

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461381

研究課題名(和文) 骨伸長障害に対するCNP/GC-B系賦活化治療の基盤構築

研究課題名(英文) Study on the mechanistic basis for the CNP/GC-B-activating therapy for impaired skeletal growth

研究代表者

八十田 明宏 (Yasoda, Akihiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50378642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の骨は、まず鋳型としての軟骨が形成され、それが骨に置き換わる「内軟骨性骨化」と呼ばれる様式で形成される。骨の伸長はこの複雑な様式に依存するため、単一のシグナル伝達を介して促進することは困難であった。しかし、我々は、近年C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)およびその受容体グアニル酸シクラーゼB(GC-B)が強力な骨伸長促進因子であることを発見した。本研究では、骨の伸長障害をきたす疾患に対する将来的な臨床応用を見据えて、その生理学的な作用メカニズムの解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：Bones in mammals are formed through endochondral ossification, in that cartilaginous anlagen are firstly formed and then replaced by calcified bone tissues. Because endochondral ossification is a complicated system, few signaling pathways are known to stimulate bone growth. Recently, we discovered that C-type natriuretic peptide (CNP) and its receptor, guanylyl cyclase-B (GC-B) are potent stimulators of bones formed through endochondral ossification. In the present study, we investigated the physiological mechanism of the effect of CNP/GC-B signaling on endochondral bone growth, in anticipation of future clinical application toward disorders with impaired bone growth.

研究分野：内分泌学

キーワード：骨伸長 内軟骨性骨化 ナトリウム利尿ペプチド CNP

1. 研究開始当初の背景

骨の伸長は個体の成長の根幹をなすものであるが、ほ乳類の椎骨や四肢の長管骨などほとんどの骨は、まず鋳型としての軟骨の形成・伸長が起こり、それが石灰化した骨組織に置換される内軟骨性骨化とよばれる様式により形成され、伸長する。内軟骨性骨化は、鋳型となる軟骨細胞の増殖と分化

最終分化(肥大化)した軟骨細胞のアポトーシスと血管侵入による骨芽細胞の侵入、すなわち、軟骨から骨への置き換わり

置換した骨(骨芽細胞→骨細胞による)の形成(モデリング)

のステップからなり、いずれのステップに問題があっても正常な骨伸長は進まない。そして、伸長する鋳型軟骨とそれを追うように起こる石灰化骨の進展に挟まれる狭い領域が成長板である。成長板は骨の先端にあって骨伸長を担う部分であり、ここに様々なホルモンや局所因子などが作用することによって、骨伸長は制御される。

ところで、C型ナトリウム利尿ペプチド(C-type natriuretic peptide: CNP)は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーに属する生理活性ペプチドである。その受容体は膜型グアニル酸シクラーゼ(guanylyl cyclase: GC)そのもののサブタイプであるGC-Bであり、リガンドであるCNPの結合によって細胞内セカンドメッセンジャーcGMPを産生し、生物作用を発揮する。CNPは体内に遍在するため局所因子として作用することが想定されていたが、申請者らはCNPおよびGC-Bが成長板に発現し、CNPあるいはGC-Bのノックアウトマウスが著しい骨伸長障害を示すことから、CNP/GC-B系が重要な内因性の骨伸長促進因子であることを証明した(Cusho et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; Tamura et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004)。ヒトにおいても、GC-Bの機能喪失型変異が著明な骨伸長障害をきたすマロト型遠位中間肢異形成症の原因であることが報告され(Bartels et al., *Am. J. Hum. Genet.* 2004) CNP/GC-B系が重要な骨伸長促進因子であることが明らかとなっている。逆に、申請者らは、軟骨での過剰発現を可能とする2型コラーゲンプロモーターを用いたCNPトランスジェニックマウスが椎骨・四肢長管骨の著明な過伸長を示すことを示し(Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004) さらに最近では大阪大学の三浦らがGC-Bの活性型変異により骨の過伸長をきたすヒトの症例

を報告して(Miura et al., *PLoS One* 2012) マウスのみならずヒトにおけるCNP/GC-B系賦活化の強力な骨伸長促進作用が明らかとなった。

これらの背景を踏まえ、申請者らはCNP/GC-B系の賦活化を、骨伸長障害をきたす疾患に対して臨床応用するための研究を開始した。骨系統疾患は、骨格の異常をきたす疾患の総称であるが、そのなかに骨伸長障害を主徴とする疾患も多く存在する。そのうち最も罹患率が高い疾患が、FGF3型受容体の恒常活性型変異による軟骨無形成症であり、最終身長が120~130 cmに留まる著しい四肢短縮型の低身長症である。申請者らはこの軟骨無形成症を対象疾患として選定し、軟骨無形成症の疾患モデルマウスに対して軟骨特異的CNP過剰発現トランスジェニックマウスを交配させて作製したCNP過剰発現の疾患モデルマウスにおいて、その骨伸長障害が野生型マウスと同程度まで回復すること明らかにした(Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004)。さらに同じモデルマウスに対して、体外からCNPを投与することによってその骨伸長障害を改善させることにも成功しており(Yasoda et al., *Endocrinology* 2004) 実際の臨床使用も視野に入ってきている。

2. 研究の目的

ところが、その強力な作用に拘らず、CNP/GC-B系賦活化の骨伸長促進作用については依然不明な点が多い。前述のように、内軟骨性骨化における骨伸長は～の3つの段階を経て起こり、これらがすべて円滑に起こらなければ骨伸長は促進されない。実際、骨伸長を促進させる分子やシステムは成長ホルモン(GH)-IGF-I系など極少なく、逆にこれまでに有効な薬物療法が存在しなかった所以でもある。CNP/GC-B系賦活化に関して、

の軟骨細胞に対する作用については、申請者らがマウス胎仔脛骨器官培養を用いた検討によりその増殖・分化促進作用を証明しているが(Yasoda et al., *J. Biol. Chem.* 1998)

軟骨から骨への置き換わり、骨への作用に関しては不明である。また、生体におけるCNPの代謝に関して、分解酵素である中性エンドペプチダーゼやクリアランスに關与するとされるクリアランス受容体(C受容体)の存在が示されているが、C受容体の内因性リガンドosteocrinの役割を含め、骨伸長促進作用に対する意義については不明な点が

多い。さらに、CNP/GC-B系と他の骨伸長調節系との相互作用について、申請者らは軟骨無形成症に対する有効性の検討に際して FGF3 型受容体下流の MAPK シグナルとの相互作用を明らかにしたが (Yasoda et al., *Nat. Med.* 2004)、その他については不明である。

本研究ではこれまでの申請者らの研究成果を受けて、骨伸長障害に対する CNP/GC-B 系賦活化治療の基盤構築をおこなう。具体的には、以下の方法により各項目をあきらかにする。

(1) CNP/GC-B 系賦活化の内軟骨性骨化による骨伸長促進作用の機序の解明

軟骨あるいは骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスの作製と解析

骨折治癒機転におよぼす作用の検討：骨折治癒機転は内軟骨性骨化を短期間に再現できる再生過程であり、この過程に対する CNP/GC-B 系の意義を解析する

(2) CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用における CNP の代謝機構の意義の解明

C 受容体ノックアウトマウスの軟骨・骨組織の解析

(3) CNP/GC-B 系と他経路・他分子との相互作用の解明・探索

これまでに骨伸長障害に対する有効な薬物治療は存在せず、標準的な治療法は患者に非常に大きな負担を強いる整形外科的な骨延長術であった。本研究は、新規の骨伸長障害治療法の基盤構築として実臨床に直結するものであるが、同時に内軟骨性骨化による骨伸長の機序の解明にも寄与し、学際的意義も大きい。さらに本研究の成果は、CNP の代謝制御や、相互作用する経路・分子による修飾といった新たな CNP/GC-B 系賦活化法の開発として創薬にも繋がる。

3. 研究の方法

(1) CNP/GC-B 系賦活化の内軟骨性骨化による骨伸長促進作用の機序の解明

軟骨あるいは骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスの作製と解析

軟骨あるいは骨における特異的発現を可能とする 2 型コラーゲンあるいは 1 型コラーゲンプロモーターを用いた Cre トランスジェニックマウスを使用して、Cre-loxP システムによる CNP あるいは GC-B の軟骨あるいは骨特異的ノックアウトマウスを作製する。作製し

たノックアウトマウスに対して、成長曲線や各骨長の計測をおこなう。さらに、成長板軟骨の組織学的解析として、特に軟骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスについて、軟骨細胞の分化および増殖の状態を、それぞれ Indian hedgehog、オステオポンチン等の免疫染色、および BrdU の取り込みで評価する。

また、骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスにおいて、 μ CT を用いた骨密度の評価や骨形態計測をおこなう。

骨折治癒機転におよぼす CNP/GC-B 系賦活化の作用の検討

骨折治癒機転は内軟骨性骨化を短期間に再現できる再生過程であり、この過程に対する CNP/GC-B 系の意義を解析する。Serum amyloid P component (SAP) プロモーターを用いて肝臓での導入遺伝子発現により血中 CNP 濃度を上昇させる血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウス (SAP-CNP-Tg マウス) はすでに作製されているが (Kake et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009)、本研究ではこのマウスを用いた骨折実験をおこなって野生型マウスと比較し、骨折治癒過程における内軟骨性骨化に対する CNP/GC-B 系賦活化の作用を解析する。

まず、生後 6 週齢のマウスに対し、髄内釘を用いた大腿骨骨折モデルを確立し、まず SAP-CNP-Tg マウスと野生型マウスの治癒率の差を比較する。さらに、SAP-CNP-Tg マウスの骨折治癒過程における組織学的所見を経時的に観察し、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞の分化・増殖能を、分化マーカーの免疫染色やアルカリフォスファターゼ-TRAP 染色・MTT アッセイ等により解析し、野生型のものと比較する。

(2) CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用における CNP の代謝機構の意義の解明

C 受容体ノックアウトマウスの軟骨・骨組織の解析

CNP のクリアランスに関与するとされる C 受容体のノックアウトマウスについて、骨の過伸長の報告があるが (Matsukawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999)、詳細な解析はおこなわれていない。今回東北大学薬学部の高橋信行准教授より C 受容体ノックアウトマウスの供与を受け、骨格系に関する詳細な解析をおこない、CNP/GC-B 系賦活化における CNP の代謝調節機構の、骨伸長促進作用における意義を検討する。

まず、C 受容体ノックアウトマウスの成長曲線、各骨長、成長板軟骨組織を確認する。また、C 受容体ノックアウトマウスに対して全身の CNP ノックアウトマウスを交配させることにより CNP かつ C 受容体ノックアウトマウスを作製し、このマウスの成長曲線、各骨長、成長板軟骨の変化を CNP ノックアウトマウスと比較し、C 受容体ノックアウトマウスに認められる骨伸長促進作用が、内因性 CNP のクリアランスによるものか否か、あるいはその寄与度を *in vivo* にて検証する。

(3) CNP/GC-B 系と他経路・他分子との相互作用の解明

CNP/GC-B の下流に位置するとされる cGKI のノックアウトマウスを用いた胎仔器官培養において、CNP あるいはその下流の cGMP の添加による伸長促進作用が消失するかを確認する。

4. 研究成果

(1) CNP/GC-B 系賦活化の内軟骨性骨化による骨伸長促進作用の機序の解明

CNP あるいは GC-B の軟骨あるいは骨特異的ノックアウトマウスの作製と解析：軟骨での特異的発現を可能とする 2 型コラーゲンプロモーターを用いた Cre トランスジェニックマウスを使用して、Cre-loxP システムによる CNP あるいは GC-B の軟骨特異的ノックアウトマウスを作製した。軟骨特異的 CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスは全身の CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスと同様に、著明な体長の短縮と、内軟骨性骨化により形成される骨の伸長障害を認めた。軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスの吻髯長は全身 CNP ノックアウトマウスとほぼ同等で、野生型マウスの 75% 程度であった。軟骨特異的 GC-B ノックアウトマウスも全身の GC-B ノックアウトマウスとほぼ同程度の大きさであったが、CNP ノックアウトマウスよりさらに小さかった。成長板軟骨の組織学的解析では、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、全身の CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスと同様に、成長板軟骨、特にその肥大化軟骨細胞層の幅の狭小化が認められた。また、BrdU の取り込みで検討した成長板軟骨細胞の増殖能は軟骨特異的ノックアウトマウスで低下する傾向が認められた。さらに、骨における特異的発現を可能とする 1 型コラーゲンプロモーターを用いた Cre ト

ランスジェニックマウスを使用して GC-B の骨特異的ノックアウトマウスを作製した。軟骨特異的ノックアウトマウスと異なり、これらのマウスでは低身長、各骨の伸長障害を認めなかった。各群サンプル数約 20 の骨特異的 GC-B ノックアウトマウスおよびその対照マウスの大腿骨の骨形態計測を、マイクロ CT を用いておこなったが、サンプル間でのばらつきが大きく、最終的には両群間の差を認めなかった。今後、週齢数や固定時間をより厳密に統一し、再検することを検討している。

骨折治癒機転における CNP/GC-B 系賦活化の作用に検討：骨折治癒機転は内軟骨性骨化を再現する再生過程である。そこで、髄内釘を用いたマウスの骨折モデルを確立し、血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスにおける骨折治癒過程を野生型マウスと比較した。その結果、骨折治癒率に差は認めなかったものの、CNP トランスジェニックマウスでは骨折部位の骨代謝回転が亢進し、化骨の吸収が促進することが明らかとなった。

2) CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用における CNP の代謝機構の意義の解明

C 受容体ノックアウトマウスの軟骨・骨組織の解析：供与を受けた C 受容体ノックアウトマウスについて、成長曲線、各骨長の解析をおこない、既報通り内軟骨性骨化により形成される骨の過伸長を確認した。このマウスに認められる骨の過伸長が、内因性 CNP のクリアランス低下によるものか否かを *in vivo* にて検証するために、CNP ノックアウトマウスと交配させて CNP かつ C 受容体ノックアウトマウスを作成したところ、C 受容体ノックアウトマウスに認められる骨の過伸長は CNP ノックアウトマウスの background では発現せず、C 受容体ノックアウトマウスに認められる骨の過伸長が、内因性 CNP のクリアランス低下によるものであることが明らかとなった。

(3) CNP/GC-B 系と他経路・他分子との相互作用の解明

CNP/GC-B の下流であるとされる cGKI のノックアウトマウスを用いた胎仔器官培養において、CNP 添加による伸長促進作用の消失の有無を検討したが、骨伸長促進が認められる傾向を認められ、組織学的解析でも成長板幅の増大が確認された。また、CNP/GC-B の下流との相互作用が想定されている MAPK 経路の ERK の阻害剤の作用を検討したところ、ERK

阻害剤は野生型マウス胎仔脛骨器官培養における培養体の伸長を促進した。今後、CNPとの相互作用を検討する予定である。

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3件)

Nakao, K., Osawa, K., Yasoda, A., Yamanaka, S., Fujii, T., Kondo, E., Koyama, N., Kanamoto, N., Miura, M., Kuwahara, K., Akiyama, H., Bessho, K., and Nakao, K. The local CNP/GC-B system in the growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep* (査読有) **5**:10554. doi: 10.1038/srep10554 2015

Kondo, E., Yasoda, A., Fujii, T., Nakao, K., Yamashita, Y., Ueda-Sakane, Y., Kanamoto, N., Miura, M., Arai, H., Mukoyama, M., Inagaki, N. and Nakao, K. Increased bone turnover and possible accelerated fracture healing in a murine model with an increased circulating C-Type natriuretic peptide. *Endocrinology* **156**, 2518-2529 2015

Ueda, Y., Yasoda, A., Yamashita, Y., Kanai, Y., Hirota, K., Yamauchi, I., Kondo, E., Sakane, Y., Yamanaka, S., Nakao, K., Fujii, T., Inagaki, N. C-type natriuretic peptide restores impaired skeletal growth in a murine model of glucocorticoid-induced growth retardation. *Bone* **92**, 157-167 2016

[学会発表](計5件)

平成26年度

Yasoda A. Translational research of the activation of the C-type natriuretic peptide (CNP)-guanylyl cyclase-B (GC-B) pathway of skeletal dysplasia. The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014 2014.6.15~2014.6.17 東京

Yasoda A. CNP/GC-B regulation of endochondral bone growth. The Conference of Bioactive Peptide for Cell-Cell Communication 2014 (招待講演) 2014.9.10~2014.9.12 京都

平成27年度

金井 有吾, 八十田 明宏, 山下 唯, 植田 洋平, 近藤 絵里, 藤井 寿人, 稲垣 暢也 Osteocrin が筋骨格系に及ぼす作用 -マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた検討- 第88回日本内分泌学会学術総会 ポスター 2015/4/23 東京

平成28年度

金井 有吾, 八十田 明宏, 森 慶太, 高野 晴子, 山下 唯, 廣田 圭昭, 植田 洋平, 山内 一郎, 上田 依利子, 近藤 絵里, 藤井 寿人, 横井 秀基, 稲垣 暢也 Osteocrin の骨伸長促進作用の検討 第89回日本内分泌学会学術総会 口演 2016/4/21 京都

植田 洋平, 八十田 明宏, 山下 唯, 金井 有吾, 廣田 圭昭, 山内 一郎, 近藤 絵里, 上田 依利子, 藤井 寿人, 稲垣 暢也 C型ナトリウム利尿ペプチドはマウスにおいてグルココルチコイドによる骨伸長障害を改善する 第89回日本内分泌学会学術総会 口演 2016/4/21 京都

[図書]

なし

[産業財産権]

出願状況

なし

取得状況

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

八十田 明宏 (YASODA, AKIHIRO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 50378642

(2)研究分担者

藤井 寿人 (FUJII, TOSHIHITO)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 50537347

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

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

近藤 絵里 (Kondo, Eri)
京都大学・医学研究科・研究生

山下 唯 (YAMASHITA, YUI)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・
医員

金井 有吾 (KANAI, YUGO)
京都大学・医学研究科・大学院生

植田 洋平 (UEDA, YOHEI)
京都大学・医学研究科・大学院生

廣田 圭昭 (HIROTA, KEISHO)
京都大学・医学研究科・大学院生