

厚生労働科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

HB-EGFにかかわる新規拡張型心筋症
モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15（2003）年3月

主任研究者 北 風 政 史
(国立循環器病センター)

目 次

I. 総括研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 ……	1
北風政史	
(資料) 別刷り	
NATURE MEDICINE · VOLUME 8 · NUMBER 1 · JANUARY 2002 ……	6
– Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF : Metalloproteinase inhibitors as a new therapy –	
PNAS · MARCH18,2003 · Vol.100 · NO.6 · 3221-3226 ……	12
– Heparin - Binding EGF - Like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function –	
Journal of the American College of Cardiology 2002 ……	18
– Opening of The Adenosine Triphate - Sensitive Potassium Channel Attenuates Cardiac Remodeling Induced by Long - Term Inhibition of Nitric Oxide Synthesis –	
PNAS · MARCH19,2002 · Vol.99 · NO.6 · 3657-3662 ……	25
– Targeting of both mouse neuropilin - 1 and neuropilin - 2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis –	
Circulation Journal · Vol.66 · No.1 · January2002 · Pages93-96 ……	31
– Adenosine - Induced Cardiac Gene Expression of Ischemic Murine Hearts Revealed by cDNA Array Hybridization –	

II. 分担研究報告

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 3 6
友池仁暢
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 3 8
宮武邦夫
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 4 0
駒村和雄
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 4 2
村松正明
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 4 4
堀 正二
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 4 8
目加田英輔
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 5 1
東山繁樹
- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルハウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 5 4
豊福利彦

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
（総括・分担）研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究
主任研究者 北風政史 国立循環器病センター 部長

研究要旨

特発性拡張型（うっ血型）心筋症は厚生労働省の特定疾患であると同時に循環器領域ではもっとも重要な疾患のひとつである。病因はいまだ不明でその治療法確立のためにはモデル動物の存在が必須であった。本件研究は、我々が新たに確立した HB-EGF 遺伝子改変拡張型心筋症モデルマウスを使用して心筋症の病態解明・治療法の確立するために開始された。今年度は心筋症モデルマウスの確立、HB-EGF の生化学的解析、特にその膜からの分離にかかわる因子の解明、心機能代謝における役割の検討、ヒト拡張型心筋症における HB-EGF 及びその主なプロセシング酵素である ADAM12 のゲノム遺伝子解析を中心に研究をおこなった。HB-EGF 遺伝子改変拡張型心筋症モデルマウスは生後6週ごろより自然発症する心不全モデルマウスである。本年はこの心不全マウスを各種薬剤、遺伝子改変マウスとのかけ合わせにより救済する目的のために、均一な遺伝子背景にそろえ予後を一定にさらにある程度の数をそろえることを中心に行なった。その間、心不全マウスとのかけ合わせのため各種増殖因子の心臓特異的発現マウスの作成中である。次年度よりスクリーニングを開始する。さらに HB-EGF の欠損マウスがいかなるメカニズムで発症したかの原因究明は心不全発症機構の解明につながると思われる。今年度は現在使用している心不全を発症するマウスとは異なった HB-EGF 欠損マウスを作成しその表現型の解析を行なった。また心臓における EGF 受容体ファミリーとそのリガンドの働きを解明するため、HB-EGF のプロセシングの生化学的解析もすすめ心筋代謝との関係を *in vitro* で解析した。さらに、ヒト拡張型心筋症の96名の HB-EGF 関連遺伝子の多型解析を進めている。

分担研究者

友池仁暢
国立循環器病センター
院長

駒村和雄
国立循環器病センター
室長

宮武邦夫
国立循環器病センター
副院長

村松正明
ヒュービットジェノミクス株式会社
研究所長

堀 正二
大阪大学大学院医学研究科
教授

目加田英輔
大阪大学微生物研究所
教授

東山 繁樹
愛媛大学医学部
教授

豊福 利彦
大阪大学大学院医学研究科
助手

A. 研究目的

特発性拡張型（うっ血型）心筋症による慢性心不全の病態解明を介して新規心不全治療薬の開発を行い、慢性心不全患者の予後および生活の質を向上させる。

B. 研究方法

HB-EGF遺伝子改変モデルマウスを使用した心不全治療薬・心不全治療法の確立と臨床応用
現在我々が継代している HB-EGF 遺伝子改変拡張型心筋症モデルマウスは遺伝的背景を数種の系統に均一化したものを実験に使用する。このマウスは進行性の心不全をきたし約 20 週で死亡する。この生存曲線を均一にすることが薬剤及び遺伝子導入、細胞移植などの心不全治療のスクリーニングをおこなううえで最も重要である。現在心不全治療薬として認知されている治療薬

の中でも効果の違い等が指摘されているものがあり、投与薬剤の使用による予後の変化を詳細に検討し、最も心不全に効果の高い投与時期、投与薬剤、及び薬剤の組み合わせを選択する。また近年急速に進みつつある遺伝子治療・細胞移植においても均一な心不全モデルを使用することにより正確な効果判定を行なう。さらに HB-EGF 遺伝子変異心不全マウスにおいて、HB-EGF を介するシグナルのどの部分が心筋代謝に重要であるかが問題となった。HB-EGF は 4 週類の EGF 受容体のすべてをリン酸化することが可能であるためどの受容体を介するかは不明であった。臨床では EGF 受容体のひとつである HER2 の中和抗体により心不全が発症すること HER2 の心筋特異的欠損マウスが心不全を呈することが知られており、HB-EGF の作用が HER2 を介する可能性が高い。実際 HB-EGF を全身で欠損するマウスは心臓における HER2 と他の EGF 受容体の一つである HER4 の自己リン酸化が抑制されることが判明した。しかし、さらに HB-EGF の心臓シグナルに重要な受容体を明確にする必要がある。我々はこの HB-EGF 膜プロセッシング障害心不全モデルマウスを HB-EGF の外部からの投与及び心筋に特異に発現したマウスとのかけあわせで救済できるかを検討する。また各種 EGF リガンドの投与及びその心臓特異的発現マウスとの掛け合わせを行なうべくマウス作成を行なった。

(倫理面への配慮)

心不全自然発症マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤によっては、

投与によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与そのものにより、マウスに身体的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合はたとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減が可能とおもわれる。もし復元不可能な重大な障害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮している。新たな治療薬の開発はその使用に常に危険を伴うがこの増殖因子治療法はこれまでの研究によりその有効性がかなりの確率で予想され、とくにこの心不全発症マウスでは有効性が期待される。またこういった生理活性物質による治療法はヒトでもインシュリンや成長因子などですでに開始されておりこの増殖因子も心不全治療薬として応用される可能性が高いとおもわれる。心不全発症マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスの積極的延命法のスクリーニングはあらたな心不全治療薬のすばやい検索に大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこないこのマウスの更なる延命手段の検索をすすめる予定である。また本マウス以外に現在のところ新たな心不全治療薬の良否をより迅速にまた的確に判断する方法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

C. 研究結果

1) HB-EGF遺伝子改変モデルマウスを使用した心不全治療薬・心不全治療法の確立と臨床応用

この項目に関しての実施状況は前述したように遺伝的背景が均一で予後の安定した大量のマウスの確保という時点までしか及ばず、薬剤等のスクリーニン等にはいたっていない。現在本目的のために確立しつつあるマウスは増殖因子HB-EGFの遺伝子を欠損させそこにHB-EGFの膜からプロセッシングされない変異HB-EGF遺伝子をゲノム上の同部位に導入したものである。本年はさらにHB-EGFが心筋特異的に欠損するマウス、全身で欠損するマウス（以上はCre-loxシステムを利用）、膜結合型は発現せず遊離型のHB-EGFのみ発現するマウス（上記と同じknock-out, knock inのシステムを利用）等も作成中である。そのうちHB-EGFを全身で欠損するマウスはすでに作成が終了し、HB-EGFのプロセッシングを受けないマウスより重症の心不全をきたす事が判明した。これらのマウスより得られた心筋細胞を利用して現在HB-EGFと心筋細胞代謝との関連を検討して、これら心不全マウスの救済手段を明らかにする予定である。

2) 心筋症モデルマウスの心不全発症のメカニズムの解明

他のトランスゲニックマウスとの交配による心不全の救済

現在HER1, 2, 3を活性化させるがHER4を活性化させないTGF-alphaさらにHER2, 3, 4を活性化させるが1を活性化させないneuregulin1の心臓特異的発現マウスを作成、各数系統のマウスが確立させた。今後心不全マウスと掛け合わせることによりHB-EGFの作用がどの受容体を介するかを明らかにしていく予定である。

D. 考察

本年度の最も重要な目的は拡張型心筋症均一なモデルマウスの確立であった、数種の系統で均一な表現型が得られるようになってきたので今後さまざまな系でスクリーニングをおこなう予定である。また他の遺伝子改変マウスとの掛け合わせ等により、心不全発症のメカニズムが解明されると期待される。

E. 結論

HB-EGF遺伝子改変マウスの遺伝子背景を均一化することにより、予後の安定した心不全モデルマウスを繁殖できた。またこのマウスを救済するための掛け合わせ用のマウス3種の系統を確立した。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M. & Higashiyama, S. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8, 35-40. (2002).

Asakura, M., Kitakaze, M., Sakata, Y., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogida,

H., Liao, Y., Node, K., Takashima, S., Tada, M. & Hori, M. Adenosine-induced cardiac gene expression of ischemic murine hearts revealed by cDNA array hybridization. *Circ J* 66, 93-6 (2002).

Sanada, S., Node, K., Asanuma, H., Ogita, H., Takashima, S., Minamino, T., Asakura, M., Hori, M. & Kitakaze, M. [Opening of ATP-sensitive potassium channel attenuates cardiac remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis]. *J Cardiol* 41, 43-4 (2003).

Sanada, S., Node, K., Minamino, T., Takashima, S., Ogai, A., Asanuma, H., Ogita, H., Liao, Y., Asakura, M., Kim, J., Hori, M. & Kitakaze, M. Long-Acting Ca²⁺ Blockers Prevent Myocardial Remodeling Induced by Chronic NO Inhibition in Rats. *Hypertension* (2003).

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M. & Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003).

Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitsukawa, T., Fujisawa, H., Klagsbrun, M. & Hori, M. Targeting of both

mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3657-62. (2002).

Sanada, S., Node, K., Asanuma, H., Ogita, H., Takashima, S., Minamino, T., Asakura, M., Liao, Y., Ogai, A., Kim, J., Hori, M. & Kitakaze, M. Opening of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel attenuates cardiac remodeling induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis: role of 70-kDa S6 kinase and extracellular signal-regulated kinase. *J Am Coll Cardiol* **40**, 991-7 (2002).

Ogita, H., Node, K., Asanuma, H., Sanada, S., Takashima, S., Asakura, M., Kitakaze, M. & Hori, M. [Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart]. *J Cardiol* **39**, 55-6. (2002).

Liao, Y., Ishikura, F., Beppu, S., Asakura, M., Takashima, S., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogita, H., Kuzuya, T., Node, K., Kitakaze, M. & Hori, M. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H1703-8. (2002).

Kitakaze, M., Asanuma, H., Funaya, H., Node, K., Takashima, S., Sanada, S., Asakura, M., Ogita, H., Kim, J. & Hori, M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors

and angiotensin II receptor blockers synergistically increase coronary blood flow in canine ischemic myocardium: role of bradykinin. *J Am Coll Cardiol* **40**, 162-6 (2002).

2. 学会発表

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy

MASANORI ASAKURA¹, MASAFUMI KITAKAZE¹, SEIJI TAKASHIMA¹, YULIN LIAO¹, FUMINOBU ISHIKURA⁵, TSUYOSHI YOSHINAKA⁷, HIROSHI OHMOTO⁷, KOICHI NODE¹, KOHICHIRO YOSHINO⁷, HIROSHI ISHIGURO⁶, HIROSHI ASANUMA¹, SHOJI SANADA¹, YASUSHI MATSUMURA³, HIROSHI TAKEDA³, SHINTARO BEPPU², MICHIIHIKO TADA², MASATSUGU HORI¹ & SHIGEKI HIGASHIYAMA⁴

Departments of ¹Internal Medicine and Therapeutics, ²Pathology and Pathophysiology, and ³Medical Information Science, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Departments of ⁴Biochemistry and ⁵Echocardiography, School of Allied Health Science, Osaka University Faculty of Medicine, Osaka, Japan

⁶Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, Toyoake, Japan

⁷Nippon Organon K.K., Osaka, Japan

Correspondence should be addressed to S.H.; e-mail: shigeki@sahs.med.osaka-u.ac.jp, or S.T.; email: takasima@medone.med.osaka-u.ac.jp

G-protein-coupled receptor (GPCR) agonists are well-known inducers of cardiac hypertrophy. We found that the shedding of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) resulting from metalloproteinase activation and subsequent transactivation of the epidermal growth factor receptor occurred when cardiomyocytes were stimulated by GPCR agonists, leading to cardiac hypertrophy. A new inhibitor of HB-EGF shedding, KB-R7785, blocked this signaling. We cloned a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) as a specific enzyme to shed HB-EGF in the heart and found that dominant-negative expression of ADAM12 abrogated this signaling. KB-R7785 bound directly to ADAM12, suggesting that inhibition of ADAM12 blocked the shedding of HB-EGF. In mice with cardiac hypertrophy, KB-R7785 inhibited the shedding of HB-EGF and attenuated hypertrophic changes. These data suggest that shedding of HB-EGF by ADAM12 plays an important role in cardiac hypertrophy, and that inhibition of HB-EGF shedding could be a potent therapeutic strategy for cardiac hypertrophy.

Cardiac hypertrophy is an adaptive response of the heart that occurs in various cardiovascular diseases¹, but prolonged hypertrophy typically culminates in chronic heart failure or sudden cardiac death². Elucidation of the mechanisms underlying cardiac hypertrophy is thus important to the field of cardiovascular biology, and may lead to new strategies for the prevention or treatment of cardiovascular diseases.

Vasoactive molecules such as phenylephrine (PE), angiotensin II (Ang II) and endothelin-1 (ET-1) are well-known inducers of cardiomyocyte hypertrophy³⁻⁵, and inhibition of their actions can be beneficial for the treatment of chronic heart failure following cardiac hypertrophy^{6,7}. All of these molecules bind to G-protein-coupled receptors (GPCRs), and there is a common cellular response to the activation of such receptors that includes an increase in protein synthesis concomitant with an increase in cell size, induction of immediate early genes and reactivation of fetal genes^{8,9}. The similarity of the response to different agents suggests that the initial signaling pathways triggered by different GPCR agonists converge on a common downstream pathway that leads to cardiac hypertrophy.

Transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) has a role in GPCR-mediated signal transduction in various cells¹⁰⁻¹³. Transactivation of EGFR is mediated, at least sometimes,

by the EGFR ligand heparin-binding EGF (HB-EGF), which is cleaved from its membrane-anchored form (proHB-EGF) by a specific metalloproteinase¹⁴. If ectodomain shedding of proHB-EGF is required for GPCR signaling in various cell types, a neutralizing antibody for HB-EGF or specific inhibitors of proHB-EGF shedding might be used therapeutically to block pathological signaling via GPCRs. Here we show that transactivation of EGFR by truncated HB-EGF occurs in cardiomyocytes, and that a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) is a key metalloproteinase in this pathway. Recently, there have been several reports indicating beneficial effects of matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors on heart failure¹⁵. We hypothesized that such beneficial effects of metalloproteinase inhibitors are at least partially mediated by antagonism of GPCR signaling via the ADAM12-mediated shedding of HB-EGF in cardiac cells, particularly cardiomyocytes.

EGFR transactivation by hypertrophic stimuli

To assess the ability of HB-EGF to stimulate tyrosine phosphorylation of EGFR, we treated cultured rat neonatal cardiomyocytes with recombinant HB-EGF (1×10^{-8} M). Cells were lysed at specified times, after which the lysates were immunoprecipitated with antibody against EGFR and probed with an anti-phosphotyrosine antibody (4G10). Phosphorylated EGFR (170 kD) was clearly seen

20020728

以降 P.6－P.35までは雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.4－ P.5の「研究発表」をご参照ください。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究
分担研究者 友池 仁暢 国立循環器病センター 院長

研究要旨

HB-EGF 遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したことにより、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

（倫理面への配慮）

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型解析に関しては倫理委員会の申請がほぼ完了したことから、インフォームドコンセントの取得のもと、血液サンプルの収集を開始している。

D. 考察

現在、遺伝子多型解析を目的に、拡張型心筋症患者を中心にインフォームドコンセントを得るため倫理委員会の申請を行い、承認を得た。現在、実際に拡張型心筋症の患者から、十分な研究の説明を行った上で、研究の趣旨に同意の得られた症例においてのみ、同意書取得の上、遺伝子解析目的にて血液の採取を行っている。すでに、96例の症例において、遺伝子解析の血液を採取している。現在、HB-EGF に関連する遺伝子を中心に遺伝子多型解析を施行していく予定である。

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した。今後疾患との関連性を検討する。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究

分担研究者 宮武邦夫 国立循環器病センター 副院長

研究要旨

HB-EGF 遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したことにより、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

（倫理面への配慮）

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型解析に関しては倫理委員会の申請がほぼ完了したことから、インフォームドコンセントの取得のもと、血液サンプルの収集を開始している。

D. 考察

現在、遺伝子多型解析を目的に、拡張型心筋症患者を中心にインフォームドコンセントを得るため倫理委員会の申請を行い、承認を得た。現在、実際に拡張型心筋症の患者から、十分な研究の説明を行った上で、研究の趣旨に同意の得られた症例においてのみ、同意書取得の上、遺伝子解析目的にて血液の採取を行っている。すでに、96例の症例において、遺伝子解析の血液を採取している。今後、HB-EGF に関連する遺伝子を中心に遺伝子多型解析を施行していく予定である。

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した。今後疾患との関連性を検討する。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究
分担研究者 駒村 和雄 国立循環器病センター 室長

研究要旨

HB-EGF 遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したことにより、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

（倫理面への配慮）

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型解析に関しては倫理委員会の申請がほぼ完了したことから、インフォームドコンセントの取得のもと、血液サンプルの収集を開始している。

D. 考察

現在、遺伝子多型解析を目的に、拡張型心筋症患者を中心にインフォームドコンセントを得るため倫理委員会の申請を行い、承認を得た。現在、実際に拡張型心筋症の患者から、十分な研究の説明を行った上で、研究の趣旨に同意の得られた症例においてのみ、同意書取得の上、遺伝子解析目的にて血液の採取を行っている。すでに、96例の症例において、遺伝子解析の血液を採取している。現在、HB-EGF に関連する遺伝子を中心に遺伝子多型解析を施行していく予定である。

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した。今後疾患との関連性を検討する。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究
分担研究者 村松 正明 ヒュービットジェノミクス株式会社 研究所長

研究要旨

HB-EGF 遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したことにより、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

（倫理面への配慮）

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型解析に関しては倫理委員会の申請がほぼ完了したことから、インフォームドコンセントの取得のもと、血液サンプルの収集を開始している。

D. 考察

現在、遺伝子多型解析を目的に、拡張型心筋症患者を中心にインフォームドコンセントを得るため倫理委員会の申請を行い、承認を得た。現在、実際に拡張型心筋症の患者から、十分な研究の説明を行った上で、研究の趣旨に同意の得られた症例においてのみ、同意書取得の上、遺伝子解析目的にて血液の採取を行っている。すでに、96例の症例において、遺伝子解析の血液を採取している。現在、HB-EGF に関連する遺伝子を中心に遺伝子多型解析を施行していく予定である。

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した。今後疾患との関連性を検討する。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究

分担研究者 堀 正二 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

拡張型心筋症は原因不明の心筋変性をきたす疾患である。この疾患の理解のためには心筋細胞の代謝系の解析が必須である。生後は殆ど分裂しない心筋細胞は、外部からの刺激に対して増殖の代わりに肥大という適応をする。この肥大のシグナルは増殖細胞における機能維持と同様の働きをすると考えられるたそのメカニズムの解明は重要である。また心臓が収縮不全をきたす状態においてこの肥大シグナルがどのように関与するかは未だ明確にされていない。我々は心筋肥大を引き起こすことが知られるカテコラミンやアンジオテンシンのシグナル伝達に EGF ファミリーに属する増殖因子のひとつである HB-EGF が共通に関与することを明らかにした。すなわち、これらの生理活性物質の投与により心筋細胞の膜表面に存在する HB-EGF がメタロプロテナーゼの ADAM12 の活性化により切断され EGF 受容体に結合し、心筋肥大を引き起こすことを示した。このように心筋肥大の共通なシグナルに位置する HB-EGF であるがその機能欠損は逆に心筋細胞不全をきたすことが主任研究者らの HB-EGF 遺伝子改変マウスの検討により明らかになった。これらのことは、HB-EGF は心筋肥大をきたす増殖因子であるが心筋代謝に必須の因子でありその不足は心筋細胞の機能不全につながることを示唆する。さらには HB-EGF がある状況においては心筋保護的に働く可能性を示唆する。我々は HB-EGF の心臓における生化学的解析を進めると共に、HB-EGF の心筋保護作用について様々なモデルを用いて検討した。

A. 研究目的

心肥大、心不全の過程における HB-EGF の機能を解析することにより、HB-EGF に心筋保護作用が存在するかどうかを検討する。

B. 研究方法

ラット培養心筋細胞を利用し、カテコラミン、アンジオテンシン、エンドセリン、LIF、などの生理活性物質を投与し、EGF 受容体がリン酸化されるかどうかを検討する。このシグナル伝達に HB-EGF の膜からの遊離が関与するかをメタロプロテナーゼ阻害

剤や HB-EGF の中和抗体を使用して検討する。さらにこれらの肥大刺激が HB-EGF のどの受容体によりもたらされるかを各受容体のリン酸化阻害剤等により検討した。また HB-EGF による心筋保護作用を検討するため、バキュロウイルスによる大量のマウス HB-EGF を作成した。

（倫理面への配慮）

現在のところ実験は培養細胞を使用した実験が中心であるため倫理的問題はないと思われる。

C. 研究結果

ラット培養心筋細胞においてカテコラミン、アンジオテンシン、エンドセリン、LIF等で刺激するとEGF受容体1がリン酸化されこのtransactivationはHB-EGFの中和抗体及びメタロプロテアーゼ阻害剤KBR-7785により抑制された。またHB-EGFは心筋細胞においてEGF受容体1のみでなく2及び4もリン酸化することが明らかになった。またin vivoにおいてHB-EGFの心筋保護作用を検討するためマウス及びヒトHB-EGFを昆虫細胞を利用して大量精製した。イオン交換樹脂と逆送カラムの組み合わせにより、エンドトキシンレベルの非常に低い大量のリコンビナント蛋白を精製できた。今後は薬剤障害性心筋障害モデル等の心不全モデルに投与しHB-EGFの心筋保護作用を検討する。

D. 考察

増殖因子による心不全治療はすでにIGFや成長因子等で治験されているが、その効果は今のところ不明である。HB-EGFは他の増殖因子と異なり、その欠損が心不全をきたすことから心筋代謝に重要な増殖因子であることは間違いない。しかしその心筋保護作用については今後の検討を待たなければならない。近年HB-EGFの受容体のひとつであるEGF受容体2の中和抗体が乳がんの治療に使用されつつあるが、心毒性のある薬剤と併用することにより心不全をきたすことが報告されている。このことは心筋障害が生じるときには特にHB-EGFが必要とされる可能性が考えられる。またどの受容体を介してその作用をきたすかも明確にしていかなければならない。今後これらの心

筋細胞障害モデルにおいてHB-EGFの心筋細胞保護作用を検討していく。

E. 結論

G共役型受容体のリガンドである生理活性物質による心筋肥大のシグナルにHB-EGFの膜からの遊離が重要な役割をすることが示唆された。また薬剤障害等による心筋障害モデルにおいてHB-EGFの心筋保護作用を検討するため、大量高品質の昆虫細胞由来HB-EGFを精製した。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M. & Higashiyama, S. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8, 35-40. (2002).

Asakura, M., Kitakaze, M., Sakata, Y., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogida, H., Liao, Y., Node, K., Takashima, S., Tada, M. & Hori, M. Adenosine-induced cardiac gene expression of ischemic murine hearts revealed by cDNA array hybridization. *Circ J* 66, 93-6 (2002).