアウトマウスをSAP-CNP-Tgマウスと交配させることにより、CNPノックアウトマウスにみられた短躯、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および肥大化軟骨細胞層の短縮が改善した(図1、2)。



図1. 生後15週齢雌SAP-CNP-Tg/*Nppc*^{-/-}マウスの外観

上から野生型マウス、SAP-CNP-Tg/*Nppc*^{-/-}マウス、*Nppc*^{-/-}マウス

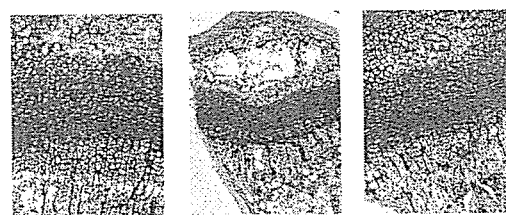


図2. CNPノックアウトマウスの成長板軟骨組織像。左、雌性7週齢の野生型、中、*Nppc*^{-/-}、および右、SAP-CNP-Tg/*Nppc*^{-/-}マウスの脛骨成長板軟骨組織のSafranin-O H&E染色像。拡大率x40

2. CNP 投与による骨伸長促進効果の検討
 昨年までに投与方法について、体外式ポンプによる経静脈からの持続注入の系を導入したが、 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.の投与による躯幹（吻臀長および吻尾長）の伸長促進、長管骨および椎骨の伸長促進、さらに組織学的に成長板幅の拡大を確認した（図3、4）。



図3. 体外式ポンプによる CNP 持続静注の効果。上段は vehicle 投与、下段は CNP $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.投与した個体の巨視像。

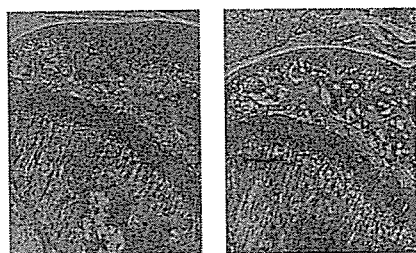


図4. 左：vehicle 投与 右：CNP $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.投与による成長板幅の変化

D. 考察

これまで CNP は局所因子として内軟骨性骨化による骨伸長を促進することが考えられていたが、今回の実験結果により、血中循環量を遺伝子改変マウス、あるいは体外からの投与によって増大させることにより作用することが確認された。従って CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用

を臨床応用する際、今後最も現実的な CNP の全身投与について理論的な基盤ができたものと判断できる。来年度以降は投与量や投与方法の最適化を中心としたより具体的な臨床使用に向けての解析をおこなう予定である。さらに、今年度の成果を基に、分担研究者の成果による delivery system との融合も早急にすすめていく予定である。

E. 結論

本研究では、マウスを用いた CNP/GC-B 系賦活化の臨床使用に関する基礎検討を推進している。今年度は実際の投与による効果が確認された。来年度以降、最適化に向けたより詳細な検討がおこなわれる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

1. 論文発表

1. Moriyama K, Tagami T, Usui T, Naruse M, Nambu T, Hataya Y, Kanamoto N, Li YS, Yasoda A, Arai H, Nakao K. Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92:1066-72.
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.* 2006, 17:105-8.

2. 学会発表

国内学会

1. 藤井寿人、小松弥郷、八十田明宏、田村尚久、中津留有子、荒井宏司、中尾一和、CNPの内軟骨性骨化における意義の検討—CNP-KOマウスとCNP過剰発現マウスを用いた解析—、第79回内分泌学会学術総会、2006/5/19-21、神戸
2. 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、肥大型心筋症を合併したリンパ球性下垂体炎の一例、第179回日本内科学会 近畿地方会、2006/6/10、神戸
3. 八十田明宏、小松弥郷、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、成長板軟骨におけるCNP/GC-BおよびFGFシグナル伝達系の相互作用の検討、第24回日本骨代謝学会、2006/7/6-8、東京
4. 八十田明宏、小松弥郷、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、マウスに対するCNP投与による骨伸長促進作用の検討、第24回日本骨代謝学会、2006/7/6-8、東京
5. 金本巨哲、荒井宏司、上原口由梨、小鳥真司、高橋潤、須川秀夫、山田豪、藤井寿人、南部拓央、中津留有子、三浦晶子、有安宏之、森山賢治、八十田明宏、小松弥郷、長村義之、橋本信夫、中尾一和、TSH産生下垂体腺腫の一例、第71回京都内分泌同好会プログラム、2006/9/9、京都
6. 藤井寿人、八十田明宏、髭 秀樹、伴健二、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、丹原圭一、三木幸雄、三上芳樹、荒井宏司、中尾一和、下垂体機能低下症を認めた Multifocal Systemic Fibrosis の一例、第7回日本内分泌学会近畿支部学術集会、2006/10/21、大阪
7. 藤井寿人、小松弥郷、八十田明宏、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、吉岡徹朗、田村尚久、向山政志、荒井宏司、中尾一和、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は血中濃度上昇を介してCNPノックアウトマウスの骨伸長障害を改善する、第57回関西カルシウム懇話会、2006/11/4、大阪
8. 野口直美、八十田明宏、椽谷真由、山田豪、藤井寿人、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、白井健、荒井宏司、中尾一和、R320C変異を認めた甲状腺ホルモン不応症、第29回京都甲状腺研究会、2007/1/27、京都
9. 八十田明宏、藤井寿人、髭 秀樹、伴健二、山田 豪、中津留有子、南部拓央、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、原田昌樹、丹原圭一、三木幸雄、三上芳樹、荒井宏司、中尾一和、下垂体機能低下症を認めた Multifocal Systemic Fibrosis の一例、第17回日本間脳下垂体腫瘍学会、2007/2/23-24、山形
10. 中津留有子、八十田明宏、藤井寿人、南部拓央、山田豪、三浦晶子、金本巨哲、森山賢治、荒井宏司、中尾一和、新しい骨系統疾患治療戦略としてのCNP/GC-B系賦活化における成長板局所CNPクリアランス系の解析、第20

回日本軟骨代謝学会、2007/3/2-3、岡山

11. 鳥居紘子、八十田明宏、中本裕士、山田豪、中津留有子、南部拓央、藤井寿人、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、坂口泰人、近藤展行、大久保憲一、荒井宏司、MIBI-SPECT/CT 画像合成により部位同定し得た縦隔内副甲状腺腫による原発性副甲状腺機能亢進症の 1 例、第 58 回関西カルシウム懇話会、2007/3/24、大阪
12. 中津留有子、八十田明宏、藤井寿人、南部拓央、山田 豪、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、荒井宏司、中尾一和、CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用賦活性化における成長板軟骨局所 CNP クリアランス系の意義、第 33 回骨・カルシウム代謝研究会、2007/3/30、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌 (中尾一和、八十田明宏)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ebihara K, Kusakabe T, Hirata M, Masuzaki H, Miyanaga F, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, DePaoli AM, Fukushima M, Nakao K	Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	92	532-41	2007
Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, Corners J, Nakao K	Safety and efficacy of low-dose pioglitazone (7.5 mg/day) vs. standard-dose pioglitazone (15 mg/day) in Japanese women with type 2 diabetes mellitus.	<i>Endocr J</i>	53	325-30	2006
Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa S, Yamashita JK	Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i>	26	1977-1984	2006
Toyoda T, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Sato K, Fushiki T, Nakao K	Hayashi T. Low-density contraction activates the α 1-isoform of 5'-AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle.	<i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i>	290	E583-E590	2006
Moriyama K, Kanamoto N, Hataya Y, Nanbu T, Hosoda K, Arai H, Nakao K	A case of type 2 diabetes mellitus developing hypothyroidism discovered as a result of a discrepancy between glycated hemoglobin and glycated albumin values.	<i>Diabetes Res Clin Pract</i>	71	227-232	2006
Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Yoshioka T, Takeda R, Sugawara A, Kuwahara T, Saleem MA, Ogawa O, Nakao K	Redistribution of connexin43 expression in glomerular podocytes predicts poor renal prognosis in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy.	<i>Nephrol Dial Transplant</i>	21	2472-7	2006
Makino H, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Kasahara M, Yahata K, Nagae T, Yokoi H, Sawai K, Ogawa Y, Suga S, Yoshimasa Y, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K	Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice.	<i>Diabetologia</i>	49	2514-24	2006

Majima T, Komatsu Y, Doi K, Takagi C, Shigemoto M, Fukao A, Morimoto T, Corners J, <u>Nakao K</u>	Negative correlation between bone mineral density and TSH receptor antibodies in male patients with untreated Graves' disease.	<i>Osteoporos Int.</i>	17	1103-1110	2006
Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Shono M, Suzuki S, Sakamoto T, Saito Y, <u>Nakao K</u> , Yasue H, Ogawa H	Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium.	<i>Endocrinology</i>	147	1314-1321	2006
Majima T, Komatsu Y, Doi K, Takagi C, Shigemoto M, Fukao A, Morimoto T, Corners J, <u>Nakao K</u>	Clinical significance of risedronate for osteoporosis in the initial treatment of male patients with Graves' disease.	<i>J Bone Miner Metab</i>	24	105-113	2006
Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, <u>Nakao K</u>	Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion.	<i>Diabetologia</i>	49	962-968	2006
Fujikura J, Hosoda K, Iwakura H, Tomita T, Noguchi M, Masuzaki H, Tanigaki K, Yabe D, Honjo T, <u>Nakao K</u>	Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas.	<i>Cell Metab</i>	3	59-65	2006
Miyashita K, Itoh H, Arai H, Suganami T, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tsujimoto H, Chao TH, Tamura N, Mukoyama M, <u>Nakao K</u>	The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential.	<i>Endocrinology</i>	147	1642-1653	2006
Moriyama K, Tagami T, Usui T, Naruse M, Nambu T, Hataya Y, Kanamoto N, Li YS, <u>Yasoda A</u> , Arai H, <u>Nakao K</u>	Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	92	1066-72	2007
Natsui K, Tanaka K, Suda M, <u>Yasoda A</u> , Sakuma Y, Ozasa A, Ozaki S, <u>Nakao K</u>	High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass.	<i>Osteoporos Int</i>	17	105-8	2006

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
Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, <u>Kangawa K</u> , Yada T	Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance.	<i>Diabetes</i>	55	3486-93	2006
Obata H, Yanagawa B, Tanaka K, Ohnishi S, Kataoka M, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Kodama M, Aizawa Y, <u>Kangawa K</u> , Nagaya N	CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	356	60-66	2007
Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, Nakazato M, <u>Kangawa K</u> , Murakami N	Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	350	598-603	2006
Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, <u>Kangawa K</u> , Kitamura S, Nagaya N	Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	349	1242-9	2006
Tachibana T, Kaiya H, Denbow DM, <u>Kangawa K</u> , Furuse M	Central ghrelin acts as an anti-dipsogenic peptide in chicks.	<i>Neurosci Lett</i>	405	241-5	2006
Fujikawa K, Nagayama T, Inoue K, Minamino N, <u>Kangawa K</u> , Niuro M, Miyata A	C-type natriuretic peptide is specifically augmented by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rat astrocytes.	<i>Ann N Y Acad Sci</i>	1070	282-5	2006
Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, <u>Kangawa K</u> , Shioda S	Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish.	<i>Peptides</i>	27	2321-5	2006
Chen T, Zhou M, Walker B, Harriot P, Mori K, Miyazato M, <u>Kangawa K</u> , Shaw C	Structural and functional analogs of the novel mammalian neuropeptide, neuromedin S (NmS), in the dermal venoms of Eurasian bombinid toads.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	345	377-84	2006
Yada T, Kaiya H, Mutoh K, Azuma T, Hyodo S, <u>Kangawa K</u>	Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes.	<i>J Endocrinol</i>	189	57-65	2006
Hosoda H, Kojima M, <u>Kangawa K</u>	Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin.	<i>J Pharmacol Sci</i>	100	398-410	2006
Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, <u>Kangawa K</u> , Nakazato M	Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor.	<i>Endocrinology</i>	147	2306-14	2006

Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, <u>Kangawa K</u> , Murakami N	Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy.	<i>Endocrinology</i>	147	1333-42	2006
Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, Sata M, Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, <u>Kangawa K</u> , Kitamura T, Nagai R, Hirata Y	Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure.	<i>J Am Soc Nephrol</i>	17	113-21	2006
Shousha S, Nakahara K, Sato M, Mori K, Miyazato M, <u>Kangawa K</u> , Murakami N	Effect of neuromedin S on feeding regulation in the Japanese quail.	<i>Neurosci Lett</i>	391	87-90	2006