

200706002B

厚生労働科学研究費補助金
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～19年度 総合研究報告書

平成20年(2008)3月

主任研究者 中尾一和

目 次

I. 総合研究報告

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. 新規 CNP 賦活化療法の開発に関する研究

寒川賢治 ----- 7

2. マウスを用いた骨伸長障害に対する CNP/GC-B 系賦活化の展開研究

八十田明宏 -----12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----24

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
平成17~19年度総合研究報告書

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約 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、内軟骨性骨化において 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、椎骨や四肢長管骨の著しい伸長障害が起こること、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、四肢長管骨の過伸長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 系の骨・軟骨・関節軟骨を標的とした展開研究（トランスレーショナルリサーチ）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 は、軟骨無形成症の原因である 3 型 FGF 受容体 (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、基質産生を増加させて成長板軟骨を増大させることにより、軟骨無形成症における骨伸長障害を改善することを明らかにした (Nat Med, 10;80, 2004)。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 所長）

八十田 明宏

（京都大学大学院医学研究科 助教）

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遂行し、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るが、一般的に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。また、BMP-2、BMP-7、FGF 等の骨、軟骨増殖因子と比較しても安価であり、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。以上のような状況を踏まえ、当該研究においては骨・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を推進した。

B. 研究方法

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 Maroteaux 型遠位中間肢異形成症において GC-B の不活性型遺伝子変異が同定され、CNP/GC-B 系のヒトの骨・軟骨における重要性が初めて証明されたが、GC-B ノックアウトマウス (GC-B KO マウス) を用いて CNP/GC-B 系の内軟骨性骨化調節機構について検討した。

また、CNP/GC-B 系賦活化の展開研究としては、CNP 投与モデルとして、まず循環血液中の 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マウス (SAP-CNP-Tg マウス) を作製し、その表現型を軟 X 線写真や組織学的手法により解析した。さらに、このマウスを CNP KO マウスと交配させて、CNP KO/SAP-CNP-Tg マウスを作製し、CNP KO マウスにおける骨伸長障害に対する効果を成長曲線、軟 X 線写真、組織学的手法により解析した。SAP-CNP-Tg マウスを用いて CNP の関節軟骨への作用を組織学的解析により検討した。また、野生型マウスに対して合成 CNP 投与をおこない、内軟骨性骨化に及ぼす効果を軟 X 線写真や組織学的解析により評価した。さらに、骨系統疾患の代表的疾患である軟骨無形成症のモデルマウスを用いて、上述の2つの方法によって血中 CNP 濃度を上昇させ、骨伸長障害に対する効果を検討した。すなわち、活性変異型 FGFR3 を軟骨に過剰発現させた軟骨無形成症モデルマウス (Ach マウス) の血中 CNP 濃度を、Ach マウスと SAP-CNP-Tg マウスとの交配実験、および Ach マウスに対する合成 CNP 投与により上昇させ、軟 X 線写真や組織学的所見を用いてその骨伸長障害に対する治療効果を評価した。

内軟骨性骨化に対する新規 CNP/GC-B 系賦活化法の開発として、成長板軟骨局所における CNP のクリアランスシステムの解析を、マウス胎仔脛骨器官培養

を用いておこなった。さらに、新たな GC-B 賦活化法としての BNP の効果について、血中 BNP 濃度上昇の効果について、SAP プロモーターを用いた BNP トランスジェニックマウス (SAP-BNP-Tg マウス) を用いて検討した。

(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。

C. 研究結果

GC-B KO マウス雌性 10 週齢の外観は明らかな体長の短縮、四肢の短縮を認めた。成長曲線においても GC-B KO マウスは生後 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、CNP KO マウスで観察されたものと同じ表現型を示した。軟 X 線写真にて、GC-B KO マウスにおいて椎体および四肢長管骨の短縮が認められた。生後 8 日齢の脛骨成長板軟骨組織像において、GC-B KO マウスに成長板軟骨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 GC-B KO マウスでは発現部位の縮小が認められた。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 マウス) を作製したところ、四肢、体幹の過伸長を観察した。組織学的には成長板軟骨層の増大、及び関節軟骨細胞数の増加を観察し、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。さらに CNP KO マウスに対する効果

を交配実験により確認したが、CNP KO マウスにおける短軀、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、野生型マウスに対する体外式ポンプによる合成 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。これらの結果をもとに、Ach マウスに対する SAP-CNP-Tg マウスの交配実験により Ach マウスの血中 CNP 濃度を上昇させるダブルトランスジェニック (Ach/SAP-CNP-Tg) マウスを作製したところ、Ach マウスに認められた成長板軟骨幅の狭小化は改善し、内軟骨性骨化により形成される骨の伸長障害は回復した。さらに、Ach マウスに対して合成 CNP を投与することにより、Ach マウスの骨伸長障害は野生型マウスとほぼ同程度まで改善した。

また、CNP/GC-B 系を修飾する因子としての C 受容体の関与に関しては、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マウス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、野生型マウス培養脛骨の伸長を促進した。さらに、組織学的解析により成長板軟骨層の伸長促進が確認された。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。また、GC-B のリガンドとしての BNP の作用に関しては、CNP KO マウスと SAP-BNP-Tg マウスを交配させることによって SAP-BNP-Tg かつ CNP KO マウス (CNP KO/BNP-Tg マウス) を作成し、CNP 欠損状態における BNP の骨伸長促進効果を検討したところ、CNP KO/BNP-Tg マウスにおいて、野生型マウスには及ばないものの、CNP KO マウスと比較して有意な骨伸長促進が確認された。組織学的解析にても、狭小化した CNP KO マウス成長板の改善が示された。

D. 考察

当該研究において、CNP/GC-B 系のトランスレショナルリサーチを推進したが、まず GC-B KO マウスの解析から CNP KO マウス同様の骨伸長障害が確認され、CNP/GC-B 系の内軟骨性骨化にお

ける意義がより明らかとなった。また、骨伸長障害をきたす骨系統疾患等に対する CNP/GC-B 系賦活化の方法として CNP の全身投与を想定し、血中 CNP 濃度上昇のための遺伝子工学的手法と合成ペプチド投与による 2 つのアプローチについての基礎検討をすすめたうえで、疾患モデルマウス (軟骨無形成症モデルマウス) に対する効果を検討し、軟骨無形成症モデルマウスにおける骨伸長障害が改善したことから、薬物としての CNP の全身投与が軟骨無形成症をはじめとする骨系統疾患に有効であることが強く示唆された。

一方で CNP/GC-B 系賦活化のための基礎検討もおこない、局所 CNP 濃度調節系である C 受容体の内軟骨性骨化における意義、CNP より血中半減期の長いナトリウム利尿ペプチドファミリーのメンバーであり、GC-B に対するリガンドとして作用しうる BNP の内軟骨性骨化による骨伸長促進作用について検討した。

E. 結論

当該研究において、骨・軟骨・関節疾患をターゲットとした CNP/GC-B 系のトランスレショナルリサーチを推進した。GC-B に対する安定な合成アゴニストの開発や、より効率的な投与法の確立、DDS の開発を目指した CNP/GC-B 系賦活化のための基礎検討や、関節軟骨に関する更なる展開研究は必要であるが、今後特に骨系統疾患をターゲットとした CNP の早期の臨床使用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 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.
- 2 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.
- 3 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.
 - 4 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.
 - 5 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.
 - 6 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.
 - 7 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.
 - 8 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.
 - 9 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.
 - 10 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.
 - 11 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.
 - 12 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.
 - 13 T. Ishii, H. Masuzaki, T. Tanaka, N. Arai, S. Yasue, N. Kobayashi, T. Tomita, M. Noguchi, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, and K. Nakao. Augmentation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in LPS-activated J774.1 macrophages – Role of 11 β -HSD1 in pro-inflammatory properties in macrophages. *FEBS Lett*. 581:0349-354, 2007.
 - 14 K. Ebihara, T. Kusakabe, M. Hirata, H. Masuzaki, F. Miyanaga, N. Kobayashi, T. Tanaka, H. Chusho, T. Miyazawa, T. Hayashi, K. Hosoda, Y. Ogawa, AM Depaoli, M. Fukushima, and K. Nakao. Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 92: 532-541, 2007.
 - 15 T. Tanaka, H. Masuzaki, S. Yasue, K. Ebihara, T. Shiuchi, T. Ishii, N. Arai, M. Hirata , H. Yamamoto, T. Hayashi, K. Hosoda , Y. Minokoshi and K. Nakao. Central Melanocortin Signaling Restores Skeletal Muscle AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylation in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metab*. 55:395-402, 2007.
 - 16 M. Sone, H. Itoh, K. Yamahara, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, A. Nonoguchi, Y. Suzuki, T-H. Chao, N. Sawada, Y. Fukunaga, K. Miyashia, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, N. Tamura, Y. Kondo, S. Nito, H. Suemori, N. Nakatsuji, S. Nishikawa, and K. Nakao. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol*. 27: 2127-2134, 2007.
 - 17 M. Nakanishi, M. Harada, E. Tadamura, H.

- Kotani, R. Kawakami, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, S. Usami, H. Kinoshita, M. Fujiwara, K. Hosoda, K. Ueshima, and K. Nakao. Mitochondrial cardiomyopathy evaluated with cardiac magnetic resonance. *Circulation* 116: e25-e26, 2007.
- 18 Iwakura, T. Akamizu, H. Ariyasu, T. Irako, K. Hosoda, K. Nakao, and K. Kangawa. Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: e819-e825, 2007.
- 19 K. Sawai, M. Mukoyama, K. Mori, M. Kasahara, M. Koshikawa, H. Yokoi, T. Yoshioka, Y. Ogawa, A. Sugawara, H. Nishiyama, S. Yamada, T. Kuwahara, M.A. Saleem, K. Shiota, O. Ogawa, M. Miyazato, K. Kangawa, and K. Nakao. Expression of CCN1 (CYR61) in developing, normal, and diseased human kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293: F1363-F1372, 2007
- 20 Yokoi, M. Mukoyama, K. Mori, M. Kasahara, T. Suganami, K. Sawai, T. Yoshioka, Y. Saito, Y. Ogawa, T. Kuwabara, A. Sugawara, and K. Nakao. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int.* 73:446-55, 2007.
- 21 K. Mori, and K. Nakao. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int.* 71: 967-970, 2007.
- 22 M. Noguchi, K. Hosoda, J. Fujikura, M. Fujimoto, H. Iwakura, T. Tomita, T. Ishii, N. Arai, M. Hirata, K. Ebihara, H. Masuzaki, H. Itoh, S. Narumiya, and K. Nakao. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem.* 282:29574-29583, 2007.
- 23 N. Arai, H. Masuzaki, T. Tanaka, T. Ishii, S. Yasue, N. Kobayashi, T. Tomita, M. Noguchi, T. Kusakabe, J. Fujikura, K. Ebihara, M. Hirata, K. Hosoda, T. Hayashi, H. Sawai, Y. Minokoshi, and K. Nakao. Ceramide and AMP-activated Protein Kinase are Two Novel Regulators of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression and Activity in Cultured Preadipocytes. *Endocrinology.* 148:5268-77, 2007.
- 24 S. Nakano, Y. Inada, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, N. Arai, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Maruyama, Y. Yamazaki, N. Shibata, and K. Nakao. Bezafibrate regulates the expression and enzyme activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:E1213-22, 2007.
- 25 L. Miyamoto, T. Toyoda, T. Hayashi, S. Yonemitsu, M. Nakano, S. Tanaka, K. Ebihara, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Ogawa, G. Inoue, T. Fushiki, and K. Nakao. Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 102:1007-13, 2007.
- 26 K. Park, H. Itoh, K. Yamahara, M. Sone, K. Miyashita, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, H. Tsujimoto, Y. Fukunaga, N. Tamura, and K. Nakao. Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology.* 149:48-91, 2007.
- 27 T. Ogihara, K. Nakao, T. Fukui, K. Fukiyama, K. Ueshima, K. Oba, T. Sato, T. Saruta, for the CASE-J Trial Group. Effects of candesartan compared with amlodipine for treatment of hypertensive patients with high cardiovascular risks in CASE-J trial. *Hypertension* 51: 393-398, 2008

2. 学会発表

国内学会

1. 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シヨナルリサーチ、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)
2. 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シヨナルリサーチ、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)
3. 中尾一和、21世紀の臨床研究—トランスレシヨナルリサーチとEBM—、平成18年度純仁会総会 特別講演、2006年2月4日(大阪市)
4. 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)
5. 中尾一和、トランスレシヨナルリサーチと 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)
6. 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)
7. 中尾一和、21世紀の臨床研究—トランスレシヨナルリサーチと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)

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

N R S E 及び N R S F 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
- ### 2. 実用新案登録
- なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
平成17~19年度分担研究報告書

新規 CNP 賦活化療法の開発に関する研究

分担研究者：寒川 賢治（国立循環器病センター研究所 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、その克服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ファミリーの発見からトランスレーショナルリサーチの推進にまで携わり、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新たな賦活化療法の開発を担当する。本研究ではまず心筋梗塞モデルラットに対する CNP 持続投与の影響を検討した。また、小ペプチドとして血中半減期の短い CNP の弱点を克服するため、成長板軟骨における CNP クリアランスシステムの関与について器官培養を用いて検討し、さらに新たなアゴニストの候補として BNP に着目して血中 BNP 濃度が上昇するトランスジェニックマウスを用いた骨伸長促進作用の可能性について検討した。

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ファミリーの発見からトランスレーショナルリサーチまでを推進し、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。本研究が、骨伸長障害を主徴とし、未だ有効な薬物治療の確立されていない骨系統疾患や、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、その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るため安全性においても問題点は少なく、BMP-2、BMP-7、FGF 等の骨、軟骨増殖因子と比較して安価であるため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。

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反面、生体内において分解を受けやすい等の問題点もあり、その克服はペプチド創薬における重要なポイントである。当該研究において、まずラット心筋梗塞モデルを用いた CNP 持続投与についての研究をおこない、さらに CNP 局所濃度に影響を与える CNP クリアランスシステムの内軟骨性骨化における意義の検討をおこなった。また、すでに薬剤として臨床使用されており、CNP より安定性で勝るナトリウム利尿ペプチドファミリーのメンバーである BNP の GC-B に対するアゴニスト作用についても、遺伝子組換えマウスを用いた解析をおこなった。

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. 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 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 KO マウス胎仔脛骨器官培養系を用いて、CNP に対する C 受容体特異的アゴニスト C-ANF (4-23) を添加し、解析をおこなった。

3. BNP の GC-B に対するアゴニスト作用についての解析

肝臓における導入遺伝子の発現を可能とし、その血中濃度を上昇させる SAP プロモーターを用いた BNP トランスジェニックマウス (SAP-BNP-Tg マウス) において、GC-B を介した骨の過伸長を認めることを主任研究者らはすでに報告しているが (*Endocrinology* 2000)、今回 CNP ノックアウトマウスと SAP-BNP-Tg マウスとの交配実験によって、CNP 欠損状態における、BNP の内軟骨性骨化による骨伸長に対する効果を検討した。すなわち、CNP ヘテロノックアウトマウスと SAP-BNP-Tg マウスを交配することによって CNP ヘテロノックアウトマウスかつ SAP-BNP-Tg マウスを作製し、さらにこのマウスと CNP ヘテロノックアウトマウスを交配させることによって CNP ホモノックアウト (CNP KO) かつ SAP-BNP-Tg マウス (CNP KO/SAP-BNP-Tg マウス) を作製して、その内軟骨性骨化により規定される骨伸長状態を軟 X 線写真や組織学的手法により解析し、CNP KO マウスあるいは野生型マウスと比較した。さらに、CNP KO マウス胎仔脛骨器官培養に BNP を添加し、その効果を解析した。(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 持続投与の効果の検討

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。

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)。

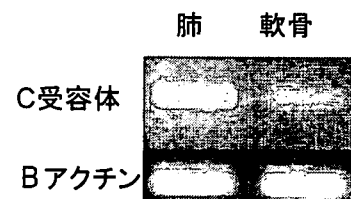


図 1. 軟骨における C 受容体の発現

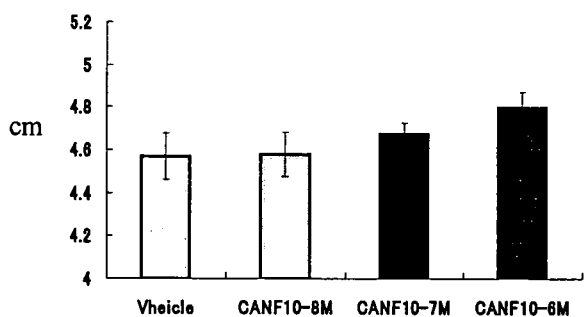


図 2. C-ANF 添加によるマウス胎仔脛骨培養体の伸長促進

3. BNP の GC-B に対するアゴニスト作用についての解析

成長曲線から、CNP KO/SAP-BNP-Tg マウスにおいて、野生型マウスには及ばないものの、CNP KO

マウスと比較して有意な吻臀長の増大が確認された(図3)。

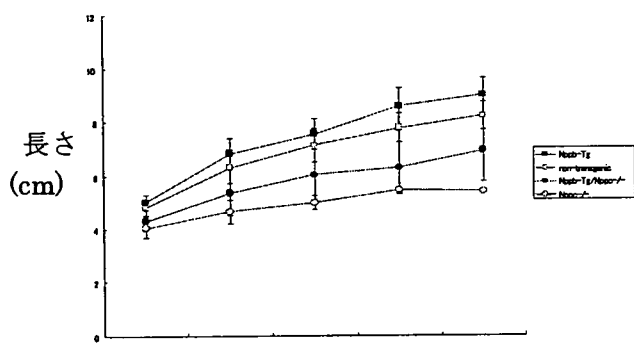
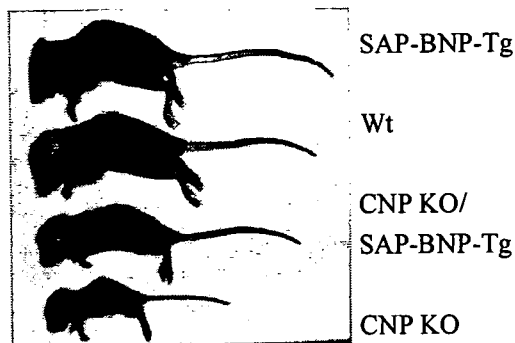


図3. 各遺伝子型マウスの外観(上段、2週齢)と成長曲線(下段)

軟X線写真による各骨の計測においても、CNP KO/SAP-BNP-Tg マウスでは、野生型マウスには及ばないものの、CNP KO マウスよりも内軟骨性骨化により形成される各骨長の増大が確認された(図4)。さらに組織学的解析により、CNP KO マウスに認められた成長板軟骨幅の狭小化が CNP KO/SAP-BNP-Tg マウスにおいて改善した。

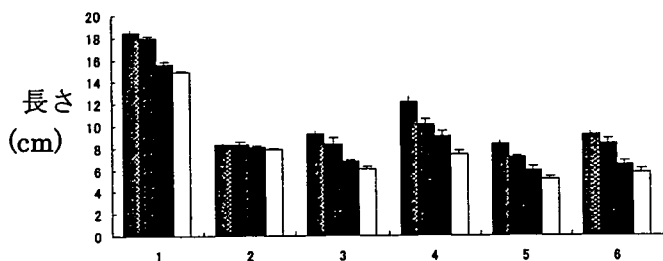


図4. 軟X線写真による各骨の長さの比較
1. 頭蓋骨前後径、2. 頭蓋骨横径、3. 脛骨、4. 上腕骨、5. 尺骨、6. 大腿骨
各カラムは左から SAP-CNP-Tg、Wt、CNP KO/SAP-BNP-Tg、CNP KO マウス

また、器官培養において、合成 BNP は濃度依存的に培養 CNP KO マウス胎仔脛骨の伸長を促進した(図5)。

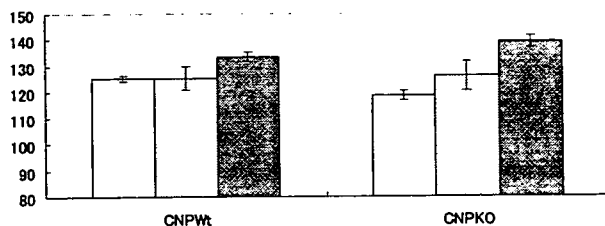


図5. CNP KO マウス胎仔脛骨器官培養における BNP の効果

Y 軸は実験開始時からの伸び率 (%)。各カラムは左より vehicle 添加群、BNP $10^{-7}M$ 添加群、同 $10^{-6}M$ 添加群

D. 考察

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。また、新たな CNP/GC-B 系賦活化のストラテジーとしての BNP 投与の意義が検討された。BNP は CNP より大型のペプチドであり、血中半減期が長く安定である利点を持つ。また、実際海外では心不全の治療薬として使用されていることから、安全性においても問題はない。今回の検討で CNP 欠損状態において BNP が内軟骨性骨化により形成される骨の伸長を促進することが示された。

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、その克服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 アゴニストの開発が期待されるが、当該研究において試みられた CNP/GC-B 系の賦活化法はそれぞれ臨床的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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Nijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* **2005**, 146:3518-25.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. 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, 356:60-6.
18. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Inuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T. The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest*. 2008, 118:29-39.
19. Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, Takeshita S, Mori H, Kodama M, Kangawa K, Aizawa Y, Nagaya N. Single injection of a sustained-release prostacyclin analog improves pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008, 177:195-201.
20. Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Seikagaku*. 79:853-67, 2007.
21. Schwenke DO, Pearson JT, Kangawa K, Umetani K, Shirai M. Changes in macrovessel pulmonary blood flow distribution following chronic hypoxia: assessed using synchrotron radiation microangiography. *J Appl Physiol*. 2008, 104:88-96.
22. Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nat Med*. 2007, 13:1234-40.
23. Itoh T, Obata H, Murakami S, Hamada K, Kangawa K, Kimura H, Nagaya N. Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007, 293:L446-52.
24. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2007, 42:88-97.

2. 学会発表

国内学会

1. 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

2. 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回日本心臓血管作動物質学会学術総会(特別講演), 2005, 宇都宮.
3. 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
4. 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

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

マウスを用いた骨伸長障害に対する CNP/GC-B 系賦活化の展開研究

分担研究者：八十田 明宏（京都大学大学院医学研究科 助教）

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より、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。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、心室から生合成、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、主任研究者および分担研究者らは、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)が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を、遺伝子改変マウスを用いた研究から証明してきた。骨伸長障害を主徴とする骨系統疾患をターゲットとした CNP/GC-B 系賦活化による骨伸長促進作用

の臨床展開は当該研究の中核をなすものであるが、CNPの直接的な臨床使用法として全身投与を想定し、マウスを用いた投与モデルの確立と、骨系統疾患モデルマウスにおける有効性の検討をおこなった。

B. 研究方法

骨伸長障害に対するCNP/GC-B系賦活化のためのCNP投与モデルとして、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)マウスを作製し、ラジオイムノアッセイ法にて血中CNP濃度を測定したのち、その表現型について軟X線写真や組織学的手法により解析した。また、このマウスをCNP KOマウスと交配させて、CNP KO/SAP-CNP-Tgマウスを作製し、その表現型を成長曲線、軟X線写真にて解析した。さらにSAP-CNP-Tgを用いてCNPの関節軟骨への作用を組織学的解析により検討した。また、野生型マウスに対して生後3週齢から4週間、合成CNP投与をおこない、その血中濃度の変化をLC-MS法にて確認したのち、内軟骨性骨化に及ぼす効果を軟X線写真や組織学的解析により評価した。さらに、骨系統疾患の代表的疾患である軟骨無形成症のモデルマウスを用いて、上述の2つの方法によって血中CNP濃度を上昇させ、骨伸長障害に対する効果を検討した。すなわち、活性変異型FGFR3を軟骨に過剰発現させた軟骨無形成症モデルマウス(Achマウス)の血中CNP濃度を、AchマウスとSAP-CNP-Tgマウスとの交配実験、あるいはAchマウスに対する合成CNP投与により上昇させ、軟X線写真や組織学的所見によりその骨伸長障害に対する治療効果を解析

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。

C. 研究結果

作製されたSAP-CNP-Tgマウスのいずれのラインにおいても、内軟骨性骨化により形成される骨の著しい過伸長が確認されたため、以下のすべての実験にはもっとも表現型の弱い、血中CNP濃度が野生型マウスの約2倍に増加した1ラインを使用した。成長曲線により10週齢雌性SAP-CNP-Tgマウスは野生型マウスに対して吻臀長にて約7%の増加を認め、軟X線写真において計測された大腿骨長は約20%増加していた。SAP-CNP-Tgマウスにおいて成長板軟骨幅は野生型マウスと比較して40%以上増加し、関節軟骨の厚さに有意な増加は認めなかったものの、軟骨細胞数の増加を認めた。そして、CNP KOマウスをSAP-CNP-Tgマウスと交配させることにより作製されたCNP KO/SAP-CNP-Tgマウスにおいて、CNP KOマウスにみられた短躯、椎体および四肢長管骨の短縮、成長板軟骨幅の短縮が改善した(図1、2)。



図1. 生後15週齢雌CNP KO/SAP-CNP-Tgマウスの外観

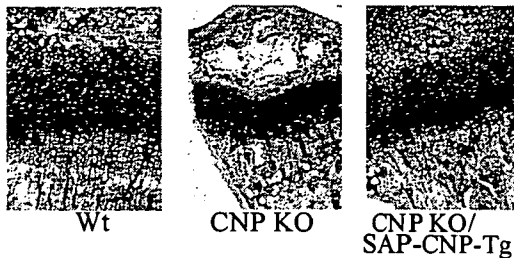


図2. CNP KO/SAP-CNP-Tg マウスの成長板軟骨組織像。雌性7週齢、脛骨、Safranin-O H&E 染色による。拡大率 x40

次に、野生型マウスに対して体外式ポンプにより CNP を持続静注することにより、投与量依存性の血中 CNP 濃度の上昇が LC-MS 法にて確認された。体外式ポンプによる $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の経静脈持続注入により、軀幹（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軟骨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

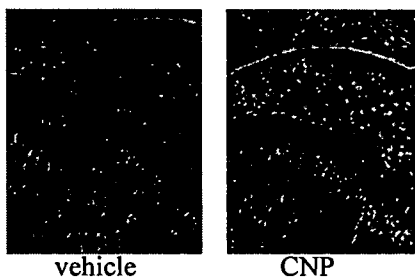


図4. CNP ($5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) 投与による成長板幅の変化

以上のように確立された2つの CNP 投与モデルを用いて、骨系統疾患の代表的疾患である軟骨無形成症のモデルマウス (Ach マウス) に対する治療効果を検討した。まず、Ach マウスに対して SAP-CNP-Tg マウスを交配させて Ach マウスの血中 CNP 濃度を上昇させるダブルトランスジェニック (Ach/SAP-CNP-Tg) マウスを作製したところ、このマウスにおいて、Ach マウスに認められた低身長が改善した（図5）。

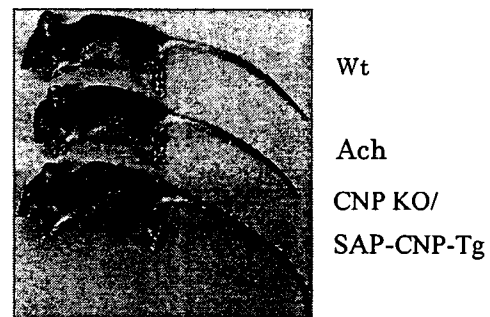


図5. Ach マウスの低身長に対する SAP-CNP-Tg の効果。雌性、3ヶ月齢、外観

成長板軟骨幅の狭小化は改善し、内軟骨性骨化により形成される骨の伸長障害は回復した（図6）。さらに、生後約3週齢の Ach マウスに対して合成 CNP を投与することにより、Ach マウスの長さは野生型マウスとほぼ同程度まで回復した（図7）。

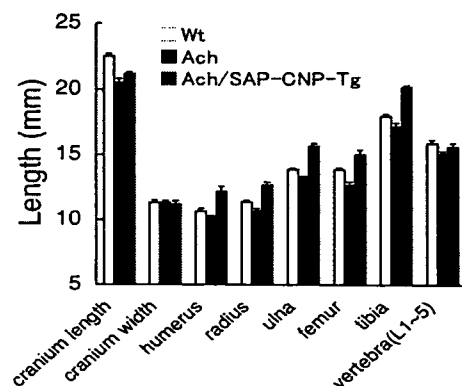


図6. 軟 X 線写真による各骨の長さの解析

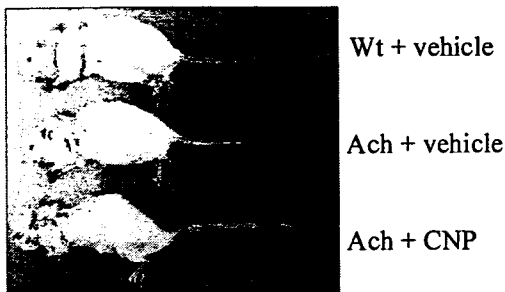


図7. Ach マウスに対する合成 CNP 投与の効果

また、Ach マウスにおいて認められた内軟骨性骨化により形成される骨の伸長障害が、合成 CNP 投与により野生型マウスとほぼ同程度まで回復した。

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と考えられていたが、循環血中 CNP 濃度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、骨伸長を促進することが確認された。このことは、臨床的に CNP の全身投与が、生体における骨伸長促進に有効であることを示すものである。さらにこれらの手法を用いて疾患モデルマウス（軟骨無形成症モデルマウス）に対する効果を検討した結果、循環血中 CNP 濃度の上昇により軟骨無形成症モデルマウスにおける骨伸長障害が改善し、CNP の全身投与が軟骨無形成症をはじめとする骨系統疾患に有効であることが強く示唆された。

E. 結論

本研究では骨伸長障害を主徴とする骨系統疾患に対する CNP の骨伸長促進作用の展開研究をマウスを用いて推進した。血中 CNP 濃度

上昇をきたす2種類の CNP 投与モデルを確立し、軟骨無形成症モデルマウスに対する有効性の検討をおこなった結果、いずれの投与モデルにおいてもその骨伸長障害が改善したことから、軟骨無形成症をはじめとする骨系統疾患に CNP 投与が有効であることが示された。

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, 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. K. Moriyama, T. Tagami, T. Usui, M. Naruse, T. Nambu, Y. Hataya, N. Kanamoto, Y. Li, A. Yasoda, H. Arai, and K. Nakao. Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 1066-1072, 2007.

2. 学会発表

国際学会

1. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Nakatsuru Y, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Nakao K. Activation of CNP/GC-B system in cartilage as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasia, The Endocrine Society 87th Annual Meeting, Jun 4-7, 2005, San Diego, USA
2. Yasoda A, Komatsu Y, Nakao K. Rescue of Achondroplasia, 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the Int. Bone and Mineral Society, June 25-29, 2005, Geneva, Switzerland

3. 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.
4. Toshihito Fujii, Yasato Komatsu, Akihiro Yasoda, Naohisa Tamura, Tetsuro Yoshioka, Yuko Nakatsuru, Takuo Nambu, Naotetsu Kanamoto, Masako Miura, Kenji Moriyama, Hiroshi Arai, Masashi Mukoyama and Kazuwa Nakao. Evaluation of role of Blood-Borne C-type Natriuretic Peptide (CNP) in Endochondral Ossification. The Endocrine Society 89th Annual Meeting, Toronto, CANADA, June 2-5, 2007
5. Yuko Nakatsuru, Akihiro Yasoda, Takuo Nambu, Toshihito Fujii, Go Yamada, Eri Kondo, Masako Miura, Naotetsu Kanamoto, Naohisa Tamura, Hiroshi Arai and Kazuwa Nakao. Local CNP Clearance System as a Regulator of CNP-GC-B System for Bone Growth. JBMR Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii, USA, Sept. 16-19, 2007.

国内学会

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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

13. 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
14. 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
15. 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、小松弥郷、荒井宏司、中尾一和、CNP/GC-B系の骨伸長作用の賦活化に対する成長板局所のCNPクリアランスの意義、第80回日本内分泌学会学術総会、2007/6/14-16、東京
16. 藤井寿人、小松弥郷、八十田明宏、中津留有子、吉岡徹朗、南部拓央、山田豪、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、田村尚久、荒井宏司、向山政志、中尾一和、CNP投与モデルとしてのCNPトランスジェニックマウスはCNP欠損による骨伸長障害を是正する、第80回日本内分泌学会学術総会、2007/6/14-16、東京
17. 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、田村尚久、荒井宏司、中尾一和、ナトリウム利尿ペプチドクリアランス受容体の骨伸長に対する効果の検討、第25回日本骨代謝学会学術集会、2007/7/19-21、大阪
18. 藤井寿人、小松弥郷、八十田明宏、中津留有子、吉岡徹朗、南部拓央、山田豪、金本巨哲、三浦晶子、森山賢治、田村尚久、荒井宏司、向山政志、中尾一和、CNP投与モデルとしてのCNPトランスジェニックマウスはCNP欠損による骨伸長障害を是正する、第25回日本骨代謝学会学術集会、第25回日本骨代謝学会、2007/7/19-21、大阪
19. 藤井寿人、八十田明宏、中津留有子、近藤絵里、山田豪、南部拓央、吉岡徹朗、金本巨哲、三浦晶子、田村尚久、小松弥郷、向山政志、荒井宏司、中尾一和、遺伝子改変マウスを用いた血中CNPによる骨伸長促進作用の検討、第34回骨・カルシウム代謝研究会、2007/11/9、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (中尾一和)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	1	371-8	2005
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	46	441-7	2005
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.	16	2690-701	2005
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.	280	15247-56	2005
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.	38	185-92	2005
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.	146	355-64	2005
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.	92	532-41	2007