

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20516

研究課題名(和文) CNPおよび疾患特異的iPS細胞を用いた新たな顎変形症治療の開発

研究課題名(英文) Development of new strategy for jaw deformity using CNP

研究代表者

中尾 一祐 (NAKAO, Kazumasa)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40599932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨無形成症(Ach)モデルマウスの μ CT画像を解析したところ、ヒトと同様に中顔面の矢状方向の劣成長や大後頭孔の狭窄を認めた。Achマウスの頭蓋底の軟骨系都合部の肥大軟骨細胞層・増殖細胞層はともに狭小化しており、さらに中心部に血管新生やアポトーシスを伴った早期骨化を認めた。Achマウスで認められていた中顔面の劣成長や大後頭孔の狭窄は、CNPの血中濃度上昇により、有意に改善することが出来た。CNPの投与は頭蓋骨の軟骨結合部の内軟骨性骨化を促進させることにより、軟骨無形成症で認められる顎顔面形態異常を改善しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the μ CT image of achondroplasia (Ach) model mice revealed midfacial hypoplasia in the sagittal direction and foramen magnum stenosis similarly to human. Both hypertrophic chondrocyte layers and proliferating chondrocyte layers the cartilage of the skull base of the Ach mice were narrowed, and early ossification with angiogenesis and apoptosis was found in the center of the cartilage of the skull base. The midfacial hypoplasia and the foramen magnum stenosis in the Ach mice could be significantly improved by the increase in the blood concentration of CNP.

It was suggested that administration of CNP could improve the abnormalities of craniofacial morphology found in achondroplasia by promoting endochondral ossification in the cranial cartilage.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CNP 顎変形症 内軟骨性骨化

1. 研究開始当初の背景

顎変形症は顎骨の大きさ、形態が著しく異常な状態であるものの総称である。先天性疾患によるものと、幼少時に受けた外傷や何らかの疾患の症状あるいは後遺症として生じる後天性のものがあり、多くの場合は原因不明の成長発育異常で、遺伝が大きな要因と考えられている。顎変形症に対する治療は主に外科的手術による上下顎の移動による治療を行っているのが現状であり、投薬などのより低侵襲な治療法の開発が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

これまで我々は、強力な内軟骨性骨化促進因子である C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) に着目し、新たな顎変形症治療への新規治療薬としての可能性を検討してきた。CNP 遺伝子欠損マウスでは、上下顎の矢状方向への劣成長を呈し、反対に軟骨における CNP の過剰発現させたトランスジェニックマウスでは上顎の過成長を呈することを示し、CNP および内軟骨性骨化の顎顔面形態への重要性を明らかとしてきた (Nakao et al, J Dent Res. 2013)。さらに SAP プロモーターを用いた血中濃度上昇型の CNP トランスジェニックマウスにおいても、上顎の矢状方向への成長が促進されることを明らかとしてきた。そこで我々は内軟骨性骨化促進因子である CNP に注目し、新たな治療法の確立を目指している。

特に軟骨無形成症を含めた先天性の骨系統疾患に生じる顎変形症に対し、CNP 投与が新たな顎変形症治療となる可能性を考えており、CNP を用いた新たなアプローチでの治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 軟骨形成不全モデルマウスの顎顔面形態の解析

生後 3 ヶ月目の軟骨形成不全モデルマウスの頭蓋骨の μ CT 撮影を行い (島津社製 inspeXio SMX-90CT)、上顎 27 ヶ所、下顎 21 ヶ所の計測点を μ CT 上でとり、それぞれの直線距離を計測し比較を行う (1) (EDMA 法)。顎変形症の原因を明らかとするために、顔面を構成する軟骨組織、つまり軟骨内骨化により成長する部位である蝶後頭軟骨結合部、鼻中隔軟骨、下顎頭軟骨等の組織学的解析を行う。

(2) 軟骨形成不全症モデルマウスへの CNP-Tg マウスとの交配および CNP 投与による顔面形態のレスキュー実験

軟骨形成不全モデルマウスにおいて認められた顎変形症 (上下顎の劣成長) を血中濃度上昇型 CNP-Tg マウスと交配させることにより、顎変形症を改善しうるか検討する。顎顔面形態の評価は、頭蓋骨を μ CT 撮影を行い EDMA 法により解析する。また CNP の皮下投与を行うことにより、顎顔面形態を改善する

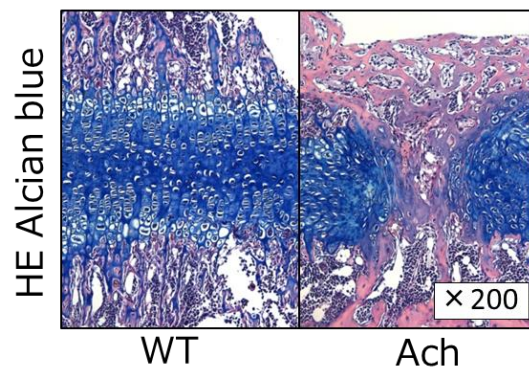
ことができるかどうかについても検討を行う。さらに、生後 1 日目の軟骨形成不全モデルマウスより下顎骨、頭蓋底を採取し、器官培養を施行し、レスキューのメカニズムについての解析を行う。また、内軟骨骨化に重要な、蝶後頭軟骨係合部 (SOS)、下顎頭軟骨 (MCC)、鼻中隔軟骨 (NSC) から軟骨細胞を採取し、3 次元培養 (Micromass culture) を施行し、軟骨無形成症の軟骨の性状および CNP 添加によりそれがどのように変化するか解析する。

4. 研究成果

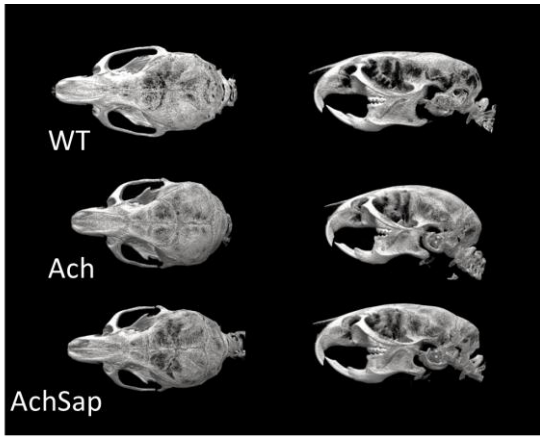
(1) 軟骨無形成症 (Ach) モデルマウスの μ CT 画像を解析したところ、ヒトと同様に中顔面の矢状方向の劣成長や大後頭孔の狭窄を認めた。



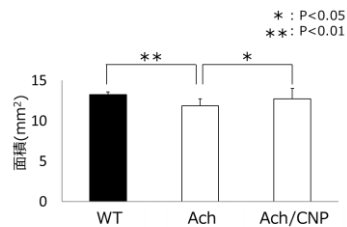
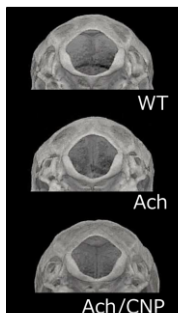
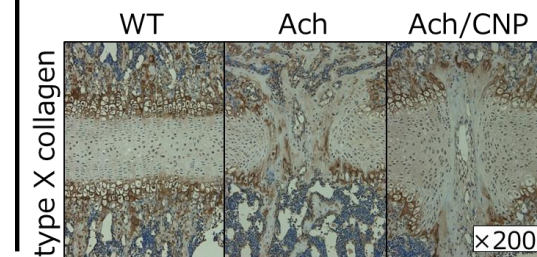
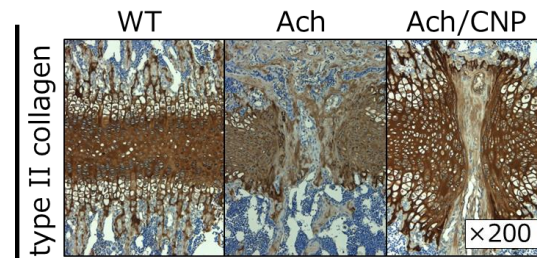
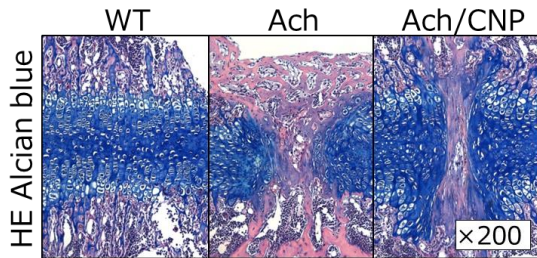
中顔面の成長には、頭蓋底における成長中心である蝶脛骨間軟骨結合部 (ISS) と蝶後頭軟骨結合部 (SOS) における内軟骨性骨化による成長が重要であるとされている。組織学的解析において、Ach マウスの ISS と SOS の肥大軟骨細胞層・増殖細胞層はともに狭小化しており、さらに SOS 中心部に血管新生やアポトーシスを伴った早期骨化を認めた。



(2) Ach マウスで認められていた顎顔面形態異常に対し、CNP の血中濃度上昇により改善できるかどうか検討するために、Ach マウスと血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスとの交配実験を行った。CNP の血中濃度上昇により、Ach マウスで認められていた中顔面の劣成長や大後頭孔の狭窄は有意に改善することが出来た。組織学的解析の結果、SOS で生じていた早期骨化については CNP の影響は認めなかったものの ISS、SOS の内軟骨性骨化の促進により、軟骨細胞の肥大化や



基質産生の増大を認めていた。以上のことより、CNPの投与は軟骨結合部の内軟骨性骨化を促進させることにより、軟骨無形成症で認められる顎顔面形態異常を改善しうる可能性が示唆された。



Ach/CNPマウスでは大後頭孔の狭窄が有意に改善した。

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 9 件)

- ① Kondo E, Yasoda A, Fujii T, Nakao K, Yamashita Y, Ueda-Sakane Y, Kanamoto N, Miura M, Arai H, Mukoyama M, Inagaki N, Nakao K. Increased bone turnover and possible accelerated fracture healing in a murine model with an increased circulating C-type natriuretic peptide. *Endocrinology*. 2015 Jul;156(7):2518-29. doi: 10.1210/en.2014-1801. Epub 2015 Apr 10.
- ② Nakao K, Osawa K, Yasoda A, Yamanaka S, Fujii T, Kondo E, Koyama N, Kanamoto N, Miura M, Kuwahara K, Akiyama H, Bessho K, Nakao K. The local C-type natriuretic peptide /guanylyl cyclase B system in the growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep*. 2015 May 27;5:10554. doi: 10.1038/srep10554
- ③ Mishima S, Nakao K, Ikeno M, Hori M, Bessho K. Tooth extraction and management of hemostasis in a patient with suspected X-linked thrombocytopenia: A case report *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2015 Volume 27, Issue 6, November 2015, Pages 849-851
- ④ Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45 (1), pp. 124-131 2016
- ⑤ Ueda Y, Yasoda A, Yamashita Y, Kanai Y, Hirota K, Yamauchi I, Kondo E, Sakane I, 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 Volume* 92, 1 November 2016, Pages 157-167
- ⑥ Nakao K, Yasoda A, Okubo Y, Yamanaka S, Koyama N, Osawa K, Isobe Y, Ikeno M, Fujii T, Miura M, Bessho K. A novel therapeutic strategy for midfacial hypoplasia using the CNP/GC-B system. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 29(1), pp. 10-16 2017
- ⑦ S. Yamanaka, K. Nakao, N. Koyama, Y. Isobe, Y. Ueda, Y. Kanai, E. Kondo, T. Fujii, M. Miura, A. Yasoda, K. Nakao, K. Bessho *Circulatory CNP rescues*

craniofacial hypoplasia in achondroplasia. J Dent Res. 2017 Dec;96(13):1526-1534. doi: 10.1177/0022034517716437. Epub 2017 Jun 23.

⑧ Kanai Y, Yasoda A, Mori K, 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. The effect of circulating osteocrin on endochondral bone growth. J Clin Invest. 2017

⑨ 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. Rats deficient C-type natriuretic peptide suffer from impaired skeletal growth without early death. Plos one Volume 13, Issue 3, March 2018, Article number e0194812

[学会発表] (計 5件)

①Nakao K, Yasoda A, Okubo Y, Yamanaka S, Isobe Y, Ikeno M, Koyama N, Bessho K. Importance of endochondral ossification in craniofacial morphology. International Association for Dental Research(IADR2015), Boston, March 11-14 2015, Poster presentation

②山中茂樹, 八十田明宏, 中尾一祐, 小山典昭, 藤井寿人, 近藤絵里, 三浦晶子, 稲垣暢也, 中尾一和, 別所和久. C型ナトリウム利尿ペプチドによる、軟骨無形成症の顎顔面形態異常に対する新規治療法の開発. 第88回日本内分泌学会学術総会 東京都 2015/4/23-25

③磯部悠, 高橋克, 喜早ほのか, 池野正幸, 中尾一祐, 小山典昭, 別所和久. 線維性異形成症の病変部におけるGNAS1遺伝子変異の検討. 第69回日本口腔科学会学術集会 大阪市 2015/5/13-15

④山中茂樹, 八十田明宏, 中尾一祐, 小山典昭, 藤井寿人, 近藤絵里, 三浦晶子, 稲垣暢也, 別所和久, 中尾一和. 軟骨無形成症モデルマウスに生じた顎顔面形態異常に対する、C型ナトリウム利尿ペプチドの有効性について. 第33回日本骨代謝学会学術集会 東京都 2015/7/23-25

⑤山中茂樹, 中尾一祐, 小山典昭, 磯部悠, 別所和久. 軟骨無形成症の顎顔面形態異常発症のメカニズム解析と新規治療法についての検討. 第61回日本口腔外科学会学術集会 千葉市 2016/11/25-27

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 一祐 (NAKAO Kazumasa)
京都大学大学院医学研究科・助教
研究者番号: 40599932