

## 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 森部弘樹
- (5) 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。その結果、分泌型 HB-EGF が心臓の形成、心筋の機能維持に必須であることを明らかにした。

### 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）を生じる。心血管系に関係の深いアンギオテンシン 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 1-2 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

### 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。HB-EGF ノックアウトマウスの作成は、homozygote で致死的になる可能性も考え、Cre-lox システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスを、上記のノックインマウスと同様の方法で作成した。このマウスと CMV プロモータでドライブする Cre 遺伝子を持つトランスジェニックマウスを掛け合わせ、全ての組織において HB-EGF 遺伝子がノックアウトされたマウス (HB<sup>del/del</sup>) を作成した。

## 3. 研究成果

### (1) 遺伝子ターゲティングマウスの解析

#### (a) HB-EGF ノックアウトマウス：

HB<sup>del/del</sup> は、約 60% の個体が生後 1 週間以内に死亡した。残りの個体も多くは生後 4 月以内に死亡した。胎生期 (E19.5)、生後すぐ (P0)、生後 12 週 (P12w) のマウスについて、その異常を組織学的に詳しく解析したところ、P0、P12w の個体で著しい心臓の拡張、心筋細胞の肥大が認められた。また、Echocardiogram によって心機能を測定したところ、心室腔の拡張、収縮率の著しい低下が観察された。さらに、心筋の異常に加えて、心臓弁の異常が認められた。E19.5 のステージで観察すると、正常個体の弁に比べて明らかに厚みのある異常な形態の弁が観察された。この異常は動脈弁、房室弁の両方で認められた。以上のことから、HB-EGF は心臓の形態形成、心筋の機能維持にきわめて重要であることが明らかとなった。

HB-EGF が結合する受容体を明らかにするために、正常マウスの心臓に分泌型 HB-EGF を投与し、活性化される ErbB ファミリー分子を検討した。その結果、ErbB1, ErbB2, ErbB4 の活性化が認められた。また、HB-EGF を投与しない HB<sup>del/del</sup> マウスの心臓で定常的に活性

化されている ErbB ファミリー分子を調べたところ、ErbB2, ErbB4 のリン酸化が正常マウスに比べて減少していた。以上の結果とすでに報告のある ErbB ファミリー分子ノックアウトマウスの解析結果を考え合わせると、HB-EGF は ErbB1 のみならず ErbB2, ErbB4 の活性化にも関与していることが示唆された。

(b) 膜型 HB-EGF しか合成できないマウス :

膜型しか合成できないマウスは HB<sup>del/del</sup> と同様、著しい心臓の拡張、心筋細胞の肥大、異常な弁形成が認められた。このことから、心臓において分泌型 HB-EGF が重要であることが明らかとなった。

(c) 分泌型 HB-EGF しか合成できないマウス :

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った。生まれてくるマウスも少数あるが、皮膚に著しい過形成が認められた (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。以上のことから、膜型として合成された HB-EGF が調節を受けることなく全て分泌型に変換されると、組織の異常な過形成を引き起こし、致死的事となることが明らかとなった。

(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、「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る切断経路を見いだした。この反応には p38 MAPK が使用されており、JNK は関与していないことが示された。ストレス刺激によって誘導される HB-EGF の切断は、他の経路と独立して存在しており、使用されているプロテアーゼも異なってい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。ストレスによって HB-EGF の膜型から分泌型への転換が誘導されることから、ストレスによって引き起こされる血管、心臓疾患に HB-EGF が関与する、

という可能性を示唆する。

#### 4. 考察

HB-EGF ノックアウトマウスの実験結果から HB-EGF が心臓の形成や機能維持に必須の働きをし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命的な効果をもたらすことも明らかにされた。しかし、今回作成したノックアウトマウスでは、心筋の肥大、心臓の著しい拡張が認められるが、同時に動脈弁、房室弁にも異常が認められるため、心筋の肥大、心臓の拡張が心筋細胞で HB-EGF が欠失しているために起こった現象なのか、弁の異常によって引き起こされた二次的現象であるか不明である。今後は、心筋特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスとかけ合わせて、心筋特異的ノックアウトマウスを作成し、この点を明らかにしたい。

アンジオテンシン 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。これについてもさらに詳しい分子機構の解明が必要である。

これまでの実験で作成された遺伝子ターゲティングマウスは、HB-EGF が関係する循環器疾患の発症機構を明らかにするためにきわめて有用であると考えられる。これらのマウスを用いて、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、拡張型心筋症などの重篤な心疾患の治療法の開発を目指したい。

#### 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。これらのマウスは、心臓の拡張、心筋の肥大、心機能の大きな低下などの異常を示し、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

Takenobu, H., Yamazaki, A., Hirata, M., Umata, T. and 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.* in press.

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. and Mekada, E. HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3221-3226 (2003).

Kawashima, M., Doh-ura, K., Mekada, E., Fukui, M., Iwaki, T. CD9 expression in solid non-neuroepithelial tumors and infiltrative astrocytic tumors. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1195-1203 (2002).

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* 13, 2547-2457 (2002).

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.* 185, 1346-1350 (2002).

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., Munchiro, 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

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).

7. 知的所有権の取得状況

特許出願 2 件

「ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子遺伝子機能改変動物、スクリーニング方法、胚性幹細胞、並びに心不全予防および／または治療薬」

特願 2002-141791 号

「制癌剤」

特願 2002-299774 号