

氏 名	ちゅう しょう ひで き 中 所 英 樹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2407 号
学位授与の日付	平 成 13 年 7 月 23 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 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide (C 型ナトリウム利尿ペプチド欠損マウスにおける小人症および早期死亡)

論文調査委員 (主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 武 藤 誠 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は中枢神経系,あるいは血管や骨軟骨組織等の末梢組織に広範に分布し,その特異的受容体である B 型グアニル酸シクラーゼ (GC-B) を介して神経ペプチドあるいは局所調節因子として多彩な生体機能調節に関与すると考えられている。本研究では, CNP の生理的・病態生理的意義を個体レベルで明らかにする目的で, CNP ノックアウトマウス (CNP-KO マウス) を作製した。

129/Sv マウス CNP 遺伝子の翻訳領域全長を含む第 1, 第 2 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子にて置換したターゲティングベクターを作製し, 相同組換え法により CNP-KO マウスを作製した。野生型マウスの小脳および脛骨骨端軟骨では CNP 遺伝子発現および CNP 様免疫活性は検出されたが, CNP-KO マウスでは検出されなかった。外観上, CNP-KO マウスでは, 野生型マウスに比較して体長の著しい短縮が認められた。軟 X 線撮影上では, 軟骨原基が骨に置換する内軟骨性骨化により形成される椎骨と四肢長管骨は野生型マウスと比較して CNP-KO マウスで著しく短縮していたが, 骨芽細胞から直接骨が形成される膜性骨化により決定される頭蓋骨横径には有意差は認められなかった。また, CNP-KO マウスはメンデルの法則に従って誕生するが, 生後早期より徐々に死亡し 10 週齢までに約 70% が死亡した。その他には明らかな異常所見は認められなかった。

組織学的検討により, 7 日齢 CNP-KO マウスでは, 野生型マウスに比較して, 脛骨成長板増殖軟骨細胞層および肥大化軟骨細胞層の著しい短縮が認められた。また, In situ hybridization 法により, 成長板軟骨細胞肥大化の過程で発現する Indian hedgehog 遺伝子陽性細胞が CNP-KO マウスでは減少していた。さらに, CNP-KO マウスの成長板軟骨では, 野生型マウスに比較して BrdU 陽性細胞の著しい減少が認められた。以上より, CNP-KO マウスでは, 成長板軟骨細胞の増殖および肥大化軟骨細胞への分化速度遅延により内軟骨性骨化が障害されていることが証明された。

骨軟骨局所における CNP の内軟骨性骨化促進因子としての意義を明らかにする目的で, II 型コラーゲン遺伝子プロモーターにより軟骨細胞特異的に CNP を発現させた CNP トランスジェニックマウス (CNP-Tg マウス) を作製し, CNP-KO マウスと交配することにより軟骨細胞にのみ CNP を発現する CNP-Tg/CNP-KO マウスを作製した。CNP-Tg/CNP-KO マウスの吻髯長は CNP-KO マウスに比較して伸長促進を認め, その程度は野生型マウスに匹敵するものであった。また, CNP-Tg/CNP-KO マウスの生存率が野生型マウスと同程度まで改善した。以上より, CNP は軟骨局所において内軟骨性骨化調節に関与することが証明され, CNP-KO マウスの早期死亡は骨格の異常によるものと考えられた。

本研究により, CNP が骨軟骨局所において内因性的内軟骨性骨化促進因子として重要な役割を果たすことが証明された。CNP-KO マウスの骨組織像は軟骨無形成症候群の組織像と類似しており, 骨軟骨代謝疾患における CNP の病態生理的意義と臨床応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）の生理的・病態生理的意義を個体レベルで明らかにする目的で、CNPノックアウトマウス（CNP-KOマウス）を作製された。

野生型マウスで認められた小脳および成長板軟骨におけるCNP発現がCNP-KOマウスでは消失していた。CNP-KOマウスでは、野生型マウスに比較して体長が著しく短縮しており、軟X線写真上、椎骨および四肢長管骨の著明な短縮が認められた。また、CNP-KOマウスは生後から10週齢までに約70%が死亡した。CNP-KOマウスでは、野生型マウスに比較して脛骨成長板の厚さが著しく短縮しており、CNPが欠損することにより内軟骨性骨化が抑制されることが明らかになった。

また、Ⅱ型コラーゲン遺伝子プロモーターを用いて軟骨特異的にCNPを発現させたトランスジェニックマウス（CNP-Tgマウス）とCNP-KOマウスを交配することにより得られたCNP-Tg/CNP-KOマウスでは、CNP-KOマウスで認められた四肢体幹の短縮と早期死亡がほぼ完全にレスキューされた。以上より、CNPが骨軟骨局所において内因性の内軟骨性骨化促進因子として重要な役割を果たすことが証明された。

以上の研究は、骨軟骨代謝におけるCNPの生理的意義の解明に貢献し、骨軟骨代謝疾患におけるCNPの病態生理的意義の解明および治療的应用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、平成13年6月6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。