

200400836B

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14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 北風政史

( 国立循環器病センター )

平成17(2005)年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

- 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 .. 1  
北風 政史

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 14

### III. 研究成果の刊行物・別刷

- Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF:  
metalloproteinase inhibitors as a new therapy. .... 16  
Nat Med. 2002 Jan;8(1):35-40.
- Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various  
heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the  
brain and other tissues. .... 22  
J Biol Chem. 2002 Nov 15;277(46):43707-16.
- Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR)  
is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. .... 32  
Mol Biol Cell. 2002 Jul;13(7):2547-57.
- Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation  
by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease  
and protein kinase C-delta. .... 43  
Mol Cell Biol. 2003 Mar;23(5):1581-9.
- Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived  
heparin binding EGF-like growth factor. .... 52  
FASEB J. 2003 Sep;17(12):1609-21.

Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. ....	65
Mol Cell Biol. 2003 Jan;23(1):55-61.	
Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. ....	72
Circ Res. 2003 Oct 17;93(8):759-66.	
PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. ....	80
J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):46029-34.	
Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. ....	86
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):489-502.	
The stress- and inflammatory cytokine-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and lysophosphatidic acid-induced signaling cascades. ....	100
J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):17255-62.	
Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. ....	108
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):469-75.	
Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. ....	115
Nat Genet. 2004 Feb;36(2):123-30.	
Roles of charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF. ....	123
Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 23;320(2):376-82.	

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
総合研究報告書

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。3 年間にわたり、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 の測定用高感度 ELISA の作成、HB-EGF の発現制御解析を中心に研究をおこなった。本研究にてほぼ均一な時間経過で心不全をきたすマウスが作成され治療薬のスクリーニングも開始された。HB-EGF の新たな生化学的作用も分担研究者により明らかになった。さらに *in vitro* 及び *in vivo* の実験により HB-EGF の心筋保護作用が明らかになり今後臨床応用されることも期待される。ヒト心不全において HB-EGF の発現が上昇することも示され、そのプロセシング酵素の遺伝子変異も心不全症例で同定された。また、HB-EGF の発現制御にエピジェネティックな遺伝子制御が関与することが示された。HB-EGF の発見当初から関与した研究者たちのグループにて、生化学手解析、各種遺伝子改変マウスの作成、臨床にわたるまで、HB-EGF の心臓及び生体における役割を詳細に検討し、HB-EGF の心不全治療薬としての可能性、血中濃度測定による予後推測、病態把握の可能性を示した。

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研究所  
室長

村松正明  
東京医科歯科大学  
教授

高島成二  
大阪大学健康体育部  
助手

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

小粥 章子  
国立循環器病センター研究所  
室員

## A. 研究目的

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。

今回我々が確立したHB-EGF遺伝子改変拡張型心筋症モデルマウスは臨床経過、組織所見等がヒト拡張型心筋症と酷似している世界で初めてのマウス系統であり、しかも遺伝的背景が均一なマウスであるため経過、予後が一定しており、薬剤、新規治療法の敏速で正確な判定が可能となった。さらに本研究はこのマウスでの検討から得られたデータをもとに増殖因子HB-EGFを全く新規の拡張型心筋症治療薬として位置付け、心筋症の病態解明・治療法の確立をめざす。

HB-EGFの心不全治療薬としての可能性は以下の我々がすでに報告した事実により示唆される。

①HB-EGFは心筋細胞代謝に重要な因子の間シグナルに特異的に位置し、その活性阻害は*in vitro*でも*in vivo*でも心筋細胞の肥大の抑制にかかわる。

②HB-EGFの膜からの遊離を阻害したマウスは、心不全により早期に死亡した。すなわちHB-EGFは心筋細胞の生存・維持に必須である。

そこで本研究では以下の検討をおこなう。

- 1、HB-EGF遺伝子改変拡張型心筋症モデル動物を確立して、従来の薬物治療法・新規の心不全治療法のスクリーニングを行う。またその結果の解析を通じて心不全発症のメカニズムを解明すると共にヒトへの臨床応用を目指す。
- 2、上記モデル動物を他の遺伝子改変マウスと交配し、心不全病態を改善させるかを検討することにより、心不全の遺伝的背景について検索する。
- 3、HB-EGFの投与が上記モデル動物の心不全及び、他の心不全モデル動物の病態を改善させるかどうかを検討する。
- 4、HB-EGFの生化学的解析、特にその膜からの分離にかかわる因子の解明、心機能代

謝における役割の検討。

- 5、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。
- 6、HB-EGFを血中で測定するための高感度ELISAの確立。

## B. 研究方法

### 1) HB-EGFの細胞膜から分離・切断機構と生化学的意義の解明

HB-EGFの細胞膜からの分離はGPCR刺激を介する心肥大シグナル形成に重要な役割を担う。HB-EGFは合成された後、*in vivo*においては多くが細胞膜に結合した形で存在することが示されている。GPCR等を介する細胞外シグナルは細胞表面のメタロプロテアーゼの活性あげHB-EGFを細胞膜から遊離させる。本研究ではその切断メカニズムを解明するのみならず、HB-EGF切断後に細胞膜に残ったC末端部分のペプチドの機能解析をおこなった。興味深いことにHB-EGFのC末端部は切断反応後、核内に移行することが示された。これらのHB-EGF切断の生化学的解析及び生理的作用について検討をおこなった。

### 2) HB-EGF遺伝子改変マウスの作成・解析

HB-EGFの細胞外への分離切断の生理学的意義を*in vivo*で解析するために、多くのHB-EGF遺伝子改変マウスの作成をおこなった。現在までに作成した、HB-EGFを全身で欠損したマウス、HB-EGFが全身で細胞膜から分離切断されないマウスに加えて、さらに

- ①HB-EGFが心筋細胞でのみ欠損するマウス
- ②HB-EGFが心筋細胞でのみ細胞外に分離切断されないマウス
- ③HB-EGFを全身で過剰発現するマウス
- ④HB-EGFが心臓でのみ過剰発現するマウス
- ⑤HB-EGFの細胞膜貫通部分・細胞内部分を欠損したマウス(遊離型のHB-EGFのみを発現するマウス)

を作成しその心臓における表現型を解析した。

### 3) 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他5系統に均一化したものを実験に使用している。これらのマウスは進行性の心不全をきたし約20週で死亡する。継代を重ねると生存曲線は均一になりつつあるが系統によるばらつきはおおきく、均一な表現型を得られる系統の選別を行う。このマウスを使用して心不全死をエンドポイントとした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予定である。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。現在、最も安定した予後をきたすマウスにおいて120日生存率は50%であり、 $\beta$ 遮断剤を生後6週から投与することにより予後の変化を検討している。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。

### 4) 心筋症モデルマウスにおける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- $\alpha$ 、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、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。

### 5) 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。これまでの検討ではHB-EGFのシグナルにはHER1のみならずHER2が重要な働きをする可能性が示唆されており今後検討を進めていく。

#### 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。現在おもにドキシソルビシン投与による急性心筋障害がHB-EGFの投与により改善するかどうかを検討している。

### 6) 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。現在までに33例の発端者の遺伝子を解析した。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。

### 7) ヒト心不全患者での血中での HB-EGF 濃度測定・高感度 ELISA の作成

HB-EGF 遺伝子欠損マウスを利用して、高品質

のモノクローナル抗体を多数得ることができたので、これまで高感度の ELISA が確立できず測定できなかったヒト HB-EGF の血中濃度を測定し、心不全との関連を検討する。

#### (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。遺伝子解析のためのヒト心筋、ヒト血液の採取等に関しては各施設の倫理委員会の承認を得て解析を行った。特に患者情報に関する解析はすべて暗号化し、患者の特定につながる可能性があるデータ解析、サンプル調整は遺伝子解析と別のものが担当し、データ保存は特に厳格に行っている。常に心不全患者の利益・研究に対する理解と研究の手

順・成果を結びつけることが重要と考え、今後発生するであろうサンプル解析、心筋組織染色に関してもそのたびに患者の承認を得るように留意する。

#### C. 研究結果

##### 1) HB-EGF の心肥大における役割の検討・遊離分解された HB-EGF の生化学的解析

交付申請時においては HB-EGF の生理活性物質による細胞膜からの遊離作用は明らかになっていたが、その心臓における生化学的作用は不明な点が多くあった。平成 14 年度には、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。さらに平成 15-16 年度において、HB-EGF が細胞膜から遊離された際に細胞側にとどまる C 末端側の HB-EGF は核内に移動することが C 末端を蛍光ラベルした HB-EGF を追跡することにより明らかになった。この C 末端 HB-EGF は核内において premyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) による転写抑制を制御し、cell cycle の進行に関与することが示された。これらの HB-EGF の C 末端が cell cycle のない心筋細胞でいかなる機能を担っているかは今後の検討課題である。

## 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

生体内における HB-EGF の生理機能解析は今回の研究の主軸であり申請時には全く不明であった。平成 15 年、16 年度には心筋における HB-EGF の in vivo での生理機能を明らかにするために HB-EGF の細胞膜から遊離されないマウス、HB-EGF を発現しないマウスが作成された。これらのマウスは生後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 遺伝子改変マウスを作成したにも関わらず、両マウス系統において、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。HB-EGF 欠損マウスは表現型が強く、生後早期に死亡し、また生命予後のばらつきが大きかった。一方、HB-EGF が細胞膜から遊離しないマウスは生命予後が安定しており、ほぼ均一な心拡大、心筋変性を起こし心不全で死亡することが示された。

そこで平成 16 年度には、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の均一化を行った。それぞれのマウスを C57BL6J,129 の各系統に 10 代以上純化させた。実際 100 個サテライトマーカーを使用したタイピングによりほぼ 100% のマーカーが BL6 となっていることを確かめられた。しかし、生命予後に関しては BL6 は 129 に比べて早期に死亡するものの、予後のばらつきが大きく正確な予後判定に関しては適切でないと判断された。一方 129 は 50% 生存率がほぼ 120 日と安定していることが確かめられ、心不全治療薬のアッセイ系としてはより理想的と考えられた。

そこで低用量の  $\beta$  遮断剤 (carvedilol) を 5mg/Kg を生後 6 週より経口投与し、非投与群と比較した。120 日経過現在で  $\beta$  遮断剤投与下有意味な生命予後の改善が見られており、

心不全治療薬のアッセイ系として、ヒト心不全症例を擬似できると判断している。今後他の薬剤のスクリーニングにも使用する予定である。

## 3) 心筋症モデルマウスにおける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

平成 15 年度に各種 HB-EGF 遺伝子改変マウスが作成され、それらの救済実験を平成 16 年度に同時進行させた。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。

そこで HER1,2,3 を活性化させるが HER4 を活性化させない TGF- $\alpha$  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、各数系統のマウスを確立させた。掛け合わせと遺伝子背景の均一化を現在行い HB-EGF 遺伝子改変マウスの掛け合わせ後、ホモマウスの作成までで現在に至っている。今後さらに検討を進める。さらに興味深いことに細胞膜に結合しない遊離型の HB-EGF のみを発現するマウスはキメラ作成の際にすでに生後まもなく致死となり、皮膚の異常及び著名な心筋肥大がみられた。この事実も HB-EGF が発生初期から心臓の代謝に重要な働きをすることを強く示唆する。

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

生体内に投与された HB-EGF が心筋保護作用を示すかどうかは不明であった。生体内で大量リコンビナント蛋白を投与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生じた。本研究で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(ドキシソルピシン投与心不全モデル)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、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(平成 14-15 年度)。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(平成 14-15 年度)。

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うることが示された(平成 16 年度)。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。

本研究により、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

る。HB-EGF のシグナル関連の障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。

#### 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

研究申請時にはヒト心不全と HB-EGF の関係は殆ど解析されていなかった。そこで HB-EGF、4 つの EGF 受容体、ADAM12 各遺伝子のすべてのエクソンにおける遺伝子解析を 23 例の家族性心筋症発端者全員について行い終了した(平成 14-15 年度)。HB-EGF に関してはエクソンすべてをシーケンシ、他については WAVE を用いて全エクソンを解析した。ほとんどが普遍的な SNP であったが ADAM12 のプロドメインに存在したアミノ酸変異は、すぐ隣の遺伝子の変化が ADAM12 のプロセッシングを阻害されることが報告されていた部位であり興味深く本家系での疾患とのかかわりを解析中である。

#### 5) 抗体作成

HB-EGF は種間での保存がよいためよい抗体がいまだ作成されていなかった。今回、われわれは HB-EGF 遺伝子欠損マウスを使用して Baculo virus にて作成、精製した大量の HB-EGF を抗原としてモノクローナル抗体を作成したところ約 10 種の良質のクローンが採取できた(平成 15 年度)。これらの抗体価を測定した後、IgG 精製・ビオチン化後にエピトープとの競合 ELISA で抗体を選別。さらに sandwich-ELISA に最適な組み合わせの選択をおこない標本の標示値の検討をおこなった。作成された現在の ELISA はヒト血清中の 10pg/ml の HB-EGF を測定可能となった(平成 16 年度)。現在ポリクローナル抗体の組み合わせでさらに高感度の ELISA スクリーニングを行う予定

である。本EILSAを利用してヒト血清中でのHB-EGFを測定し、疾患との関連を検討していく予定である。また数種の中和活性を持った抗体も得られており、*vivo*への投与も検討中である。

#### D. 考察

本研究の最も重要な目標は、心不全治療のスクリーニングに可能な均一な動物モデルの確立であった。心不全は心機能低下に伴う全身性の病態であるが、その病態には体液・神経性の因子も大きく、ヒトに近い *in vivo* のモデルの作成が待ち望まれていた。我々が作成した HB-EGF 遺伝子改変マウス、特に129を遺伝子背景に持つマウスは進行性に緩やかに心不全が進行するマウスモデルであり、均一な心不全病態を再現できた。故に最も重要な目標は主任研究者によりほぼ達成できたと考える。

HB-EGF の生化学的解析、多種の遺伝子改変マウスの作成、HB-EGF 欠損マウスを使用した HB-EGF モノクローナル抗体の作成成功、世界初の高感度 HB-ELISA によるヒト血中 HB-EGF の測定、心不全患者での HB-EGF およびその関連因子の SNP 解析等、機能解析から臨床に至るまで世界の最先端の業績をあげることができた。心不全治療薬のスクリーニングは一部の陽性コントロールのみしか施行できず、HB-EGF の心不全治療薬としての応用も未知数のまま残されたが今後さらに研究を進める地盤は作成できたと考える。

高齢化社会の進行に伴い心不全患者の数は急激に増加している。高齢者に対する心不全治療は人工心臓や心臓移植は望めず、保存的な薬物療法が中心となると思われる。加えて近年は遺伝子治療や細胞移植などの新しい治療法も開発され応用されつつある。しかし心不全のモデル動物の作成が困難でそれらの効果の正確な評価が困難であった。本研究により、世界で始めてヒト心不全と同様の進行性の心筋変性を緩やかにきたす、均一な動物モデルを作成できた。新しい薬剤や治療法のスクリーニングに役立つ期待される。

#### E. 結論

世界で始めてヒト心不全に酷似した経過をたどる自然発症マウス心不全モデルを確立した。HB-EGFの心筋代謝における役割を明確にし、あたらしい心不全治療薬としての利用・診断への応用への可能性を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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).
2. Deepa, S. S., Umehara, Y., Higashiyama, S., Itoh, N. & Sugahara, K. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem* 277, 43707-16 (2002).
3. 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).
4. Frank, G. D., Mifune, M., Inagami, T., Ohba, M., Sasaki, T., Higashiyama, S., Dempsey, P. J. & Eguchi, S. Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C- $\delta$ . *Mol Cell Biol* 23, 1581-9 (2003).
5. Iivanainen, E., Nelimarkka, L., Elenius, V.,

- Heikkinen, S. M., Junntila, 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).
6. 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).
  7. 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).
  8. Liao, Y., Takashima, S., Asano, Y., Asakura, M., Ogai, A., Shintani, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogita, H., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res* 93, 759-66 (2003).
  9. 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).
  10. 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).
  11. Takenobu, H., Yamazaki, A., Hirata, M., Umata, T. & Mekada, E. The stress- and inflammatory cytokine-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and lysophosphatidic acid-induced signaling cascades. *J Biol Chem* 278, 17255-62 (2003).
  12. 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).
  13. 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. Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-30 (2004).
  14. Nanba, D., Toki, F. & Higashiyama, S. Roles of charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 376-82 (2004).
  15. Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., Yutani, C., Ozawa, K., Ogawa, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M.

- Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110, 705-12 (2004).
16. Ongusaha, P. P., Kwak, J. C., Zwible, A. J., Macip, S., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Fang, L. & Lee, S. W. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 64, 5283-90 (2004).
  17. Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P. & Blobel, C. P. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, 769-79 (2004).
  18. Takazaki, R., Shishido, Y., Iwamoto, R. & Mekada, E. Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor. *J Biol Chem* 279, 47335-43 (2004).
  19. Toki, F., Nanba, D., Matsuura, N. & Higashiyama, S. Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in the cell cycle. *J Cell Physiol* (2004).
2. 学会発表
    - 1) 国内
      1. 第 27 回日本集中治療医学会総会  
(平成 12 年 3 月 2-4 日、名古屋)  
シンポジウム「急性冠症候群の病態と治療における新戦略」  
“アデノシンと心筋保護 —プレコンディショニングとの関わり”
      2. 第 64 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 12 年 4 月 1-3 日、大阪)  
シンポジウム「重症心不全治療の新たな展開」  
“心不全重症化に対するアデノシンの心保護作用”
      3. 第 64 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 12 年 4 月 1-3 日、大阪)  
ランチョンセミナー「心筋障害をいかに防ぐか」  
“虚血心筋保護の New Strategy —アデノシン・NO の関与”
      4. 第 64 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 12 年 4 月 1-3 日、大阪)  
ランチョンセミナー  
“NO と虚血性心疾患”
      5. 第 43 回日本腎臓学会学術集会総会  
(平成 12 年 5 月 11-13 日、名古屋)  
ランチョンセミナー  
「心・腎連関とカルシウム拮抗薬」  
“大規模試験にみる心・腎連関 —心臓から”
      6. 第 48 回日本心臓病学会・学術集会  
(平成 12 年 9 月 11 日-13 日、大阪)  
シンポジウム「心不全の治療戦略:  $\beta$  ブロッカー —治療に続くもの」  
“慢性心不全におけるアデノシンの役割-新しい治療法展開の可能性”
      7. 第 48 回日本心臓病学会・学術集会  
(平成 12 年 9 月 11 日-13 日、大阪)  
サテライトシンポジウム「コレステロール低下療法と心保護作用」  
“HMG-CoA 還元酵素阻害薬と虚血心筋保護 -NO・アデノシンの関与”
      8. 第 53 回日本胸部外科学会総会  
(平成 12 年 10 月 25 日-27 日、大阪)  
ランチョンセミナー-3  
“プレコンディショニングの心筋保護と分子メカニズム -PKC と PKA の関与-”

- 9.第 37 回日本臨床生理学会総会  
(平成 12 年 11 月 18 日-19 日、奈良)  
シンポジウム「イオンチャネルと受容体」  
“アデノシンと心筋保護:プレコンディショニングとの関わり”  
(平成 13 年 9 月 24-26 日、広島)  
ランチョンセミナー「心血管におけるブラジキニンの役割」  
“ACE 阻害薬・ATII 拮抗薬による心保護作用とその分子メカニズム—ブラジキニンの役割”
- 10.第 30 回日本心脈管作動物質学会  
(平成 13 年 2 月 3 日、大阪)  
ランチョンセミナー「アムロジピン:血管保護薬としての新しい側面」  
“アムロジピンと心筋保護”
- 11.第 28 回日本集中治療医学会総会  
(平成 13 年 3 月 8 日、東京)  
ファイアーサイドセミナー「心筋虚血・再灌流障害。再灌流障害の薬剤による防止は可能か？」  
“心筋虚血・再灌流障害のメカニズムとその抑止—Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換系阻害薬の有用性”
- 12.第 65 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 13 年 3 月 25-27 日、京都)  
シンポジウム「Cardioprotection Afforded by Ischemic Preconditioning」  
“Role of P38 mitogen-activated protein kinase in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning in vivo”
13. 10th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy(平成 13 年 3 月 29 日、京都)  
ランチョンセミナー “New strategy for treatment of ischemic heart disease”
14. 第一回日本 NO 学会学術集会  
(平成 13 年 5 月 26 日、福岡)  
サテライトシンポジウム「21 世紀の ACE 阻害薬」  
“ACE 阻害薬の NO を介した心保護作用—基礎的及び臨床的エビデンス”
- 15.第 49 回日本心臓病学会  
(平成 13 年 9 月 24-26 日、広島)  
サテライトシンポジウム「NEW GENERATION  $\beta$ -blocker 新世紀への旅立ち」  
“アデノシン産生酵素と心保護— $\beta$  遮断薬の関与—”
16. 第 49 回日本心臓病学会  
(平成 13 年 9 月 24-26 日、広島)  
サテライトシンポジウム「プレコンディショニング—現状と未来—」  
“虚血プレコンディショニングの分子メカニズムの解明—細胞膜・ミトコンドリア ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルの関与”
17. 第 49 回日本心臓病学会  
(平成 13 年 9 月 24-26 日、広島)  
サテライトシンポジウム「プレコンディショニング—現状と未来—」  
“虚血プレコンディショニングの分子メカニズムの解明—細胞膜・ミトコンドリア ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルの関与”
- 18.第 5 回日本心不全学会学術総会  
(平成 14 年 10 月 25-27 日、仙台)  
ランチョンセミナー「心不全治療のニューコンセプト」  
“PDEIII 阻害によるプレコンディショニング心保護作用の解明—心不全治療への展開”
- 19.第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 4 月 24-26 日、札幌)  
プレナリーセッション4「ポストゲノムにおける心血管病への遺伝的アプローチ」  
“DNA アレーを用いた心血管疾患関連遺伝子の探索と大規模臨床試験における遺伝子多型解析”
- 20.第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 4 月 24-26 日、札幌)  
プレナリーセッション4「ポストゲノムにおける心血管病への遺伝的アプローチ」

- “DNA アレーを用いた心血管疾患関連遺伝子の探索と大規模臨床試験における遺伝子多型解析”
21. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 4 月 24-26 日、札幌)  
ランチョンセミナー5「一酸化窒素と虚血性心疾患」  
“NOと心筋保護—その分子メカニズムと臨床への応用”
22. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 4 月 24-26 日、札幌)  
ファイアーサイドセミナー「人類への大いなる遺産—遮断薬の開発とその展開」  
“慢性心不全におけるβ遮断薬療法の Best Practice とは?”
23. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 4 月 24-26 日、札幌)  
ファイアーサイドセミナー9(第 63 回冠循環談話会)  
「冠血管インターベンションとno-reflow」  
“アデノシン・NOと冠微少循環障害”
24. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 4 月 24-26 日、札幌)  
ランチョンセミナー40「心血管イベント抑制とカルシウム拮抗薬」  
“NO・アデノシンと心血管保護—アムロジピンとの関与”
25. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 14 年 5 月 24-25 日、東京)  
ランチョンセミナー40「カルシウム拮抗薬と心血管保護作用」  
“NO・アデノシンによる心血管保護作用とアムロジピン”
26. 第 11 回心血管インターベンション学会  
(平成 14 年 6 月 27-29 日、徳島)  
ランチョンセミナー
- “ACEIとARBの心保護作用は異なるか”
27. 第7回日本心血管麻酔学会  
(平成 14 年 9 月 21-22 日、神戸)  
ランチョンセミナー  
「アデノシン・KATP チャネル開口と心保護」
28. 第6回日本心不全学会学術総会  
(平成 14 年 10 月 2-4 日、東京)  
ランチョンセミナー  
「心不全治療のニューコンセプト」  
“心肥大・心不全でのHG-EGFの役割”
29. 第6回日本心不全学会学術総会  
(平成 14 年 10 月 2-4 日、東京)  
モーニングセミナー「プレコンディショニング」
30. 第 25 回日本高血圧学会学術総会  
(平成 14 年 10 月 11-13 日、東京)  
DEBATE「高血圧臓器障害の評価法」  
“心保護を考えた高血圧治療”
31. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 15 年 3 月 28-30 日、福岡)  
シンポジウム4「Management of Chronic Heart Failure-Problems in Japan」  
“Data mining of the best treatments of chronic heart failure and proposal of adenosine therapy as a new treatment”
32. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 15 年 3 月 28-30 日、福岡)  
ランチョンセミナー  
「心筋リモデリングに関する最近の話題—ベータ遮断薬の新展開」  
“血管拡張性ベータ遮断薬の心保護作用におけるNOの役割”
33. The International Symposium of Cardiology Frontiers. Cardiomyopathy and Heart Failure 2003(平成 15 年 10 月 17-180 日、札幌)

- “Novel Strategies to Find the New Pathophysiology or Treatment of Chronic Heart Failure: The Molecular Analysis using DNA Array and SNP or The Data Mining Method using Medical Records”
- (平成 16 年 5 月 13-15 日、東京)  
ランチョンセミナー「IGT の病態を考える」  
“糖尿病は心血管疾患である—IGT に対する介入の意義”
34. 第 26 回日本高血圧学会総会  
(平成 15 年 10 月 30 日-11 月 1 日、宮崎)  
ランチョンセミナー  
「血管拡張性  $\beta$  遮断薬の心保護作用」
40. 第 13 回心血管インターベンション学会  
(平成 16 年 7 月 1-4 日、名古屋)  
ランチョンセミナー“心筋虚血・再灌流障害の分子メカニズム—臨床への展開”
35. 第 31 回日本集中治療学会学術集会  
(平成 16 年 3 月 4-6 日、福岡)  
ランチョンセミナー  
「虚血・再灌流障害と心筋保護」  
“虚血・再灌流障害の分子メカニズムの解明と臨床への展開”
41. 第 52 回日本心臓病学会(平成 16 年 9 月 12-14 日、京都)  
ランチョンセミナー  
“血管拡張性  $\beta$  遮断薬と心血管保護”
36. 第 77 回日本薬理学会学会年会  
(平成 16 年 3 月 8-9 日、大阪)  
シンポジウム「心臓リモデリングから心不全への機構—新たな治療ターゲットを求めて—」  
“慢性心不全治療の現状と新展開”
42. 第 52 回日本心臓病学会  
(平成 16 年 9 月 12-14 日、京都)  
ランチョンセミナー「循環器専門医が知っておきたい H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の役割—専門家の意見を聞いてみよう」  
“ゲノム・インフォメーションサイエンスを用いた新しい心不全治療法の解析—H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬と心血管保護—”
37. 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 16 年 3 月 27-29 日、東京)  
シンポジウム 5「Genome Informatics of Cardiovascular System」  
“Systematic Linkage between the Genomic and Clinical Database of Cardiovascular Disease to Find New Pathophysiology or Effective Treatment”
43. 第 15 回日本老年医学会近畿地方会  
(平成 16 年 11 月 6 日、守口)  
ランチョンセミナー“高齢者における急性・慢性心不全の病態とその治療”
38. 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会  
(平成 16 年 3 月 27-29 日、東京)  
ランチョンセミナー「心血管疾患の新しい治療法開発への挑戦—BNP などの心機能指標の応用」  
“心血管疾患の新しい治療法開発への挑戦—BNP などの心機能指標の応用”
44. 第 85 回日本循環器学会 中国・四国合同地方会  
(平成 16 年 11 月 26-27 日、広島)  
ランチョンセミナー  
“慢性心不全治療の現状と新展開”
39. 第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会
45. 第 98 回日本循環器学会 近畿地方会  
(平成 16 年 12 月 11 日、京都)  
ランチョンセミナー“網羅的・包括的手法による慢性心不全治療法開発の戦略—ゲノム医学とインフォメーションサイエンスをいかに生かすか—”

## 2) 海外

1. Symposium entitled "HB-EGF: An obligatory mediator of diverse hypertrophic signals" in the session of "Signaling in Heart Failure: Cytokines, Kinases, and Other Mediators, Part II" in the 6th Annual Scientific Meeting of Heart Failure Society. Boca Raton, FL, USA, September 22-25, 2002
2. Fireside Seminar entitled "Statin as a new strategy to ischemic or non-ischemic heart failure: Implication of cardiac statin" in the session of "Statin and Cardiovascular remodeling" in the International Symposium on Cardiovascular remodeling and Function 02. Osaka, Japan, October 12, 2002
3. Symposium entitled "Regulation of coronary circulation in ischemic hearts: Roles of adenosine, NO and EDRF" in the session of "Coronary Microcirculation" in the 15th Cardiovascular Systemic Dynamic Society Meeting. Sendai, Japan, October 13-16, 2002
4. Special Lecture entitled "How intracellular signals generate extracellular events. An introduction" in The Cardiovascular Seminar entitled "Inside-Outside signaling in the myocardium: The Interstitial-Intercellular Environment during Development and Disease" of the 75th Scientific Sessions of the American Heart Association. Chicago, Illinois, U.S.A., November 17-20, 2002
5. Symposium entitled "Adenosine therapy: A new approach to ischemic heart disease - Evidence that anesthetic agents afford cardioprotection via adenosine-dependent mechanisms- " in the session of "Myocardial Protection with anesthetic agents" in the 1st International Symposium

for Cardiac Anesthesia in MORIOKA. Morioka, Japan, April 24-45, 2003

6. Symposium entitled "Novel Strategies to Find the New Pathophysiology or Treatment of Chronic Heart Failure: The Molecular Analysis using DNA Array and SNP or The Data Mining Method using Medical Records" in The International Symposium of Cardiology Frontiers. Cardiomyopathy and Heart Failure 2003. Sapporo, Japan October 17-18, 2003
7. Symposium entitled "Genomic analysis and data mining of patients with chronic heart failure may provide novel therapy of adenosine" in the 20th Meeting of Japanese Section of International Society for Heart Research. Tokyo, Japan, November 23-24, 2003
8. Luncheon Seminar entitled "How to treat the hearts to maximize cardioprotection- A role of cyclic GMP-dependent mechanisms-" in the 3rd International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide. Nara, Japan, May 24-28, 2004

## G. 知的所有権の取得状況

### 1) 特許取得

なし

### 2) 実用新案登録

発明の名称: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、ならびに心不全予防及び/または治療薬。国際出願番号:特願 2002-141791  
国際出願日:2003年5月3日  
出願者 北風政史、高島成二、目加田英輔

### 3) その他

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

研究課題名 : 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
Asakura, M., Kitakaze, M., et al.	Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy.	Nat Med	8	35-40	2002
Deepa, S. S., Umehara, Y., et al.	Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues.	J Biol Chem	277	43707-16	2002
Yu, X., Sharma, K. D., et al.	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
Frank, G. D., Mifune, M., et al.	Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta.	Mol Cell Biol	23	1581-9	2003
Iivanainen, E., Nelimarkka, L., et al.	Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor.	Faseb J	17	1609-21	2003

Kurisaki, T., Masuda, A., et al.	Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis.	Mol Cell Biol	23	55-61	2003
Kurisaki, T., Masuda, A., et al.	Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model.	Circ Res	93	759-66	2003
Mori, S., Tanaka, M., et al.	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
Nanba, D., Mammoto, A., et al.	Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF.	J Cell Biol	163	489-502	2003
Takenobu, H., Yamazaki, A., et al.	The stress- and inflammatory cytokine-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and lysophosphatidic acid-induced signaling cascades.	J Biol Chem	278	17255-62	2003
Yamazaki, S., Iwamoto, R., et al.	Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities.	J Cell Biol	163	469-75	2003
Asano, Y., Takashima, S., et al.	Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice.	Nat Genet	36	123-30	2004
Nanba, D., Toki, F., et al.	Roles of charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF.	Biochem Biophys Res Commun	320	376-82	2004

# Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy

MASANORI ASAKURA<sup>1</sup>, MASAFUMI KITAKAZE<sup>1</sup>, SEIJI TAKASHIMA<sup>1</sup>, YULIN LIAO<sup>1</sup>, FUMINOBU ISHIKURA<sup>5</sup>, TSUYOSHI YOSHINAKA<sup>7</sup>, HIROSHI OHMOTO<sup>7</sup>, KOICHI NODE<sup>1</sup>, KOHICHIRO YOSHINO<sup>7</sup>, HIROSHI ISHIGURO<sup>6</sup>, HIROSHI ASANUMA<sup>1</sup>, SHOJI SANADA<sup>1</sup>, YASUSHI MATSUMURA<sup>3</sup>, HIROSHI TAKEDA<sup>3</sup>, SHINTARO BEPPU<sup>5</sup>, MICHIIHIKO TADA<sup>2</sup>, MASATSUGU HORI<sup>1</sup> & SHIGEKI HIGASHIYAMA<sup>4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine and Therapeutics, <sup>2</sup>Pathology and Pathophysiology, and <sup>3</sup>Medical Information Science, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Departments of <sup>4</sup>Biochemistry and <sup>5</sup>Echocardiography, School of Allied Health Science, Osaka University Faculty of Medicine, Osaka, Japan

<sup>6</sup>Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, Toyoake, Japan

<sup>7</sup>Nippon Organon K.K., Osaka, Japan

Correspondence should be addressed to S.H.; e-mail: shigeki@sahs.med.osaka-u.ac.jp, or S.T.; email: takasima@medone.med.osaka-u.ac.jp

G-protein-coupled receptor (GPCR) agonists are well-known inducers of cardiac hypertrophy. We found that the shedding of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) resulting from metalloproteinase activation and subsequent transactivation of the epidermal growth factor receptor occurred when cardiomyocytes were stimulated by GPCR agonists, leading to cardiac hypertrophy. A new inhibitor of HB-EGF shedding, KB-R7785, blocked this signaling. We cloned a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) as a specific enzyme to shed HB-EGF in the heart and found that dominant-negative expression of ADAM12 abrogated this signaling. KB-R7785 bound directly to ADAM12, suggesting that inhibition of ADAM12 blocked the shedding of HB-EGF. In mice with cardiac hypertrophy, KB-R7785 inhibited the shedding of HB-EGF and attenuated hypertrophic changes. These data suggest that shedding of HB-EGF by ADAM12 plays an important role in cardiac hypertrophy, and that inhibition of HB-EGF shedding could be a potent therapeutic strategy for cardiac hypertrophy.

Cardiac hypertrophy is an adaptive response of the heart that occurs in various cardiovascular diseases<sup>1</sup>, but prolonged hypertrophy typically culminates in chronic heart failure or sudden cardiac death<sup>2</sup>. Elucidation of the mechanisms underlying cardiac hypertrophy is thus important to the field of cardiovascular biology, and may lead to new strategies for the prevention or treatment of cardiovascular diseases.

Vasoactive molecules such as phenylephrine (PE), angiotensin II (Ang II) and endothelin-1 (ET-1) are well-known inducers of cardiomyocyte hypertrophy<sup>3-5</sup>, and inhibition of their actions can be beneficial for the treatment of chronic heart failure following cardiac hypertrophy<sup>6,7</sup>. All of these molecules bind to G-protein-coupled receptors (GPCRs), and there is a common cellular response to the activation of such receptors that includes an increase in protein synthesis concomitant with an increase in cell size, induction of immediate early genes and reactivation of fetal genes<sup>8,9</sup>. The similarity of the response to different agents suggests that the initial signaling pathways triggered by different GPCR agonists converge on a common downstream pathway that leads to cardiac hypertrophy.

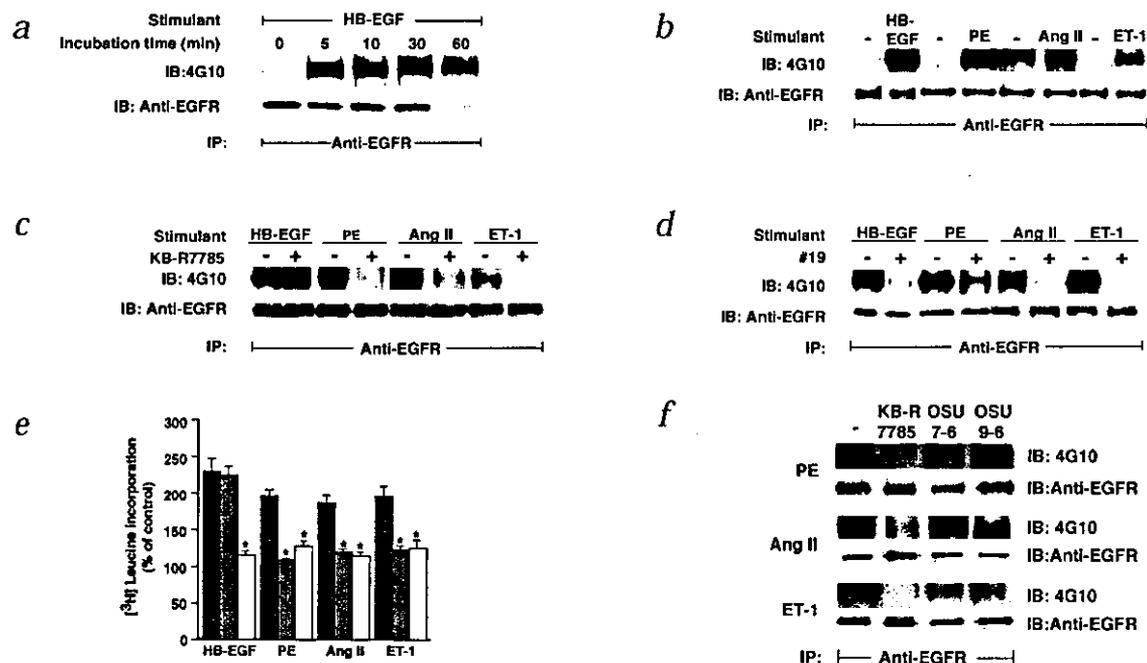
Transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) has a role in GPCR-mediated signal transduction in various cells<sup>10-13</sup>. Transactivation of EGFR is mediated, at least sometimes,

by the EGFR ligand heparin-binding EGF (HB-EGF), which is cleaved from its membrane-anchored form (proHB-EGF) by a specific metalloproteinase<sup>11</sup>. If ectodomain shedding of proHB-EGF is required for GPCR signaling in various cell types, a neutralizing antibody for HB-EGF or specific inhibitors of proHB-EGF shedding might be used therapeutically to block pathological signaling via GPCRs. Here we show that transactivation of EGFR by truncated HB-EGF occurs in cardiomyocytes, and that a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) is a key metalloproteinase in this pathway. Recently, there have been several reports indicating beneficial effects of matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors on heart failure<sup>15</sup>. We hypothesized that such beneficial effects of metalloproteinase inhibitors are at least partially mediated by antagonism of GPCR signaling via the ADAM12-mediated shedding of HB-EGF in cardiac cells, particularly cardiomyocytes.

## EGFR transactivation by hypertrophic stimuli

To assess the ability of HB-EGF to stimulate tyrosine phosphorylation of EGFR, we treated cultured rat neonatal cardiomyocytes with recombinant HB-EGF ( $1 \times 10^{-8}$  M). Cells were lysed at specified times, after which the lysates were immunoprecipitated with antibody against EGFR and probed with an anti-phosphotyrosine antibody (4G10). Phosphorylated EGFR (170 kD) was clearly seen





**Fig. 1** Effects of KB-R7785 and HB-EGF neutralizing antibody on EGFR transactivation and protein synthesis induced by GPCR agonists in cardiomyocytes. EGFR tyrosine phosphorylation in cultured cardiomyocytes was detected by blotting with a monoclonal antibody against phosphotyrosine, 4G10 (upper panels), or with antibody against EGFR (lower panels). **a**, Tyrosine phosphorylation of EGFR activated by HB-EGF for the indicated times. **b**, Tyrosine phosphorylation of EGFR after treatment with or without indicated agents. **c**, **d** and **f**, Tyrosine phosphorylation of EGFR activated by HB-EGF or GPCR agonists after preincubation with

without KB-R7785 (**c**), the neutralizing antibody #19 against HB-EGF (**d**), or OSU7-6 or OSU9-6 (**f**). **e**, In protein synthesis experiments, cardiomyocytes were exposed to the indicated agents for 18 h after preincubation for 30 min with KB-R7785 or antibody #19, or after no treatment. Protein synthesis was determined by the incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine after ■, no treatment; ▣, KB-R7785; □, #19. Results (mean ± s.e.m., *n* = 3) are expressed relative to control values for cells not exposed to any agents and not preincubated with any inhibitor or antibody. \*, *P* < 0.05 versus control cells.

from five minutes after HB-EGF treatment (Fig. 1a). Next we examined whether GPCR agonists transactivated EGFR in cardiomyocytes. When cardiomyocytes were treated with physiological concentrations of PE ( $1 \times 10^{-5}$  M), Ang II ( $1 \times 10^{-8}$  M) or ET-1 ( $1 \times 10^{-7}$  M) for five minutes, significant enhancement of EGFR phosphorylation was induced by all three agonists (Fig. 1b).

#### EGFR transactivation by the released ectodomain of HB-EGF

To investigate whether metalloproteinases were involved in EGFR transactivation in cardiomyocytes by GPCR agonists, we examined the effect of a new metalloproteinase inhibitor, KB-R7785. From over 2,000 metalloproteinase inhibitors, we selected KB-R7785 as one of the most potent inhibitors of HB-EGF shedding in a growth factor-alkaline phosphatase (AP) tag assay<sup>16</sup>. Table 1 shows the specificity of this compound: KB-R7785 inhibited HB-EGF shedding at a lower  $IC_{50}$  than that for other growth factors of the EGF family or tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). In this study, the KB-R7785 concentration ( $1 \times 10^{-6}$  M) was selected to obtain relatively specific inhibition of HB-EGF shedding. Preincubation with KB-R7785 ( $1 \times 10^{-6}$  M) for 30

min abrogated the tyrosine phosphorylation of EGFR by PE, Ang II and ET-1, whereas EGFR activation by HB-EGF was unaffected (Fig. 1c). The HB-EGF neutralizing antibody (#19) also inhibited the tyrosine phosphorylation of EGFR by PE, Ang II and ET-1 (Fig. 1d), indicating that release of soluble HB-EGF by metalloproteinases after GPCR stimulation was responsible for EGFR transactivation.

#### Effect of HB-EGF on protein synthesis in cardiomyocytes

The exposure of cultured cardiomyocytes to PE, Ang II or ET-1 increased total protein synthesis, a typical hypertrophic response. HB-EGF also stimulated [<sup>3</sup>H]leucine uptake in cardiomyocytes to

**Table 1** Inhibitory activity of KB-R7785

KB-R7785	Cell assay <sup>a</sup>				Peptide assay <sup>b</sup>			
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)				$IC_{50}$ (nM)			
	HB-EGF	AR	TGF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ <sup>c</sup>	MMP-1	MMP-3	MMP-9	TACE <sup>c</sup>
	0.23	0.76	2.01	4.50	0.30	3.00	0.30	9.60

<sup>a</sup>, Inhibitory activities of the compounds were measured by using HT1080 transfectants. Each value was the mean of 5 time measurements. <sup>b</sup>, Inhibitory activities of the compounds for MMP-1 and MMP-9 were measured by using FITC-collagen and FITC-gelatin as the substrate, respectively<sup>16</sup>.  $IC_{50}$  values were calculated by the probit method from concentration-% inhibition curves. <sup>c</sup>, Since TNF- $\alpha$  is processed by TACE, the difference of  $IC_{50}$  values estimated by cell assay and peptide assay indicates ~470-fold difference of their sensitivities.