

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792201

研究課題名(和文)CNPを用いた顎顔面領域におけるトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文)Translational research for craniofacial region using CNP

研究代表者

中尾 一祐(Nakao, Kazumasa)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40599932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：顎顔面の成長は、膜性骨化、内軟骨性骨化が複雑に混在して成長することが知られており、軟骨無形成症をはじめとする骨系統疾患においては、上顎骨の劣成長などの顎変形症が随伴することが報告されている。これまで強力な内軟骨骨化促進作用を有するCNP/GC-B系の顎顔面形態における影響についての報告はなく、今回我々は、CNPの顎顔面形態への作用を、遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。CNPの欠失により上下顎の劣成長を呈し、CNPの過剰発現は上顎の矢状方向への過成長を認めた。CNPは内軟骨骨化を促進することにより、顎顔面形態に強く影響をおよぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：C-type natriuretic peptide (CNP) is a potent stimulator of long bone and vertebra development via endochondral ossification. In the present study, we investigated the effects of CNP on craniofacial skeletogenesis, which consists of both endochondral and membranous ossifications. Morphometric analyses of crania from CNP knockout and transgenic mice revealed that CNP stimulates longitudinal growth along the cranium length, but does not regulate the cranium width. These results indicate that CNP primarily stimulates endochondral ossification in the craniofacial region and is crucial for midfacial skeletogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：内軟骨骨化 顎顔面形態

1. 研究開始当初の背景

近年、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は新たな内軟骨骨化調節因子として注目されている。しかし、顎顔面領域における CNP の作用についての報告はなされていない。顔面形態における CNP の作用機序の解明および内軟骨骨化の役割を解明するとともに、CNP を用いた顎変形症への臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

ナトリウム利尿ペプチドファミリーはこれまで主にホルモンあるいは局所因子として 血圧水電解質代謝調節に 関与する循環器系における重要な調節因子であることが示されてきたが、このうち C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は新たな内軟骨骨化調節因子として注目されている。マウス胎仔脛骨の器官培養系を用いて CNP を添加したところ著明な骨伸張促進作用をもっていることを確認されており、CNP ノックアウトマウスでは著しい骨の伸長障害を認めており、反対に軟骨特異的 CNP トランスジェニックマウス (CNP-Tg) でも内軟骨骨化促進により骨の著しい伸長作用が認められたことが報告されている 1, 2)。

低身長をきたす骨系統疾患の代表として軟骨形成不全症は、3 型線維芽細胞増殖因子受容体 (fibroblast growth factor 3: FGFR-3) の遺伝子変異による恒常的活性化が原因であることが明らかとなった。そして、この変異遺伝子を軟骨に導入することにより、低身長 の表現型を示す軟骨形成不全症モデルマウスと CNP を軟骨に過剰発現したトランスジェニックマウスとの交配により、低身長や骨の短縮がほぼ正常レベルまで改善したとの報告がなされている 2)。

CNP は現在新たな骨伸張促進系としてクローズアップされており、CNP 系の賦活化が低身長をきたす疾患群に対する新しいカテゴリーの治療法となる可能性が示唆されている。

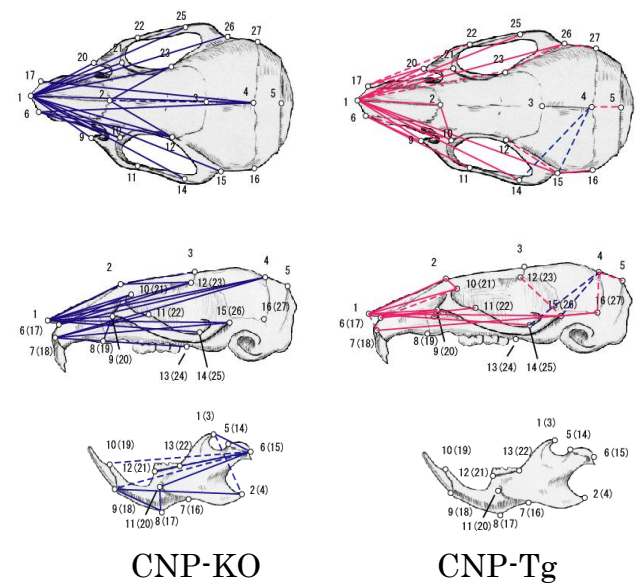
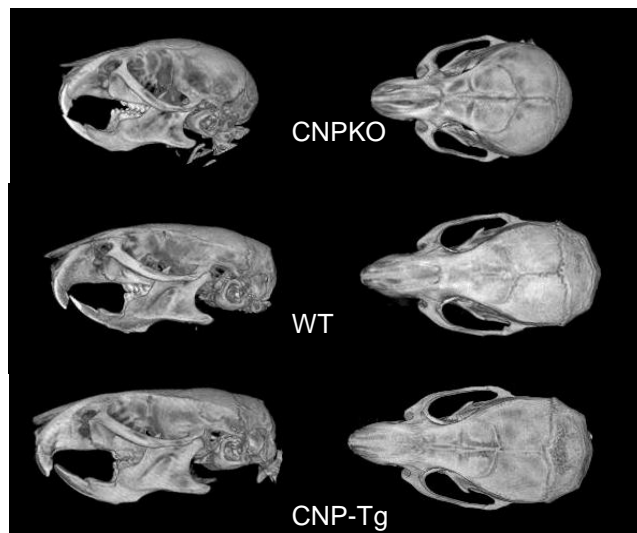
しかし、現在まで CNP の顎顔面形態への影響についての報告は認めておらず、CNP の顔面形態におよぼす影響については知られていない。今回 CNP 遺伝子改変マウスを用い顎顔面形態の解析をおこなうことにより CNP の顎顔面形態への重要性を明らかにし、CNP 投与による軟骨形成不全症などの骨系統疾患により生じた顎変形症治療への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

- ① CNP ノックアウトマウス (CNP-KO) と CNP トランスジェニックマウス (CNP-Tg) の顎顔面形態の解析
- ② 顎顔面を構成する軟骨組織 (蝶後頭軟骨結合部) の組織学的解析および器官培養法を用い、CNP 添加による内軟骨骨化への作用の検討

4. 研究成果

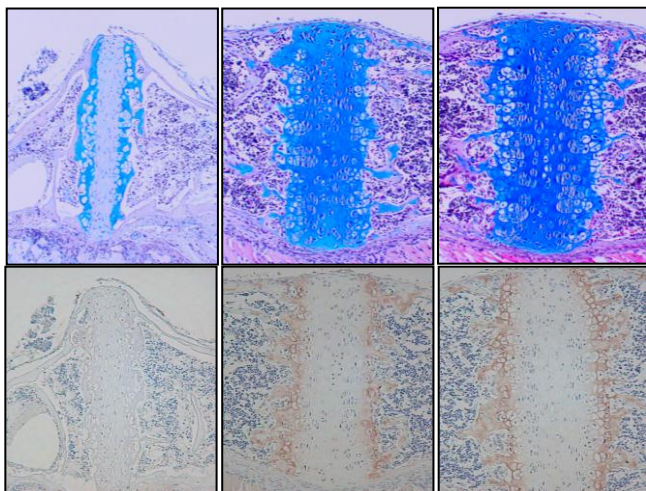
- ① μ CT による顎顔面骨の形態解析にて、3 か月齢の CNP ノックアウト (CNP-KO) マウスは、上下顎の矢状方向への劣成長を認め、反対に血中 CNP 濃度上昇型 CNP トランスジェニック (CNP-Tg) マウスでは上顎の矢状方向への過成長を認めた。



共に野生型マウスと比較した結果であり、青の線は劣成長であること、赤のラインは過成長であることを示している。

- ② 2 週齢、4 週齢 CNP-KO マウスの頭蓋底における蝶後頭軟骨結合部の組織学的解析をおこなったところ、軟骨結合部の幅が狭くなっており、免疫染色により肥大化軟骨細胞層のマーカーである X 型コラーゲンの染色領域の減少を認めた。反

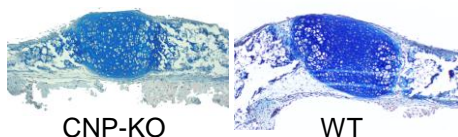
対に CNP-Tg マウスでは、軟骨結合部の幅が広がっており、X型コラーゲンの染色領域の増大を認めた。頭蓋底の器官培養において、CNP-KO マウスより採取した頭蓋底培養体は、野生型 (WT) マウスから採取したものより蝶後頭軟骨結合部の幅が有意に狭かった。反対に WT マウス由来頭蓋底培養体に CNP (10^{-8} ~ 10^{-6} M) を添加して器官培養を行ったところ、有意に蝶後頭軟骨結合部の伸長が促進した。組織学的解析においても in vivo の結果と同様に、CNP-KO マウス由来頭蓋底培養体の蝶後頭軟骨結合部ではX型コラーゲンの染色領域の減少を認め、CNP 添加群 (10^{-8} ~ 10^{-6} M) において増大を認めた。



CNP-KO WT CNP-Tg

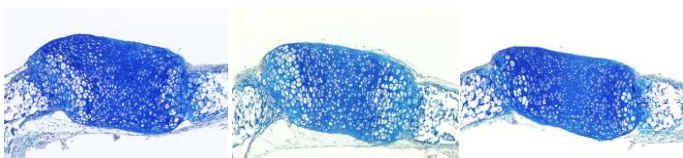
2週令の各マウスの蝶後頭軟骨結合部の組織像

(上がアルシアンブルー染色、下が免疫染色 (10型コラーゲン))



CNP-KO

WT



CNP 10^{-8} M

CNP 10^{-7} M

CNP 10^{-6} M

生後1日目のマウスより採取した蝶後頭軟骨結合部の器官培養 (アルシアンブルー染色)

CNP は顎顔面骨の内軟骨性骨化を促進することにより顔面形態に強く影響を与えることが明らかとなった。さらに CNP の投与が軟骨無形成症をはじめとする骨系統疾患によっ

て生じた上下顎劣成長に対する新たな治療法となりうる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

①Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, Kanamoto N, Sone M, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 22(1): 102-113. 2013

②Nakao K, Okubo Y, Yasoda A, Koyama N, Osawa K, Isobe Y, Kondo E, Fujii T, Miura M, Nakao K, Bessho K. The Effects of C-type Natriuretic Peptide on Craniofacial Skeletogenesis. *J Dent Res.* 92(1): 58-64. 2013

[学会発表] (計 10件)

・Nakao K, Yasoda A, Osawa K, Koyama N, Miura M, Akiyama H, Bessho K, Nakao K. C-type natriuretic peptide (CNP) / guanylate cyclase-B (GC-B) system in growth plate promotes endochondral bone formation through autocrine/paracrine mechanism. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research approaches (IBMS2013), Kobe, 5/28-6/1・2013, Oral presentation

・Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. The development of culture method for chondrogenic differentiation of human iPS cells. 2nd Joint Meeting of the IBMS and the JSBMR. Kobe, 5/28-6/1, 2013

・Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. The development of culture method for chondrogenic differentiation of human iPS cells. 2nd Joint Meeting of the IBMS and the JSBMR, Young Investigator Seminar. Kobe, 5/28-6/1, 2013

・Nakao K, Kuwahara K, Yasoda A, Katuura G, Nakao K, Yamasita Y. Lessons from tissue-specific KO of CNP/GC-B system -everlasting challenge to clinical application. 6th International Conference on cGMP. Erfurt, June 28-30 2013

・Nakao K, Yasoda A, Osawa K, Fujii T, Kondo E, Koyama N, Kanamoto N, Miura M, Kuwahara K, Akiyama H, Bessho K, Nakao K. Impact of local CNP/GC-B system in growth plates on endochondral bone growth. 6th

International Conference on cGMP. Erfurt,
june 28-30 2013

・中尾一祐 八十田明宏 別所和久 中尾一和、
内軟骨骨化における CNP/GC-B 系の生理的意
義、第 19 回研究発表 (TMFC) 成人病の
病因・病態の解明に関する研究助成、セント
レジスホテル大阪、7/6, 7・2013

・中尾一祐 大久保康則 山中茂樹 磯部悠
池野正幸 小山典昭 大澤賢次 別所和久、顎
顔面形態における内軟骨骨化の影響、第 58
回日本口腔外科学会総会、福岡市、
10/11-13・2013

・磯部悠 小山典昭 池野正幸 中尾一祐 高
橋克 別所和久、ヒト iPS 細胞を用いて間葉
系前駆細胞を介した骨芽細胞への分化誘導、
第 58 回日本口腔外科学会総会、福岡市、
10/11-13・2013

・吉岡洋祐 中尾一祐 斉藤和幸 山崎亨 高
橋克 別所和久、高圧酸素療法と反復腐骨
少量除去術が奏功したビスフォスフォネー
ト関連顎骨骨髓炎の 1 例、第 25 回日本口腔
科学会近畿地方部会、大阪市、12/7・2013

・山中茂樹 中尾一祐 磯部悠 池野正幸 小
山典昭 別所和久、内軟骨性骨化の顎顔面形
態に対する影響 (軟骨細胞特異的 CNP ノック
アウトマウスを用いた研究)、第 25 回日本口
腔科学会近畿地方部会、大阪市、12/7・2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 一祐 (NAKAO KAZUMASA)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：40599932