

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591176

研究課題名（和文） 骨系統疾患の新規治療戦略の探索

研究課題名（英文） Translational research for novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias

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

研究成果の概要（和文）：

CNP/GC-B 系の骨伸長促進作用を利用した骨系統疾患に対する新規治療戦略についての検証をおこなった。その遺伝子変異が骨系統疾患の原因となる因子と、CNP/GC-B 系の相互作用を培養細胞や器官培養を用いて検証した。さらに、骨系統疾患モデルマウスに対する CNP/GC-B 系の賦活化の効果を CNP 投与モデルである血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスとの交配実験により検討した。

研究成果の概要（英文）：

We performed the translational research of the CNP/GC-B system for impaired skeletal growth of skeletal dysplasias using mice model of skeletal dysplasias. We studied interactions between the CNP/GC-B system and molecules that play essential roles on endochondral bone growth using cell lines and organ culture system. Further we investigated the effects of the CNP/GC-B system on impaired bone growth in mice models of skeletal dysplasias.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：CNP/GC-B 系、骨系統疾患

1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患（skeletal dysplasia）は骨・軟骨組織の成長障害により骨格異常をきたす先天性疾患の総称である。多くの疾患が含まれるが、近年その疾患原因遺伝子が次々と同定されており、それぞれの病態を分子医学的にとらえることが可能となった。2006年に改

訂された国際分類にもその成果がより一層取り入れられ、3型 FGF 受容体の恒常活性化型変異による軟骨無形成症グループをはじめ、コラーゲン遺伝子の異常による疾患群、1型 PTH/PTHrP 受容体遺伝子異常による Jansen 型骨幹端異形成症や Blomstrand 骨異形成症、BMP ファミリーに属する GDF5 の遺伝子異常による Grebe 骨異形成症など

や IB 型 BMP 受容体遺伝子異常による遠位中間肢異形成症などが分類されている。申請者らはこれまでに、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) およびその受容体 B 型グアニル酸シクラーゼ (GC-B) が強力な骨伸長促進因子であることを証明してきた。

2. 研究の目的

1) CNP/GC-B 系と、骨系統疾患発症の分子機序に関与していることが明らかとなっている分子の (骨伸長促進因子等) との相互作用を、マウス軟骨細胞様 ATDC5、あるいは器官培養系を用いて解析し、2) CNP/GC-B 系賦活化の *in vivo* における骨系統疾患モデルマウスに対する治療効果を検証する。

3. 研究の方法

1) マウス新生仔脛骨器官培養、あるいはマウス軟骨細胞様 ATDC5 を用いて、CNP および BMP2 の共添加による形態の変化、発現遺伝子の変化、細胞内シグナル伝達系である Smad のリン酸化の変化について、RIA 法、定量 PCR 法、ウェスタンブロット法等を用いて検討してきた。さらに、GDF-5 の遺伝子変異マウスの脛骨器官培養において、CNP を添加し、伸長促進作用について検討した。

2) ムコ多糖症 7 型モデル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を交配させて血中濃度の上昇するムコ多糖症 7 型モデルマウスを作製し、表現型の改善を軟 X 線写真や組織学的解析にて検討した。

4. 研究成果

1) 4 日間の器官培養において培養脛骨長は BMP2 単独添加群と比べて CNP および BMP2 共添加群では短縮する傾向が認められた。ATDC5 において添加後 24 時間後に測定した mRNA 定量では Id2、Id3 や Runx2 の発現量は BMP2 単独添加群と比較して共添加群において減少した。また、ウェスタンブロット法により検出された BMP 添加による Smad1 のリン酸化は CNP との共添加により減弱した。また、GDF5 mutant マウスより抽出した脛骨を用いて器官培養をおこない、CNP 添加の効果を確認したところ、GDF5 mutant マウス脛骨培養体の伸長は促進し、CNP が GDF5 の変異が原因となる骨系統疾患に対して有効である可能性が示された。

2) ムコ多糖症のモデルマウス (mps-2J) を用いた研究では、まず、器官培養における CNP の作用の評価をおこなったところ、CNP の添加によりムコ多糖症モデルマウスの培養脛骨

は容量依存的にその伸長が促進した (下図)。

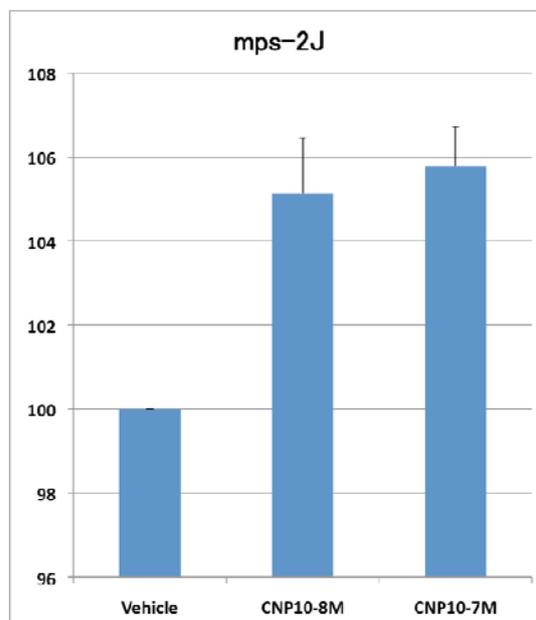


図1. mps-2J より抽出した脛骨器官培養における、培養脛骨の伸長に対する CNP の効果

さらに、血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウス (SAP-CNP-Tg) との交配実験により得られたレスキューマウス (mps-2J/SAP-CNP-Tg) において、mps-2J に認められた骨伸長障害が改善した (図2)。



図2. mps-2J/SAP-CNP-Tg (上段)、および mps-2J (下段) の外観

【結論】 CNP/GC-B 系は BMP シグナルを抑制的に調節している可能性が示唆された。また、CNP/GC-B 系の賦活化による治療が、GDF5 の変異が原因となる骨系統疾患や、ムコ多糖症に認められる骨伸長障害に対しても有効であ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 7 件）

1. Kondo E, Yasoda A, et al., Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (lbab/lbab) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant. *Calcif Tissue Int.*, 査読有 2012, 90:307-18 DOI: 10.1007/s00223-011-9567-0
2. Yasoda A, Nakao K, Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. *Endocr J.* 査読無, 2010, 57:659-66 DOI: 10.1507/endocrj.K10E-164
3. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, et al., Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology*, 査読有, 2010, 151:4381-8 DOI: 10.1210/en.2010-0078
4. Yasoda A, Nakao K., Genetic basis for skeletal disease. CNP therapy for achondroplasia. *Clin Calcium*, 査読無, 2010, 20:1212-8 DOI:該当なし
5. Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, et al., Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology*. 査読有, 2009, 150:3138-44. DOI: 10.1210/en.2008-1676
6. Nakao K, Yasoda A, Ebihara K, et al. Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases for common human diseases. *J Mol Med* 査読有, 2009, 87:1029-39. DOI: 10.1007/s00109-009-0515-7
7. Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y, Jishage K, Yasoda A, et al. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 査読有, 2009, 297:E1339-48. DOI: 10.1152/ajpendo.00272.2009

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 八十田明宏、骨系統疾患に焦点をあてた骨代謝研究、第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011 年 7 月 28-30 日、大阪国際会議場
 2. 八十田明宏、他、軟骨無形成症モデルマウスに対する CNP 投与による骨伸長障害改善効果の検討、第 28 回骨代謝学会学術総会、2010 年 7 月 22 日、東京
 3. Akihiro Yasoda, et al. CNP Therapy, 14th International Congress of Endocrinology, 2010 年 3 月 30 日、京都
 4. Toshihito Fujii, Yasato Komatsu, Akihiro Yasoda, et al. Evaluation for the role of serum c-type natriuretic peptide in endochondral ossification. 14th International Congress of Endocrinology, 2010 年 3 月 30 日、京都
 5. Eri Kondo, Akihiro Yasoda, et al. CNP mutant Lbab mouse as a novel model for skeletal dysplasia. 14th International Congress of Endocrinology, 2010 年 3 月 29 日、京都
 6. 八十田 明宏 他、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) /グアニル酸シクラーゼ B (GC-B) 系の骨伸長促進作用とそのトランスレーショナル研究、第 83 回日本内分泌学会学術総会、2010 年 3 月 26 日、京都
 7. 藤井 寿人、八十田 明宏、他、内軟骨性骨化における CNP/GC-B 系と TGF β /BMP ファミリーのクロストーク、第 83 回日本内分泌学会学術総会、2010 年 3 月 26 日、京都
 8. 近藤 絵里、八十田 明宏、他、著明な高 Ca 血症で発症し部位同定に難渋した原発性副甲状腺機能亢進症の一例、第 83 回日本内分泌学会学術総会、2010 年 3 月 26 日、京都
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

なし

(3)連携研究者

辻 岳人 (Takehito Tsuji)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：90314682