

なりうることが示唆された。またその遊離型の心筋肥大作用は著明で HB-EGF が心肥大またはそれにつながる心不全の発症に関与することが示唆された。

E. 結論

増殖因子 HB-EGF は心臓において特異的重要な代謝シグナルを担っており、その作用は細胞膜からの遊離によって調整されている。そのシグナルの異常は心臓にとって重大な機能不全の原因となる。

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. Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G. & Mekada, E. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163, 469-75 (2003).

2. 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. 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

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 東山 繁樹 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

我々は HB-EGF の発見当初よりその生化学的解析を進めてきた。最近、主任研究者らにより HB-EGF の細胞膜からの遊離が心筋代謝に重要な役割を担うことが示された。今回は HB-EGF が細胞膜から遊離した際にどういったシグナル経路が作用するかを、その C 末端部に注目して解析をおこなった。HB-EGF の C 末端部は HB-EGF がメタロプロテアーゼにより分解されたあと核に移行し、新たな、シグナル経路を動かすことを明らかにした。心臓においては HB-EGF は G 共役型受容体のリガンドにより刺激を受け細胞膜から遊離されることが知られており、遊離した HB-EGF による心筋肥大が報告されている。しかし、HB-EGF の細胞膜に残された C 末端部も異なるシグナルを担うことが示されたため、心筋細胞代謝におけるこの HB-EGF の C 末端部の役割も今後検討する。

A. 研究目的

HB-EGF が細胞膜からプロテアーゼにより分解されたあと細胞膜に残された C 末端部がいかなる蛋白機能を有するかを検討した。

B. 研究方法

HT1080 細胞に導入した C 末端部に蛍光標識 HB-EGF を TPA 処理により細胞膜から遊離させ、蛍光追跡することにより C 末端部の細胞内分布を検討した。

さらに HB-EGF の C 末端部と結合する蛋白を yeast two-hybrid 法により同定しその細胞機能を解析した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使用した実験のみであり倫理上の問題は無いものと思われる。

C. 研究結果

C 末端部に蛍光色素を導入した HB-EGF (HB-EGF-C) は TPA 処理後に細胞膜から遊離し、核に移動することが示された。また核に移動した HB-EGF-C は promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) 蛋白と結合することが明らかとなった。PLZF と結合した HB-EGF-C は PLZF を積極的に核外に排出し、PLZF の cyclinA 抑制作用を減弱させることが示された。これらのことは HB-EGF の C 末端部は HB-EGF が細胞外へ遊離したあと、核内に移行することにより、全く別のシグナル経路をとるが、細胞分裂に関しては HB-EGF と協調的に働くことが示された。

D. 考察

増殖因子が細胞膜から遊離され、リガンドとして働くだけでなく、その切れ端と思われる部分が新たな生理作用を持つことは興味深い。心臓においてもこの新たなシグナル経路がその代謝に関与していることが示唆され、今後検討を進めていく予定である。

E. 結論

HB-EGF の C 末端部は HB-EGF が細胞膜から遊離したあと核内に移動し、異なるセルサイクルを動かすシグナルに関与することが示された。

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

I. 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).

2. Iivanainen, E., Nelimarkka, L., Elenius, V., Heikkinen, S. M., Junttila, T. T., Sihombing, L., Sundvall, M., Maatta, J. A., Laine, V. J., Yla-Herttuala, S., Higashiyama, S., Alitalo, K. & Elenius, K. Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *Faseb J* 17, 1609-21 (2003).

3. Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Inui, Y., Yoshida, Y., Sawai, Y., Umeki, S., Ito, N., Yamada, A., Miyagawa, J., Higashiyama, S., Iwakaki, 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).

4. Madarame, J., Higashiyama, S., Kiyota, H., Madachi, A., Toki, F., Shimomura, T., Tani, N., Oishi, Y. & Matsuura, N. Transactivation of epidermal growth factor receptor after heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor shedding in the migration of prostate cancer cells promoted by bombesin. *Prostate* 57, 187-95 (2003).

5. Mori, S., Tanaka, M., Nanba, D., Nishiwaki, E., Ishiguro, H., Higashiyama, S. & Matsuura, N. PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Biol Chem* 278, 46029-34 (2003).

6. Nakano, N., Higashiyama, S., Ohmoto, H., Ishiguro, H., Taniguchi, N. & Wada, Y. The N-terminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity on angiogenesis. *J Biol Chem* 279, 11465-70 (2004).

7. Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K. & Higashiyama, S. Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol* 163,

489-502 (2003).

8. Nanba, D. & Higashiyama, S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 13-9 (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

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 豊福 利彦 大阪大学大学院医学研究科 助手

研究要旨

心臓に高血圧や炎症などの負荷がかかると心筋細胞は肥大することが知られている。心筋細胞を肥大させるシグナル分子として、G 蛋白共役型受容体リガンドであるアンジオテンシン II やカテコールアミンなどが知られている。これらを標的とした β 遮断薬やアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬などが降圧作用だけでなく、慢性心不全の治療にも有効であることから、心筋細胞が肥大するメカニズムを理解することが心不全の治療に繋がる可能性が示唆される。

アンジオテンシン II などの肥大刺激は直接肥大を引き起こすと考えられていたが、2002 年に肥大シグナルは部分的に増殖因子の一種である Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (以降、HB-EGF) を介していることが明らかとなった。さらに、HB-EGF が細胞膜から遊離しない遺伝子改変マウス(HB^{uc/uc}マウス)や、HB-EGF を全身で欠失させたマウス(HB^{del/del}マウス)を作製し、HB-EGF の *in vivo* での役割を検討した。これらのマウスは心筋肥大を起こさないばかりでなく著明な心筋細胞死をおこし心不全にて早期に死亡した。このことはHB-EGF は肥大シグナルにとって重要な因子であるが一方で心臓にとって不可欠な増殖因子であり、HB-EGF を介する心筋細胞の肥大は心機能低下に対する代償的な現象であって、心機能障害の原因ではないことが示唆された。そのため、HB-EGF が心筋細胞に対して、逆に保護的に働く可能性が示唆され検討することとした。

心筋障害モデルとしては定量的な障害が作成可能な薬剤性心筋障害を使用した。アントラサイクリン系の抗癌剤である Doxorubicin (以降、Dox) は DNA 傷害やフリーラジカルの産生を介して、心筋細胞に特異的に傷害をもたらす。臨床的にも心毒性があることが知られている。更に、乳癌に有効である Trastuzumab (抗ヒト ErbB2 抗体、商品名ハーセプチン) と併用すると、特に心不全など重篤な心機能障害を生じることが知られている。すなわち、EGF 受容体の一つである ErbB2 を介したシグナルを遮断すると心毒性が増すということから、ErbB2 を介したシグナルはドキソルビシンによる心筋細胞の障害からの保護に重要であると考えられる。ErbB2 は HB-EGF によりリン酸化されることが知られており、この事実からも HB-EGF が心筋保護的に働くことが示唆される。今回の検討ではラット培養心筋細胞を使用して薬剤性の心筋障害を HB-EGF が改善するか否かを検討しさらにそのシグナルメカニズムを検討した。

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 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を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シ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. Kamei, J., Toyofuku, T. & Hori, M. Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 380-7 (2003).

2. Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Suto, F., Kamei, J., Aoki, K., Yabuki, M., Hori, M., Fujisawa, H. & Kikutani, H. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev* 18, 435-47 (2004).

3. Zhang, H., Toyofuku, T., Kamei, J. & Hori, M. GATA-4 regulates cardiac morphogenesis through transactivation of the N-cadherin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1033-8 (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

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者氏名 = 北風 政史

所属機関名 = 国立循環器病センター 職名 = 部長

研究項目 = 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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
Iwamoto, R., Yamazaki, S	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
Asano, Y., Takashima, S.	Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice.	Nat Genet	36	123-30	2004
Yasumura, Y., Takemura,	Changes in myocardial gene expression associated with beta-blocker therapy in patients with chronic heart failure.	J Card Fail	9	469-74	2003
Asakura, M., Takashima,	Canine DNA array as a potential tool for combining physiology and molecular biology.	Circ J	67	788-92	2003
Yamazaki, S., Iwamoto, R.	Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities.	J Cell Biol	163	469-75	2003
Nanba, D., Mammoto, A.	Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF.	J Cell Biol	163	489-502	2003