

学位申請論文

新規 C 型ナトリウム利尿ペプチド誘導体の創薬への応用研究

2020 年 3 月

四元 孝史

目 次

項目	頁
要 旨	- 6 -
序 論	- 9 -
はじめに	- 9 -
CNP KO ラットの作製とその特徴	- 9 -
CNP-53 投与による骨伸長作用と早期成長板閉鎖の予防	- 11 -
本研究の目的と内容	- 13 -
第 1 章 CNP KO ラットにおける頭蓋骨の形態解析及び CNP-53 投与によるその改善効果	- 14 -
第 1 節. 緒言	- 14 -
第 2 節. 実験材料及び方法	- 15 -
第 1 項. 被験物質	- 15 -
第 2 項. 動物	- 15 -
第 3 項. 実験系	- 16 -
第 4 項. 頭蓋骨の形態測定	- 16 -
第 5 項. Reverse Transcription (RT) - PCR	- 17 -
第 6 項. 頭蓋底における SOS の観察	- 18 -
第 7 項. 統計学的解析	- 18 -
第 3 節. 実験結果	- 19 -
第 1 項. CNP KO ラット及び SDR における体長及び体重	- 19 -
第 2 項. CNP KO ラット及び SDR における頭蓋骨の形態	- 19 -
第 3 項. CNP KO ラット及び SDR における大後頭孔の大きさ	- 22 -
第 4 項. CNP KO ラットで認められる中顔面の低形成及び大後頭孔狭窄に対する CNP-53 の影響	- 24 -
第 5 項. 頭蓋底における SOS 部位の観察	- 26 -
第 6 項. CNP KO ラットと頭蓋骨縫合早期癒合症との関連	- 28 -
第 4 節. 考察	- 30 -
第 5 節. 小括	- 33 -
第 2 章 新規 C 型ナトリウム利尿ペプチド誘導体：ASB20123 の薬理作用	- 34 -
第 1 節. 緒言	- 34 -
第 2 節. 実験材料及び方法	- 35 -
第 1 項. 被験物質	- 35 -
第 2 項. 動物	- 36 -
第 3 項. In vitro 受容体活性評価	- 36 -

第4項. ラットにおける PK 評価	- 37 -
第5項. マウスの耳介軟骨における cGMP 産生評価	- 37 -
第6項. マウス及びラットを用いた in vivo 薬理試験	- 38 -
第7項. ラット成長板厚の測定	- 38 -
第8項. 統計学的解析	- 39 -
第3節. 実験結果	- 40 -
第1項. ASB20123 の in vitro 受容体活性評価	- 40 -
第2項. ラットにおける PK 評価	- 42 -
第3項. マウスの耳介軟骨における cGMP 産生評価	- 45 -
第4項. 若齢のマウスを用いた ASB20123 の骨伸長促進作用	- 47 -
第5項. ラットにおける ASB20123 の持続皮下投与の骨伸長作用	- 50 -
第6項. ラットにおける ASB20123 の長期投与による骨伸長作用	- 54 -
第4節. 考察	- 56 -
第5節. 小括	- 61 -
第3章 新規 C 型ナトリウム利尿ペプチド誘導体 : ASB20123 の安全性評価	- 62 -
第1節. 緒言	- 62 -
第2節. 実験材料及び実験方法	- 62 -
第1項. 被験物質	- 62 -
第2項. 動物	- 62 -
第3項. 実験系	- 62 -
第4項. 観察・検査項目	- 63 -
第5項. 統計学的解析	- 65 -
第3節. 実験結果	- 66 -
第1項. ASB20123 の毒性プロファイル	- 66 -
第2項. 骨・軟骨毒性の機序に関する検討	- 71 -
第3項. 骨・軟骨毒性に関するバイオマーカーの探索と回復性の評価	- 73 -
第4節. 考察	- 78 -
第5節. 小括	- 80 -
【総括】	- 81 -
参考資料	- 83 -
論文リスト	- 94 -
【主論文を構成する論文】	- 94 -
【参考論文】	- 94 -
謝辞	- 96 -

本文中及び図中で用いた略号は以下のとおりである。

ALP	alkaline phosphatase
Ank	progressive ankyloses protein
ANP	atrial natriuretic peptide
AUC	area under the curve
BMD	bone mineral density
BNP	brain natriuretic peptide
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CHO	chinese hamster ovary
CNP	c-type natriuretic peptide
CPK	creatine phosphokinase
CT	computed tomography
ECM	extracellular matrix
EDTA-2Na	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Fgfr3 ^{ach}	activated fibroblast growth factor 3 achondroplasia-phenotype
GH	growth hormone
GHS-R	growth hormone sequetagogue receptor
HA	hyaluronic acid
Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
KO	knock out
Mgp	matrix gla protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NEP	neutral endopeptidase

Npp1	nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
NPR	natriuretic peptide receptor
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PD	pharmacodynamics
PK	pharmacokinetics
RIA	radioimmunoassay
RT	reverse transcription
SD	sprague dawley
SDR	spontaneous dwarf rat
SOS	spheno-occipital synchondrosis
STAT	signal transduction and activator of transcription
TG	transgenic
WT	wild type

要 旨

C型ナトリウム利尿ペプチド (c-type natriuretic peptide: CNP) は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP) 及び脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP) と共にナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つである。ANP 及び BNP は、それぞれ心房及び心室から主に産生されるペプチドであり、心臓、腎臓、及び血管において、ナトリウム利尿ペプチド受容体 (natriuretic peptide receptor: NPR) -A に結合することによって作用する。一方、CNP は主に中枢神経系血管内皮細胞で産生され、脳、生殖腺、及び骨を含む広範な組織において、別のナトリウム利尿ペプチド受容体 NPR-B に結合することによって局所調節因子として作用する。CNP または NPR-B の knock out (KO) マウスはいずれも、骨格成長の障害により顕著な低身長表現型を示すことから、CNP/NPR-B のシグナル伝達が内軟骨性骨化に重要であることが明らかとされている。

CNP KO マウスは四肢長管骨及び体幹の伸長障害を呈し、不正咬合やそれに伴うと考えられる栄養不良により成獣に達する前に死亡することから、成獣における CNP 欠損の影響を十分に解析することはできなかった。一方で、CNP KO ラットは CNP KO マウスと同様に内軟骨性骨化の機能が著しく損なわれ、低身長の表現型を示す一方、不正咬合は認められず、その野生型のラットと同様の寿命であった。更に、天然型 CNP の 1 つである CNP-53 を CNP KO ラットに 4 週間持続皮下投与したところ、体長の用量依存的な伸長が認められた。

第 1 章では、CNP KO ラットの頭蓋骨の形態を解析し、野生型ラットを対照としてその特徴を比較した。CNP KO ラットの頭蓋骨は、WT ラットと比較して矢状方向に短く、大後頭孔の狭窄が認められた。これらの症状は、軟骨無形成症をはじめとした四肢短縮型低身長症の患者の特徴的な臨床症状である中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄と共通するものと考えられ、成長ホルモン欠損による自然発症矮小ラットでは認められなかった。CNP KO ラットに天然型 CNP である CNP-53 を 4 週間持続皮下投与したところ、頭蓋骨の矢状方向の伸長と大後頭孔の有意な拡大が認められ、頭蓋骨の形態異常は完全若しくは部分的に改善した。本検討結果から、CNP-53 若しくは CNP 誘導体による治療は、低身長に加え、頭蓋骨の形態についても改善する可能性が示された。

第2章及び第3章では、内軟骨性骨化における CNP の生理的作用について創薬応用への可能性を検討するために、新規 CNP 誘導体をデザインし、その有効性と毒性を評価した。我々のグループは、既に ghrelin の C 末端部分を CNP-22 に適用することで、より高い血中安定性をもたらすことを報告している。そこで、新規 C 型ナトリウム利尿ペプチド誘導体、ASB20123 を作製し、その有効性と毒性を評価した。

ASB20123 は完全な NPR-B アゴニスト活性を有し、CNP-22 と比較して AUC の明らかな増加を示した。また、ASB20123 はマウス若しくはラットに反復皮下投与することによって用量依存的な骨伸長促進作用を示し、1 日 1 回の反復皮下投与した場合と比較して同用量を持続皮下投与することによって、より強力な薬理作用を示した。CNP には血管拡張作用が報告されていることから、投与には低血圧リスクを伴うことが考えられ、実際に他の CNP 誘導体である BMN-111 の臨床試験においても有意な低血圧が報告されている。それに対し、ASB20123 の持続投与は、効果的な骨伸長作用を示しつつ、低血圧のような最大血中濃度に依存するオンターゲット毒性を回避するには有効な投与方法であることが示唆された。

以上の結果から、新規 CNP 誘導体である ASB20123 は軟骨無形成症の患者など、四肢短縮型低身長症の患者において成長を改善する可能性を有することが示された。また、ASB20123 の持続皮下投与を模倣するデバイス等を用いた投与方法は有意な低血圧の発現を回避しつつ、骨成長に対する有効性を最大化する有効な手段であることが示された。

次に、ASB20123 の毒性学的プロファイルを評価した。ASB20123 をラットに 0.5、1.5、及び 5.0 mg/kg/day で 4 週間反復皮下投与したところ、毒性変化は骨・軟骨組織にのみに観察され、その他の器官・組織には観察されなかった。薬理作用の延長にある所見として、組織学的検査で大腿骨及び脛骨において成長板の肥厚が認められ、それに伴う変化として、体長の伸長や骨型アルカリフスファターゼの上昇等が認められた。毒性変化として、大腿骨骨密度の低値、並びに組織学的検査において骨端・骨幹端の壊死、骨髓の線維化、異所性の骨・軟骨形成、及び筋線維の変性・壊死が認められた。これらの変化と成長板の関連を評価するため、12 ヶ月齢ラットを用いて同様の毒性試験を実施したところ、成長板が閉鎖して

いる箇所には毒性所見は認められなかったことから、これらの毒性変化は、ASB20123 の薬理作用に基づく過剰な成長促進作用によって惹起されることが示された。これらの骨・軟骨毒性の発現は、大腿骨の成長板厚及び大腿骨皮質骨の骨密度の低下と良好な相関が認められた。成長板厚や骨密度は臨床においてもモニターが可能であることから、毒性変化を予測する良好なマーカーになり得ると考えられる。

本研究によって、CNP/NPR-B シグナルの活性化は、軟骨無形成症をはじめとした四肢短縮型低身長症の患者にとって有効な治療手段であることが示された。特に外因性の CNP によって中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄の改善効果が示されたことは患者の QOL の観点から重要な知見と考えられる。新規 CNP 誘導体である ASB20123 を用いた検討では、低血圧のリスクを回避しつつ骨成長に対する有効性を最大化する投与法の提案とその骨軟骨毒性を回避するためのモニター方法を提示することができた。本剤の毒性変化は薬理作用の延長上に発現することから、用法用量を厳密に設定することが、治療薬として成功する鍵となると考えられる。今後、このような CNP/NPR-B シグナルの研究がさらに進展することによって、四肢短縮型低身長症の患者に対する治療法が確立されることを期待する。

序 論

はじめに

C型ナトリウム利尿ペプチド (c-type natriuretic peptide: CNP) は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP) 及び脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP) と共にナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つである [1]。ANP 及び BNP は、それぞれ心房及び心室から主に産生されるペプチドである。これらのペプチドは、心臓、腎臓、及び血管において、ナトリウム利尿ペプチド受容体 (natriuretic peptide receptor: NPR) -A に結合することによって作用する [2]。一方、CNP は主に中枢神経系血管内皮細胞で産生され [3]、脳、生殖腺、及び骨を含む広範な組織において、別のナトリウム利尿ペプチド受容体 NPR-B に結合することによって局所調節因子として作用する [2]。CNP または NPR-B の knock out (KO) マウスはいずれも、骨格成長の障害により顕著な低身長の変現型を示し [4-8]、CNP の軟骨特異的過剰発現または循環血中濃度の増加を有するトランスジェニック (transgenic: TG) マウスは、過成長の変現型を示す [9-12]ことから、CNP/NPR-B のシグナル伝達が内軟骨性骨化に重要であることが明らかとされている。ヒトにおいても、NPR-B 遺伝子のホモ接合性の機能喪失型の突然変異によって内軟骨性骨化による骨成長が著しく損なわれるのみならず [13, 14]、ヘテロ接合性の突然変異によっても、骨格成長の障害を引き起こすことが報告されている [15-19]。さらに、最近の研究では、CNP 遺伝子におけるヘテロ接合性の機能喪失型の突然変異も、ヒトにおいて低身長を引き起こすことが示された [20]。また、NPR-B をコードする遺伝子の機能獲得型の突然変異と CNP の発現増加の両方が、ヒトにおいて過成長を引き起こすことが報告されている [21-26]。これらの事実は、CNP/NPR-B シグナルがヒト及びマウスにおける内軟骨性骨化に非常に重要な役割を担っていることを示している。

CNP KO ラットの作製とその特徴

全身性及び軟骨特異的 CNP KO マウスはいずれも不正咬合やそれに伴う栄養不良により成人前に死亡することから [3, 7]、成獣における CNP 欠損の影響を十分に解析することはできなかった。そこで、ジnkフィンガーヌクレアーゼを用いたゲノム編集により CNP KO ラットが作製された [27]。CNP KO ラ

ットは CNP KO マウスと同様に内軟骨性骨化の機能が著しく損なわれ、低身長の変現型を示した (Fig. 1)。CNP KO ラットは組織学的解析から、成長板、特に肥大軟骨細胞層は顕著に薄く、成長板軟骨細胞の増殖が野生型 (wild type: WT) ラットと比較して低下していることが明らかになった。CNP KO ラットで不正咬合は認められず、CNP KO マウスの生存率が 10 週齢で 70%未満に低下 [7]するのとは対照的に WT ラットと同様の生存率であった。また、評価に供した全てのラットは生後 1 年以上生存した。33 週齢の時点における体長と成長板を評価したところ、CNP KO ラットの体長は有意に短く、WT ラットの約 72%であった。また、33 週齢の WT ラットでは大腿骨の成長板が確認されたのに対し、CNP KO ラットの成長板は閉鎖しており、CNP KO ラットにおける成長板の早期閉鎖が示唆された。CNP 及び NPR-B は脳、心血管系、及び生殖腺において発現している [1, 2]ことから、骨組織以外の組織への影響が懸念されるが、CNP KO ラットにおいて、少なくとも組織学的な異常は認められなかった。

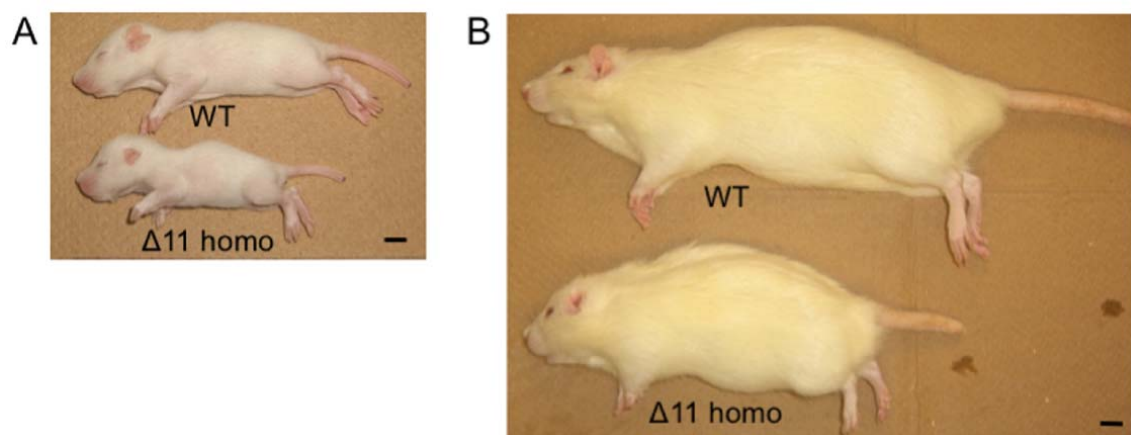


Fig 1. Gross appearance of CNP KO rats.

(A) and (B) Gross appearance of male WT rat and rat with a homozygous $\Delta 11$ mutation at two weeks (A) and 14 weeks (B) of age. Black scale bar in each picture denotes 10 mm.

CNP-53 投与による骨伸長作用と早期成長板閉鎖の予防

天然型 CNP は、22 個のアミノ酸からなる CNP-22 と CNP-22 の N 末側に 31 個のアミノ酸残基からなる直鎖ペプチドが結合した CNP-53 の 2 種類が存在し、両方とも同一の 126 個のアミノ酸で構成される前駆体からプロセッシングを受けて生成する [28]。CNP-53 は CNP-22 と比較して、中枢及び末梢組織で優勢であり [29]、中性エンドペプチダーゼ (neutral endopeptidase: NEP) に対して高い耐性を有する [30]。そこで、本検討では 4 週齢の CNP KO 及び同腹仔の WT ラットに CNP-53 を 0.15 又は 0.5 mg/kg/day で 4 週間持続皮下投与した。CNP-53 投与により、CNP KO ラット及び WT ラットの体長は用量依存的に有意に伸長した。CNP KO ラットにおいて 0.15 mg/kg/day 投与群の体長は、その対照群と比較して有意に伸長し、WT ラットの対照群とほぼ同程度の伸長幅であった。0.5 mg/kg/day 投与群の体長は投与終了時点で WT ラットの対照群とほぼ同等の体長であった (Fig. 2)。CNP KO ラットの対照群では、投与終了時である 8 週齢の時点において、脛骨の遠位端及び踵骨の成長板の閉鎖が認められた。一方、CNP-53 投与群では成長板の早期閉鎖は認められず、その機序は不明であるものの、CNP-53 投与による成長板閉鎖の遅延は、成長期間を延長する面においても最終体長の改善に寄与しうると考えられた。

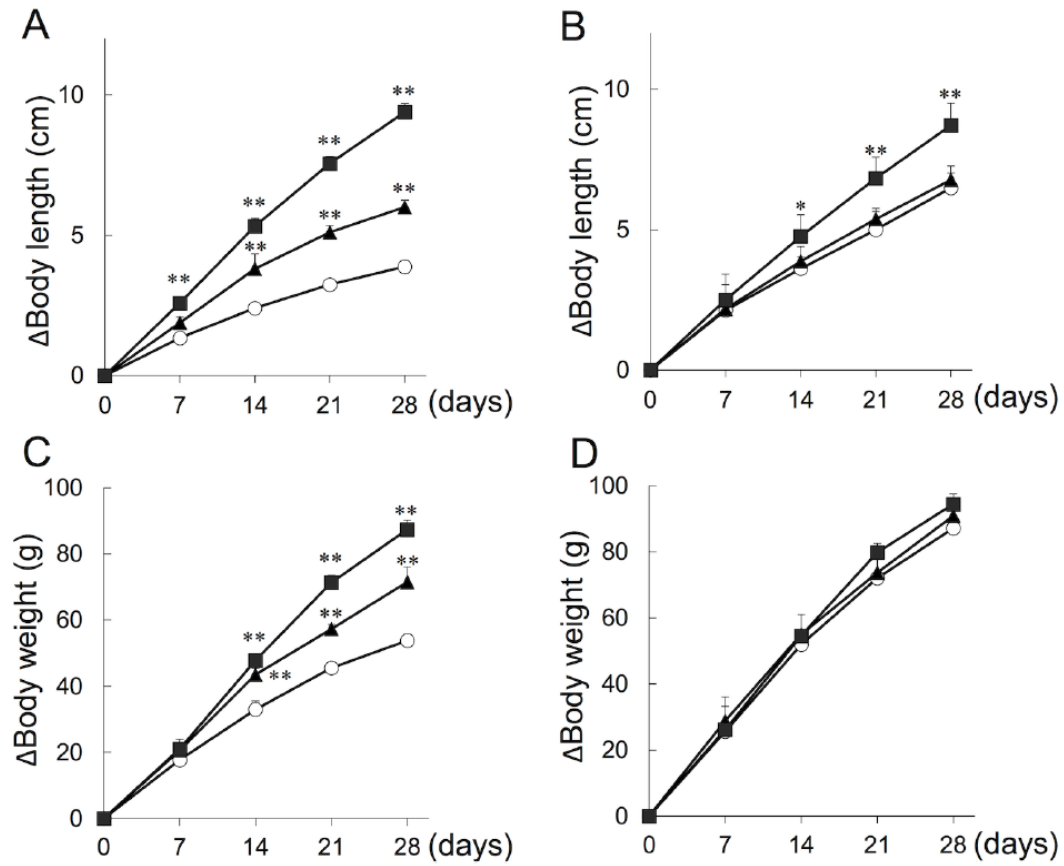


Fig 2. Changes in body length and body weight of female WT and CNP-KO rats that received vehicle or CNP-53 for 28 days.

Changes in naso-anal body length (Δ body length) in CNP-KO rats (A) and WT rats (B), and changes in body weight (Δ body weight) in CNP-KO rats (C) and WT rats (D). Each value shown is the mean + SE. Open circles, vehicle (n = 5 and 7 in CNP-KO and WT rats, respectively); closed triangles, CNP-53 0.15 mg/kg/day (n = 4 in the both genotypes); closed squares, CNP-53 0.5 mg/kg/day (n = 6 in the both genotypes). *, $p < 0.05$ vs. vehicle-treated group, **, $p < 0.01$ vs. vehicle-treated group based on Dunnett's multiple comparison test.

本研究の目的と内容

CNP/NPR-B シグナルはヒトの内軟骨性骨化に非常に重要な役割を担っており、CNP 及びその誘導体は、軟骨無形成症をはじめとする四肢短縮型低身長症の治療アプローチとして最も期待されている方法の 1 つである [31]。これまでの研究から、CNP KO ラットは CNP KO マウスと同様に内軟骨性骨化の機能が著しく損なわれており、低身長の表現型を示すことが明らかとなっている。また、CNP KO ラットは、生後 1 年以上生存することから長期の投薬実験が実施可能であり、CNP-53 投与によって、その体長は用量依存的に有意に伸長することが示された。四肢短縮型低身長症の患者は、低身長であることに加え、大後頭孔の狭窄と中頭骨の低形成を特徴として有する。第 1 章では、CNP KO ラットの頭蓋骨の形態的特徴を明らかとするとともに、外因性に補充された CNP-53 による頭蓋骨形態への影響を検討した。

我々は以前の研究で、ghrelin の C 末端部分が薬物動態プロファイル及び成長ホルモン放出活性に重要な役割を果たすことを示した [32]。更に、ghrelin の C 末端部分を CNP に適用することで天然型と比較して、より高い血中安定性をもたらし、内軟骨性骨化の刺激剤としての生理活性も改善することが推察された [33, 34]。第 2 章及び第 3 章ではこれらの知見を基に作製された新規 CNP 誘導体について、その薬理作用と毒性を評価した。その中で新規の薬理学的アプローチや毒性のモニタリング法を提唱することで、新規 C 型ナトリウム利尿ペプチド誘導体の四肢短縮型低身長症に対する治療薬として、創薬への可能性を検討した。

第1章 CNP KO ラットにおける頭蓋骨の形態解析及び CNP-53 投与によるその改善効果

第1節. 緒言

軟骨無形成症に代表される四肢短縮型低身長症の患者は、低身長であることに加え、大後頭孔の狭窄及び中頭骨の低形成を特徴として有する。重篤な場合、延髄や上位頸椎の圧迫により、頸部の屈曲制限、後弓反張、四肢麻痺、深部腱反射の亢進、下肢のクロームス、中枢性無呼吸がみられるが、本質的な治療はなく神経症状を呈した場合は減圧手術を行う [31]。軟骨無形成症の原因遺伝子である FGFR3 を変異させた軟骨無形成症モデル (activated fibroblast growth factor 3 achondroplasia-phenotype: *Fgfr3^{ach}*) マウス [35]及び CNP KO マウス [36]の表現型は軟骨無形成症患者と類似しており、頭蓋骨の形態及び大後頭孔の狭窄が報告されている [37]ものの、大後頭孔の狭窄について、投薬による改善報告はない。そこで、本章では CNP KO ラットの頭蓋骨の形態を詳細に検討した。同時に、成長ホルモン (growth hormone: GH) 欠損による自然発症矮小ラット (spontaneous dwarf rats: SDR) と比較した [38]。更に、CNP-53 を5週齢の CNP KO ラットに4週間持続皮下投与し、大後頭孔狭窄と中顔面低形成に対する改善効果を検討し、その改善効果と頭蓋底の蝶後頭軟骨結合部位 (spheno-occipital synchondrosis: SOS) の関連を検討した。

第 2 節. 実験材料及び方法

第 1 項. 被験物質

ヒト CNP-53 (GLSKGCFGLKLDRIKSGGLCKKNAGKYRANPHEQLLLRA WAARSKTDVRLD) は、遺伝子組換え大腸菌を用いて製造し、高速液体クロマトグラフィーで精製した。ペプチドの構造はアミノ酸組成分析及びエレクトロスプレーイオン化質量分析により確認した。CNP-53 の純度は 95% 以上であった。

媒体は 10 w/v% 精製白糖及び 1 w/v% ベンジルアルコール添加 0.03 M 酢酸緩衝液を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH4 に調製して用いた（以下、媒体）。

第 2 項. 動物

本研究は、京都大学実験動物委員会、株式会社オリエンタルバイオサービスの実験動物委員会、及びアスピオファーマ株式会社の実験動物倫理委員会の承認を受けて、各実施機関の動物実験ガイドラインに基づいて実施した。

CNP KO ラットはジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたゲノム編集により作製された動物を用いた [27]。4～5 週齢の雌性の CNP KO ラット及び同腹仔の WT ラットは京都大学から、7 週齢の雌性 Sprague Dawley (SD) 系ラット及び SD 系ラット由来で GH 欠損による自然発症矮小ラットである SDR は日本 SLC 株式会社から入手若しくは購入した。CNP KO ラット及び WT ラットは、株式会社オリエンタルバイオサービス 神戸 BM ラボラトリーにおいて、SD 系ラット及び SDR はアスピオファーマ株式会社において、温度 23℃（許容範囲：21～25℃）、湿度 50%（許容範囲：30～70%）、及び 12 時間照明（7：00～19：00 点灯）に設定した動物飼育室で飼育した。飼料は高圧蒸気滅菌された固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を、飲水は自動給水装置により水道水をそれぞれ自由に摂取させた。CNP KO ラットのジェノタイピングは、導入遺伝子である *Nppc* を確認した。切断した尻尾より、Easy DNA Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いてゲノム抽出し、Polymerase Chain Reaction（PCR）により増幅後、マルチキャピラリー電気泳動法（QIAxcel、QIAGEN）によって確認した。プライマー配列は forward として 5'-CACAGCAGTAGGACCCGTG-3'、reverse として 5'-GGGGAACGAACCCTAGAAGT-3' を用い、試薬

は Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いた。

第 3 項. 実験系

1. 頭蓋骨形態の解析

本検討では、9 週齢の雌性 WT ラット (5 例) 及び CNP KO ラット (4 例)、33 週齢の雌性 CNP WT ラット (3 例) 及び KO ラット (3 例)、並びに 9 週齢の雌性 SD 系ラット (5 例) 及び SDR (5 例) について頭蓋骨の形態を解析した。頭蓋骨の形態の測定及び解析方法は第 4 項に記載した。同時に体重及び体長を測定した。体長測定はイソフルラン吸入麻酔下でノギスを用いて測定し、鼻先から肛門までの長さとした。

2. CNP-53 投与による頭蓋骨形態の改善効果

5 週齢の雌性 WT ラット (5 例) 及び CNP KO ラット (4 例) に媒体を、CNP KO ラット (5 例) に CNP-53 の約 0.5 mg/kg/day を浸透圧ミニポンプ (ALZET osmotic pump 2004、Durect Corporation) を用いて 4 週間持続皮下投与したところ、CNP KO ラットの骨伸長は有意に促進し、投与終了時の体長は同週齢の WT ラットと同等であったことから、本試験でも同様の方法で投与液を調製した。つまり、WT ラット及び CNP KO ラットの 5~7 週齢における平均体重に基づいて投与液を調製し、浸透圧ポンプを皮下に移植した。移植 2 週間後に、7~8 週齢における平均体重に基づいて調製した投与液の浸透圧ポンプに交換した。投与期間終了後に体重及び体長を測定し、頭蓋骨の形態及び頭蓋底の SOS を観察した。

第 4 項. 頭蓋骨の形態測定

ラット頭蓋骨は、Latheta LCT-200 (computed tomography: CT; 日立アロカメディカル株式会社) を用いて撮影した。CT の撮影条件は、管電圧 50 kVp、管電流 0.5 mA、積分時間 3.6 ms、撮影視野 96 mm、ボクセルサイズ 96 μ m で実施した。CT 画像の 3D 画像の再構成及び頭蓋骨の形態測定は、画像処理プログラム (ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) を用いて行った。頭蓋骨の形

態として、skull width、skull length、nose length、nasal bone length、inter-orbital distance、upper jaw length、lower jaw length、及び foramen magnum size を測定した [36, 39]。

第 5 項. Reverse Transcription (RT) - PCR

4 週齢の WT ラット及び CNP KO ラットの腰椎における matrix gla protein (*Mgp*)、progressive ankyloses protein (*Ank*)、及び nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (*Npp1*) についてリアルタイム RT-PCR により遺伝子発現解析を実施した。ハウスキーピング遺伝子として hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) を用い、WT ラットに対する相対値によって、CNP KO ラットの発現変動を評価した。ラットの腰椎から RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出し、ReverTra Ace (東洋紡株式会社) を用いて逆転写反応し、cDNA を合成した。PCR は測定機器として StepOnePlus Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を、反応試薬として THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX (東洋紡株式会社) を用い、*Mgp*、*Ank*、*Npp1*、及び *Hprt1* に特異的なプライマー (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。

プライマーの配列を Table 1 に示した。

Table 1. Sequences of the PCR primer

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon
<i>Mgp</i>	5'-CTTCACCACCCGGAGAAT-3'	5'-CTGCCTGAAGTAGCGGTTGT-3'	196-bp
<i>Ank</i>	5'-CATCACCAACATAGCCATCG-3'	5'-AAGGCAGCGAGATACAGGAA-3'	351-bp
<i>Npp1</i>	5'-GTCAGTATGCGTGCTAAC-3'	5'-TGGCACACTGAACTGTAG-3'	309-bp
<i>Hprt1</i>	5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3'	5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'	123-bp

第 6 項. 頭蓋底における SOS の観察

4 週齢及び 9 週齢の WT ラット及び CNP KO ラット、並びに CNP-53 の 0.5 mg/kg/day を 4 週間持続皮下投与した 9 週齢の CNP KO ラットの頭蓋骨について、頭蓋底における SOS の評価を実施した。単離した頭部の皮膚を除去し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中で固定した。その後、95%エタノール溶液中で再固定し、アルシアンブルー及びアリザリンレッドで染色した。染色後、軟部組織を 2% KOH 溶液で溶解し、実体顕微鏡下にて観察した。

第 7 項. 統計学的解析

得られた個別データをもとに平均値及び標準偏差を算出した。全てのデータ間の比較は Student の t 検定を用いて有意差検定を行った。その際、 p 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意な差があると判断した。

第3節. 実験結果

第1項. CNP KO ラット及び SDR における体長及び体重

9 週齢の WT ラット及び CNP KO ラット、並びに SD 系ラット及び SDR の体長及び体重を比較した。SDR は GH 欠損による自然発症矮小ラットであり、比較対照として用いた。CNP KO ラット、SDR は共にそれぞれの野生型ラットと比較して明らかに矮小な表現型を示した。CNP KO ラットは WT ラットと比較して、体重で 77.3%、体長で 68.6%、SDR は SD 系ラットと比較して、体重で 31.6%、体長で 68.9%あった (Fig. 3)。

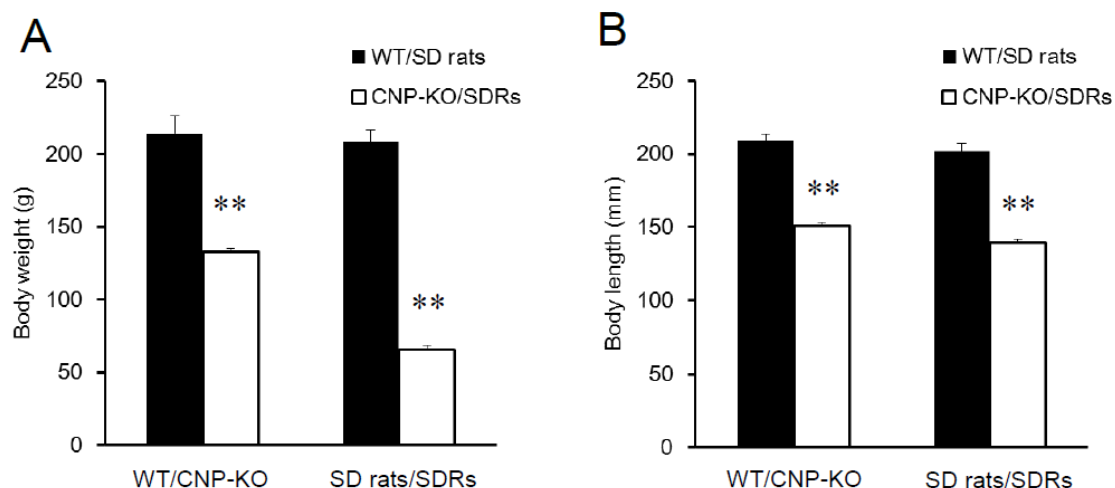


Fig 3. Weights and lengths of WT, CNP-KO, SD rats and SDRs

(A) Body weights and (B) lengths of female WT, CNP-KO, SD rats, and SDRs at 9 weeks of age. Body weights and lengths of WT and CNP-KO rats at 9 weeks of age (N=3 each), and of SD rats and SDRs at 9 weeks of age (N=5 each). Data are expressed as the means \pm SD. **, $p < 0.01$ vs. WT or SD rats using Student's t-test.

第2項. CNP KO ラット及び SDR における頭蓋骨の形態

9 週齢及び 33 週齢の WT ラット及び CNP KO ラット、並びに 9 週齢の SD 系ラット及び SDR の頭蓋骨について再構成した 3D CT 画像を用いて skull width、skull length、nose length、nasal bone

length、inter-orbital distance、upper jaw length、及び lower jaw length の直線距離を計測し比較した (Fig. 4)。CNP KO ラットの skull length、nose length、nasal bone length、及び upper jaw length は WT ラットと比較して有意に低値であった。一方、CNP KO ラットの skull width、inter-orbital distance、及び lower jaw length は WT ラットとほぼ同等の値であり、CNP KO ラットの頭蓋骨は矢状方向の計測部位のみ有意な低値を示した。また、この結果は 9 週齢と 33 週齢で共通していた。対照的に SDR の頭蓋骨は全ての計測部位において SD 系ラットと比較して有意に低値であった (Fig. 5)。

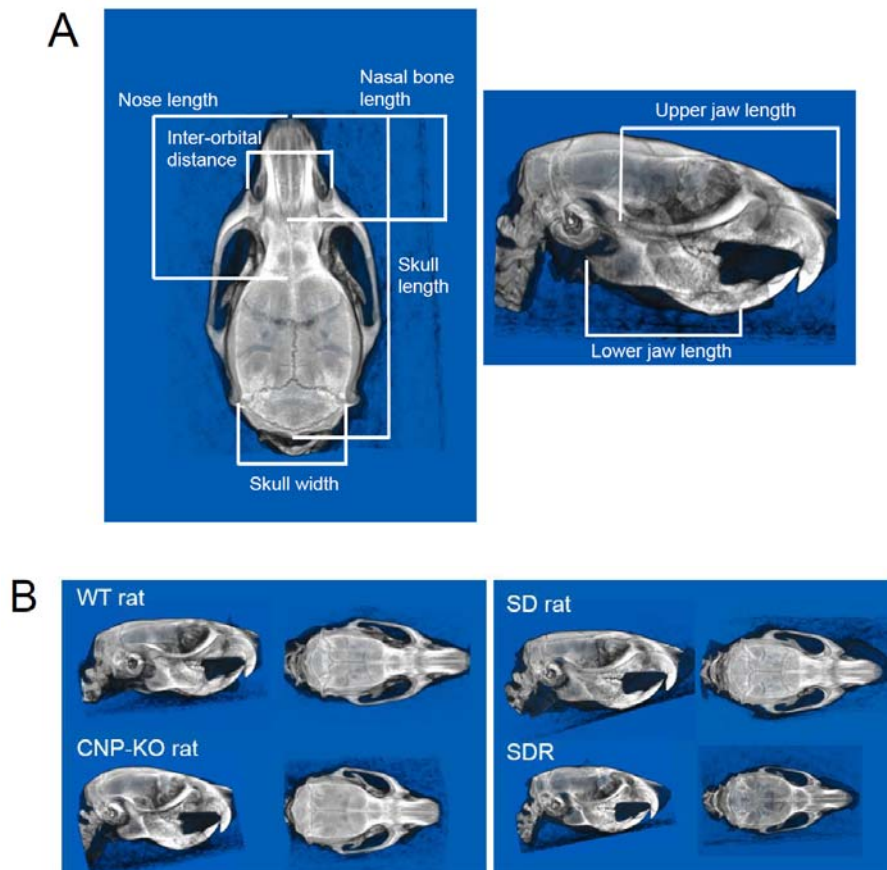


Fig 4. Analyses of craniofacial morphology in WT, CNP-KO, SD rats, and SDRs

(A) Linear measurements for analysis of skull morphology. (B) 3D-reconstructed images of WT, CNP-KO, SD rats, and SDRs at 9 weeks of age.

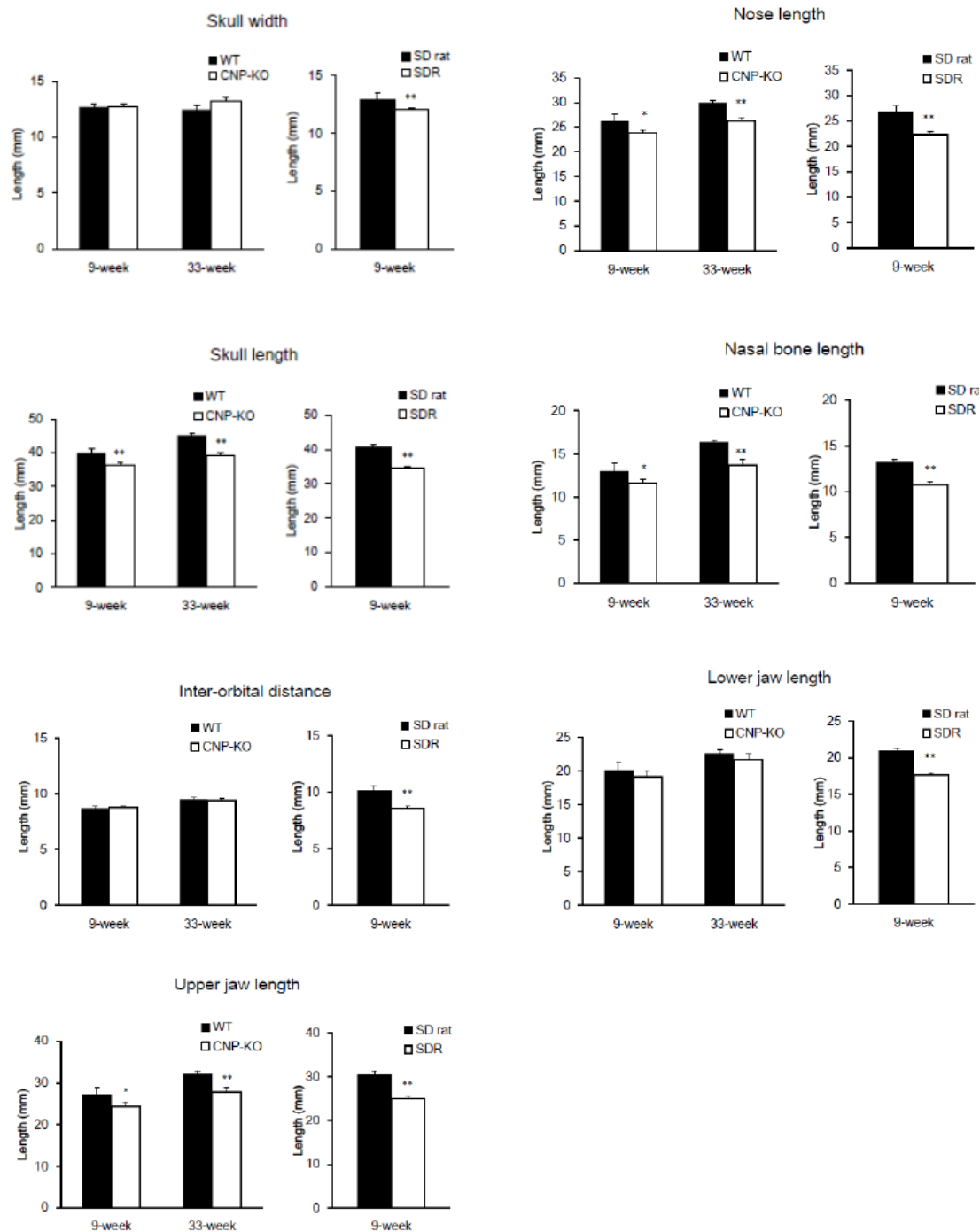


Fig 5. Measurements of craniofacial morphology in WT, CNP-KO, SD rats, and SDRs

Linear measurements of craniofacial morphology of WT and CNP-KO rats at 9 and 33 weeks of age (N=3 each), and of SD rats and SDRs at 9 weeks of age (N=5 each). Data are expressed as the means \pm SD. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. WT or SD rats using Student's t-test.

第3項. CNP KO ラット及び SDR における大後頭孔の大きさ

9 週齢及び 33 週齢の WT ラット及び CNP KO ラット、並びに 9 週齢の SD 系ラット及び SDR の大後頭孔について再構成した 3D CT 画像を用いて面積を計測し比較した (Fig. 6A)。CNP KO ラットの大後頭孔の大きさは、9 週齢、33 週齢ともに WT ラットと比較して有意に低値であった。また、WT ラット、CNP KO ラットともに 9 週齢から 33 週齢で大後頭孔の大きさはほぼ同等であった。対照的に、SD 系ラットと SDR は、体重及び体長に明確な差があるにもかかわらず、大後頭孔の大きさはほぼ同等であり、有意な差は認められなかった (Fig. 6B)。

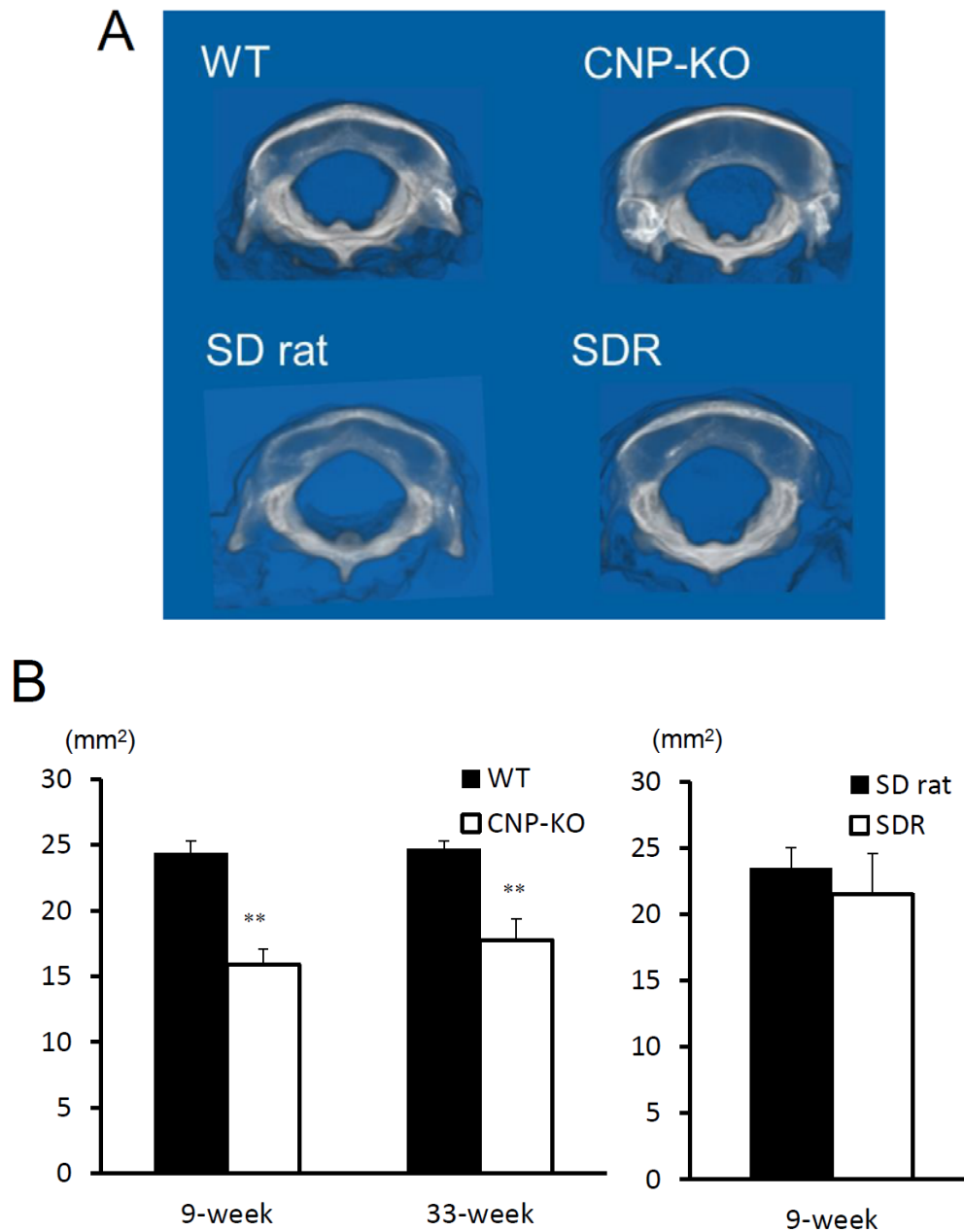


Fig 6. Foramen magnum size in WT, CNP-KO, SD, and SDR rats

(A) 3D-reconstructed images of the foramen magnum in WT and CNP-KO rats at 9 weeks of age, and in SD rats and SDRs at 9 weeks of age. (B) Foramen magnum size in WT and CNP-KO rats at 9 and 33 weeks of age (N=3 each), and in SD rats and SDRs at 9 weeks of age (N=5 each). Data are expressed as the means \pm SD. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. WT or SD rats using Student's t-test.

第4項. CNP KO ラットで認められた中顔面の低形成及び大後頭孔狭窄に対する CNP-53 の影響

5 週齢の CNP KO ラットに CNP-53 を約 0.5 mg/kg/day の用量で 4 週間持続皮下投与した。投与終了時の CNP KO ラットの体重及び体長は対照群と比較して有意に高値であり、有意差はあるものの WT ラットの対照群とほぼ同等の値であった (Fig 4)。CNP KO ラットの頭蓋骨で有意な低値がみられた矢状方向の長さ (skull length、nose length、nasal bone length、及び upper jaw length) は、CNP-53 投与によって有意に伸長した。一方、冠状方向の長さ (skull width、inter-orbital distance、及び lower jaw length) は CNP-53 投与による伸長は認められなかった (Fig. 7A and B)。また、大後頭孔の大きさについても CNP-53 投与によって有意に改善が認められた (Fig. 7C)。

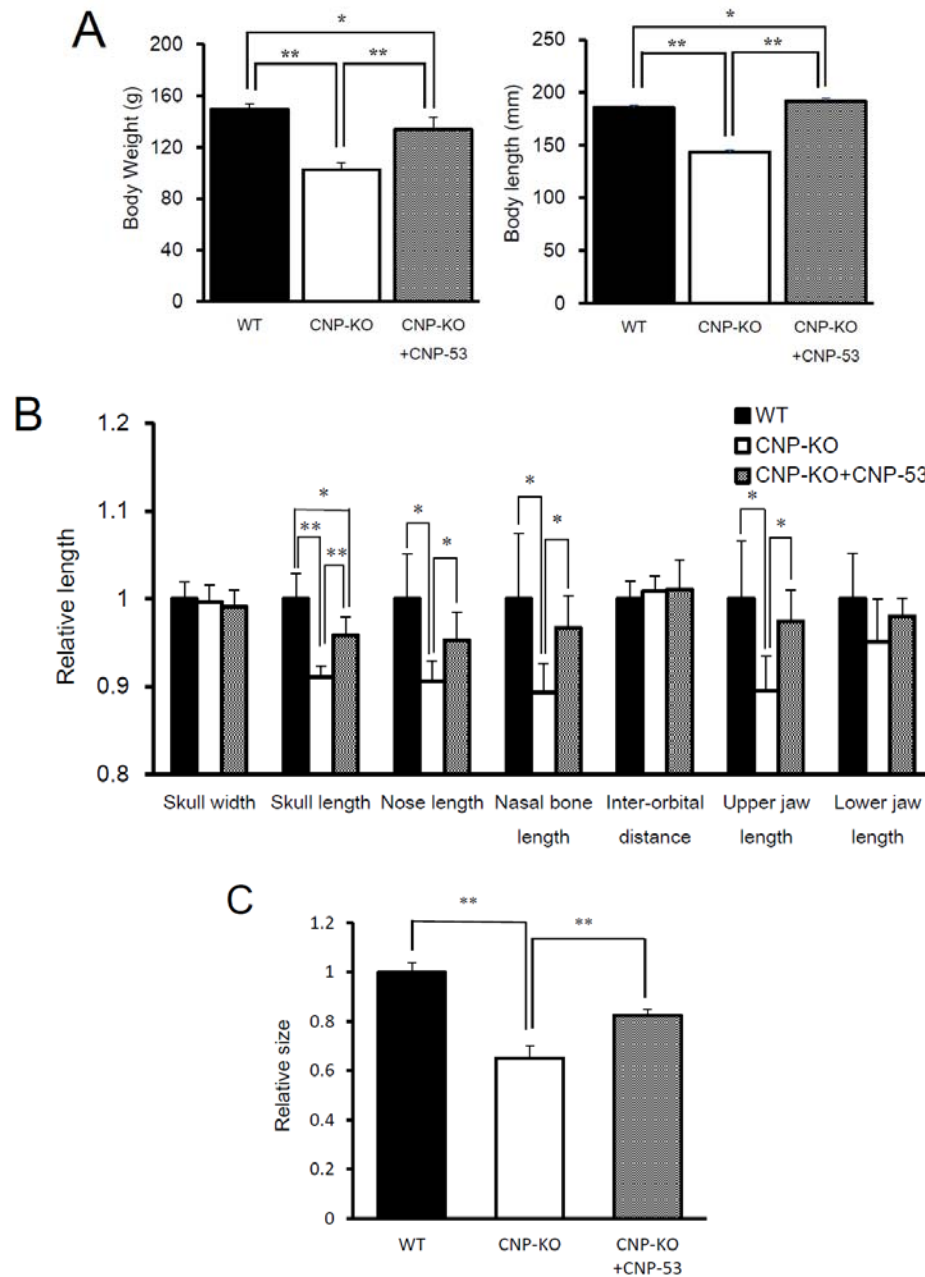


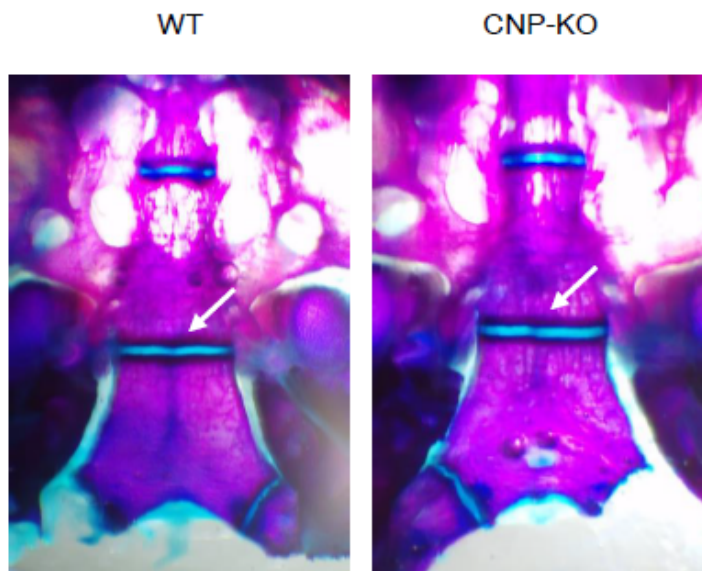
Fig 7. Effects of CNP-53 on body weight, length, craniofacial morphology, and foramen magnum size in CNP-KO rats.

(A) Body weight and length, (B) relative lengths of craniofacial morphology to WT rats, (C) relative size of foramen magnum to WT rats. WT, WT rats which received vehicle; CNP-KO, CNP-KO rats which received vehicle; CNP-KO + CNP, CNP-KO rats which received CNP-53 (ca. 0.5 mg/kg/day). Data are expressed as the means \pm SD of 4-5 rats. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. WT or CNP-KO rats using Student's t-test.

第 5 項. 頭蓋底における SOS 部位の観察

これまでの検討により、CNP KO ラットにおいて中顔面の低形成や大後頭孔狭窄が認められ、CNP-53 の投与はそれらの異常を有意に改善することが示された。そこで、頭蓋底における成長中心である SOS について 4 週齢の WT ラット及び CNP KO ラット、並びに 9 週齢の WT ラット、CNP KO ラット、及び CNP-53 を投与した CNP KO ラットについて評価した。4 週齢の時点で WT ラット、CNP KO ラット共に明確に SOS を確認できたものの、CNP-53 の投与 4 週間後である 9 週齢では、WT ラット及び CNP-53 を投与した CNP KO ラットでのみ SOS が確認され、無処置の CNP KO ラットでは閉鎖していた (Fig. 8)。

4-week (before-administration)



9-week (after-administration)

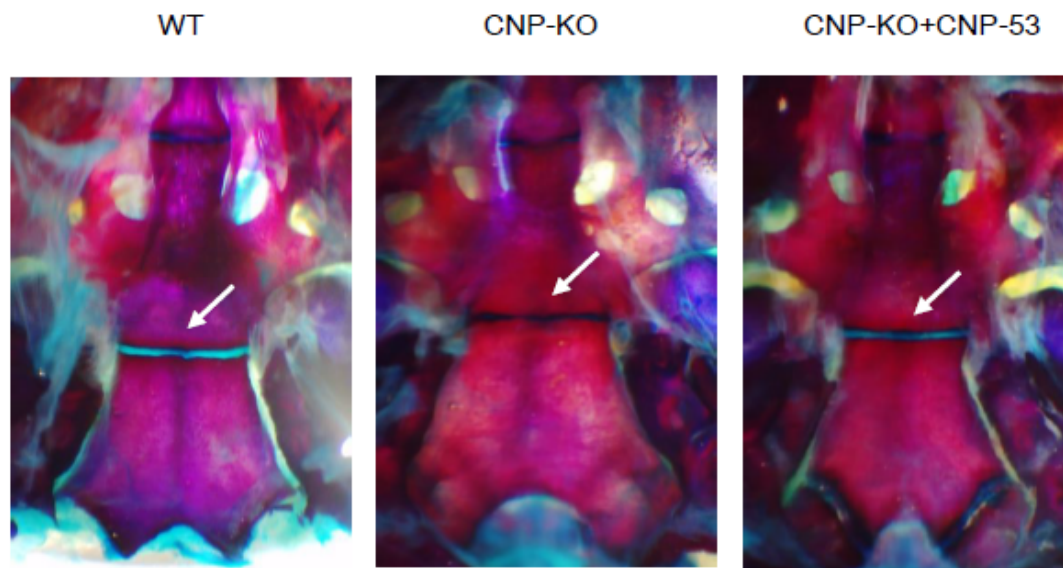


Fig 8. Appearance of the synchondrosis at the cranial base after staining with alcian blue and alizarin red.

Arrow indicates the SOS.

第 6 項. CNP KO ラットと頭蓋骨縫合早期癒合症との関連

CNP KO ラットで認められた中顔面の低形成及び SOS の早期閉鎖は、頭蓋骨縫合早期癒合症のモデルマウスである *Mgp* 欠損マウスにおいても報告されている [40]。 *Mgp* 欠損マウスは上記の特徴に加え、鼻中隔の石灰化及び頭蓋骨の早期癒合が認められることから、9 週齢の WT ラット及び CNP KO ラットの CT 画像を用いて、鼻中隔の石灰化、並びにラムダ縫合及び冠状縫合の癒合を確認したが、CNP KO ラットには認められず、WT ラットとの差は認められなかった (Fig 9)。更に頭蓋骨縫合早期癒合症の原因遺伝子として報告されている *Mgp*、*Ank*、及び *Npp1* について、4 週齢の CNP KO ラットの腰椎における mRNA の発現量を測定した [40]。 CNP KO ラットにおける *Mgp* は WT ラットと比較して有意に低値であった。 *Ank* 及び *Npp1* についても低値傾向であったが、有意差は認められなかった (Fig 10)。

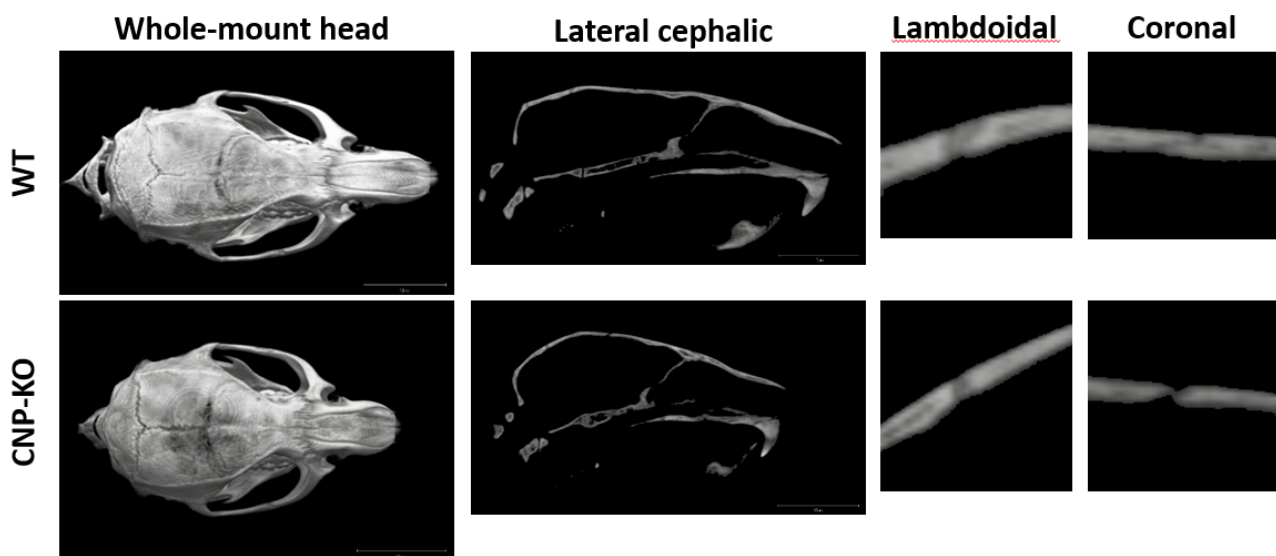


Fig 9. Craniosynostosis and nasal septum in WT and CNP-KO rats

3D CT images of whole-mount skull, lateral cephalic and magnification of lambdoidal and coronal.

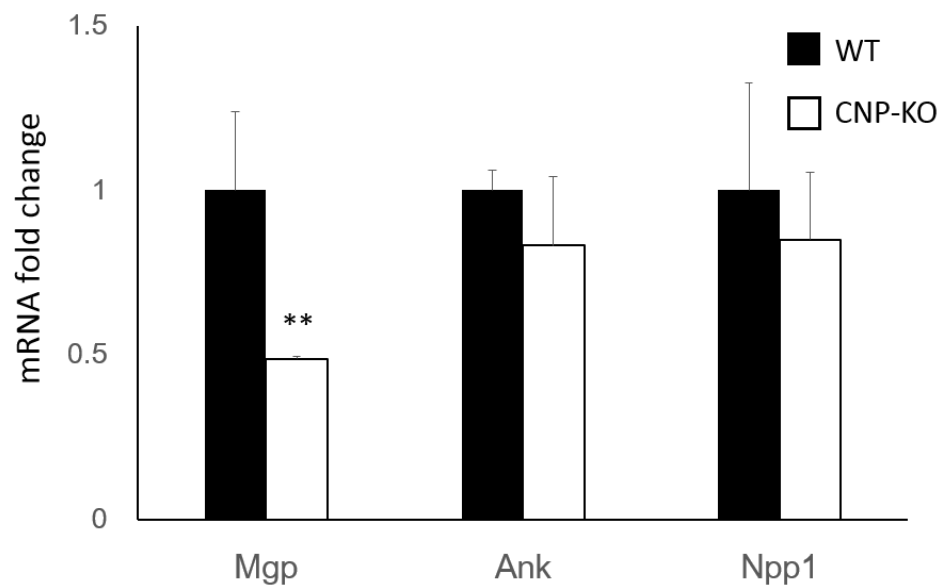


Fig 10. Comparison of gene expression of *Mgp*, *Ank* and *Npp1* between WT and CNP-KO rats.

RT-PCR of the mineralization inhibitor regulating genes, *Mgp*, *Ank* and *Npp1* in lumbar vertebra of 4-week-old female WT and CNP-KO rats. Data are expressed as the means \pm SD of 4 rats. **, $p < 0.01$ vs. WT or CNP-KO rats using Student's t-test.

第4節. 考察

本章では、CNP KOラットの頭蓋骨の形態的特徴を明らかにすると共に、外因性に補充された CNP-53による頭蓋骨の形態への影響を検討した結果について示す。

9週齢及び33週齢の雌性WTラット及びCNP KOラットを用いて、その頭蓋骨の形態及び大後頭孔の大きさを計測比較した。CNP KOラットの頭蓋骨は9週齢及び33週齢ともにWTラットと比較して矢状方向に短く、頭蓋腔と脊柱管の接合部である大後頭孔の狭窄が認められた。加えて、WTラットと同様に、CNP KOラットの大後頭孔の大きさは9週齢と33週齢でほぼ変化がなく、ラットの大後頭孔の形成は9週齢までにほぼ終了していると考えられた。

これまでに我々のグループは、CNP KOラットはWTラットと比較して矮小であり、長管骨の短縮や成長板の菲薄化が認められること [27]、これらの特徴は、CNP KOマウス及び*Fgfr3^{ach}*マウスにおける所見と一致していることを報告した [4, 41]。CNP KOラットの頭蓋骨の形態学的特徴についても、CNP KOマウス及び*Fgfr3^{ach}*マウスの報告と一致しており [36, 39]、軟骨無形成症の患者で観察される特徴とも類似していた [37]。これらの結果は、内因性のCNP/NPR-Bシグナルが中顔面及び大後頭孔の形成に関与していることを示唆している。興味深いことに、GH欠損によって成長障害を示すSDRではその正常対照動物であるSD系ラットと比較して頭蓋骨の大きさは全ての計測部位において低値であったにも関わらず、大後頭孔の大きさに有意差は認められなかった。GH欠損患者においても、軟骨無形成症の患者で認められる中顔面の低形成や大後頭孔狭窄は報告されておらず [42]、これらの特徴はラットとヒトで類似していると考えている。

次に、外因性に補充された CNP-53 が CNP KO ラットの頭蓋骨形態及び大後頭孔の大きさに及ぼす影響を調べた。CNP-53 の 0.5 mg/kg/day を 5 週齢の CNP KO ラットに 4 週間持続皮下投与した結果、頭蓋骨の矢状方向の伸長と大後頭孔の拡大が有意に認められ、長管骨と同様に頭蓋骨の形態についても完全若しくは部分的な改善効果が認められた。*Fgfr3^{ach}* マウスに認められる中顔面矢状方向の低形成や大後頭孔の狭窄に対しても、血中の CNP 濃度を上昇させたトランスジェニック

マウス (SAP-*Nppc*-Tg マウス) との交配によって得られた *Fgfr3^{ach}/SAP-Nppc-Tg* マウスにおいて、中顔面矢状方向の低形成や大後頭孔の狭窄が有意に改善したことが報告されており [39]、CNP が軟骨無形成症患者の中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄にとっての治療薬となりうることが期待される。軟骨無形成症患者の中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄の発生機序には軟骨細胞における FGFR3 とその下流である mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルが関与していると考えられ、FGFR3 は MAPK や signal transduction and activator of transcription (STAT) 等を介して内軟骨性骨化の重要な負の調節因子として働くことで、骨芽細胞の分化や増殖を調節し、SOS の閉鎖にも関与することが報告されている [35、43]。CNP/NPR-B シグナルは、Raf-1 を介して MAPK シグナル伝達を阻害することで FGF3 のシグナルを減弱させると考えられる [44]。*Fgfr3^{ach}/SAP-Nppc-Tg* マウスや細胞内シグナル経路の知見を踏まえると、CNP KO ラットを用いた今回の検討結果は、*Fgfr3^{ach}* マウスでも再現されると推察している。

一方で CNP の誘導体である BMN-111 及びメクリジンを *Fgfr3^{ach}* マウスに投与した報告では、大後頭孔の狭窄に対する改善効果は得られていない [45、46]。これらの報告と本試験の成績との相違の原因は明らかではないが、*Fgfr3^{ach}* マウスの SOS は生後 10 日で閉鎖していることが報告されており [35]、この早期閉鎖が BMN-111 及びメクリジンの治療効果が得られない理由の一つとして考えられる。本研究では、CNP-53 投与開始週齢の 1 週間前である 4 週齢の時点においても CNP KO ラットの SOS は観察されており、CNP-53 投与によって大後頭孔の狭窄が改善した一因と考えている。ヒトの SOS は、X 線検査で評価でき、健常人における閉鎖時期は 11~25 歳であることが報告されている [47~49]。これらのことから CNP-53 を SOS 閉鎖前から投与を開始することによって、軟骨無形成症患者においても、中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄が改善できるものと期待される。

本試験は、9 週齢の時点において WT ラットの SOS が確認できたが無処置の CNP KO ラットでは閉鎖しており、CNP-53 投与によって、閉鎖時期を遅らせることができた。同様の現象は大腿骨や頸骨等の長管骨の成長板でも確認されており、閉鎖時期の遅延は生長期間を延長する面においても有用と考えている [50]。

SOSの早期閉鎖や中顔面の低形成は、CNP KOラットと同様に*Mgp*を欠損したマウスにおいても報告されている [40]。*Mgp*は骨芽細胞の石灰化に関連した遺伝子であり [40]、成長板軟骨の休止期、増殖期、及び終末期肥大軟骨細胞において発現していると報告されているが [51]、CNP/NPR-Bシグナルとの関係性は明確ではない。本試験でCNP KOラットの腰椎における*Mgp*、*Ank*、及び*Npp1*の発現、並びに頭蓋骨の癒合及鼻中隔の石灰化についてWTラットと比較した結果、CNP KOラットにおける*Mgp*の発現はWTラットと比較して有意に低く、*Ank*及び*Npp1*についても低値傾向が認められた。CNP KOラットでは頭蓋骨の早期癒合及び鼻中隔の石灰化は認められなかったことから、CNP KOラットで認められた*Mgp*、*Ank*、及び*Npp1*の低発現は骨の鉱質化が進行した結果を反映したものであり、CNP/NPR-Bシグナルによる直接の関連はないと考えている。

第 5 節. 小括

CNP KO ラットは低身長に加え、中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄を表現系として有しており、CNP KO マウス及び *Fgfr3^{ach}* マウスにおける特徴と一致していた。同様の特徴は SDR では認められず、軟骨無形成症の患者で認められる症状と共通するものと考えられる。CNP KO ラットの中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄は CNP-53 を投与することで改善した。今回の結果は、外因性の CNP によって頭蓋骨の形態を改善した初めての報告であり、CNP/NPR-B シグナルを利用した治療によって、低身長のみならず、頭蓋骨の形態についても改善する可能性を示すことができた。

第2章 新規C型ナトリウム利尿ペプチド誘導体：ASB20123の薬理作用

第1節. 緒言

C型ナトリウム利尿ペプチド（c-type natriuretic peptide: CNP）及びその受容体であるナトリウム利尿ペプチド受容体（natriuretic peptide receptor: NPR）-Bのシグナル伝達は、内軟骨性骨化に非常に重要な役割を担っており [52, 53]、CNP若しくはその誘導体は、軟骨無形成症などの四肢短縮型低身長症の患者にとって最も期待される治療アプローチの一つである [31]。血中におけるCNPの主要な内因性の分子型はCNP-22であるが、外因性に補充されたCNP-22は中性エンドペプチダーゼ（neutral endopeptidase: NEP）によって代謝され速やかに循環系から消失するため、十分な有効性を示すことができない [54, 55]。また、CNPを含む全てのナトリウム利尿ペプチドファミリーは、循環において利尿作用及び低血圧を誘発することが報告されており [56]、高用量のCNP-22を投与した場合、全身の血管抵抗及び血圧の低下を引き起こすことが考えられる [57]。これらの知見は、CNPの商業的臨床応用の難しさを示している。

我々はこれまでに、ghrelinのC末端がghrelinの薬物動態（pharmacokinetics: PK）プロファイル及び成長ホルモンの放出に重要な役割を果たすことを見出した [32]。この知見はmotilinやCNPなどの他のペプチドにも適用可能であり、CNPにghrelinのC末端を適用することによって、天然型であるCNP-22と比較してより高い血中安定性をもたらし、生理活性の向上も認められた [33, 34]。

本章では、新規CNP誘導体であるASB20123を用いて、CNP/NPR-Bシグナルを利用した医薬品開発を成功させるためには、ペプチド配列と用法用量の最適化が重要であることを示した。

第 2 節. 実験材料及び方法

第 1 項. 被験物質

α 型ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (α -type human atrial natriuretic peptide: α -hANP)、CNP-22 及び CNP 誘導体は大腸菌を用いた遺伝子組換え技術を用いて製造した。ヒト ghrelin は、既報 [58] に従い、固相合成法で製造した。我々はこれまでに複数の CNP/ghrelin キメラペプチドを製造し、in vitro での NPR-B 受容体活性、並びに in vivo での PK/pharmacodynamics (PK/PD) プロファイルを評価した [34]。その結果に基づき新規 CNP/ghrelin キメラペプチドである ASB20123 を設計した。ASB20123 は、CNP-22 に ghrelin (12-28) のアミノ酸を 1 つ置換したペプチドを結合した CNP/ghrelin キメラペプチドである。ASB20123 の分子量は 4183.9 であり、これは CNP-22 の分子量 (2197.6) の約 2 倍に相当する。CNP-22、ヒト ghrelin、ASB20123 のアミノ酸配列を Fig. 11 に示す。ペプチドの構造確認はエレクトロスプレーイオン化質量分析及びアミノ酸組成分析により確認した。本研究で使用したすべてのペプチドは高速液体クロマトグラフィー法で精製し、純度は 95%以上であった。

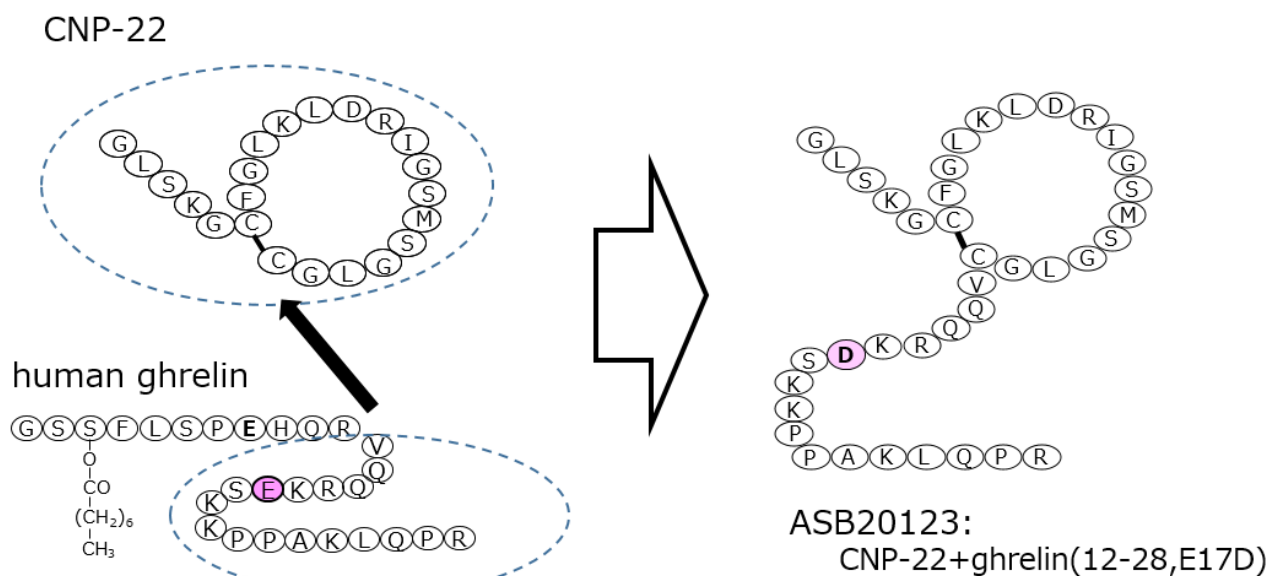


Fig 11. The amino acid sequences and structures of CNP-22, human ghrelin, and ASB20123.

CNP-22 is a 22-amino acid (AA) natriuretic peptide. ASB20123 is a 39-AA-designed chimeric natriuretic peptide composed of CNP-22 and the 17-AA C-terminal fragment of human ghrelin (12-28). It has a single amino acid exchange as CNP-22 + ghrelin (12-28, E17D).

第 2 項. 動物

本研究は、「アスピオファーマ株式会社 動物実験ガイドライン」に従い、アスピオファーマ株式会社の実験動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

Sprague Dawley (SD) ラット及び ICR マウスは日本チャールスリバー株式会社から購入した。動物の飼育条件は第 1 章 第 2 節 第 2 項と同様に実施した。

第 3 項. In vitro 受容体活性評価

ヒト NPR のアゴニスト活性は hNPR-A または hNPR-B を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (chinese hamster ovary: CHO) 細胞を用いてサイクリックグアノシンーリン酸 (cyclic guanosine

monophosphate: cGMP) を測定した [33, 59]。各被験物質または陰性対照としてリン酸バッファー (phosphate buffer saline: PBS) を細胞に添加し、15 分間インキュベートした。細胞を溶解し、市販の競合酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent assay: ELISA) キットである CatchPoint cGMP 蛍光アッセイキット (Molecular Devices Corporation) 及び FlexStation (Molecular Devices Corporation) を用いて細胞中の cGMP 濃度を測定した。成長ホルモン分泌促進物質受容体 (Growth Hormone Sequetagogue receptor: GHS-R) 1a のアゴニスト活性はラット型 GSH-R1a を安定発現させた CHO 細胞を用い、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化を、FRIPR Calcium 3 Assay kit (Molecular Devices Corporation) 及び FlexStationTM を用いて測定した [58, 60]。

第 4 項. ラットにおける PK 評価

7 週齢または 8 週齢の雄性 SD 系ラットを用いた。麻酔はペントバルビタールナトリウム (ネンブタール注射液、大日本住友製薬株式会社) 50 mg/kg 若しくはイナクチン水和物 (Sigma-Aldrich) 100 mg/kg を腹腔内投与した。生理食塩水にヘパリンナトリウム 100 U/mL を入れたカニューレを大腿動脈に挿入し、ラットに CNP-22 または ASB20123 を尾静脈内投与または背部皮下投与により 1 mL/kg で投与した。経時的にカニューレからアプロチニン (ウシ、ナカライテスク) とエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA-2Na、和光純薬工業株式会社) を含む試験管に血液を採取した。採血後 14,000×g、4°C で遠心分離し、血漿を採取した。CNP の 17 アミノ酸残基からなる環状構造に対する抗血清と [¹²⁵I]-標識[Tyr⁰]-CNP-22 をトレーサとして用いたラジオイムノアッセイにより血漿中の CNP 免疫反応性を測定した [34]。cGMP の血漿中濃度は、Yamasa cGMP アッセイキット (ヤマサ醤油株式会社) を用いてラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay: RIA) により測定した。

第 5 項. マウスの耳介軟骨における cGMP 産生評価

6 週齢の ICR 雄性マウス (4 または 5 例/群) に、CNP-22 は 1600 nmol/kg で、ASB20123 は 200 nmol/kg で皮下投与した。動物をイソフルラン (Mylan Inc.) で麻酔し、下大静脈から EDTA-2Na を

含む試験管に採血し、遠心分離して血漿を採取した。耳介の一部をサンプリングし、煮沸して cGMP 分解酵素を不活化した。耳介軟骨サンプルをトリミングにより他の組織から分離し、6%過塩素酸溶液（和光純薬工業株式会社）中でホモジナイズした。サンプルを遠心分離後、上清を一定量回収し、KOH 溶液で中和した。市販の EIA キット（Amersham cGMP 酵素免疫測定 Biotrak EIA System, GE Healthcare Company）を用いて、cGMP 濃度を測定した。

第 6 項. マウス及びラットを用いた in vivo 薬理試験

3 週齢の雌性 ICR マウス（5 または 10 例/群）に、ASB20123 を 8 週間反復皮下投与した。7 週齢の雄性 SD 系ラット（5 例/群）に、ASB20123 を皮下ボーラス投与若しくは浸透圧ミニポンプ（ALZET 浸透圧ポンプ、Durect Corporation）を用いて 1 週間若しくは 12 週間投与した。各動物の体重、体長（鼻先から肛門までの長さを測定）、及び尾長を投与及び休薬期間を通して週に 1 回測定し、剖検時に大腿骨及び脛骨の長さをデジタルノギスを用いて測定した。マウス血漿中のオステオカルシン濃度は市販の ELISA キット（Mouse Osteocalcin EIA キット、Biomedical Technologies Inc.）を用いて測定した。マウス血漿中の抗 ASB20123 抗体は市販の ELISA キット（Protein detector ELISA Kit, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.）及び ASB20123 を用いて測定した。投与期間終了時に後大静脈から採血し、遠心分離して血漿を採取した。ラット血漿中の CNP 免疫活性は、PK 試験と同様の方法で測定した。皮下ボーラス投与から 15 分後、または連続皮下注入した動物の剖検前に頸静脈から血液サンプルを採取した。

第 7 項. ラット成長板厚の測定

右下肢の大腿骨及び脛骨を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、10%ギ酸及び 10%中性緩衝ホルマリンの混合液中で 1 週間脱灰してパラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して組織標本を作製した。作製した組織標本を用いて、近位端及び遠位端の成長板厚を測定した。計測には顕微鏡下で撮影した画像を用いて各成長板を長軸方向に等間隔に、大腿骨近位端は 9 箇所、脛骨遠位端は 5 箇所測定し、それぞれの測定値の平均値を成長板厚とした。大腿骨遠位端及び脛骨近位

端は長軸方向の中央の 1 箇所を測定した。

第 8 項. 統計学的解析

得られた個別データをもとに平均値と標準偏差を算出した。

統計学的解析は、二元分散因子分析 (ANOVA) を行い、続いてポストホック解析として Dunnett test を行った。その際、 p 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意な差があると判断した。

第 3 節. 実験結果

第 1 項. ASB20123 の *in vitro* 受容体活性評価

ASB20123 の NPR-B に対するアゴニスト活性及びその特異性を評価した。Fig 12A 及び B は、ヒト NPR-A 及び NPR-B を安定発現させた CHO 細胞における各ペプチドの cGMP 産生活性を示した。CNP-22、CNP-22/ghrelin (12-28)、及び ASB20123 はヒト NPR-B を発現する CHO 細胞における cGMP 産生を用量依存的に増加させた。ASB20123 と内因性リガンドである CNP-22 の NPR-B アゴニスト活性はほぼ同等であった。また、CNP-22 及びその誘導体は NPR-A アゴニスト活性はみられなかった。また、いずれのペプチドにおいても ghrelin 受容体であるラットの GHS-R1a を発現する CHO 細胞において $[Ca^{2+}]_i$ を増大させなかった (Fig 2C)

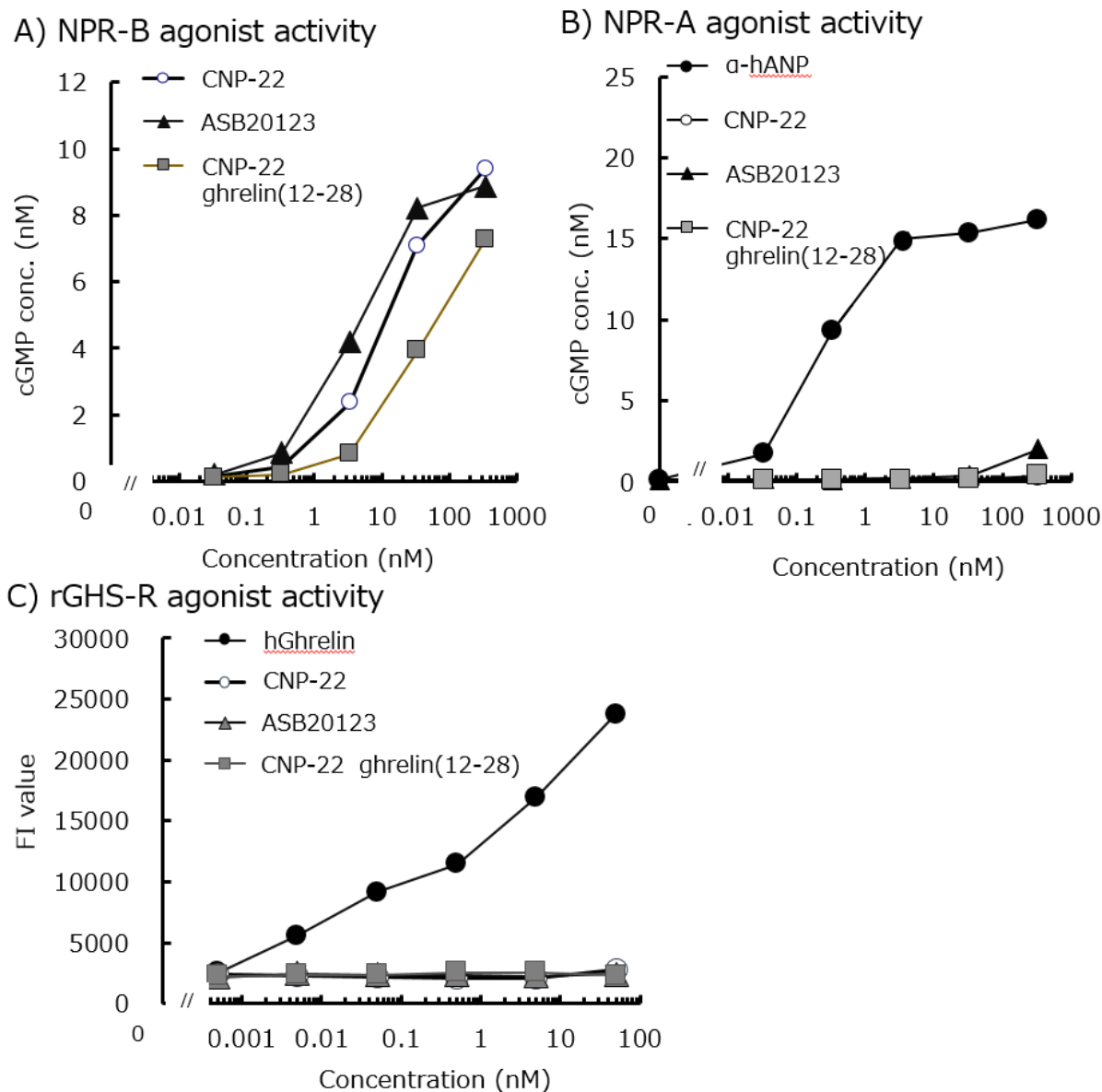


Fig 12. Receptor agonist activity of CNP and its derivatives.

(A) NPR-B agonist activity of CNP-22, CNP-22/ghrelin(12-28), and ASB20123 was evaluated based on cGMP production in CHO cells stably expressing human NPR-B. (B) NPR-A agonist activity of α -hANP, CNP-22, CNP-22/ghrelin (12-28), and ASB20123 was evaluated based on cGMP production in CHO cells stably expressing hNPR-A. (C) GHS-R agonist activity of human ghrelin, CNP-22, CNP-22/ghrelin (12-28), and ASB20123 based on the changes in $[Ca^{2+}]_i$ in CHO cells stably expressing rat GHS-R1a. Each value represents the mean of duplicate assays.

第2項. ラットにおける PK 評価

ラットにおける CNP-22 または ASB20123 の静脈内 (20 nmol/kg) 若しくは皮下 (50 nmol/kg) 投与後の CNP 免疫活性の血漿中濃度の結果を Fig 13A 及び C に示す。ASB20123 投与後の血漿中濃度一時間曲線下面積 (area under the curve: AUC) は、静脈内投与後で CNP-22 の 4 倍、皮下投与後で 6.8 倍高かった (Table 2)。これらの結果は ASB20123 が中性エンドペプチダーゼ (neutral endopeptidase: NEP) に対して抵抗性があり、クリアランスが遅いことを示している。また、ASB20123 の iv 投与後の定常状態分布容積 (Vdss) は CNP-22 よりも 6.7 倍大きく (Table 2)、セカンドメッセンジャーである血漿中 cGMP 濃度は皮下投与 180 分後においても生理的濃度よりも高いレベルに維持された (Fig 13B 及び D)。以上の結果から、ASB20123 は CNP-22 と比較して血中からの消失が遅く、より効率的に組織に到達することが示唆された。

Table 2. PK parameters of CNP immunoreactivity after a single iv or sc dose of CNP-22 or ASB20123 in rats.

A) Intravenous administration

Peptides	Dose (nmol/kg)	AUC _{0-∞} (pmol · min/mL)	MRT _{0-∞} (min)	T _{1/2} (min)	CL _{tot} (mL/min/kg)	Vd _{ss} (mL/kg)
CNP-22	20	320 ± 54	1.02 ± 0.18	1.42 ± 0.45	63.9 ± 11.9	64.2 ± 5.1
ASB20123		1281 ± 502	24.1 ± 2.6	31.3 ± 4.8	17.9 ± 8.9	429 ± 204

B) Subcutaneous administration

Peptides	Dose (nmol/kg)	Cmax (pmol/mL)	Tmax (min)	AUC _{0-∞} (pmol · min/mL)	MRT _{0-∞} (min)	T _{1/2} (min)	BA (%)
CNP-22	50	9.02 ± 3.74	5.0 ± 0.0	152 ± 73	13.9 ± 3.4	10.0 ± 5.0	19 ± 9
ASB20123		15.60 ± 0.95	20.0 ± 8.7	1037 ± 96	49.6 ± 6.0	32.1 ± 8.0	32 ± 3

PK parameters were calculated from the individual plasma CNP immunoreactivity-time PK parameters were calculated from the individual plasma CNP immunoreactivity-time curves after a single iv (A) or sc (B) dose of each peptide in anesthetized rats. Each value represents the mean ± SD of 3 rats. MRT=mean residence time, CL_{tot}=total clearance, T_{1/2}=half-life period, BA=bioavailability.

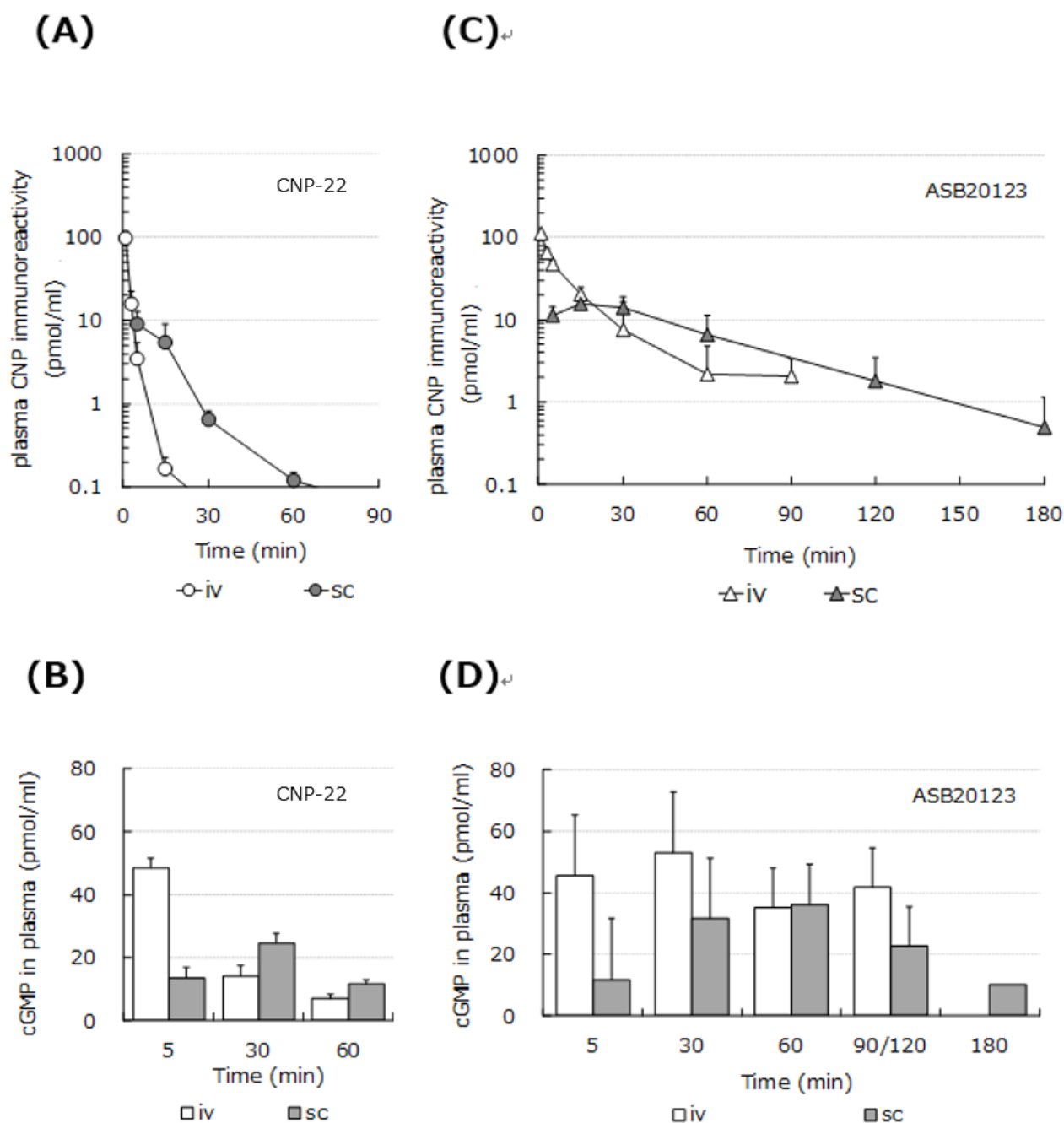


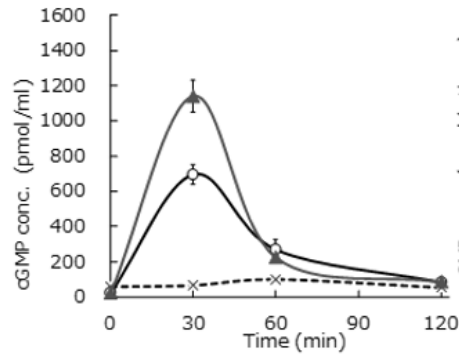
Fig 13. PK/PD profiles of CNP-22 and ASB20123 in rats.

Plasma CNP immunoreactivity-time curves (the upper panels) and cGMP concentrations (the lower panels) after a single iv (20 nmol/kg) or sc (50 nmol/kg) dose of CNP-22 (A, B) or ASB20123 (C, D) in anesthetized rats. Each value represents the mean \pm SD of 3 rats.

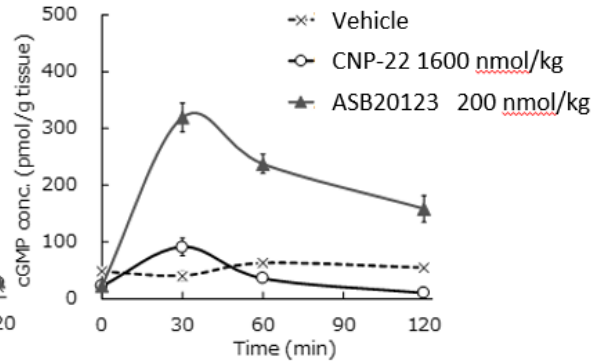
第3項. マウスの耳介軟骨における cGMP 産生評価

CNP-22 及び ASB20123 の軟骨組織への分布を検討するために、マウスに CNP-22 を 1600 nmol/kg で若しくは ASB20123 を 200 nmol/kg で皮下投与し、血漿及び耳介軟骨の cGMP 濃度を比較した。ASB20123 投与後、血漿及び耳介軟骨中の cGMP 濃度は CNP-22 投与後より明らかに高値を示した (Fig 14A 及び B)。また、ASB20123 投与後の耳介軟骨中の cGMP 濃度は、投与後 120 分の時点においても媒体群より高値であった。CNP-22 及び ASB20123 投与後の耳介軟骨中と血漿中の cGMP 濃度の相関を Fig 14C に示す。これらの結果は、天然型である CNP-22 と比較して ASB20123 が耳介軟骨において効率的、且つ長時間にわたって cGMP を産生することが可能であることを示している。

(A) Plasma



(B) Auricular cartilage



(C) Correlation between cGMP in plasma and auricular cartilage

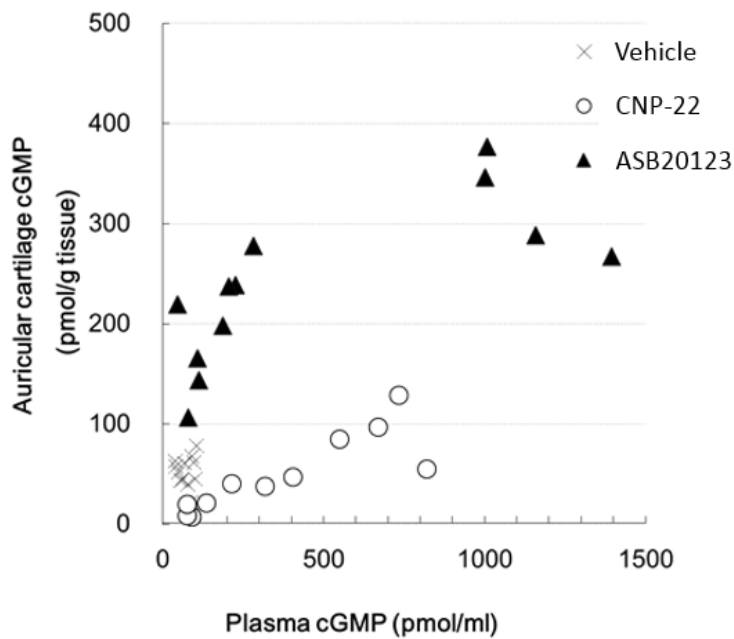


Fig 14. cGMP concentration-time curves in plasma and auricular cartilage after a single sc dose of CNP-22 or ASB20123 in mice.

Plasma (A) or auricular cartilage (B) cGMP concentration-time curves after a single sc dose of CNP-22 at 1600 nmol/kg or ASB20123 at 200 nmol/kg in mice. Correlation between cGMP concentrations in plasma and in auricular cartilage at each sampling point (C). Each value represents the mean \pm SD of 4 mice (A, B) or individual value (C).

第 4 項. 若齢のマウスを用いた ASB20123 の骨伸長促進作用

ASB20123 を 3 週齢の雌性 ICR マウスに 0、50、及び 200 nmol/kg/day の用量で、各群 10 例に 8 週間反復皮下投与した。ASB20123 の投与群の体長及び尾長は、対照群と比較して有意に高値であり、用量相関が認められた (Fig 15B、C、及び D)。また、骨形成マーカーである血漿中のオステオカルシン濃度は 200 nmol/kg/day 群において、対照群と比較して有意に高値であった (Table 3)。一方、体重には各群間に有意な差は認められなかった (Fig 15A)。休薬期間中、群間で体長及び尾長の伸長に有意差はなく (Fig 15B 及び C)、CNP の骨伸長促進作用は休薬により速やかに消失することが示唆された。なお、抗 ASB20123 抗体は、投与 8 週間及び休薬 4 週間後のいずれの時点においても ASB20123 を投与したすべてのマウスで検出されなかった (Table 4)。

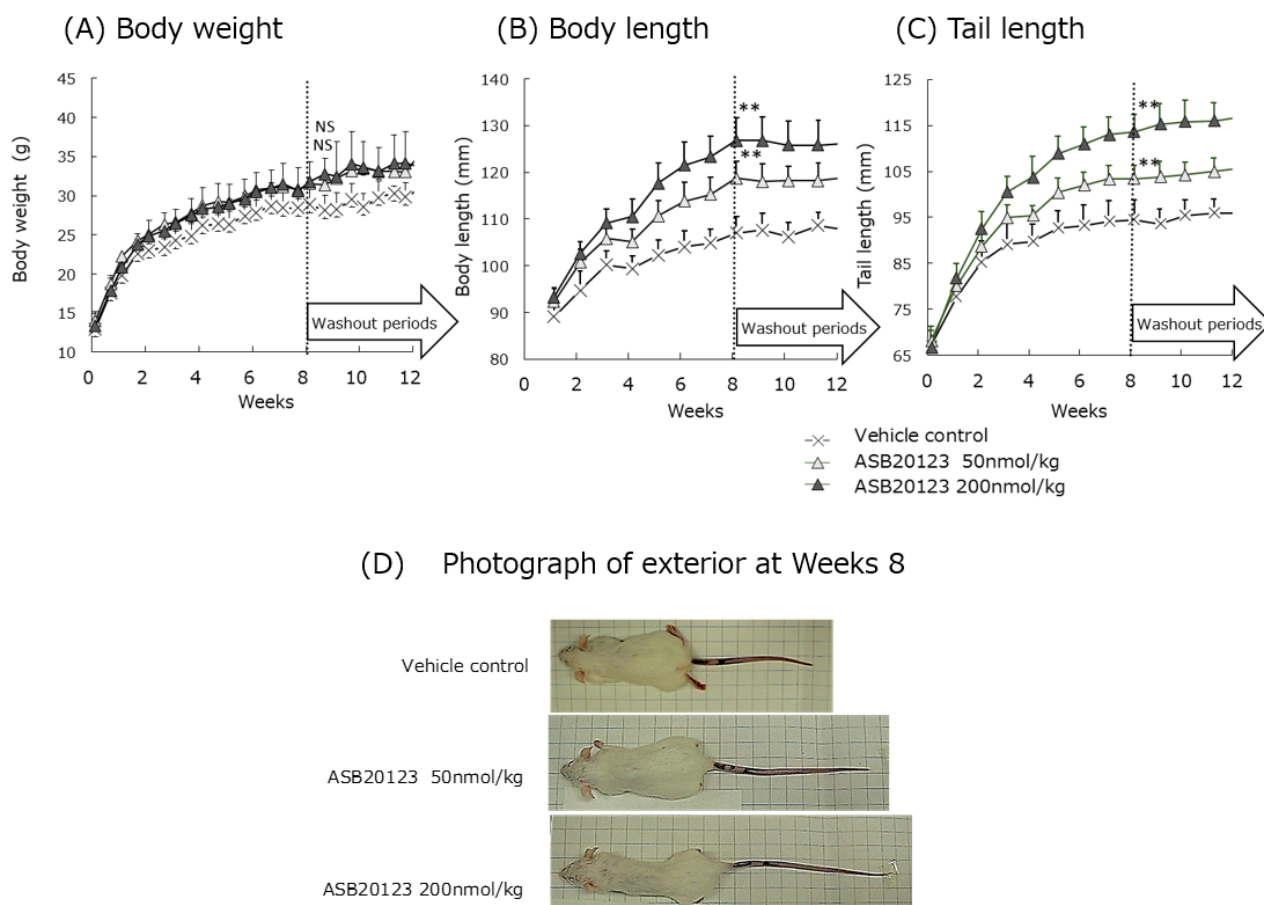


Fig 15. Growth curves of female juvenile ICR mice treated with ASB20123 sc during the 8 weeks of the dosing period and the 4 weeks of the washout period.

Body weight (A), body length (B) and tail length (C) data are shown in the upper panels, and the photographs in the lower panel represent the gross appearance of mice at Day 56 (D). Each value represents the mean \pm SD of 10 (for the dosing period) or 5 mice (for the washout period). NS: not significant ($p > 0.05$), *: significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group using Dunnett's test.

Table 3. Serum osteocalcin concentration of juvenile female ICR mice with multiple sc bolus injections of ASB20123 for 8 weeks.

Peptides	Dose (nmol/kg/day)	Serum osteocalcin conc. (ng/mL)
	0 (vehicle)	27.2 ± 8.2
ASB20123	50	33.5 ± 6.9 ^{NS}
	200	47.5 ± 13.2 ^{**}

Each value represents the mean ± SD of 5 mice. NS: not significant ($p > 0.05$), **: $p < 0.01$ compared to the control group using Dunnett's test.

Table 4. The specific antibody titer against ASB20123 in serum of juvenile female ICR mice received ASB20123 for 8 weeks, and after 4 weeks washout period.

Peptide	Dose (nmol/kg/day)	Treatment period (8 weeks)	Washout period (4 weeks)
	0 (vehicle)	0.124 ± 0.013	0.133 ± 0.030
ASB20123	50	0.170 ± 0.068 ^{NS}	0.141 ± 0.022 ^{NS}
	200	0.133 ± 0.011 ^{NS}	0.161 ± 0.039 ^{NS}

Absorbance values at 405 nm were represented as the anti- ASB20123 antibody titer. Each value represents the mean ± SD of 5 mice. NS: not significant ($p > 0.05$) to the control group using Dunnett's test.

第5項. ラットにおける ASB20123 の持続皮下投与の骨伸長作用

ASB20123 のラットにおける骨伸長作用について、持続皮下投与と反復皮下投与を比較した。ASB20123 を7週齢の雄性ラットに0、0.005、0.015、0.05、0.15、0.5 mg/kg/day (0、1.2、3.6、12、36、120 nmol/kg/day) の用量で7日間投与し、体長及び尾長を測定した (Table 5)。ASB20123 の持続皮下投与によって、0.15 及び 0.5 mg/kg/day の用量で体長及び尾長に有意な高値が認められたが、反復皮下投与では認められなかった。投与終了時の大腿骨及び脛骨における成長板厚を Fig 16 に、大腿骨近位端の成長板の組織像を Fig. 17 に示した。いずれの投与方法においても成長板は用量依存的に肥厚したが、同じ血漿中濃度 (C_{ss} または C_{max}) で比較した場合、持続皮下投与でより顕著な成長板の肥厚が認められた。

Table 5. Body measurements and growth rate in male rats receiving multiple sc bolus injections or continuous sc infusion of ASB20123 for 7 days.

(A) Subcutaneous bolus injections

Dose (mg/kg/day)	Weight or length on the final day			Growth rate		
	Body weight (g)	Body length (mm)	Tail length (mm)	Body weight (g/week)	Body length (mm/week)	Tail length (mm/week)
0 (vehicle)	317 ± 11	212.4 ± 6.4	201.6 ± 6.4	56 ± 3	12.6 ± 5.7	14.2 ± 2.6
0.005	315 ± 21 ^{NS}	209.6 ± 3.2 ^{NS}	197.0 ± 3.9 ^{NS}	49 ± 10 ^{NS}	13.6 ± 3.4 ^{NS}	11.4 ± 4.0 ^{NS}
0.015	315 ± 15 ^{NS}	212.8 ± 3.8 ^{NS}	208.0 ± 7.2 ^{NS}	50 ± 9 ^{NS}	11.6 ± 2.1 ^{NS}	12.4 ± 3.8 ^{NS}
0.05	317 ± 15 ^{NS}	211.8 ± 4.0 ^{NS}	205.2 ± 5.6 ^{NS}	53 ± 6 ^{NS}	11.4 ± 2.9 ^{NS}	14.2 ± 4.3 ^{NS}
0.15	322 ± 11 ^{NS}	215.4 ± 2.4 ^{NS}	201.4 ± 5.7 ^{NS}	58 ± 6 ^{NS}	14.8 ± 3.7 ^{NS}	9.6 ± 3.5 ^{NS}
0.5	316 ± 10 ^{NS}	210.4 ± 2.6 ^{NS}	206.8 ± 5.4 ^{NS}	48 ± 4 ^{NS}	11.6 ± 4.2 ^{NS}	12.0 ± 2.7 ^{NS}

(B) Subcutaneous infusion

Dose (mg/kg/day)	Weight or length on the final day			Growth rate		
	Body weight (g)	Body length (mm)	Tail length (mm)	Body weight (g/week)	Body length (mm/week)	Tail length (mm/week)
0 (vehicle)	333 ± 13	215.0 ± 3.5	205.4 ± 4.2	53 ± 7	8.4 ± 3.4	5.4 ± 3.6
0.005	337 ± 14 ^{NS}	221.0 ± 3.3 ^{NS}	211.6 ± 4.2 ^{NS}	53 ± 7 ^{NS}	13.2 ± 7.0 ^{NS}	6.4 ± 2.3 ^{NS}
0.015	328 ± 14 ^{NS}	219.6 ± 3.4 ^{NS}	207.2 ± 2.3 ^{NS}	48 ± 7 ^{NS}	11.0 ± 2.0 ^{NS}	5.4 ± 1.9 ^{NS}
0.05	329 ± 12 ^{NS}	219.8 ± 2.4 ^{NS}	208.8 ± 4.6 ^{NS}	49 ± 8 ^{NS}	14.6 ± 3.5 ^{NS}	6.2 ± 3.3 ^{NS}
0.15	343 ± 4 ^{NS}	222.8 ± 4.5*	210.3 ± 6.1 ^{NS}	59 ± 3 ^{NS}	16.5 ± 4.4*	10.0 ± 2.0 ^{NS}
0.5	330 ± 22 ^{NS}	226.4 ± 4.6**	215.6 ± 1.8**	48 ± 20 ^{NS}	22.2 ± 4.0**	11.0 ± 4.7*

Each value represents the mean ± SD of 4 or 5 rats. NS: not significant ($p > 0.05$), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared to the control group using Dunnett's test.

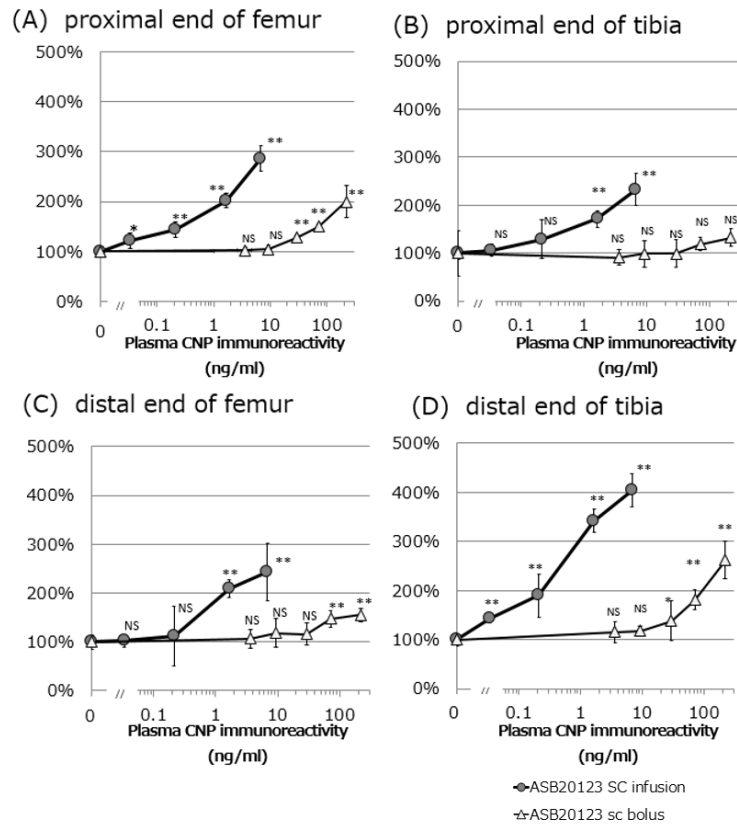


Fig 16. Correlation between plasma CNP immunoreactivity and growth plate thickness of lower limbs [proximal ends of femur (A) and tibia (B), and distal ends of femur (C) and tibia (D)] in rats after sc bolus injections or infusion of ASB20123 at 0, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, and 0.5 mg/kg/day for 7 days.

Each value represents the mean \pm SD of 4 or 5 rats. The horizontal axis indicates the mean plasma CNP immunoreactivity concentration at 15 min after the 1st dose for the sc bolus injection groups or mean plasma CNP immunoreactivity on the 2nd day for the sc infusion groups. The vertical axis indicates the mean percentage of growth plate thickness compared to the respective control groups. The growth plate was measured at nine sites for the proximal end of the femur and five sites for the distal end of the tibia. The growth plate thickness of the other end of the femur (distal) or tibia (proximal) was measured at one site of the central of the growth plate. Plasma CNP immunoreactivity after sc infusion of ASB20123 at 0.005 mg/kg/day was not detected.

NS: not significant ($p > 0.05$), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared to the control group (0 mg/kg/day) using Dunnett's test (logarithm conversion)

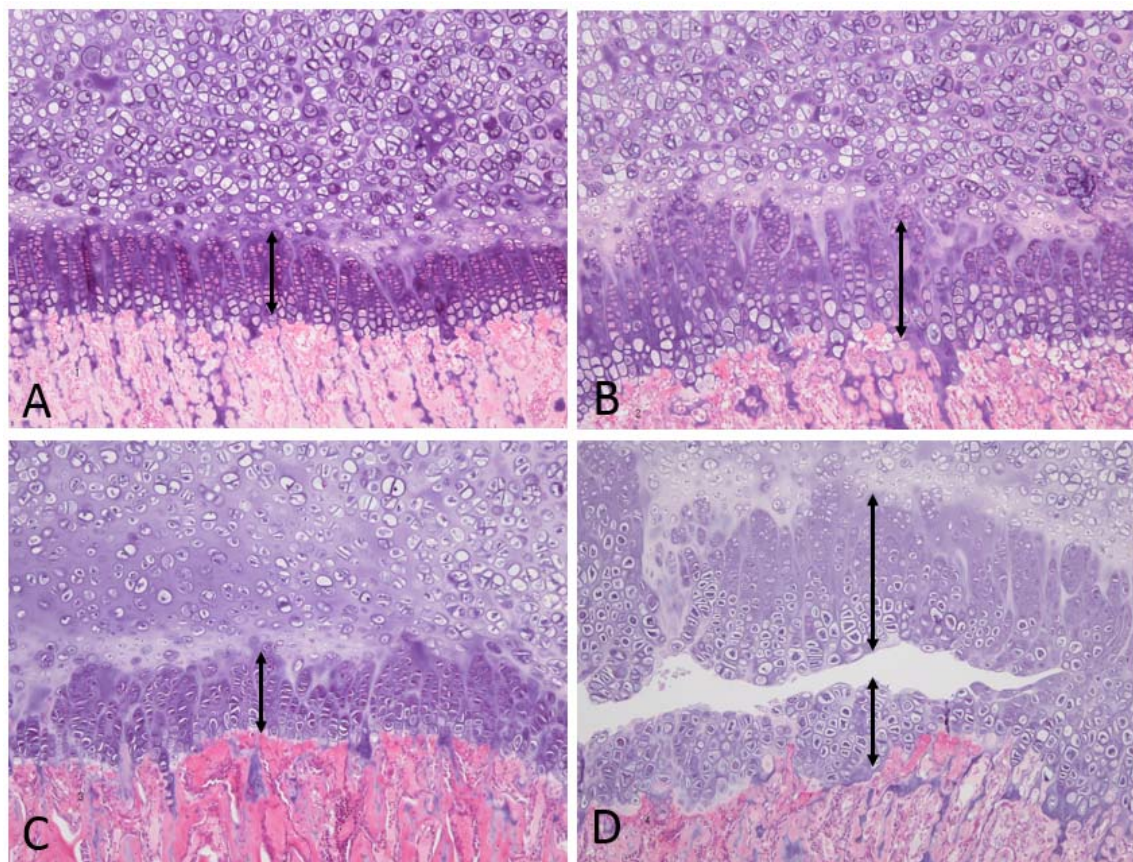


Fig 17. Representative histological findings of growth plate in the proximal femoral bone in rats after sc bolus injections or infusion of ASB20123 at 0 and 0.5 mg/kg/day for 7 days.

(A) Vehicle group after sc bolus injection. (B) 0.5 mg/kg/day group after sc bolus injection. (C) Vehicle group after sc infusion. (D) 0.5 mg/kg/day group after sc infusion.

Bidirectional arrows indicate the width of the epiphyseal plate.

第6項. ラットにおける ASB20123 の長期投与による骨伸長作用

7週齢のSD系雄性ラットを用いてASB20123の持続皮下投与による長期投与による薬理試験を実施した。ASB20123を0、0.05、及び0.15 mg/kg/day (0、12、及び36 nmol/kg/day) で12週間、各群5例のラットに浸透圧ポンプを用いて投与した。投与期間中における体長の増加率をFig 18Aに示した。投与終了時の体長は有意に伸長し、用量相関が認められた。対照群、0.05及び0.15 mg/kg/day投与群の成長速度は、それぞれ 57.2 ± 3.6 、 70.0 ± 5.0 及び 87.8 ± 6.2 mm/12-weekであった。高用量群 (0.15 mg/kg/day) において、脊椎及び尾椎に異常な彎曲が認められ (Fig 18B)、この変化はASB20123の過剰投与による過成長が原因と考えられた。

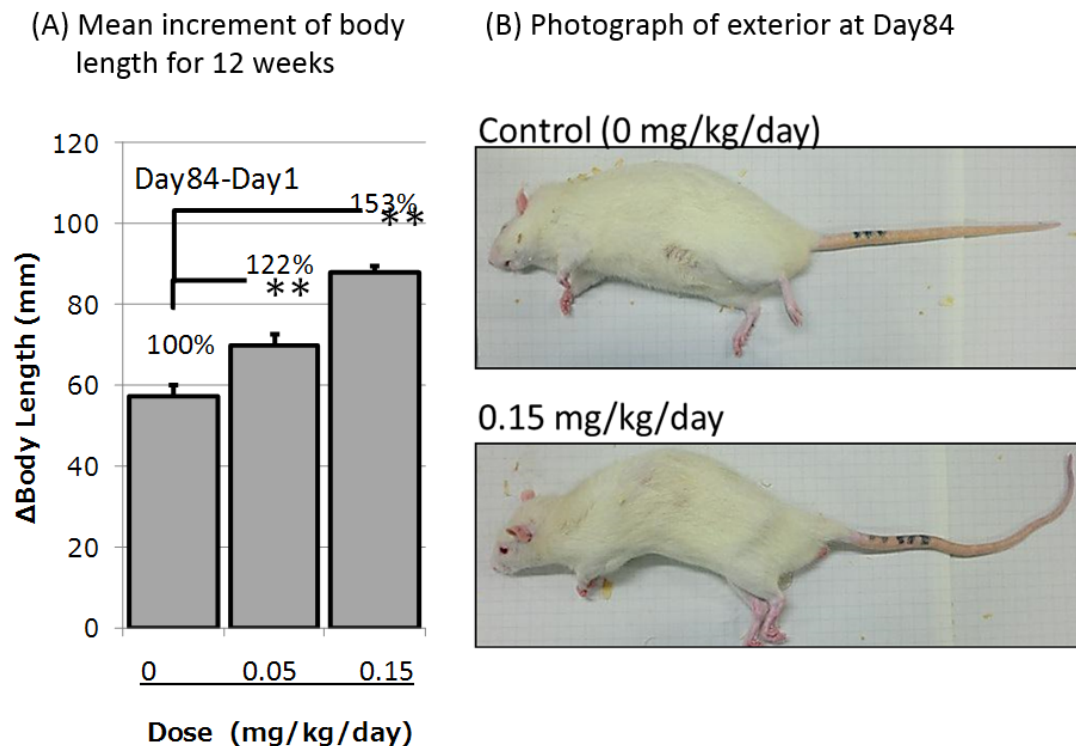


Fig 18. Increase in body length of male rats receiving sc infusion of ASB20123 at 0.05 and 0.15 mg/kg/day for 12 weeks.

Each value represents the mean \pm SD of 4 or 5 rats, **: significant ($p < 0.01$) compared to the control group using Dunnett's test. (A) Mean increase in body length after 12 weeks (84 days). (B) Photographs of the exterior appearance on day 84.

第 7 項. ラットにおける CNP-22 及び ASB20123 の血漿中濃度推移に対する細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の影響

CNP-22 及び ASB20123 を ECM 含有溶媒に溶解してラットに 0.58 mg/kg の用量で皮下投与し、血漿中濃度推移を比較した (Fig 19)。ASB20123 を 1%HA 溶液 (ARTZ 関節内注射液 25mg、Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) 若しくは 10%硫酸化グリコサミノグリカン溶液 (extracted from bovine tracheal cartilage, Adequan, Luitpold Pharmaceuticals) を媒体とした場合、生理食塩水を媒体とした場合と比較して、最高血中濃度到達時間と AUC の増加が認められた。この結果から、ASB20123 は ECM 中での安定性及び保持性が改善したものと考えられた。

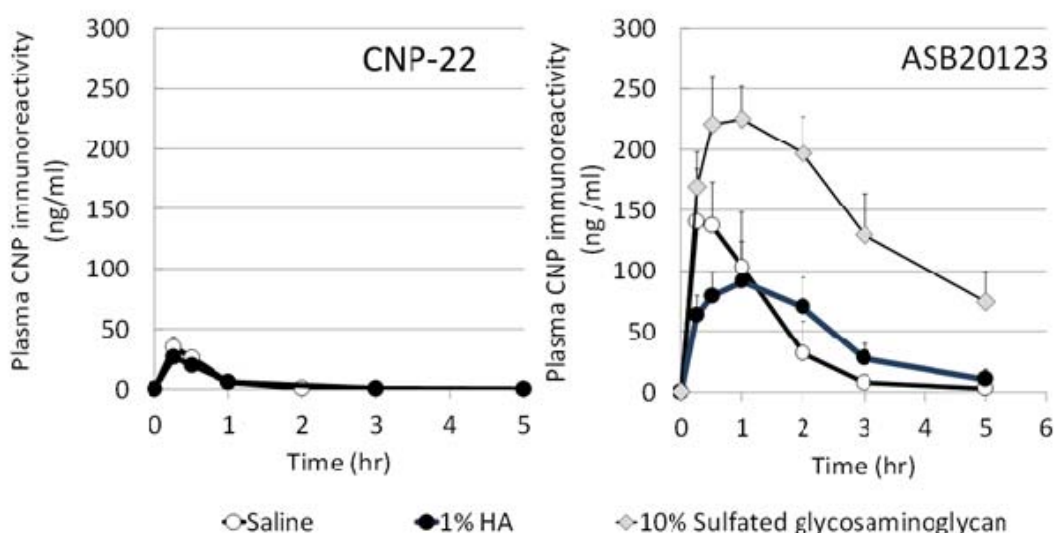


Fig 19. CNP immunoreactivity in rat plasma after a single sc administration of CNP-22 or ASB20123 dissolved in various liquid mixtures

Seven-week-old male SD rats (n = 3 or 4/group) received sc bolus injections of CNP-22 or ASB20123 at 0.58 mg/kg. After designated period, a small amount of blood was collected. CNP immunoreactivity level in plasma was determined by RIA.

第4節. 考察

本章では、CNP/ghrelin キメラペプチドである ASB20123 の薬理活性を評価した。ASB20123 は、全長 22 アミノ酸のヒト CNP-22 及び 1 つのアミノ酸置換を有するヒト ghrelin の C 末端領域で構成され、天然型 CNP と同等の受容体特異性と親和性を有する NPR-B アゴニストである。生体内での代謝安定性が向上しており、ラットにおける PK プロファイルを CNP-22 と比較すると、血漿中からの消失半減期が延長し、AUC の有意な増加を示した。内因性 CNP は作用部位の近傍で発現・分泌するオートクリンまたはパラクリン物質と考えられており、血漿中における内因性 CNP 濃度は極めて低く、天然型の CNP-22 を投与しても速やかに消失してしまうために、医薬品として開発することは困難と考えられてきた。本試験では、ASB20123 を正常ラット及びマウスに反復皮下投与することで用量依存的な骨伸長促進作用を示した。CNP/NPR-B シグナルを介した骨伸長作用は、CNP 誘導体である BMN-111 の報告があり、*Fgfr3^{ach}* マウス [45] やクルーゾン症候群のモデルマウス [61] において骨伸長を促進し、軟骨無形成症の治療薬として臨床試験が実施されている。

ラットに同量の ASB20123 を投与したときの骨伸長促進作用は、反復皮下投与と比較して持続皮下投与においてより強く、1 週間という短い期間で骨長を有意に増加させることができた。これは、ASB20123 の骨伸長促進作用を発現させるには、高い血漿中濃度を必要とせず、低濃度でも持続的に作用させることが有効であることを示唆する結果である。

CNP は、同じナトリウム利尿ペプチドファミリーである ANP または BNP とは受容体とその分布が異なるために、循環器系に及ぼす影響が比較的弱いと考えられている。しかし、CNP を肝臓特異的に発現させ、血中の CNP を上昇させたトランスジェニックマウスにおいて、収縮期血圧の変化を伴わずに過成長の表現型を示す個体がみられる一方で、一部の CNP の発現量が高いマウスは、WT の同腹仔と比較して収縮期血圧の有意な減少を示すことが報告されている [10]。このことは、CNP の投薬においても、低血圧に代表的される循環器系の副作用の発症リスクを伴うことを示唆する [62]。実際、CNP 誘導体である BMN-111 の臨床的試験においても、一部の被験者で有意な低血

圧が発症することが報告されており、臨床最大投与可能用量を制限する要因の一つとなっている [63, 64]。一般的に、発育不全の小児患者を対象とした治療は、長期にわたることから、在宅による自己投与の可能性も想定され、患者の健康状態などの影響で副作用の発生リスクが増大する可能性を含めて十分な手当が必要になる [64]。このような観点からも、ASB20123 の持続投与は効果的な骨伸長作用を示し、低血圧のような循環器系の副作用の発生リスクを低減させるために有効な投与方法であると考えている。

ASB20123 の 0.05 mg/kg/day を 7 日間 持続皮下投与したところ、成長板厚は有意に肥厚したが、体長に有意な伸長は認められなかった。一方、同じ投与用量を 12 週間投与することによって体長は有意に増加し、より高用量である 0.15 mg/kg/day 投与群では脊椎及び尾椎に異常な彎曲が認められ、過成長に伴う変化と考えられた。成長期の小児の成長速度は、年齢、性別、遺伝的な要因、その他で異なり、個々の患者に期待される成長速度も異なる。また、小児の身長を正確に測定し、その伸びを指標として短期間で各患者に対する適切な用量を設定することは困難と予想される。本研究で薬効の指標とした成長板厚は、臨床でも X 線検査、コンピュータ断層撮影法若しくは磁気共鳴画像法を用いてモニターできることから [65, 66]、投薬前後の成長板厚の変化を指標に有効用量を評価することも可能であると考えられ、良好なサロゲートマーカーとなり得ると考える。

本検討で ASB20123 の皮下投与後のマウス耳介軟骨における cGMP 濃度は、CNP-22 投与後よりも高く、ASB20123 は標的である軟骨組織に対して優れた親和性を持つことが示された。成長期の子供の長管骨の骨端部にある成長板は、軟骨細胞とそれを取り囲む細胞外マトリクスからなる層状の軟骨組織である。成長板には、血管、神経、リンパ管の侵入が認められない為に、薬剤、酸素及び組織維持に必須の栄養素の供給は、近隣組織の血管からの受動拡散に依存している。すなわち、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の構造及び性質が成長板の特性に大きく影響している [67]。ECM は主にプロテオグリカン、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid: HA)、コラーゲンからなる [68]。本検討で ASB20123 は、骨伸長において CNP-22 よりも効率的に作用したが、この要因としては、生体内での代謝抵抗性が向上したこと、血漿中での消失半減期が延長したことで移行に十

分な時間が確保されたことのみでなく、塩基性アミノ酸を多く含む ghrelin の C 末側の構造を CNP に付加することで、負電荷を帯びた軟骨組織内の細胞外マトリクス成分との親和性が向上し、作用局所へのペプチドの移行性と局所での滞留性が改善されたのではないかと推察している。Ghrelin の C 末端部分は BX7B モチーフを含み、「B」は塩基性アミノ酸（アルギニンまたはリジン）を、「X」は任意の非酸性アミノ酸を表す [69]。BX7B モチーフのような塩基性アミノ酸のクラスターは HA と分子間相互作用により結合する。特に、HA は、極親水性を有し、粘弾性多孔質の網目構造を形成することから、ASB20123 の保持性を向上させることによって、細胞表面受容体若しくはタンパク質との相互作用を介した細胞増殖及び遊走を促進すると考えられた [70, 71]。

上記の考察を裏付ける傍証として、CNP-22 及び ASB20123 を ECM 含有溶媒に溶解してラットに皮下投与し血漿中濃度を比較したところ、ECM 含有溶媒を用いることにより ASB20123 の血漿中濃度は生理食塩水を媒体とした場合と比較して、最高血中濃度到達時間と AUC の増加が認められた。この結果から、ASB20123 は ECM 中での安定性及び保持性が改善したものと推定している。HA やグリコサミノグリカンなどの高分子の中における拡散は、分子サイズ、電荷、親水性などの物理化学的特性、及び間質における構成成分との相互作用によって影響を受ける [72]。ASB20123 とは対照的に、CNP-22 の PK プロファイルは HA、グリコサミノグリカンのいずれの媒体においても血中濃度推移に差は認められなかった。興味深いことに、CNP-53 の N 末端部分も ASB20123 の C 末端部分と同様に BX7B モチーフが存在し (Fig 20)、マウスでの検討において CNP-53 は、CNP-22 と比較して、より強い骨伸張作用を誘導した (Fig 21)。

NPR-B の内因性リガンドである CNP は、脳 [73]、培養ヒト大動脈内皮細胞 [74]、及びラット腎臓 [75]を含む様々な組織において主に CNP-53 として存在している。CNP-53 は NEP による分解抵抗性を有するが、血漿中ではほとんど検出されず、軟骨内骨化のオートクリン／パラクリン因子として作用すると考えられている。ASB20123 は、ghrelin の C 末端部分 (1 塩基置換) を CNP-22 に付加することで塩基性アミノ酸残基数が 6 個増加する。ペプチド中の正に荷電した残基数は、ECM 中の負に荷電したプロテオグリカンに対する親和性に関与すると考えられる。骨の成長を促

進するためには長期にわたって CNP が作用し続ける必要があるが、成長板軟骨には血管がないため、外因性 CNP を用いた治療にとって、ECM を介した血液から軟骨細胞への輸送が重要であり、治療効果の律速となっている可能性が考えられる [76]。そのため、成長板への分布効率の改善し、徐放製剤化による長期間投与によって、骨伸長作用を最大限に高めることができると考えている。

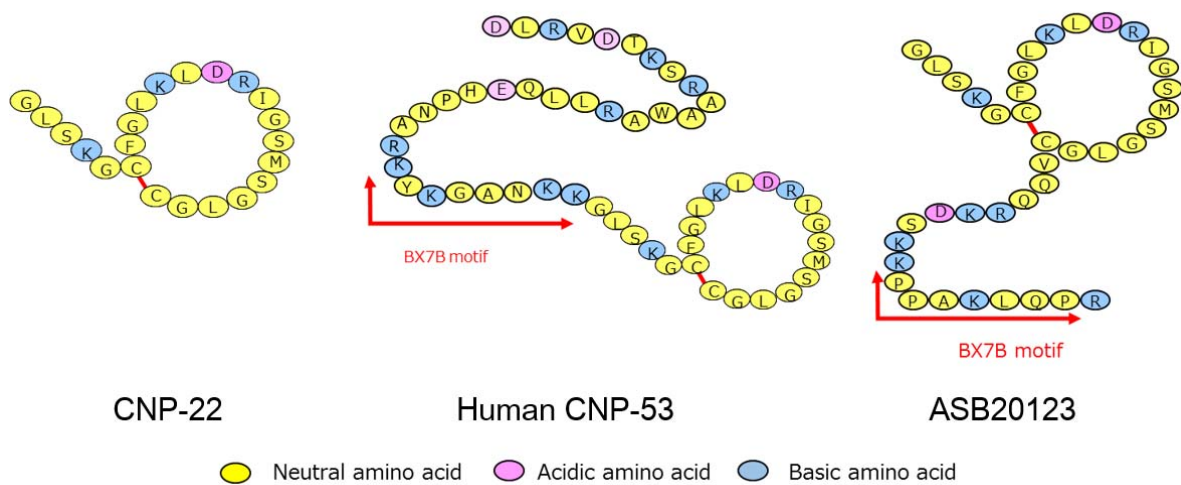


Fig 20. Amino acids sequences of CNP-22, human CNP-53 and ASB20123

Yellow circles indicate neutral amino acids, pink circles indicate acidic amino acids, and blue circles indicate basic amino acids. The red arrow indicates the BX7B motif that also can bind to the glycosaminoglycan hyaluronan, where “B” represents arginine or lysine, and “X” represents any non-acidic amino acid. CNP-53 and ASB20123 include BX7X motif, but CNP-22 doesn’t.

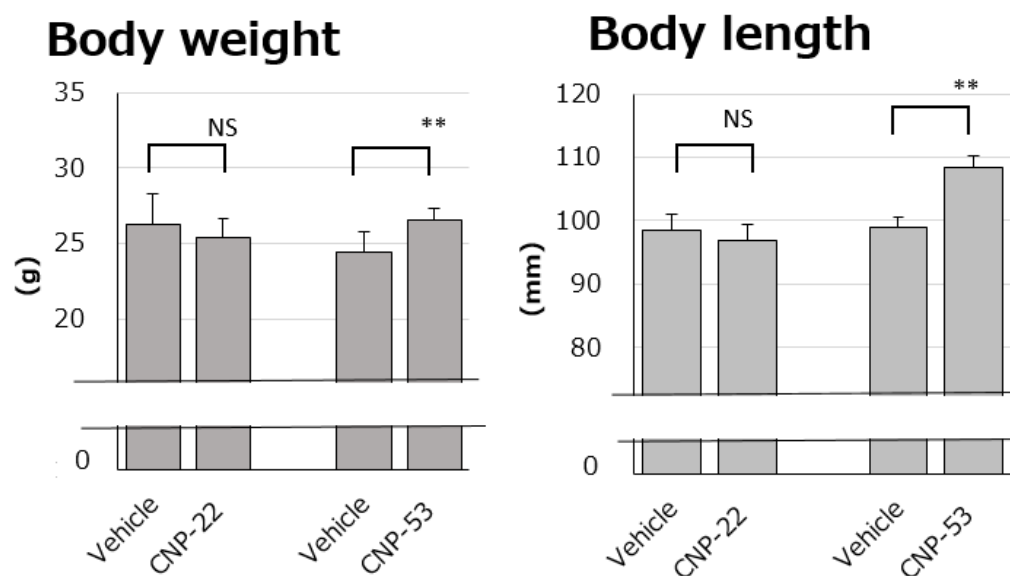


Fig 21. Body weight and body length of female ICR mice subcutaneously administered CNP(1-22) and human CNP(1-53) for 3 weeks

Three-weeks-old ICR female mice (n = 5 or 10 /group) received sc bolus injections of CNP(1-22) (186 nmol/time/kg, bis in die) or human CNP(1-53) (100 nmol/day/kg, quaque die) for 3 weeks. Body weight and body length were measured on the day after the final dosing. Each value represents the mean + SD of 5 or 10 mice. NS : not significant ($p > 0.05$), **: significant ($p < 0.01$) with Student's t test (vs vehicle group)

第 5 節. 小括

本章では、新規 CNP 誘導体である ASB20123 の薬効を評価した。ASB20123 は特異的な NPR-B アゴニスト活性を有しており、ラットやマウスに反復皮下投与することによって用量依存的な骨伸長促進作用を示したことから、軟骨無形成症などの低身長症に対して有効な治療効果を有すると考えられた。また、反復皮下投与と比較して持続皮下投与で、より強力な薬理作用を示した。更に、持続皮下投与は低血圧のリスクを低減することにも寄与すると考える。このような薬理学的アプローチは、広い安全域を確保しつつ、強力な薬効を発揮するために有効な方法であると考えている。

第3章 新規C型ナトリウム利尿ペプチド誘導体：ASB20123の安全性評価

第1節. 緒言

C型ナトリウム利尿ペプチド（C-type natriuretic peptide: CNP）は主に脳、腎臓、骨、赤血球、血管、心臓で産生される [77]。その受容体であるナトリウム利尿ペプチド受容体（natriuretic peptide receptor: NPR）-B は脳、肺、骨、心臓、卵巣において、特に線維芽細胞及び血管平滑筋細胞において比較的高発現している [78]。一方、CNP 誘導体の毒性学的プロファイルはこれまで報告されていない。本章では、ASB20123 の毒性学的プロファイルを評価した。さらに、骨・軟骨毒性と成長板の形態学的変化との関係、及び毒性を検出するためのバイオマーカーを研究した。

第2節. 実験材料及び実験方法

第1項. 被験物質

ASB20123 及び媒体は第2章 第2節 第1項に記載したものと同様のものを使用した。

第2項. 動物

本研究は、アスビオファーマ株式会社若しくは株式会社 LSI メディエンスの動物実験ガイドラインに従い、各施設の動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

Sprague Dawley (SD) ラットは日本チャールスリバー株式会社から購入した。動物の飼育条件は第1章 第2節 第2項と同様に実施した。

第3項. 実験系

1. 一般毒性試験 (Study 1)

7週齢の雌雄各20例のラットを、各群雌雄5例ずつ計4群に無作為に群分けした。投与量は0、0.5、1.5、及び5.0 mg/kg/day とした。対照群は媒体を投与した。投与容量は1 mL/kg とし、直近の体重から

各個体の投与量を算出した。各群の投与液をディスポーザブルシリンジ及び注射針（テルモ株式会社）を用いて背側皮下に投与した。投与量は第2章において、ASB20123の0.15 mg/kg/dayを12週間持続皮下投与した際にラットの過剰成長がみられたことから、その約30倍である5.0 mg/kg/dayを高用量として設定した。

2. 機序検討試験（Study 2）

12ヵ月齢の雌雄各15例のラットを、各群雌雄5例ずつ計3群に無作為に群分けした。投与量は0、0.5及び5.0 mg/kg/dayとした。その他の操作はstudy 1と同様に実施した。

3. バイオマーカー検討及び回復性試験（Study 3）

7週齢の雄性ラット40匹を、各群5例ずつ無作為に群分けした。バイオマーカー検討では0、0.005、0.05、0.5、及び5.0 mg/kg/dayの5群、13週間の回復性試験では0、0.5、及び5.0 mg/kg/dayの3群を設定した。その他の操作はstudy 1と同様に実施した。

第4項. 観察・検査項目

Study 1では、一般状態観察、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液化学検査、alkaline phosphatase（ALP）isozymes、osteocalcin、体長、骨密度（bone mineral density: BMD）、臓器重量、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。Study 2及び3では、一般状態観察、体重、体長、大腿骨骨長、BMD、剖検、大腿骨及び脛骨の病理組織検査を実施した。

1. 一般状態観察

投与期間中及び回復期間中は1日1回以上観察し、生死の確認及び外観から動物の全身状態を観察した。

2. 血液化学検査

剖検時に血液を採取して、 $1870 \times g$ で 10 分間遠心分離して血清を得た。Total protein、albumin、A/G ratio、total bilirubin、aspartate aminotransferase、alanine aminotransferase、gamma glutamyltranspeptidase、alkaline phosphatase、lactate dehydrogenase、creatine phosphokinase (CPK)、total cholesterol、triglycerides、phospholipids、glucose、blood urea nitrogen、creatinine、inorganic phosphorus、及び calcium は生化学自動分析装置（日立 7170、株式会社日立製作所）を用いて、sodium、potassium、及び chloride は電解質分析装置（EA07、A&T 株式会社）を用いて測定した。

3. ALP isozymes 及び osteocalcin

血液生化学検査用に採取した残りの血清サンプルを ALP isozymes 及び osteocalcin の測定に用いた。ALP isozymes の測定には、自動電気泳動システム（Epalyzer 2, Helena Laboratories Co., Ltd.）を用いた。Osteocalcin の測定には、ラット osteocalcin IRMA キット（Immutopics, International, LLC, USA）を用いて免疫放射測定法を適用した。

4. 体長及び大腿骨長の測定

体長はノギスを用いて、各ラットの鼻先から肛門までの長さを測定した。大腿骨長はデジタルノギスを用いて、剖検時に採取した大腿骨（左側）を測定した。

5. 大腿骨骨密度

剖検時に採取した大腿骨（左側）の骨密度（皮質骨及び海綿骨）について、実験動物用 X 線 CT 装置 ラシータ（Latheta LCT-200; 日立アロカメディカル株式会社）を用いて測定した。

6. 病理組織学的検査

剖検した全例の検体を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。パラフィン包埋・薄切後、ヘマトキシ

リン・エオジン染色を施して病理組織標本を作製し、鏡検した。大腿骨及び頸骨の標本作製方法及び成長板厚の測定は、第2章 第2節 第7項と同様に実施した。

第5項. 統計学的解析

対照群と ASB20123 投与群との間で Bartlett の方法により分散の均一性について検定を行い、等分散の場合は Dunnett test、等分散でない場合は Steel test を行った。その際、 p 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意な差があると判断した。

第 3 節. 実験結果

第 1 項. ASB20123 の毒性プロファイル

ASB20123 をラットに 0、0.5、1.5、及び 5.0 mg/kg/day で 4 週間反復皮下投与し、その毒性プロファイルを検討した。一般状態観察では、全 ASB20123 投与群において、投与 3 週以降に後肢反転を伴う歩行異常が認められ、歩行異常が認められた動物数は用量依存的に増加した。また、大腿骨の皮質骨及び海綿骨の BMD 値は、全 ASB20123 投与群において対照群と比較して有意に低値であった (Fig 22)。

組織学的検査の結果を Table 6 に、大腿骨の近位端における組織像を Fig 23 に示した。ASB20123 に関連した変化は、骨・軟骨組織でのみ観察された。全 ASB20123 投与群において大腿骨の近位端と遠位端の両方の成長板に肥厚が認められ、近位端でより肥厚しており、一次骨及び骨芽細胞の増加を伴っていた。また、大腿骨近位端では骨端・骨幹端の壊死、骨頭部の骨髄の線維化、異所性骨／軟骨形成が認められた。脛骨でも全 ASB20123 投与群において成長板の肥厚及び一次骨の増加が認められ、遠位端でより強く、高頻度に認められた。また、近位端及び遠位端の骨芽細胞の増加、遠位端の骨端／骨幹端の壊死、及び周辺組織の炎症性の変化が認められた。

体長、CPK 活性、ALP 活性、ALP isozyme、及び osteocalcin の値を Fig 24 に示した。体長は雄の 5.0 mg/kg/day 群、雌の 0.5 mg/kg/day 以上の群で対照群と比較して有意に高値であった。CPK 活性は全 ASB20123 投与群で有意に高値、若しくは高値傾向を示した。ALP 活性は、雄の 1.5 及び 5.0 mg/kg/day 群で有意に高値であり、雄の 0.5 mg/kg/day 群、並びに雌の 1.5 及び 5.0 mg/kg/day においても高値傾向を示した。ALP isozyme fraction 3 は、雌雄の 5.0 mg/kg/day 群で、対照群と比較して有意に高値であり、雄の 0.5 及び 1.5 mg/kg/day 群、並びに雌の 1.5 mg/kg/day 群でも同様の傾向が認められた。その他の血液化学検査項目及び osteocalcin については、いずれの群においても対照群と比較して差は認められなかった。

その他、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、剖検、臓器重量に ASB20123 投与に関連する変化は認められなかった。

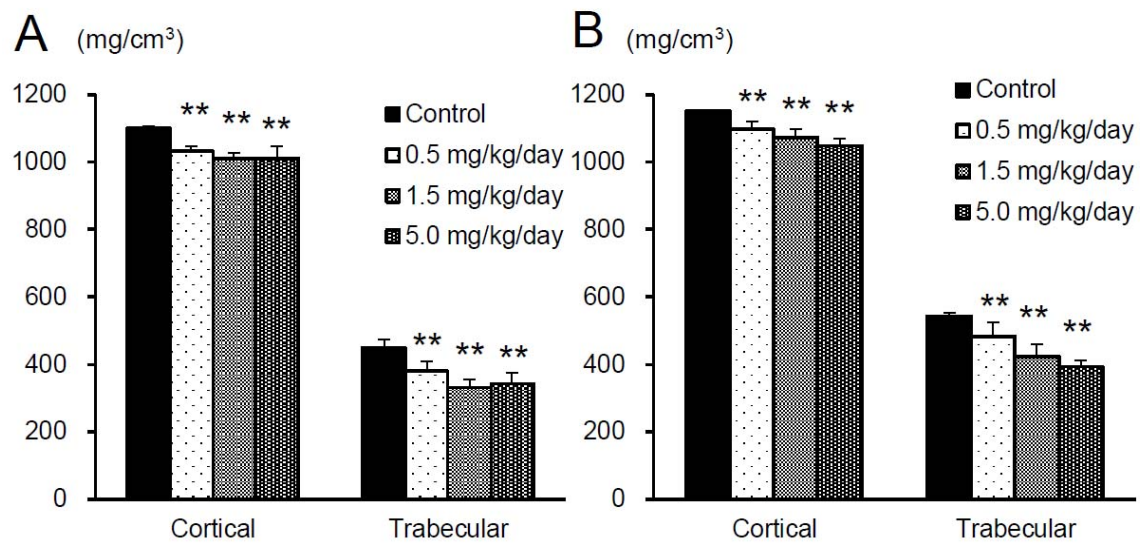


Fig 22. BMD of both the cortical and trabecular bone in the femurs of male (A) and female (B) rats treated subcutaneously with ASB20123 for 4 weeks in study 1.

Each value represents the mean \pm SD of 5 rats, ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated group by Dunnett's multiple comparison test.

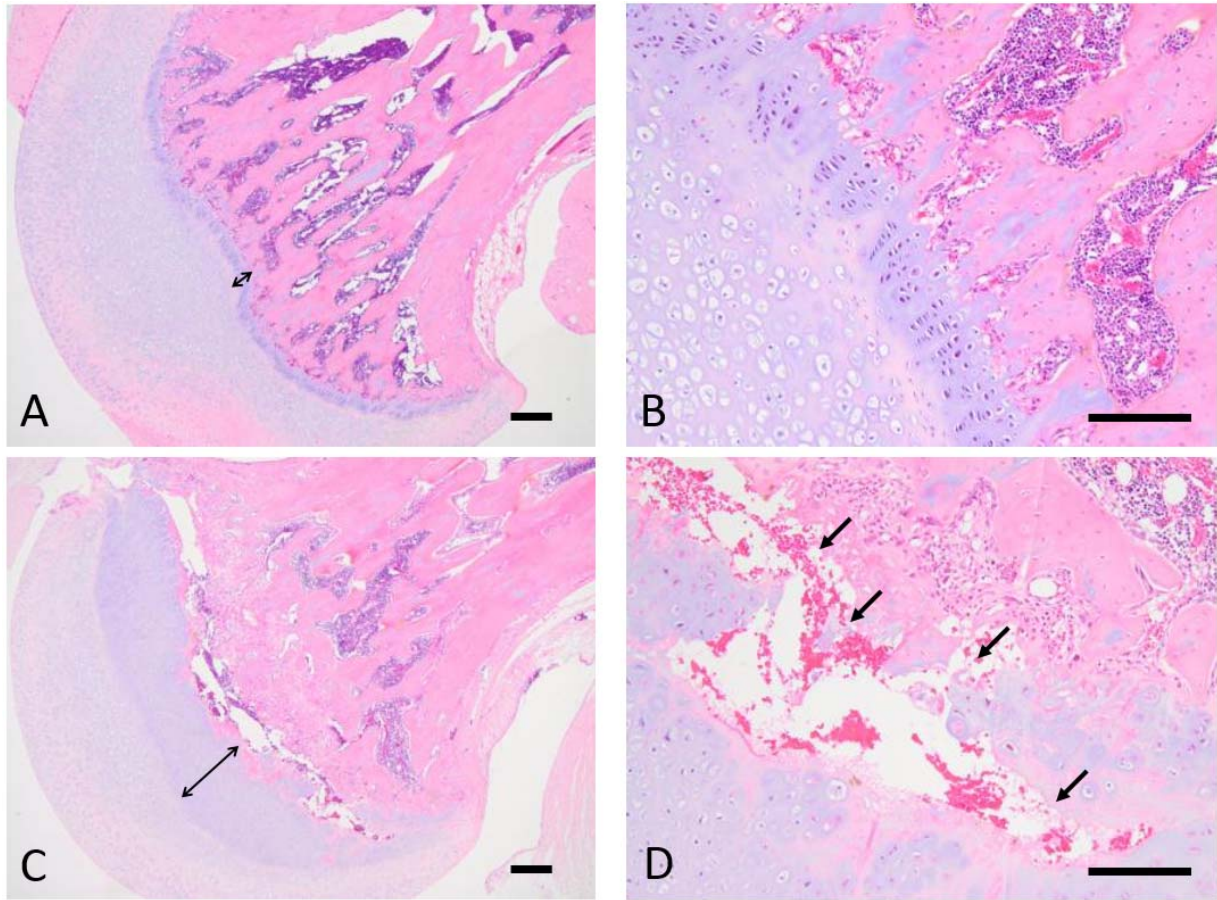


Fig 23. Representative histopathological findings in the proximal femoral bone in rats in study 1.

(A) Vehicle group (× 40). (B) Vehicle group (× 100). (C) 0.5 mg/kg/day group (× 40). (D) 0.5 mg/kg/day group (× 100). Bidirectional arrows indicate the width of the epiphyseal plate. Arrows indicate the necrosis of cartilage/osseous tissues. Scale bars represent 200 μm.

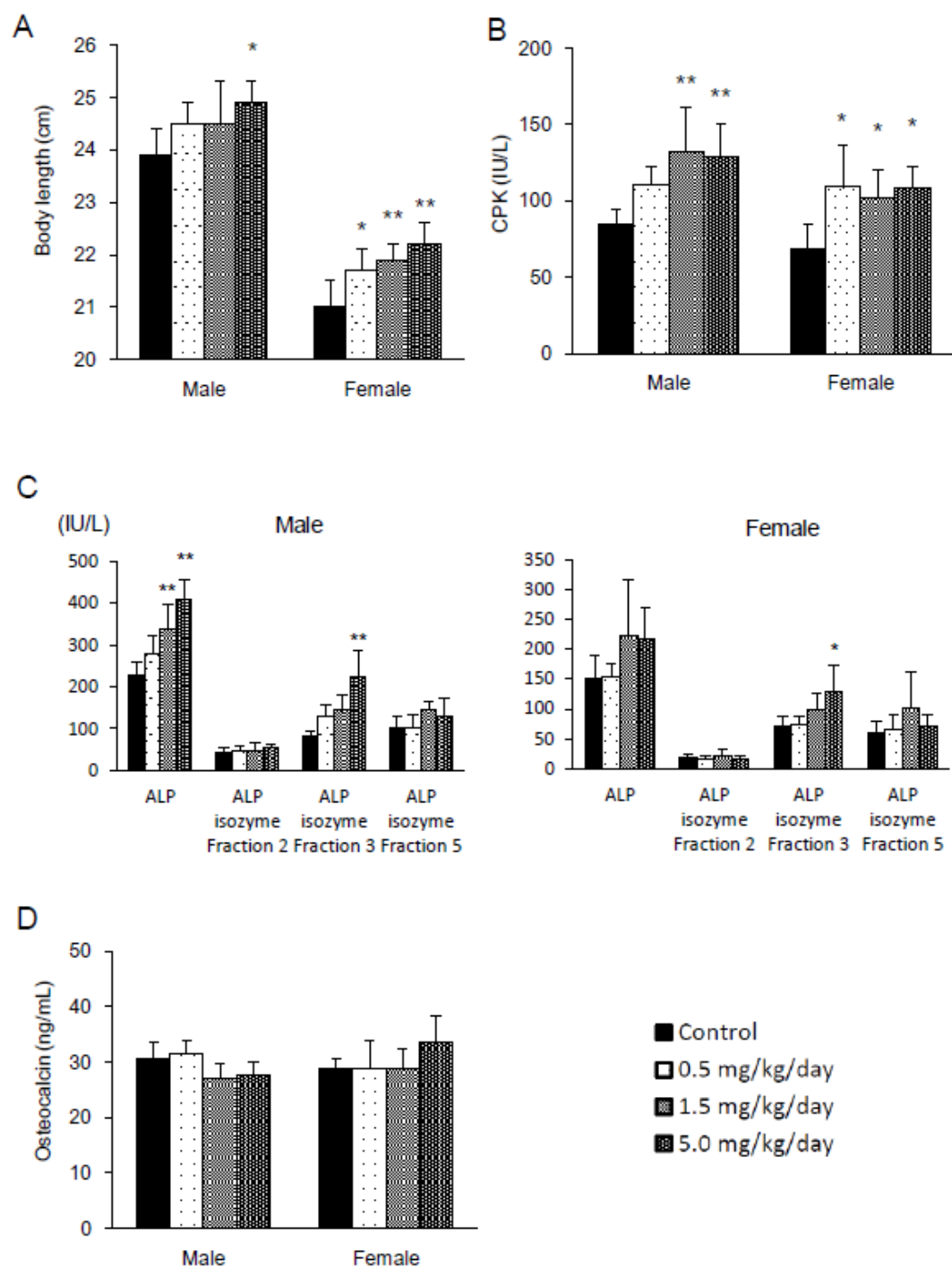


Fig 24. Effects of ASB20123 on the body length (A), CPK activity (B), ALP and ALP-isozyme fraction activity (C), and osteocalcin value (D) in rats treated subcutaneously for 4 weeks in study 1.

Each value represents the mean \pm SD of 5 rats, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated group by Dunnett's multiple comparison test.

Table 6. Histopathological findings in rats treated subcutaneously with ASB20123 for 4 weeks in study 1

Organs / Tissues Findings	Sex Group Dose (mg/kg/day) No. of animals	Male				Female			
		Vehicle	ASB20123			Vehicle	ASB20123		
		0	0.5	1.5	5	0	0.5	1.5	5
Temporomandibular joint		5	5	5	5	5	5	5	5
Thickening, cartilage Sternum		-	-	-	1 (+)	-	-	-	1 (+)
Thickening, cartilage Femur (Proximal)		-	1 (+)	2 (+)	1 (+)	-	1 (+)	2 (+)	2 (+)
Degeneration/necrosis, muscle fiber, peripheral		-	-	1 (+)	-	-	-	-	-
Necrosis, trabecula/marrow, epiphysis, head		-	2 (+)	2 (+)	1 (+)	-	-	-	-
Necrosis, epiphysis/metaphysis, head		-	3 (+)	5 (+)	3 (+)	-	2 (+)	3 (+)	1 (+)
Increase, osteoblast		-	2 (+)	5 (+)	5 (+)	-	1 (+)	3 (+)	4 (+)
Increase, primary bone		-	2 (+)	1 (+)	5 (+)	-	3 (+)	4 (+)	5 (+)
Thickening, epiphyseal plate		-	5 (+/+++)	5 (+/+++)	5 (+/+++)	-	5 (+/+++)	5 (+/+++)	5 (+/+++)
Chondrogenesis/osteogenesis, ectopic		-	1 (+)	3 (+)	2 (+)	-	3 (+)	3 (+)	3 (+)
Fibrosis, marrow, head Femur (Distal)		-	2 (+)	5 (+)	5 (+)	-	1 (+)	3 (+)	4 (+)
Increase, osteoblast		-	2 (+)	1 (+)	1 (+)	-	-	-	1 (+)
Increase, primary bone		-	3 (+)	4 (+)	4 (+)	-	2 (+)	3 (+)	3 (+)
Thickening, epiphyseal plate Tibia (Proximal)		-	3 (+)	4 (+/++)	4 (+/++)	-	2 (+)	3 (+)	3 (+)
Increase, osteoblast		-	1 (+)	2 (+)	2 (+)	-	-	-	-
Increase, primary bone		-	1 (+)	2 (+)	2 (+)	-	2 (+)	3 (+)	2 (+)
Thickening, epiphyseal plate Tibia (Distal)		-	5 (+/++)	5 (+/++)	5 (+)	-	2 (+)	3 (+)	1 (+)
Necrosis, epiphysis/metaphysis, head		-	2 (+)	3 (+)	4 (+)	-	2 (+)	3 (+)	2 (+)
Increase, osteoblast		-	1 (+)	2 (+)	2 (+)	-	-	-	-
Increase, primary bone		-	5 (+)	5 (+)	5 (+)	-	5 (+)	5 (+)	5 (+)
Thickening, epiphyseal plate		-	5 (+/+++)	5 (+/+++)	5 (+/+++)	-	5 (+/+++)	5 (+/+++)	5 (+/+++)
Inflammatory change, peripheral		-	2 (+)	2 (+)	4 (+)	-	2 (+)	2 (+)	2 (+)

Grades: -, normal; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +/++, slight to moderate; +/+++, slight to severe; +/+++, moderate to severe

The numbers of animals with pathological changes are listed.

Vehicle: 0.03 mol/L acetic acid buffer solution (pH4) containing 10 w/v% sucrose and 1 w/v% benzyl alcohol

第2項. 骨・軟骨毒性の機序に関する検討

投与7日目に5.0 mg/kg/day 群の雄1例が死亡で発見された。死亡例は十二指腸に腺癌と膵臓のラ氏島の線維化が認められ、ASB20123 の投与と関連のない腫瘍性の変化が死因として考えられたことから、評価の対象外とした。

12ヵ月齢のラットにASB20123 を0、0.5 及び5.0 mg/kg/day の投与量で4週間反復投与した。対照群は雌性ラットの2例の脛骨近位端で成長板が観察されたものの、その他の全ての観察部位において、成長板の閉鎖が観察された。ASB20123 投与群は、対照群と比較してより多くの個体で成長板の存在が確認できた。成長板を有する一部の個体で骨芽細胞及び一次骨の増加、並びに骨端及び骨幹端の変性／壊死が観察された。これらの所見は、成長板が閉鎖した部位では観察されなかった（Table 7）。一般状態観察において0.5 mg/kg/day 群の1例に歩行異常が認められた。その他は一般状態、体重、大腿骨長、BMD にASB20123 に関連した変化は認められなかった。

Table 7. Histopathological findings in the femur and tibia in study 2

Organs / Tissues	Sex	Male			Female		
	Group	Vehicle	ASB20123		Vehicle	ASB20123	
		0	0.5	5.0	0	0.5	5.0
Findings*	No. of animals	5	5	4#	5	5	5
Femur (proximal)							
Epiphyseal plate closure		5	4	4	5	3	0\$
Thickening, epiphyseal plate			1			2	1\$
		-	(+)	-	-	(+/++)	(++)
Increase, osteoblast and primary bone						2	
		-	-	-	-	(+)	-
Degeneration/necrosis, epiphysis/metaphysis						1	5
		-	-	-	-	(+)	(+/+++)
Femur (distal)							
Epiphyseal plate closure		5	5	2	5	2	1
Thickening, epiphyseal plate				2		3	4
		-		(+++)	-	(+/++)	(++/+++)
Increase, osteoblast and primary bone				2		3	4
		-	-	(+)	-	(+)	(+/++)
Tibia (proximal)							
Epiphyseal plate closure		5	0	0	3	0	0
Thickening, epiphyseal plate			5	4		1	5
		-	(+)	(+)	-	(+)	(+)
Increase, osteoblast and primary bone			3	4		5	5
		-	(+)	(+)	-	(+)	(+)
Tibia (distal)							
Epiphyseal plate closure		5	5	5	5	5	5

Grades: -, normal; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +/++, slight to moderate; +/+++, slight to severe; ++/+++, moderate to severe. The numbers of animals with histopathological findings are listed. Vehicle: 0.03 mol/L acetic acid buffer solution (pH 4) containing 10 w/v% sucrose and 1 w/v% benzyl alcohol. *: No test article-related changes were observed in any animal without an epiphyseal plate. #: One animal was found dead on Day 7 due to the formation of a tumor in the duodenum. \$: The findings of epiphyseal plate were not evaluated in the proximal femoral bone of 4 rats, because the specimen did not have the target tissue.

第3項. 骨・軟骨毒性に関するバイオマーカーの探索と回復性の評価

ASB20123 を 0、0.005、0.05、0.5、及び 5.0 mg/kg/day の用量で 4 週間反復皮下投与し、体長、成長板厚、大腿骨長、及び大腿骨の BMD を測定した。成長板厚は用量依存的に肥厚しており、骨端若しくは骨幹端の毒性所見は成長板厚が 200 μm 以上の個体においてのみ観察された。大腿骨 BMD の低下も毒性所見と相関が認められた。対照的に、骨毒性の出現と体長若しくは大腿骨長の間に相関は認められなかった (Fig 25)。

ASB20123 投与後に認められた骨毒性及び大腿骨における BMD の低値について、その回復性を 13 週間の休薬期間後に評価した。4 週間投与終了時点における一般状態、体重、体長、大腿骨長、BMD、剖検所見、並びに大腿骨及び脛骨の組織学的検査の結果は、study 1 と同様であった (Fig 26A 及び Table 8)。回復期間の終了時の組織学的検査において、被験物質投与群の一部の個体 (1 若しくは 2 例/群) に大腿骨近位端の骨端/骨幹端の壊死及び脛骨遠位端の関節の変形が観察された (Table 9)。投与終了時の BMD は皮質骨、海綿骨ともに 0.5 及び 5.0 mg/kg/day 群で対照群と比較して有意に低値であったが、回復期間終了時では、皮質骨は 5.0 mg/kg/day 群のみ、海綿骨は 0.5 及び 5.0 mg/kg/day 群で対照群と比較して有意に低値であった。一方、対照群、被験物質投与群ともに加齢に伴った BMD 値の増加が認められた。(Fig 26B)。

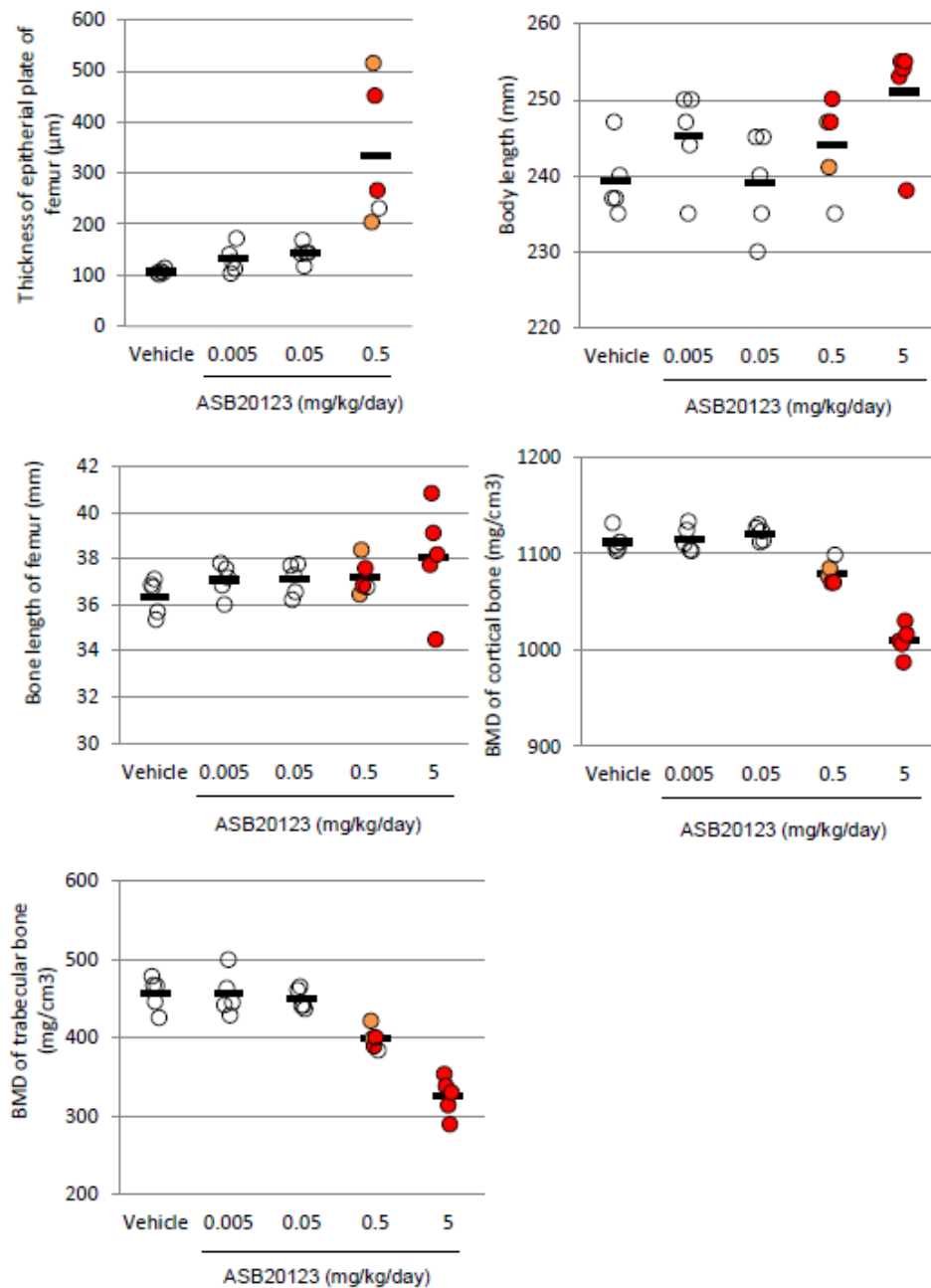


Fig 25. The correlation between bone and cartilage toxicity and several parameters in study 3.

The thickness of the epiphyseal plate of the femur (A), body length (B), and bone length of the femur (C). The BMD of the cortical bone (D) and trabecular bone (E) in the femurs is shown. Bone toxicity observed in each animal is shown in the colored circle, the open circle represents no toxicity, orange indicates slight toxicity, and red indicates severe toxicity. Each bar represents the mean of 5 rats.

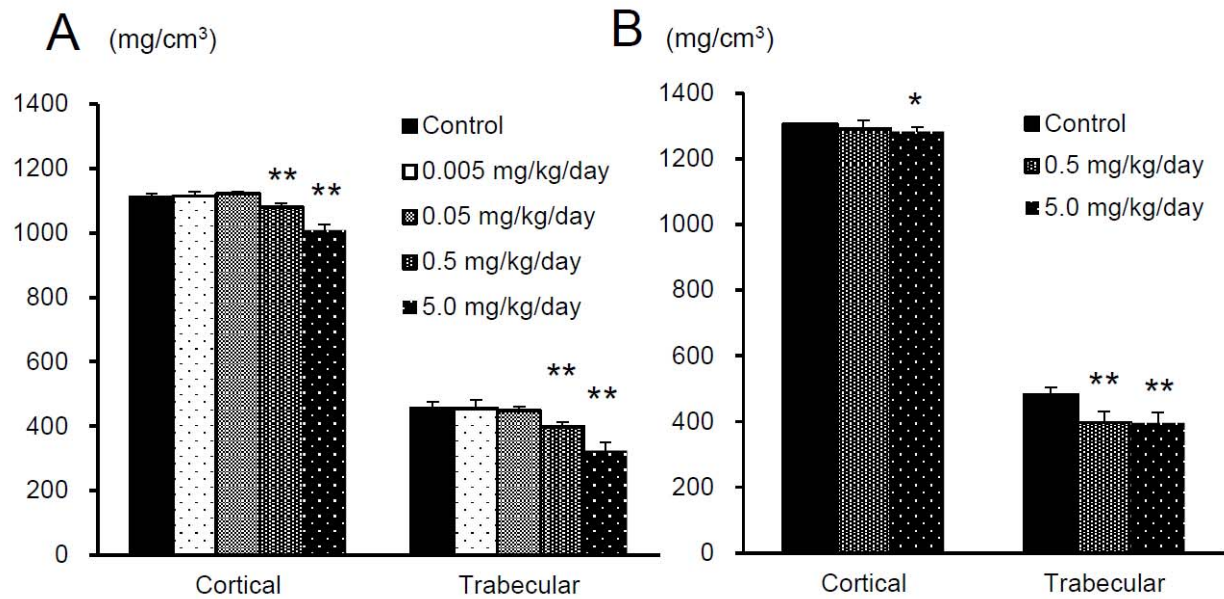


Fig 26. BMD of both the cortical and trabecular bone in the femurs of rats treated subcutaneously with ASB20123 for 4 weeks followed by 13 weeks recovery period in study 3.

(A) At the end of administration period. (B) At the end of recovery period. Each value represents the mean \pm SD of 5 rats, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group by Dunnett's multiple comparison test.

Table 8. Histopathological findings of the femur and tibia in rats treated subcutaneously with ASB20123 for 4 weeks in study 3.

Organs/Tissues	Group Dose (mg/kg/day)	Vehicle	ASB20123			
		0	0.005	0.05	0.5	5.0
Findings	No. of animals	5	5	5	5	5
Femur (proximal)						
Thickening, epiphyseal plate			1	4	5	5
	-	(+)	(+)	(+/++)	(++/+++)	
Increase, osteoblast and primary bone		1	3	4	4#	
	-	(+)	(+)	(+)	(+)	
Degeneration/necrosis, epiphysis/metaphysis				4	5	
	-	-	-	(+)	(+/+++)	
Femur (distal)						
Thickening, epiphyseal plate				4	4	
	-	-	-	(+)	(+)	
Increase, osteoblast and primary bone			3	5	5	
	-	-	(+)	(+)	(+)	
Tibia (proximal)						
Thickening, epiphyseal plate				1	2	
	-	-	-	(+)	(+)	
Tibia (distal)						
Thickening, epiphyseal plate			5	4#	5	
	-	-	(+/++)	(+++)	(+++)	
Increase, osteoblast and primary bone				2#	4#	
	-	-	-	(+)	(+)	
Degeneration/necrosis, epiphysis/metaphysis				3#	3	
	-	-	-	(+)	(+)	

Grades: -, normal; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +/++, slight to moderate; ++/+++ , moderate to severe.

The numbers of animals with pathological changes are listed. Vehicle: 0.03 mol/L acetic acid buffer solution (pH 4) containing 10 w/v% sucrose and 1 w/v% benzyl alcohol. #: The findings in each one were not evaluated because the specimen did not have the target tissue.

Table 9. Histopathological findings of the femur and tibia in rats treated subcutaneously with ASB20123 for 4 weeks followed by 13 weeks recovery period in study 3.

Organs/Tissues	Group	Vehicle	ASB20123	
	Dose (mg/kg/day)	0	0.5	5.0
Findings	No. of animals	5	5	5
Femur (proximal)				
Degeneration/necrosis, epiphysis/metaphysis		-	1 (+++)	2 (+++)
Femur (distal)		-	-	-
Tibia (proximal)		-	-	-
Tibia (distal)				
Deformation of tibia distal end joint*		-	2 (+)	2 (+)

Grades: -, normal; +, slight; +++, severe.

The numbers of animals with pathological changes are listed. Vehicle: 0.03 mol/L acetic acid buffer solution (pH 4) containing 10 w/v% sucrose and 1 w/v% benzyl alcohol.

*: with discontinuity of articular surface and minimal focal degeneration/necrosis of cartilage and osseous tissue.

第4節. 考察

本章では、新規C型ナトリウム利尿ペプチド誘導体；ASB20123の安全性評価、特に骨・軟骨における毒性を中心に検討した。

ASB20123は、CNP/NPR-Bシグナルを介して軟骨細胞の増殖及び分化を活性化することにより骨成長を促進する[13]。本章では、ASB20123をラットに0.5、1.5、5.0 mg/kg/dayの用量で4週間反復皮下投与し、その毒性プロファイルを検討した。

本試験条件下において、ASB20123の毒性変化は骨・軟骨組織においてのみ観察され、その他の組織に毒性に関連した変化は観察されなかった。組織学的検査では、ASB20123投与群の全例で大腿骨及び脛骨に成長板の肥厚が認められ、それらの多くは一次骨及び骨芽細胞の増加を伴っていた。成長板の肥厚は顎関節や胸骨においても同様に認められ、ASB20123の薬理作用に基づく変化と考えられた。骨への関連する変化として、ASB20123投与群で体長が伸長し、骨型のALPであるALP isozyme fraction 3の増加が認められた。

毒性所見としては、大腿骨の近位端において、骨端／骨幹端の壊死、骨頭部の骨髄の線維化、異所性の骨／軟骨形成が全てのASB20123投与群で認められ、頭部骨端の骨梁・骨髄の壊死、末梢筋線維の変性・壊死が散発的に認められた。脛骨では骨端・骨幹端の壊死、遠位端の周囲組織における炎症性変化が認められた。これらの変化はいずれも成長板の肥厚に伴う急激な骨伸長によって生じた物理的若しくは生理的刺激による炎症や虚血による反応性的変化であると推察している。骨・軟骨毒性は大腿骨頭及び脛骨の遠位端に強く発現しており、歩行時に荷重が掛かる部位と一致していることから後肢への物理的ストレスが骨・軟骨における毒性変化を顕在化させている可能性が示唆された。一般状態観察において後肢の反転歩行が認められ、この症状は脛骨遠位端における過剰な軟骨の増加が原因と推察している。CPKの増加は、全身骨の急速な伸長による筋肉の変性または壊死が原因の一つとして考えられるが、その増加の程度はわずかであり、重篤な毒性ではないと判断した。

次に、骨関連の変化における成長板の関与を検討するため、成長板がほぼ閉鎖している12ヵ月齢のラットにASB20123を投与し、若齢ラットの結果と比較した。媒体投与群は、雌性ラット2例の脛骨近

位端を除く全評価部位で成長板は閉鎖していた。ASB20123 投与群では、媒体投与群と比較してより多くの個体で成長板の存在が確認でき、ASB20123 投与により成長板閉鎖を遅らせることが示唆された。この結果は、第 1 章での CNP-53 投与による結果や以前の報告 [27]と一致している。ASB20123 投与による骨芽細胞及び一次骨の増加、並びに骨端及び骨幹端の変性壊死は、成長板が閉鎖した部位では観察されなかったことから、骨及び軟骨組織における毒性変化は、ASB20123 の薬理作用に基づく過剰な成長促進作用によって引き起こされることが示唆された。

さらに、ASB20123 を 0、0.005、0.05、0.5、及び 5.0 mg/kg/day の用量で 4 週間反復皮下投与したラットにおいて、骨及び軟骨の毒性変化と体長、大腿骨長、大腿骨における成長板厚、並びに大腿骨の皮質骨及び海綿骨における BMD との相関を検討した。今回測定した項目のうち、大腿骨の成長板厚及び皮質骨の BMD が骨及び軟骨の毒性発現に最も良く相関していた。成長板厚、BMD 共に臨床においても X 線検査、コンピュータ断層撮影、及びヒトの磁気共鳴画像法を用いてモニターが可能であることから、骨及び軟骨における毒性変化を予測する良好なマーカーになり得ると考えられる [79, 80]。

軟骨無形成症の患者では BMD 値の低下が報告されており [80]、ASB20123 を用いた治療において BMD の低下は慎重に取り扱う必要があると考えられることから、骨・軟骨毒性及び BMD の低下について回復性を検討した。回復期間終了時、ASB20123 投与群の一部の個体において、大腿骨近位端に骨端／骨幹端の壊死及び頸骨遠位端に関節の変形がみられたが、大腿骨及び脛骨における骨毒性の発現頻度は明らかに低下したことから、骨・軟骨毒性の回復性はあると考えられた。一方、一部の個体では回復性は認められなかった。その要因として、大腿骨近位端の成長板に亀裂が生じた個体はステนレスケージで自由に移動可能な飼育環境条件下では回復できず、症状の悪化や関節の変形に至ったと推察している。ASB20123 投与群の BMD 値の低値は、13 週間の回復期間後においても対照群と同等の値までには回復しなかったが、対照群の加齢による BMD の増加とほぼ同等の増加を示した。これらの結果は、投薬を中断することによって、少なくとも BMD のさらなる低下を防ぐことは可能であることを示している。

第 5 節. 小括

第 3 章では、新規 CNP 誘導体である ASB20123 の毒性プロファイルを評価した。ASB20123 をラットに過剰投与した結果、内軟骨性骨化の活性化を介して過剰な骨成長を誘導し、骨及び軟骨特異的な毒性変化を生じた。この毒性変化は成長板が閉鎖した加齢ラットでは認められず、成長板の過剰な分化・増殖に関連していることが明らかとなった。また、骨及び軟骨特異的な毒性変化は成長板厚及び皮質骨の BMD をモニターすることによってコントロールできる可能性が示唆された。CNP 誘導体による軟骨無形成症等の低身長症の治療では、薬理作用の延長上として毒性が発現する可能性があることから、用法用量を厳密に設定する必要があると考えられ、それが治療薬として成功する鍵となると考えられた。

【総括】

第1章では、CNP KO ラットの頭蓋骨の形態を解析し、WT ラットを対照としてその特徴を比較した。CNP KO ラットの頭蓋骨は WT ラットと比較して矢状方向に短く、大後頭孔の狭窄が認められた。これらの症状は、軟骨無形成症をはじめとした四肢短縮型低身長症の患者の特徴的な臨床症状である中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄と共通するものと考えられ、成長ホルモン欠損による自然発症矮小ラットでは認められなかった。この頭蓋骨の形態異常は、天然型 CNP である CNP-53 を4週間持続皮下投与することによって、完全若しくは部分的に改善し、CNP-53 若しくは CNP 誘導体による治療が、低身長に加え、頭蓋骨の形態についても改善する可能性が示された。

第2章及び第3章では、内軟骨性骨化における CNP の生理的作用について創薬への可能性を検討するために、新規 CNP 誘導体である ASB20123 をデザインし、その有効性と毒性を評価した。ASB20123 は完全な NPR-B アゴニスト活性を有し、CNP-22 と比較して AUC の明らかな増加を示した。また、ASB20123 はマウス若しくはラットに反復皮下投与することによって用量依存的な骨伸長促進作用を示し、1日1回の反復皮下投与した場合と比較して同用量を持続皮下投与することで反復皮下投与と比較して、より強力な薬理作用を示した。CNP には血管拡張作用が報告されていることから、投与には低血圧リスクを伴うことが考えられ、実際に他の CNP 誘導体である BMN-111 の臨床試験においても有意な低血圧が報告されている。それに対し、ASB20123 の持続投与は、効果的な骨伸長作用を示しつつ、低血圧のような最大血中濃度に依存するオンターゲット毒性を回避するには有効な投与方法であることが示唆された。

次に、ASB20123 の毒性学的プロファイルを評価した。ASB20123 をラットに 0.5、1.5、及び 5.0 mg/kg/day で4週間反復皮下投与したところ、毒性変化は骨・軟骨組織にのみに観察され、その他の器官・組織には観察されなかった。薬理作用の延長にある所見として、組織学的検査で大腿骨及び脛骨において成長板の肥厚が認められ、それに伴う変化として、体長の伸長や骨型アルカリフスファターゼの上昇等が認められた。毒性変化として、大腿骨骨密度の低値、並びに組織学的検査において骨端・骨幹端の壊死、骨髓の線維化、異所性の骨・軟骨形成、及び筋線維の変性・壊死が認められた。これらの変化と成長板

の関連を評価するため、12 ヶ月齢ラットを用いて同様の毒性試験を実施したところ、成長板が閉鎖している箇所に毒性所見は認められなかったことから、これらの毒性変化は、ASB20123 の薬理作用に基づく過剰な成長促進作用によって惹起されることが示された。また、骨・軟骨毒性の発現は、大腿骨の成長板厚及び大腿骨皮質骨の骨密度の低下と良好な相関が認められた。成長板厚や骨密度は臨床においてもモニターが可能であることから、毒性変化を予測する良好なマーカーになり得ると考えられる。

本研究によって、CNP/NPR-B シグナルの活性化は、軟骨無形成症をはじめとした四肢短縮型低身長症の患者にとって有効な治療手段であることが示された。特に外因性の CNP によって中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄の改善効果が示されたことは患者の QOL の観点から重要な知見と考えられる。また、新規 CNP 誘導体である ASB20123 を用いた検討では、低血圧のリスクを回避しつつ骨成長に対する有効性を最大化する投与法の提案とその骨・軟骨毒性を回避するためのモニター方法を提示することができた。本剤の毒性変化は薬理作用の延長上に発現することから、用法用量を厳密に設定することが、治療薬として成功する鍵となると考えられる。今後、このような CNP/NPR-B シグナルの研究がさらに進展することによって、四肢短縮型低身長症の患者に対する治療法が確立されることを期待する。

参考資料

1. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. J Hypertens. 1992;10(9):907-12. Epub 1992/09/01. PubMed PMID: 1328371.
2. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. J Hypertens. 1992;10(10):1111-4. Epub 1992/10/01. PubMed PMID: 1334991.
3. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H, Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of “vascular natriuretic peptide system”. J Clin Invest 1992, 90: 1145-9.
4. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, et al. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(7):4016-21. Epub 2001/03/22. doi: 10.1073/pnas.071389098. PubMed PMID: 11259675; PubMed Central PMCID: PMCPMC31171.
5. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17300-5. Epub 2004/11/30. doi: 10.1073/pnas.0407894101. PubMed PMID: 15572448; PubMed Central PMCID: PMCPMC534612.
6. Tsuji T, Kondo E, Yasoda A, Inamoto M, Kiyosu C, Nakao K, et al. Hypomorphic mutation in mouse Nppc gene causes retarded bone growth due to impaired endochondral ossification. Biochem Biophys Res Commun. 2008;376(1):186-90. Epub 2008/09/09. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.139. PubMed PMID: 18775416.
7. Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, et al. Skeletal analysis of the long bone abnormality (lbab/lbab) mouse, a novel chondrodysplastic C-type natriuretic peptide mutant. Calcif Tissue Int. 2012;90(4):307-18. Epub 2012/01/25. doi: 10.1007/s00223-011-9567-0. PubMed PMID:

22271248.

8. Nakao K, Osawa K, Yasoda A, Yamanaka S, Fujii T, Kondo E, et al. The Local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep.* 2015;5:10554. Epub 2015/05/28. doi: 10.1038/srep10554. PubMed PMID: 26014585.
9. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med.* 2004;10(1):80-6. Epub 2004/01/02. doi: 10.1038/nm971. PubMed PMID: 14702637.
10. Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, et al. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(6):E1339-48. Epub 2009/10/08. doi: 10.1152/ajpendo.00272.2009. PubMed PMID: 19808910.
11. Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, Miura M, et al. Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology.* 2009;150(7):3138-44. Epub 2009/03/14. doi: 10.1210/en.2008-1676. PubMed PMID: 19282381; PubMed Central PMCID: PMC2703521.
12. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, et al. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology.* 2010;151(9):4381-8. Epub 2010/07/09. doi: 10.1210/en.2010-0078. PubMed PMID: 20610569.
13. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, et al. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):27-34. Epub 2004/05/18. doi: 10.1086/422013. PubMed PMID: 15146390; PubMed Central PMCID: PMC1182004.
14. Hachiya R, Ohashi Y, Kamei Y, Suganami T, Mochizuki H, Mitsui N, et al. Intact kinase homology

- domain of natriuretic peptide receptor-B is essential for skeletal development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):4009-14. Epub 2007/07/27. doi: 10.1210/jc.2007-1101. PubMed PMID: 17652215.
15. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Prickett TC, Espiner EA, Potter LR, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(4):1229-32. Epub 2005/12/31. doi: 10.1210/jc.2005-1949. PubMed PMID: 16384845.
 16. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):E1636-44. Epub 2013/09/05. doi: 10.1210/jc.2013-2142. PubMed PMID: 24001744.
 17. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, et al. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):E713-8. Epub 2014/01/30. doi: 10.1210/jc.2013-3525. PubMed PMID: 24471569.
 18. Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, Belinchón A, Barreda-Bonis AC, Vasques GA, et al. Heterozygous NPR2 Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Léri-Weill Dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):E1133-42. Epub 2015/06/15. doi: 10.1210/jc.2015-1612. PubMed PMID: 26075495.
 19. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat.* 2015;36(4):474-81. Epub 2015/03/16. doi: 10.1002/humu.22773. PubMed PMID: 25703509; PubMed Central PMCID: PMC4382411.
 20. Hisado-Oliva A, Ruzafa-Martin A, Sentchordi L, Funari MFA, Bezanilla-López C, Alonso-Bernáldez M, et al. Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): a novel cause of autosomal dominant short stature. *Genet Med.* 2017. Epub 2017/06/29. doi: 10.1038/gim.2017.66. PubMed PMID: 28661490.
 21. Bocciardi R, Giorda R, Buttgerit J, Gimelli S, Divizia MT, Beri S, et al. Overexpression of the C-type

- natriuretic peptide (CNP) is associated with overgrowth and bone anomalies in an individual with balanced t(2;7) translocation. *Hum Mutat.* 2007;28(7):724-31. Epub 2007/03/22. doi: 10.1002/humu.20511. PubMed PMID: 17373680.
22. Moncla A, Missirian C, Cacciagli P, Balzamo E, Legeai-Mallet L, Jouve JL, et al. A cluster of translocation breakpoints in 2q37 is associated with overexpression of NPPC in patients with a similar overgrowth phenotype. *Hum Mutat.* 2007;28(12):1183-8. Epub 2007/08/07. doi: 10.1002/humu.20611. PubMed PMID: 17676597.
 23. Miura K, Namba N, Fujiwara M, Ohata Y, Ishida H, Kitaoka T, et al. An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PLoS One.* 2012;7(8):e42180. Epub 2012/08/08. doi: 10.1371/journal.pone.0042180. PubMed PMID: 22870295; PubMed Central PMCID: PMC3411678.
 24. Robinson JW, Dickey DM, Miura K, Michigami T, Ozono K, Potter LR. A human skeletal overgrowth mutation increases maximal velocity and blocks desensitization of guanylyl cyclase-B. *Bone.* 2013;56(2):375-82. Epub 2013/07/06. doi: 10.1016/j.bone.2013.06.024. PubMed PMID: 23827346; PubMed Central PMCID: PMC34413012.
 25. Miura K, Kim OH, Lee HR, Namba N, Michigami T, Yoo WJ, et al. Overgrowth syndrome associated with a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) gene. *Am J Med Genet A.* 2014;164a(1):156-63. Epub 2013/11/22. doi: 10.1002/ajmg.a.36218. PubMed PMID: 24259409.
 26. Ko JM, Bae JS, Choi JS, Miura K, Lee HR, Kim OH, et al. Skeletal overgrowth syndrome caused by overexpression of C-type natriuretic peptide in a girl with balanced chromosomal translocation, t(1;2)(q41;q37.1). *Am J Med Genet A.* 2015;167a(5):1033-8. Epub 2015/03/03. doi: 10.1002/ajmg.a.36884. PubMed PMID: 25728306.
 27. Fujii T, Hirota K, Yasoda A, Takizawa A, Morozumi N, Nakamura R, et al. Rats Deficient C-type Natriuretic Peptide Suffer from Impaired Skeletal Growth with Normal Life-Span. *PLoS One* 2018; 13(3):

- e0194812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194812> PMID: 29566041.
28. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 2011; 57(2): 131-40. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2011.01.002>.
 29. Minamino N, Aburaya M, Kojima M, Miyamoto K, Kangawa K, Matsuo H. Distribution of C-type natriuretic peptide and its messenger RNA in rat central nervous system and peripheral tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 197(1):326-35. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2479> PMID: 8250942.
 30. Wendt DJ, Dvorak-Ewell M, Bullens S, Lorget F, Bell SM, Peng J, et al. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015; 353(1):132±49. Epub 2015/02/03. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.218560> PMID: 25650377.
 31. Ornitz DM, Legeai-Mallet L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn*. 2017;246(4): 291-309.
 32. Morozumi N, Hanada T, Habara H, Yamaki A, Furuya M, Nakatsuka T , et al. The role of C-terminal part of ghrelin in pharmacokinetic profile and biological activity in rats. *Peptides*. 2011; 32: 1001–1007. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.021>, PMID: 21291937.
 33. Morozumi N, Sato S, Yoshida S, Yamaki A, Furuya F, Inomata N, et al. A new strategy for metabolic stabilization of motilin using the C-terminal part of ghrelin. *Peptides*. 2012; 33:279–284. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.010> PMID: 22286034.
 34. Morozumi N, Sato S, Yoshida S, Harada Y, Furuya M, Minamitake Y, Kangawa K, et al. Design and evaluation of novel natriuretic peptide derivatives with improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Peptides*. 2017; 97:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.008> PMID: 28899838.
 35. Matsushita T, Wilcox WR, Chan YY, Kawanami A, Bu'ku'lmez H, Balmes G, et al. FGFR3 promotes synchondrosis closure and fusion of ossification centers through the MAPK pathway. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 227–240. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn339> PMID: 18923003; PubMed Central PMCID:

PMC2638772.

36. Nakao K, Yasoda A, Okubo Y, Yamanaka S, Koyama N, Osawa K, et al. A novel therapeutic strategy for midfacial hypoplasia using the CNP/GC-B system. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 2017; 29: 10–16 <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2016.07.007>
37. Shirley ED, Ain MC. Achondroplasia: manifestations and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 2009; 17(4):231-241.
38. Kuramoto K, Tahara S, Sasaki T, Matsumoto S, Kaneko T, Kondo H, et al. Spontaneous dwarf rat: a novel model for aging research. *Geriatr Gerontol Int*. 2010; 10: 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2009.00559.x> PMID: 20102388.
39. Yamanaka S, Nakao K, Koyama N, Isobe Y, Ueda Y, Kanai Y, et al. Circulatory CNP rescues craniofacial hypoplasia in achondroplasia. *J Dent Res*. 2017; 96: 1526–1534. <https://doi.org/10.1177/0022034517716437> PMID: 28644737
40. Marulanda J, Eimar H, McKee MD, Berkvens M, Nelea V, Roman H, et al. Matrix Gla protein deficiency impairs nasal septum growth, causing midface hypoplasia. *J Biol Chem* 2017; 292: 11400–11412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.769802> PMID: 28487368
41. Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 1998; 125: 4977–4988. PMID: 9811582.
42. Grugni G, Marzullo P. Diagnosis and treatment of GH deficiency in Prader-Willi syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016; 30: 785–794. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.003> PMID: 27974191.
43. Laederich MB, and Horton WA. Achondroplasia: Pathogenesis and implications for future treatment. *Curr. Opin. Pediatr* 2010; 22: 516–523 <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32833b7a69> PMID: 20601886.

44. Krejci P, Masri B, Fontaine V, Mekikian PB, Weis M, Prats H, et al. Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis. *J Cell Sci* 2005; 118: 5089–5100 <https://doi.org/10.1242/jcs.02618> PMID: 16234329.
45. Lorget F, Kaci N, Peng J, Benoist-Lasselin C, Mugniery E, Oppeneer T, et al. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a Fgfr3 mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet* 2012; 91:1108–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.014> PMID: 23200862; PubMed Central PMCID: PMC3516592.
46. Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Maternal administration of meclozine for the treatment of foramen magnum stenosis in transgenic mice with achondroplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2017; 19: 91–95. <https://doi.org/10.3171/2016.7.PEDS16199> PMID: 27767902.
47. Madeline LA, Elster AD. Suture closure in the human chondrocranium: CT assessment. *radiology* 1995; 196: 747–756. <https://doi.org/10.1148/radiology.196.3.7644639> PMID: 7644639.
48. Okamoto K, Ito J, Tokiguchi S, Furusawa T. High-resolution CT findings in the development of the sphenooccipital synchondrosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17: 117–120. PMID: 8770261.
49. Kahana T, Birkby WH, Goldin L, Hiss J. Estimation of age in adolescents—the basilar synchondrosis. *J Forensic Sci* 2003; 48: 504–508. 1276 PMID: 12762517.
50. Hirota K, Furuya M, Morozumi N, Yoshikiyo K, Yotsumoto T, et al. Exogenous C-type natriuretic peptide restores normal growth and prevents early growth plate closure in its deficient rats. *PLoS One* 2018; 13 (9): e0204172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204172> PMID: 30235256.
51. Luo G, D’Souza R, Hogue D and Karsenty G. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 325–334. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100221> PMID: 7754814
52. Nakao K, Yasoda A, Osawa K, Fujii T, Kondo E, Koyama N, , et al. Impact of local CNP/GC-B system in growth plates on endochondral bone growth. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 2013; 14(Suppl 1):P48.

<https://doi.org/10.1186/2050-6511-14-S1-P48>, PubMed PMCID: PMC3765567.

53. Nakao K, Osawa K, Yasoda A, Yamanaka S, Fujii T, Kondo E, et al. The local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep.* 2015; 5:10554. <https://doi.org/10.1038/srep10554> PMID: 26014585 PubMed PMCID: PMC5395013.
54. Minamino N, Makino Y, Tateyama H, Kangawa K, Matsuo H. Characterization of immunoreactive human C-type natriuretic peptide in brain and heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 179(1):535–542. PMID: 1831979.
55. Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, Ctype natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J.* 1993; 291 (Pt 1):83–88. PMID: 8097089 PubMed PMCID: PMC1132484.
56. Ogawa Y, Itoh H, Nakao K. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995; 22(1):49–53. PMID: 7768034.
57. Moyes AJ, Khambata RS, Villar I, Bubb KJ, Baliga RS, Lumsden NG. et al. Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2014; 124(9):4039–4051. <https://doi.org/10.1172/JCI74281> PMID: 25105365 PubMed PMCID: PMC4151218.
58. Makino T, Matsumoto M, Suzuki Y, Kitajima Y, Yamamoto K, Kuramoto M, et al. Semisynthesis of human ghrelin: condensation of a Boc-protected recombinant peptide with a synthetic O-acylated fragment. *Biopolymers.* 2005; 79(5): 238–47. <https://doi.org/10.1002/bip.20342> PMID: 16049959.
59. Iwaki T, Tanaka T, Miyazaki K, Suzuki Y, Okamura Y, Yamaki A, et al. Discovery and in vivo effects of novel human natriuretic peptide receptor A (NPR-A) agonists with improved activity for rat NPR-A. *Bioorg Med Chem.* 2017; 25(24):6680–6694. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.006> PMID: 29153628.
60. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402(6762):656–660.

<https://doi.org/10.1038/45230> PMID: 10604470.

61. Holmes G, Zhang L, Rivera J, Murphy R, Assouline C, Sullivan L, et al. C-type natriuretic peptide analog treatment of craniosynostosis in a Crouzon syndrome mouse model. *PLoS One*. 2018; 13(7): e0201492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201492> PMID: 30048539.
62. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78(6):1428–1435. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.6.8200946> PMID: 8200946.
63. A study to evaluate safety and tolerability of BMN 111 administered to healthy adult volunteers. Clinical-Trials.gov Identifier: NCT01590446 (Available at URL: <https://www.bmrn.com/pipeline/clinical-trials/achondroplasia.php>).
64. Wendt DJ, Dvorak-Ewell M, Bullens S, Lorget F, Bell SM, Peng J, et al. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015; 353(1):132–149. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.218560> PMID: 25650377.
65. Chang CY, Rosenthal DI, Mitchell DM, Handa A, Kattapuram SV, Huang AJ. Imaging Findings of Metabolic Bone Disease. *Radiographics*. 2016 Oct; 36(6):1871–1887. Review. <https://doi.org/10.1148/rg.2016160004> PMID: 27726750
66. Jawetz ST, Shah PH, Potter HG. Imaging of physeal injury: overuse. *Sports Health*. 2015 Mar; 7(2):142–53. <https://doi.org/10.1177/1941738114559380> PMID: 25984260.
67. Stewart JM. Update on the theory and management of orthostatic intolerance and related syndromes in adolescents and children. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012; 10(11):1387–1399. <https://doi.org/10.1586/erc.12.139> PMID: 23244360. PubMed PMCID: PMC3896077.
68. Myllyharju J. Extracellular matrix and developing growth plate. *Curr Osteoporos Rep*. 2014; 12(4):439–445. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0232-1> PMID: 25212565.

69. Jean L, Mizon C, Larsen WJ, Mizon J, Salier JP. Unmasking a hyaluronan-binding site of the BX(7)B type in the H3 heavy chain of the inter-alpha-inhibitor family. *Eur J Biochem.* 2001; 268(3):544–553. PMID: 11168393.
70. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; 2(2):79–87. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0244> PMID: 11292373.
71. Kronenberg HM., Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003 15; 423(6937):332–336, <https://doi.org/10.1038/nature01657> PMID: 12748651.
72. McLennan DN, Porter CJ, Charman SA. Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics. *Drug Discov Today Technol.* 2005; 2(1):89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.006> PMID: 24981760.
73. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. N-terminally extended form of C-type natriuretic peptide (CNP-53) identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 170(2):973–979. PMID: 2383278.
74. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, Wei CM, Pittelkow MR, Burnett JC Jr. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol.* 1992; 263(4 Pt 2):H1318–1321. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.4.H1318> PMID: 1384363.
75. Suzuki E, Hirata Y, Hayakawa H, Omata M, Kojima M, Kangawa K, et al. Evidence for C-type natriuretic peptide production in the rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 192(2):532–538. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1448> PMID: 8484764.
76. Serrat MA, Williams RM, Farnum CE. Temperature alters solute transport in growth plate cartilage measured by in vivo multiphoton microscopy. *J Appl Physiol (1985).* 2009; 106(6):2016–2025. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00295.2009> PMID: 19372302. PubMed PMCID: PMC2692772.
77. Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, et al. C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology.* 1991;129(2): 1104-1106.
78. Potter LR. Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther.* 2011;130(1): 71-82.

79. Jawetz ST, Shah PH, Potter HG. Imaging of physeal injury: overuse. *Sports Health*. 2015;7(2): 142-153. doi: 10.1177/1941738114559380.
80. Sims D, Onambele-Pearson G, Burden A, Payton C, Morse C. Whole-body and segmental analysis of body composition in adult males with achondroplasia using dual X-ray absorptiometry. *PLoS One*, 2019;14(3): e0213806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213806> PMID: 30889196.

論文リスト

【主論文を構成する論文】

1. **Yotsumoto T**, Morozumi N, Furuya M, Fujii T, Hirota K, Ueda Y, Nakao K, Yamanaka S, Yoshikiyo K, Yoshida S, Nishimura T, Abe Y, Jindo T, Ogasawara H, Yasoda A. Foramen magnum stenosis and midface hypoplasia in C-type natriuretic peptide deficient rats and restoration by the administration of human C-type natriuretic peptide with 53 amino acids. PLoS One 2019;14(5): e0216340. doi: 10.1371/journal.pone.0216340
2. Morozumi N, **Yotsumoto T***, Yamaki A, Yoshikiyo K, Yoshida S, Nakamura R, Jindo T, Furuya M, Maeda H, Minamitake Y, Kangawa K. ASB20123: A novel C-type natriuretic peptide derivative for treatment of growth failure and dwarfism. PLoS One 2019;14(2): e0212680. doi: 10.1371/journal.pone.0212680 (* co-first author)
3. **Yotsumoto T**, Morozumi N, Nakamura R, Jindo T, Furuya M, Abe Y, Nishimura T, Maeda H, Ogasawara H, Minamitake Y, Kangawa K. Safety assessment of a novel C-type natriuretic peptide derivative and the mechanism of bone- and cartilage-specific toxicity. PLoS One 2019;14(9): e0218229. doi: 10.1371/journal.pone.0218229

【参考論文】

1. Fujii T, Hirota K, Yasoda A, Takizawa A, Morozumi N, Nakamura R, **Yotsumoto T**, Kondo E, Yamashita Y, Sakane Y, Kanai Y, Ueda Y, Yamauchi I, Yamanaka S, Nakao K, Kuwahara K, Jindo T, Furuya M, Mashimo T, Inagaki N, Serikawa T, Nakao K. Rats Deficient C-type Natriuretic Peptide Suffer from Impaired Skeletal

Growth with Normal Life-Span. PLoS One 2018; 13(3): e0194812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194812> PMID: 29566041.

2. Hirota K, Furuya M, Morozumi N, Yoshikiyo K, **Yotsumoto T**, Jindo T, Nakamura R, Murakami K, Ueda Y, Hanada T, Sade H, Yoshida S, Enomoto K, Kanai Y, Yamauchi I, Yamashita T, Ueda SY, Fujii T, Yasoda A, Inagaki N. Exogenous C-type natriuretic peptide restores normal growth and prevents early growth plate closure in its deficient rats. PLoS One 2018; 13 (9): e0204172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204172> PMID: 30235256.

謝 辞

本論文の作成にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました東京理科大学薬学部衛生学教室 市原学教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究は、アスビオファーマ株式会社及び京都大学医学部で行われたものであり、ご懇篤なるご指導ご鞭撻を携わりましたアスビオファーマ株式会社 古谷真由美博士、諸住なおみ博士、小笠原裕之博士、京都大学 八十田 明宏 博士、廣田 圭昭 博士、藤井 寿人 博士、植田 洋平 博士に深甚なる謝意を表します。

また、森 和彦 博士、藤本 和則 博士、南竹 義春 博士、磯野 藤男 博士、前田 博昭 博士をはじめ、本研究にご支援、ご協力いただきましたアスビオファーマ株式会社及び第一三共株式会社の皆様に厚くお礼申し上げます。