

令和 4 年 6 月 22 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：20K17490

研究課題名(和文) CNPの発現調節機構解明による新規低身長治療の探索研究

研究課題名(英文) Exploratory research on novel treatment for short stature by elucidating the regulatory mechanism of CNP expression

研究代表者

植田 洋平 (Ueda, Yohei)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：30848213

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)：近年C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の骨伸長効果が報告され、低身長症の新規治療薬として臨床応用が進められているが、毎日注射が必要で小児には負担が大きいなど改善すべき点もある。本研究はCNP産生の調節機構解明を通して、CNPの骨伸長効果を利用した低身長症治療の選択肢を広げ、より安全で簡便な治療法を確立することを目的としている。今回の研究では、成長板軟骨という成長の中心と、それ以外の組織ではCNP産生の調節機構が異なることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は低身長症に応用されるようになってきているが、一方で生体内でのCNP発現調節機構は不明であり、これを解明することはCNP発現調節を利用した低身長症の新規治療法開発につながるため、社会的意義のあるものである。今回の研究では、成長板軟骨とそれ以外の組織においてCNPの調節機構が異なっていることを発見し、CNP発現調節機構解明とその低身長症への応用に向けた基礎を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, C-type natriuretic peptide (CNP) has been reported to promote bone elongation and is now in clinical use as a novel therapeutic agent for short stature. However, there are still some points that need to be improved, such as the need for daily injections, which is burdensome for children.

The purpose of this study is to elucidate the regulatory mechanism of CNP production and to establish a safer and simpler treatment method for short stature by expanding the treatment options for short stature by the bone elongation effect of CNP. In this study, we found that CNP production is regulated by different mechanisms in the growth plate cartilage, the center of growth, and in other tissues.

研究分野：内分泌学

キーワード：CNP 低身長症 成長因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在多くの小児が低身長症による QOL の低下を強いられている。低身長症に対する薬剤は成長ホルモン(GH)のみであるが、その効果は極めて限定的で、骨身長症に対する有効な治療法は確立されていない。近年新規治療薬として C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が注目されている。CNP は軟骨無形成症の低身長症に対して有効であることが示されており、さらに我々はグルココルチコイドによる成長障害、ムコ多糖症においても有効であることも報告している。以上のように CNP シグナルの不活化は低身長症治療において非常に有効な戦略となるものであるが、現在研究されている CNP アナログ製剤は半減期の短い注射製剤であるため頻回の注射が必要、一度に大量に注射する必要があるため類似の受容体と交差して血圧が下がる懸念がある、といった欠点もある。

### 2. 研究の目的

CNP の全身投与による CNP の血中濃度上昇よりも、成長板局所での CNP 濃度上昇を目指す治療戦略が副作用等の点で有利である可能性がある。CNP の転写調節機構は未解明であり、これを解明することにより CNP の発現上昇を利用した新規低身長治療法開発の基礎を構築することが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) CNP のフィードバック調節についての解析

CNP の転写調節機構の解明のため、CNP のフィードバック機構の解明を目的として CNP の投与実験を行った。野生型ラットに対して浸透圧ポンプを用いて CNP を 3 日間持続皮下投与し、NT-proCNP の血中濃度および各組織での CNP mRNA の発現を解析した。また局所での調節の評価のため、摘出した野生型ラット胎仔の脛骨および軟骨細胞株 ATDC5 でも CNP の添加実験を行い、CNP mRNA の発現を解析した。

#### (2) CNP の転写調節機構についての解析

CNP の転写調節領域、転写因子の特定のため、CNP のプロモーター領域をクローニングしたルシフェラーゼベクターを使用し、軟骨細胞において CNP の転写調節を行っている部位を評価した。同部位の配列から考えらえる転写因子のノックダウン、強制発現により転写調節の変化を確認した。さらに、軟骨細胞における CNP の転写調節が epigenomic に調節されている可能性を考え、CNP の転写活性が低い未分化軟骨細胞と CNP の転写活性が高い分化軟骨細胞において CNP プロモーター領域のメチル化、ヒストンのアセチル化をそれぞれ bisulfite sequence、ChIP qPCR により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) CNP のフィードバック調節についての解析

CNP は生体内の軟骨組織でのみ負のフィードバック作用を持つが、その他の CNP 産生臓器ではフィードバックがないこと(図 1)、細胞レベルでは、14 日間分化誘導し CNP 発現の上昇している軟骨細胞でも CNP 添加 4 時間後、24 時間後でフィードバックが起こらず、このフィードバック作用には軟骨以外の組織が関与していること(図 2)、さらに生体内の血中 CNP には軟骨由来のものが少ないため NT-proCNP の血中濃度は CNP の投与によりほとんど変わらないこと(図 3)を見出し報告した(Ueda et al. PLoS One. 2020 Oct 1;15(10):e0240023)。

#### (2) CNP の転写調節機構についての解析

CNP のプロモーター領域をクローニングしたルシフェラーゼベクターにより、軟骨細胞において CNP の転写調節を行っている部位を特定したが、考えらえる転写因子のノックダウン、強制発現では明らかな転写活性の変化がなく、CNP の転写調節を変化させると考えられる転写因子は特定できなかった。また、CNP プロモーター領域のメチル化、ヒストンのアセチル化についても未分化軟骨細胞、分化軟骨細胞において有意な差を認めず、今回の実験では CNP が epigenomic に調節されているかどうかについても明らかにすることはできなかった。

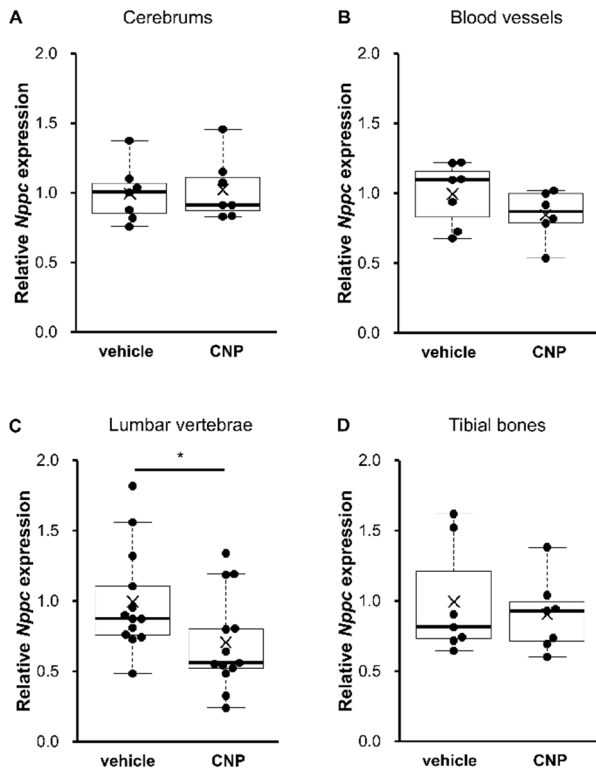


図 1 3 日間 CNP 持続皮下投与後の各組織における CNP mRNA 発現の変化

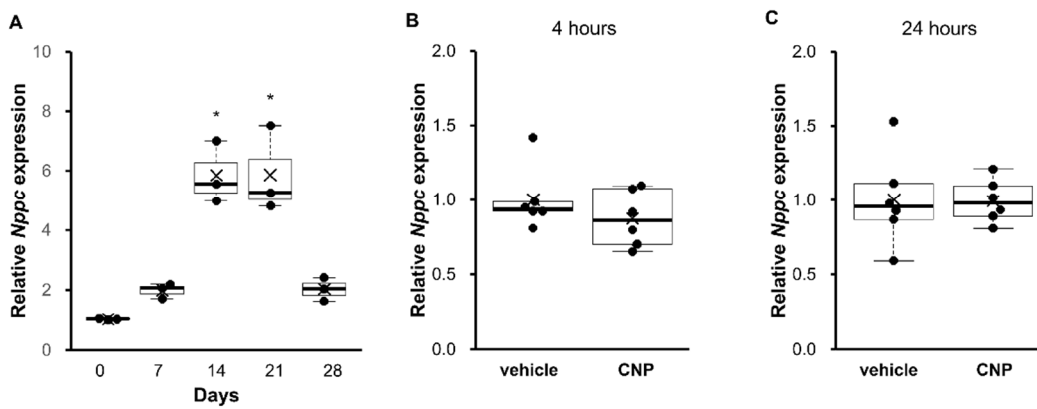


図 2 軟骨細胞の分化誘導による CNP mRNA 発現の変化と CNP 添加後 4 時間、24 時間での CNP mRNA 発現の変化

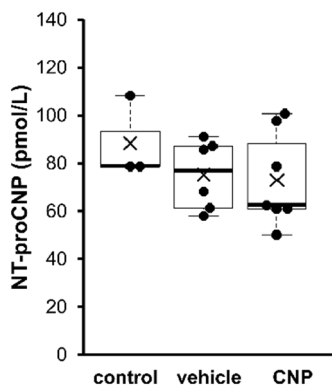


図 3 3 日間 CNP 持続皮下投与後の NT-proCNP の血中濃度の変化

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 Ueda Yohei, Hirota Keisho, Yamauchi Ichiro, Hakata Takuro, Yamashita Takafumi, Fujii Toshihito, Yasoda Akihiro, Inagaki Nobuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Is C-type natriuretic peptide regulated by a feedback loop? A study on systemic and local autoregulatory effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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） 10.1371/journal.pone.0240023	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 1. 植田洋平, 廣田圭昭, 伯田琢郎, 山内一郎, 藤井寿人, 八十田明宏, 稲垣暢也
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドのフィードバック調節に関する検討
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------