

京都大学	博士（薬科学）	氏名	宮崎 侑
論文題目	C-type natriuretic peptide facilitates autonomous Ca^{2+} entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth (C型ナトリウム利尿ペプチドは自発的な Ca^{2+} 流入を介して骨伸長を促進する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>長骨における骨形成機構である軟骨内骨化では、伸長過程の骨端部で観察される成長板軟骨細胞の増殖・分化が骨伸長に重要な役割を果たす。これまで培養軟骨細胞や軟骨細胞株の解析により骨形成にCa^{2+}シグナルが重要な役割を果たすことは報告されてきたが、生理的条件下における成長板軟骨細胞のCa^{2+}動態は未解明であった。最近、所属研究グループにおいて、マウス胎児大腿骨急性スライスを用いることで定常状態の成長板軟骨細胞内Ca^{2+}をライブイメージング可能な独自の実験系が確立された。当実験系を用いることで、二価カチオン透過性チャネルTRPM7を介した自発的な軟骨細胞内Ca^{2+}濃度変動（以下「自発的Ca^{2+}変動」）がCa^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKII）を活性化することで骨伸長を促進する分子メカニズムを発見した。一方で、当該シグナル経路の活性化を介して骨伸長を促進する内分泌因子の存在が示唆されたものの、未同定であった。</p> <p>本研究ではC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）に着目した。CNPは長骨伸長を強力に促進する内分泌因子として同定されており、CNP誘導体Vosoritideが軟骨無形成症の治療薬として2021年9月に欧米で承認されている。軟骨無形成症は骨伸長障害による低身長を特徴とする遺伝子疾患であり、先天的な<i>Fgfr3</i>の活性型変異による下流のERK/MAPK経路の過剰な活性化に起因する。CNPは、グアニル酸シクラーゼドメインを持つ細胞膜受容体NPR2に作用し、cGMPの産生を介して活性化したプロテインキナーゼG（PKG）がERK/MAPK経路を抑制する作用機構で軟骨細胞の分化成熟を促すとされている。しかし、CNPの過剰発現のみで骨伸長が促進されること、同様にERK活性を低下させるグルココルチコイド投与が逆に骨伸長障害を引き起こすことなどから、CNPの細胞内シグナル経路の理解は不十分と考えられる。また、CNP誘導体には血中半減期の短さや、慢性投与による中和抗体の出現などの改善すべき問題があり、効果的な課題克服にはCNPの骨伸長に関与する細胞内シグナル経路の正確な理解が必須である。</p> <p>軟骨細胞特異的<i>Trpm7</i>欠損マウスとCNPの遺伝子およびその受容体（それぞれ<i>Nppc</i>、<i>Npr2</i>）全身欠損マウスがいずれも重度の骨伸長障害を示すことが注目された。これらの知見から、成長板軟骨細胞においてCNPとTRPM7が機能的に連関し、細胞内Ca^{2+}を介した未同定の骨伸長促進経路を構成するとの作業仮説に基づき、本研究は立案された。まずCNPおよびその下流のcGMP、PKGが軟骨細胞内Ca^{2+}動態に与える影響を検討した。CNPを室温で一時間曝露した軟骨スライス（以下「CNP処置群」）を観察したところ、自発的Ca^{2+}変動のCNP濃度依存的な活性化が観察された。次にcGMPアナロ</p>			

グを室温で一時間曝露した軟骨スライスを観察した結果、CNP同様に自発的Ca²⁺変動の活性化が観察された。また、CNP処置群にPKG阻害薬を還流で処置したところ、CNPにより活性化された自発的Ca²⁺変動が有意に抑制された。これよりCNPはcGMPを介してPKGを活性化することで自発的Ca²⁺変動を促進することが示された。一方、先行研究では成長板軟骨細胞において大コンダクタンスCa²⁺依存性K⁺ (BK) チャネルの活性化による過分極がTRPM7を介するCa²⁺流入を増強することが示唆されており、血管平滑筋および内皮細胞においてBKチャネルがPKGによってリン酸化を受けて活性化することも報告されている。そこでCNPがPKGを介してBKチャネルを活性化することで、成長板軟骨細胞の過分極を引き起こす可能性を検証した。まずCNP処置群にBKチャネル阻害薬を還流で処置したところ、CNPにより活性化された自発的Ca²⁺変動が有意に抑制された。膜電位の蛍光指示薬を用いたイメージングでは、定常状態でCNP処置群において過分極が観察された。次に定常状態で自発的Ca²⁺変動を媒介するTRPM7とCNPの関係を評価するためにCNP処置群にTRPM7阻害薬を還流で処置した。その結果、CNPにより活性化した自発的Ca²⁺変動が有意に抑制された。更に、CNP処置により活性化した自発的Ca²⁺変動がTRPM7下流のCaMKIIの自己リン酸化活性に与える影響を蛍光免疫染色およびWestern blottingを用いて評価した。その結果、蛍光免疫染色においてCNP処置群でリン酸化CaMKIIシグナルの増強が観察されたが、CaMKII阻害薬を同時に処置することで観察されなくなった。また、Western blottingにおいてもCNP処置群では溶媒処置群と比較してリン酸化CaMKIIの発現が有意に上昇していた。以上の結果からCNPはBKチャネルを活性化して過分極を引き起こすことでTRPM7を介するCa²⁺流入を活性化し、その下流でCaMKIIを活性化していることが示された。軟骨内骨化の評価に有用な中足骨培養系を用いて、CNPの骨伸長に対する影響も評価した。軟骨細胞特異的*Trpm7*欠損マウスの中足骨について、CNP含有培地にて培養したところ、対照群で観察されたCNPによる骨伸長促進効果が観察されなかった。また、野生型マウス由来の中足骨培養系においてBKチャネル活性化薬はCNP同様に骨伸長効果が確認されたが、その作用は*Trpm7*遺伝子欠損により消失した。以上の成果は、CNPの骨伸長促進効果にはBK-TRPM7のチャネル機能共役が不可欠であることを示している。

以上の一連の研究により、成長板軟骨細胞においてCNP-cGMP-PKG-BKチャネルシグナルの活性化により誘発された過分極がTRPM7チャネルを介したCa²⁺流入を増強し、下流のCaMKIIの活性化を介して骨伸長を促進する新たな作用機序が解明された。本知見は、将来的な骨関連疾患に対する臨床治療法への応用や新規創薬標的の設定、更には家畜等の人為的サイズ改変などへの応用に資することが期待される。

※ 学位授与された方の「論文内容の要旨」、「論文審査結果の要旨」（審査教員作成）は、学位授与日から3ヶ月以内に京都大学学術情報リポジトリに掲載され公開されます。

学位申請を行う方は掲載を承認されたものとします。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者より提出された論文により、CNPによる骨伸長作用のメカニズムの一端が解明され、成長板軟骨細胞におけるNPR2-cGMP-PKG-BKチャネル-TRPM7チャネル-CaMKIIのシグナル伝達機構の生理的な重要性が明らかにされた。CNP誘導体は発育不全の治療薬として開発されており、本研究成果は医薬領域においてインパクトのある波及効果を有する。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年1月21日に副査二名とともに研究成果に関する討論を行い、さらに令和4年2月7日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 2022年 4月 1日以降