

201128150A

厚生労働科学研究補助金
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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成24(2012)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 に関する研究	1
中尾 一和	

II. 分担研究報告書

1. CNP/GC-B 系の骨代謝に対する影響に関する研究	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	11
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊	12
-----------------------	----

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23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。現在、有効な薬物治療は確立されていないが、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、400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。

申請者らは骨系統疾患に対する薬物治療を目指した前臨床研究として、平成15～19年度厚労科研究費を得て、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのメンバーである C 型ナトリウム利尿ペプチド（C-type natriuretic peptide: 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）、さらに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 B 型グアニル酸シクラーゼ（guanylyl cyclase-B : 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、400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 治療に対する有効疾患の把握を、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

平成23年度は前年度に引き続き、前臨床研究として、CNP/GC-B系の骨伸長促進作用をより詳細に検討するために、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おこなった。さらに、種を越えたCNP/GC-B系の骨伸長促進作用を検討するために、CNPノックアウトラットを作製し、解析した。展開研究としては、引き続き、軟骨無形成症以外の骨系統疾患モデルマウスに対するCNPの作用を解析した。

(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) CNPラットの作成と解析

種を越えたCNP/GC-B系の骨伸長促進作用を検討するために、新たにZn finger nuclease法を用いたCNPノックアウトラットの作製をおこない、その表現型を解析した。

(3) 骨系統疾患におけるCNP/GC-B系賦活化療法の適応拡大のための前臨床研究

軟骨無形成症以外の骨系統疾患に対するCNP/GC-B系賦活化療法の適応拡大のために、これまでに様々な骨系統疾患のモデルとなる遺伝子変異マウスの長管骨器官培養を用いたCNPの骨伸長促進作用の検討をおこなってきた。昨年度よりムコ多糖症7型モデルマウスと、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の交配実験を開始したが、本年度も引き続き骨・軟骨組織における治療効果を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関して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)。

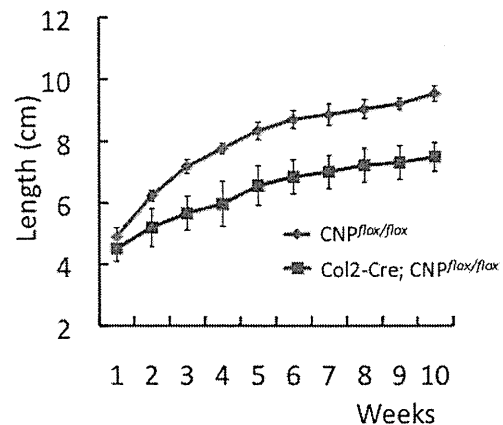
C. 研究結果

(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

昨年度に引き続き、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 (下図)。

図. 軟骨特異的CNPノックアウトマウスの成長



曲線

また、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、身長に関しても同様であり、骨伸長障害はGC-BノックアウトマウスにおいてCNPノックアウトマウスより強く認められた。組織学的解析においても、軟骨特異的CNPあるいはGC-B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、特にX型コラーゲンを発現する肥大化軟骨細胞層

に著明な狭小化が認められた。BrdU 染色により、成長板増殖軟骨細胞の増殖能の低下が証明された。

(2) CNP ノックアウトラットの作製と解析

Zn finger nuclease 法を用いて CNP ノックアウトラットを作製すると、CNP ノックアウトマウスと同様の骨伸長障害をきたすラットが作出された (下図)。

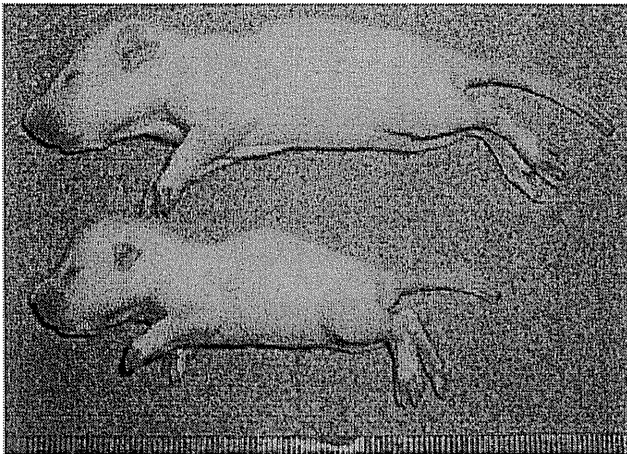


図. CNP ノックアウトラットの外観。上、野生型、下、CNP ノックアウトラットの外観

(2) 骨系統疾患における CNP/GC-B 系賦活化療法の適応拡大のための前臨床研究

ムコ多糖症は、グリコサミノグリカンを分解する酵素の変異によって全身にグリコサミノグリカンが過剰に蓄積され、骨伸長障害による低身長症や関節病変、精神遅滞、循環器、呼吸器病変などが引き起こされる先天性疾患である。そのうちムコ多糖症 1、2 および 6 型に対しては、近年本邦においても酵素補充療法が開始されているが、7 型に対する酵素補充療法は現時点で存在せず、対症療法が主体となっている。今回、ムコ多糖症 7 型モデルマウス (mps-2j マウス) を用いて、その骨伸長障害に対する CNP の効果を検討した。mps-2j マウスと、CNP 投与モデルである血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウス (CNP-Tg マウス) を交配させて mps-2j/CNP-Tg マウスを作製し、mps-2j マウスの低身長や骨伸長障害に対する効果を検討した。mps-2j マウスでは野生型マウスと比較して吻髻長の短縮を認めた

が、mps-2j/CNP-Tg マウスでは mps-2j と比較して吻髻長の有意な増加を認めた。また、軟 X 線写真による各骨長の測定において、mps-2j マウスでは野生型マウスと比較して頭蓋骨前後径および橈骨、腰椎、脛骨の長さが減少したが、mps-2j/CNP-Tg マウスでは mps-2j マウスと比較して、それぞれ 69、44、80、39%改善した。さらに、組織学的検討において、既報同様 mps-2j マウスにおいて野生型マウスと比較して成長板幅の増大が認められたが、mps-2j/CNP-Tg マウスでは成長板幅のさらなる増大が確認された (下図)。

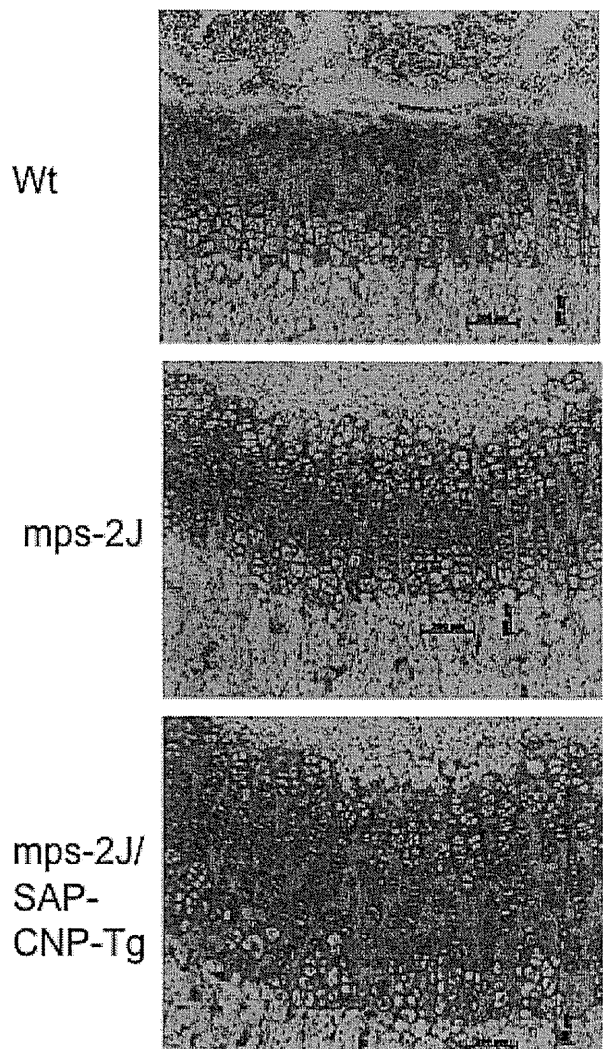


図. 3 週齢雄性マウスの脛骨成長板軟骨の組織像。上より野生型、mps-2j、mps-2j/CNP-Tg マウス

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・456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、軟骨無形成症に加え、ムコ多糖症に対して、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（マロト一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 異常によるマロト一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 治療に対する有効性の検証の展開研究をおこなった。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、本研究を遂行した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, Nakao K. Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (Ibab/Ibab) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant. *Calcif Tissue Int.* 90:307-18, 2012
2. Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Nakao K. Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver. *Endocrinology.* 153:492-500 2012.

2. 学会発表

国内学会

1. 我国の特徴に即した臨床医学研究の推進、CRO 協会講演会「国際化の中で日本の臨床開発を今一度見直そう」—日本が Initiative をとれるか— 2011年11月30日（東京都）

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

たは予防剤

3. 特願 2004-25631
内皮細胞分化増殖方法
4. 特願 2004-184138
霊長類動物胚性幹細胞から発生初期血管内皮細胞の製造方法及びその細胞の使用
5. 特願 2002-248232
NRSE及びNRSFの利用法
6. 特願 2001-310322
軟骨無形成症治療剤
7. 特願 2001-301586

軟骨無形成症治療剤

8. 特許 3267893
自己免疫疾患の診断薬
 9. 特許 3343866
ハムスター脳のナトリウム利尿ペプチド
 10. 特許 2036732
 α -hANP を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
平成23年度分担研究報告書

CNP/GC-B系の骨代謝に対する影響に関する研究

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、本年度は CNP/GC-B 系の骨代謝におよぼす効果についての検討をおこなった。

A. 研究目的

分担研究者はこれまでナトリウム利尿ペプチド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、本年度はCNP/GC-B系の骨代謝におよぼす効果について検討した。

B. 研究方法

CNP投与モデルである血中濃度上昇型CNPトランスジェニックマウス(SAP-CNP-Tgマウス)における骨状態の解析を、骨代謝マーカーおよびマ

イクロCTを用いて解析した。さらに、モデルマウスを用いた検討によりその骨伸長障害に対するCNP治療の有効性が確認されている軟骨無形成症について、CNP治療の骨代謝/骨密度に対する効果を、軟骨無形成症モデルマウスに対するSAP-CNP-Tgマウスの交配実験における骨状態の解析により評価した。

C. 研究結果

野生型マウスと比較してSAP-CNP-Tgマウスでは骨形成系の骨代謝マーカーであるオステオカルシンは上昇し、また骨吸収系のマーカーであるTRAP5bも有意に上昇していた。さらに、骨形態計測では骨芽細胞面、破骨細胞面の上昇傾向を認めた。石灰化速度に両者の差は認めなかった。また、マイクロCTを用いた解析では、SAP-CNP-Tgは骨梁数や幅の減少傾向を伴う骨量(BV/TV)の減少傾向を認めた。

次に、軟骨無形成症モデルマウス(Achマウス)は野生型マウスと比較して既報通り骨量の低下を認め、前述のようにSAP-CNP-Tgマウスも骨量の低下傾向を認めたが、Achマウスに対してSAP-CNP-Tgマウスを交配させて作製した軟骨無形成症のCNP投与治療モデル(Ach/SAP-CNP-Tgマウス)では、マイクロCTを用いた解析の結果、Achマウスと比較して骨量の低下は認めなかった。

D. 考察

CNP治療にともなう骨代謝の影響に関する検討

を CNP 投与モデルである SAP-CNP-Tg マウスを用いておこなった。SAP-CNP-Tg マウスにおいて骨代謝の高回転による骨量の低下傾向を認めたが、過伸長にともなう骨量の低下の因子も含まれる可能性もあり、いずれにしても CNP 治療時の投与量の設定には十分な注意を払う必要があるものと考えられた。一方、興味深いことに、軟骨無形成症モデルマウスに対する CNP 投与モデルとしての Ach/SAP-CNP-Tg マウスでは、低下した Ach マウスの骨量のさらなる低下は認めず、骨量が維持されていた。詳細なメカニズムは現在のところ不明だが、軟骨無形成症に対する治療時には骨密度の低下について安全である可能性が示唆された。

E. 結論

CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用を臨床展開する際に必要となる骨そのものへの効果を今回検討した。今後 CNP/GC-B 系の骨特異的過剰発現マウスや欠損マウスなどを用いたより詳細な検討が必要になると考えられるが、CNP/GC-B 系は骨代謝回転を亢進させる傾向があり、CNP、あるいはそのアナログによる治療時には投与量の調節など注意が必要となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

1. 論文発表

1. 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.

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

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23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 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。分担研究者らは本年度も引き続き、軟骨無形成症以外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研究が進行している。分担研究者らは前年度に引き続き、1）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 治療有効性の検討をおこなうための、ヒト iPS 細胞を用いた検討をおこなった。

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、昨年度に引き続き、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

今年度は昨年度に引き続き、ムコ多糖症に対する効果を検討した。

ムコ多糖症は異常な基質蓄積をきたすライソゾーム病として、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(human serum amyloid P componentプロモーターにより肝臓でのCNP transgeneの発現をさせる

SAP-CNP-Tgマウス)との交配実験によってその改善効果を検討した。交配によって得られたヘテロでCNP transgeneを有するmps-2Jマウス(mps-2J, SAP-CNP-Tg/+マウス)において、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、mps-2J, SAP-CNP-Tg/+マウスにおいて、さらなる成長板幅の拡大が認められた。さらに、ホモでCNP transgeneを有するmps-2Jマウス(mps-2J, SAP-CNP-Tg/SAP-CNP-Tgマウス)において、mps-2J, SAP-CNP-Tg/+マウスより大きな低身長の改善が認められた。また、器官培養系において、mps-2Jマウスより抽出した脛骨にCNPを添加することにより、容量依存性に培養脛骨の伸長促進作用が確認された。

2. ヒトiPS細胞から軟骨細胞への分化誘導法の確立

昨年度に引き続きヒトiPS細胞の軟骨への分化誘導法の確立の検討をおこなった。iPS細胞から分化誘導された軟骨細胞における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たが、免疫染色において、2型コラーゲンの発現は弱く、10型コラーゲンの発現は認められなかった。

また、本年度は研究班員片岡(滋賀県立小児保健医療センター小児整形外科)より骨延長術時に軟骨無形成症患者の皮膚細胞を入手して、iPS細胞の樹立に成功した。今後軟骨への分化をおこなって、CNPに対する反応性を正常ヒトiPS細胞から分化させた軟骨と比較する予定である。

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。本年度は、ムコ多糖症7型モデルマウスとの交配実験をおこない、その有効性を検証した。

また、正常ヒトiPS細胞からの軟骨への分化条件を確立し、さらに、軟骨無形成症患者由来iPS細胞

胞を樹立した。今後軟骨への分化誘導をおこない、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おこなった。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を確立した。さらに、軟骨無形成症患者由来 iPS 細胞を樹立した。今後、確立された分化誘導系によって軟骨への分化をおこない、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. Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, Nakao K. Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (Ibab/Ibab) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant. *Calcif Tissue Int.* 90:307-18, 2012
2. Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Nakao K. Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2)

oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver. *Endocrinology.* 153:492-500 2012.

2. 学会発表

国内学会

1. 骨代謝調節研究の進展と臨床展開 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ショナルリサーチ、八十田明宏、中尾一和、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011 年 4 月 21-23 日、神戸
2. CNP の骨伸長促進作用の臨床応用 血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスの開発とその意義、藤井寿人、八十田明宏、小松弥郷、近藤絵里、吉岡徹朗、金本巨哲、三浦晶子、田村尚久、荒井宏司、向山政志、中尾一和、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011 年 4 月 21-23 日、神戸
3. Toshihito Fujii, Akihiro Yasoda, Eri Kondo, Yui Yamashita, Yoriko Ueda, Naotetsu Kanamoto, Masakatsu Sone, Masako Miura, Hiroshi Arai, Kazuwa Nakao, C-type natriuretic peptide(CNP) rescues short stature of mice model of mucopolysaccharidosis type 7. 第 29 回骨代謝学会学術総会、2011 年 7 月 29-30 日、大阪

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
Kondo E, <u>Yasoda A</u> , Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, <u>Nakao K</u> .	Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (Ibab/Ibab) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant.	Calcif Tissue Int.	90	307-18	2012
Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, <u>Nakao K</u> .	Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver.	Endocrinology.	153	492-500	2012

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, <u>Nakao K</u> , <u>Kangawa K</u>	Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models.	FEBS J.	278	1830-41	2011

Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (*lbab/lbab*) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant

Eri Kondo · Akihiro Yasoda · Takehito Tsuji · Toshihito Fujii · Masako Miura · Naotestu Kanamoto · Naohisa Tamura · Hiroshi Arai · Tetsuo Kunieda · Kazuwa Nakao

Received: 5 July 2011 / Accepted: 22 December 2011 / Published online: 25 January 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Long bone abnormality (*lbab/lbab*) is a strain of dwarf mice. Recent studies revealed that the phenotype is caused by a spontaneous mutation in the *Nppc* gene, which encodes mouse C-type natriuretic peptide (CNP). In this study, we analyzed the chondrodysplastic skeletal phenotype of *lbab/lbab* mice. At birth, *lbab/lbab* mice are only slightly shorter than their wild-type littermates. Nevertheless, *lbab/lbab* mice do not undergo a growth spurt, and their final body and bone lengths are only ~60% of those of wild-type mice. Histological analysis revealed that the growth plate in *lbab/lbab* mice, especially the hypertrophic chondrocyte layer, was significantly thinner than in wild-type mice. Overexpression of CNP in the cartilage of *lbab/lbab* mice restored their thinned growth plate, followed by the complete rescue of their impaired endochondral bone growth. Furthermore, the bone volume in *lbab/lbab* mouse was severely decreased and was recovered by CNP overexpression. On the other hand, the thickness of the growth plate of *lbab/+* mice was not

different from that of wild-type mice; accordingly, impaired endochondral bone growth was not observed in *lbab/+* mice. In organ culture experiments, tibial explants from fetal *lbab/lbab* mice were significantly shorter than those from *lbab/+* mice and elongated by addition of 10^{-7} M CNP to the same extent as *lbab/+* tibiae treated with the same dose of CNP. These results demonstrate that *lbab/lbab* is a novel mouse model of chondrodysplasia caused by insufficient CNP action on endochondral ossification.

Keywords C-type natriuretic peptide · Long bone abnormality (*lbab*) · Chondrodysplasia · Endochondral bone growth · Organ culture

C-type natriuretic peptide (CNP) is a member of the natriuretic peptide family and exerts its biological actions through the accumulation of intracellular cyclic GMP via a subtype of membranous guanylyl cyclase receptor, guanylyl cyclase-B (GC-B) [1, 2]. We previously demonstrated that the CNP/GC-B system is a potent stimulator of endochondral bone growth: transgenic mice with targeted overexpression of CNP in cartilage under the control of type II collagen promoter [3] or those with elevated plasma CNP concentrations under the control of human serum amyloid P component promoter [4] exhibit a prominent skeletal overgrowth phenotype. On the other hand, the physiological importance of the CNP/GC-B system on endochondral bone growth has been revealed by the phenotypes of hypomorphs. We generated complete CNP or GC-B null mice and demonstrated that they exhibit an impaired bone growth phenotype [5, 6]. We have also reported that in two lines of spontaneous mutant mice, *cn/cn* and *slw/slw*, disproportionate dwarfism is caused by loss-of-function mutations in the murine GC-B gene [7, 8].

The authors have stated that they have no conflict of interest.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00223-011-9567-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Kondo · A. Yasoda (✉) · T. Fujii · M. Miura · N. Kanamoto · N. Tamura · H. Arai · K. Nakao
Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan
e-mail: yasoda@kuhp.kyoto-u.ac.jp

T. Tsuji · T. Kunieda
Department of Animal Science, Okayama University Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama 700-8530, Japan

The skeletal phenotypes of these mutant mice resemble those of GC-B knockout mice. Furthermore, recent studies have elucidated that loss-of-function mutations in the human GC-B gene are the causes of acromesomelic dysplasia type Maroteaux (AMDM), one form of skeletal dysplasia with a disproportionate short stature phenotype [9]. The impaired skeletal growth phenotype observed in patients suffering from AMDM is similar to the skeletal phenotype of *cn/cn*, *slw/slw*, and GC-B knockout mice.

The long bone abnormality (*lbab/lbab*) mouse was first identified in The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) as a spontaneous autosomal recessive mutant characterized by impaired growth of the long bones [10]. Recent studies have elucidated that the impaired growth of *lbab/lbab* mice is caused by a hypomorphic mutation in the CNP gene; Jiao et al. [11] found that its impaired growth phenotype is associated with a single point mutation in the mouse CNP gene, and we showed that this phenotype is completely recovered by CNP overexpression [12]. Yoder et al. [13] characterized the mutant CNP in *lbab/lbab* mice and demonstrated that it is less biologically active than authentic CNP; in whole-cell cGMP elevation and membrane guanylyl cyclase assays, 30-fold to greater than 100-fold more mutant CNP is required to activate GC-B compared to authentic CNP. We also confirmed that the mutant CNP in *lbab/lbab* mice retains only about 10% activity to induce cyclic GMP production through GC-B compared to authentic CNP in an in vitro transfection assay using COS-7 cells [12]. Collectively, *lbab/lbab* is a novel chondrodysplastic mouse model with insufficient CNP action on endochondral bone growth. Nevertheless, the skeletal phenotypes of *lbab/lbab* mice have only been partially described in short reports, including our own brief communication [11–13], and have not yet been fully studied. In this study, we performed further analyses of the skeletal phenotypes of *lbab/lbab* mice.

Materials and Methods

Mice

Heterozygous (*lbab/+*) mice (C57BL/6 J background) were obtained from The Jackson Laboratory, and the strain was maintained by sib mating of heterozygotes. Transgenic mice with targeted overexpression of CNP in the growth plate chondrocytes under the control of the mouse pro- α_1 (II) (*Col2a1*) promoter (CNP-Tg) were created as reported previously [3]. To perform genetic rescue of *lbab/lbab* mice, CNP-Tg mice were mated with *lbab/+* mice, and F₁ offspring heterozygous for the transgene and for the *lbab* allele were mated with those with only the *lbab* allele

to generate *lbab/lbab* mice with the transgene expression (*lbab/lbab*-CNP-Tg/+ mice) [12]. Genotypes for the CNP transgene and the *lbab* allele were determined by PCR analysis using mouse genomic DNAs extracted from tails. Because there was no tendency of gender differences in the growth of each genotype (data not shown), we used only female mice in our experiments. Animal care and all experiments were conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments of Kyoto University and were approved by the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Kyoto University.

Skeletal Analysis

For 10 weeks after birth, body lengths of female mice were measured weekly. Body length was measured as the length from the nose to the anus (nasoanal length) or that from the nose to the tip of the tail (nose–tail length). Body weights were also measured weekly. Skeletal analysis was performed as previously described [14]. Briefly, mice were subjected to soft X-ray analysis (30 kVp, 5 mA for 1 min; Softron type SRO-M5; Softron, Tokyo, Japan), and lengths of the bones were measured on the X-ray films. CT scanning of the humerus was performed using a ScanXmate-L090 Scanner (Comscantechno, Yokohama, Japan). Three-dimensional microstructural image data were reconstructed and structural indices calculated using TRI/3D-BON software (RATOC System Engineering, Tokyo, Japan).

Histological Examination

Tibiae were fixed in 10% formalin neutral buffer, decalcified in 10% EDTA, and embedded in paraffin. Sections (5 μ m thick) were sliced and stained with alcian blue (pH 2.5) and hematoxylin–eosin. For immunohistochemistry, sections were incubated with rabbit anti-type X collagen antibody (LSL, Tokyo, Japan), goat anti-Indian hedgehog (Ihh) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mouse anti-matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody (Dako, Copenhagen, Denmark). Immunostaining was performed using the Histofine Mousestain Kit (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instruction. Peroxidase activity was visualized using diaminobenzidine. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and then mounted with malinol (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan). To confirm antibody specificity, normal rabbit serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), normal goat IgG (Santa Cruz Biotechnology), and mouse IgG (Dako) were used as first antibodies for negative controls.

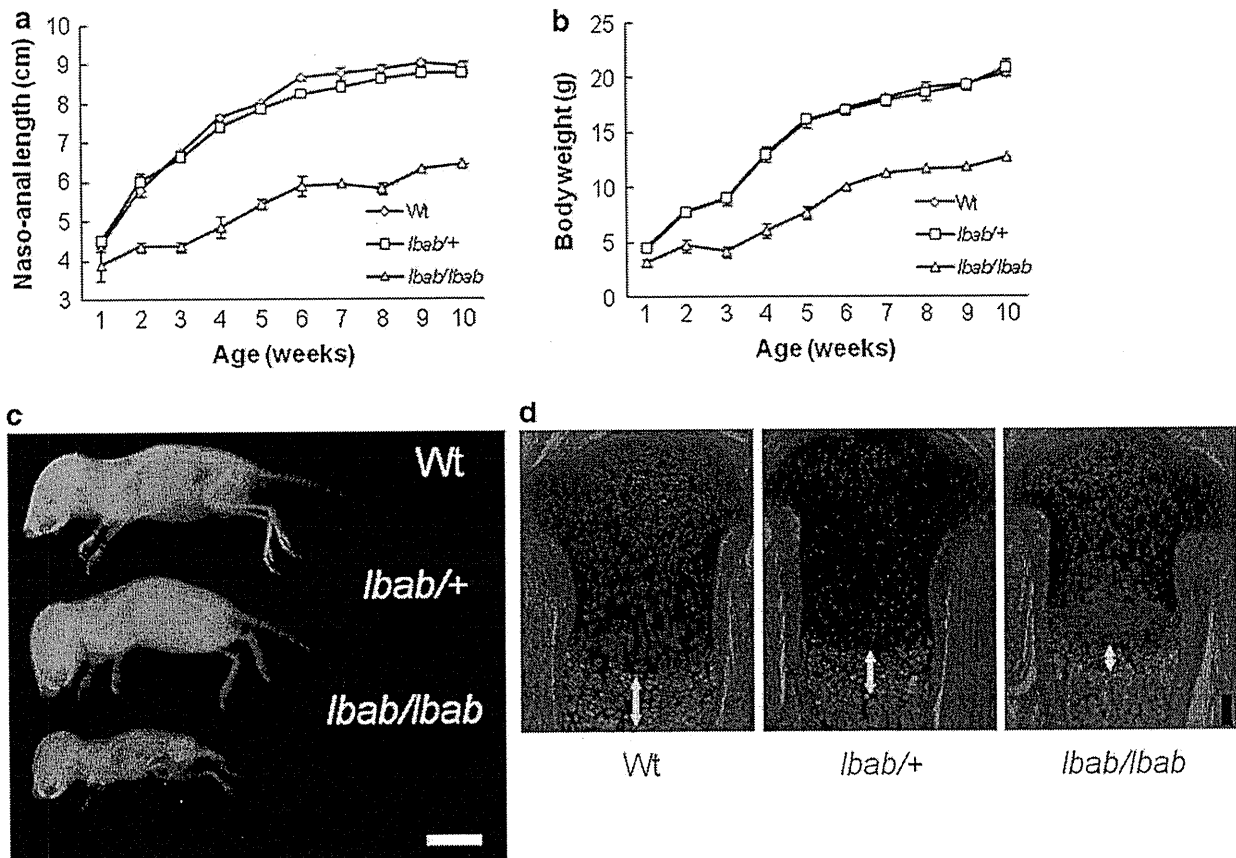


Fig. 1 Growth and skeletal phenotype of *lbab*^{+/+} and *lbab*^{/lbab} mice. Nasoanal lengths (**a**) and body weights (**b**) of female wild-type (*Wt*, open diamond), *lbab*^{+/+} (open square), and *lbab*^{/lbab} (open triangle) mice ($n = 2-8$). **c** Whole skeletons of wild-type, *lbab*^{+/+}, and *lbab*^{/lbab}

lbab mice at 2 weeks of age. Scale bar 1 cm. **d** Histological analysis of the tibial growth plates of 3-day-old mice. Arrows indicate hypertrophic chondrocyte layers. Alcian blue and hematoxylin–eosin staining. Scale bar 100 μ m

Organ Culture

Organ culture of fetal mouse tibiae or third metatarsi was performed as described previously [15]. Tibial or metatarsal explants from *lbab*^{+/+} mice and their *lbab*^{/lbab} littermates at 16.5 days postcoitus were cultured for 4 days with vehicle or 10^{-7} M CNP (Peptide Institute, Minoh, Japan). Medium was changed every day. Before and after the culture, the maximal longitudinal lengths of tibiae were measured as the total tibial length, the sum of the lengths of proximal and distal cartilaginous primordia (CP), and the length of the osteogenic center (OC), using a linear ocular scale mounted on an inverted microscope. For histological analysis, explants were fixed in 10% formalin neutral buffer and embedded in paraffin. Sections (5 μ m thick) were sliced and stained with alcian blue (pH 2.5) and hematoxylin–eosin. Immunohistochemical staining of incorporated bromodeoxyuridine (BrdU) was performed using 5-Bromo-2'-deoxyuridine labeling and detection kit II (Roche Applied Science,

Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol.

Statistical Analysis

Data were expressed as the mean \pm SEM. The statistical significance of differences between mean values was assessed using Student's *t*-test.

Results

Analyses of Skeletal Growth of *lbab*^{/lbab} and *lbab*^{+/+} Mice

As previously reported, *lbab*^{/lbab} mice developed severe dwarfism characterized by short tails and extremities [11, 12]. At birth, *lbab*^{/lbab} pups were slightly shorter than their wild-type littermates: the nasoanal and nose–tail lengths of *lbab*^{/lbab} mice were 88 and 83% of those of

their wild-type littermates, respectively (Fig. 1a, Supplemental Fig. 1). The ratios of nasoanal and nose–tail lengths of *lbab/lbab* mice to those of wild-type mice sharply decreased to 65% and 55%, respectively, by the age of 3 weeks. After 5 weeks of age, these ratios stabilized at 66–72% and 57–62%, respectively (Fig. 1a, Supplemental Fig. 1). The body weight of *lbab/lbab* mice was 68% of that of their wild-type littermates at birth and decreased to 46% by the age of 3 weeks. The ratio did not increase until 5 weeks of age, becoming ~60% after 7 weeks (Fig. 1b). On the other hand, *lbab/+* mice were indistinguishable from their wild-type littermates at birth and grew almost similarly (Fig. 1a,b, Supplemental Fig. 1). Soft X-ray analysis revealed that longitudinal growth of the vertebrae, tail, and extremities was affected in *lbab/lbab* mice at the age of 2 weeks but was not affected in *lbab/+* mice (Fig. 1c). Histological analysis revealed that at the age of 3 days the tibial growth plate, especially the hypertrophic chondrocyte layer, of *lbab/lbab* mice was apparently thinner than that of wild-type mice (Fig. 1d). On the other hand, the thickness of the tibial growth plate of *lbab/+* mice was not different from that of wild-type mice (Fig. 1d).

Effect of CNP Overexpression on Impaired Endochondral Bone Growth of *lbab/lbab* Mice

In order to further characterize the impaired skeletal growth of *lbab/lbab* mice, we analyzed how their impaired endochondral bone growth recovered in response to targeted overexpression of CNP in the cartilage in vivo [12]. We crossed *lbab/lbab* mice with cartilage-specific CNP transgenic mice under the control of type II collagen promoter (CNP-Tg mice) and obtained *lbab/lbab* mice with transgenic expression of CNP in cartilage (*lbab/lbab*-CNP-Tg mice) [12]. At the first week after birth, the nasoanal length of *lbab/lbab*-CNP-Tg mice was almost the same as that of *lbab/lbab* mice and considerably smaller than that of wild-type mice: nasoanal lengths of wild-type, *lbab/lbab*, and *lbab/lbab*-CNP-Tg mice were 4.38 ± 0.06 , 3.87 ± 0.37 , and 4.00 ± 0.12 cm, respectively. Subsequently, *lbab/lbab*-CNP-Tg mice began to grow larger than *lbab/lbab* mice and promptly caught up with wild-type mice; although the nasoanal length of *lbab/lbab*-CNP-Tg mice was still considerably smaller than that of wild-type mice until 3 weeks of age (5.70 ± 0.57 and 6.71 ± 0.10 cm, respectively, at age 3 weeks), it became almost comparable to that of wild-type mice after 4 weeks (7.38 ± 0.48 and 7.61 ± 0.10 cm, respectively, at age 4 weeks). Further, the body weight of *lbab/lbab*-CNP-Tg mice was almost the same as that of *lbab/lbab* mice and smaller than that of wild-type mice until the age of 3 weeks but then promptly

increased to a level comparable to that of wild-type mice (Supplemental Fig. 2).

Soft X-ray analyses revealed that at the age of 2 weeks the impaired growth of bones formed through endochondral ossification in *lbab/lbab* mice was partially recovered by targeted overexpression of CNP in cartilage in *lbab/lbab*-CNP-Tg mice (Fig. 2a): the recoveries in the longitudinal length of cranium and the lengths of the humerus, radius, ulna, femur, tibia, and vertebrae were 35, 73, 68, 37, 51, 63, and 27%, respectively (Fig. 2b). Furthermore, at the age of 10 weeks, the impaired endochondral bone growth in *lbab/lbab* mice was almost completely recovered by targeted overexpression of CNP in cartilage, as observed in *lbab/lbab*-CNP-Tg mice (Fig. 2c, d). On the other hand, there were no significant differences in the width of the cranium, which is formed via intramembranous ossification, among the three genotypes at either 2 or 10 weeks (Fig. 2b, d).

Histological analysis showed that the thickness of both the proliferative chondrocyte layer and the hypertrophic chondrocyte layer, positive for immunohistochemical staining for type X collagen, was significantly decreased in *lbab/lbab* mice compared to wild-type mice at the age of 2 weeks, as previously reported [12] (Fig. 3a, b). The thinner proliferative chondrocyte layer in the *lbab/lbab* growth plate was completely recovered by targeted overexpression of CNP as observed in the *lbab/lbab*-CNP-Tg growth plate (Fig. 3c). The thinner hypertrophic chondrocyte layer in the *lbab/lbab* growth plate was also considerably recovered in the *lbab/lbab*-CNP-Tg growth plate, although the extent of the recovery was less than in the proliferative chondrocyte layer (Fig. 3d). Immunohistochemical staining for PCNA revealed that the number of PCNA-positive cells was severely decreased in the proliferative chondrocyte layer of the *lbab/lbab* growth plate (Fig. 3e). The number of PCNA-positive cells did not recover in the proliferative chondrocyte layer of the *lbab/lbab*-CNP-Tg growth plate, whereas the thinner proliferative chondrocyte layer in the *lbab/lbab* growth plate was almost completely recovered in the *lbab/lbab*-CNP-Tg growth plate (Fig. 3c). The area positive for immunostaining of Ihh, one of the markers of hypertrophic differentiation, was decreased in the *lbab/lbab* growth plate compared to the wild-type growth plate (Fig. 3f). The smaller size of the area positive for Ihh in the *lbab/lbab* growth plate was almost completely recovered in the *lbab/lbab*-CNP-Tg growth plate (Fig. 3f). Immunohistochemical staining of MMP-13, a useful marker for terminal hypertrophic chondrocytes, was not changed between the three genotypes, indicating that the progression through the hypertrophy program was not accelerated in the *lbab/lbab* growth plate (Fig. 3g).

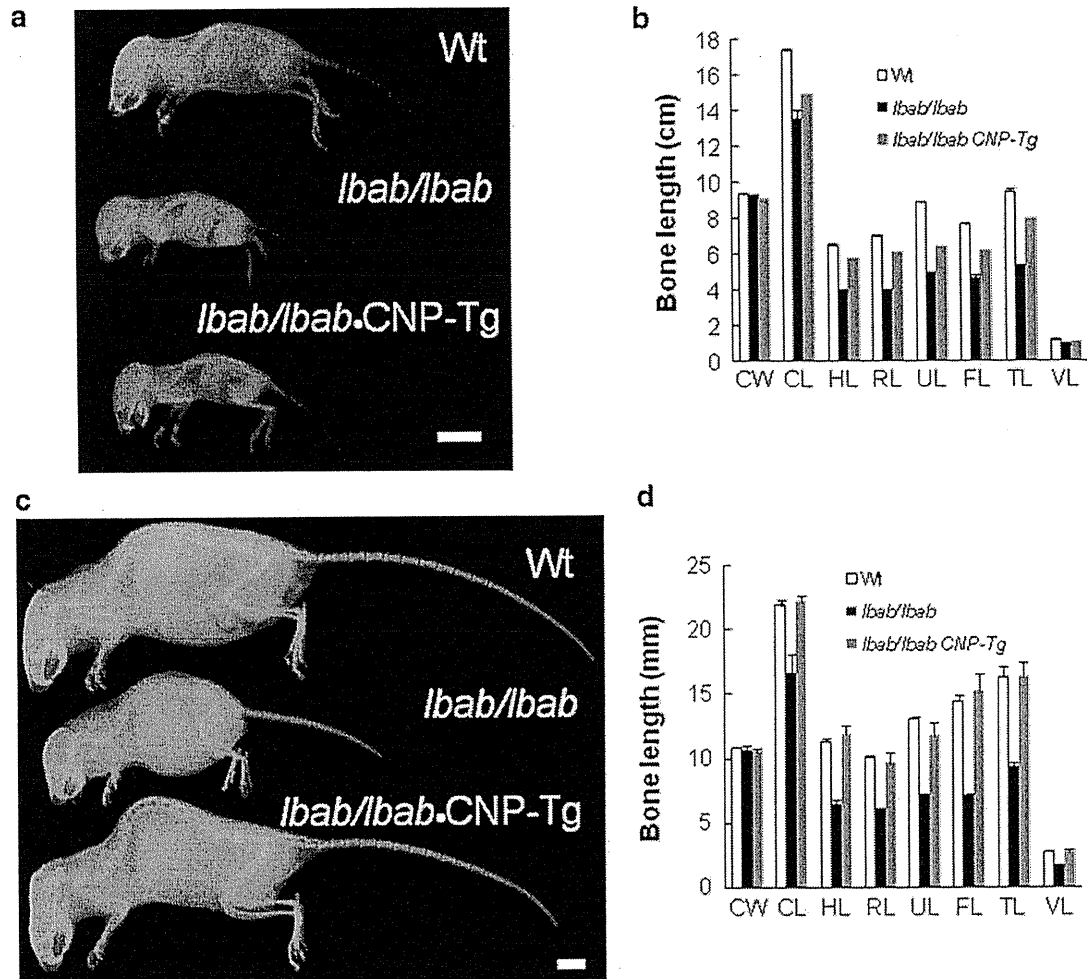


Fig. 2 Effect of CNP overexpression on impaired endochondral bone growth of *lbat/lbat* mice. Whole skeletons (a, c) and bone lengths measured on soft X-ray films (b, d) of female wild-type (Wt), *lbat/lbat*, and *lbat/lbat*.CNP-Tg mice at the age of 2 weeks (a, b) and 10 weeks (c, d). a, c Scale bar 1 cm. b, d White bars, wild-type mice;

black bars, *lbat/lbat* mice; gray bars, *lbat/lbat*.CNP-Tg mice. CW, width of cranium; CL, longitudinal length of cranium; HL, humeral length; RL, radial length; UL, ulnar length; FL, femoral length; TL, tibial length; VL, vertebral length. n = 2–7 (b) and 3–5 (d) (Color figure online)

At the age of 10 weeks, the tibial growth plate of *lbat/lbat* mice continued to be thinner than that of wild-type mice and was completely recovered by overexpression of CNP in cartilage (Fig. 4).

Recovery of Decreased Bone Volume in *lbat/lbat* Mouse by CNP Overexpression

Three-dimensional CT analysis manifested a marked reduction in bone volume of the humerus in *lbat/lbat* mice and considerable recovery in *lbat/lbat*.CNP-Tg mice (Fig. 5). At the age of 10 weeks, the quantified bone volume (BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th) of the humerus in *lbat/lbat* mice were 2.4% and 34.5 μ m, whereas those in wild-type mice were 4.1% and 40.3 μ m, respectively. The decreased BV/TV and Tb.Th in *lbat/lbat*

mice were increased to 5.4% and 37.0 μ m, respectively, in *lbat/lbat*.CNP-Tg mice.

Organ Culture Experiments of Tibiae from *lbat/lbat* Mice

In order to further analyze the impaired endochondral ossification of *lbat/lbat* mice, we preformed organ culture experiments using tibial explants from fetal mice (Fig. 6a) [15]. Because skeletal phenotypes of mice heterozygous for the *lbat* allele were not different from those of wild-type mice, we compared the growth of tibial explants from *lbat/lbat* mice with that from *lbat/+* mice. At the beginning of culture, both the total length and the sum length of the CP of *lbat/lbat* tibiae were significantly smaller than those of *lbat/+* tibiae (3.80 ± 0.04

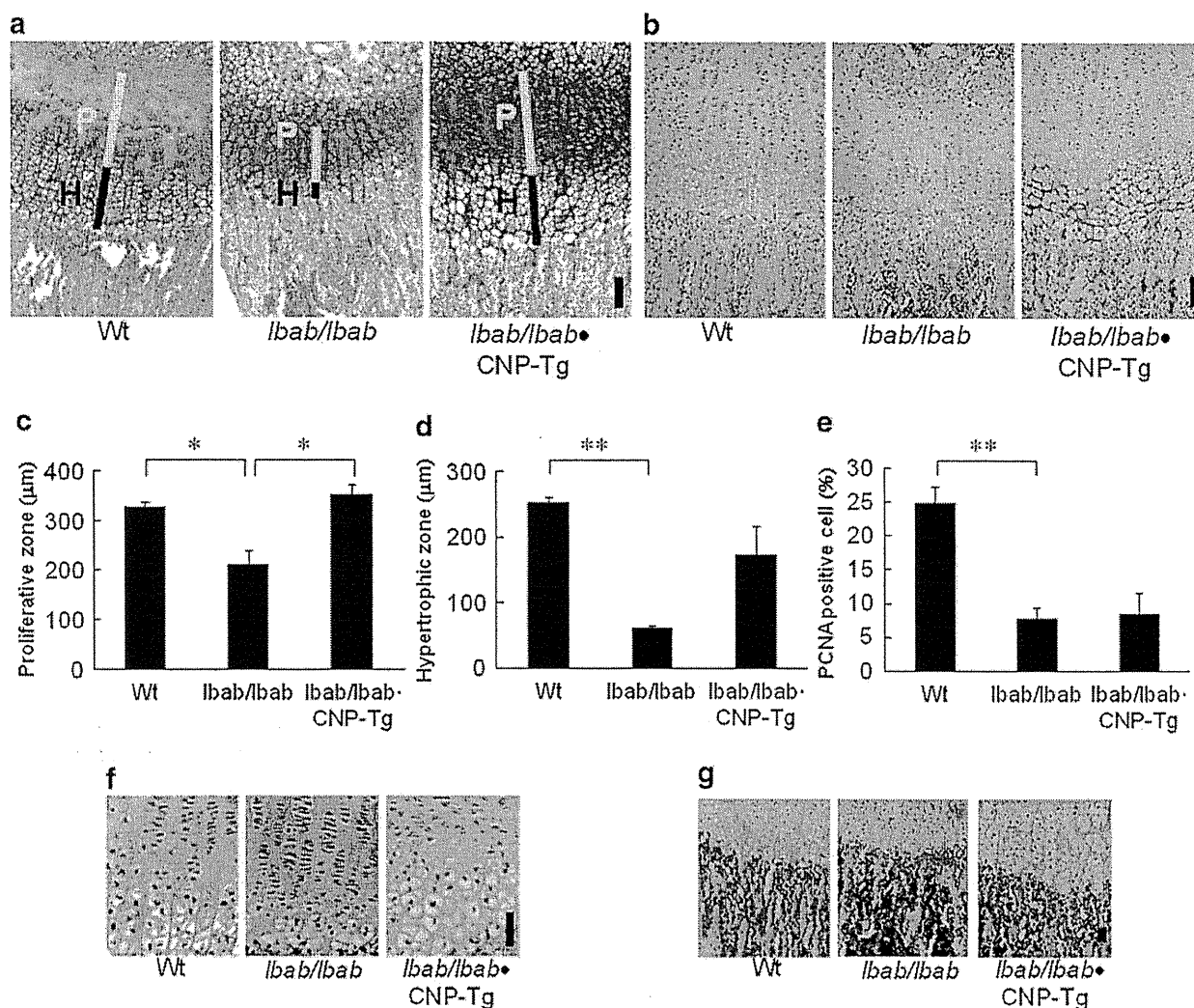


Fig. 3 Histological analysis of tibial growth plates from 2-week-old wild-type (*Wt*), *lbat/lbat*, and *lbat/lbat*-CNP-Tg mice. **a** Alcian blue and hematoxylin-eosin staining. Yellow bars (depicted as *P*) indicate proliferative chondrocyte layers, and red bars (depicted as *H*) indicate hypertrophic chondrocyte layers. **b** Immunohistochemical staining for type X collagen. Scale bar in **a** and **b** = 100 µm. Heights of the

proliferative (**c**) and hypertrophic (**d**) chondrocyte layers. $n = 3$ each. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. **e** The proportion of PCNA-positive chondrocytes in proliferative chondrocyte layers. $n = 3-4$. $**P < 0.01$. Immunohistochemical staining of *Ihh* (**f**) and *MMP-13* (**g**). Scale bar in **f** and **g** = 50 µm

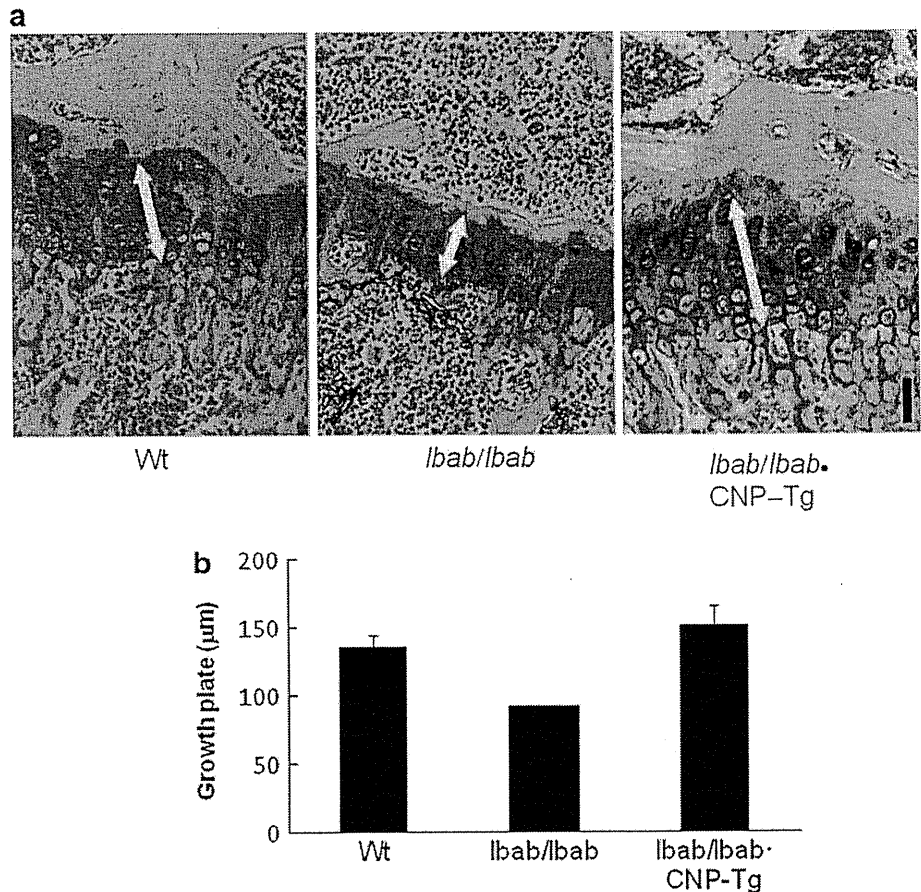
vs. 4.25 ± 0.03 and 2.19 ± 0.02 vs. 2.43 ± 0.01 mm, respectively, $n = 8-12$ each) (Fig. 6b, c). Tibial explants from *lbat/lbat* mice grew to the same extent as those from *lbat/+* mice during a 4-day culture period; the difference in the total length or in the length of the CP between *lbat/lbat* and *lbat/+* explants at the end of culture was comparable to that at the beginning of culture (Fig. 6b, c). There was no significant difference in the length of the OC between the two genotypes before and after the culture period (data not shown).

The treatment of CNP at the dose of 10^{-7} M stimulated the growth of both *lbat/lbat* and *lbat/+* tibiae (Fig. 6b, c). CNP stimulated the growth of *lbat/lbat*

tibiae more potently than that of *lbat/+* tibiae; in the presence of 10^{-7} M CNP, the difference between the total length of *lbat/+* tibiae and that of *lbat/lbat* tibiae was decreased (Fig. 6b), and furthermore, the CP length of *lbat/lbat* tibiae became almost the same as that of *lbat/+* tibiae (Fig. 6c). The growth of the OC was not stimulated by CNP in either *lbat/lbat* or *lbat/+* explants (data not shown).

Histological examination at the end of the culture period revealed that the length of the primordial growth plate (Fig. 7a), especially that of the hypertrophic chondrocyte layer positive for type X collagen immunostaining (Fig. 7b,c), was smaller in *lbat/lbat* explants than in

Fig. 4 Histological analysis of tibial growth plate from female 10-week-old wild-type (*Wt*), *lbab/lbab*, and *lbab/lbab*-CNP-Tg mice. **a** Alcian blue and hematoxylin–eosin staining. Arrows indicate the width of growth plates. Scale bar 50 μm . **b** Total heights of the growth plates. $n = 2\text{--}5$ each



lbab/+ explants. The area positive for immunostaining for *Ihh*, one of the markers for chondrogenic differentiation [16], tended to be a little decreased in *lbab/lbab* explants compared to that in *lbab/+* explants, although the intensity of the immunostaining was not different between the two genotypes (Supplemental Fig. 3). Immunohistochemical detection of BrdU-incorporated chondrocytes revealed that BrdU-positive chondrocytes tended to be decreased in *lbab/lbab* explants compared to those in *lbab/+* explants (Fig. 7d). Addition of CNP prominently increased the lengths of primordial growth plates (Fig. 7a) and their hypertrophic chondrocyte layers (Fig. 7b, c) of both *lbab/+* and *lbab/lbab* explants. The lengths of the primordial growth plate and its hypertrophic chondrocyte layer of *lbab/lbab* explants treated with 10^{-7} M CNP became comparable to those of *lbab/+* explants treated with the same dose of CNP (Fig. 7a–c). CNP increased the areas positive for *Ihh* immunostaining in both *lbab/+* and *lbab/lbab* explants. By addition of CNP, the sizes of the areas positive for, and the intensities of, *Ihh* immunostaining were not different between *lbab/+* and *lbab/lbab* explants (Supplemental Fig. 3). CNP did not

increase BrdU-positive chondrocytes in *lbab/lbab* explants (Fig. 7d).

Further, we explored whether CNP controls the progression of growth plate chondrocytes through the different stages of maturation or not. Because the process of endochondral ossification is delayed in the metatarsus compared to that in the tibia in an individual, we performed organ culture of metatarsi as well as tibiae from fetal mice at 16.5-days postcoitus and examined the expression of type X collagen and *Ihh*. In the case of *lbab/+* organ culture, the area positive for immunostaining of type X collagen was reduced and that of *Ihh* was localized near the ossification center in metatarsal explants compared with those in tibial explants, indicating that the metatarsal growth plate represents an earlier stage of endochondral ossification than the tibial growth plate (Fig. 8). The area positive for immunostaining of type X collagen was greatly reduced in *lbab/lbab* metatarsal explants compared with that in *lbab/+* metatarsal explants and recovered by addition of 10^{-7} M CNP to the same extent to that in *lbab/+* metatarsal explants treated with vehicle. The area positive for immunostaining of *Ihh* became closer to ossification center