

## 骨を長く伸ばす仕組みの一端を解明

—C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを活性化して骨伸長を促す—

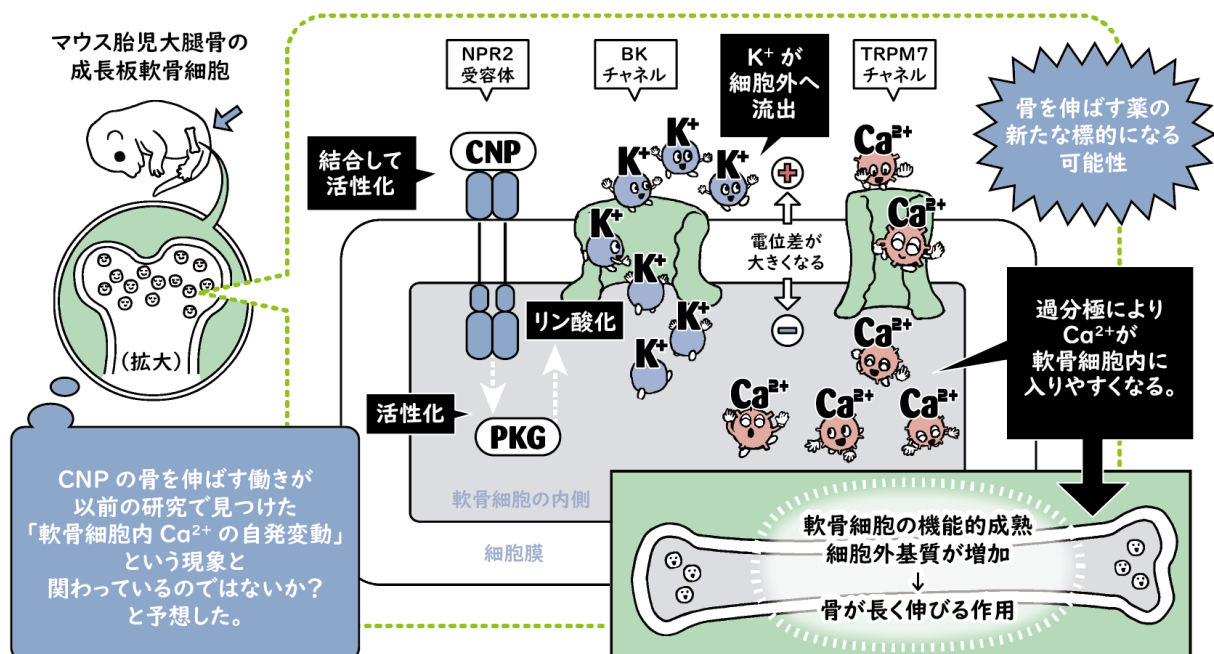
### 概要

市村 敦彦 京都大学薬学研究科 助教、宮崎 侑 同博士課程学生らの研究グループは、軟骨細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 動態を独自の手法で解析することによって、強力な骨伸長促進作用を持つC型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が軟骨細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを活性化していることを発見しました。

同研究グループは、2019年に軟骨細胞が正常に機能し骨が伸びるためにはTRPM7という陽イオンチャネルを介して自発的に細胞内に流入する  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることを同定していました。今回、CNPの持つ骨を伸ばす生理機能にはTRPM7を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路の活性化が必要であることがわかりました。CNP類縁ペプチドVOXZOGO™が軟骨無形成症という骨の短縮を引き起こす遺伝性疾患の治療薬として2021年に米国や欧州で承認されました。本邦でもまもなく承認される見通しであり、臨床応用の観点から注目が高まっています。今回の発見はCNPが軟骨細胞にどのように働いて骨を伸ばしているのかという仕組みの一端を解明した新知見であり、これまで不完全だったCNP作用の分子メカニズムが明らかになりました。今後、解明した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路を利用してCNPの作用を増強する手法を開発したり、シグナル経路に関与する分子の活性を調節することで骨を伸ばす物質を見つけ出したりできることが期待されます。これらの研究成果は、本学薬学研究科と同医学研究科、同メディカルイノベーションセンター、同工学研究科および岐阜大学医学部との共同研究により得られました。

本成果は、2022年3月15日に英国の国際学術雑誌「eLife」にオンライン出版されました。

### C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が軟骨細胞 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを活性化して骨を伸ばすしくみ



論文名: C-type natriuretic peptide facilitates autonomic  $\text{Ca}^{2+}$  entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth

(C型ナトリウム利尿ペプチドは成長板軟骨細胞における自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを促進することで骨の伸長を促す)

著者: Yuu Miyazaki, Atsuhiko Ichimura, Ryo Kitayama, Naoki Okamoto, Tomoki Yasue, Feng Liu, Takaaki Kawabe, Hiroki Nagatomo, Yohei Ueda, Ichiro Yamauchi, Takuro Hakata, Kazumasa Nakao, Sho Kakizawa, Miyuki Nishi, Yasuo Mori, Haruhiko Akiyama, Kazuwa Nakao and Hiroshi Takeshima

掲載紙: eLife DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.71931>

イラストレーション: parsely918 and Hayanon (Science Manga Studio, 2022)

## 1. 背景

### 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態を知ることの重要性

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は、いろいろな生理機構に必須と言えるほど重要なシグナル分子として働いています。たとえば、受精、筋収縮、神経伝達物質やホルモン分泌などの重要な生理機能はすべて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度が適切に変化することによって調節されています。しかしその一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの詳しい仕組みや担っている生理的な役割がまだよくわからない細胞もたくさんあります。そういった細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  の役割を明らかにすることで細胞ごとに特徴的な生理機能を理解できるだけでなく、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの調節による生理機能の制御もできる可能性があります。私達の研究室では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の制御に関わる分子の機能を解明することを大きな目的の一つとして研究を行ってきました。

### これまでの研究でわかってきたこと

2019年、骨の伸長を担っている軟骨細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  動態やその生理機能がよくわかっていないことに注目し、その解明を試みました。体の中にある状態に近い状態を保ったまま軟骨細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化をリアルタイムに測定できる実験系を独自に確立して解析を行いました。その結果、軟骨細胞における自発的  $\text{Ca}^{2+}$  変動という現象を発見するとともに、TRPM7 という  $\text{Ca}^{2+}$  を含む2価の陽イオンを透過するイオンチャネルがこれを調節し、軟骨細胞の正常な機能や分化成熟に必要であることを発見しました。

(図1, 2019年4月10日の報道発表資料より)

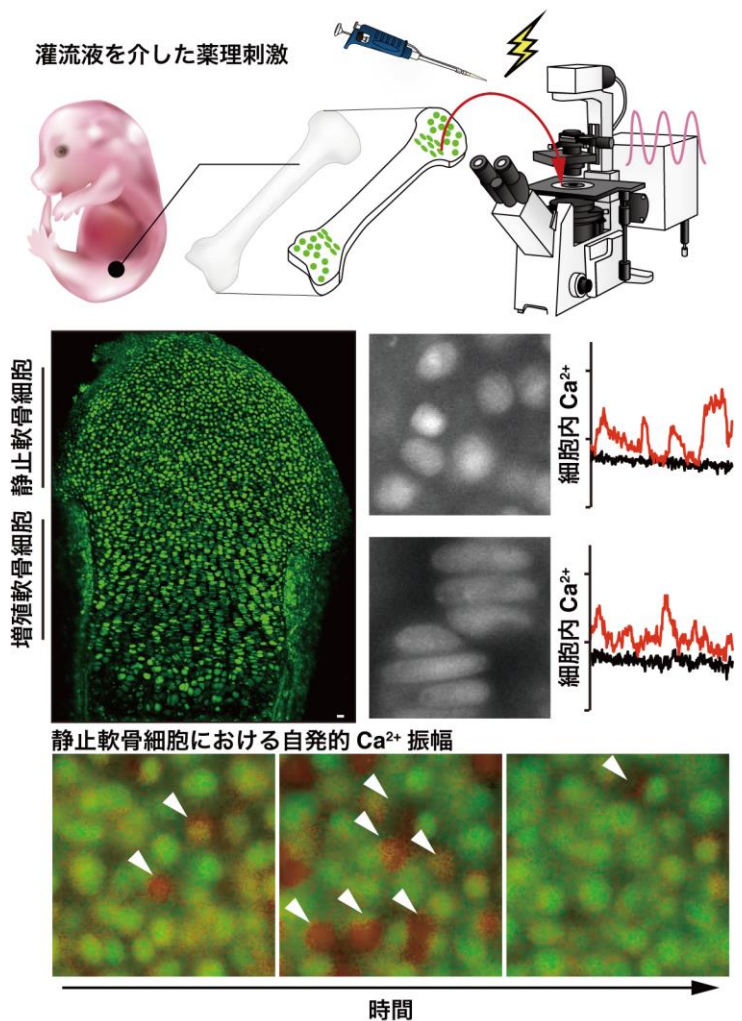
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2019-04-10>

TRPM7 を遺伝子レベルで働かないようにしたり、阻害薬を使ったりすることで軟骨機能が障害されて骨の伸長が阻害されたことから、この分子機構が骨を伸ばすために必要であることがわかりました。この発見から、TRPM7 を介した軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路を活性化することで骨を伸ばすことができることが予見されました。また、体の中にもともと備わっている骨を伸ばす物質の作用に、軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路が関与していることも考えられました。

### 本研究の着眼点

そこで、本研究では強い骨伸長促進作用を持っていることが報告されていたC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)に注目しました。CNPは1980年から1990年にかけて本邦で同定された3種類のナトリウム利尿ペプチド<sup>1</sup>の一つです。CNPの投与によって骨が伸びることはげっ歯類での実験だけでなくヒトでも臨床試験で確かめられており、軟骨無形成症という骨の伸びが著しく障害され四肢短縮や低身長が引き起こされる遺伝性疾患の治療を目指した解析がこれまでに多数行われてきました。その成果に基づいて、米国バイオマリン社によって開発されたCNP類縁ペプチドであるVOXZOGO<sup>TM</sup>が軟骨無形成症治療薬として欧米で先行して昨年承認され、本邦でも承認される見通しであることから臨床的に注目が高まっています。軟骨無形成症では、遺伝

図1: スライス培養マウス軟骨細胞のカルシウムイメージング

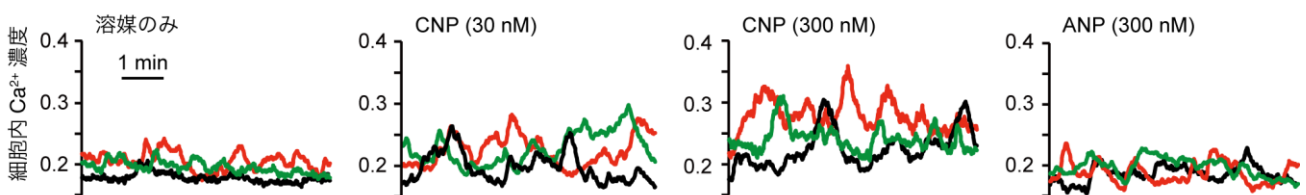


子変異によって分裂促進因子タンパク質キナーゼ (MAPK) <sup>2</sup>シグナルが過剰に活性化することで骨伸長が障害されることが知られています。CNP は受容体であり グアニル酸シクラーゼ <sup>3</sup>活性を持つ NPR2 という分子に作用し、細胞内のシグナル分子の一つである cGMP を増加させます。その結果、cGMP により活性化するタンパク質リン酸化酵素 PKG が活性化します。PKG が過剰な MAPK シグナルを抑制することにより軟骨無形成症の骨の伸長を促進すると報告されていました。しかし、病気を引き起こす変異を持たない正常な骨や、MAPK シグナルの過剰活性化を伴わない骨伸長障害に対しても CNP の骨を伸ばす効果が観察されることから、CNP の作用に必要な細胞内シグナルの理解は十分ではない可能性が考えられました。そこで、CNP が TRPM7 を介した軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルを活性化することで骨の伸長を促しているのではないかと考えて今回の研究を行いました。

## 2. 研究手法・成果

主な研究手法として、マウス胎児大腿骨端の軟骨組織を構成する軟骨細胞でおこる細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化をそのまま観察できる独自の実験系を用いました。新生直前 (胎生 17.5 日齢) のマウスから大腿骨を取り出し、およそ 40 マイクロメートル (μm: マイクロは 100 万分の 1) の薄さでスライス培養試料を作りました。この試料に Ca<sup>2+</sup>濃度を蛍光シグナルとして観察可能な Fura-2 という試薬を取り込ませることにより、生きた軟骨細胞のなかで起こる細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化をライブイメージングしました。前回の論文ではこの手法を用いることで軟骨細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度が自発的に上昇と下降を繰り返している現象を同定し、軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>の自発変動と名付けました。観察中の軟骨組織は常に生理的な溶液を還流しており、還流液に阻害薬や活性化薬を加えることで軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>がどのように刺激に応答しているのか知ることができます。まず、CNP で 1 時間室温で軟骨細胞を刺激してから細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度をイメージングしてみました。すると、軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>の自発変動が CNP の濃度に依存して強くなりました (図 2)。一方で、同じナトリウム利尿ペプチドでも骨を伸ばす作用を持たない A 型ナトリウム利尿ペプチド (ANP) ではこのような現象は観察されませんでした。

図 2: CNP 一時間の処置による軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup> シグナルの活性化



CNP で 1 時間刺激することによって、軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup> の自発変動が濃度依存的に強くなりました。

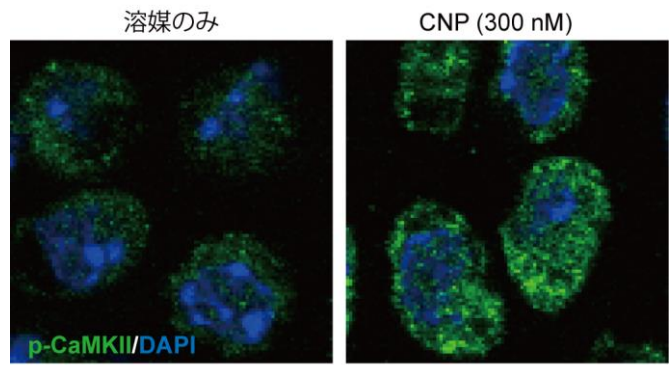
同じナトリウム利尿ペプチドでも骨を伸ばす作用のない ANP ではこのようなことは観察されませんでした。

それぞれのトレースはそれぞれ 1 つの軟骨細胞から得られた細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の経時変化です。

そこで、次にこの軟骨細胞における Ca<sup>2+</sup>シグナルの増強がどのような分子的機序で起こるのか、薬理学的実験と遺伝学的モデルの両方を用いて検証しました。CNP の受容体である *Npr2* 遺伝子を軟骨細胞特異的に働かなくすることで CNP の作用は消失しました。前述の通り、NPR2 はグアニル酸シクラーゼ活性を持っており、その刺激により cGMP 産生が増加します。cGMP の安定な類似体を用いると、CNP で刺激したときと同様に軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルが増強されました。また、PKG の阻害薬を CNP で予め刺激された軟骨スライスに処置すると、CNP によって増強した Ca<sup>2+</sup>シグナルが弱くなりました。ここで、過去に報告されていた情報とわたしたちの以前の研究から、PKG によってリン酸化され活性化する分子として、大コンダクタンス Ca<sup>2+</sup>

感受性 K<sup>+</sup> (BK) チャネル<sup>4</sup>を予想しました。実際に、BK チャネル阻害薬を CNP で予め刺激された軟骨スライスに処置すると、CNP で増強された Ca<sup>2+</sup> シグナルが弱くなりました。BK チャネルは膜電位という細胞膜に存在する電荷を調節している分子です。BK チャネルが活性化して K<sup>+</sup> を細胞外に向かって透過することで、細胞の内側が外側に対して相対的に強くマイナスに荷電した状態、すなわち過分極が引き起こされることが予想されます。そこで、膜電位を蛍光イメージングでできる色素を用いて CNP によって膜電位がどのように変化するか調べました。その結果、CNP で刺激することによって、膜電位が下がりいわゆる過分極が引き起こされていること、また、その効果は BK チャネルの阻害薬を用いることでキャンセルされることがわかりました。過分極が引き起こされると細胞内が定常より強くマイナスに荷電するため、陽イオンが細胞内に透過しやすくなります。この

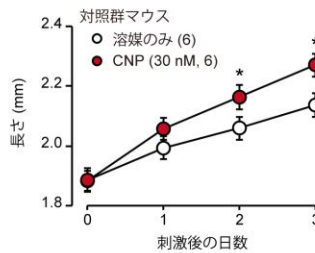
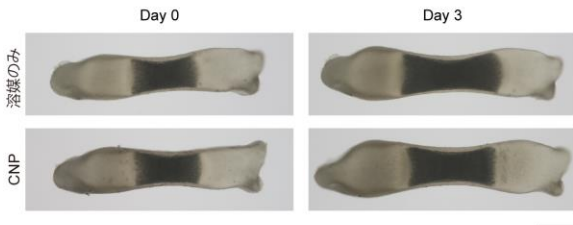
図3: CNP 処置による Ca<sup>2+</sup> 依存的酵素 CaMKII の活性化



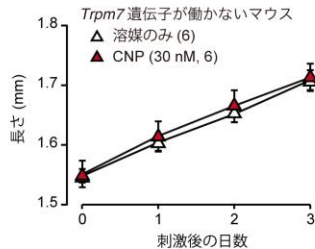
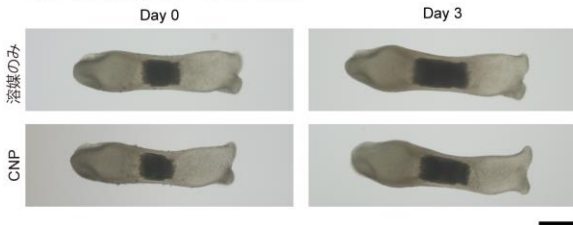
CNP の刺激によって、Ca<sup>2+</sup> 依存的に活性化される CaMKII のリン酸化 (p-CaMKII, 活性化の指標) が促されました。

図4: CNP シグナル活性化による骨伸長作用と *Trpm7* 遺伝子発現

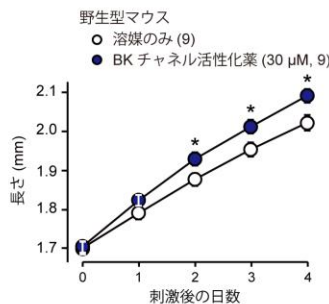
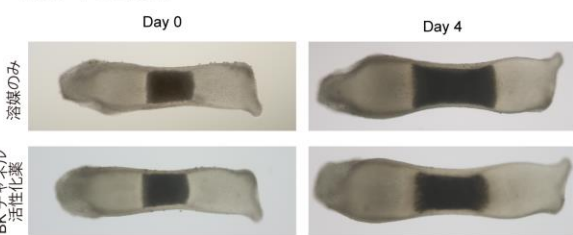
A 対照群マウス由来の中足骨



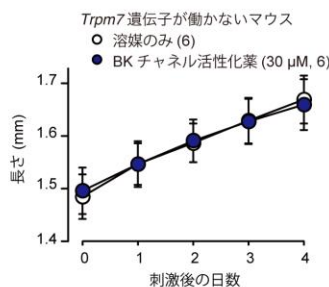
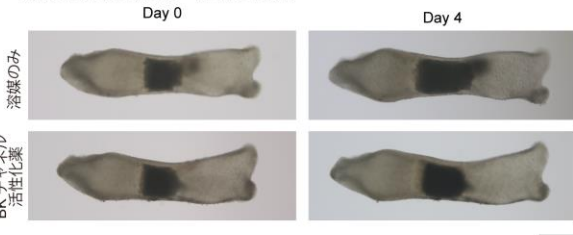
*Trpm7* 遺伝子が働かないマウスの中足骨



B 野生型マウスの中足骨



*Trpm7* 遺伝子が働かないマウスの中足骨



CNP の添加によって対照群マウス由来の中足骨の伸長が促進されましたが、*Trpm7* 遺伝子を働かないマウス由来の中足骨にはその効果が観られなくなりました (A)。

また、CNP シグナル経路に関与する分子として今回新たに同定した BK チャネル活性化薬の添加によって、CNP と似た骨伸長効果が観察されました。この効果は CNP 同様に *Trpm7* 遺伝子の発現に依存していることがわかりました (B)。

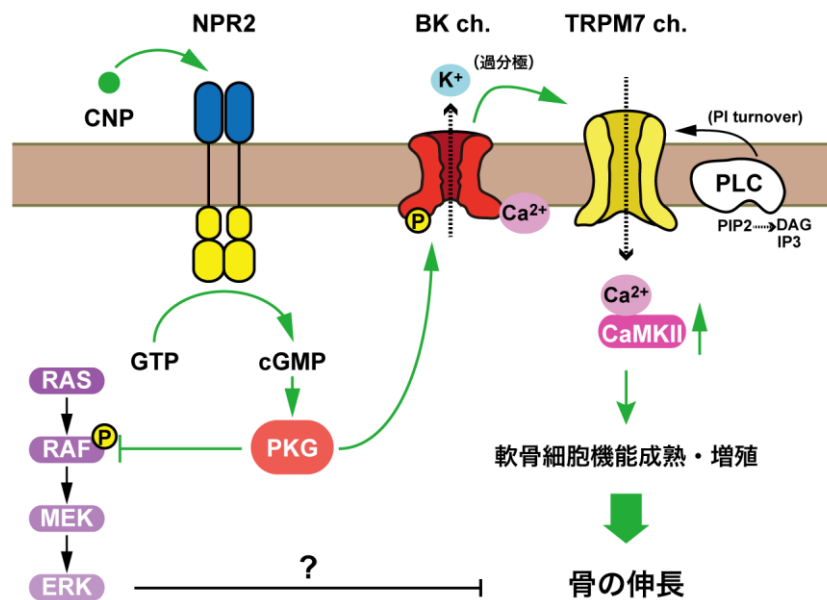
電気化学的な力によって TRPM7 を介して細胞内に流入する Ca<sup>2+</sup>が増加していると考えられました。実際に、TRPM7 阻害薬を用いると CNP によって増強された Ca<sup>2+</sup> シグナルは著しく阻害されました。さらに、CNP によって流入した Ca<sup>2+</sup>によって、CaMKII という Ca<sup>2+</sup>依存的に活性が上昇する酵素が活性化していることもわかりました (図3)。一連の解析から、CNP が軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルを活性化することが初めて明らかになりました。

では、新たに同定したシグナル経路は CNP が持つ骨を伸ばす作用に必要なのでしょうか。これを検証するために、*Trpm7* 遺伝子を軟骨細胞でのみ働かなくしたマウスの足の指の骨を体外で培養し、そこに CNP を加えてみました。すると、*Trpm7* が働いている対照群マウスの骨は CNP の添加

によって伸長しましたが、*Trpm7*が働かないマウスの骨は CNP を加えても、加えていない場合と同程度にし  
 か伸びませんでした (図 4A)。*Trpm7*が働かないマウスの骨は定常的な軟骨細胞内  $Ca^{2+}$ シグナルの減弱によっ  
 てそもそも短いことが私達の以前の研究からわかっていました。今回の実験から、CNP によって増強された  
 TRPM7 チャンネルを介して軟骨細胞内に流入する  $Ca^{2+}$ が CNP の骨を伸ばす作用にとって必要であることが新  
 たにわかりました。

最後に、今回見つけたシグナル経路を活性化すれば骨を伸ばすことができる可能性を検証するために、BK  
 チャンネルの活性化薬を体外で培養した野生型マウスの骨に加えてみました。その結果、BK チャンネル活性化薬  
 の添加によって、CNP を加えたときのように骨が伸びることがわかりました(図 4B)。また、BK チャンネル活性  
 化薬は CNP と同じく *Trpm7*が働かない骨には効果がありませんでした。以上の結果は、今回新たに発見した  
 CNP シグナル経路に参与するイオンチャンネルや酵素の活性を調節することによって骨を伸ばすことができる  
 可能性を示しています。最終的に同定したシグナル経路とこれまでにわかっていた MAPK シグナル抑制経路  
 をまとめて図示すると以下ようになります (図 5)。

図 5: 成長板軟骨細胞における CNP シグナル経路



### 3. 波及効果、今後の予定

一連の研究から、CNP が活性化する新たな軟骨細胞内シグナル経路として NPR2-PKG-BK チャンネル  
 -TRPM7 チャンネル-CaMKII を同定しました。*Trpm7*遺伝子の発現が CNP の骨を伸ばす作用にとって必要であ  
 ったことから、今回同定したシグナル経路が CNP の強力な骨伸長促進作用に寄与する重要なシグナル経路で  
 あることが示されました。さらに、同定した経路の下流分子である BK チャンネル活性化薬にも CNP に似た骨  
 伸長促進作用が観察されたことから、今回同定したシグナル経路の活性を薬理的に調節することによって、  
 骨の長さを制御できるようになると期待されます。背景で述べた通り、CNP 類縁ペプチドである VOXZOGO™  
 が軟骨無形成症治療薬として本邦でも承認されつつあります。臨床試験ではヒト軟骨無形成患者に対して身長  
 が伸びる速度を増加させることが示されており、有効性に関して疑いないと考えられます。一方で、軟骨無形  
 成症患者では CNP 受容体である NPR2 の活性が抑制されていること、長期間の投与によって効果が減弱され  
 る可能性があることなどもいくつかの研究から示唆されています。そのため、CNP の作用に関連する細胞内  
 シグナル経路を正確に知ることが骨を効果的かつ持続的に伸ばす薬物治療法を確立するためにも重要です。今

回のわたしたちの研究成果は CNP が軟骨細胞にどのように働いて骨を伸ばしているのかという仕組みの一端を解明した新知見であり、これまで不完全だった CNP 作用の分子メカニズムが明らかになりました。今後、解明した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路を利用して CNP の作用を増強する手法を開発できるかもしれません。また、BK チャネルや TRPM7 チャネルといったシグナル経路に関与する分子の活性を調節することで骨を伸ばす物質が見つかることも期待されます。さらに、今回同定したシグナル経路は病的な状態だけではなく定常的な状態においても骨を伸ばすために働いていると考えられるため、このシグナル経路の活性を調節することで骨の長さを人為的に変え体格を制御できる可能性も考えられます。すなわち、愛玩動物や家畜を任意に小型化・大型化させるようなこともできるかもしれません。ただし、骨を伸ばす目的でイオンチャネルの活性調節薬を全身性に投与することは副作用を引き起こす可能性が予想されるため、実用に至るためには解決すべき課題が多く残されており、着実な研究により一つずつ克服していくことが必要です。

今後は、同定したシグナル経路の活性を調節可能な物質の探索を行いつつ、軟骨細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  制御メカニズムのより詳細な解析を進めていきたいと考えています。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（基盤（B）, 挑戦的研究（萌芽）研究代表者：市村敦彦 並びに 基盤（B）研究代表者：竹島浩）、公益財団法人 日本応用酵素協会（研究代表者：市村敦彦）、公益財団法人 武田科学振興財団（研究代表者：市村敦彦）、公益財団法人 小林国際奨学財団（研究代表者：西美幸）、公益財団法人 車両競技公益記念財団（研究代表者：竹島浩）、公益財団法人 中富健康科学振興財団（研究代表者：市村敦彦）、公益財団法人 母子健康協会（研究代表者：市村敦彦）などの支援を受けて実施されました。

#### <用語解説>

**\*1 ナトリウム利尿ペプチド**：ナトリウム利尿ペプチドは心臓や血管、体液量の恒常性維持に重要な役割を担うペプチドホルモンであり、本邦で同定されました。心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）と脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）は心不全の診断薬および治療薬として臨床応用されています。

**\*2 分裂促進因子タンパク質キナーゼ（MAPK）**：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼは Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナルと呼ばれる重要な細胞内シグナル経路の一つです。様々な刺激によって活性化されることが知られており、活性化された MAPK は転写因子などの基質をリン酸化し、基質や刺激に応じて細胞増殖や細胞分化、アポトーシスなどの細胞応答を引き起こすことがわかっています。

**\*3 グアニル酸シクラーゼ**：グアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate, GTP) を環状グアノシン一リン酸 (Cyclic guanosine monophosphate, cGMP) に変換する酵素を指します。cGMP は細胞内シグナル分子として働き、平滑筋の弛緩や光情報伝達など様々な重要な生理的機能に関与するセカンドメッセンジャーです。

**\*4 大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$  感受性  $\text{K}^+$  (BK) チャネル**：細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存して活性化する  $\text{K}^+$  イオンチャネルです。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に伴って  $\text{K}^+$  を細胞外へ透過することで過分極を引き起こし、平滑筋を弛緩させる役割を担っていることがよく知られている。

#### <研究者のコメント>

前回の論文で骨の伸長に関わる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを同定した際、思っていたよりもたくさんの方に興味を持っていただけたことが励みになりました。その時点では、骨を伸ばすこともできる可能性があったものの、はっきりしたことはわかっていませんでした。今回、人為的な骨伸長の制御に一歩近づく成果を得ることがで

きました。臨床応用されたばかりのペプチドホルモンの作用機序に関する新知見につながり嬉しく思います。一見地味でも重要な基礎科学的知見に立脚し、何かに役立つかもしれない発見を目指して今後も研究を進めたいと考えています。(市村 敦彦)

<論文タイトルと著者>

タイトル：C-type natriuretic peptide facilitates autonomic  $Ca^{2+}$  entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth (C型ナトリウム利尿ペプチドは成長板軟骨細胞における自発的な  $Ca^{2+}$ の取り込みを促進することで骨の伸長を促す)

著者：Yuu Miyazaki<sup>†</sup>, Atsuhiko Ichimura<sup>†</sup>, Ryo Kitayama, Naoki Okamoto, Tomoki Yasue, Feng Liu, Takaaki Kawabe, Hiroki Nagatomo, Yohei Ueda, Ichiro Yamauchi, Takuro Hakata, Kazumasa Nakao, Sho Kakizawa, Miyuki Nishi, Yasuo Mori, Haruhiko Akiyama, Kazuwa Nakao and Hiroshi Takeshima

掲載誌：*eLife* DOI：<https://doi.org/10.7554/eLife.71931>