

京都大学	博士 (医学)	氏 名	藤井 寿人
論文題目	Circulating C-Type Natriuretic Peptide(CNP)Rescues Chondrodysplastic CNP Knockout Mice from Their Impaired Skeletal Growth and Early Death. (英文題目) 循環血中の C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は軟骨異形成を示す CNP ノックアウトマウスの骨伸長障害と早期の高い死亡率を改善する		
(論文内容の要旨) これまで本教室では、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) およびその受容体であるグアニル酸シクラーゼ B (GC-B) より成る CNP/GC-B 系が強力に内軟骨性骨化を促進することを明らかにしてきた。CNP ノックアウトマウスおよび GC-B ノックアウトマウスにおいて骨伸長障害による著しい低身長が認められ、ヒトにおいても GC-B の変異が四肢短縮型低身長症の一病型であるマロトー型遠位中間肢異形成症の原因であることが明らかになっている。これらの成果を踏まえて本教室では軟骨無形成症をはじめとする骨系統疾患に対する CNP のトランスレショナルリサーチを推進している。本研究の目的は、成長板軟骨の autocrine/paracrine 因子である CNP/GC-B 系に対して、末梢投与された CNP が血中を循環して成長板軟骨に到達し、作用できるかどうかを明らかにすることである。まずヒトアミロイド P プロモーターを用いて CNP を肝臓特異的に発現させ血中 CNP 濃度が増加するトランスジェニックマウス(SAP-CNP-Tg マウス)を作製し、骨格の表現型を解析した。SAP-CNP-Tg マウスでは吻髀長や、軟 X 線写真上で計測した椎骨・長管骨長が野生型マウスと比較して著しく増加していた。更に SAP-CNP-Tg ホモマウスを作製したところ、ヘテロマウスと比べて椎骨・四肢長管骨長の更なる増加が認められ、SAP-CNP-Tg マウスにおける導入遺伝子の用量依存性が確認された。また、マウス新生仔脛骨器官培養系において、2 型コラーゲンプロモーターを用いた軟骨過剰発現 CNP トランスジェニックマウスの脛骨が野生型マウス脛骨と比較して有意に伸長促進するのに対し、SAP-CNP-Tg マウス脛骨は野生型マウス脛骨と同等の伸長しか示さず、SAP-CNP-Tg マウスの骨伸長促進作用は循環血中の CNP による作用であることが証明された。更に循環血中の CNP の内軟骨性骨化に対する作用をより詳細に検討するために、CNP ノックアウトマウス(Nppc ^{-/-} マウス)と SAP-CNP-Tg マウスを交配させて Nppc ^{-/-} /SAP-CNP-Tg マウスを作製したところ、Nppc ^{-/-} マウスは骨伸長障害により著しい低身長をきたすが、Nppc ^{-/-} /SAP-CNP-Tg マウスでは、Nppc ^{-/-} マウスと比較して吻髀長と椎骨・四肢長管骨長の著しい改善が認められた。組織学的にも Nppc ^{-/-} /SAP-CNP-Tg マウスでは Nppc ^{-/-} マウスと比較して脛骨成長板厚が増大し、in situ hybridization による解析にてそれぞれ 2 型、10 型コラーゲンの発現を認める増殖細胞層、肥大化細胞層の厚みの著しい増大が確認された。更にマウス新生仔脛骨器官培養系において CNP 添加により Nppc ^{-/-} マウスの培養脛骨の伸長は用量依存的に促進し、in vitro の器官培養系においても内軟骨性骨化の促進に対する CNP の用量依存性が確認された。また、Nppc ^{-/-} マウスの生後早期の高い死亡率が、Nppc ^{-/-} /SAP-CNP-Tg マウスでは大幅に改善し、骨伸長障害の改善を通じた CNP の死亡率改善作用が確認された。以上の本研究の結果から、CNP が内軟骨性骨化に対して局所因子として作用するのみならず、末梢投与された CNP が血液循環を介して成長板軟骨に到達し内軟骨性骨化を促進することが明らかとなった。この研究成果は合成 CNP や CNP analog の末梢投与による軟骨無形成症など骨系統疾患や低身長症などを対象とした新規治療法の可能性を示唆するものである。			

(論文審査の結果の要旨)

当教室では CNP が成長板軟骨における局所因子として強力な骨伸長促進作用を有することを報告してきた。本研究は、CNP を用いた骨系統疾患に対する新規治療法の開発を目的として、CNP が血中を循環して成長板軟骨に到達し、骨伸長促進作用を発揮する可能性について検討したものである。まず、アミロイド P プロモーターを用いて CNP を肝臓特異的に発現させ、血中 CNP 濃度が増加するトランスジェニックマウス(SAP-CNP-Tg)を作製した。野生型マウスと比較して、SAP-CNP-Tg の吻髀長、長管骨長はそれぞれ 6%、9-13%増加した。更に、骨伸長障害により低身長を来す CNP ノックアウトマウス(CNP-KO)と SAP-CNP-Tg を交配させて CNP-KO/SAP-CNP-Tg を作製すると、CNP-KO の吻髀長、長管骨長はそれぞれ 17%、15-36%と著しく増加した。組織学的解析では、CNP-KO/SAP-CNP-Tg は CNP-KO と比較して脛骨成長板厚が 72%増大した。また、CNP-KO で明らかにされている生後早期の高死亡率は、CNP-KO/SAP-CNP-Tg において改善した。

以上の研究は、合成 CNP を投与して血中 CNP 濃度を持続的に上昇させることにより、内軟骨性骨化を促進し骨伸長を誘導できることを証明するものであり、CNP 投与による骨系統疾患に対する新規治療法の開発の前臨床研究としての意義は大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 11 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。