

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860765

研究課題名(和文) 低身長症を呈するSEDCに対するC型ナトリウム利尿ペプチドの効果の検討

研究課題名(英文) The effect of C-type natriuretic peptide for Spondyloepiphyseal dysplasia congenita(SEDC) with short stature

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低身長症を呈するSpondyloepiphyseal Dysplasia Congenita (SEDC、先天性脊椎・骨端異形成症)は常染色体優性遺伝であり、その原因遺伝子座は2型コラーゲンである。このSEDCの低身長症に対しては現在有効な治療法はない。そこで、SEDCモデルマウス(JAX mice ID:003916)をアメリカ合衆国のJackson Laboratory社から購入して、CNPトランスジェニックマウスとの交配実験を計画した。今後も引き続き研究を継続して、SEDCの低身長に対するCNPの効果을明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita (SEDC) with short stature is autosomal dominant inheritance, and causative gene of SEDC is in the type 2 collagen. There is no effective therapy for short stature of SEDC. And so, we bought model mice of SEDC from Jackson Laboratory, USA. We are trying to study the effect of CNP for short stature of SEDC using model mice of SEDC and CNP transgenic mice. We are going to elucidate the effect of CNP for SEDC by growth curves, radiograph, histopathology, and so on.

研究分野：代謝学

キーワード：骨・カルシウム代謝異常

1. 研究開始当初の背景

C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)や脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)と同じナトリウム利尿ペプチドファミリーに属している。ANPやBNPは主にGCA受容体に接合して、循環器領域で重要な存在であることが分かっている。ANPは心不全の治療薬として既に臨床応用されており、BNPは心不全の重症度を示すマーカーとして臨床で用いられている。一方、CNPは主にGCB受容体に接合して主に長管骨の軟骨細胞の分化形式である内軟骨性骨化において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。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や軟骨特異的にCNPを過剰発現させたCNPトランスジェニックマウスでは著明な高身長になることから、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が明らかとなっている(Chucho H et al, PNAS, 2001, Vol. 98, 4016-4021)(Tamura N et al, PNAS, 2004, Vol. 101, 17300-17305)。そこで、このCNPの強い骨伸長促進作用を臨床応用することを計画し、骨伸長障害をきたすヒトの代表的な疾患である軟骨無形成症に対するCNPの有効性をモデルマウスを用いた検討で証明してきた(Yasoda A et al, Nature Medicine, 2004, Vol. 10)。さらに循環血液中のCNP濃度が上昇したCNPトランスジェニックマウスの検討でも血中CNP濃度の上昇による骨伸長促進が確立されていることからヒトに対するCNPの末梢投与方法による治療が可能であることが証明された(Fujii T et al, Endocrinology, 2010; Sep; 151(9):4381-88)(Kake T et al, Am J Physiol Endocrinol Metab., 2009 Oct 6)。

また、内軟骨性骨化においてCNP/GC-B系はTGF- β /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ている(in preparation)。TGF- β /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。すなわち、TGF

は軟骨前駆細胞であるATDC5において細胞外マトリックスであるアグリカンの産生を正に制御していることが示されている(Hideto Watanabe et al, The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, 14466-14473)。あるいはBMPについてはその下流シグナルである転写因子 smad1/5/8のノックアウトマウスの解析が報告されている(Kelsey N. Retting et al, Development 2009, 136, 1093-1104)。その報告によれば smad1/5/8 ノックアウトマウスでは四肢の

形成がほとんど認められないことから BMPシグナルが内軟骨性骨化に必須の因子であることが示された。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形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva:FOP)は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。

CNP/GC-B系は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。

現在、米国のBioMarin社は、CNP誘導体である vosoritide (BMN-111) について、欧米および豪州にて軟骨無形成症児を対象とした第II相臨床試験を実施している。本試験の中間解析では、vosoritideの一日1回皮下投与の安全性および有効性について良好な結果が得られていることが報告されている。現在、投与量を増加した4つ目の投与群を追加し、第II相臨床試験を継続している。また、BioMarin社は現在、主要な第III相臨床試験ならびに、5歳未満の幼児を対象とした新たな試験を計画中であることが公開されている。このようにCNPの臨床応用に向けた製薬会社の臨床試験が進行しており、今後、実際に臨床の場において使用が開始される日が近づいている。臨床応用が近づいている中で、CNPの投与適応疾患が軟骨無形成症から他の低身長症を呈する骨系統疾患に広がることが期待されている。

一方、Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita (SEDC、先天性脊椎・骨端異形成症)は常染色体優性の遺伝形式であり、原因遺伝子座は 型コラーゲン (*Col2A1*) である (Lee B et al, Science, 1989; 244: 978-980)。型コラーゲンは主に軟骨に多く発現しており、長管骨の骨端部にある成長板軟骨にも多く発現している。SEDCでは異常な型コラーゲンの発現により長管骨成長のエンジンである長管骨の骨端部にある成長板軟骨の軟骨細胞の増殖と分化がともに障害される。よって、症状としては著しい低身長症を呈する (Spranger et al, Lancet, 1966; 288: 642 only)。最終身長は、個人差はあるものの典型的には 90cm から 140cm の範囲内に留まってしまうことが多い。また、時に視力障害(近視)や聴力障害、脊椎側湾が出現することもある (Roaf R et al, Dev. Med. Child Neurol, 1967; 9: 464-473)。加えて、頸椎症による神

経症状を呈して外科的手術を要することも
ある (Gembun Y et al, J Nippon Med
Sch, 2000;2:186-189)。ただ、精神発達は正
常であり、また、妊娠や出産も可能である。
しかし、これらの低身長症以外の合併症に
ついては対症療法が主であるが、著しい低
身長症に対しては現在有効な治療法はない。
よって、SEDC の低身長症に対する有効な治
療方法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

このように C 型ナトリウム利尿ペプチド
(CNP) は内軟骨性骨化において重要な役割
を果たしており、低身長症を呈する軟骨無
形成症モデルマウスとの交配実験において
その低身長をレスキューすることが報告さ
れている (Yasoda A et al, Nature Medicine,
2004, Vol. 10)。この CNP の強力な骨伸長促
進作用を他の低身長症を呈する骨系統疾患
に適応を拡大するために、低身長症を呈す
る Spondylo- epiphyseal Dysplasia
Congenita (SEDC、先天性脊椎・骨端異形成
症) に着目した。SEDC は常染色体優性遺伝
形式の疾患であり、低身長症を呈する先天
性の希少難病であるが、現在、有効な治療
法はない。SEDC の低身長症の治療として
CNP の投与治療が有効かどうか検討するた
めに今回の研究を計画した。

今回の研究では、ヒトに投与する前の前臨
床試験として、SEDC モデルマウスを用いる
ことにより CNP の有効性を検討する。また、
今回使用を予定している SEDC モデルマウ
スは過去にヒトにおいて見つかった変異と
同義の変異を有しており、そういった意味
でも実際に即した前臨床試験と言える
(Donahue R. et al, JBMR, 2003;18:
1612-1621)。

今回の研究で SEDC に対する CNP の効果が確
認できれば、CNP 投与治療が SEDC の低身長
症に対する新規治療法となりうる可能性が
あり、この研究は日本発の世界初の新規治
療法になる可能性がある。

3. 研究の方法

SEDC モデルマウス (JAX mice ID:003916)
をアメリカ合衆国の Jackson Laboratory
社から購入して、CNP 投与モデルである血
中 CNP 濃度が上昇している CNP トランスジ
ェニックマウス (SAP-CNP-Tg) を交配させ
SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg を作製して解析する。

具体的には、SEDC の疾患モデルマウスで
ある SEDC モデルマウス (SEDC^{+m}) をアメリ
カ合衆国の Jackson Laboratory 社から購入
する。この SEDC モデルマウスはホモマウス
(SEDC^{m/m}) において低身長を呈し、大腿骨

や脛骨などの長管骨の骨長の短縮を認める。
また、この SEDC モデルマウスでは Col2a1
遺伝子の 48 番目のエクソンにおいて 1147
番目のアミノ酸であるアルギニンがシスチ
ンに置換されていることが同定されている。
この変異は既報で報告されているヒトにお
ける 789 番目のアルギニンがシスチンに置
換されている変異と同義と見られることが
報告されている (Donahue R. et al, JBMR,
2003;18:1612-1621)。よって、このモデル
マウスを用いて CNP の効果を検討すること
はヒトの実際の症例における効果を検討す
ることにより適していることを示している。
まず、SEDC^{+m} マウス同士を交配させて、
SEDC^{m/m} マウスを作製する。次に生直後の
SEDC^{m/m} マウスの脛骨を取り出して 4 日間器
官培養を行う。Vehicle 群と CNP10^{-8M} 群、
CNP10^{-7M} 群で器官培養を行い脛骨長を測定
する。Vehicle 群と CNP 添加群との脛骨長
を比較することで CNP の SEDC の低身長症に
対する効果を確認する。また、CNP10^{-8M} 群
と CNP10^{-7M} 群の脛骨長を比較することで
CNP の骨伸長促進作用の用量依存性の有無
を確認する。加えて、器官培養終了後の脛
骨を用いて組織学的解析を行う。すなわち、
Vehicle 群と CNP10^{-8M} 群、CNP10^{-7M} 群にお
ける脛骨に対して型コラーゲンや型コ
ラーゲンなどの軟骨分化マーカーの免疫染
色、アルシアンブルー & HE 染色を行い、軟
骨の分化過程である増殖層や肥大化軟骨層
に及ぼす CNP の影響を検討する。

器官培養実験と併行して、SEDC の疾患モ
デルマウスである SEDC モデルマウス
(SEDC^{+m}) と血中 CNP 濃度が上昇している
CNP トランスジェニックマウス (SAP-
CNP-Tg) を交配して、SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg
を作製して成長曲線 (吻臀長や体重) の作成
を開始する。成長曲線はオスとメスの両方
で作成して 2 週目から計測して 10 週目ま
で毎週測定する。また、野生型群、
SAP-CNP-Tg 群、SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg 群、
SEDC^{m/m} 群の 4 群で成長曲線を作成する。
SEDC の疾患モデルマウスである SEDC モ
デルマウス (SEDC^{+m}) と血中 CNP 濃度が上昇
している CNP トランスジェニックマウス
(SAP-CNP-Tg) を交配して、
SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg を作製して成長曲線
(吻臀長や体重) の作成を継続して行う。
10 週目の野生型群、SAP-CNP-Tg 群、
SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg 群、SEDC^{m/m} 群の 4 群で
軟 X 線写真を撮影して長管骨 (頭蓋骨前後
径、橈骨、腰椎 L1-L5、大腿骨、脛骨) を
中心として骨長を計測して CNP の SEDC に対
する効果を検討する。

野生型群、SAP-CNP-Tg 群、
SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg 群、SEDC^{m/m} 群の 4 群で

3 週齢の脛骨をサンプリングを行い、型コラーゲンや 型コラーゲンなどの軟骨分化マーカーによる免疫染色、アルシアンブルー & HE 染色、BrdU 染色などの組織学的解析を行う。

4 . 研究成果

SEDC の疾患モデルマウスである SEDC モデルマウス (SEDC^{+m}) をアメリカ合衆国の Jackson Laboratory 社から購入した。現在も、SEDC モデルマウスと CNP 投与モデルである血中 CNP 濃度が上昇している CNP トランスジェニックマウス (SAP-CNP-Tg) を交配させ SEDC^{m/m}/SAP-CNP-Tg の作製を試みている。今後も研究を継続して、CNP の SEDC の低身長症に対する効果を明らかにしていく。

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 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)

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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :