

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390264

研究課題名(和文) CNP/NPR B/CGMPシグナル系に焦点を当てた成長障害の病態・治療法の検討

研究課題名(英文) Ozono Keiichi

研究代表者

大園 恵一(Ozono, Keiichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20270770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：NPR2機能獲得変異により、高身長となり母趾が長くなる疾患単位を確立した。OMIMに収載され、epiphyseal chondrodysplasia, Miura Type (#615923)と名付けられた。その機序の解明のためにmutNPR2 tg mice を作出したところ、表現型の再現を認め、組織的および遺伝子発現変化を検討しているところである。また、このシグナルと関係するNT-pro CNPが、低身長診療、GH治療の指標として良いバイオマーカーとなることを見いだした。NPR2受容体を活性化できる低分子化合物の候補を見いだしたので、薬剤開発につなげていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have established the disease entity associated with tall stature and long hallux due to the gain-of-function type mutations of NPR2. The disease is named as epiphyseal chondrodysplasia, Miura Type and filed (#615923) in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Transgenic mice with the collagen type XI promoter/enhancer-driven NPR2 mutation showed the overgrowth and deformity of long bones. The growth plate of the transgenic mice were elongated, especially hypertrophic zone, and gene expression is being analyzed in chondrocytes of the growth plate. We found that NT-pro CNP is a good marker of the height velocity in patients with short stature before and after the growth hormone therapy. Ten small compounds are identified by in silico as candidates of NPR2 activator and being analyzed by the generation of cGMP in cultured cells expressing NPR2.

研究分野：小児科学

キーワード：成長障害 骨系統疾患 C型Na利尿ペプチド 成長軟骨 cGMP 創薬

## 1. 研究開始当初の背景（申請書記載のまま）

- ① 従来、ヒトにおいては、NPRBの機能喪失型変異により四肢短縮と低身長を呈する遠位中間肢異形成症マロトー型(acromesomelic dysplasia-type Maroteaux)をきたすことが報告されていたが、機能獲得型変異は知られていなかった(Bartels et al. Am J Hum Genet 2004)。一方、染色体転座によるCNPの産生亢進により高身長をきたすことが報告されている(Bocciardi et al. Hum Mut 2007)。
  - ② マウスにおいては、CNPノックアウトマウスがdwarfismとなること、一方、CNPを過剰産生するトランスジェニックマウス(tg mice)が過成長に伴う骨変形が起こる事が報告されている(Chusho et al. Proc Natl Acad Sci 2001, Yasoda et al. Nat Med 2004)。
  - ③ 動物モデルにおいてCNPは軟骨無形成症(achondroplasia)の治療薬となりうる事が報告され、臨床応用に向けてCNP製剤の開発中である(Yasoda et al. Endocrinology 2009)。
  - ④ 申請者らは、高身長と巨大母趾を呈する家系において、世界で初めてNPR-Bの機能獲得型変異(p.Val883Met)を見いだした(論文投稿中、特許申請中)。本変異を軟骨特異的に発現するtg miceを作成し、患者で認められた表現型が再現される事を見いだした。また、患者血中のNT-proCNPを測定し、本経路のnegative feedback loopの存在の可能性を示唆した。
  - ⑤ 発端者およびその母に脆弱性骨折をみとめ、tg miceにおいても骨粗鬆症が疑われることから、本シグナル系が軟骨成長のみならず骨代謝にも関わる可能性がある。これは、従来報告されていない知見である。
  - ⑥ さらに、韓国から同様な症状を呈する家系を紹介され、NPR-Bの別の部位に変異を見いだした(未発表データ)。
  - ⑦ CNP/NPR-Bの下流で働くcGMPは種々の生物活性を有する重要なセカンドメッセンジャーである。その効果としては、血管拡張、軟骨・骨伸長、神経伝達などが存在し、cGMPの分解酵素に対する阻害薬が、勃起不全・肺高血圧・心不全などの治療薬として開発されている。しかしながら、cGMPを増加させるphosphodiesterase阻害薬には、特異性が低いこと、効果持続が短いこと、全身性の副作用(低血圧)を示すことなどの問題があった(Potter LR. Pharmacol Ther 2011)。
  - ⑧ cGMPをセカンドメッセンジャーとする受容体としてはANP/BNP/CNP受容体群の他、NO(nitric oxide)系非膜結合型受容体も知られているが、これら全ての受容体に関し、機能獲得型変異型受容体の自然発症は知られていない。
- ## 2. 研究の目的
- これまでのヒトおよびマウスの解析から、

CNP(C型Na利尿ペプチド)-NPR-B(Na利尿ペプチド受容体B型)-cGMP(cyclic GMP)シグナル系が内軟骨性骨化に重要であることは知られているが、その詳細な分子機序は不明である。ヒトにおいては、NPR-Bの機能喪失型変異は四肢短縮と低身長を呈する骨系統疾患の原因となることが報告されていたが、機能獲得型変異は知られていなかった。申請者らは、高身長と巨大母趾を呈する家系を解析し、世界に先駆けて、NPR-Bの機能獲得型変異を同定した。本研究はその独創的な成果を踏まえ、CNP/NPR-B/cGMPシグナル系に焦点を当てて、小児の成長障害の病態解明を行い、新規の治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ① NPR-B変異型を軟骨特異的に発現するtg miceの解析

XI型コラーゲンプロモーター/エンハンサーを用いて、変異型NPR-B cDNAを軟骨特異的に発現するtg miceを作出した。本マウスは、3系統が作出され、中間的な発現量のtg miceを用いて以下の検討を行う。また、野生型のNPR-Bを発現するtg miceを作成したので、これを比較対照として解析を行う。

#### i) 成長軟骨帯の解析

組織学的な評価をHE染色で行い、肥大軟骨層の重層化をみとめたので、軟骨肥大化にかかわる因子を検討する。具体的には、iHH, collagen type II, type X, HDACなどの発現を免疫組織化学、in situ hybridizationなどの手法で検討する。

FGFR3の機能獲得型変異を有する軟骨無形成症モデルマウス(achondroplasia mice)において、CNPの持続投与が成長軟骨の伸長効果がみられるとの報告があり、achondroplasia miceと、当該tg miceの交配を行い、伸長促進効果がみられるかどうか検討する。Achondroplasia miceの受精卵に関しては入手手続きが終了した。

#### ii) 成長軟骨細胞での遺伝子発現プロファイリング

レーザーキャプチャ法で成長軟骨細胞を採取し、遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に検討する。あるいは、脛骨のex vivo培養を行い、ウイルスベクターを用いて変異NPR2を発現させ、成長軟骨帯の組織変化と遺伝子発現の変化を調べる。アデノウイルスベクターを用いた発現ベクターは、作成が完了している。

#### iii) 骨形態計測

骨形成、骨吸収に関連する各種パラメーターを用いて検討する。週齢を2つに分けて検討する。

### ② CNP/NPR-B/cGMPの下流シグナルの解析

#### i) 軟骨細胞におけるcGMP下流シグナル分子群の同定

cGMP以降のシグナルとしては、cGMP-dependent kinase II(cGKII)を鍵として、本酵素によりリン酸化を受ける蛋白質を同定する。

方法としては、cGKII発現ベクターを軟骨株化細胞(ATDC5)に導入し、2次元電気泳動により、リン酸化が誘導される蛋白質を同定する。

ii)本シグナル系とFGF, IGF-1シグナルとのクロストーク

ATDC5細胞に、CNP, bFGF, IGF-1を添加し、それぞれの相互作用を検討する。クロストークの部位を同定する。

③本家系の症例の解析

i)患者皮膚線維芽細胞からdirect reprogrammingによる軟骨細胞の誘導

患者皮膚線維芽細胞から疾患特異的iPS作成の順の確認を行い、他疾患でiPS細胞の作成に成功した。当該患者の、線維芽細胞を採取したが、培養中に失われてしまったので、再度、採取する予定である。作成したiPS細胞の分化能および機能を解析する。

ii)骨代謝の評価

易骨折性、骨塩量低値を認めるので、ビスフォスフォネート製剤を投与し、骨塩量は改善した。投与中止してその後の経過を観察する。また、最終身長を確認する。

④NT-proCNP値と成長との関連性

CNP前駆体のN端部分である血中NT-proCNP濃度を測定したところ(NT-pro CNP EIA kit; BIOMEDICA)、本児ではコントロールと比較しやや低値、母、母方祖母は正常範囲内であった。NT-CNPpro値と身長増加の関連性に関し、低身長、高身長などの症状を有する患児およびGH治療中の患児においてNT-proCNP値を測定し、検討する。症例の蓄積により、NT-proCNPの上昇が、GH治療による身長増加の予測因子として使用できる可能性がでてきたので、さらに症例を蓄積して検討する。

⑤骨粗鬆症発症機序の検討

前述のtg miceの骨形態計測の結果を踏まえ、骨量低下が、骨形成抑制によるのか、骨吸収亢進によるのかを決定する。前者の場合は骨芽細胞機能を、後者の場合は破骨細胞機能を検討する。ともに、in vitroで機能解析を行う事が可能であり、そのメカニズムも解析する。

⑥2家系目の解析(韓国症例)

i)NPR-B変異体の機能解析

別の変異であるが、機能獲得型であることを確認した。第1家系よりややcGMPの産生活性は弱い。2種の変異体の酵素学的な特性を検討する。

ii)臨床データの採取

症例の担当医のTae-Joon Cho, MD, Professor, Division of Pediatric Orthopaedics, Seoul National University Children's Hospital, Koreaと連絡をとり臨床データを詳細に検討する。大腿骨頭すべり症が数人でみられたが、本邦家系では見られていない。必要性があれば、共同研究の打ち合わせのため、韓国を訪問する。

機能喪失型変異症例(acromesomelic dysplasia Maroteaux-type)の家系も4家系あり、in vivo発

現系を用いて、その機能および局在などを検討する。

iii)tg mice 作出

2例目の変異NPR-Bを発現するtg miceを作出し、表現型を検討する。

⑦NPR-Bを効果的に活性化型に変換するsmall compoundのscreening

4. 研究成果

① XI型コラーゲンプロモーター/エンハンサーを用いて、変異型NPR2 cDNA(V883M)を軟骨特異的に発現するtransgenicマウスを作出した。組織学的な評価で、主として肥大化軟骨層の拡大を認め、CNPシグナルが軟骨分化に関わることが示唆された。成長軟骨細胞層からmRNAを抽出し、col2a1, col10a1, ihh, aggrecanなど軟骨分化に関わる分子とCNP, NPRB, NPRCなどCNPシグナルに関わる分子の発現の検討を行っている。ATDC5細胞を分化誘導培地で培養4週および8週後、 $10^{-6}$ M CNPの添加を行った所、cGMPの上昇を認めた。FGFシグナルなど、他のシグナルとのクロストークを検討している。初代軟骨培養の培養条件を検討し、肥大化させることにほぼ成功した。現在、CNP添加により、発現が変化する遺伝子を検討中である。

② 前思春期の特発性低身長患者において、血清NT-proCNP濃度と年齢は逆相関を示した。また、軟骨無形成症・低形成症の患者において血清NT-proCNP濃度は、同年齢の低身長の児と差はなかった。さらに、同疾患の患児に成長ホルモン治療を行うと、成長速度の増加より先に血清NT-proCNP濃度が増加した(成果論文はほぼ完成した)。

③ NPR2の機能獲得型変異の2例目を同定した。本患者で見られた変異NPR2(A488P)は機能獲得型であることを証明し報告した(Miura K et al. Am J Med Genet A 2014)。本症例(成人)は205cmであり、他グループから報告された同疾患の症例は221cmであり、本症の成人身長は200cmを超える可能性が高い。また、染色体転座によりCNPが過剰に発現している症例を見だし報告した(Ko JM et al. Am J Med Genet A 2015)。

④ Potter博士との共同研究により、高身長の1例で認められたV883M変異はguanylyl cyclase活性のVmaxを増加させること、不活化プロセスが障害されていることを見だし報告した(Robinson JW et al Bone 2013)。

⑤ In silicoでV883M変異の立体構造解析を行った。タンパク立体構造予測サーバーのI-TASSERを用いて、V883M変異による立体構造変化を可視化した。さらに、分子モデリングシミュレーションソフトウェアであるAutoDock Vinaと3次元ドッキングできるデータベースのZINCを用いて、約270万個の化合物のなかからV883部位とのaffinityが高い化合物をスクリーニングした。これらの中から酵素を活性化させる可能性のある化合物を10選出出した。

CNPシグナルの過剰が高身長をもたらすことはより確実となった。

⑥ まとめとして、NPR2機能獲得変異により、高身長となり母趾が長くなる疾患単位を確立した。これは、O M I Mにも収載され、ECDM: epiphyseal chondrodysplasia, Miura Type (#615923)と名付けられた。その機序の解明は未だ途上であるが、mutNPR2 tg miceを確立し、表現型の再現を認め、軟骨細胞の採取ができているので、in vitro培養系と組み合わせることによって、下流シグナルを解明できると考えている。

NT-pro CNPが、低身長診療、GH治療の指標として良いバイオマーカーとなることを見だし、論文発表を行うところである。

CNPアナログが、軟骨無形成症の治療薬として開発されてきているが、本研究ではNPR2受容体を活性化できる低分子化合物の候補を見いだした。今後、その活性を検討し、薬剤開発につなげていきたいと考えている。

研究計画がすべて実行できたとは言えないが、疾患の確立、tgマウスの作成、候補物質の同定など、必要な成果は上げられたと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等 雑誌論文] (計7件)

- ① 窪田拓生, 三浦弘司, 王薇, 北岡太一, 大幡泰久, 山本景子, 藤原誠, 橘真紀子, 三善陽子, 難波範行, 大藪恵一, 小児における血清NT-proCNP値測定の意義-年齢, 成長速度及びGH治療反応性-, ホルモンと臨床, 60 (12) 2014, 41-43. 査読有
- ② Miura K, Kim OH, Lee HR, Namba N, Michigami T, Yoo WJ, Choi H, Ozono K, Cho TJ, Overgrowth syndrome associated with a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) gene. *Am J Med Genet A*, 164A, 2014. :156-16, 査読有
- ③ Robinson JW, Dickey DM, Miura K, Michigami T, Ozono K, Potter LR. A human skeletal overgrowth mutation increases maximal velocity and blocks desensitization of guanylyl cyclase-B. *Bone*, 56(2), 2013, 375-382. 査読有
- ④ Tatton-Brown K, Murray A, Hanks S, Douglas J, Armstrong R, Banka S, Bird LM, Clericuzio CL, Cormier-Daire V, Cushing T, Flinter F, Jacquemont ML, Joss S, Kinning E, Lynch SA, Magee A, McConnell V, Medeira A, Ozono K, Patton M, Rankin J, Shears D, Simon M, Splitt M, Strenger V, Stuurman K, Taylor C, Titheradge H, Van Maldergem L, Temple IK, Cole T, Seal S, Childhood Overgrowth Consortium, Rahman N, Weaver syndrome

and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am J Med Genet A*, 161A (12) 2013. 2972-2980. 査読有

- ⑤ Miura K, Namba N, Fujiwara M, Ohata Y, Ishida H, Kitaoka T, Kubota T, Hirai H, Higuchi C, Tsumaki N, Yoshikawa H, Sakai N, Michigami T, Ozono K, An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PLoS One*, 2012. 7(8) : e42180. 査読有
- ⑥ Ozono K, Namba N, Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Ohata Y, Fujiwara M, Miyoshi Y, Michigami T, Pediatric aspects of skeletal dysplasia. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2012. 10 (1) : 35-43. 査読有
- ⑦ Kawai M, Kinoshita S, Kimoto A, Hasegawa Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ohata Y, Ozono K, Michigami T. FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble  $\alpha$ -klotho both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 2013. 288 (4) : 2414-2427. 査読有

#### [学会発表] (計12件)

- ① 窪田拓生, 三浦弘司, 王薇, 北岡太一, 大幡泰久, 山本景子, 藤原誠, 橘真紀子, 三善陽子, 難波範行, 大藪恵一, 低身長症例における血清NT-proCNP値測定の有用性-成長速度及びGH治療反応性-, 第87回 日本内分泌学会学術総会, 2014. 04. 24-26, 福岡
- ② Kubota T, Miura K, Wang W, Yamamoto K, Fujiwara M, Ohata Y, Tachibana M, Kitaoka T, Miyoshi Y, Namba N, Ozono K, Serum Levels of Amino-terminal Propeptide of C-type Natriuretic Peptide may Predict Growth Response to Growth Hormone Treatment in Patients with Achondroplasia / Hypochondroplasia. American Society of Bone and Mineral Research 2014 annual meeting : 2014. 9. 12-15, ヒューストン
- ③ 三浦弘司, 難波範行, 山本景子, 大幡泰久, 藤原誠, 北岡太一, 窪田拓生, 道上敏美, 大藪恵一, ナトリウム利尿ペプチド受容体2(NPR2)機能獲得型変異に伴う高身長症-2家系目における新規変異の同定, 第86回 日本内分泌学会学術総会, 2013. 04. 25-27, 仙台
- ④ Kubota T, Miura K, Wang W, Namba N, Kitaoka T, Ohata Y, Fujiwara M, Yamamoto K, Tachibana M, Miyoshi Y, Ozono K. Serum NT-proCNP levels in patients with achondroplasia/hypoplasia may predict response to therapy with

- growth hormone. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013. 05. 28-06. 01, 神戸
- ⑤ 小垣滋豊, 石井良, 石田秀和, 高橋邦彦, 髭野亮太, 市森裕章, 馬殿洋樹, 那波伸敏, 藪下陽子, 三浦弘司, 大藪恵一, C-type natriuretic peptide (CNP)受容体 (NPR-B) の機能獲得型変異体を用いた、肺高血圧症に対する新たな治療アプローチ (第3報), 第48回 大阪小児腎研究会, 2013. 07. 11, 吹田
- ⑥ 三善陽子, 難波範行, 松本直道, 大藪恵一, 過成長の原因としてEZH2遺伝子変異が同定されたWeaver症候群の一例, 第47回 日本小児内分泌学会学術集会, 2013. 10. 10-12, 東京
- ⑦ Ozono K, Height determination and chondrocyte development-JSPE/ESPE, 51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology, 2012. 09. 20-23, Leipzig, Germany
- ⑧ 三浦弘司, 難波範行, 藤原 誠, 大幡泰久, 北岡太一, 窪田拓生, 大藪恵一, 樋口周久, 吉川秀樹, 妻木範行, 道上敏美, ナトリウム利尿ペプチド受容体B (NPR-B) 変異に起因する軟骨の表現型の解析, 第85回 日本内分泌学会学術総会, 2012. 04. 19-21, 名古屋
- ⑨ 三浦弘司, 難波範行, 山本景子, 大幡泰久, 藤原 誠, 北岡太一, 窪田拓生, 大藪恵一, 道上敏美, Cho Tae-Joon, ナトリウム利尿ペプチド受容体2 (NPR-2) 機能獲得型変異に伴う高身長症-2家系目, 第46回 日本小児内分泌学会学術集会, 2012. 09. 27-29, 大阪
- ⑩ 窪田拓生, 三浦弘司, 難波範行, 北岡太一, 大幡泰久, 藤原 誠, 山本景子, 橋 真紀子, 三善陽子, 大藪恵一, 小児における血清NT-proCNP値測定の意味-年齢、成長速度及びGH治療反応性-, 第46回 日本小児内分泌学会学術集会, 2012. 09. 27-29, 大阪
- ⑪ Miura K, Namba N, Yamamoto K, Fujiwara M, Ohata Y, Kitaoka T, Kubota T, Michigami T, Ozono K, An Overgrowth Disorder Associated with Excessive Production of cGMP Due to a Gain-of-Function Mutation of the Natriuretic Peptide Receptor 2 (NPR2) Gene. 7th Biennial Asia Pacific Paediatric Endocrine Society (APPES) Scientific Meeting, 2012. 11. 14-17, Bali, Indonesia
- ⑫ 窪田拓生, 三浦弘司, 難波範行, 北岡太一, 大幡泰久, 藤原 誠, 橋 真紀子, 三善陽子, 平井治彦, 大藪恵一, 小児における血清NT-proCNP値と身長に関連性, 第64回 関西カルシウム懇話

会, 2012. 03. 31, 大阪

〔図書〕 (計2件)

- ① 大藪恵一, エヌ・ティー・エス, 進化を続ける骨研究最新動向, 2013. 3-7
- ② 大藪恵一, エヌ・ティー・エス, 骨系統疾患, 2013. 95-103

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大藪 恵一 (Ozono, Keiichi)

大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20270770

### (2)研究分担者

道上 敏美 (Michigami, Toshimi)

大阪府立母子保健総合医療センター (研究所)・部長

研究者番号：00301804

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：