

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満/糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

研究要旨 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。

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 水島寛人
- (3) 大阪大学 微生物病研究所 森部弘樹
- (4) 大阪大学 微生物病研究所 川渕真大

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的とする。

A. 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、

B. 研究方法

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
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。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては大阪大学動物実験指針に従っ
て実験を行った。

C. 研究成果

(1) 遺伝子ターゲティングマウスの解析

(a) 膜型 HB-EGF しか合成できないマウス：

プロテアーゼによって切断を受けない HB-
EGF を作成するために、マウス HB-EGF の ¹⁴⁸Leu
および ¹⁴⁹Pro をそれぞれ Ser, Thr に変換した
HB-EGF を作成した (HB^{uc})。HB^{uc} は wt HB-EGF と
同様細胞表面に発現したが、TPA 等の刺激を加
えても細胞外部分の切断がほとんど認められ
なかった。HB^{uc} をコードする cDNA をベースに、
HB^{uc/uc} ノックインマウスを作成した。作成した
マウス皮膚より分離した細胞で、再度 HB-UC
タンパクの発現と TPA による切断抵抗性を調
べ、培養細胞で調べた結果と同様に、マウス
個体中でも HB-UC は分泌型を生成しないこと
を確認した。次に、HB^{uc/uc} ノックインマウスの
心臓での異常を調べたところ、HB^{del/del} 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。

(b) 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 (HB^{ATM/ATM}) を作成した。このマウスでは、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。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。
心筋細胞の核の形態、HE 染色による染色性が
正常マウスと明らかに異なり、心筋の分化異
常が示唆された。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、致命的となることが明ら
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
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- δ 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。

D. 考察

HB-EGF ノックアウトマウス、ノックイン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あるが、この調節機構に異常が起こると、致死的な効果をもたらすことが明らかになった。

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はノックアウトマウスの解析からは不明である。現在我々は、これまで解析した HB-EGF ミュータントノックインマウスとは異なる変異を持つ HB-EGF ノックインマウスを作成し、その異常を解析中であるが、このマウスでは心臓弁の異常はあるが心室の拡張は認められないことから、ノックアウトマウスで見られる心臓の拡張は心筋細胞そのものが原因であると考えられる。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、この点をさらに詳しく解析したい。

アンジオテンシン II 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ットイングマウスは、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。

E. 結論

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。

F. 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.* 2003, 278: 17255-17262.

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. 2003, 100:3221-3226.

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. and
Mekada, E. Mice with defects in HB-EGF ectodomain
shedding show severe developmental abnormalities. J.
Cell Biol. 2003, 163: 469-475.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願 3 件

1. 「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
2. 「制癌剤」 特願 2003-355731 号
3. 「CD9/CD81 二重欠損非ヒト動物」 特願 2003-162916 号

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社