

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570183

研究課題名(和文)

マウス心臓弁形成過程における HB-EGF による細胞増殖制御

研究課題名(英文)

Regulation of cell proliferation by HB-EGF in mouse cardiac valve development

研究代表者

岩本 亮 (IWAMOTO RYO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：10213323

研究成果の概要(和文)：マウス心臓弁形成過程において、EGF ファミリーの増殖因子 HB-EGF は弁間質細胞の増殖を抑制しているが、この過程で弁間質内のヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用が必須であることを明らかにした。またこの増殖抑制には EGFR とその下流で JNK 及び p38MAPK を介した経路が関与していることと、HB-EGF 欠失時の細胞増殖昂進にも EGFR シグナル経路が関与し、正常な心臓弁形成過程において HB-EGF による増殖抑制シグナルと他の EGFR リガンドによる増殖促進シグナルが拮抗している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：HB-EGF, a member of the EGF family of growth factors, plays an important role in cardiac valve development by suppressing mesenchymal cell proliferation. In this study, we reveal that HB-EGF must interact with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) to properly function in this process. Further study to elucidate the molecular mechanism involved in HB-EGF-mediated suppression of cell proliferation suggests that EGFR and the downstream JNK- and p38MAPK-signaling cascades in mesenchymal cells are involved in the growth inhibition. Moreover, EGFR-signaling is also involved in the up-regulation of cell proliferation when HB-EGF is deleted in developing valves, suggesting that the opposite signaling cascades of HB-EGF/EGFR-mediated growth-inhibition and the other EGFR-ligand(s)/EGFR-mediated growth promotion are competing in normal cardiac valve development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞・組織、発生・分化、増殖因子、細胞間情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) HB-EGF

HB-EGF は、EGF ファミリーに属するヘパリン結合性増殖因子である。HB-EGF は EGFR あるいは ErbB4 に結合し、これらを発現する細胞

に細胞増殖、生存、あるいは細胞運動の促進など種々のシグナルを伝達する。HB-EGF は他の EGF ファミリーと同様に、膜結合型蛋白質 (proHB-EGF) として合成された後、種々の内的・外的刺激に伴って細胞表面においてプ

ロテアーゼによる切断（エクドメイン・シエディング）を受け細胞外に分泌される。本研究代表者らはこれまでに、主に培養細胞を用いた研究から、HB-EGF は分泌型増殖因子（sHB-EGF）としての機能のみならず、膜結合型としても、ジフテリア毒素受容体（DTR）として機能することや細胞接着を介した細胞間情報伝達にも機能していることを見いだしてきた（Iwamoto and Mekada, 2000）。

## (2) HB-EGF の多様な生理機能

培養細胞レベルの研究から得られた HB-EGF の機能に関する知見を生体レベルで検証するために、本研究代表者らはこれまでに、HB-EGF ノックアウト (KO) マウスを含む種々の変異マウスの作製を行い、これらの表現型解析から HB-EGF がマウス生体内において、1) 心筋機能維持過程における心筋細胞の生存 (Iwamoto et al., 2003)、2) 心臓弁形成過程における心臓弁間質細胞の増殖抑制 (Iwamoto et al., 2003)、3) 目蓋形成過程 (Mine et al., 2005) や表皮創傷治癒過程 (Shirakata et al., 2005) における表皮細胞の移動促進、4) 受精卵の着床 (Xie et al., 2007)、あるいは 5) 肺胞形成過程における肺胞細胞の増殖抑制 (Minami et al., 2008) など、多様な生理機能を有していることを明らかにしてきた。またこれら多くの過程で主に分泌型 HB-EGF が機能していることもわかってきた (Yamazaki et al., 2003)。従来、HB-EGF は発癌など種々の病的過程において細胞増殖の促進に寄与していることが知られている (Miyamoto et al., 2006)。一方興味深いことに、上記の HB-EGF が機能している生理的過程の中で、HB-EGF が増殖促進因子として機能する過程はこれまでの解析の限りにおいて見つかっておらず、むしろ細胞の生存（心筋維持）や移動（目蓋形成・創傷治癒）を促進する因子として、あるいは逆に増殖抑制に機能している（肺胞形成過程・心臓弁形成過程）ことが明らかとなってきた。これまで増殖促進因子と考えられてきた HB-EGF の多様な生理機能発揮機構を理解する上で、HB-EGF による細胞増殖抑制機構を解明することは非常に重要である。そこで本研究では HB-EGF が増殖抑制因子として機能している心臓弁形成過程に焦点を当て、HB-EGF による細胞増殖制御機構の解明を目標とした。

## (3) 心臓弁形成における HB-EGF の機能

心臓弁形成過程は前期の cushion 形成期と後期のリモデリング期に分けられる。まず心臓弁の形成は、マウス胎生期 9 日目 (E9) 前後の心臓形成開始時期と並行して、心臓弁形成予定領域において、心筋から種々のシグナルを受容した心臓内皮細胞が、内皮-間葉転換

(EMT) をおこして間質細胞に分化し、内皮と心筋の間隙に存在する cardiac jelly とよばれる細胞外マトリックスが豊富な構造内へ、遊走・増殖し、cardiac cushion とよばれる構造を形成することから始まる。そして E13.5 以降に cardiac cushion を構成する細胞群は心室中隔を形成する集団と、心臓弁を形成する集団に分かれる。その後心臓弁は細長い leaflet 構造へとリモデリングし、成熟心臓弁が形成される。心臓弁形成過程の機構に関する研究はこれまで主に EMT が深く関わる cushion 形成期の事象についてのものがほとんどであり、EMT 終了後のリモデリング期についての分子機構は全くといっていいほど明らかとなっていない。本研究代表者らのこれまでの解析から、HB-EGF はこのリモデリング期で発現し、機能していることが明らかとなっている (Iwamoto and Mekada, 2006)。

## [文献]

- Iwamoto et al. (2003) PNAS. 100:3221-3226  
Iwamoto and Mekada (2000) Cytokine Growth Factor Rev. 11:335-344  
Iwamoto and Mekada (2006) CSF. 31:1-14  
Minami et al. (2008) Dev. Dyn. 237:247-258  
Mine et al. (2005) Development 132:4317-4326  
Miyamoto et al. (2006) Cancer Sci. 97:341-347  
Shirakata et al. (2005) JCS. 118:2363-2370  
Xie et al. (2007) PNAS. 104:18315-18320  
Yamazaki et al. (2003) JCB. 163:469-475

## 2. 研究の目的

HB-EGF KO マウスは間質細胞の過増殖を伴った著しい弁肥厚を呈する。マウス胎生期の心臓弁形成過程後期リモデリング期において、HB-EGF は弁内皮細胞から弁間質内に分泌され、間質細胞の増殖を抑制していることが、本研究代表者らによるこれまでの研究から明らかとなっている。しかし、この HB-EGF による間質細胞に対する増殖抑制の分子機構は全く不明であった。そこで本研究では、HB-EGF による心臓弁間質細胞の増殖制御の分子機構解明を目的として、解析目標を以下の 3 項目に設定した。

- (1) ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) による HB-EGF の機能制御機構
- (2) HB-EGF による間質細胞増殖抑制機構
- (3) HB-EGF 欠失時の間質細胞増殖昂進機構

これらの解析によって得られる、HB-EGF による細胞増殖制御機構に関する知見を基に、さらに将来的には HB-EGF が増殖促進因子として関与する発癌など増殖昂進性疾患の新たな治療法への応用も視野に入れ研究を進める。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種変異マウスの組織学的検討

本研究開始以前に本研究代表者らが作製した HB-EGF ノックアウト (KO) マウス、非分泌型変異 HB-EGF ノックイン (UC) マウス、非ヘパリン結合型変異 HB-EGF ノックイン ( $\Delta$ HB) マウス、及び EGFR 活性低下変異 (waved-2) マウスを用いて、心臓弁形成過程に焦点を当て、免疫組織化学染色等の各種組織学的手法により、野生型マウスと変異マウス間の表現型比較解析を行った。

##### ① 心臓弁肥厚計測

E10.5~P0 マウス胎仔心臓弁の連続切片の HE 染色画像から最も厚い弁短径を計測した。

##### ② 心臓弁細胞増殖計測

妊娠 13~18 日目のマウスに BrdU を腹腔内投与した後に胎仔心臓を解剖し、E13.5~E18.5 マウス胎仔心臓弁の連続切片を、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色によって増殖細胞を検出し、総核数あたりの BrdU 陽性核の割合で増殖率を算出した。

##### ③ 心臓弁細胞死計測

E10.5~P0 マウス胎仔心臓弁の連続切片について TUNEL 染色法によって細胞死を検出し、総核数あたりの TUNEL 陽性細胞の割合で細胞死率を算出した。

##### ④ HSPG 発現解析

E15.5~E18.5 マウス胎仔心臓弁の未固定凍結切片を作製・トルイジンブルー染色後、レーザーマイクロディセクション (LMD) 法により弁間質部分を採取し、RNA を調整後 RT-PCR 法により各種 HSPG の発現を検出した。

#### (2) 心臓弁初代細胞培養系 (cushion explant 培養系) による細胞生物学的検討

心臓弁形成初期の胎生期 E10.5 の心臓から将来心臓弁となる cardiac cushion を切り出し、心筋側を上、内皮側をうつぶせにしてヒアルロン酸を含むコラーゲンゲル上で 1 週間から 10 日間培養する。その間にゲル上に増殖伸展した内皮細胞では HB-EGF が発現し、内皮細胞から分化転換した間質細胞がゲル内に浸潤・増殖する。野生型あるいは各種 HB-EGF 変異マウス由来の cushion explant を培養、あるいはこの培養時に薬剤処理等を行い、培養終了時に BrdU を取り込ませ、抗 BrdU 抗体による免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による画像取得によってゲル内の間質細胞の増殖性を評価した。核は propidium iodide (PI) 染色し、総核数あたりの BrdU 陽性核の割合で増殖率を算出した。

##### ① HB-EGF KO 由来間質細胞に対するレスキュー実験

Cushion explant 植え付け 1 日後に野生型あるいは  $\Delta$ HB 変異 HB-EGF のリコンビナント蛋白を加え、さらに 6 日間培養後、BrdU 取り込みアッセイを行った。

##### ② HSPG 阻害実験

Cushion explant 植え付け 3 日後に各種の阻害剤を加え、さらに 4 日間培養後、BrdU 取り込みアッセイを行った。

##### ③ 各種シグナル阻害実験

Cushion explant 植え付け 7 日後に各種の阻害剤を加え、さらに 3 日間培養後、BrdU 取り込みアッセイを行った。

##### ④ EGFR リガンド発現解析

Cushion explant を 10 日間培養後、explant を取り外し、ゲルのコラゲナーゼ処理によりゲル上内皮細胞とゲル内間質細胞を回収し RNA を調整後、RT-PCR 法により各種 EGFR リガンドの発現を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 弁間質 HSPG による HB-EGF の機能制御機構の解析

##### ① $\Delta$ HB マウスの表現型解析

マウス心臓弁形成過程での HB-EGF の生理機能発揮における弁間質内細胞外マトリックスの HSPG との相互作用の生理的重要性を検討するため、非ヘパリン結合型変異 HB-EGF ノックイン ( $\Delta$ HB) マウスの心臓弁表現型を解析したところ、このマウスでも HB-EGF ノックアウト (KO) マウスあるいは非分泌型変異 HB-EGF ノックイン (UC) マウスと同様に、後期リモデリング過程において間質細胞の過増殖を伴った著しい弁肥厚の症状を呈することがわかった。一方、細胞死の差異は認められなかった。これらの結果からこの過程での HB-EGF の正常な機能発揮には HSPG との相互作用が必須であることが示唆された。

一方、既に KO マウスにおいて異常が確認されている心筋機能異常や肺胞形成異常の表現型が  $\Delta$ HB マウスでは正常であったことから、HB-EGF の生理機能発揮における HSPG との相互作用は、特に心臓弁形成過程において重要な事象である可能性が示唆された。

##### ② Cushion explant 系による解析

Cushion explant 培養系において、 $\Delta$ HB マウス由来間質細胞が KO マウスあるいは UC マウス由来間質細胞と同様に、野生型マウス由来間質細胞と比較して高い増殖性を示した。また野生型由来間質細胞に対してヘパリン、クロル酸ナトリウム、あるいはヘパリチナーゼ処理により HB-EGF と HSPG との相互作用を阻害することでその増殖性が昂進した。さらに KO マウス由来間質細胞の過増殖に対する野生型 HB-EGF による増殖抑制 (レスキュー) 活性と比較して、変異型  $\Delta$ HB のレスキュー活性が著しく低下していた。

以上の結果から、マウス心臓弁形成後期リモデリング過程における HB-EGF による間質細胞の増殖抑制には弁間質内 HSPG と HB-EGF の相互作用が必須であることが明らかとなった。

### ③ HSPG 発現解析

心臓弁間質において HB-EGF と特異的に相互作用している HSPG の同定を目標として、リモデリング期の心臓弁間質で発現している HSPG の発現解析を、LMD 法による弁間質組織切片の採取・RNA 調製と RT-PCR 法によって検討したところ、syndecan-1, 2, glypican-1, 2, 3, agrin, collagen18, CD44, perlecan の少なくとも 9 種類の HSPG の発現を認めた。これらのすべてが HB-EGF との相互作用及び機能制御に寄与しているのか、あるいはこれらの中に HB-EGF に特異的な HSPG が存在しているのかどうかは今後の課題であり、さらに解析を続けていく。

以上の結果から、マウス心臓弁形成における正常な HB-EGF の生理機能（細胞増殖抑制）発揮にとって、HB-EGF と HSPG の相互作用が必須であることが明らかとなった。本研究によって、心臓弁形成過程における HB-EGF の作用機序について、マウス心臓弁形成後期リモデリング過程で、HB-EGF は心臓弁内皮細胞において発現し、そこで切断を受けて分泌型となり、心臓弁間質内の HSPG と相互作用することで間質細胞の増殖を抑制する、というモデルが成り立つ。

### (2) HB-EGF による弁間質細胞増殖抑制機構の解析

#### ③ 野生型マウス由来 cushion explant に対する各種シグナル分子の阻害

HB-EGF による間質細胞増殖抑制機構の解析のため、HB-EGF を発現する野生型の explant 培養系に種々のシグナル分子に対する阻害剤を添加し、間質細胞の増殖に与える影響を検討したところ、EGFR 阻害剤 ZD1839、JNK 阻害剤 SP600125 あるいは p38MAPK 阻害剤 SP600125 が間質細胞の増殖を昂進させた。一方、MEK 阻害剤 PD98059 あるいは PI3-kinase 阻害剤 LY294002 は間質細胞の増殖に影響を与えなかった。

これらの結果から、HB-EGF による間質細胞の増殖抑制には、HB-EGF の受容体としての EGFR と、その下流で JNK 及び p38MAPK のシグナル経路が関与していることが示唆された。また同時に、従来 EGFR の下流で主として機能することが知られている Ras-ERK 経路や PI3-kinase 経路がこの過程では寄与していないことも示唆された。EGFR の下流で JNK や p38MAPK がどのような機構で活性化され、結果としてどのような機構で増殖抑制が誘導されるのか、その詳細な分子機構の解明は今後の課題であり、さらに解析を続けていく。

### (3) HB-EGF 欠失時の弁間質細胞増殖昂進機構の解析

#### ① HB-EGF KO マウス由来 cushion explant

#### に対する EGFR 阻害

Explant 培養系において HB-EGF KO の間質細胞は野生型の細胞よりも高い増殖性を示すが、EGFR 阻害剤がこの KO 由来間質細胞の過増殖を抑制することを見出した。このことから HB-EGF 欠失時の間質細胞の過増殖にも EGFR が関与している可能性が示唆された。

#### ② HB-EGF-KO;waved-2 二重変異マウスの弁肥厚解析

HB-EGF KO の間質細胞の増殖昂進における EGFR の関与の可能性をさらに *in vivo* で検証するために、HB-EGF KO と EGFR 機能低下変異体 waved-2 の二重変異マウスを作製し、弁肥厚表現型を解析したところ、二重変異マウスでは HB-EGF 単独 KO マウスよりも弁肥厚が有意に低下していた。この結果からも、HB-EGF 欠失時の間質細胞の過増殖にも EGFR が関与している可能性がさらに補強された。

#### ③ 野生型及び HB-EGF KO 弁における EGFR の活性化状態の免疫組織化学的比較検討

リモデリング期の心臓弁間質における EGFR の活性化状態を、抗リン酸化 EGFR 抗体を用いた免疫染色法により野生型と HB-EGF KO で比較したところ、両者に有意な差は認められなかった。このことから発生活過程の心臓弁間質細胞の EGFR を活性化させている因子は HB-EGF のみではなく、同時に他の EGFR リガンドも関与していることが示唆された。

#### ④ EGFR リガンド発現解析

野生型 cushion explant 由来内皮細胞と間質細胞における全て（7種類）の EGFR リガンドの発現を RT-PCR により検討したところ、HB-EGF 以外にも EGF、epiregulin、及び amphiregulin の発現が認められた。この結果から、HB-EGF 欠失時の間質細胞の過増殖にこれらの EGFR リガンドを介した EGFR シグナル系が関与していることが示唆された。

以上の結果から、HB-EGF による心臓弁間質細胞の増殖抑制には、EGFR とその下流で JNK や p38MAPK を介したシグナル経路が関与していること、そして HB-EGF 欠失時の細胞増殖昂進にも EGFR シグナル経路が関与し、正常な心臓弁形成過程において HB-EGF による増殖抑制シグナルと他の EGFR リガンドによる増殖促進シグナルが拮抗している可能性が示唆された。しかし、EGFR KO においても弁肥厚の表現型が報告されていることから、おそらく EGFR 以外の未知のシグナル経路も HB-EGF 欠失時の増殖昂進に関与していることが考えられる。今後は、未だ確立されていない cushion explant 培養系での遺伝子導入法の構築と、弁間質細胞の性質を保持した細胞株の樹立などによって、さらに HB-EGF による心臓弁間質細胞増殖制御の分子機構の解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Koshikawa, N., Mizushima, H., Minegishi, T., Iwamoto, R., Mekada, E. and Seiki, M.

Membrane type 1-matrix metalloproteinase cleaves off the NH<sub>2</sub>-terminal portion of heparin-binding epidermal growth factor and converts it into a heparin-independent growth factor.

**Cancer Res.** 70:6093-6103, 2010 (査読有)

② Iwamoto, R.\*, Mine, N., Kawaguchi, T., Minami, S., Saeki, K. and Mekada, E. (\*corresponding author)

HB-EGF function in cardiac valve development requires interaction with heparan sulfate proteoglycans.

**Development** 137:2205-2214, 2010 (査読有)

③ Hamaoka, M., Chinen, I., Murata, T., Takashima, S., Iwamoto, R. and Mekada, E. Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding.

**J. Biochem.** 148:55-69, 2010 (査読有)

④ Ichise, T., Adachi, S., Ohishi, M., Ikawa, M., Okabe, M., Iwamoto, R. and Mekada, E.

Humanized gene replacement in mice reveals the contribution of cancer stroma-derived HB-EGF to tumor growth.

**Cell Struct. Funct.** 35:3-13, 2010 (査読有)

⑤ 岩本 亮

HB-EGF におけるシェディングの役割とその制御.

**蛋白質核酸酵** 54 (13):1722-1727, 2009 (査読無)

⑥ Mekada, E. and Iwamoto, R.

HB-EGF.

**UCSD-Nature Molecule Pages.** doi: 10.1038/mp.a002932.01, 2008 (査読有)

⑦ 岩本 亮

細胞外マトリックスにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンによるシグナル分子の制御.

**生体の科学** 59 (5):340-341, 2008 (査読無)

⑧ Minami, S., Iwamoto, R.\*, and Mekada, E.

(\*corresponding author)

HB-EGF decelerates cell proliferation synergistically with TGF $\alpha$  in perinatal distal lung development.

**Dev. Dyn.** 237:247-258, 2008 (査読有)

[学会発表] (計5件)

① 岩本 亮

Role of ectodomain shedding in physiological functions of HB-EGF.

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会 (招待講演)

2010.12.9. 神戸 (神戸ポートアイランド)

② 岩本 亮

Physiological functions of diphtheria toxin receptor/HB-EGF.

International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology (招待講演)

2010.7.13. 大阪 (大阪国際会議場)

③ 岩本 亮

心臓弁形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンによる HB-EGF の機能制御

第62回日本細胞生物学会大会 (招待講演)

2010.5.19. 大阪 (大阪国際会議場)

④ 岩本 亮

HB-EGF とヘパラン硫酸プロテオグリカンの相互作用は正常な心臓弁形成に必須である

第61回日本細胞生物学会大会

2009.6.2. 名古屋 (名古屋国際会議場)

⑤ 岩本 亮

HB-EGF の生理機能発揮におけるエクトドメイン・シェディングの役割

第60回日本細胞生物学会大会 (招待講演)

2008.6.29. 横浜 (パシフィコ横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://cell-biology.biken.osaka-u.ac.jp/MekadaLabHP/Iwamoto/Iwamoto.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 亮 (IWAMOTO RYO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号: 10213323

(2) 研究分担者

(無)

(3) 連携研究者

(無)