TITLE:

Complementary antagonistic actions
between C-type natriuretic peptide and the
MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5
cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ozasa, Ami

CITATION:

Ozasa, Ami. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. 京都大学, 2005, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2005-07-25

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/144484>

RIGHT:

氏 名	お 小 ざ さ あ み
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2905 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. (前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞における CNP と FGFR3 を介した MAPK 経路の相互作用の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 中 村 孝 志 教 授 戸 口 田 淳 也

論 文 内 容 の 要 旨

前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞における CNP と FGFR3 を介した MAPK 経路の相互作用の研究

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには ANP, BNP, CNP の 3 種類が存在する。ANP, BNP は GC-A 受容体に, CNP は主に GC-B 受容体に結合し, 細胞内 cGMP 上昇を介して生理作用を発揮する。CNP は局所因子として成長板軟骨においては軟骨成長作用を持つ。一方, 4 種類存在する線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) は, チロシンキナーゼ型受容体に分類され, 軟骨細胞の分化や増殖に関わっている。このうち FGFR3 は内軟骨性骨化を抑制し, FGFR3 の活性型遺伝子変異がヒトにおける軟骨無形成症の原因であることが明らかになっている。近年, 申請者らはこの FGFR3 遺伝子変異を導入した軟骨無形成症モデルマウスの四肢・体幹の短縮が, 軟骨に CNP を過剰発現することにより, 正常まで是正されることを報告した。

本研究は, マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いて, 軟骨における CNP と FGF の相互作用について細胞内情報伝達レベルで明らかにすることを目的とし行った。

ATDC5 細胞における細胞内 cGMP 産生は CNP (10^{-9} ~ 10^{-7} M) の濃度依存性に基礎値の36倍程度まで上昇した。この CNP による cGMP 産生は basic FGF と軟骨における FGFR3 の特異的リガンドである FGF18にて40%抑制された。この抑制効果は MAPK 阻害剤によりほぼ消失した。この際の GC-B のタンパク発現量は常に一定であり, basic FGF と FGF18による cGMP 産生抑制効果は受容体より下流で作用していることが示唆された。

これに対して, FGFR3 の下流シグナルのひとつである MAPK 経路における ERK1/2 のリン酸化は, ATDC5細胞において FGF 添加にて誘導され, CNP (10^{-7} ~ 10^{-6} M) により濃度依存性に, また, 8-bromo-cGMP (10^{-4} M) により抑制された。この時, FGFR3 の mRNA 発現量は変化しておらず, CNP による ERK1/2 のリン酸化抑制効果は FGFR3 より下流で作用していることが示唆された。また, FGFR3 のもうひとつの主要な下流シグナルである STAT-1 経路についても検討したが, ATDC5 細胞の STAT-1 のリン酸化は FGF, CNP 添加にても変化しなかった。この結果より, ATDC5 細胞における CNP の影響は STAT-1 経路に対しては認めないことを確認した。

マウス胎仔脛骨器官培養を用いた検討にて, CNP 添加により骨長は12%伸長し, FGF18 添加により骨長は 6 %短縮した。CNP と FGF18 同時添加により骨長は 8 %伸長し, FGF18 による骨短縮は CNP により回復することが確認された。またこの組織像において, タイプ X コラーゲンを発現している肥大化軟骨層の細胞数とサイズは FGF18 にて減少し, CNP 添加により回復することが確認された。

以上の結果により, CNP/GC-B 経路は成長板軟骨の内軟骨性骨化に重要な役割を果たし, FGFR3/MAPK 経路との間に受容体より下流のレベルで相互に抑制作用を示すことが明らかとなった。このことは, CNP による軟骨無形成症の治療への応用における基礎的な裏付けの一部になると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、申請者は CNP の骨軟骨形成における意義を明らかにすることを目的として、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用い軟骨における CNP と FGF の相互作用について細胞内情報伝達レベルで検討を試みた。

ATDC5 細胞において CNP による細胞内 cGMP 産生は basic FGF と FGF18 にて抑制された。この抑制効果は MAPK 阻害剤によりほぼ消失した。この際の GC-B タンパク発現量は常に一定であった。これに対し、FGFR3 の下流シグナル MAPK 経路における ERK1/2 のリン酸化は、FGF 添加にて誘導され、CNP、8-bromo-cGMP により濃度依存性に抑制された。この時、FGFR3 の mRNA 発現量は変化していなかった。また、FGFR3 のもうひとつの主要な下流シグナルである STAT-1 経路に対しては、CNP の影響は認めなかった。

マウス胎仔脛骨器官培養を用いた検討では、FGF18 による骨短縮は CNP 添加により回復した。また、この組織像において、肥大化軟骨層の細胞数とサイズは FGF18 にて減少し、CNP 添加により回復した。

これらの結果により、CNP/GC-B 経路と FGFR3/MAPK 経路は受容体より下流のレベルで相互に抑制作用を示すことが明らかとなった。

以上の研究は、骨軟骨形成における CNP と FGFR3 を介した MAPK 経路における相互作用の解明に貢献し、骨軟骨形成における意義を明らかにしたもので CNP の臨床応用が期待される。

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17年7月6日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。