

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791056

研究課題名(和文) ナトリウム利尿ペプチドの内軟骨性骨化におけるクロストーク

研究課題名(英文) crosstalk of C-type natriuretic peptide in the endochondral ossification

研究代表者

藤井 寿人(Fujii, Toshihito)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50537347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究によって、内軟骨性骨化においてCNP/GC-B系はTGF- $\beta$ /BMPファミリーであるBMPの下流シグナルを阻害することが明らかとなった。BMPの受容体であるアクチビン受容体1型の遺伝子変異が原因でBMPシグナルの暴走が引き起こされるヒトの筋骨格系難治疾患である進行性骨化性線維異型性症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva:FOP)に対する治療として今後、創薬のターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I showed that C-type natriuretic peptide(CNP) attenuated downstream signals of BMP in the endochondral ossification. Now, therefore, CNP may be the target of drug discovery for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva(FOP), that is a refractory disease of muscle and bone caused by runaway of BMP signals.

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：軟骨 ナトリウム利尿ペプチド 骨

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで CNP/GC-B/cGMP 系が内軟骨性骨化において重要な役割を果たしていることを報告してきた。すなわち、CNP あるいは GC-B ノックアウトマウスでは著明な低身長となることから、CNP/GC-B 系が主に内軟骨性骨化による長管骨の伸長を促進していることを明らかにしてきた (Hideki Chuchō et al, PNAS, 2001, Vol. 98, 4016-4021) (Naohisa Tamura et al, PNAS, 2004, Vol. 101, 17300-17305)。また、TGF /BMP ファミリーも内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖および分化を制御している重要な因子であることが報告されている。軟骨細胞は間葉系幹細胞から分化するが、同様に間葉系幹細胞から分化する筋細胞や腱組織などでの BMP シグナルの暴走によって引き起こされるヒトの筋骨格系難治疾患として進行性骨化性線維異型性症が知られている。この疾患は BMP の受容体であるアクチビン受容体 1 型の遺伝子変異が原因であることが報告されている (Shore, E.M. et al, Nature Genetics, 38, 525-527, 2006) が、小児期より筋肉や腱周囲組織が骨化して可動範囲が狭まったり背中が変形したりする難病であり、この疾患における異所性骨化は内軟骨性骨化のメカニズムで発生しているのだが、これまでのところ有効な治療法は確立されていない。

### 2. 研究の目的

我々は C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) およびその受容体グアニル酸シクラーゼ-B (GC-B) 系が内軟骨性骨化において重要な役割を果たしていることを報告してきた。また、TGF /BMP ファミリーも内軟骨性骨化および筋骨格系疾患において重要な役割を果たしていることが報告されている。これまで CNP と同じナトリウム利尿ペプチドファミリーである ANP や BNP が TGF /BMP ファミリーと相互作用することが報告されてきたが、CNP/GC-B 系と TGF /BMP ファミリーとの相互作用の報告はほとんどない。よって、この両者の内軟骨性骨化における相互作用を検討し、その役割と意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

CNP/GC-B/cGMP 系と TGF /BMP ファミリーの相互作用を明らかにするために CNP が BMP 下流シグナルに与える影響から検討を

手する。BMP シグナルの標的遺伝子である Id ファミリーや Runx2、p21 の発現量を軟骨前駆細胞である ATDC5 を用いて定量 PCR 法で、BMP 下流シグナルであるリン酸化 smad1/5/8 タンパク量はウエスタンブロット法を用いて検討する。BMP は軟骨細胞の増殖・分化に影響を与えていることが明らかとなっていることから ATDC5 およびマウスの脛骨を用いて細胞増殖および分化に対する影響を検討する。さらに、BMP は細胞周期およびアポトーシスに影響を与えることが報告されていることから ATDC5 およびマウスの脛骨器官培養における影響を検討する。

### 4. 研究成果

- (1) CNP/GC-B/cGMP 系と TGF /BMP ファミリーの相互作用を明らかにするためにまず CNP が BMP の下流シグナルに与える影響から検討した。ICR マウスの脛骨を取り出して Vehicle 群、CNP 単独添加群、BMP2 単独添加群、BMP2 および CNP 共添加群の 4 群に分けて 4 日間器官培養を行った。その結果、Vehicle 群に比較して CNP 単独添加群、BMP2 単独添加群では脛骨長の増加を認めたが、BMP2 および CNP 共添加群では予想よりも脛骨長の増加は少なかった。
- (2) 次に、軟骨前駆細胞である ATDC5 におけるウエスタンブロット法を用いて BMP2 単独添加群と BMP2 および CNP 共添加群において BMP2 の下流シグナルである転写因子 smad1/5/8 のリン酸化タンパク量を検討した。その結果、smad1/5/8 のリン酸化タンパク量は BMP2 単独添加群に比較して BMP2 および CNP 共添加群において減少を認めた。よって、CNP は BMP 下流シグナルを阻害することが示唆された。
- (3) 次に、軟骨前駆細胞である ATDC5 において BMP のさらに下流の標的遺伝子である Id ファミリーや Runx2、p21 の mRNA 発現量を Vehicle 群、CNP 単独添加群、BMP2 単独添加群、BMP2 および CNP 共添加群の 4 群で定量 PCR

法で比較した。その結果、Vehicle 群と比較して BMP2 単独添加群では著明な発現増加を Id ファミリー、Runx2、p21 それぞれで認めた。それに対して、BMP2 および CNP 共添加群では BMP2 単独添加群と比較して Id ファミリー、Runx2、p21 の発現量の低下を認めた。よって、CNP は BMP 下流シグナルを阻害することが示唆された。

( 4 ) BMP は軟骨細胞の増殖・分化に影響を与えていることが明らかとなっていることから軟骨細胞である ATDC5 を用いて *in vitro* における CNP が BMP 下流シグナルに与える影響を増殖能を解析できる MTT アッセイを用いて検討した。具体的に、6-well に ATDC5 細胞を一定数それぞれまいて Vehicle 群、CNP 単独添加群、BMP2 単独添加群、BMP2 および CNP 共添加群の 4 群に分けてコンフルエントに至る前の段階で 6 日間添加培養を行って MTT アッセイを行った。その結果、Vehicle 群、CNP 単独添加群では同様の結果であった。しかし、BMP2 単独添加群、BMP2 および CNP 共添加群では Vehicle 群、CNP 単独添加群と比べてそれぞれ有意に低下を認めた。だが、BMP2 単独添加群、共添加群では有意な違いは認めなかった。前年度の結果と合わせてこの実験系では BMP2 が ATDC5 細胞の増殖能を抑制することが明らかとなった。また、BMP2 単独添加群、共添加群では有意な違いは認めなかったことから BMP2 の ATDC5 細胞の増殖能抑制作用は non-smad 経路である可能性が示唆された。

( 5 ) 次に、軟骨細胞の分化マーカーである ALP アッセイを 4 群で検討した。コンフルエントに達した 6-well の

ATDC5 細胞に 3 日間添加した。その結果、Vehicle 群、CNP 単独添加群では同様の結果であった。また、BMP2 単独添加群、共添加群では Vehicle 群、CNP 単独添加群と比べてそれぞれ有意に増加を認めた。だが、BMP2 単独添加群、共添加群では有意な違いは認めなかった。前年度の結果と合わせてこの実験系では BMP2 の ALP 活性化作用は non-smad 経路である可能性が示唆された。

( 6 ) CNP/GC-B/cGMP 系と TGF /BMP ファミリーの相互作用を明らかにするために、BMP が CNP 下流シグナルに与える影響を検討した。ATDC5 において Vehicle 群、CNP 単独添加群、BMP2 単独添加群、BMP2 および CNP 共添加群の 4 群での cGMP 産生量を ELISA 法を用いて測定した。Vehicle 群および BMP2 単独添加群では cGMP 値は低値であったが、既報の通り、CNP 単独添加群では著明に cGMP 値は上昇を認めた。BMP2 および CNP 共添加群においても CNP 単独添加群と同様に著明に cGMP 値は上昇を認めたが、CNP 単独添加群と比較して有意差を認めなかった。

( 7 ) 以上、総合すると、CNP/GC-B 系が BMP シグナルを負に制御することでヒトへの CNP 投与が進行性骨化性線維異型性症の治療法となりうる可能性がある。または、創薬のターゲットになる可能性がある。

#### 5 . 主な発表論文等 投稿準備中

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 寿人 (FUJII Toshihito)  
京都大学・大学院医学研究科・糖尿病・内  
分泌・栄養内科・助教  
研究者番号：50537347

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし