

氏名（本籍）	よつもと たかふみ 四元孝史（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第362号
学位授与の日付	2020年3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	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

論文審査委員	（主査）教授 市原 学
	教授 小茂田昌代 教授 斎藤 顕宜
	教授 東 達也 准教授 早田 匡芳

論文内容の要旨

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、反復皮下投与と比較して持続皮下投与において、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 の臨床的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、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、骨髄の線維化、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。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。

論文審査の結果の要旨

C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つであり、CNP またはナトリウム利尿ペプチド受容体 (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。本研究では CNP KO ラットの頭蓋骨が、野生型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ることが示された。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た。更に天然型 CNP である CNP-53 の 4 週間持続皮下投与により、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。

次に新規 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、反復皮下投与と比較して持続皮下投与において、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るが、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。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考えられた。ASB20123 の毒性変化は骨・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、骨髄の線維化、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と考えられ、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た。

審査では、ASB20123 反復皮下投与と持続皮下投与の具体的な投与条件、CNP-53 と CNP-22 の位置付け、統計検定、Mgp、Ank、及び Npp1 の発現解析に腰椎を用いた理由、ghrelin 受容体であるラットの GHS-R1a、耳介軟骨を用いた理由、本検討に雌性マウスを用いた理由、大腿骨及び脛骨における成長板厚の測定方法、動物の一般状態観察の方法、一般状態観察で認められた後肢の反転歩行、一次骨及び骨芽細胞の増加の評価法、骨頭の剥離を伴う変化がある場合の体長の伸長について質疑が行われ、申請者よりの確かな回答が得られた。

本研究は外因性の CNP が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中顔面の低形成及び大後頭孔の狭窄の改善効果を示したはじめての報告である。また、新規 CNP 誘導体である ASB20123 の毒性プロファイルを明らかとするとともに、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が提示された。これらの知見は本疾患の患者への新たな治療法の可能性を提示するものであり、学位の授与に値すると評価した。