

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

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15年度 総括・分担研究報告書

平成16（2004）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

- 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
- Heparin-Binding EGF-Like growth factor and ErbB signaling is essential
for heart function 5
PNAS・MARCH18,2003・Vol.100・NO.6・3221-3226
- Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. 11
Nat Genet. 2004 Feb;36(2):123-30. Epub 2004 Jan 18
- Changes in myocardial gene expression associated with beta-blocker therapy
in patients with chronic heart failure. 19
J Card Fail. 2003 Dec;9(6):469-74.
- Canine DNA array as a potential tool for combining physiology and molecular
biology. 25
Circ J. 2003 Sep;67(9):788-92.
- Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental
abnormalities. 30
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):469-75. Epub 2003 Nov 03.
- Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes
nuclear export of PLZF. 37
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):489-502. Epub 2003 Nov 03.

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 …	51
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 …	53
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 …	55
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 …	57
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 …	59
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 …	62
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 …	64
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 …	66
豊福利彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	69

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
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・治療法の確立のために開始された。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、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、HB-EGF の心筋保護作用の検討、HB-EGF モノクローナル抗体の作成、ヒト血清中の HB-EGF の測定、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。昨年より、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も完成した。本年は HB-EGF の心筋障害保護作用に注目しそのメカニズムを生体内及び心筋培養細胞を用いて明らかにした。さらにあらたな HB-EGF 遺伝子欠損マウスを作成し、HB-EGF の心筋細胞代謝における役割を明らかにした。またこのマウスを免疫することにより、これまで作成困難であった、HB-EGF のモノクローナル抗体の作成に成功した。現在この抗体を使用して高感度 ELISA を作成しており、今後ヒト血液サンプルにおいて血中 HB-EGF 濃度を測定し、心不全との関係を明らかにする予定である。それらと平行して、HB-EGF 及びその受容体の遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症様の病態を示したことにより、自然発症ヒト拡張型心筋症においても HB-EGF シグナルの遺伝子変異が関与する可能性が示唆された。そこで96名の心不全患者の HB-EGF 関連遺伝子の多型解析もおこなった。

分担研究者 友池仁暢

国立循環器病センター
院長

宮武邦夫

国立循環器病センター
副院長

駒村和雄

国立循環器病センター
室長

村松正明

東京医科歯科大学
教授

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

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

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C57BL/6に均一化したものを実験に使用している。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。この生存曲線は非常に均一であるのでこの心不全死をエンドポイントとして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。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、より正確な効果判定を行なう。

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

本研究の心不全マウスモデルではEGF受容体のシグナル異常が心不全を引き起こした可能性が高い。そこで心臓でのEGF受容体シグナルの重要性を検討するため、現在EGFファミリーの増殖因子の心臓での発現を増強させたマウスを作成中である。HB-EGF, EGF, TNF- α , neuregulin1 のcDNAを心臓特異的プロモーター下に置いたマウスを作製した。心不全マウスとの交配により救済できるかを検討することにより心不全発症におけるEGF受容体シグナルの重要性を検討する。

3) 心筋細胞の生存因子(サバイバルファクター)としてのHB-EGFの解析

① 培養心筋細胞におけるHB-EGFの生存因子としての役割

正常マウス及び心不全マウスより得られた培養心筋細胞を利用して、HB-EGFが生存因子として働くメカニズムを検討する。生直後マウスから得られた心筋細

胞を使用して、薬剤に対する反応性、老化の進行、EGF状態シグナルの活性化等を検討することにより心筋細胞の機能維持機構を探る。

② マウス心筋障害後のHB-EGFの心筋保護作用の検討・心不全治療薬としての応用

薬剤性心筋症モデル、自己免疫性心筋炎モデル、虚血性心筋障害モデル、圧負荷心不全モデル等のマウスを使用して、生体内で実際にHB-EGFが心筋保護的に作用するかを検討する。HB-EGFは京都大学再生研の田畑より供与された徐放性ビーズと混ぜ投与し、2次性心筋障害にもHB-EGFが保護的に働くかどうかを検討する。

4) ヒト拡張型心筋症におけるHB-EGF及びその膜からの遊離酵素ADAM12のゲノム解析

主任研究者は厚生科学研究(ヒトゲノム・再生医療等)研究事業の一環として多くの心不全患者のゲノム解析を行なっている、このデータベースを利用して特にHB-EGFとその遊離酵素ADAM12の全エクソンの配列を同定するため、プライマーの条件検定を行なってきた、今後は家族性の拡張型心筋症を中心にHB-EGF及びADAM12の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行う。

(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を図る。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する。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 の心肥大における役割の検討

ラット培養心筋細胞において心筋肥大を引き起こすカテコラミンやアンジオテンシンなどの生理活性物質により EGF 受容体 1 がリン酸化されることが示された。またこの EGF 受容体のリン酸化はメタロプロテアーゼ阻害剤 KBR-7785 によって阻害された。KBR-7785 はマウス大動脈縮窄モデルやカテコラミン投与モデルなどの *in vivo* 心筋肥大モデルにおいてもその肥大抑制作用を有した。以上のことにより様々な心筋肥大シグナルの共通の過程として増殖因子 HB-EGF の膜からの遊離が関与し、その遊離を阻害するメタロプロテアーゼ阻害剤によりこの肥大反応は抑制されることが明らかになった。さらに HB-EGF を膜から切断する酵素として ADAM12 を同定し、心筋において ADAM12 の dominant negative 体を強制発現させることにより、心筋肥大反応が抑制されることを明らかにした。

2) HB-EGF 遺伝子改変心不全モデルマウスの確立及びこの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

心筋における HB-EGF の働きを明確にするために HB-EGF の膜から遊離されないマウス、HB-EGF を発現しないマウスを作成した。これらのマウスは生後4週ごろより徐々に心拡大と心筋収縮不全をきたし早期に死亡した。全身における HB-EGF 欠損マウスを作成したにも関わらず、心筋のみに表現型を見たことは HB-EGF の心筋代謝における重要性を強く示唆する。組織像では進行性に心筋変性をきたし、炎症細胞浸潤や血管の異常を伴わないことからヒト拡張型心筋症と類似の病態と考えられた。そこでこのマウスを心不全自然発症マウスとして薬剤や他の治療法のスクリーニングに利用するため遺伝的背景を均一にすることに専念した。それぞれのマウスを C57BL6J, 129 の各系統に5代以上純化させたところ BL6 のマウスではほぼ均一となった。実際100個サテライトマーカ―を使用したタイピングによりほぼ100%のマーカ―が BL6 となっていることを確かめてい

る。現在各種薬剤によりスクリーニングを開始している。

3) 心筋症モデルマウスの心不全発症のメカニズムの解明

①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

上記の各 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。

現在 HER1, 2, 3 を活性化させるが HER4 を活性化させない TGF- α 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。掛け合わせと遺伝的背景の統一化で本年度は終了したが、次年度は解析が可能となると思われる。

②マウス心筋障害後の HB-EGF の心筋保護作用の検討・心不全治療薬としての応用

生体内で大量リコンビナント蛋白を使用するため精製度の高いリコンビナント蛋白を精製する必要がある。本年は昆虫細胞を利用した系でマウス及びヒト HB-EGF を大量作成、イオン交換樹脂と逆相カラムの組み合わせによりエンドトキシンの含有の極めて低い、精製度の高いリコンビナント HB-EGF を mg 単位で精製できた。最初に薬剤性心筋症モデル (doxorubicin 投与心不全モデル) を使用して、生体内で実際に HB-EGF が心筋保護的に作用するかを検討した。HB-EGF は京都大学再生研の田畑より供与された徐放性ビーズと混ぜ投与したが現在のところ高容量での短期間の心筋障害には HB-EGF は保護効果を示さなかった。しかし、ラット心筋細胞では過酸化水素、ドキシソルピシンによる心筋障害を HB-EGF は抑制した。また HB-EGF 強制発現マウス、野生型マウス、HB-EGF 遺伝子欠損マウスにおいてドキシソルピシン腹腔内投与による心筋障害を作成すると、野生型に比し、HB-EGF 強制発現マウスでは軽度の、HB-EGF 欠損マウスではより重度の心筋障害をきたした。このことより HB-EGF は心筋細胞障害時に心筋保

護的に働くことが示された。さらにこの保護メカニズムを検討するために、心筋細胞に UV, DNA 障害薬剤によりアポトーシスを生じさせ、HB-EGF の心筋保護作用を検討した。HB-EGF はこれらの障害時の p53 の蛋白量を有意に抑制した。これらの事実は非分裂細胞である心筋細胞においてもセルサイクルにかかわるこれらの因子がアポトーシスにいたるシグナル経路を担っており、HB-EGF などの増殖因子はこのシグナルを調整していることが示された。今後はより普遍的な心筋障害モデルを使用して、*in vivo* での p53 を含めたシグナリング分子をモニターしながら、HB-EGF の心筋細胞保護作用のメカニズムを解明する予定である。

D. 考察

本年度の研究により、心筋細胞における HB-EGF の心筋保護作用がより明確になったと思われる。HB-EGF のシグナル関連の阻害が心筋代謝の重大な障害につながるという事実は、我々の動物モデル、さらには臨床における EGF 受容体阻害剤の作用から見て明らかであったが、HB-EGF そのものが心筋保護作用を持つかは不明であった。今後は HB-EGF の直接投与により、心筋障害が治療可能か、実際の心不全症例ではどの程度 HB-EGF が病態に関与しているかを検討する予定である。

E. 結論

EGF ファミリーのリガンドの一つである HB-EGF がほかの増殖因子にはない特異的生理作用を心筋細胞に対して及ぼすことが明らかになった。HB-EGF は今後新しいタイプの心不全治療薬となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 U S A 100, 3221-6 (2003).

2. Asano, Y., Takashima, S., Asakura, M., Shintani, Y., Liao, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogai, A., Fukushima, T., Oikawa, Y., Okazaki, Y., Kaneda, Y., Sato, M., Miyazaki, J., Kitamura, S., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Hori, M. Lamri functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-30 (2004).

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

20030815

以降 P.5－P.50までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P.69の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
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

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体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及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、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

家族性の拡張型心筋症発端者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが 6 つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが 20 以上存在するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法

は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の 2 家系の発端者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつきり現在この家系及び健常人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADAM12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながると期待される

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上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

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

1. Komamura, K., Iwai, N., Kokame, K., Yasumura, Y., Kim, J., Yamagishi, M., Morisaki, T., Kimura, A., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Miyatake, K. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. J Hum Genet 49, 129-33 (2004).

2. Asakura, M., Takashima, S., Asano, Y., Honma, T., Asanuma, H., Sanada, S., Shintani, Y., Liao, Y., Kim, J., Ogita, H., Node, K., Minamino, T., Yorikane, R., Agai, A., Kitamura, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Canine DNA array as a potential tool for combining physiology and molecular biology. Circ J 67, 788-92 (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

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
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

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体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及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、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

家族性の拡張型心筋症発端者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが 6 つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが 20 以上存在するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法

は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の 2 家系の発端者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつかっており現在この家系及び健常人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADAM12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながると期待される。

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上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

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

1. Yasumura, Y., Takemura, K., Sakamoto, A., Kitakaze, M. & Miyatake, K. Changes in myocardial gene expression associated with beta-blocker therapy in patients with chronic heart failure. J Card Fail 9, 469-74 (2003).

2. Asakura, M., Takashima, S., Asano, Y., Honma, T., Asanuma, H., Sanada, S., Shintani, Y., Liao, Y., Kim, J., Ogita, H., Node, K., Minamino, T., Yorikane, R., Agai, A., Kitamura, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Canine DNA array as a potential tool for combining physiology and molecular biology. Circ J 67, 788-92 (2003).

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(難治性疾患克服研究事業)
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

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体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及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、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

家族性の拡張型心筋症発端者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが 6 つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが 20 以上存在するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法

は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の 2 家系の発端者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつきり現在この家系及び健常人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADAM12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながると期待される

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上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

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

1. Komamura, K., Iwai, N., Kokame, K., Yasumura, Y., Kim, J., Yamagishi, M., Morisaki, T., Kimura, A., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Miyatake, K. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 49, 129-33 (2004).

2. Asakura, M., Takashima, S., Asano, Y., Honma, T., Asanuma, H., Sanada, S., Shintani, Y., Liao, Y., Kim, J., Ogita, H., Node, K., Minamino, T., Yorikane, R., Agai, A., Kitamura, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Canine DNA array as a potential tool for combining physiology and molecular biology. *Circ J* 67, 788-92 (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

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
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 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体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及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、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

家族性の拡張型心筋症発端者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが 6 つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが 20 以上存在

するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の 2 家系の発端者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつきり現在この家系及び健康人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADAM12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながると期待される

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上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

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

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(難治性疾患克服研究事業)
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 堀 正二 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

高齢化社会の進展に伴い、心不全患者は急速に増加しつつある。保健衛生の観点からも大きな問題となっており、そのメカニズムの解明、新規の治療法の開発が必要である。心筋細胞は生後まもなくその分裂・増殖を停止し、一度失われた心筋は補充されることなく収縮性のない線維性組織に置き換わる。虚血・炎症・高血圧などの心臓への負荷は、心筋本来がもつ遺伝性素因とあいまって心筋細胞死へとつながる。しかし心筋細胞の代謝・生死には増殖する細胞とはまた別のメカニズムが存在することが予想され、多細胞と別個の経路の存在が示唆される。

EGFファミリーに属する増殖因子HB-EGFはこれらの心筋代謝に非常に重要な役割を担うことが主任研究者らの成果により明らかになりつつある。カテコラミンβ受容体刺激剤・アンジオテンシンIIなどのG蛋白共役型受容体リガンドの心筋細胞におけるシグナルにこのHB-EGFの細胞膜からの遊離が関与する。これらの生理活性物質は、全身の循環動態に影響を与える代表的な生理活性物質である。また心筋に直接作用して、細胞の肥大や組織のリモデリングに関与する。HB-EGFは心筋細胞上においてこれら生理活性物質の作用を受けると細胞膜からメタロプロテアーゼによる分解を受けて遊離し、細胞外からEGF受容体を刺激する。すなわち生理活性物質による生理作用の一部をHB-EGFが担っていることが示唆された。しかし増殖因子であるHB-EGFが生理活性物質の生理作用のどの程度を担っているかは明らかでなかった。実際G蛋白共役型受容体の刺激はHB-EGF以外にも多くの細胞内シグナルを動かすことが知られている。そこで今回はカテコラミンβ受容体刺激剤・アンジオテンシンIIなどによって変化するシグナル因子のどの程度がHB-EGFの膜からの遊離を介するEGFの受容体刺激を介するかを検討した。さらに最近のHB-EGF遺伝子改変マウスの解析によりHB-EGFが心筋代謝に必須の因子であることが示された。HB-EGFの細胞膜からの遊離を阻害したマウス及びHB-EGF欠損マウスはともに早期に心筋細胞死をきたし、心不全で死亡する。また心筋障害性の抗がん剤であるドキソルビシンとHB-EGFで活性化されるEGF受容体の一つであるErbB2の中和抗体を同時投与することによりさらに高率に心不全が発症することが報告されている。これらの事実はHB-EGFを介するシグナルが心筋の生存に必須であり、特に心筋障害時には保護的に働くことが示唆する。今回の検討ではこのドキソルビシンによる心筋障害をHB-EGFが抑制するかを検討し、そのシグナルメカニズムの一部を明らかにした。

A. 研究目的

I. 増殖因子HB-EGFの細胞膜からの遊離が心筋細胞の肥大シグナルにどの程度関与するかを明らかにする。

II. 心筋代謝・生存におけるHB-EGFの重要性を検討する。

II. Doxorubicin 障害を受けた心筋細胞をHB-EGFによって保護できるか、細胞生存率及び細胞内シグナルの変動により検討した。

(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。

B. 研究方法

I. 新生仔ラット心筋細胞において、心筋肥大の重要な誘導因子であるPhenylephrine刺激時のMAPK変化及びc-fos発現を検出し、HB-EGFの膜からの遊離を介するシグナル経路がどの程度関与するかを明らかにした。

C. 研究結果

I. Phenylephrine刺激時の心筋細胞の肥大シグナルにおいて、HB-EGFを介するEGFRのHB-EGF等を介するTransactivationはMAPKレベルで5割、c-fos発現レベルで2~3割と非常に重要な役割を果たすことが証明された。

II. Doxorubicin 障害心筋細胞は HB-EGF により細胞生存率が有意に上昇した。また HB-EGF は p53 より上流で心筋細胞死抑制作用を担うことが明らかになった。

D. 考察

G 蛋白共役型受容体 (GPCR) は介するシグナルは心筋のみならず多くの臓器で強い生理活性をもつ。心臓においても特にカテコラミン類は強い陽性変力作用を有し、臨床でも汎用されている。一方過剰なカテコラミン刺激は逆に心機能を悪化させ長期予後が悪くすることが知られている。実際、カテコラミンβ遮断剤は現在心不全治療には必須の薬剤でありその効果は明らかである。しかし、その心機能改善効果のメカニズムはいまだ不明であり、カテコラミン刺激に伴うシグナルの研究が積極的に行われてきた。なかでもカテコラミンによる心筋肥大にかかわるシグナルは心不全の形成にも重要なシグナルと考えられ、ERK, JNK 等の MAPK が強く関与することが知られていた。今回の検討ではこのカテコラミンによる刺激が、GPCR を介して直接 MAPK を刺激するのではなく、いったん細胞膜から遊離した HB-EGF を介してもう一度 EGF 受容体の刺激を介して細胞内に入り ERK, JNK を活性化することが明らかになった。この transactivation は短時間に蛋白合成を伴わずにおきるため、GPCR から直接入ったシグナルと区別することが困難である。今回の検討では HB-EGF の細胞からの遊離を阻害する KBR-7785 により特異的にこの transactivation の経路を阻害し、GPCR 刺激による MAPK 活性化の約半分のシグナルが HB-EGF を介することが明らかになった。本来心筋細胞における GPCR は短時間の Ca 流入を伴う収縮性の増加など短時間の細胞機能に関与すると考えられていた。GPCR 刺激による EGF 受容体の活性化は本来増殖因子の作用と考えられていた機能、例えば細胞増殖や肥大といった生理活性を GPCR リガンドが持つ時の一般的なシグナルモデルとも考えられる。また細胞外に一旦だされる、このユニークなシグナル伝達経路はその阻害が比較的容易である。今後このシグナルを抑制することにより細胞機能にどのような影響が出るかを検討することにより、心筋以外の細胞でも GPCR リガンドのあらたな機能メカニズムが明らかにされると期待される。

E. 結論

HB-EGF は数ある EGF 受容体リガンドの一つでありながら、その心臓における特異的な役割が示唆されている。それは全身の HB-EGF の遺伝子欠損マウスが心臓にだけ著明な変性像をきたしたことから明らかである。今回は代表的な心毒性薬剤である Doxorubicin (Dox) によって心筋障害を作成し HB-EGF の保護効果を検討した。Dox はアントラサイクリン系の抗生物質であり、急性白血病、悪性リンパ腫や癌に対して効果的である。しかしながら Dox は容量依存性の不可逆的慢性心筋毒性を引き起し、拡張型心筋症様の鬱血性心不全になるため臨床使用は制限されている。広く研究されているにもかかわらず、Dox の心臓毒性メカニズムはまだ完全には明らかにされていない。心筋細胞において Dox がアポトーシスを引き起こしたという報告も出ている一方、Dox によるアポトーシスは *in vivo* 或いは *in vitro* において観察されなかったとの報告もある。実際、Dox によって筋原線維システムの障害と細胞内オルガネラの障害、すなわち不可逆性のミトコンドリア機能の低下、リソソームの活性化、そしてリソソーム酵素の流出が起こることは良く知られている。このように Dox の薬理的機構による心筋細胞の構造や機能の変化は広く研究されているが、そのシグナリング機構の検討はされていない。また近年、心筋細胞のサバイバルとアポトーシスにおけるストレス関連経路が、心不全の進展に非常に重要であることが明らかになった。今回は Dox による DNA 障害が p53 を介してアポトーシスを起こしうることに注目しそのシグナルを HB-EGF が抑制するかどうかを検討した。HB-EGF はある濃度の Dox による心筋障害を顕著に抑制した。また同じ濃度の Dox で誘導される p53 の発現を抑制し、caspase-3 の活性化を介するアポトーシス経路を抑制することを明らかにした。増殖因子のシグナルが p53 の上流で作用する報告はいままでなく、興味深い。今後 ATM, ATR や Mdm2 と EGF 受容体を介するシグナルがどう関係するかを検討する予定である。近年開発された EGF 受容体の一つである ErbB2 の中和抗体 (traumazb) が臨床応用されている。この薬剤は強い抗腫瘍効果を有するが強い心毒性を有することが報告された (文献)。この心毒性はドキソルビン等の心筋障害性の抗がん剤と併用することでさらに増強される。このことは EGF 受容体を介するシグナルが心筋代謝・心筋生存に非常に重要なシグナルであることを強く示唆する。今回の検討では、HB-EGF の心筋保護効果は明確になり、心不全の治

療への可能性も示唆された。現在同じ増殖因子である IGF も心不全への臨床試験が開始されている、心臓におけるその特異的作用からも HB-EGF は不全心筋のアポトーシス予防に有効に作用する可能性がある。今後は *in vivo* のモデルも含めて心不全治療薬としての HB-EGF の可能性が追求されるものと期待される。

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

1. 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 U S A* 100, 3221-6 (2003).

2. Asano, Y., Takashima, S., Asakura, M., Shintani, Y., Liao, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogai, A., Fukushima, T., Oikawa, Y., Okazaki, Y., Kaneda, Y., Sato, M., Miyazaki, J., Kitamura, S., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Hori, M. Lamin functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-30 (2004).

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

ヒト増殖因子 HB-EGF はその細胞膜結合型のタイプがジフテリア毒素の受容体として知られている。生体内では HB-EGF は膜結合型として主に存在し、必要時に刺激に応じて切断され、可溶性タイプとして EGF 受容体と結合する。このプロセッシングの最終段階は各臓器により厳密にコントロールされていることが明らかになりつつある。我々はこの HB-EGF の細胞膜からの遊離の重要性を検討するため、HB-EGF が細胞膜から遊離されないマウス及び遊離型の HB-EGF のみ発現するマウスを遺伝子改変により作成した、両マウスとも全身の HB-EGF を変異させたにも関わらず、特に心臓にその表現型が現れたことより、心臓においては HB-EGF が他の EGF ファミリーでは代用されない特異的作用を有することが示唆された。

A. 研究目的

増殖因子 HB-EGF の細胞膜からの遊離の生理学的意義を遺伝子改変マウスを用いることにより検討する。

B. 研究方法

HB-EGF が細胞膜から遊離されないマウスの作成は HB-EGF マウス遺伝子を変異導入して細胞膜から切れないことを確認したあるいは細胞内ドメインの存在しない HB-EGFcDNA と入れ替えた。

(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を図る。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する。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

HB-EGF が細胞膜から遊離されないホモマウスは興味深いことに、全身で HB-EGF が遊離されないにも関わらず、ほぼ心臓にだけ表現型が表れた、生後 8 週間くらいより心筋細胞は徐々に変性・脱落し生後 140 日でおよそ半数のマウスが心不全にて死亡した。さらに HB-EGF の遊離型のみが発現するマウスはキメラマウスの段階で胎児期死亡し、著明な心肥大と皮膚の異常をきたした。

D. 考察

HB-EGF は全身で発現する増殖因子であるがその心筋における役割は特に重要であることが示唆された。生後心臓が形成されたあとであってもその機能維持には必須であることが明らかになった。またこのマウスが拡張型心筋症と類似の表現型を示したことにより、HB-EGF がヒトにおいても心不全の原因遺伝子と