

201024246A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

骨系統疾患における新規 CNP 治療に対する
有効症例鑑別診断法の確立に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 骨系統疾患における新規 CNP 治療に対する有効症例鑑別診断法の確立 …… 1
に関する研究
中尾 一和

II. 分担研究報告書

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
伊藤 達也

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 …… 13

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22年度総括研究報告書

骨系統疾患における新規 CNP 治療に対する
有効症例鑑別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・軟骨の成長障害をきたす先天性疾患の総称であり、著明な低身長や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）、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劇的な治療効果を示すことを証明した（*Nat. Med.* 2004）。今後、軟骨無形成症に対する CNP の臨床応用が期待されるとともに、軟骨無形成症以外の骨系統疾患に対する展開研究が期待されるが、その有効性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、約400種類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展開研究である。

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 講師）

伊藤 達也

（京都大学大学院医学研究科 助教）

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り、ほとんどが単一遺伝子変異に起因する稀少難病群である。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が、現在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・軟骨疾患による骨系統疾患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、骨系統疾患に対する 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、最近骨系統疾患の一病型であるマロト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 治療抵抗性骨系統疾患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、約400種類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展開研究である。

B. 研究方法

前臨床研究として、CNP/GC-B 系の骨伸長促進作

用、すなわち、内軟骨性骨化に対する作用を、骨／軟骨特異的 CNP/GC-B ノックアウトマウスの作製と解析をとおしてより詳細に検討した。また、その展開研究として、さまざまな骨系統疾患モデルマウスに対する CNP の作用を解析し、治療的効果を検討した。さらに、骨系統疾患患者における CNP 治療の反応性を直接検討するための系として、患者由来 iPS 細胞からの培養軟骨細胞の樹立を目指し、iPS 細胞から軟骨細胞への分化系の確立をおこなった。臨床研究としては CNP 治療の有効性を予測するための CNP/GC-B 系の評価(血中 CNP および NT-proCNP 値)、および、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)) の確立を試みた。

(1) 骨／軟骨特異的 CNP/GC-B ノックアウトマウスの作製と解析

CNP/GC-B 系の骨・軟骨組織における意義をさらに詳細に検討するために、骨あるいは軟骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスを作製し、その表現型を成長曲線、軟 X 線による各骨の長さの計測、成長板軟骨の組織学的解析、さらに μ CT を用いた骨量の解析等により検討した。

(2) 骨系統疾患の原因分子と CNP/GC-B 系の相互作用の検討

これまでに骨系統疾患の原因として、BMP 系 (BMP1 型受容体、GDF5 等)、SOX9、PTHrP 受容体等内軟骨性骨化に重要な因子の遺伝子変異が報告されている。今回、GDF5 変異マウスの長管骨器官培養を用いて BMP 系と CNP/GC-B 系の相互作用を検討し、CNP 治療の有効性の分子機構を検討した。また、CNP 投与モデルとしての血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスと骨系統疾患モデルマウスの交配実験をおこない、骨・軟骨組織における効果を解析した。

(3) 骨系統疾患特異的 iPS 細胞の樹立

骨系統疾患は単一遺伝子変異が原因である多くの疾患を含むが、同定された原因遺伝子に基づいた遺伝子変異モデルマウスを用いた CNP 治療有

効性の検討とは別に、骨系統疾患患者に対する CNP の有効性を直接検討する方法として、患者特異的 iPS 細胞を樹立して軟骨細胞へ分化させ、CNP に対する反応性を検討する評価系の確立をおこなった。今回、正常ヒトから樹立された iPS 細胞を用いて、軟骨細胞への分化条件を検討した。

(4) 骨系統疾患に対する CNP 有効症例診断のための臨床研究

骨系統疾患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、我々は 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。また、CNP/GC-B 系の遺伝子変異による骨系統疾患としては、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。本研究では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 抵抗性の骨系統疾患であると判断されるが、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。

さらに、臨床診断あるいは原因遺伝子が同定されていない骨系統疾患に対しては、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 (CNP、cGKII 等) の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 (血中 CNP 濃度、血中・尿中 cGMP 濃度等) 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ともに、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、cGKII 異常症は CNP 抵抗性であることが予想される。また、AMDM

とは異なる臨床病型が存在する可能性もあるため、GC-B 遺伝子変異の有無も検討する。

(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

(1) 骨/軟骨特異的 CNP/GC-B ノックアウトマウスの作製と解析

組織特異的遺伝子欠損を可能とする Cre-loxP システムを用いて骨/軟骨特異的 CNP/GC-B 欠損マウスを作製した。すなわち、それぞれ骨/軟骨特異的プロモーターである I 型コラーゲン/II 型コラーゲンプロモーターを用いた Cre マウス (col1a1-Cre/col2a1-Cre) を CNP あるいは GC-B flox マウスと交配させることによって骨あるいは軟骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウス (合計 4 種類) を作製した。

まず、col2a1-Cre プロモーターを用いた軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスに関しては、四肢長管骨・椎骨の伸長障害を伴う低身長を認め、その程度は完全ノックアウトマウスとほぼ同程度であった (10 週齢における身長の野生型比: 軟骨特異的ノックアウトマウス約 79%、完全ノックアウトマウス約 76%)。また、組織学的解析においても、軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスにおいて完全ノックアウトマウスと同様に長管骨成長板軟骨の狭小化が認められた。軟骨特異的 GC-B ノックアウトマウスの四肢長管骨・椎骨長、身長についても同様の傾向が認められており、現在結果につき解析中である。さらに、col1a1-Cre プロモーターを用いた骨特異的 CNP あるいは

GC-B ノックアウトマウスについても、 μ CT を用いた骨量の測定を中心としたデータの解析を現在おこなっている。

(2) 骨系統疾患の原因分子と CNP/GC-B 系の相互作用の検討

まず、内軟骨性骨化により形成される骨の伸長を *ex vivo* にて解析することを可能とするマウス胎仔脛骨器官培養において、GDF5 変異マウス由来培養脛骨に対する CNP の効果を検討した。胎生後期において、GDF5 変異マウス由来培養脛骨長は野生型マウス培養脛骨長と比較して差を認めず、さらに CNP 投与により GDF5 変異マウス由来培養脛骨は野生型マウス培養脛骨と同等に伸長が促進された。組織学的解析においても、CNP 添加によって GDF5 変異マウス培養脛骨成長板軟骨は野生型マウス培養脛骨成長板軟骨と同様にその伸長が促進した。現在、CNP 投与モデルとしての血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスと GDF5 変異マウスとの交配実験をおこない、CNP の *in vivo* における GDF5 変異マウスの骨伸長障害に対する効果を解析している。

(3) ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導法の確立

iPS 細胞は ES 細胞に類似していることから、iPS 細胞を用いた分化誘導は ES 細胞で使われている方法を流用していることが多い。また、ES 細胞を用いた軟骨細胞への分化誘導は間葉系幹細胞 (MSC) で報告された方法を基礎にしている。そこで、MSC や ES 細胞で報告されている軟骨細胞誘導法を基に iPS 細胞、ES 細胞を用いて検討を行った。その結果、alcian blue 染色で染色され、RT-PCR により軟骨分化マーカーである Sox9、2 型コラーゲン、アグリカンの発現を認める軟骨細胞への分化が確認された。さらに現在 2 型コラーゲン等のタンパクレベルでの発現の解析をおこなっている。

(4) 骨系統疾患に対する CNP 有効症例診断のための臨床研究

治療有効性判定のために必要な CNP/GC-B 系関連の基礎値の測定をおこなった。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 法にて測定したところ、以下のようになった。

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

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

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

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。

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 (2010 年国際分類) で 40 グループ・400 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。今回おこなった前臨床研究では、GDF5 変異による骨系統疾患に対して、CNP 治療が有効である可能性が示唆された。ところで 2004 年米国の Warman らは 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) を報告しており (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ている。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おこなう臨床研究を遂行している。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. 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.
2. Yasoda A, Nakao K. Genetic basis for skeletal disease. CNP therapy for achondroplasia. *Clin Calcium.* 20:1212-8, 2010.
 3. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, Kanamoto N, Miura M, Tamura N, Arai H, Mukoyama M, Nakao K. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology.* 151:4381-8, 2010.
 4. Yasoda A, Nakao K Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. *Endocr J.* 57:659-66, 2010.

2. 学会発表

国際学会

1. Kazuwa Nakao, Translational Research in Cardiovascular Endocrinology and Metabolism(CVEM) – Breakthroughs for common human diseases using excellent animal models and rare human diseases-, International Symposium CVEM2010, Apr.1, 2010, Nara, Japan
2. Kazuwa Nakao, Translational Research and Animal Disease Models, XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat, Nov.30, Kyoto, Japan
3. Kazuwa Nakao, Translational Research of Novel Hormones, International Symposium Frontiers in Biologically Active Peptide Research, Dec 7, Kyoto, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1. 特願 2004-107871
GC-B (guanyryl cyclase B)を活性化する分子を用いた身長増加用組成物
2. 特願 2004-107924
GC-B (guanyryl cyclase B)を活性化する分子を用いた変形性関節症および関節炎症治療剤または予防剤
3. 特願 2004-25631
内皮細胞分化増殖方法
4. 特願 2004-184138
霊長類動物胚性幹細胞から発生初期血管内皮細胞の製造方法及びその細胞の使用
5. 特願 2002-248232
NRSE及びNRSFの利用法
6. 特願 2001-310322
軟骨無形成症治療剤
7. 特願 2001-301586
軟骨無形成症治療剤
8. 特許 3267893
自己免疫疾患の診断薬
9. 特許 3343866
ハムスター脳のナトリウム利尿ペプチド
10. 特許 2036732
 α -h ANP を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ

2. 実用新案登録

なし

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。

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、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ー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 治療有効性が確立している軟骨無形成症に対する臨床治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を計画している。

B. 研究方法

CNP/GC-B 系の状態評価（血中 CNP および NT-proCNP、血中 cGMP 値測定）をおこなって CNP 治療をおこなう際の基礎値とする。さらに、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 ± 0.05 pg/ml (mean \pm S.E.)

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

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

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 系関連の正常基礎値について検討した。今後骨系統疾患患者におけるこれらの基礎値を測定し、CNP/GC-B 系遺伝子そのもの、あるいは骨系統疾患の原因となる重要な内軟骨性骨化調節因子の遺伝子の変異における変化を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

1. 論文発表

1. Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Kanamoto N, Bando M, Kohno K, Sato T, Kojima M, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T, A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone in male mice but does not affect somatic growth. *Endocrinology*, 151:1743-50, 2010.
2. Iwakura H, Li Y, Ariyasu H, Hosoda H, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T, Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. *Endocrinology*, 151:2940-5, 2010.
3. Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Nakao K, Kangawa K. Generation of transgenic mice overexpressing a ghrelin analog. *Endocrinology*, 151:5935-40, 2010.
4. Kishimoto I, Tokudome T, Nakao K, Kangawa K, Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models. *FEBS J*.

278:1830-41, 2011.

5. Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T, Oxytocin and Dopamine Stimulate Ghrelin Secretion by the Ghrelin-Producing Cell Line, MGN3-1 in Vitro. *Endocrinology*. 2011, Epub ahead of print.

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

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 講師）

研究分担者：伊藤 達也（京都大学大学院医学研究科 助教）

研究分担者（八十田）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系統疾患はそのほとんどが単一遺伝子病であり、様々な遺伝子変異に起因する稀少難病群であるが、その中で骨伸長障害による著明な低身長や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疾患も多く存在する。しかしながら現在、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 治療はこれらの疾患群に対する革新的な薬物治療法として注目されているが、CNP 治療抵抗性が予想される受容体 GC-B の遺伝子変異による骨系統疾患（マロトー型遠位中間肢異形成症（acromesomelic dysplasia, type Maroteaux: AMDM））も発見され、CNP 治療に対する有効症例把握の必要性も惹起されている。分担研究者らは、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検討するために、個々の疾患のモデルマウスを用いた *in vivo* 研究、および疾患（患者）特異的 iPS 細胞を用いた解析系の確立をおこなった。

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、分担研究者らは、1) 原因遺伝子が同定された疾患のモデルマウスを用いた CNP 治療有効性検討のための前臨床研究、および2) 疾患、あるいは、患者特異的 iPS 細胞を用いた CNP

治療有効性検討法を確立するために、ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導法の確立をおこなった。

B. 研究方法

1. 骨系統疾患モデルマウスに対するCNPの効果、*ex vivo*にて直接骨伸長が観察できる長管骨の器官培養を用いておこなった。さらにCNP投与モデルとして、循環血中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) を用いて疾患モデルマウスとの交配実験をおこない、CNP治療の効果を解析した。
2. 骨系統疾患患者特異的iPS細胞を用いたCNPに対する反応性の検討をおこなうために、まずその準備段階として、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。ヒト iPS 細胞の使用はヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成22年11月改正)に準拠している。

C. 研究結果

1. 骨系統疾患のモデルマウスに対するCNP投与モデルとしての血中濃度上昇型CNPトランスジェニックマウスを用いた研究

i) GDF5 変異マウスに対する有効性の検討

GDF5 は BMP ファミリーに属する内軟骨性骨化の調節因子で、その機能喪失型遺伝子変異により、遠位中間肢異形成症(acromesomelic dysplasia)を含む様々な病型の骨系統疾患をきたす。今回、理化学研究所より譲渡された GDF5 変異マウスを用いた検討をおこなった。まず、内軟骨性骨化により形成される骨の伸長を *ex vivo* にて解析することを可能とするマウス胎仔脛骨器官培養系において、GDF5 変異マウス由来培養脛骨に対する CNP の効果を

検討した。胎生後期において、GDF5 変異マウス由来培養脛骨長は野生型マウス培養脛骨長と比較して差を認めず、さらに CNP 投与により GDF5 変異マウス由来培養脛骨は野生型マウス培養脛骨と同等に伸長が促進された。組織学的解析においても、CNP 添加によって GDF5 変異マウス由来培養脛骨成長板軟骨は野生型マウス培養脛骨成長板軟骨と同様にその伸長が促進した。現在、CNP 投与モデルとしての血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスと GDF5 変異マウスとの交配実験をおこない、CNP の GDF5 変異マウスの骨伸長障害に対する *in vivo* の効果を解析している。

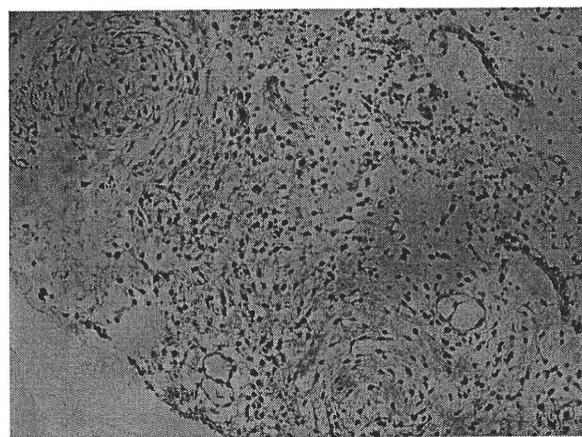
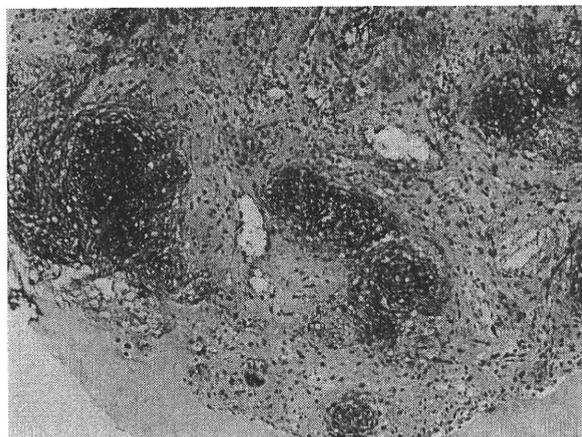
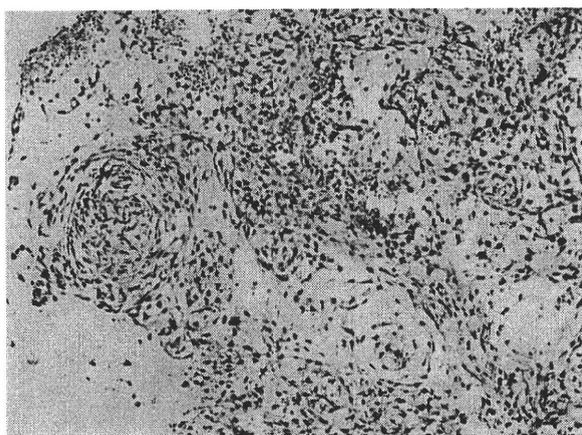
ii) ムコ多糖症に対する効果

ムコ多糖症は異常な基質蓄積をきたすライゾーム病として、骨系統疾患においても多くの疾患が含まれる。そのうち7型は、原因遺伝子(βグルクロニダーゼ遺伝子)は同定されているものの、現在のところ酵素補充療法は存在しない。その疾患モデルマウスであるβグルクロニダーゼ遺伝子変異マウス(mps-2J マウス)において、疾患に認められるのと同様の低身長や四肢長管骨の伸長障害が認められるが、今回血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスとの交配実験によってその改善効果を検討した。その結果、mps-2J マウスに認められた低身長および骨伸長障害は雌雄ともに有意に改善した。組織学的解析において、mps-2J マウスの成長板幅は拡大を認めたが、CNP トランスジェニックマウスとの交配によりさらなる成長板幅の拡大が認められた。

2. ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導法の確立

iPS 細胞は ES 細胞に類似していることから、iPS 細胞を用いた分化誘導は ES 細胞で使われている方法を流用していることが多い。また、ES 細胞を用いた軟骨細胞への分化誘導は間葉系幹細胞(MSC)で報告された方法を基礎にしている。そこで、MSC や ES 細胞で報告されている軟骨細胞誘導法を基に iPS 細胞、ES 細胞を用いて検討を行った。その結果、DMEM/F-12、10% FBS、1x ITS+™Premix、1mM Sodium pyruvate、100nM Dexamethasone、170mM Ascorbic acid、100U/ml

Penicillin、100mg/ml Streptomycin、10ng/ml rhTGF β 3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、alcian blue染色で染色され、RT-PCRにより軟骨分化マーカーであるSox9、2型コラーゲン、アグリカンの発現を認める軟骨細胞への分化が確認された(図)。現在2型コラーゲン等のタンパクレベルでの発現の解析をおこない、さらに安定した分化条件の確立を検討している。



x 100

図. 軟骨への分化誘導をおこなったiPS細胞。培養2週間後。上よりH-E染色、Alcian Blue-HE染色、aggrecanの免疫染色。

D. 考察

CNP投与モデルとしての循環血中CNP濃度上昇型CNPトランスジェニックマウスは、さまざまな骨系統疾患モデルマウスとの交配実験により*in vivo*におけるCNP治療の有効性をスクリーニングすることを可能とする有効な手段である。今回の検討では、その前段階として、骨系統疾患の原因の一つであるGDF5遺伝子変異のモデルマウスを用いて、胎仔脛骨器官培養系におけるCNPの有効性を証明した。今後交配実験による*in vivo*での効果を検討することを予定している。また、ムコ多糖症7型モデルマウスとの交配実験に関してもその効果を確認しており、治療効果のメカニズムなどについて、今後解析をおこなう予定である。今後さらに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を確立しつつあり、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

骨系統疾患に対するCNP治療の前臨床研究として、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、骨系統疾患に対するCNP治療の反応性を確認するためのiPS細胞由来軟骨細胞を用いたスクリーニング系を確立するために、iPS細胞から軟骨細胞への分化誘導の確立を試みた。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. Yasoda A, Nakao K. Genetic basis for skeletal disease. CNP therapy for achondroplasia. *Clin Calcium*. 20:1212-8, 2010.
2. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, Kanamoto N, Miura M, Tamura N, Arai H, Mukoyama M, Nakao K. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology*. 151:4381-8, 2010.
3. Yasoda A, Nakao K. Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. *Endocr J*. 57:659-66, 2010.

2. 学会発表

国内学会

1. 八十田明宏, 北村秀智, 藤井寿人, 近藤絵里, 村尾尚昭, 三浦晶子, 金本巨哲, 小松弥郷, 荒井宏司, 中尾一和、軟骨無形成症モデルマウスに対する CNP 投与による骨伸長障害改善効果の検討、第 28 回骨代謝学会学術総会、2010 年 7 月、東京
2. 藤井寿人, 八十田明宏, 近藤絵里, 山田豪, 金本巨哲, 三浦晶子, 曾根正勝, 田村尚久, 小松弥郷, 荒井宏司, 中尾一和、内軟骨性骨化による骨伸長に対する C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の内分泌的作用の検討、第 28 回骨代謝学会学術総会、2010 年 7 月、東京

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
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
Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, Kanamoto N, Miura M, Tamura N, Arai H, Mukoyama M, Nakao K.	Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death.	Endocrinology	151	4381-8	2010
Yasoda A, Nakao K	Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias.	Endocr J.	57	659-66	2010

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
Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Kanamoto N, Bando M, Kohno K, Sato T, Kojima M, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T	A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone in male mice but does not affect somatic growth.	Endocrinology	151	1743-50	2010
Iwakura H, Li Y, Ariyasu H, Hosoda H, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T	Establishment of a novel ghrelin-producing cell line.	Endocrinology	151	2940-5	2010
Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Nakao K, Kangawa K	Generation of transgenic mice overexpressing a ghrelin analog.	Endocrinology	151	5935-40	2010
Kishimoto I, Tokudome T, Nakao K, Kangawa K	Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models.	FEBS J.	278	1830-41	2011
Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T	Oxytocin and Dopamine Stimulate Ghrelin Secretion by the Ghrelin-Producing Cell Line, MGN3-1 in Vitro.	Endocrinology		Epub ahead of print.	2011

Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases for common human diseases

Kazuwa Nakao · Akihiro Yasoda · Ken Ebihara ·
Kiminori Hosoda · Masashi Mukoyama

Received: 12 May 2009 / Revised: 3 August 2009 / Accepted: 3 August 2009 / Published online: 3 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Since the 1980s, a number of bioactive molecules, now known as cardiovascular hormones, have been isolated from the heart and blood vessels, particularly from the subset of vascular endothelial cells. The natriuretic peptide family is the prototype of the cardiovascular hormones. Over the following decade, a variety of hormones and cytokines, now known as adipokines or adipocytokines, have also been isolated from adipose tissue. Leptin is the only adipokine demonstrated to cause an obese phenotype in both animals and humans upon deletion. Thus, the past two decades have seen the identification of two important classes of bioactive molecules secreted by newly recognized endocrine cells, both of which differentiate from mesenchymal stem cells. To assess the physiological and clinical implications of these novel hormones, we have investigated their functions using animal models. We have also developed and analyzed mice overexpressing transgenic forms of these proteins and knockout mice deficient in these and related genes. Here, we demonstrate the current state of the translational

research of these novel hormones, the natriuretic peptide family and leptin, and discuss how lessons learned from excellent animal models and rare human diseases can provide a better understanding of common human diseases.

Keywords Natriuretic peptide family (ANP, BNP, CNP) · Leptin · Translational research · Animal models · Genetically engineered mice

Although a multitude of animal models have been developed to emulate various diseases, there are a few excellent animal models that mimic human disease remarkably well, such as spontaneously hypertensive rats (SHR) [1] and hereditary obese mice, ob/ob mice [2]. These models are very useful for translational research into the common human diseases, hypertension and obesity. Lessons from research on SHR, an excellent animal model for hypertension research, developed at Kyoto University led us to investigate the clinical importance of cardiovascular hormones and adipokines using appropriate animal models that mimic human diseases beyond species differences. In this review, we discuss the current state of translational research of the natriuretic peptide family and leptin and discuss the ways in which animal models and rare human diseases can educate about common human diseases.

Translational research of natriuretic peptide family

The natriuretic peptide family consists of three structurally related peptides, atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP) [3]. The biological actions of natriuretic peptides are mediated by activation of two subtypes of membranous guanylyl cyclase (GC), GC-A and GC-B, leading to

K. Nakao (✉) · A. Yasoda · K. Ebihara · K. Hosoda ·
M. Mukoyama
Department of Medicine and Clinical Science,
Kyoto University Graduate School of Medicine,
Kyoto 606, Japan
e-mail: nakao@kuhp.kyoto-u.ac.jp

K. Nakao
Translational Research Center,
Kyoto University Graduate School of Medicine,
Kyoto 606, Japan

K. Nakao
EBM Research Center,
Kyoto University Graduate School of Medicine,
Kyoto 606, Japan

intracellular accumulation of cyclic guanine monophosphate (cGMP) [4]. The rank order of potency to induce cGMP production via GC-A is $ANP \geq BNP \gg CNP$, while that via GC-B is $CNP > ANP \geq BNP$ [5]. Thus, ANP and BNP serve as endogenous ligands for GC-A, while CNP is specific for GC-B. A third natriuretic peptide receptor with no intracellular GC domain, dubbed the clearance receptor (C-receptor), is thought to be engaged in the receptor-mediated degradation of natriuretic peptides [4]. The ANP, BNP/GC-A system plays a pivotal role in the regulation of cardiovascular homeostasis, as demonstrated by their augmentation in various pathophysiological states such as heart failure [6–10], myocardial infarction [11, 12], cardiac hypertrophy [13, 14], and hypertension [15–17]. ANP and BNP are cardiac hormones secreted primarily by the atrium and ventricle of the heart, respectively [10, 17], with strong diuretic, natriuretic, and vasodilatory activities [6, 7, 10]. ANP and BNP are used in the treatment of heart failure [18, 19] and serve as sensitive biochemical markers for heart failure and cardiac hypertrophy [8–10]. ANP infusion therapy has currently reached a greater than 30% share among drugs given for acute congestive heart failure in Japan.

CNP, the third member of natriuretic peptide family, was first purified from porcine brain [20]. While CNP is the primary natriuretic peptide in the human brain [21], it is also produced by vascular endothelial cells [22–24] and macrophages [25]. This hormone functions in the regulation of vascular endothelial function and arteriosclerosis via local effects, not by acting as a circulating hormone [26–28]. These observations indicate that CNP acts as an autocrine/paracrine regulator and as a neuropeptide [21].

The distribution of the natriuretic peptide system overlaps with the distribution of the renin–angiotensin system [21, 29–33], prompting us to examine the functional relationship of the natriuretic peptide system and the renin–angiotensin system. We demonstrated an antagonistic relationship between these two systems, both in their peripheral functions as well as their central actions [34–39]. Furthermore, the natriuretic peptide system has therapeutic implication in vascular regeneration in patients with arteriosclerosis obliterans [40].

Mice with genetic alterations in the ANP, BNP/GC-A system

Genetically engineered mice are useful tools to study the complex phenotypic effects of an altered gene in living animals. Overexpression or deficiency of each member of the natriuretic peptide family or its receptors has been generated through transgenic (Tg) or knockout (KO) technologies [41–45]. We generated Tg mice expressing BNP under the control of the serum amyloid P (SAP)

component promoter, which targets hormone expression to the liver [43]. BNP-Tg mice exhibited a 100-fold increase in plasma BNP concentrations with concomitant elevations in plasma cGMP concentrations. These mice displayed significantly lower blood pressures and smaller hearts than non-Tg littermates. These results indicate that BNP functions in the long-term cardiovascular regulation and may be useful as a long-term therapeutic agent. In addition, the proteinuria and renal dysfunction observed in anti-GBM nephritis [46], the nephrosclerosis induced by subtotal nephrectomy [47], and the manifestations of diabetic nephropathy [48] were ameliorated in BNP-Tg mice compared to those in wild-type mice, indicating a possible application for the natriuretic peptide family in the treatment of renal disorders.

We also generated mice bearing a targeted disruption of the BNP gene [44]. At baseline, BNP-KO mice did not show any signs of systemic hypertension or ventricular hypertrophy; however, these animals developed multifocal fibrotic lesions within the cardiac ventricle even in the absence of additional stresses; these lesions increased in size and number in response to ventricular pressure overload, demonstrating that BNP is an antifibrotic factor acting within the ventricle of the heart as an autocrine/paracrine regulator for ventricular remodeling [44]. In addition to these cardiovascular manifestations, BNP-Tg mice exhibited marked skeletal overgrowth via endochondral bone formation [49]. Nevertheless, BNP-KO mice did not possess any skeletal abnormalities [44]. The skeletal overgrowth seen in BNP-Tg mice that express elevated plasma concentrations of BNP was similar to that seen in cartilage-specific CNP-Tg mice [49]. As the BNP/GC-A system does not have an abnormal skeletal phenotype [41, 42, 45], we postulated that the markedly increased circulating levels of BNP (100-fold greater than wild-type mice) may cross-react with GC-B to stimulate endochondral bone growth, even though the affinity of BNP for GC-B is lower than that for GC-A. This interpretation is supported by the finding that the skeletal overgrowth observed in BNP-Tg mice was not abrogated by a genetic deficiency of GC-A in BNP-Tg mice [50].

ANP transgenic mice expressing elevated levels of circulating ANP under the control of mouse transthyretin promoter [41] exhibited decreased arterial blood pressure without the induction of diuresis or natriuresis. ANP-KO mice and GC-A-KO mice displayed salt-sensitive and salt-resistant hypertension, respectively [42, 45]. Studies using GC-A-KO mice implicated the involvement of GC-A in antihypertrophic actions in the heart [51–53]. A more detailed analysis of GC-A was performed using mice bearing a conditional knockout of GC-A and indicated the importance of GC-A in vascular endothelial-cell-mediated blood pressure control [54–56].

As for the regulation of ANP and BNP gene expression, neuron-restrictive silencer elements (NRSEs) are located in the 5'-flanking region of the BNP gene and the 3'-untranslated region of the ANP gene [57]. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF) can thus repress ANP promoter activity through binding to NRSE [58]. Studies examining dominant-negative NRSF Tg mice expressed under the control of the α -myosin heavy-chain promoter have demonstrated that NRSF plays an important role in the gene expression of both ANP and BNP and in the progression of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia associated with heart failure [59].

Genetically engineered mice of the CNP/GC-B system

We generated mice with a targeted disruption of the CNP gene; the resultant CNP-KO mice exhibited markedly short stature due to impaired bone growth [60]. Mammalian bones are formed through two different mechanisms, endochondral ossification and membranous ossification. Most mammalian bones are formed through endochondral ossification, a process during which chondrocytes in the growth plate undergo proliferation, hypertrophy, cell death, and osteoblastic replacement [61]. The short-stature phenotype of CNP-KO mice resulted from impaired bone growth through endochondral ossification [60]. CNP-Tg mice with targeted overexpression of CNP at the growth plate cartilage exhibited prominent overgrowth of those bones formed through endochondral ossification [62]. GC-B-KO mice exhibit the same short-stature phenotype as observed in CNP-KO mice [63], demonstrating that the CNP/GC-B system is a physiologically important stimulator of endochondral bone growth. Dominant-negative GC-B transgenic rats displayed blood-pressure-independent cardiac hypertrophy, suggesting evidence linking GC-B signaling to the control of cardiac growth [64].

cGMP-dependent protein kinase (cGK) has been identified as a molecule activated downstream of the natriuretic peptide family and GC system [65]. Mice depleted with the gene of

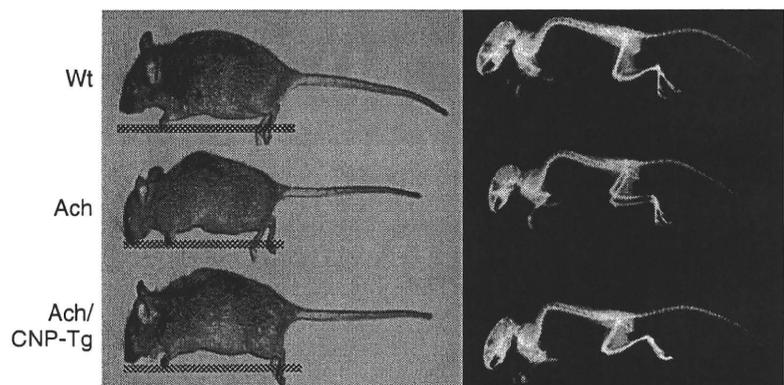
one subtype of cGK, cGKII (cGKII-KO mice), exhibit a short-stature phenotype secondary to impaired endochondral bone growth [66], similar to that observed in CNP-KO mice [60]. We demonstrated that cGKII affected endochondral bone growth by functioning downstream of the CNP/GC-B system by showing that the impaired endochondral bone growth observed in cGKII-KO mice could not be rescued by targeted overexpression of CNP in the growth plate cartilage [67].

Multiple spontaneous animal models with impairments in the CNP/GC-B system have been identified [68–71]. Two strains of dwarf mice, with an autosomal recessive mutant gene, named *cn/cn* [68] and short-limbed dwarfism (SLW) mice [69], possess spontaneous loss-of-function mutations in the *GC-B* gene. Spontaneous mutant mice with a loss-of-function mutation in the CNP gene, named long bone abnormality (Lbab) mice, exhibit short-stature owing to their impaired endochondral bone growth [70], and this phenotype could be abrogated by targeted overexpression of CNP in the growth plate cartilage [71].

Clinical application of CNP and its analogs for skeletal dysplasia

To explore the potential applications of CNP and its analogs for clinical use, we attempted to apply the strong effect of CNP and GC-B on endochondral bone growth to skeletal dysplasia, a group of genetic disorders characterized by severely impaired bone growth [72]. Achondroplasia (Ach), the most common form of skeletal dysplasia characterized by short-limbed dwarfism, is caused by constitutive activation of fibroblast growth factor (FGF) receptor 3 [73]. The current therapy for Ach is limited to distraction osteogenesis [74], an orthopedic procedure; no efficient medical therapies have been developed as yet. We demonstrated that targeted overexpression of a CNP transgene in the growth plate cartilage of a mouse model of achondroplasia (Ach mice) rescues their impaired bone growth and short-stature phenotypes [62] (Fig. 1). To elucidate the molecular

Fig. 1 Rescue of achondroplastic mice (Ach mouse) by targeted overexpression of CNP in growth plate cartilage. From *top to bottom* are shown the gross appearance (*left panel*) and skeletal phenotype (*right panel*, soft X-ray picture) of female wild-type mice (*Wt*), Ach mice (*Ach*), and Ach mice overexpressing CNP in the growth plate cartilage (*Ach/CNP-Tg*) at an age of 3 months



mechanism by which CNP ameliorates achondroplasia, we examined the effect of CNP on extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling. CNP inhibited FGF2-stimulated phosphorylation of ERK in a dose-dependent manner through cGMP activation via GC-B ligation, ultimately increasing matrix synthesis by chondrocytes [62].

We also demonstrated that systemic and continuous administration of synthetic CNP is safe and effective to reverse the impaired bone growth seen in Ach mice [75] (Fig. 2). The safety and efficacy of systemic CNP administration in preclinical studies with the observation that CNP has only a minimal effect of blood pressure in humans [76] suggest that systemic administration of CNP or CNP analogs provides a novel therapeutic strategy for the treatment of human skeletal dysplasia, including Ach.

One form of human skeletal dysplasia, acromesomelic dysplasia type Maroteaux, is caused by loss-of-function mutations in the GC-B gene [77]. This implicates the CNP/GC-B system as a physiologically important enhancer of endochondral bone growth in humans, suggesting a clinical application for CNP and CNP analogs to multiple types of human skeletal dysplasia [75].

In the near future, idiopathic short stature, a common disease of short-stature phenotype with an unknown etiology, and bone fracture, the healing of which is made through endochondral ossification, would be the next avenues to explore for a therapeutic effect of CNP treatment.

Translational research of leptin

Leptin, an adipocyte-derived hormone originally identified from hereditary obese mice (*ob/ob* mice) [78], plays crucial physiologic roles in the regulation of energy expenditure and food intake [79–83]. Mice [84] and rats [85, 86]

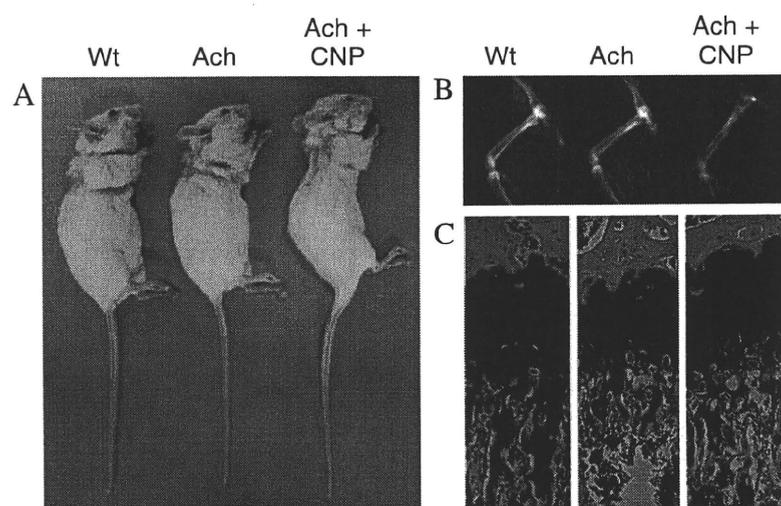
bearing mutations in leptin receptors demonstrate identical phenotypes as *ob/ob* mice. The Koletsky rat, an obese substrain of SHR serving as a model of metabolic syndrome exhibiting both hypertension and morbid obesity, was discovered to carry an additional nonsense mutation of the leptin receptor [86].

In obese animals and subjects, plasma leptin concentrations are increased in proportion to the degree of adiposity [87–89], indicating that leptin is a satiety signal communicating the size of adipose stores to the brain [90–92] and that leptin resistance is related to obesity [87, 93–95]. Leptin deficiency in human subjects is associated with morbid obesity with insulin resistance, indicating the physiological role of leptin in both animal models and humans [96, 97]. Leptin is implicated in a number of manifestations seen in obese animal models [91, 98–101], especially obesity-related hypertension [99], abnormal reproduction [98], bone changes [100], and Cushing syndrome [102]. Leptin is also produced by human placenta [103] and chorionic tumors [104].

Generation of Tg mice overexpressing leptin

To explore the clinical implications of leptin *in vivo*, we generated leptin-Tg mice displaying elevated plasma leptin concentrations comparable to those seen in obese subjects [105]. A fusion gene comprised of the human SAP promoter upstream of the mouse leptin cDNA coding sequences was designed to target hormone expression to the liver [43, 106]. Overexpression of leptin in the liver resulted in the complete disappearance of both white and brown adipose tissues in mice [105]. Such a phenotype did not occur when transgene expression was targeted to adipose tissue, the endogenous site of leptin production, using adipocyte-specific promoters [107]. The hyperlepti-

Fig. 2 Rescue of Ach mice by administration of synthetic CNP. Three-week-old female wild-type (*Wt*) or Ach mice were continuously administered CNP intravenously. The gross appearances (a), soft X-ray pictures of femurs (b), and histological pictures of tibial growth plates stained with safranin-O and hematoxylin and eosin (c) are shown for wild-type mice treated with vehicle (left), Ach mice treated with vehicle (middle), and Ach mice treated with 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per minute CNP (right) after a 4-week administration period. Scale bar in c, 50 μm



nemia seen in these transgenic “skinny” mice provides a unique experimental system in which the long-term effects of leptin are investigated *in vivo* [98–101, 105, 108, 109]. Skinny mice exhibit augmented glucose metabolism and increased insulin sensitivity of both skeletal muscle and liver [105], supporting the concept that leptin acts as an antidiabetic hormone *in vivo* [110–112]. These studies suggest the potential usefulness for leptin treatment of diabetes and obesity.

Crossbreeding of transgenic skinny mice with A-ZIP/F-1 mice, a mouse model of severe lipotrophic diabetes

Generalized lipodystrophy, caused by a systemic deficiency of adipose tissue, is characterized by severe insulin resistance and hypertriglyceridemia [113]. A form of diabetes, called lipotrophic diabetes, eventually develops, although the precise mechanism by which this paucity of fat results in diabetes has remained to be elucidated. Plasma leptin concentrations are markedly reduced or absent in patients with lipotrophic diabetes and in rodent models of this disease [114–117]. Given leptin’s antidiabetic action, leptin deficiency may play a role in the pathogenesis of lipotrophic diabetes; thus, leptin may be a drug for lipotrophic diabetes.

A mouse model of severe lipotrophic diabetes (A-ZIP/F-1) was generated by expressing in adipose tissue a protein that inactivates basic-zipper transcription factors [116]. To assess the pathophysiological role and therapeutic potential of leptin in lipotrophic diabetes, we crossed transgenic skinny (*LepTg/+*) and A-ZIP/F-1 (*A-ZIPTg/+*) mice to produce double transgenic mice (*LepTg/+;A-ZIPTg/+*) virtually lacking adipose tissue and expressing approximately tenfold higher levels of leptin than normal controls [118]. *LepTg/+;A-ZIPTg/+* mice were hypophagic in comparison to *A-ZIPTg/+* mice and exhibited decreased hepatic steatosis. Glucose and insulin tolerance tests displayed increased insulin sensitivity and normal glucose tolerance in *LepTg/+;A-ZIPTg/+* mice, which was comparable to *LepTg/+* mice. Pair-feeding experiments demon-

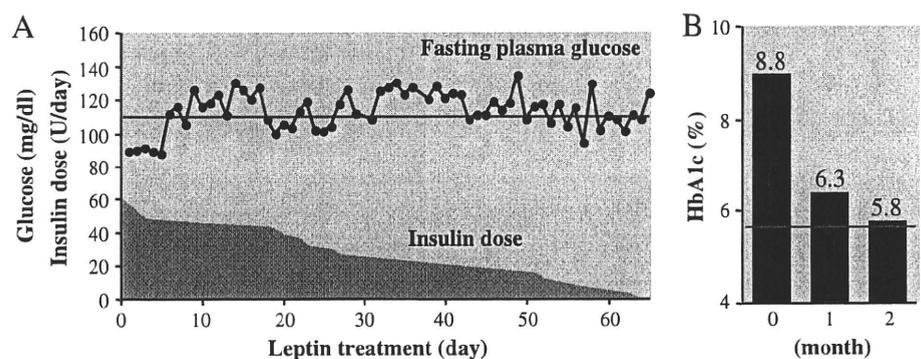
strated that the effects of leptin were not solely due to decreased food intake. Leptin also helped to prevent diabetic nephropathy in generalized lipotrophic diabetes mice [101]. These results demonstrate that leptin can improve insulin resistance and diabetic manifestations in a mouse model of severe systemic lipodystrophy, indicating that leptin is therapeutically useful in the treatment of lipotrophic diabetes [118].

Leptin replacement therapy in Japanese patients with generalized lipodystrophy

We previously reported a novel homozygous mutation of *MC4R* in a Japanese woman with severe obesity (body mass index (BMI) 62 kg/m²) [119]. *MC4R* mutations have been identified at a relatively high frequency (3–4%) in morbidly obese patients in Europe; all of the mutations reported to date occur in an autosomal-dominant fashion, with the exception of a single unique pedigree in the UK. [120, 121]. Although both parents were heterozygous for the mutation, neither exhibited such a severe obese phenotype (BMI 27 and 26 kg/m², respectively, which are preobese according to WHO criteria). As genetic backgrounds and lifestyles vary significantly between European and Asian countries, it is necessary to examine the effect of lifestyle on the phenotypes resulting from genetic mutations and on treatment efficacy in each country.

Four-month leptin replacement therapy has been reported to improve glucose and lipid metabolism in lipodystrophy patients in the USA [122]. To elucidate the efficacy, safety, and mechanisms underlying leptin replacement therapy in Asian patients with generalized lipodystrophy, we treated seven Japanese patients, two acquired and five congenital types, with physiological replacement dose of leptin [123, 124]. Leptin replacement therapy dramatically improved fasting glucose (mean±SE, 172±20 to 120±12 mg/dl, *P*<0.05) and triglyceride (mean±SE, 700±272 to 260±98 mg/dl, *P*<0.05) levels within 1 week. Leptin replacement reduced insulin resistance, as demonstrated by the euglycemic clamp method. Improvement of

Fig. 3 **a** Daily insulin doses and fasting plasma glucose levels and **b** HbA1c levels during the first 2 months of leptin therapy in a 19-year-old male patient with congenital generalized lipodystrophy (Seipin gene mutant)



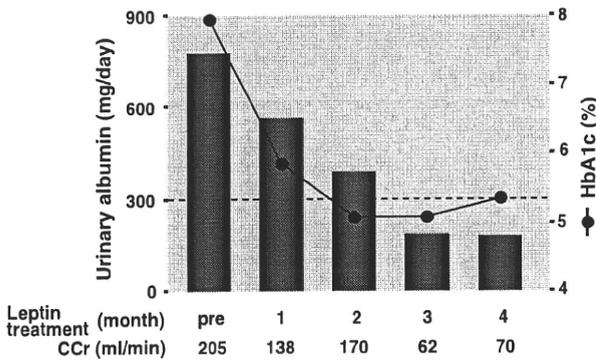


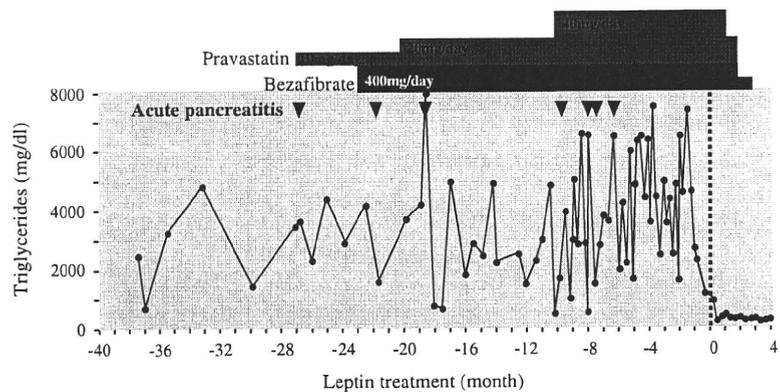
Fig. 4 Time course of daily urinary albumin secretion, creatinine clearance, and HbA1c levels during leptin treatment of a 16-year-old female patient with acquired generalized lipodystrophy

fatty liver was also confirmed by changes in computed tomography (CT) attenuation, and liver volume was calculated by CT imaging. By 4 months, six of seven patients were able to discontinue all antidiabetic drugs, including insulin (Fig. 3). The decreased fasting plasma glucose levels, triglyceride levels, and liver volumes in all seven patients were well maintained throughout the therapy period with no adverse effects. The longest period of leptin replacement therapy has now extended beyond 7 years.

Leptin treatment was also effective at combating diabetic complications. The macroalbuminuria seen in two patients regressed to microalbuminuria, while microalbuminuria in two additional patients normalized. The creatinine clearance of patients with glomerular hyperfiltration decreased with improved glucose tolerance (Fig. 4), which was consistent with previous findings in the lipotrophic diabetes model mice [101].

We also examined the effect of leptin therapy on a 16-year-old girl with severe hypertriglyceridemia who suffered from repeated episodes of acute pancreatitis (Fig. 5). After the initiation of leptin therapy, her triglyceride levels normalized; she did not have any additional episodes of acute pancreatitis (Fig. 5). These results clearly demonstrate

Fig. 5 Fasting serum triglyceride levels, doses of lipid-lowering drugs, and episodes of acute pancreatitis (red inverted triangle) before and after leptin therapy in a 16-year-old girl with acquired generalized lipodystrophy



the safety and efficacy of the long-term leptin replacement therapy in patients with generalized lipodystrophy. While these results are impressive, it is important to remember that the efficacy of leptin replacement therapy in patients from Japan, a country in which the prevalence of obesity is relatively low, is excellent.

Leptin therapy for more prevalent forms of diabetes

To assess the therapeutic potential for leptin treatment in insulin-deficient diabetes, we generated diabetic animals by treating wild-type and LepTg/+ mice with a relatively low dose of streptozotocin (STZ 180 g/g body weight) [125]. Plasma insulin concentrations were reduced (<0.10 ng/ml), resulting in severe hyperglycemia in both wild-type and LepTg/+ mice 2 weeks after STZ treatment. LepTg/+ mice were more sensitive to exogenously administered insulin than wild-type mice; STZ-treated LepTg/+ mice became normoglycemic at doses of insulin that did not improve the hyperglycemia in STZ-treated wild-type mice. To clarify if combination therapy with leptin and insulin is beneficial for insulin-deficient diabetes, we also examined the effect of chronic coadministration of leptin and insulin in STZ-treated wild-type mice. We demonstrated that subthreshold doses of insulin, which do not affect glucose homeostasis, are effective at improving diabetes in STZ-treated wild-type mice in combination with leptin. These results indicate that leptin therapy may be used as an adjunct for insulin therapy in insulin-deficient diabetes.

We also investigated the therapeutic usefulness of leptin in a mouse model of type 2 diabetes mellitus with increased adiposity [126], generated using a combination of a low-dose STZ (120-g/g body weight) and a high-fat diet (HFD, 45% of energy as fat; STZ/HFD). In STZ/HFD mice, continuous infusion of leptin (20-ng/g body weight per hour) reduced food intake and body weight gain and improved glucose and lipid metabolism with enhanced insulin sensitivity. Leptin therapy also decreased the triglyceride content of both the liver and skeletal muscle.