

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09881

研究課題名(和文) CNP/NPR-Bシグナルによる骨伸長促進作用のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the promoting effect of CNP/NPR-B signaling on endochondral bone growth

研究代表者

八十田 明宏 (Yasoda, Akihiro)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・その他部局等・臨床研究センター長

研究者番号：50378642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は成長板における成長因子として強力に骨伸長を促進する。本研究はマウス胎仔長管骨器官培養系を用いて、イメージング技術によりその形態学的な動態を解析し、一方ではシグナル伝達物質の解析をおこなって、CNPの成長板における作用の分子カスケードを解明することを目的とした。発現遺伝子のアレイ解析により、CNPとERK阻害剤により変化した遺伝子群は相関し、両者は二光子顕微鏡によるCGA-EGFPマウス胎仔尺骨の器官培養のイメージング解析にて同等の成長板伸長促進作用を認めた。以上より、CNPの成長板におけるシグナル伝達系としてERKシグナルが重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CNP/NPR-Bシグナルの骨伸長促進作用は強力であり、現在、軟骨無形成症をはじめとする骨伸長障害に対する展開研究や臨床応用が進められている。本研究ではCNP/NPR-Bシグナルの分子カスケードについて、最近注目されているシグネチャー解析による解明を試み、さらに二光子蛍光顕微鏡を用いて哺乳類成長板ではじめての4Dイメージング解析をおこなってその成果をフィードバックし、ERKシグナルがCNPの成長板軟骨の伸長促進に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：C-type natriuretic peptide (CNP) potently promotes endochondral bone growth as an intrinsic growth factor. Here we aimed to elucidate molecular cascade of the growth promoting effect of CNP in the growth plate by using array analyses of expressing genes, as well as morphological analyses of dynamic imaging of tissue culture using fetal murine long bones. We performed gene set enrichment analysis (GSEA) of two gene sets, i.e., the subtraction of expressing genes in the growth plate of CNP knockout rats treated with vehicle from those with CNP, and that of wild-type rats treated with vehicle from those with an ERK inhibitor, U0126. The resultant two gene sets correlated well, and furthermore, live imaging analyses using two-photon microscope revealed that CNP and U0126 displayed similar growth promoting effect of explanted ulnae from fetal CGA-EGFP mice. These results indicate that ERK pathway is important as an intracellular signaling of the effect of CNP on endochondral bone growth.

研究分野：内分泌学

キーワード：骨伸長 CNP 器官培養 成長板 シグネチャー イメージング 二光子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の四肢長管骨や椎骨などほとんどの骨は、内軟骨性骨化 (endochondral ossification) とよばれる様式により形成され、伸長する。すなわち、発生過程においてまず軟骨の鋳型が形成され、その鋳型が中心部から血管とともに侵入する骨芽細胞等によって石灰化骨に置換されて形成される。そして、その伸長に関してもっとも重要な要素は、鋳型となる軟骨 = 成長板軟骨の伸長である。

成長板軟骨における調節因子としては、PTHrP-Ihh、FGF、BMP、IGF-I、SOX 等、様々な分子やそのシグナル伝達系が知られているが、最終的に骨伸長を促進する因子は少ない (Kronenberg, *Nature* 2003)。申請者らはこれまでに、C型ナトリウム利尿ペプチド (C-type natriuretic peptide : CNP) とその受容体である B 型ナトリウム利尿ペプチド受容体 (natriuretic peptide receptor-B : NPR-B) が強力な骨伸長促進作用をもつことを報告してきた。CNP は 22 個のアミノ酸からなる小ペプチドであり、受容体である NPR-B は膜型グアニル酸シクラーゼそのものであって CNP の結合により細胞内セカンドメッセンジャー cGMP を産生して生物作用を発揮するが (図 2A)、両者は成長板軟骨に発現する。そして、CNP あるいは NPR-B の成長板軟骨特異的ノックアウトマウスでは骨長が対照マウスの 60~70%程度にとどまる著しい骨伸長障害を来すのに対して (Nakao et al., *Sci. Rep.* 2015)、CNP の成長板軟骨特異的過剰発現トランスジェニックマウスでは著明な骨の過伸長を認めることから (Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004) CNP/NPR-B 系が成長板軟骨由来の非常に強力な骨伸長促進因子であることを明らかにした。

このように CNP/NPR-B 系は非常に強い骨伸長促進作用をもつが、そのメカニズムについて、軟骨細胞の増殖や分化への軽微な関与が示されてきたものの、その本態については不明であった。その理由として、これまでの解析方法が組織切片による空間的・時間的に極めて限定されたものであったことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、成長板軟骨を *ex vivo* で観察可能とするマウス胎仔長管骨の器官培養を用いて、(1) 二光子蛍光顕微鏡を用いた 4D イメージングによるダイナミックな形態学的変化の解析および (2) 各種細胞内シグナル伝達経路の阻害剤による変動遺伝子群 (シグネチャー) との比較による分子カスケードの解析、そして最後に、(3) (2) の解析結果を (1) の 4D イメージングで検証することにより、CNP/NPR-B 系の骨伸長促進作用のメカニズムとしての形態学的な本態および分子カスケードを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、(1) マウス胎仔長管骨器官培養において、マウス成長板軟骨の伸長を、二光子蛍光顕微鏡を用いた 4D イメージングにより観察し、解析する方法を確立する。この系に CNP を添加してその変化を解析し、CNP の成長板軟骨伸長促進作用の形態学的な本態を解明する。申請者らは、器官培養における CNP のマウス成長板軟骨に対する伸長促進作用を報告しているが (Yasoda et al., *J. Biol. Chem.* 1998)、4D イメージング解析における成長板の伸長に関する

各パラメーター（軟骨細胞の分裂能、収斂伸長 convergent extension、娘細胞再配列 daughter cell rearrangement、細胞質あるいは基質の量的変化）に対する CNP の作用を定量化して解析する。

次に、（２）CNP/NPR-B 系の骨伸長促進作用の分子カスケードについて、まず、様々な細胞内シグナル経路の阻害剤（MEK 阻害剤、PI3 キナーゼ阻害剤等）のマウス胎仔長管骨器官培養における作用（伸長促進あるいは抑制）をスクリーニングしたのち、DNA アレイにより各種阻害剤添加による変動遺伝子群を同定する。これらと、CNP ノックアウトマウスの成長板に対する CNP 添加による変動遺伝子群を比較して解析することにより、CNP/NPR-B シグナルと関連の強い細胞内シグナル経路を抽出し、同定する。

最後に、（３）では、（２）で同定された阻害剤単独あるいは CNP との共添加によるマウス成長板の形態学的変化を（１）の 4D イメージングの手法で観察・解析し、（２）で導き出された結果の妥当性を検証する。

平成 29 年度の計画

（１）二光子蛍光顕微鏡を用いた 4D イメージングによる CNP の成長板軟骨伸長促進作用の形態学的解析

【マウス成長板 4D イメージング系の確立】二光子蛍光顕微鏡による 4D イメージングを可能とする以下の２種類の蛍光発色マウスを使用する。

１）Rosa26-H2B-mCherry マウス：全身の細胞核が蛍光発色、核のトラッキング＝軟骨細胞の動きの観察 ２）CGA-EGFP マウス（グリーンマウス）：全身の細胞質全体を蛍光発色、細胞質および間質（基質）の容量変化の観察

これらのマウスの胎生 16.5 日胎仔より中手骨を摘出し、骨幹部をゲルで固定した状態でフェノールレッド不含の培養液を用いた器官培養（静置培養）をおこなう。培養開始時から、開始後 48 時間の中手骨器官培養体を、インキュベーター二光子蛍光顕微鏡（Olympus LCV110-MPE）を用いてタイムラプスイメージング（微速度撮影）により撮影する。

撮影画像を、１）軟骨細胞の動き＝移動距離に関しては画像解析ソフト IMARIS により、２）細胞質および基質の容量変化については MetaMorph により解析し、変化を定量化する。さらに、ニワトリの成長板軟骨を用いた既報（Li et al., *Nat. Commun.* 2015）を参考として、１）で定量化される軟骨細胞の動きの各要素（細胞の分裂能、収斂伸長、娘細胞再配列）、および２）で定量化される細胞質あるいは基質の量的変化が、最終的に １）の全体としてのトラッキングにより観察される軟骨細胞の動きに寄与する程度を確定する。

【4D イメージングによるマウス成長板に対する CNP の作用の解析】確立した 4D イメージング系において CNP（ 10^{-7} M）を添加し、CNP の成長板軟骨伸長促進作用を確認したうえで、上述の １）軟骨細胞の動き、および ２）細胞質・基質の変化に対する CNP の作用を解析する。既報では、ニワトリの成長板軟骨において、軟骨細胞の動きの各要素のうちで、最終的にトラッキングで観察される軟骨細胞の動きにもっとも大きく寄与するものが ２）で観察される細胞質・基質の増大であると結論づけられたが（Li et al., *Nat. Commun.* 2015）、本研究ではマウスにおいても各要素の寄与度を解明し、CNP が実際これらの要素にどのように影響を与えるかについて明らかにする。

本研究は京都大学大学院医学研究科病態生物医学（松田研究室）との共同研究のもと、京都大学

蛍光生体イメージングセンターにおいて研究協力者の廣田(大学院生)が中心となっておこなう。また、申請者は文部科学省科学研究費助成事業「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」より支援を受けており、同イメージングセンターに設置してある二光子蛍光顕微鏡(Olympus LCV110-MPE)に関しては半額の利用料金での使用が可能となっている。

平成30年度以降の計画(可能なら、RNA抽出等まで平成29年度に先行して施行)

(2) CNPの成長板軟骨伸長促進作用の分子カスケードに関するシグネチャー実験

【CNPの骨伸長促進作用において変動する遺伝子のアレイ解析】胎生16.5日 CNP ノックアウトマウス(Cusho et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2001) 胎仔より摘出した脛骨を、CNP 添加群および非添加群に分けて2日間培養し、近位部骨端軟骨(成長板軟骨)より RNA を抽出し、マイクロアレイにより両群の発現遺伝子の差を解析する。

* ノックアウトマウスからの RNA 収量が少ないため実験の遂行が困難な場合は、同じ齧歯類として最近申請者が開発した CNP ノックアウトラット(現在論文投稿中)の成長板軟骨からアレイデータを取得する。

【各種シグナル伝達経路阻害剤の骨伸長におよぼす作用の検討】上述の CNP ノックアウトマウス胎仔脛骨器官培養において、これまでに内軟骨性骨化に影響をおよぼすことが報告されているさまざまなシグナル伝達経路(ERK、p38、PI3 kinase 等)の阻害剤を、CNP 添加下、あるいは非添加下に添加して、培養体の伸長に対する作用を形態学的・組織学的に解析する(スクリーニング)。培養体の伸長に大きな作用を与えた阻害剤を優先的に以下のアレイ実験に使用する。
* ノックアウトマウスの出生が少ない等、獲得が困難な場合は、野生型マウスからの胎仔脛骨器官培養体を用いて阻害剤の効果スクリーニングすることを検討する。

【各種シグナル伝達経路阻害剤により変動する遺伝子のアレイ解析】CNP 添加の場合と同様に、CNP ノックアウトマウス胎仔脛骨器官培養に対して、前年度候補として選定したシグナル伝達経路阻害剤を、添加あるいは非添加にて2日間培養し、添加群と非添加群における発現遺伝子の変化をマイクロアレイで解析する。

先に得られた CNP 添加による発現遺伝子変化のプロファイル(シグネチャー)と、それぞれのシグナル伝達経路阻害剤添加によるシグネチャーとの相関を、専用のソフトウェアで解析し、CNP の骨伸長促進作用に対する各シグナル伝達経路の寄与度を解明する。シグネチャー解析は、研究協力者 吉清、古谷(アスピオファーマ株式会社)との共同研究でおこない(共同研究契約締結済)、同社で開発した解析ソフトを使用する。最終的に CNP の作用との連関が強いシグナル経路を抽出し、スクリーニングの添加実験の結果と照合する。

(3) シグネチャー解析の結果の4Dイメージング解析への還元と検証

同定された CNP の作用との連関が強いシグナル経路について、阻害剤の添加による変化を、適宜 CNP との共添加も併せて、(1)の4Dイメージングにおいて検証する。さらに、その経路の可視化マウスが連携研究者 松田より入手可能な場合(ERK、JNK 等)、CNP 添加によるこれらのシグナルの変化を4Dイメージングにより観察・確認する。

4 . 研究成果

平成 29 年度

二光子蛍光顕微鏡を用いた 4D イメージングによる CNP の成長板軟骨伸長促進作用の形態学的解析について、CGA-EGFP マウス(グリーンマウス) の胎生 16.5 日胎仔より尺骨を摘出し、骨幹部をゲルで固定した状態で器官培養(静置培養)をおこない、インキュベーター二光子蛍光顕微鏡(Olympus LCV110- MPE)を用いてタイムラプスイメージング(微速度撮影)により撮影する系を確立した。

確立した 4D イメージング系において CNP(10⁻⁷ M)を添加し、CNP の成長板軟骨伸長促進作用を確認したうえで、上述の 1)軟骨細胞の動き、および 2)細胞質・ 基質の変化に対する CNP の作用を解析した。

平成 30 年度

分子カスケードの解明としておこなうシグネチャー解析の前段階として、主な成長板伸長調節系である ERK シグナル伝達系の阻害剤である U0126 の、同じくマウス胎仔長管骨器官培養系における巨視的な作用を確認した。その結果、U0126 が長管骨培養体の成長板軟 骨の伸長を強力に促進することを確認した。それを受けて、次年度のシグネチャー解析を行うための準備として CNP、ERK 阻害剤を添加したマウス胎仔長管骨器官 培養系の成長板軟骨から RNA 抽出をおこなった。

平成 31 / 令和 1 年度

CNP の成長板における作用を解析するためにシグナルカスケードの検討をおこなった。CNP によるシグナルをより 明確に表出するために、CNP ノックアウトラット胎仔脛骨の器官培養において vehicle あるいは CNP を添加した 2 群の遺伝子アレイセットを使用して、野生型ラット胎仔脛骨の器官培養に vehicle あるいは ERK 阻害剤を添加した 2 群の遺伝子アレイセットとの比較において gene set enrichment analysis (GSEA) を施行した。 その結果、ERK 阻害剤により変化した遺伝子群、とくに低下した遺伝子群と CNP 添加により変化した遺伝子群はよく相関し、CNP の成長板におけるシグナル伝達系 として ERK シグナルが重要であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirota Keisho, Yasoda Akihiro, Kanai Yugo, Ueda Yohei, Yamauchi Ichiro, Yamashita Takafumi, Sakane Yoriko, Fujii Toshihito, Inagaki Nobuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Live imaging analysis of the growth plate in a murine long bone explanted culture system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-28742-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirota Keisho, Furuya Mayumi, ... Yasoda Akihiro, Inagaki Nobuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Exogenous C-type natriuretic peptide restores normal growth and prevents early growth plate closure in its deficient rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e204172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 八十田 明宏、金井 有吾	4. 巻 32
2. 論文標題 オステオクリンとC型ナトリウム利尿ペプチド	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と骨代謝	6. 最初と最後の頁 158-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanai Y, Yasoda A, Mori KP, Watanabe-Takano H, Nagai-Okatani C, Yamashita Y, Hirota K, Ueda Y, Yamauchi I, Kondo E, Yamanaka S, Sakane Y, Nakao K, Fujii T, Yokoi H, Minamino N, Mukoyama M, Mochizuki N, Inagaki N.	4. 巻 127
2. 論文標題 Circulating osteocrin stimulates bone growth by limiting C-type natriuretic peptide clearance.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4136, 4147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI94912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii T, Hirota K, Yasoda A, Takizawa A, Morozumi N, Nakamura R, Yotsumoto T, Kondo E, Yamashita Y, Sakane Y, Kanai Y, Ueda Y, Yamauchi I, Yamanaka S, Nakao K, Kuwahara K, Jindo T, Furuya M, Mashimo T, Inagaki N, Serikawa T, Nakao K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Rats deficient C-type natriuretic peptide suffer from impaired skeletal growth without early death.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PROS ONE	6. 最初と最後の頁 e0194812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 廣田 圭昭 他
2. 発表標題 ライブイメージングを用いたC型ナトリウム利尿ペプチドによる骨伸長促進機序の解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣田 圭昭 他
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) ノックアウトラットの作製と解析
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	廣田 圭昭 (Hirota Keisho)	京都大学・生命科学研究科・助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	松田 道行 (Matsuda Michiyuki) (10199812)	京都大学・生命科学研究科・教授 (14301)	