

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 USA* 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 目加田 英輔 大阪大学微生物研究所 教授

研究要旨

我々はジフテリア毒素の受容体としての HB-EGF とその膜からのプロセシングの研究を行ってきた。主任研究者らの HB-EGF の膜からの遊離の阻害が心筋肥大の抑制に働くとの報告により、HB-EGF 及びそのプロセシングと心筋代謝とのかかわりが明らかになった。我々は HB-EGF の各種の遺伝子改変マウスの作成を行った。HB-EGF の欠損マウスは心筋障害を起こし早期に死亡することが示され、HB-EGF の心臓での重要な役割が遺伝子改変マウスの研究からも明らかになった。

A. 研究目的

HB-EGF 遺伝子改変マウスを作成し、心臓における HB-EGF の機能を明らかにする。

B. 研究方法

相同組みかえ法を用いて HB-EGF の遺伝子が欠損するマウスを作成した。具体的には HB-EGF のエクソン 1-3 までを含む領域を lox 配列で囲んだ HB-EGF cDNA で置換したターゲティングベクターを作成した。このベクターを ES 細胞に導入し相同組み換えによりゲノム内に導入した。そこから作成したキメラマウスを掛け合わせることで、HB-EGF のゲノム配列が lox で挟んだ HB-EGFcDNA で置換されたマウスが作成できた。このマウスをさら Cre を発現するマウスと掛け合わせることで全身において HB-EGF が欠損するマウスを作成した。

〈倫理面への配慮〉

ある特定の遺伝子を欠損するマウスを作

成することは近年蛋白の機能解析とくに疾患とのかかわりを知る上で重要な手段となりつつある。現に疾患の理解と治療法の開発に大きく貢献しており、またこれにかわり生体において適切に蛋白の解析、疾患の理解につながる方法は存在しない。特に特定の表現型を示したマウスはその疾患の病態を解明する手がかりとなる上に治療薬の敏速なスクリーニングを可能とする。一方、遺伝子を改変したマウスを作成することはマウスにとっては不利益なこともおおく、いたずらに作成することは厳に慎まなければならない。我々はその蛋白の解析に必要なと思われる最低限を作成使用するよう心がけている。特にマウスに苦痛を生じるとされる表現型が出現したときにはその苦痛を最大限軽減する努力を行なった。またどうしても回避できない苦痛が生じると予想される場合には、安楽死する方法を選択した。動物実験のプロトコール等は施設のガイドラインにのっとり適切に行なった。

C. 研究結果

HB-EGF を欠損したマウスは一部を除き正常に発生した。HB-EGF を全身で欠損することは全身の組織での northern blotting により検討した。このマウスは生後 4 - 6 週の時期から徐々に心不全をきたし、早期に死亡した。心臓はこの経過で著明に拡大し、収縮性が進行性に低下した。驚いたことに全身で HB-EGF を欠損したマウスであるにもかかわらず表現型が現れたのは心臓のみであり、改めて心臓における他の EGF ファミリーリガンドにはない HB-EGF の心臓特異的な作用が明らかになった。組織では心筋の変性像は見られるものの炎症細胞浸潤、血管の異常等は見られず、心筋細胞自体の代謝不全がその病態の本質と考えられた。

D. 考察

HB-EGF の欠損マウスが心筋細胞の変性脱落を伴うヒト拡張型心筋症類似の表現型を示したことは、このモデルが心不全のモデルとして使用できるということのみならず、HB-EGF 自身が心筋の代謝に必須であることを示唆している。しかし HB-EGF が実際に生体内でいかに発現制御されているか、どの受容体を利用しているか、実際のヒト拡張型心筋症の病態にいかに関与しているか等解き明かさなければならぬ問題も多い。我々は今後さらに違った HB-EGF 遺伝子改変マウスの作成を行い HB-EGF の生化学的解析をマウスを通じて行なうことによって、心筋代謝と HB-EGF の関係を明確にしていこう予定である。

E. 結論

HB-EGF を全身で欠損するマウスはヒト拡張型心筋症類似の表現型を示したことから心筋代謝における HB-EGF の重要性が示唆された。

F. 健康危険情報

現在まで有害事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takenobu, H., Yamazaki, A., Hirata, M., Umata, T. & Mekada, E. The stress- and the inflammatory cytokine-induced Ectodomain shedding of heparin-binding EGF-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from TPA-induced and LPA-induced signaling cascades. *J Biol Chem* (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).

Yu, X., Sharma, K. D., Takahashi, T., Iwamoto, R. & Mekada, E. Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell* 13, 2547-57 (2002).

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 東山 繁樹 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

マクロファージから線維芽細胞増殖因子として HB-EGF を精製して以来、一貫してその生化学的解析を行なってきた。本研究班では特に HB-EGF の膜からの遊離の病態的意義、遊離をきたす酵素の同定及び生化学的解析を中心に、HB-EGF の心臓における役割を検討した。HB-EGF 遺伝子改変マウスにおける心臓の表現型はこの増殖因子の心臓での重要な役割を強く示唆し、特にその膜からのプロセッシングは心筋代謝に必須のシグナルであることが示された。またあらたに HB-EGF の細胞内ドメインに結合する蛋白を同定し心臓における生化学的意義を検討中である。

A. 研究目的

HB-EGF 及びそのプロセッシング酵素の生化学的解析を通じて、HB-EGF 遺伝子改変マウスにおいて生じた心筋代謝不全のメカニズムを解明する。

（倫理面への配慮）

細胞を使用した実験が中心であり、倫理面の問題はないと思われる

B. 研究方法

主任研究者により、メタロプロテナーゼ阻害剤による心肥大抑制作用が示されその過程に HB-EGF のプロセッシングがシグナルとして関与することが示された。そこで HB-EGF の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインと結合する蛋白を酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングを行なった。さらにここで同定された ADAM12 のメタロプロテナーゼ阻害剤との結合を証明する。さらにアデノウイルスベクターにより ADAM12 及びその dominant negative 体を導入し、心筋における ADAM12 の役割を検討した。

C. 研究結果

HB-EGF の細胞内ドメインとの結合蛋白のスクリーニングによりメタロプロテナーゼファミリーに属する ADAM12 が同定された。実際に、ADAM12 を細胞に強制発現させると HB-EGF が切断されることが示された。さらに心臓においても ADAM12 が HB-EGF のプロセッシング酵素として働いているかをラット培養心筋細胞に ADAM12 の dominant negative 体を導入することにより検討した。酵素活性部位を欠く ADAM12 を心筋細胞に強制発現させると、G 共役型受容体による HB-EGF のプロセッシングを介する EGF 受容体のリン酸化が抑制された。また心筋肥大を抑制する効果の見られたメタロプロテナーゼ阻害剤 KBR-7785 は ADAM12 と直接結合することが biotin 化した KBR-7785 と細胞に

発現させた ADAM12 の結合実験により明らかとなった。

D. 考察

心筋肥大、心不全の病態に HB-EGF がどの程度関与しているかは未だ不明の点が多い、しかし、多くの他の EGF 受容体のリガンドを欠損したマウスは心臓になんら表現型を示さないのに比し、HB-EGF 遺伝子改変マウスの心臓での表現系は非常に顕著で HB-EGF の生化学的解析を進めることは心筋細胞の代謝を考える上で重要と思われる。今回我々は HB-EGF のプロセシング酵素として ADAM12 を同定したが他のメタロプロテナーゼもそのプロセシングに関わることも考えられる。さらに強い心筋肥大抑制作用を *in vivo* でも *in vitro* でも発揮するメタロプロテナーゼ阻害剤 KBR-7785 が他のメタロプロテナーゼを阻害した可能性も否定できない。現在心臓における他の ADAM ファミリー酵素の発現のスクリーニング、HB-EGF の細胞内ドメインに結合する新たな蛋白の同定をすすめており、HB-EGF の心筋代謝における役割をさらに検討する予定である。

E. 結論

EGF 受容体のリガンドである HB-EGF が心筋代謝に特異的な重要なシグナルを担うことを明らかにした。HB-EGF の膜結合ドメイン細胞内ドメインと結合する蛋白を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングすることにより HB-EGF の膜からの遊離酵素 ADAM12 を同定した。

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).

Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Nabeshima, Y., Asano, M., Iwakura, Y. & Sehara-Fujisawa, A. Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 55-61 (2003).

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Inui, Y., Yoshida, Y., Sawai, Y., Umeki, S., Ito, N., Yamada, A., Miyagawa, J., Higashiyama, S., Iwawaki, T., Saito, M., Taniguchi, N., Matsuzawa, Y. & Kohno, K. Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 124, 701-7 (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).

Yoshinaka, T., Nishii, K., Yamada, K., Sawada, H., Nishiwaki, E., Smith, K., Yoshino, K., Ishiguro, H. & Higashiyama, S.
Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene* **282**, 227-36. (2002).

Murayama, Y., Miyagawa Ji, J., Shinomura, Y., Kanayama, S., Isozaki, K., Yamamori, K., Mizuno, H., Ishiguro, S., Kiyohara, T., Miyazaki, Y., Taniguchi, N., Higashiyama, S. & Matsuzawa, Y.
Significance of the association between heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 in human gastric cancer. *Int J Cancer* **98**, 505-13. (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 豊福 利彦 大阪大学大学院医学系研究科 助手

研究要旨

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されると考えられるため、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。よって、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し、逆に HB-EGF がある状況においては心筋保護的に働くことを示唆する。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。

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。

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アーゼ阻害剤や 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

(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

Nakayama, H., Otsu, K., Yamaguchi, O., Nishida, K., Date, M. O., Hongo, K., Kusakari, Y., Toyofuku, T., Hikoso, S., Kashiwase, K., Takeda, T., Matsumura, Y., Kurihara, S., Hori, M. & Tada, M. Cardiac-specific overexpression of a high Ca²⁺ affinity mutant of SERCA2a attenuates *in vivo* pressure overload cardiac hypertrophy. *FASEB J* 17, 61-3 (2003).

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