

200936147A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 低身長症におけるCNP有効症例の 把握と診断法の確立に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成22(2010)年5月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

低身長症における CNP 有効症例の把握と診断法の確立に関する研究 ……1

中尾 一和

### II. 分担研究報告

1. CNP/GC-B 関連因子の測定系の確立に関する研究 ……6

寒川 賢治

2. 骨系統疾患における CNP 有効症例の確定に関する前臨床研究 ……8

八十田 明宏

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……12

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……15

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
平成21年度総括研究報告書

低身長症における CNP 有効症例の把握と診断法の確立に関する研究

研究代表者：中尾 一和（京都大学大学院医学研究科 教授）

骨系統疾患（Skeletal dysplasia）は骨・軟骨成長障害をきたす先天性稀少難病の総称であり、著明な低身長、四肢短縮などによる著しい日常生活の支障をきたすが、現在、有効な薬物治療は確立されていない。申請者らは C 型ナトリウム利尿ペプチド（C-type natriuretic peptide: CNP）が極めて強力な骨伸長促進作用を持つことを発見し（*J. Biol. Chem.* 1998、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001、*Nat. Med.* 2004）、現在、骨系統疾患に対する CNP 治療の展開研究を遂行している。まず、骨系統疾患の代表的疾患である軟骨無形成症（Achondroplasia）のモデルマウスに対して CNP が劇的な治療効果を示すことを証明し、軟骨無形成症に対する CNP 治療の POC を確立した。ところが、軟骨無形成症以外の骨系統疾患に対する CNP 治療については、その有効性は期待されるものの、POC は確立されていない。実際、骨系統疾患の一疾患であるマロトー型遠位中間肢異形成症の原因が CNP 受容体であるグアニル酸シクラーゼ B（Guanylyl Cyclase-B: GC-B）の機能喪失型遺伝子変異であることが報告されており（*Am. J. Hum. Genet.* 2004）、当疾患が CNP 治療に抵抗性である可能性は濃厚である。本研究は、300種類以上と数多く存在する軟骨無形成症以外の骨系統疾患における CNP 治療に対する有効症例の把握を、前臨床研究や疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析と併せて総合的におこなう臨床研究である。

研究分担者

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 特定講師）

A. 研究目的

骨系統疾患は骨・軟骨の成長障害により骨格異常をきたす先天性疾患の総称であるが、この中に骨伸長障害を主徴とする低身長症が含まれる。これらの低身長症は様々な遺伝子変異に起因する稀少難病群であり、骨伸長障害による著明な低身長と四肢短縮のため、生活面での長期間にわたる著しい支障をきたす。しかし、現在、低身長症に対する有効な薬物治療は確立されておらず、極めて侵襲的な整形外科的治療である骨延長術がおこなわれているのみである。

申請者らは骨・軟骨疾患による低身長症治療に対する前臨床研究として、平成15～19年度厚労科研費を得て、CNP が極めて強力かつ特異的な骨伸長促進作用を持つこと（Cusho et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001）、低身長症の代表的疾患である軟骨無形成症のモデルマウスに対して劇的な治療効果を示すこと報告してきた

（Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004, *Endocrinology* 2009）。現在、申請者が代表を務める「難治性疾患を標的としたシグナル伝達制御による創薬スーパー特区」の主要プロジェクトとして、低身長症に対する CNP のトランスレーショナルリサーチの積極的推進が計画されている。ところで、CNP はその受容体 GC-B を介して細胞内セカンドメッセンジャー cGMP を産生し、その生物作用を発揮するが、最近低身長症の一病型であるマロトー型遠位中間肢異形成症（AMDM）の原因が GC-B の遺伝子変異であることが報告され（Bartels et al., *Am. J. Hum. Genet.* 2004）、CNP 治療抵抗性低身長症の存在が明らかとなった。CNP 治療を展開するうえで有効症例の把握は必須である。本研究は、300種類以上と数多く存在する軟骨無形成症以外の骨系統疾患における CNP 治療に対する有効症例の把握を、前臨床研究や疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析と併せて総合的におこなう臨床研究である。

B. 研究方法

当該研究では、1) CNP/GC-B 系の状態評価（血中 CNP および NT-proCNP、血中、尿中 cGMP 基礎値測定、および CNP 負荷試験による血中、

尿中 cGMP 反応性の確認)、および、2) CNP/GC-B 系遺伝子検索 (CNP、GC-B、および下流の II 型 cGMP 依存性プロテインキナーゼ: cGKII) により低身長症を解析し、CNP 治療の有効性を予測して、CNP 有効性低身長症と CNP 抵抗性低身長症に分類・診断する。

#### (1) 軟骨無形成症

低身長症のうちもっとも高頻度に認められる軟骨無形成症は、理学所見、骨 X 線所見により臨床診断が比較的容易である。同疾患は FGF3 型受容体の恒常活性型変異に起因するが、申請者らは CNP が FGF シグナルの MAPK 経路を抑制することにより軟骨無形成症モデルマウスの骨伸長障害を改善することを証明しており (Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004)、CNP の有効性は確立している (CNP 有効性低身長症)。CNP/GC-B 系の状態評価をしたうえで、CNP 治療を開始する。

(2) 臨床診断および原因遺伝子が確立している疾患

#### (2) -1. CNP/GC-B 系遺伝子異常

これまでに GC-B の機能喪失型遺伝子変異 (AMDM) のみが、海外 (21 家系)、および国内 (Hachiya et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007) にて報告されている。臨床診断は専門医に依頼し、診断が確定した患者に対して GC-B 遺伝子変異を常法にて確定する。AMDM は CNP 抵抗性低身長症と診断されるが、CNP/GC-B 系の状態を確認し、さらに新規 GC-B 遺伝子変異の場合は変異 GC-B を COS-7 細胞に発現させて CNP に対する反応性を確認し、CNP 治療に対する抵抗性を予測する。抵抗性が軽微なら CNP 治療の開始も検討する。

#### (2) -2. その他の遺伝子異常

これまでに低身長症の原因として、BMP 系 (BMP1 型受容体、GDF5 等)、SOX9、PTHrP 受容体等の遺伝子変異が同定されているが、これらの疾患に対する CNP 治療の有効性をまず基礎実験にて確認する。すなわち、疾患モデルマウスに対して合成 CNP 投与をおこない、その効果を解析する。さらに疾患モデルマウスの長管骨器官培養や初代骨・軟骨細胞培養を用いて疾患原因因子と CNP/GC-B 系の相互作用を検討し、CNP 治

療有効性の分子機構を検討する。さらに CNP/GC-B 系の状態を把握し、総合的に CNP 治療の有効性が証明された疾患に対して優先的に治療を開始する。

(3) 臨床診断あるいは原因遺伝子が同定されていない疾患

専門医による臨床診断を確認したうえで、CNP/GC-B 系の遺伝子変異の有無を検索する。変異が認められない場合、CNP/GC-B 系の状態を評価し、その結果により CNP/GC-B/cGKII のプロモーター領域の変異の有無も検討する。以上の検討から新規の CNP/GC-B 系の異常が同定された場合、その異常症として骨系統疾患分類に情報を還元すると同時に CNP 治療に対する反応性を予測する。すなわち、CNP 異常症においては良好な治療反応性が期待され (CNP 有効性低身長症)、cGKII 異常症は CNP 抵抗性低身長症と考えられる。また、AMDM とは異なる臨床病型存在の可能性があるため、GC-B 遺伝子変異に関する検討もおこなう。

CNP/GC-B 系に異常が認められない場合、患者由来 iPS 細胞を軟骨細胞に分化させてその性状を解析し、CNP に対する反応性を検証して、良好な反応性が得られた場合 (CNP 有効性低身長症)、CNP 治療の開始を検討する。

#### (倫理面への配慮)

研究対象者に対して、本年度から改訂された「臨床研究に関する倫理指針」に則った人権擁護、利益保護上の配慮をおこなう。その内容は、同指針にすべて準拠した疫学研究実施申請書および遺伝子研究実施申請書 (研究実施計画書およびインフォームド・コンセントのための説明文書、同意書も添付) に記載し、京都大学大学院医学研究科医学部医の倫理委員会に提出して審議を受け、京都大学の承認を受ける予定である。また、動物実験に関しては動物愛護上の配慮を含んだ動物実験計画書を京都大学動物実験委員会に申請し、すでに承認を得ている (MedKyo09105)。

#### C. 研究結果

平成 21 年度の研究計画に従って、臨床研究としては、治療有効性判定のための CNP 負荷試験に必要な CNP/GC-B 系関連の基礎値を測定した。健常

男性(24~44才、n=10)における血中CNP濃度、血中NT-proCNP(CNPのN端プロペプチド)濃度、血中cGMP(CNPの細胞内セカンドメッセンジャー)濃度をRIA法、EIA法にて測定し、以下の結果を得た。

血漿中CNP濃度  $0.75 \pm 0.05$  pg/ml (mean  $\pm$  S.E.)

血漿中NT-proCNP濃度  $1.95 \pm 0.14$  pmol/L (mean  $\pm$  S.E.)

血清中cGMP濃度  $2.44 \pm 0.16$  pmol/ml (mean  $\pm$  S.E.)

現在研究分担者寒川を通して株式会社ペプチド研究所にGMPレベルのCNP作製を依頼しており、本年3月の完成を待ってCNP負荷試験を開始する予定である。

また、CNP/GC-B系の遺伝子変異の検索に関しては、CNP、GC-B、およびCNP/GC-B系の細胞内effector分子であり、その自然発症遺伝子変異ラットにおいて骨伸長障害が確認されているcyclic GMP dependent protein kinase II (cGKII)の、遺伝子検索性のPCRプライマーセットを作製し、正常に作動することを確認した。

さらに骨系統疾患患者由来iPS細胞を用いたCNP治療の有効性およびそのメカニズムの解析研究に関しては、研究班員三浦らが正常ヒトiPS細胞を用いた軟骨分化条件の検討をおこなった。現在分化条件はほぼ確立しており、条件が確定し次第、研究班員片岡(滋賀県立小児保健医療センター小児整形外科)より骨延長術時に骨系統疾患患者の皮膚細胞を入手してiPS細胞を樹立し、軟骨細胞への分化誘導をおこなう。そして、正常ヒトiPS細胞から誘導した軟骨細胞と分化・増殖能等形質の比較をおこなったうえで、CNP添加の効果についての比較検討を開始する予定である。

一方、前臨床研究としては、human serum amyloid P componentプロモーターを用いて肝臓でCNPを過剰発現し、血中CNP濃度が上昇するCNP投与モデルのトランスジェニックマウスを作製し、その解析をおこなった(Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2009)。さらにCNP治療の効果が最も顕著であると期待される骨系統疾患モデルとして、著明な骨伸長障害をきたすCNPノックアウトマウスを用いて、作製されたCNPトランスジェニックマウスとの交配実験による治療効果を検討し、骨伸長障害の改善のみならず、全身的な成長障害や

死亡率の改善をきたすことを証明した(現在投稿中)。

#### D. 考察

骨系統疾患は、骨・軟骨組織の成長障害により低身長や骨伸長障害などをきたし、生活面への長期にわたる支障をおこす先天性の稀少難治性疾患群である。現時点(2006年国際分類)で37グループ・372種類の多岐に分類され、個々の疾患の頻度は低いものの疾患数が多いため総数としてはかなりの数にのぼるとされている。これらの疾患に対する現在の標準治療法は整形外科による極めて侵襲の強い骨延長術であり、有効な薬物治療は未だ確立されていない。申請者らが現在先端医療開発特区制度を活用して、骨系統疾患のうちの軟骨無形成症に限定して進めている新規薬物治療法であるCNP治療は、骨系統疾患に対する画期的治療法であり、世界的にも注目され

(Endocrine news, May 2009)国内外からの問い合わせが殺到している。また、申請者は既に国内のみならず、海外(米国)においても同治療法に関する特許を出願または取得している(軟骨無形成症治療薬、特願番号2001-301586、公2003-104908等)。CNPは極めて強力な骨伸長促進作用をもつため軟骨無形成症以外の骨系統疾患に対しても有効である可能性が高く、今後他の稀少難病である骨系統疾患への治療適応の拡大が期待される。しかし2004年米国のWarmanらをはじめ21家系のGC-B(CNP受容体)異常による骨系統疾患(マロト型遠位中間肢異形成症)を報告し(Bartels et al., *Am. J. Hum. Genet.* 2004)、骨系統疾患におけるCNP治療抵抗症例の可能性が示された。さらに彼らは、GC-Bのヘテロ遺伝子変異による低身長は原因不明の低身長症の1/30にのぼると推論しており(Olney et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006)、骨系統疾患におけるCNP/GC-B系異常の意義は、CNP治療をおこなう際に必須であるのみならず、社会的にも予想外に大きなインパクトをもつ可能性もある。なお、本邦におけるGC-B異常によるマロト型遠位中間肢異形成症は研究班員長谷川らから報告されている(Hachiya et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007)。本研究は、軟骨無形成症を対象としたCNP治療をその他の骨系統疾患に波及させることをひとつの目的とするが、本研究を通してCNP/GC-B系異常による

骨系統疾患群が、骨系統疾患における新規疾患群の概念として確立されることも考えられる。

#### E. 結論

軟骨無形成症以外の骨系統疾患における CNP 治療に対する有効症例の把握を、前臨床研究や疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析と併せて総合的にこなす臨床研究を開始した。現在軟骨無形成症を対象とする CNP の臨床治験開始が予定されているが、その他の骨系統疾患においても CNP 治療により救える患者を少しでも増やすことを目的として、CNP 治療の有効性を検証する本研究を継続する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y, Jishage K, Yasoda A, Mukoyama M, Nakao K. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297, E1339-48, 2009
2. Sawada N, Itoh H, Miyashita K, Tsujimoto H, Sone M, Yamahara K, Arany ZP, Hofmann F, Nakao K. Cyclic GMP kinase and RhoA Ser188 phosphorylation integrate pro- and antifibrotic signals in blood vessels. *Mol Cell Biol.* 29, 6018-32, 2009
3. Nakao K, Yasoda A, Ebihara K, Hosoda K, Mukoyama M. Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases for common human diseases. *J Mol Med.* 87, 1029-39, 2009
4. Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, Miura M, Kanamoto N, Komatsu Y, Arai H, Nakao K. Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology.* 150 3138-44, 2009
5. Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda H, Hosoda K, Shimatsu A, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297, E802-11, 2009
6. Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M,

- Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. *Circ Res.* 105, 746-54, 2009.
7. Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K. T-type Ca<sup>2+</sup> channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation.* 120, 743-52, 2009.
  8. Sonoyama T, Tamura N, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Taura D, Inuzuka M, Fukunaga Y, Sone M, Nakao K. Inhibition of hepatic damage and liver fibrosis by brain natriuretic peptide. *FEBS Lett.* 583, 2067-70, 2009
  9. Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 1100-3, 2009
  10. Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Adachi Y, Nakanishi M, Kinoshita H, Horiuchi M, Murray M, Nakao K. Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 2 receptor-mediated pro-hypertrophic signaling in the heart. *Endocrinology.* 150, 3759-65, 2009
  11. Yasuno S, Usami S, Kuwahara K, Nakanishi M, Arai Y, Kinoshita H, Nakagawa Y, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Harada M, Nakao K. Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296, H1804-10, 2009

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

1. Kazuwa Nakao, Translational Research in Endocrinology and Metabolism, The 8th Congress of Chinese Society of Endocrinology, 2009年9月5日, NanJing
2. Kazuwa Nakao, Translational Research—Lessons from Animal Models and Rare Human Diseases—, World Health Summit, 2009年10月15日, Berlin
3. Kazuwa Nakao, Metabolic Syndrome Update—Basic and Clinical Aspects of Metabolic Syndrome, The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010年3月5日, 京都

## 国内学会

1. 中尾 一和、日本内分泌学会の針路、第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 24 日、前橋
2. 中尾 一和、疾患モデル動物、稀少難病から Common Disease への展開、第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2009 年 9 月 4 日、東京
3. 中尾 一和、メタボリックシンドロームと高血圧—Adipotoxicity の概念と分子基盤—、第 32 回日本高血圧学会総会、2009 年 10 月 2 日、大津
4. 中尾 一和、ミネラルコルチコイド受容体の臨床的意義—原発性アルドステロン症からの学習—、第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2009 年 10 月 23 日、大宮
5. 中尾 一和、臨床医学研究：Translational Research & EBM、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 17 日、大阪

## 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  
 $\alpha$ -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（難治性疾患克服研究事業）  
平成21年度分担研究報告書

CNP/GC-B 関連因子の測定系の確立に関する研究

研究分担者：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。分担研究者はこれまでに様々な生理活性ペプチドを発見してきたが、ナトリウム利尿ペプチドファミリーもそのひとつであり、主任研究者との共同研究によって ANP・BNP/GC-A 系の循環器系における意義の解明や心不全の診断薬・治療薬としての臨床応用への展開に貢献してきた。今回、もうひとつのナトリウム利尿ペプチド系である CNP/GC-B 系の極めて強力な骨伸長促進作用を臨床応用するにあたり、これまでの豊富なペプチド研究の経験を生かして、本年度は生体内における CNP/GC-B 系評価に協力した。次年度以降は負荷試験等の臨床研究に必要な GMP レベルのペプチド製剤を供給する予定である。

**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、心不全に対する診断薬・治療薬としての臨床応用に成功してきた。更に平成 15 年度から 19 年度までの厚生労働科学研究にて、CNP/GC-B 系の極めて強力な骨伸長促進作用を発見して骨・軟骨・関節疾患における CNP/GC-B 系の意義を解明し、新規治療薬としての臨床応用を実現するトランスレショナルリサーチを開始した。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。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。骨系統疾患のうち、もっとも代表的な疾患であり、且つ疾患モデルマウスを用いた前臨床研究において CNP 治療有効性の POC が確立している軟骨無形成症に対する臨床試験はすでに計画されているが、本研究においては、その他の骨系統疾患に対する CNP 治療の適応症例を選定するための臨床研究である。

**B. 研究方法**

CNP/GC-B 系の状態評価（血中 CNP および

NT-proCNP、血中、尿中 cGMP 基礎値測定、および CNP 負荷試験による血中、尿中 cGMP 反応性の確認）をおこなって CNP 治療の有効性を予測し、CNP/GC-B 系遺伝子異常の有無とこれらの測定値を照会することによって CNP 有効性低身長症と CNP 抵抗性低身長症に分類・診断する。

**C. 研究結果**

京都大学における CNP/GC-B 系関連の基礎値の測定に協力した。RIA 法、EIA 法により測定した健康男性（24～44 才、n=10）における血中 CNP 濃度、血中 NT-proCNP（CNP の N 端プロペプチド）濃度、血中 cGMP（CNP の細胞内セカンドメッセンジャー）濃度は以下の結果となった。

血漿中 CNP 濃度  $0.75 \pm 0.05$  pg/ml (mean  $\pm$  S.E.)

血漿中 NT-proCNP 濃度  $1.95 \pm 0.14$  pmol/L (mean  $\pm$  S.E.)

血清中 cGMP 濃度  $2.44 \pm 0.16$  pmol/ml (mean  $\pm$  S.E.)

現在株式会社ペプチド研究所に GMP レベルの大量の CNP 作製を依頼しており、完成を待って CNP 負荷試験を開始する予定である。

**D. 考察**

CNP は主に局所因子として考えられており、そ



の血中濃度は ANP、BNP と比較して著しく低値である。今回新しい RIA 測定キット（米国 Phoenix 社製 CNP-22 Ultra-Sensitive RIA Kit）を用いることにより高感度の CNP 測定が可能となった。また、EIA 法により測定した血漿中 NT-proCNP 濃度および血清中 cGMP 濃度に関しても既報とほぼ同等の数値であった。

#### E. 結論

CNP/GC-B 系関連の各種正常基礎値について検討した。研究計画次年度以降、健常人に対する CNP 負荷試験をおこない、まず正常の反応パターンを確認する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 発表

##### 1. 論文発表

1. Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart. *Curr Cardiol Rev.* 5:45-51, 2009
2. Kangawa K. Challenge for novel peptide hormones: from discovery to therapeutic application. *Endocr J.* 56:1031-2, 2009
3. Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochem.* 10:30, 2009.
4. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J.* 56:1119-28, 2009
5. Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, Sata M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:1516-21, 2009

##### 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（難治性疾患克服研究事業）

平成21年度分担研究報告書

骨系統疾患における CNP 有効症例の確定に関する前臨床研究

研究分担者：八十田 明宏（京都大学大学院医学研究科 特定講師）

研究分担者は研究代表者らとともに平成 15～19 年度厚労科研費「骨・軟骨・関節疾患を標的とした CNP-GC-B system のトランスレーショナルリサーチ」（ヒトゲノム、再生医療等）を得、CNP が強力かつ特異的な骨伸長促進作用を有することを発見し（Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004）、さらに前臨床試験として、合成 CNP 投与が、骨伸長障害をきたす軟骨無形成症のモデルマウスの症状をほぼ完全に改善することを証明した（Yasoda et al., *Endocrinology* 2009）。軟骨無形成症を代表とする骨・軟骨疾患による低身長症は、様々な遺伝子変異に起因する稀少難病群であり、骨伸長障害による著明な低身長と四肢短縮をきたして生活面での長期間に及ぶ著しい支障をきたす。しかし、現在、同疾患群に対する有効な薬物治療は確立されておらず、極めて侵襲的な整形外科的治療法である骨延長術がおこなわれているのみである。CNP 治療はこれらの低身長症に対する革新的な薬物治療法として注目されているが、低身長症の一病型であるマロトー型遠位中間肢異形成症（acromesomelic dysplasia, type Maroteaux: AMDM）の原因が CNP の受容体である GC-B の遺伝子変異であることが報告され（Bartels et al., *Am. J. Hum. Genet.* 2004）、CNP 治療に対する有効症例把握の必要性が惹起された。分担研究者は軟骨無形成症以外の骨系統疾患における CNP 治療に対する有効性を、モデルマウスを用いた前臨床研究および疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析により評価した。

#### 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、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。現在 CNP の骨伸長促進作用の骨系統疾患に対する臨床展開が進行しており、当該研究はその適応疾患選定のための臨床研究であるが、分担研究者は、おもにその方法確立のための基礎研究に従事した。

## 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

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 (Kake et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009) を用いた解析をおこなった。

### 2. 骨系統疾患特異的 iPS 細胞を用いた CNP に対する反応性の検討

前段階として、正常ヒト iPS 細胞を用いた軟骨細胞への分化条件の検討をおこなった。

(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

### 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

CNP 治療の効果が最も顕著であると期待される骨系統疾患モデルとして、著明な骨伸長障害をきたす CNP ノックアウトマウスを用いて、SAP-CNP-Tg マウスとの交配実験による治療効果を検討した。その結果、骨伸長障害の改善のみならず、全身的な成長障害や死亡率の改善をきたすことを証明した (図 1、2)。

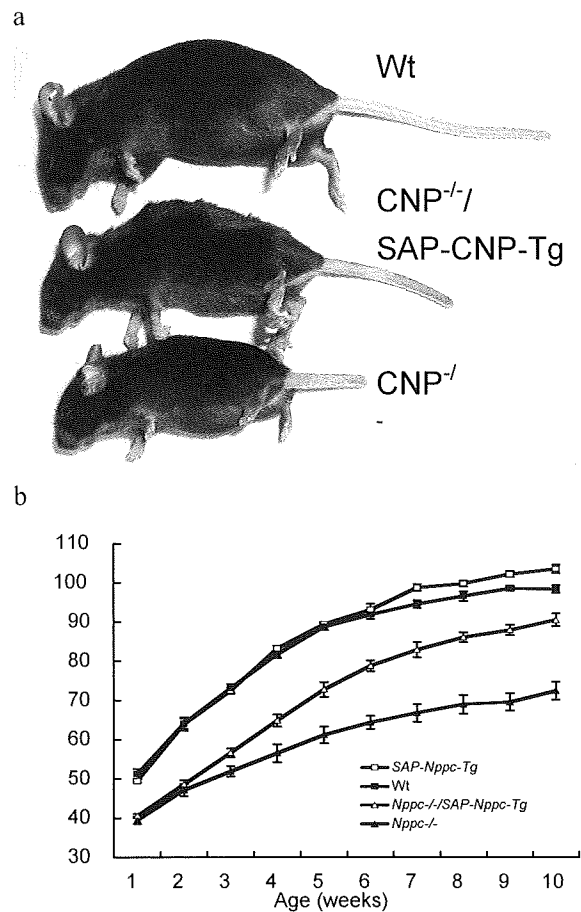


図 1. CNP ノックアウトマウス (CNP<sup>-/-</sup>) と SAP-CNP-Tg マウスとの交配により得られた CNP<sup>-/-</sup>/SAP-CNP-Tg マウスにおける骨伸長障害の改善。外観(a)および成長曲線(b)。

### 2. 骨系統疾患特異的 iPS 細胞を用いた CNP に対する反応性の検討

研究班員三浦らが正常ヒト iPS 細胞を用いた軟骨分化条件の検討をおこなった。DMEM/F-12、10% FBS、1x ITS<sup>+</sup>™Premix、1mM Sodium pyruvate、100nM Dexamethasone、170mM Ascorbic acid、100U/ml Penicillin、100mg/ml Streptomycin、10ng/ml rhTGFβ3 により培養期間2週間の pellet 培養で軟骨への分化がおこり、分化条件が確立した (図 2)。

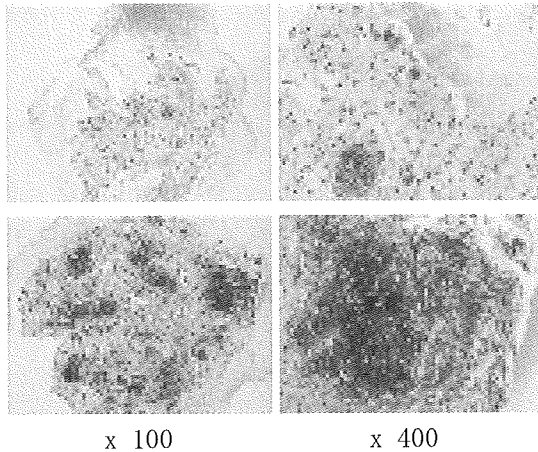


図 2. 軟骨への分化誘導をおこなった iPS 細胞。培養 2 週間後。Alcian Blue-HE 染色。

#### D. 考察

CNP ノックアウトマウスは、循環血中 CNP 濃度の上昇により骨伸長障害の改善効果をもっとも明確に期待される骨系統疾患のモデルマウスと考えられる。当該研究においてそのことが確認され、循環血中 CNP 濃度の上昇、すなわち CNP の全身投与が骨系統疾患に有効であることが示された。この結果を受けて、今後様々な疾患モデルマウスに対する血中 CNP 濃度上昇の効果を検討する予定である。

また、正常ヒト iPS 細胞からの軟骨への分化条件がほぼ確立したため、今後研究班員片岡（滋賀県立小児保健医療センター小児整形外科）より骨延長術時に骨系統疾患患者の皮膚細胞を入手して iPS 細胞を樹立し、軟骨細胞への分化誘導をおこなう。そして、正常ヒト iPS 細胞から誘導した軟骨細胞と分化・増殖能等形質の比較をおこなったうえで、CNP 添加の効果についての比較検討を開始する予定である。

#### E. 結論

前臨床研究として、軟骨無形成症以外の骨系統疾患モデルマウスを用いた CNP 治療の有効性の検討を開始した。また、今後疾患特異的 iPS 細胞の作製と CNP に対する反応性の検討をおこなう予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y, Jishage K, Yasoda A, Mukoyama M, Nakao K. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 297:E1339-48.
2. Nakao K, Yasoda A, Ebihara K, Hosoda K, Mukoyama M. Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases. *J Mol Med.* 2009, 87:1029-39.
3. Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, Miura M, Kanamoto N, Komatsu Y, Arai H, Nakao K. Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology.* 2009, 150:3138-44.

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

1. Akihiro Yasoda, et al. CNP Therapy, 14th International Congress of Endocrinology, 2010年3月30日、京都
2. Toshihito Fujii, Yasato Komatsu, Akihiro Yasoda, Eri Kondo, Go Yamada, Takuo Nambu, Masako Miura, Masakatsu Sone, Naotetsu Kanamoto, Naohisa Tamura, Hiroshi Arai, Kazuwa Nakao, Evaluation for the role of serum c-type natriuretic

peptide in endochondral ossification.  
14th International Congress of  
Endocrinology, 2010年3月30日、京  
都

3. Eri Kondo, Akihiro Yasoda, Toshihito Fujii, Takehito Tsuji, Go Yamada, Takuo Nambu, Misa Saijo, Masako Miura, Naotetsu Kanamoto, Masakatsu Sone, Naohisa Tamura, Hiroshi Arai, Kazuwa Nakao, CNP mutant Lbab mouse as a novel model for skeletal dysplasia. 14th International Congress of Endocrinology, 2010年3月29日、京都

#### 国内学会

1. 八十田明宏 他、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)/グアニル酸シクラーゼB(GC・B)系の骨伸長促進作用とそのトランスレーショナル研究、第83回日本内分泌学会学術総会、2010年3月26日、京都
2. 藤井 寿人、八十田 明宏、近藤 絵里、山田 豪、南部 拓央、西條 美佐、三浦 晶子、金本 巨哲、曾根 正勝、田村 尚久、荒井 宏司、中尾 一和、内軟骨性骨化におけるCNP/GC・B系とTGF $\beta$ /BMPファミリーのクロストーク、第83回日本内分泌学会学術総会、2010年3月26日、京都
3. 近藤 絵里、八十田 明宏、藤井 寿人、山田 豪、南部 拓央、西條 美佐、三浦 晶子、金本 巨哲、曾根 正勝、田村 尚久、荒井 宏司、中尾 一和、著明な高Ca血症で発症し部位同定に難渋した原発性副甲状腺機能亢進症の一例、第83回日本内分泌学会学術総会、2010年3月26日、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、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
Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y, Jishage K, Yasoda A, Mukoyama M, Nakao K.	Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice.	<i>Am J Physiol Endocrinol Metab.</i>	297	E1339-48	2009
Sawada N, Itoh H, Miyashita K, Tsujimoto H, Sone M, Yamahara K, Arany ZP, Hofmann F, Nakao K.	Cyclic GMP kinase and RhoA Ser188 phosphorylation integrate pro- and antifibrotic signals in blood vessels.	<i>Mol Cell Biol.</i>	29	6018-32	2009
Nakao K, Yasoda A, Ebihara K, Hosoda K, Mukoyama M.	Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases for common human diseases.	<i>J Mol Med.</i>	87	1029-39	2009
Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, Miura M, Kanamoto N, Komatsu Y, Arai H, Nakao K.	Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias.	<i>Endocrinology.</i>	150	3138-44	2009
Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda H, Hosoda K, Shimatsu A, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T.	A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance.	<i>Am J Physiol Endocrinol Metab.</i>	297	E802-11	2009
Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K.	p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts.	<i>Circ Res.</i>	105	746-54	2009

Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K.	T-type Ca <sup>2+</sup> channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure.	<i>Circulation.</i>	120	743-52	2009
Sonoyama T, Tamura N, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Taura D, Inuzuka M, Fukunaga Y, Sone M, Nakao K.	Inhibition of hepatic damage and liver fibrosis by brain natriuretic peptide.	<i>FEBS Lett.</i>	583	2067-70	2009
Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K.	Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells-brief report.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i>	29	1100-3	2009
Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Adachi Y, Nakanishi M, Kinoshita H, Horiuchi M, Murray M, Nakao K.	Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 2 receptor-mediated pro-hypertrophic signaling in the heart.	<i>Endocrinology</i>	150	3759-65	2009
Yasuno S, Usami S, Kuwahara K, Nakanishi M, Arai Y, Kinoshita H, Nakagawa Y, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Harada M, Nakao K.	Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol.</i>	296	H1804-10	2009

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
Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K.	Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart.	<i>Curr Cardiol Rev.</i>	5	45-51	2009
Kangawa K.	Challenge for novel peptide hormones: from discovery to therapeutic application.	<i>Endocr J.</i>	56	1031-2	2009
Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Kangawa K.	Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, <i>Dasyatis akajei</i> .	<i>BMC Biochem.</i>	10	30	2009

Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K.	Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study.	<i>Endocr J.</i>	56	1119-28	2009
Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, Sata M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K.	Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i>	29	1516-21	2009



## Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice

Takei Kake,<sup>1\*</sup> Hidetomo Kitamura,<sup>1\*</sup> Yuichiro Adachi,<sup>1</sup> Tetsuro Yoshioka,<sup>2</sup> Tomoyuki Watanabe,<sup>1</sup> Hiroaki Matsushita,<sup>1</sup> Toshihito Fujii,<sup>2</sup> Eri Kondo,<sup>2</sup> Takanori Tachibe,<sup>3</sup> Yosuke Kawase,<sup>3</sup> Kou-ichi Jishage,<sup>3</sup> Akihiro Yasoda,<sup>2</sup> Masashi Mukoyama,<sup>2</sup> and Kazuwa Nakao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Research Department I, Research Division, Chugai Pharmaceutical Company, Shizuoka; <sup>2</sup>Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto; and <sup>3</sup>Pharmacology and Pathology Research Center, Chugai Research Institute for Medical Science, Shizuoka, Japan

Submitted 30 April 2009; accepted in final form 27 September 2009

Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y, Jishage K, Yasoda A, Mukoyama M, Nakao K. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1339–E1348, 2009. First published October 6, 2009; doi:10.1152/ajpendo.00272.2009.—C-type natriuretic peptide (CNP) plays a critical role in endochondral ossification through guanylyl cyclase-B (GC-B), a natriuretic peptide receptor subtype. Cartilage-specific overexpression of CNP enhances skeletal growth and rescues the dwarfism in a transgenic achondroplasia model with constitutive active mutation of fibroblast growth factor receptor-3. For future clinical application, the efficacy of CNP administration on skeletal growth must be evaluated. Due to the high clearance of CNP, maintaining a high concentration is technically difficult. However, to model high blood CNP concentration, we established a liver-targeted CNP-overexpressing transgenic mouse (SAP-CNP tgm). SAP-CNP tgm exhibited skeletal overgrowth in proportion to the blood CNP concentration and revealed phenotypes of systemic stimulation of cartilage bones, including limbs, paws, costal bones, spine, and skull. Furthermore, in SAP-CNP tgm, the size of the foramen magnum, the insufficient formation of which results in cervico-medullary compression in achondroplasia, also showed significant increase. CNP primarily activates GC-B, but under high concentrations it cross-reacts with guanylyl cyclase-A (GC-A), a natriuretic peptide receptor subtype of atrial natriuretic peptides (ANP) and brain natriuretic peptides (BNP). Although activation of GC-A could alter cardiovascular homeostasis, leading to hypotension and heart weight reduction, the skeletal overgrowth phenotype in the line of SAP-CNP tgm with mild overexpression of CNP did not accompany decrease of systolic blood pressure or heart weight. These results suggest that CNP administration stimulates skeletal growth without adverse cardiovascular effect, and thus CNP could be a promising remedy targeting achondroplasia.

blood level elevation

THE SKELETON OF A VERTEBRATE is formed by two different processes of ossification, membranous and endochondral. Most of the craniofacial bones are developed through membranous ossification (desmocranium). On the other hand, endochondral ossification leads to the development of vertebrae, long bones, and base of skull (chondrocranium) by the sequential formation and degradation of cartilaginous structure growth plates. It has been reported that many factors are implicated in the regulation

of endochondral ossification, and mutations of these factors often cause skeletal dysplasias (10, 18, 35).

Achondroplasia is the most common form of human dwarfism, and it results from a constitutively active mutation in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3, which is a strong negative regulator of endochondral ossification via suppression of proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes (1, 32). Currently, distraction osteogenesis, an orthopedic procedure, is applied to limbs of achondroplasia patients. The procedure improves height, but it does not recover any of the other symptoms related to achondroplasia, such as midface deficiency, short fingers, spinal stenosis, and cervico-medullary compression (CMC) (1, 6). Moreover, this procedure imposes heavy burdens on the patient, such as having to wear an external fixator, or complications, including microbial infections (34). Growth hormone treatment seems to have only modest short-term success and lacks long-term benefits. Furthermore, the treatment may cause growth hormone-related metabolic adverse effects by affecting lipid profiles and muscle mass (14).

The natriuretic peptide family consists of three structurally related peptides: atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP). The biological actions of the natriuretic peptides are mediated by two types of membrane-bound receptors, guanylyl cyclase-A (GC-A) for ANP and BNP and guanylyl cyclase-B (GC-B) for CNP (17, 22, 24, 30). These receptors are linked to the cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling cascade. ANP and BNP are produced mainly in the atrium and ventricle, respectively, and are thought to be implicated in cardiovascular homeostasis through GC-A. On the other hand, CNP is produced in a wide variety of tissues, where it acts locally as an autocrine/paracrine factor through GC-B. It has been reported that the CNP/GC-B system is involved in endochondral ossification. Inactivation of the CNP/GC-B pathway in mice by depletion of CNP (5), GC-B (29), or cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase II (21), a downstream mediator of the CNP/GC-B system, results in dwarfism caused by impaired endochondral ossification. By contrast, activation of GC-B in transgenic mice with highly elevated blood BNP concentrations (26) or in mice with depletion of the clearance receptor for natriuretic peptides (13) leads to skeletal overgrowth. In humans, loss-of-function mutations in GC-B cause autosomal recessive skeletal dysplasia, acromesomelic dysplasia, type Maroteaux (2). These results strongly suggest that GC-B activation is one of the major positive regulators of endochondral ossification.

\* T. Kake and H. Kitamura contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: H. Kitamura, Project Management Dept., Portfolio Management Unit, Chugai Pharmaceutical, 1-1 Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8324, Japan.

Local overexpression of CNP in chondrocytes stimulated endochondral ossification and rescued the dwarfism of the achondroplasia model mouse with mutated constitutive active fibroblast growth factor receptor-3 (33). These results provide a scientific rationale for the clinical application of CNP for achondroplasia. In contrast to ANP and BNP, CNP is currently thought to be a local regulator and to exert its biological actions in an autocrine/paracrine manner (7, 27). Therefore, any endocrine-like effect of CNP on endochondral bone growth must be examined before clinical application. It has been reported that CNP is rapidly metabolized by neutral endopeptidase (NEP) and cleared by a clearance receptor (4) and has a very short half-life (2.6 min) in humans (9). These suggest a low bioavailability and will hamper examination of the effects of CNP administration on endochondral ossification. Additionally, CNP primarily activates GC-B, but it could cross-react with GC-A at high concentrations (27). Excess activation of GC-A could cause hypotension and heart weight reduction (25). Therefore, we must also examine whether stimulation of endochondral ossification due to chronically elevated plasma CNP levels can occur independently from cardiovascular effects.

To examine these issues, we generated transgenic mice with chronically elevated plasma CNP levels from liver-specific CNP overexpression, using a human serum amyloid P (SAP) promoter [SAP-CNP transgenic mice (tgm)] (36). Here, we report the phenotypes of SAP-CNP tgm, which show stimulation of endochondral ossification without apparent cardiovascular effects due to CNP overexpression in liver.

## MATERIALS AND METHODS

**Generation of CNP transgenic mice.** A transgene was designed to express CNP specifically in the liver under control of the human SAP component promoter (36). The coding sequence fragment of mouse CNP was inserted into the blunt-ended *EcoRI* sites of the pSG2 vector, which resulted in the SAP-CNP fusion gene. The *HindIII-XbaI* fragment of the SAP-CNP fusion gene was purified and microinjected into the pronucleus of C57BL/6J embryos using standard techniques. Founders were identified by Southern blot analysis and mated with C57 BL/6J mice (CLEA Japan, Tokyo, Japan) to establish lines. We established two lines of transgenic mice, lines 17 and 40, with similar skeletal phenotypes, and these phenotypes were milder in line 17 than in line 40. The heterozygosity of the transgenic mice was maintained. Animals were housed at 22–26°C in a 12:12-h light-dark cycle with access to standard rodent chow CE-2 (CLEA Japan) and tap water ad libitum. After animals reached 3 wk of age, body weight and body length as the naso-anal length were measured every week. The Institutional Animal Care and Use Committee of Chugai Pharmaceutical reviewed the protocols and confirmed that the animals used in this study were cared for and used under the Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals promulgated by Chugai Pharmaceutical.

**Analysis of transgene expression.** The transgene expression in cartilage, muscle, kidney, heart, lung, brain, intestine, and liver was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was prepared from mouse tissues using Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan), and cDNA was synthesized with ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan). PCR was performed using *Taq* polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan). All procedures were carried out according to the manufacturers' instructions. To detect the transgene expression distinguished specifically from endogenous CNP expression, the untranslated sequence of pSG2 vector and the mouse CNP cDNA sequence were used as the forward primer and reverse

primer, respectively (forward: 5'-GCTGGTTGTTGTGCTGTCTC-3'; reverse: 5'-CCGATCCGGTCCAGCTTGAG-3'; product, 427 bp).

Internal control RT-PCR was performed with  $\beta$ -actin (forward: 5'-GCCATGGATGACGATATCGCT-3'; reverse: 5'-CGCCTAGAAGCACTTGCGGTG-3'; product, 1,134 bp).

**Measurement of blood CNP concentration.** Blood CNP concentration was measured using RIA kits (CNP-22 RIA and CNP-22 ultrasensitive RIA kits; Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA) according to the manufacturer's instructions. For the RIA assays, blood withdrawal tubes contained 1 mg of EDTA-4Na (Junsei Chemical, Tokyo, Japan) for 1 ml of blood and were stored on ice immediately. Aprotinin was added (0.6 TIU/ml; Sigma, St. Louis, MO) and mixed to inhibit proteinase activity. Plasma was separated by centrifugation (3,000 rpm, 4°C, 20 min) and stored at -80°C until use. CNP extraction was carried out according to the manufacturer's recommendation using C18 sep-column (Nihon Waters, Tokyo, Japan), 1% trifluoroacetic acid (Wako Pure Chemical industries, Osaka, Japan), and 60% acetonitrile (Junsei Chemical) in 1% trifluoroacetic acid.

**Quantitative real-time RT-PCR.** The expression of natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) mRNA in heart and costal cartilage was analyzed by quantitative real-time PCR. Heart and costal cartilage (including growth plate) were quickly removed from wild-type littermates and transgenic mice of SAP-CNP tgm line 17 (8–10 wk old, male;  $n = 4$  each) and quickly frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using Isogen (Nippon Gene) and then purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan).

TaqMan Gene Expression Assays for NPR-C (cat. no. Mm00435329\_m1) and GAPDH (Mm99999915\_g1) were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA). The expression levels of each mRNA were quantified in duplicate using Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System according to the manufacturer's protocol. The arbitrary value for NPR-C was normalized to that of GAPDH, and then relative values from costal cartilage of wild-type littermates were calculated.

**Radiography.** To examine the morphological skeletal phenotypes of SAP-CNP tgm, radiography was carried out using a  $\mu$ FX-1000 system (25 kV, 80 mA, 6 s; Fujifilm, Tokyo, Japan). Image analysis was performed by an imaging analyzer (BAS-5000; Fujifilm).

**Bone mineral density.** Bone mineral density of femur and lumbar spine (L<sub>2-4</sub>) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DCS-600EX; Aloka, Tokyo, Japan).

**Proteoglycan synthesis in growth plates.** Proteoglycan synthesis in growth plates were assessed using ex vivo cultures of costal growth plates by measuring the incorporation of [<sup>35</sup>S]sulfate, as described previously (33). In brief, the costal growth plates were isolated from the third, fourth, and fifth ribs of 5-wk-old mice. Under a microscope, soft tissues were carefully removed from the ribs, and the growth plates were separated from the costal bones. Subsequently, the growth plates were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, South Logan, UT), antibiotics (Invitrogen Japan), and 1.1 MBq/ml [<sup>35</sup>S]sulfate (PerkinElmer Japan, Yokohama, Japan) at 37°C for 3 h. The growth plates were then rinsed three times with PBS solution and digested with papain (Sigma) at 60°C for 16 h. The digested sample was added to the precipitation solution for glycosaminoglycans [0.3% cetylpyridinium chloride (Sigma), 3  $\mu$ g/ml chondroitin sulfate C (Wako Pure Chemical Industries), 0.7 mmol/l MgSO<sub>4</sub> (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 70 mmol/l Tris-HCl (pH 7.8; Sigma), 1.5 mmol/l CaCl<sub>2</sub> (Nacalai Tesque)]. The precipitate was captured on a glass filter (Advantec, Tokyo, Japan) and washed three times with 1% cetylpyridinium chloride in 20 mmol/l NaCl (Wako Pure Chemical Industries). The radioactivity of the precipitate was measured by a liquid scintillation analyzer (Packard TR-2700; PerkinElmer, Wellesley, MA). Bone morphometry was performed using a caliper (Mitutoyo, Tokyo, Japan).

**Histological analysis.** The hindlimbs were fixed in 20% formalin neutral buffered solution (pH 7.4; Wako Pure Chemical Industries)

and decalcified in 20% EDTA (pH 7.4; Junsei Chemical). Decalcified tissues were embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan). To detect sulfated proteoglycans, safranin O (Merck, Darmstadt, Germany) staining was carried out using standard procedures.

For immunohistochemistry, sections were stained using the following antibodies. Primary antibodies included rabbit anti-type II collagen antibody (LSL, Tokyo, Japan), rabbit anti-type X collagen antibody (LSL), goat anti-Runx2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), goat anti-parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor (PTH1R; Santa Cruz Biotechnology), goat anti-Ihh (Indian hedgehog; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit anti-PCNA antibody (Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies included biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) and biotinylated anti-goat IgG (Vector Laboratories). Immunoreaction signals were detected using a Dako LSAB2 kit (Dako, Copenhagen, Denmark). To confirm antibody specificity, rabbit preimmune serum (LSL), rabbit preimmune IgG fraction (Santa Cruz Biotechnology), or preimmune goat IgG fraction (Vector Laboratories) was used as the first antibody negative control.

Morphometric analyses were performed using software (IPAP; Sumika Technoservice, Hyogo, Japan) connected to a light microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The thickness of resting, proliferating, and hypertrophic layers of the tibial growth plate was calculated as the mean thickness of five different  $\times 10$  objective lens fields in the H & E-stained specimens. Total thickness of growth plate was calculated as the sum of the three zones above. The cellularity of chondrocytes in the tibial growth plate was calculated as the mean chondrocyte number/field in five different  $\times 10$  objective lens fields of the H & E-stained specimens. The proportion of proliferating chondrocytes was calculated as the frequency of PCNA-positive cells using the following formula: PCNA positive cell percentile (%) = PCNA-positive cell no./200 chondrocytes  $\times 100$ .

**Measurement of systolic blood pressure.** Systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious animals using the tail-cuff method (BP-98A; Softron, Tokyo, Japan).

**Heart weight.** Under anesthesia by inhalation of 3% isoflurane, mice were euthanized by exsanguination from the ventral vein. The heart was excised and weighed using an electric balance (EB-50; Shimadzu, Kyoto, Japan). Relative heart weight was calculated by the following formula: relative heart weight (%) = heart weight (g)/body weight (g)  $\times 100$ .

**Statistical analysis.** The statistical significance was determined by Student's *t*-test using SAS statistical software (SAS Institute, Tokyo, Japan). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant vs. control ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

## RESULTS

**Generation of SAP-CNP tgm.** To examine the effect of elevated blood CNP concentration on endochondral ossification, we generated the SAP-CNP tgm, a model with liver-specific CNP overexpressed under the control of a liver-specific SAP promoter (Fig. 1A). We obtained two lines of SAP-CNP tgm, lines 17 and 40 (Fig. 1B).

**Blood CNP levels.** We measured plasma CNP concentrations using two RIA kits with different sensitivities to CNP (standard: CNP-22, linear range of 10–80 pg/ml; ultrasensitive: CNP-22, linear range of 2.5–40 pg/ml). In line 40, the blood CNP level in the wild type ( $n = 5$ ) was very low, less than the detection limit (10 pg/ml) of the standard RIA kit. In contrast, the blood CNP level in SAP-CNP tgm was very high at  $23.7 \pm 15.8$  ng/ml (means  $\pm$  SD;  $n = 4$ ). SAP-CNP tgm had blood CNP levels  $\geq 2,300$  times higher than wild-type littermates. The retrieval rate of CNP-22 in column C18 was 83%.

In contrast, in line 17, differences in blood CNP levels of SAP-CNP tgm and wild-type littermates were not detected by the standard RIA kit. Therefore, we used the ultrasensitive CNP RIA kit to analyze line 17. The transgene of SAP-CNP tgm contains the cDNA sequence of mouse prepro-CNP, and presumably, various molecular forms of CNP, including CNP-53 and CNP-22, are expressed in SAP-CNP tgm. With this in mind, we investigated the sensitivity of the ultrasensitive RIA kit to CNP-22 and CNP-53 prior to analysis of the blood CNP levels in SAP-CNP tgm line 17. The sensitivity of the ultrasensitive RIA kit to CNP-53 was approximately one-third that of CNP-22 (data not shown), indicating that both CNP-22 and CNP-53 can be detected by this RIA kit with different sensitivities to respective CNP molecular forms. The retrieval rate in column C18 was 93% for CNP-22 and 83% for CNP-53 with the ultrasensitive RIA kit. In this assay system, SAP-CNP tgm revealed an 84% higher blood CNP level ( $7.5 \pm$

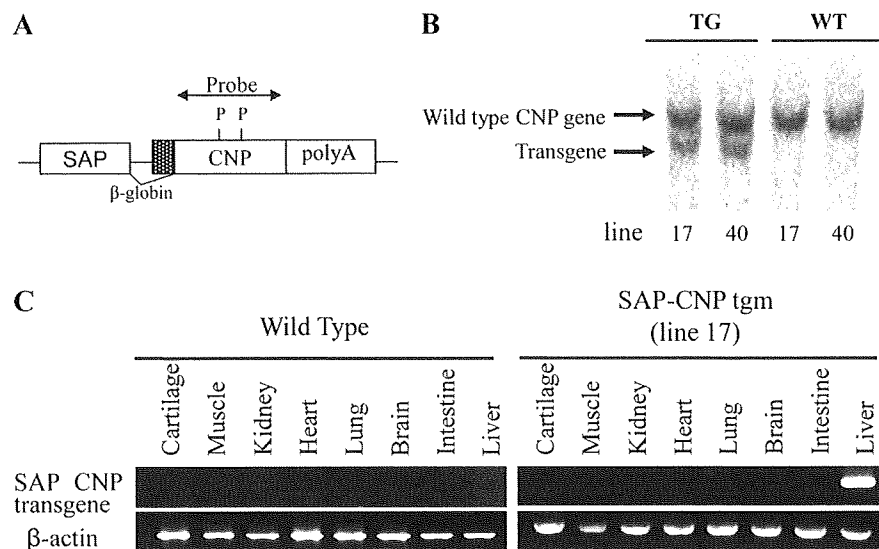


Fig. 1. Generation of serum amyloid P-C-type natriuretic peptide transgenic mouse (SAP-CNP tgm). A: schematic representation of the SAP-CNP transgene. P, *PvuII*. B: Southern blot analysis of the transgene. TG, SAP-CNP transgenic mouse; WT, wild-type littermate. Tail genomic DNA (15  $\mu$ g) was digested with *PvuII* (200 U). Transgene (2.0 kbp) was detected only in TG, whereas the band for wild-type allele (2.4 kbp) was detected both in WT and TG. C: expression of the transgene. Expression of the transgene was examined in cartilage, muscle, kidney, heart, lung, brain, small intestine, and liver by RT-PCR. Only liver expressed the transgene mRNA.

2.5 pg/ml, means  $\pm$  SD;  $n = 8$ ,  $P = 0.002$ ) than that of the wild-type littermate ( $4.1 \pm 0.5$  pg/ml, means  $\pm$  SD;  $n = 8$ ). Taken together, these results demonstrated that SAP-CNP tgm line 40 is an extremely overexpressing line and line 17 is a mildly overexpressing line.

**Cardiovascular phenotypes of SAP-CNP tgm.** SAP-CNP tgm line 17 showed no significant difference in SBP levels compared with wild-type littermates. On the other hand, the SBP in line 40 with highly elevated blood CNP concentrations was significantly lower ( $\sim 23\%$ ) than that of wild-type littermates (Table 1). Heart weight measurements for line 17 were not different from those of wild-type littermates. In contrast, line 40 revealed a significant decrease in heart weight compared with wild-type littermates (Table 2).

**Expression of the transgene.** Because the skeletal overgrowth in SAP-CNP tgm line 17 was not accompanied with cardiovascular alterations, we hypothesized that line 17 could be a suitable model to examine the effects of CNP on skeletal system in an endocrine manner. We examined the transgene expression in various organs (liver, skeletal muscle, kidney, heart, lung, brain, small intestine, and costal cartilage) in line 17 using RT-PCR. Liver-specific expression of the transgene was observed in SAP-CNP tgm but not in wild-type littermates (Fig. 1C). This demonstrated that SAP-CNP tgm line 17 is a suitable model for the elucidation of the effect of chronically elevated plasma CNP levels in mouse concerning effects other than that related to the cardiovascular system. Therefore, we examined the phenotypes of SAP-CNP tgm line 17.

**Expression of NPR-C in heart and costal cartilage.** To estimate local availability of CNP in heart and cartilage in SAP-CNP tgm line 17, mRNA expression of NPR-C clearance receptor was compared between wild-type littermates and transgenic mice by real-time PCR. As a result, an  $\sim 53\%$  increase in NPR-C mRNA expression was observed in the heart of transgenic mouse. In contrast, a 42% decrease of NPR-C mRNA expression was observed in costal cartilage of transgenic mouse (Fig. 2).

**Growth of SAP-CNP tgm.** SAP-CNP tgm exhibited systemic elongation of cartilage bones such as limb, paw, and spine (Fig. 3A). During postweaning development, increased body length was observed in proportion to plasma CNP level in both lines 17 and 40. In line 17, elongation of the body was apparent at 5 wk of age. In line 40, skeletal overgrowth was first detected at 3 wk of age (Fig. 3B). Transgenic mice in both lines became progressively hump-backed due to excessively elongated spines. This phenotype was revealed more apparently in line 40 than in line 17. There was no significant difference in body

Table 1. SBPs in SAP-CNP tgm

	Age, wk	No. of Mice	SBP, mmHg
Wild type	11	6	104.7 $\pm$ 2.0
SAP-CNP tgm line 17	11	6	107.2 $\pm$ 2.0
Wild type	7	4	106.3 $\pm$ 1.4
SAP-CNP tgm line 40	7	4	81.9 $\pm$ 5.0*

Values are means  $\pm$  SE. SBP, systolic blood pressure; SAP-CNP tgm, serum amyloid P-C-type natriuretic peptide transgenic mice. SAP-CNP tgm line 40 revealed 23% lower SBP than that of wild-type littermates, but line 17 did not. SBP was measured in conscious animals. \* $P < 0.01$  vs. wild-type littermate; Student's *t*-test.

Table 2. HW in SAP-CNP tgm

	HW, mg	BW, g	HW/BW, mg/g
Wild type	123.6 $\pm$ 6.6	26.0 $\pm$ 0.6	4.74 $\pm$ 0.16
Line 17	126.2 $\pm$ 3.5	27.2 $\pm$ 0.6	4.64 $\pm$ 0.14
Wild type	131.7 $\pm$ 7.6	26.4 $\pm$ 0.5	4.99 $\pm$ 0.24
Line 40	87.1 $\pm$ 4.4*	23.0 $\pm$ 1.6	3.84 $\pm$ 0.24*

Values are means  $\pm$  SE;  $n = 7$ , mice are 10 wk old. HW, heart weight; BW, body weight. SBP, SAP-CNP tgm line 40 revealed absolute and relative HW to be 34 and 22% lower, respectively, than wild-type littermates. SAP-CNP tgm line 17 did not exhibit lower HWs. \* $P < 0.01$  vs. wild-type littermates; Student's *t*-test.

weights at any age among the SAP-CNP tgm line 17, line 40, and wild-type littermates (Fig. 3C).

**Skeletal phenotypes of SAP-CNP tgm.** We examined the skeletal phenotypes of SAP-CNP tgm line 17 in detail. Radiographs showed systemic elongation of cartilage bones (humerus, femur, tibia, paw, spine, and skull) in line 17 compared with those in wild-type littermates (Fig. 4). No gross skeletal defects were observed in SAP-CNP tgm line 17 (Fig. 4A).

At the age of 10 wk, the lengths of the lumbar (L<sub>2-4</sub>) and femur in SAP-CNP tgm line 17 were 6 and 13% larger, respectively, than that of wild-type littermates (Fig. 5, A and B). Skull growth was also stimulated in SAP-CNP tgm (lengths are given in Fig. 5C; widths were wild type:  $12.2 \pm 0.3$  mm, and SAP-CNP tgm:  $12.7 \pm 0.3$  mm,  $P < 0.01$ ). Width of the foramen magnum in SAP-CNP tgm was significantly dilated (Fig. 5D).

Bone mineral density was measured in the femur and lumbar spine (L<sub>2-4</sub>) in males and females in line 17 at 9 wk of age. Although both femur (wild type:  $28.9 \pm 0.7$  mg/cm<sup>2</sup>, SAP-CNP tgm:  $25.6 \pm 0.6$  mg/cm<sup>2</sup>, means  $\pm$  SD;  $n = 7$ , female) and spine (wild type:  $29.0 \pm 1.1$  mg/cm<sup>2</sup>, SAP-CNP tgm:  $26.3 \pm 0.6$  mg/cm<sup>2</sup>, means  $\pm$  SD;  $n = 7$ , female) bone mineral

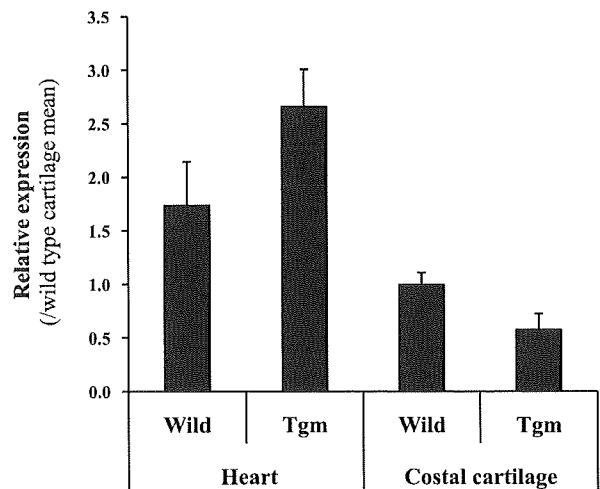


Fig. 2. Expression of natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) mRNA in heart and costal cartilage in SAP-CNP tgm line 17. Relative NPR-C mRNA expression was standardized with GAPDH mRNA expression in individual samples. The mean values in each organ were standardized with the mean value of costal cartilage in the wild-type (wild) littermates. In heart, transgenic mice (tgm) showed 53% increased expression of NPR-C mRNA compared with that of wild littermates. In contrast, tgm showed 42% decreased expression in costal cartilage. Means  $\pm$  SE;  $n = 4$ .