

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析

所属 大阪大学 微生物病研究所

研究者 目加田 英輔

### 分担研究者

- (1) 大阪大学 微生物病研究所 岩本亮
- (2) 大阪大学 微生物病研究所 宮戸健二
- (3) 大阪大学 微生物病研究所 水島寛人
- (4) 大阪大学 微生物病研究所 山崎悟
- (5) 大阪大学 微生物病研究所 平田道也
- (6) 大阪大学 微生物病研究所 森部弘樹
- (7) 大阪大学 微生物病研究所 川淵真大

### 要旨

循環器疾患における HB-EGF の役割解明と、それに関わる治療法の開発を目指して、HB-EGF 欠損マウスや種々の変異型 HB-EGF を発現するマウスの作成を行った。これらのマウスでは心臓形成に異常を示すものがあり、心臓の形成と病態に HB-EGF が深く関わっていることが明らかとなった。

### 1. 研究目的

心筋、血管平滑筋の増殖、肥大、遊走は血管の狭窄、動脈硬化、心不全など、致命的な循環器疾患の原因となる。バルンカテーテルによる冠動脈形成術では、損傷に伴う血管の再狭窄が大きなネックとなっており、心筋梗塞の治療法として克服しなければいけない重要課題である。EGF ファミリーの細胞増殖因子である HB-EGF がこれら心筋、血管平滑筋の病理に深くかかわっている証拠が急速に蓄積されつつある。HB-EGF は膜結合型前駆体として合成され、細胞表面でプロテアーゼによって切断されて遊離型（分泌型）HB-EGF を生じる。心血管系に関係の深いアンジオテンシン I I やエンドセリンは、G 蛋白共役型リセプターを介して分泌型 HB-EGF を生成し、分泌型 HB-EGF が EGF リセプターを活性化して、細胞増殖や遊走を促進する。本研究では、HB-EGF 遺伝子に異常があるマウス、あるいは HB-EGF を欠損したマウスを作成して、マウス個体での病態を詳細に解析することで、HB-EGF が関係する循環器疾患の発症機構を明らかにすると同時に、作成された病態モデル動物を用いた治療法の開発を目指している。循環器疾患における HB-EGF の重要性は、この1年くらいの間に急速に明らかになってきた事実で、新た

な創薬の可能性についても探りたい。

## 2. 研究方法

### (1) ノックアウトマウス、ノックインマウスの作成

膜型しか合成できない（プロテアーゼによる切断箇所に変異を持つ）ノックインマウス、反対に分泌型しか合成できない（トランスメンブレン領域以下を欠失した）ノックインマウスを、ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングの手法で作成した。マウスゲノムからの HB-EGF 遺伝子の分離、ターゲティングベクターの構築は通常の方法を用いて行った。HB-EGF 遺伝子の機能を改変したターゲティングベクターによって組み替えされた ES 細胞の検出はゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションと PCR 法にて行った。相同組み換えの結果得られた組換え ES 細胞を、胚盤胞の胚内に移植し、この ES 細胞移植胚を偽妊娠仮親の子宮内に移植して出産させることによりキメラ動物を作製した。得られたキメラマウスから、F1 世代を作成し、姉妹交配によって F2 世代を作成し、遺伝子型と表現型の解析を行った。ノックアウトマウスは、homozygote で致死になる可能性も考え、cre-lox システムでコンディショナルにノックアウトできるようにした。

## 3. 研究成果

### (1) 遺伝子ターゲティングマウスの作成

HB-EGF に関連するターゲティングマウス 3 種類（コンディショナルにノックアウトできるマウス、プロテアーゼによる切断箇所に変異を持つマウス、トランスメンブレン領域以下を欠失したマウス）の作成を完了した。いずれのマウスも、その表現型の解析を進めている途中であるが、解析がもっとも進んでいるのはトランスメンブレン領域以下を欠失したマウスである。トランスメンブレン領域以下を欠失したマウス、すなわち分泌型しか合成できないマウスでは、おそらく循環器系の異常により、キメラマウス、F1 ヘテロの段階で多くは胎性致死になる。生まれてくるマウスも少数認められるが、皮膚に著しい過形成が認められる（論文投稿中）。心臓においても心室壁の過形成で心室腔容積の減少が観察され、心室腔がほとんど認められない個体もあった。ただし、観察例が少ないので、この点はさらに詳しく調べる必要がある。これらのマウスは、キメラマウス、F1 ヘテロの個体で致死となるため、cre-lox システムを用いてコンディショナルにトランスメンブレン領域以下を欠失するようなマウスを現在作成中である。このマウスを用いて、今後さらに詳細な解析を行う。

膜型しか合成できないマウスや HB-EGF 欠損マウスの表現型の解析も現在進行中である。これまでの実験では、これらのマウスはキメラマウスや F1 ヘテロの個体で致死な異常は認められないが、F2 ホモでは生後に突然死を多発し、心臓に異常を示す可能性がある。これらのこ

とから HB-EGF の膜型から分泌型への転換は、HB-EGF の作用機構に極めて重大で、厳密に制御されていることが明らかとなった。現在、これらの異常が HB-EGF のどのような機構によるものか、膜型と分泌型の機能の違い等を詳しく解析中である。

#### (2) HB-EGF の膜型から分泌型への転換機構の解析

HB-EGF の膜型から分泌型への転換は、いわゆる「エクストドメインシェディング」、すなわち、細胞膜蛋白質が細胞表面でプロテアーゼによる切断を受け、その細胞外ドメインが培養液中に放出される機構、によって行われている。サル腎由来 Vero 細胞に膜型 HB-EGF を過剰発現させた細胞 (Vero-H 細胞) を用いて、HB-EGF のエクストドメインシェディング機構について詳細に検討した。その結果、すでに明らかにしている二つの経路 (TPA によって誘導され PKC- $\delta$  と膜結合型メタロプロテアーゼ ADAM9 が関係する経路、LPA などの G 蛋白共役型受容体のリガンドによって刺激され Ras-Raf-MEK 経路と低分子量 G 蛋白質 Rac1 が関与する経路) の他に、種々のストレス刺激によって誘導され p38MAPK が関与する経路を見いだした (論文投稿中)。これらの経路は、互いに独立して存在し、それぞれが異なったプロテアーゼによって切断されることが示唆された。これらのことから、HB-EGF の切断調節は複雑に制御されており、制御機構の重要性が示唆された。

エクストドメインシェディングにおいては、シェディングを誘導する機構と同時にシェディングを抑制する機構の解析も重要と考え、抑制物質の探索を開始した。ADAM9 は TPA によって誘導される HB-EGF 切断経路に働く膜型メタロプロテアーゼである。この分子の細胞質領域に結合する分子を yeast two-hybrid 法で検索し、dynamin などと共約してエンドサイトーシス機構に働く endophilin が ADAM9 の proline-rich 領域に結合することを見いだした。詳しい解析から、endophilin は細胞表面に輸送された ADAM9 に結合して、ADAM9 を速やかに細胞内に取り込むことで、不要な切断が起こらないようにネガティブな調節をしていることが明らかにされた。ADAM ファミリーの分子は、構造から予測されるほど細胞表面には存在しないが、これはこのようなネガティブ調節機構の存在によることが明らかとなった (論文投稿中)。

#### 4. 考察

遺伝子ターゲティングマウスの実験結果から HB-EGF が心臓の形成や心肥大などの疾患に深く関わっていることが明らかとなった。また、HB-EGF の膜型から分泌型への転換 (エクストドメインシェディング) は、この分子の機能にとってきわめて重大で、この調節機構の異常が致死的な効果をもたらすことも明らかにされた。アンギオテンシン I I やエンドセリンなどの G 蛋白共役型リセプターを活性化するリガンドは、HB-EGF のシェディングを誘導することで、心肥大の原因となっていることが考えられるが、そこには HB-EGF の発現上昇と過剰なエクストド

メインシェディングという研究代表者らが明らかにした HB-EGF/EGFR を介したポジティブフィードバック機構によって増幅されている可能性がある。今後は HB-EGF が関係する循環器疾患の発症機構を明らかにすると同時に、作成された病態モデル動物を用いた治療法の開発を目指す。HB-EGF の膜型から分泌型への転換を抑制する機構についてさらに詳しく解析すると同時に、癌細胞における HB-EGF 切断機構と HB-EGF/EGFR を介したポジティブフィードバック機構についても研究を進めたい。

## 5. まとめ

循環器疾患における HB-EGF の役割解明と、それらに対する新奇治療法の開発を目指して、HB-EGF 欠損マウスおよび種々の変異型 HB-EGF を発現するマウスの作成を行った。これらのマウスの中には、心筋の著しい過形成を示すものがあり、心臓の形成と病態に HB-EGF が深く関わっていることが明らかとなった。今後はこのマウスの病態をさらに詳細に解析し、HB-EGF が関係する疾患の発症機構を明らかにすると同時に、作成された病態モデル動物を用いた治療法の開発へと研究を進める予定である。

## 6. 研究発表

Yu, X., Sharma, K. D., Takahashi, T., Iwamoto, R. and Mekada, E. Ligand-independent dimer formation of EGFR is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol. Biol. Cell* (2002) in press.

Shimizu, T., Matsuishi, T., Iwamoto, R., Handa, K., Yoshioka, H., Kato, H., Ueda, S., Hara, H., Tabira, T. and Mekada, E. Elevated cerebrospinal fluid levels of anti-CD9 antibodies in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Infect. Dis.* (2002) In press.

Hasuwa, H., Shishido, Y., Yamazaki, A., Kobayashi, T., Yu, X. and Mekada, E. CD9 amino acids critical for upregulation of diphtheria toxin binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 782-790 (2001).

Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Munehiro, N., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 19, 746-750 (2001).

Umata, T., Hirata, M., Takahashi, T., Ryu, F., Shida, S., Takahashi, Y., Tsuneoka, M., Miura, Y., Masuda, M., Horiguchi, Y. and Mekada, E. A dual signaling cascade that regulates the ectodomain shedding of HB-EGF. *J. Biol. Chem.* 276, 30475-30482 (2001).

Hirata, M., Umata, T., Takahashi, T., Ohnuma, M., Miura, Y., Iwamoto R. and Mekada, E. Identification of serum factor inducing ectodomain shedding of proHB-EGF and studies of non-cleavable mutants of proHB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 915-922 (2001).

Takahashi, T., Umata, T. and Mekada, E. Extension of juxtamembrane domain of diphtheria toxin receptor arrests translocation of diphtheria toxin fragment A into cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 690-696 (2001).

Nakamura, Y., Handa, K., Iwamoto, R., Tsukamoto, T., Takahashi, M. and Mekada, E. Immunohistochemical distribution of CD9, heparin binding epidermal growth factor-like growth factor and integrin  $\alpha 3\beta 1$  in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 439-444 (2001).

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社