

京都大学	博士（医学）	氏名	山下 貴史
論文題目	C-type natriuretic peptide restores growth impairment under enzyme replacement in mice with mucopolysaccharidosis VII （C型ナトリウム利尿ペプチド投与治療は欠損酵素補充治療を併用することでムコ多糖症VII型マウスの成長障害を回復させる）		
（論文内容の要旨） <p>【背景・目的】ムコ多糖症（MPSs）はグリコサミノグリカン（GAG）を分解する酵素の欠損により引き起こされるライソソーム病である。欠損する酵素により I-IV、VI、VII、IX型に分類され、VII型はβグルクロニダーゼ（GUSB）をコードする遺伝子の変異によりコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸と他の型より多種の GAG が蓄積する。MPSs は GAG の蓄積により全身の臓器が障害され、精神発達遅滞、関節固縮、閉塞性気道疾患といった様々な症候を呈するが、既存の治療である欠損酵素の補充療法では成長障害は残存する。MPSs の成長障害は、低身長症に対し広く用いられる成長ホルモン投与にも抵抗性であり、課題として残っている。C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）は成長促進因子であり、MPSs と同じ骨格異形成症の一つである軟骨無形成症や、成長ホルモン抵抗性のグルココルチコイドによる成長障害に対する有効性が報告されている。以上の背景により、本研究では MPSVII 型の成長障害に対する CNP の効果を調べる事を目的とした。</p> <p>【方法・結果】6 週齢の MPSVII 型モデルである <i>Gusb^{m^{ps}2}</i> マウスに対し、ハイドロダイナミック遺伝子導入法を用いて GUSB 補充と CNP 投与のモデルを作成した。具体的には、発現ベクターにマウス <i>Gusb</i> 遺伝子あるいはヒト CNP 遺伝子をクローニングし、各ベクターを体重の 8-10% の生理食塩水に溶解し、尾静脈から急速注入した。空ベクターを注入した群（Empty 群）、単独発現（GUSB 群、CNP 群）あるいは共発現させた群（GUSB/CNP 群）を作成し、4 週間観察した。成長曲線から GUSB 群および CNP 群では体長の有意な伸長は認めなかったが、GUSB/CNP 群では有意な体長の伸長が得られ、4 週間後に野生型マウスと同等の体長となった。この相乗効果の機序を調べるため脛骨遠位端の成長板組織像を検討した。Empty 群は野生型マウスと比較して、静止層（RZ）が腫大した細胞を伴って厚く、増殖層（PZ）、肥大化層（HZ）の細胞数が少なかった。次いで介入効果を検討し、GUSB 発現により RZ の厚さが有意に減少し、PZ、HZ の細胞数の増加が見られること、CNP 発現により PZ、HZ の厚さが増大すること、GUSB/CNP 共発現により相乗的に PZ、HZ の細胞数が増加することを明らかにした。背景として、Empty 群では野生型マウスと比較し PZ の Ki-67 陽性細胞数が減少し HZ の TUNEL 陽性細胞数が増加していたが、GUSB 発現によりいずれも改善した。最後に、異常な骨密度増加、関節障害に対する効果を検討し GUSB 発現でいずれも改善が得られること、CNP を共発現させてもこれらの改善が阻害されないことを確認した。</p> <p>【考察】MPSVII 型モデルマウスの体長に関して、GUSB あるいは CNP 単独の発現では有意な伸長が得られなかったが、共発現させることで有意な伸長が得られた。成長板の解析から GUSB 治療は RZ の細胞への GAG の蓄積を減少させ、PZ での細胞増殖および HZ でのアポトーシスに関する異常も回復させることが示された。CNP の成長促進作用は、GUSB 治療により成長板の異常が改善した環境下において、より効果的であったと考えられた。MPSVII 型の成長障害を酵素補充療法と CNP の併用により治療できることが示唆され、蓄積する GAG の種類が VII 型よりも少なく、患者数が多い I 型や II 型への応用も期待される。</p>			

（論文審査の結果の要旨）

ムコ多糖症（MPSs）は分解酵素の欠損によりグリコサミノグリカンが全身に蓄積するライソゾーム病であり、VII型はグルクロニダーゼ（GUSB）をコードする遺伝子の変異による。既存治療の酵素補充療法には成長障害が残存するという課題が残っている。本研究では成長促進因子である C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）の MPSVII 型の成長障害に対する効果を検証した。MPSVII 型モデルである *Gusb^{m^{ps}2}* マウスにおいてハイドロダイナミック遺伝子導入法による過剰発現系を利用して GUSB 補充と CNP 投与の各治療モデルを作成した。GUSB および CNP 単独治療では有意な体長の伸長は認めなかったが、併用治療により有意な体長の伸長が得られ、野生型マウスと同等の体長となった。機序を調べるため脛骨遠位端成長板の組織像を検討すると、GUSB 治療は静止層の異常な肥厚を改善し、減少していた増殖層、肥大化層の細胞数を増加させていた。CNP 単独治療でも増殖層、肥大化層の細胞数は増加したが、GUSB との併用治療では相乗的な細胞数増加が得られた。MPSVII 型の成長障害は、酵素補充療法により成長板の異常が改善した環境下に、CNP 治療を併用することで治療可能となる可能性が示唆された。

以上の研究は、MPSVII 型における成長障害の機序解明と新規治療法の開発に貢献し、MPSs に対する治療の発展に寄与するところが多い。

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、令和 2 年 8 月 4 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。