

氏 名	みやざわ たかし 宮 澤 崇
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医 博 第 2726 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification (C型ナトリウム利尿ペプチドの内軟骨性骨化促進作用には 2 型 cGMP 依存性蛋白キナーゼが必須である)
論文調査委員	(主 査) 教授 戸口田 淳也 教授 開 祐 司 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) は中枢神経系のみならず、血管壁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グアニル酸シクラーゼ B (GC-B) に結合し、細胞内 cGMP 濃度の上昇を介して多彩な生体現象に関与する。CNP ノックアウトマウスでは四肢・長幹骨の著しい短縮が認められ、CNP が成長板軟骨において細胞内 cGMP 濃度の上昇を介して軟骨性骨化促進作用を示すことが証明されている。一方、cGMP を介する細胞内シグナル伝達機構としてフォスフォジエステラーゼ、cGMP 調節性イオンチャネル、1 型および 2 型 cGMP 依存性蛋白キナーゼ (cGK I, cGK II) が知られているが、そのいずれが CNP の内軟骨性骨化促進作用に重要な役割を果たすかはこれまで明らかでなかった。本研究では、CNP の内軟骨性骨化促進作用と cGK II の関連を明らかにする目的で、II 型コラーゲンプロモーターを用いて軟骨細胞特異的に CNP を発現する CNP トランスジェニック (CNP-Tg) マウスと cGK II ノックアウト (cGK II KO) マウスを交配して CNP-Tg/cGK II KO マウスを作製し、内軟骨性骨化における表現型の検討を行った。

外観および軟 X 線撮影上では、CNP-Tg マウスは野生型マウスと比較して、5 週齢より内軟骨性骨化により形成される四肢・長幹骨の有意な伸長促進が認められたが、cGK II KO マウスでは有意に短縮していた。一方、CNP-Tg/cGK II KO マウスでは cGK II KO マウスと比較して、検討したいずれの週齢においても四肢・長幹骨の長さに変化は認められなかった。組織学的検討により、4 週齢 CNP-Tg マウスでは野生型マウスと比較して成長板増殖軟骨細胞層および肥大化軟骨細胞層の増大が認められたが、CNP-Tg/cGK II KO マウスでは cGK II KO マウスと比較して成長板軟骨細胞層の増大は認められなかった。以上より、個体レベルで、CNP の内軟骨性骨化促進作用は cGK II を介することが明らかとなった。

内軟骨性骨化では軟骨原基細胞が増殖し、その後、基質産生、軟骨細胞の肥大化等の分化の過程を経て骨細胞に置換される。本研究では、CNP の軟骨細胞増殖、基質産生増加、肥大化促進作用に cGK II が関与するか否かを明らかにする目的で、以下の検討を行った。胎生 16.5 日齢の野生型および cGK II KO マウスの胎児脛骨に CNP 10^{-7} ~ 10^{-6} M 添加して 4 日間回転培養を行い、軟骨細胞の増殖を BrdU の取り込みにより、基質産生を X 型コラーゲンの免疫染色およびグリコサミノグリカンに取り込まれる ^{35}S の測定により、軟骨細胞の肥大化を組織学的な細胞面積の測定により評価した。野生型マウスの胎児脛骨では CNP 添加により軟骨細胞増殖、基質産生増加、軟骨細胞肥大化促進作用が認められたが、cGK II KO マウスでは CNP 添加によるいずれの作用も認められなかった。以上より、CNP の軟骨細胞増殖、基質産生増加および肥大化促進作用は cGK II を介することが明らかとなった。

本研究により、CNP の内軟骨性骨化促進作用は cGK II を介することが in vivo および in vitro で証明され、軟骨細胞の内軟骨性骨化過程における CNP/GC-B/cGK II 経路の機能的意義が証明された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は軟骨成長板局所において cGMP 濃度の上昇を介して内軟骨性骨化促進作用を示す

が、下流の細胞内シグナル伝達機構は不明である。本研究では、CNPと2型cGMP依存性蛋白キナーゼ(cGK II)の関連を明らかにする目的で、II型コラーゲンプロモーターにより軟骨細胞特異的にCNPを発現するCNPトランスジェニック(CNP-Tg)マウスとcGK IIノックアウト(cGK II KO)マウスを交配してCNP-Tg/cGK II KOマウスを作製した。

外観および組織学的検討上、CNP-Tgマウスで認められた四肢・長幹骨の伸長促進や成長板層厚の増大といった内軟骨性骨化促進作用は、CNP-Tg/cGK II KOマウスでは認められなかった。さらに胎児脛骨器官培養系を用いて、CNPの軟骨細胞増殖、基質産生増加、軟骨細胞肥大化作用にcGK IIが関与するか否かを検討した。野生型マウスの胎児脛骨で認められたCNPの軟骨細胞増殖、基質産生増加、軟骨細胞肥大化促進作用は、cGK II KOマウスの胎児脛骨では認められなかった。以上よりCNPの内軟骨性骨化促進作用はcGK IIを介することが明らかとなった。

以上の研究は、内軟骨性骨化におけるCNP/GC-B/cGK II経路の機能的意義の解明に貢献し、CNPの骨軟骨代謝疾患治療への臨床応用をふまえた生理的意義の解明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16年2月9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。