

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19565

研究課題名（和文）軟骨細胞内Ca<sup>2+</sup>を通じた新規骨伸長促進法と骨系統疾患治療法の探索研究課題名（英文）Study on novel methods to promote bone elongation through intracellular Ca<sup>2+</sup> in chondrocytes and treatment of bone system diseases

研究代表者

市村 敦彦（Ichimura, Atsuhiko）

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10609209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：軟骨内骨化における細胞内Ca<sup>2+</sup>制御機構を独自のCa<sup>2+</sup>イメージング実験系を駆使して解析した結果、以下に示す細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナル制御分子機構とその骨系統疾患治療応用に関する主要な成果が得られた。1) C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が軟骨細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルを活性化することを見出し、TRPM7やBKチャネルを始めとしたCNPの骨伸長促進作用と関連する新規シグナル経路を同定した。2) ホスホジエステラーゼ(PDE)3阻害薬が、CNPが活性化する軟骨細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナル経路を活性化することによって骨を伸ばすことを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルは多彩な細胞機能を制御しており、その破綻は様々な疾患の原因となる。長骨伸長を担う軟骨細胞内Ca<sup>2+</sup>胴体やその制御分子機構はそのほとんどが不明であり、分子機構の解を目指す本研究の学術的意義は高い。また、本研究によって明らかとなった軟骨細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルを構築する分子機構は、CNPの新規シグナル経路を踏まえた新たな骨伸長促進薬開発に資する知見を得るに至っており、医薬領域への波及効果を有している。

研究成果の概要（英文）：The following key results were obtained from the analysis of intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation mechanisms in endochondral ossification using an original Ca<sup>2+</sup> imaging system: 1) We found that C-type natriuretic peptide (CNP) activates intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in growth plate chondrocytes and identified novel signaling pathways, including TRPM7 and BK channels, that are associated with CNP's bone elongation-promoting effects. 2) We newly found that phosphodiesterase (PDE)3 inhibitors elongate metatarsal bone by activating CNP-activated intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling pathways.

研究分野：分子薬理学

キーワード：軟骨内骨化 細胞内Ca<sup>2+</sup> C型ナトリウム利尿ペプチド 軟骨無形成症

## 1. 研究開始当初の背景

骨伸長に寄与する軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  自発振幅現象を発見し、2 価陽イオンチャネル TRPM7 を中軸とした制御分子メカニズムの同定に成功した (*Science Signaling*, 2019)。軟骨細胞特異的 *Trpm7* 欠損マウスが著しい軟骨伸長障害を呈したことから、TRPM7 を介した正常な軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態が軟骨伸長に必要であることが示された。ここで、遺伝子欠損マウスの表現型類似性から、軟骨伸長を促進する C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)に着目した。CNP は膜型グアニル酸シクラーゼ NPR2 を活性化して cGMP を増加させ、cGMP 依存性プロテインキナーゼ(PKG) を活性化するが、骨伸長を促進する細胞内シグナルの全容は不明であった。われわれは、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の活性化が CNP の生理機能に重要であることを予想し、分子メカニズムを推測した。予備的検討から、CNP 処置により軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が活性化され、大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネル(BK ch)阻害薬処置により CNP の効果が阻害された。更に、BK ch 活性化剤 NS1619 の処置により軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を活性化できるだけでなく、器官培養軟骨細胞の伸長を促進できたことから、われわれが見出したシグナル経路の賦活により骨伸長を人為的に制御できることが強く示唆された。軟骨無形成症への適用を目指して臨床試験中の CNP アナログペプチド Vosoritide は副作用の発現率 100%であり、 $T_{\max}$  0.25hr、 $T_{1/2}$  0.35hr とクリアランスが早く効果の發揮には大量かつ毎日の皮下投与が必要であるなど改善すべき課題も多い。このように、薬理的介入による骨伸長促進を効果的に達成するには CNP 自体だけでなくシグナル経路の分子基盤の理解に基づいた戦略的な開発が必要であると考えられた。

遺伝的要因やステロイド等の投薬を原因として引き起こされる四肢短縮や低身長症は、著しい QOL の低下と社会的経済的損失につながるが、根本的な治療法は存在しない。CNP アナログは研究開始当初は治療薬候補として現在臨床第 III 相であったが、研究期間中にその効果が確認され、欧米ではファースト・インクラスの軟骨無形成症治療薬として 2021 年に承認された。その一方で、CNP のシグナル経路や分子機序は詳細が不明であり、CNP アナログ投与による多くの副作用や血中安定性の低さ、中和抗体の出現、受容体脱感作など複数の課題が報告されている。これらは CNP シグナルの理解により克服できるとわれわれは考えた。本研究により、明確な分子機序に基づく新しい安定的骨伸長促進手法開発に資する科学的基盤を確立できると期待して一連の研究を遂行した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨伸長を促進する細胞内シグナルの分子基盤を明らかとし、基礎的知見に立脚した軟骨伸長促進手法を開発することである。

われわれは未知の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態とその制御分子機構の解明に取り組んできた。近年では、骨伸長に寄与する軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の発生・制御メカニズムの解明を進めており、その薬理的調節により骨伸長を人為的に操作できる可能性を着想した。本研究では、骨伸長を促進する CNP が軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の活性化を介して生理機能を發揮している独自の予備的知見に基づき、骨伸長が促される際の細胞内シグナル経路を探索し、分子機序を詳細に検討した。さらに、解明した分子機序を基盤とし、軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  制御に寄与するイオンチャネルや酵素の活性を調節して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を活性化し骨伸長を促し得る化合物をスクリーニングするとともに、得られた候補化合物の構造展開を行うことにより、CNP とは異なる分子を標的として骨伸長促進可能な化合物の取得を目指した。また、並行して CNP ペプチドの化学的改変を行うことで生理活性を保ったまま血中安定性を向上させ、現状頻回大量投与が必要な CNP アナログに代わるペプチドの同定につながる構造的改変や修飾等の新規知見の取得を試みた。一連の研究遂行により、薬物投与による骨伸長の制御や軟骨細胞の増殖・分化の調節が可能となる新規手法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) CNP シグナル分子機構の詳細な解明と鍵分子の同定

独自の軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング系と各分子の選択的阻害薬や活性化薬を用いて想定している CNP が骨伸長を促進するシグナル分子機構を探索した。器官培養系を用いた生理活性の評価と分子機序との関連についても解析した。

### (2) シグナル経路上の鍵分子活性化薬のスクリーニングと構造展開

解明したシグナル経路の理解に基づき、BK チャネルまたは TRPM7 チャネルといったシグナル経路下流の鍵分子を活性化して CNP 同様の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  活性化と骨伸長促進効果を示す低分子化合物を、軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより探索した。候補化合物は本学所有の独自の化合物ライブラリから有機合成化学者の経験に基づき選出した。

### (3) CNP ペプチド改変と体内動態改善

CNP ペプチドには構造改変により血中安定性や体内動態の改善余地があると考えられた。そこで、プロテアーゼ切断は受けず生理活性を維持した新規医薬品リード化合物候補となる類縁体の創製を目指した。

#### 4. 研究成果

(1) CNP の室温 1 時間の処置によって軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが賦活されることが明らかとなった。さらに、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングおよび薬理的阻害実験や活性化実験を行うことによって、CNP の受容体である NPR2 のみならず、cGMP および cGMP 依存性タンパク質リ酸化酵素 PKG が CNP の軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル活性化に寄与していることを明らかとした。さらに、大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  (BK) チャネルや TRPM7 チャネルといったイオンチャネルが CNP の軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル活性化を引き起こしていることを示した。また、CNP 措置によって CaMKII が活性化することを示した。一連の細胞内シグナル経路解析結果から、CNP-NPR2-cGMP-PKG-BK ch.-TRPM7 ch.-CaMKII という CNP が軟骨細胞において活性化する新たなシグナル経路を明らかにした。生理機能との関与を調べるため、器官培養軟骨を用いた CNP の評価を行った。CNP は既報の通り野生型マウス由来の器官培養軟骨の伸長を促進したが、*Npr2* 欠損マウス由来の器官培養軟骨ではその生理機能が失われた。これらの結果は、CNP の骨を伸ばす活性が軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路に依存して発揮されていることを示唆している。本研究で明らかとなったシグナル経路に関連する分子の活性調節剤は新たな骨系統疾患治療薬として期待できる。以上の結果を国際学術誌に公表した (*eLife*, 2022)。

(2) 化合物ライブラリより合計 68 種類の化合物を選択してスクリーニングを行った。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングシステムの中核を成す冷却 CCD カメラが長期間故障したため試行化合物数は当初計画より限定的な数にとどまった。スクリーニング結果から 2 種類の軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル活性化能を有すると思われる化合物を発見したため、器官培養系を用いて骨伸長促進活性について評価した。しかしながら、これらの化合物には骨を伸ばす活性は観察されなかった。

(3) CNP の C 末端側モデルペプチドを用いた検討によって、計画通りの化学反応が非常に低立ながら進行することを確認した。今後反応最適化を行った後、CNP 自体の改変を行う予定である。

(4) 1 の結果を踏まえて当初計画から派生し、CNP 下流のシグナル分子 cGMP 分解を担うホスホジエステラーゼ(PDE)に注目した。軟骨組織に発現している PDE のうち cGMP 分解に関与する可能性のあるサブタイプとして PDE3 を見出した。PDE3 を阻害することで CNP と同様の軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路を活性化し骨を伸ばす事ができるのではないかと考え、PDE3 阻害薬 シロスタゾールを用いた検討を行った。その結果、シロスタゾール処置により軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが有意に活性化されるとともに、器官培養軟骨に対して骨伸長促進効果が発揮された。その他の PDE3 阻害薬を用いた検討や分子機序の解析を進め、それらの結果をもとに「骨伸長促進剤」として特許を申請した(特願 2023-026255)。今後早急に国際学術誌への成果報告を目指す予定である。

以上の一連の研究成果から、CNP の骨伸長促進作用と関連する新たな細胞内シグナル経路として、CNP-NPR2-cGMP-PKG-BK ch.-TRPM7 ch.-CaMKII が同定されただけでなく、この経路を CNP-NPR2 よりも下流側で活性化することによって骨を伸ばすことが出来ることを示す事ができた。これらの知見は、新たな骨伸長促進薬の可能性を示しており、軟骨無形成症をはじめとした成長障害を来す様々な疾患に対して新たな観点から治療薬候補を提示する成果である。

PDE3 阻害薬は抗血小板薬や心不全治療薬として既に臨床で用いられており、成人における投与の安全性は確認されている。しかし一方で、これらの薬剤の長期投与は血管平滑筋の弛緩による血圧低下と頻脈、それに伴う頭痛といった副作用をもたらすことがわかっており、小児への慢性的な投与にはなお克服すべき課題が多い。循環器への作用を減弱するとともに骨への作用を高めるような化学的修飾や標的特異性を高めるための薬剤学的アプローチが今後必要になると予想される。

#### <引用文献>

Qian N, **Ichimura A**, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H., TRPM7 channels mediate spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development, *Sci Signal*. 2019 Apr 9;12(576):eaaw4847. doi: 10.1126/scisignal.aaw4847.

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 0件）

1. 著者名 Yuu Miyazaki#, Atsuhiko Ichimura#, Ryo Kitayama, Naoki Okamoto, Tomoki Yasue, Feng Liu, Takaaki Kawabe, Hiroki Nagatomo, Yohei Ueda, Ichiro Yamauchi, Takuro Hakata, Kazumasa Nakao, Sho Kakizawa, Miyuki Nishi, Yasuo Mori, Haruhiko Akiyama, Kazuwa Nakao, Hiroshi Takeshima, #, contributed equally	4. 巻 11
2. 論文標題 C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca <sup>2+</sup> entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e71931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.71931.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎 侑、市村 敦彦、北山 諒、岡本 直樹、安江 智生、劉 楓、川邊 隆彰、長友 宏樹、西 美幸、柿澤 昌、竹島 浩
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドは成長板軟骨細胞において自発的なCa <sup>2+</sup> 流入を介して骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬理学会95回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 直樹、市村 敦彦、宮崎 侑、北山 諒、安江 智己、劉 楓、川邊 隆彰、長友 宏樹、柿澤 昌、西 美幸、竹島 浩
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドは軟骨細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナル経路を活性化し骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川邊 隆彰、市村 敦彦、安江 智生、竹島 浩
2. 発表標題 成長板軟骨細胞におけるホスホジエステラーゼ3(PDE3)の阻害は細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナル経路を活性化し骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市村 敦彦
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドによる軟骨細胞内 Ca2+シグナルの活性化と骨伸長促進作用：分子機序に基づく小児骨系統疾患に対する創薬戦略
3. 学会等名 「子どもの薬を創る会」第5回セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨伸長促進剤	発明者 市村 敦彦、竹島 浩	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-026255	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	植田 洋平 (Ueda Yohei) (30848213)	京都大学・医学研究科・特定助教  (14301)	
研究分担者	井貫 晋輔 (Inuki Shinsuke) (70736272)	京都大学・薬学研究科・准教授  (14301)	

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
---------	---------