

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17532

研究課題名（和文）光遺伝学的手法によるcGMP活性制御に基づく低身長症の治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for dwarfism based on the regulation of cGMP activity by optogenetic tool

研究代表者

廣田 圭昭（Hirota, Keisho）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20852263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ライブイメージングを用いて成長板軟骨でcGMPが軟骨細胞の分化に与える影響を明らかにし、光遺伝学的手法を用いて低身長症治療への応用を目指すものである。近年、CNPの作用において、cGMPとcAMP/PKAシグナル経路間の相互作用が報告されている。本研究ではそれに関連し、FRETバイオセンサーとライブイメージングを用いて、CNPによるcGMP濃度上昇を介したPKA活性化が成長板軟骨細胞の分化に伴い増強され、特に肥大化軟骨細胞層の伸長を促進することを明らかにした。今後は、光遺伝学的cGMP活性化ツールを用いたcGMP活性制御を可能とする実験系の確立に引き続き取り組む予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CNPIは、その特異的受容体GC-Bに結合し、細胞内cGMP濃度の上昇を介して骨伸長を強力に促進する。本研究では、内軟骨性骨化におけるCNPによるPKA活性化が成長板軟骨細胞の分化に伴い増強され、肥大化軟骨細胞層の伸長を促進することが明らかとなった。今後、さらにcGMP活性制御と成長板軟骨伸長との関連を明らかにすることにより、cGMP活性の局所制御に基づく新たな低身長症の治療法の開発への基盤形成につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to clarify the effect of cGMP on chondrogenic differentiation in growth plate cartilage using live imaging and to apply optogenetic tools to the treatment of dwarfism. Recently, interactions between cGMP and the cAMP/PKA signaling pathway have been reported in the physiological roles of CNP. We used FRET biosensors and live imaging to show that CNP-induced PKA activation via cGMP elevation is enhanced during growth plate chondrocyte differentiation. We revealed that CNP-induced cGMP elevation activated the cAMP/PKA pathway, and clarified that this PKA activation contributed to the bone growth-promoting effect of CNP in hypertrophic chondrocytes.

研究分野：代謝および内分泌学関連

キーワード：生体イメージング C型ナトリウム利尿ペプチド 骨代謝 内分泌学

1．研究開始当初の背景

近年、FRET の原理に基づき cGMP 濃度の変動をリアルタイムで観察できるバイオセンサーが報告された。これにより生きた個々の細胞および細胞間での cGMP/PKG シグナル伝達活性の変動を観察できるようになった (Ohta Y, et al. *ACS Chem Biol.* 2016)。さらに、水性菌類である *Blastocladiella emersonii* の光受容感覚器で同定されたロドプシンクラスに属する光活性化酵素である Rhodopsin-guanylyl cyclase (RhGC) が光刺激により cGMP を産生することが明らかになり、この仕組みを応用することで光刺激により生きた細胞中の cGMP 産生を制御できるようになった (Avelar GM, et al. *Curr Biol.* 2014. Scheib U, et al. *Sci Signal.* 2015.)。

長管骨の伸長は内軟骨性骨化により達成される (Kozhemyakina E, et al. *Development.* 2015)。現在、低身長症の治療薬として臨床応用が進められている CNP は強力な骨伸長促進因子であり、その受容体である Guanylyl cyclase-B (GC-B) の活性化を介した cGMP 産生と、それに続く Type II cGMP dependent protein kinase (PKG II) を介して生理作用を発揮する (Yasoda A. et al. *J Biol Chem.* 1998. Miyazawa T, et al. *Endocrinology.* 2002)。このように軟骨細胞における cGMP 産生の増加は、骨伸長において重要な役割を持つ。しかし、生体内の成長板軟骨組織における cGMP/PKG シグナル活性の局在や、その変動が軟骨細胞の分化や組織全体の伸長に与える影響の時空間的な制御機構は明らかにされていない。

2．研究の目的

- (1) cGMP/PKG シグナル伝達経路による成長板軟骨分化への時空間的制御を解明する。
- (2) cGMP 産生の局所制御に基づく新たな作用機序の低身長症の治療法の概念を確立する。

3．研究の方法

- (1) 蛍光スペクトラムの異なる cGMP と PKA の FRET バイオセンサーを軟骨前駆細胞株である ATDC5 細胞に共発現させ、分化誘導を行い、ライブイメージングを施行した。
- (2) PKA の FRET バイオセンサーを全身に発現したトランスジェニックマウスの胎仔成長板軟骨のライブイメージングを行い、生きた成長板軟骨組織内で CNP による PKA 活性化の時空間的な動態を観察した。
- (3) 器官培養条件下で CNP と PKA 阻害剤を共添加し、成長板軟骨の長さを測定した。

4．研究成果

- (1) 軟骨前駆細胞株である ATDC5 細胞に蛍光スペクトラムの異なる cGMP と PKA の FRET バイオセンサーを共発現させ、増殖軟骨細胞から、より分化した肥大化軟骨細胞まで分化誘導を行った。各分化段階において共焦点顕微鏡を用いてライブイメージングを行い、一細胞レベルで CNP に対する両シグナル経路の活性

の変化をリアルタイムで観察した。その結果、CNP による cGMP 上昇が各分化段階で変化しない一方で、PKA 活性化が肥大化軟骨細胞への分化に伴い増強されることが明らかとなった。

(2) これまでに細胞質内 Ca²⁺ 上昇による adenylyl cyclase 活性化を介した cAMP 産生増加が報告されており、CNP による cAMP/PKA 活性化の分子機序との関連につき検討した。ATDC5 細胞に輝度変化型 Ca²⁺ センサーを発現させ、各分化段階においてライブイメージングしたところ、CNP による細胞内 Ca²⁺ 上昇が肥大化軟骨細胞への分化に伴い増強した。さらに、BAPTA-AM によって細胞内 Ca²⁺ をキレートした条件では、CNP による PKA 活性化が阻害されることが明らかとなった。これらの結果から、CNP が細胞内 Ca²⁺ の上昇を介して cAMP/PKA 経路を活性化することが示唆された。

(3) これまでに申請者らは、二光子顕微鏡を用いて器官培養条件下でマウス胎仔の長管骨成長板軟骨をライブイメージングすることに世界に先駆けて成功している。本実験系に、PKA の FRET バイオセンサーを全身に発現したトランスジェニックマウスを適用し、生きた成長板軟骨組織内で、CNP による PKA 活性化の時空間的な動態を観察した。その結果、ATDC5 細胞での実験結果と同様に、肥大化軟骨細胞において CNP による PKA 活性化が増強されることが明らかとなった (図 1)。

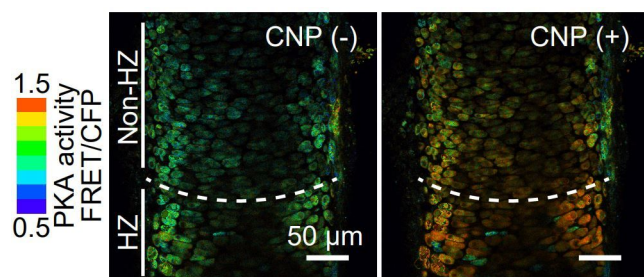


図 1 PKA バイオセンサー発現マウスの成長板軟骨二光子顕微鏡によるイメージング画像。PKA 活性を FRET/CFP 比で表示している。CNP 添加後に肥大化軟骨層優位に PKA 活性化を認める。HZ; 肥大化軟骨層, Non-HZ; 非肥大化軟骨層

その結果、ATDC5 細胞での実験結果と同様に、肥大化軟骨細胞において CNP による PKA 活性化が増強されることが明らかとなった (図 1)。

(4) さらに、これらの CNP による PKA 活性化の生理的意義を検証するために、器官培養条件下で CNP と PKA 阻害剤を共添加し、成長板軟骨の長さを測定したところ、PKA 活性化の増強が見られる肥大化軟骨細胞層に一致して CNP による骨伸長効果の減弱が見られた。

これらの結果より、内軟骨性骨化における CNP による PKA 活性化は成長板軟骨細胞の分化に伴い増強され、特に肥大化軟骨細胞層の伸長を促進することが明らかとなった。その背景となる分子的機序として、成長板軟骨細胞の分化に伴う CNP による細胞内 Ca²⁺ 上昇の増強が示唆された。

今後は、光遺伝学的 cGMP 活性化ツールを用いた cGMP 活性制御を可能とする実験系の確立に引き続き取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keisho Hirota, Tsuyoshi Hirashima, Kazuki Horikawa, Akihiro Yasoda, Michiyuki Matsuda	4. 巻 163(3)
2. 論文標題 C-type Natriuretic Peptide-induced PKA Activation Promotes Endochondral Bone Formation in Hypertrophic Chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqac005.	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
2. 発表標題 Analysis of protein kinase A regulation by C-type natriuretic peptide in endochondral ossification
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田 圭昭
2. 発表標題 ライブイメージングによる内軟骨性骨化におけるCNP/GC-Bシグナルの時空間的制御機構の解析
3. 学会等名 第95回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------