

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240126

研究課題名(和文) HB-EGFによる癌細胞の増殖・悪性化機構の解析

研究課題名(英文) The role of HB-EGF in cancer cell proliferation and malignancy

研究代表者

目加田 英輔 (Mekada, Eisuke)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20135742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、細胞増殖因子HB-EGFの癌における役割と分子機構の解明並びに新たな分子標的治療法の探索を行うことである。平成23年度は子宮頸癌を例に癌-癌間質相互作用におけるHB-EGFの役割解析を中心に研究を進め、子宮頸癌の治療にHB-EGF阻害剤とPDGF阻害剤併用の有効性を示した。平成24-25年度は、癌細胞では増殖促進や悪性化に働くHB-EGFが正常発生過程である心臓弁形成期には増殖抑制作用を示すことを明らかにし、その詳細なメカニズムを解析すると同時に、HB-EGFの増殖促進作用を増殖抑制作用に切り替える新たな癌治療法の可能性を提唱した。

研究成果の概要(英文)：We have studied on the role of HB-EGF in cancer cell proliferation and malignancy. In 2011, we have studied the role of HB-EGF expressing at tumor stroma in uterine cervical cancer. We have shown that HB-EGF expressed in stroma and PDGF expressed in cancer cells contribute to the reciprocal interaction of cancer cells with cancer-associated fibroblasts and promote cancer cell proliferation in a paracrine manner, providing an insight for the novel combinatorial therapy. In 2012-2013, we have studied on the molecular mechanism of HB-EGF-inducing growth inhibition. In cardiac valve, HB-EGF inhibits the proliferation of mesenchymal cells. The study indicated that HB-EGF is expressed in cardiac epithelial cells and secreted toward the mesenchymal cells in developing heart valve tissue, where HB-EGF inhibits mesenchymal cell proliferation. P38 MAPK and JNK are involved in this process. Further study may provide a new paradigm for cancer therapy.

研究分野：腫瘍生物学、細胞生物学

キーワード：EGFファミリー 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

EGF ファミリーの細胞増殖因子である HB-EGF は生体にとってきわめて重要な因子の一つで、その欠損は心臓弁や肺の形態形成異常、心室の拡張、骨代謝、創傷治癒の遅延など広範な組織で異常を示す。さらに HB-EGF の発現の亢進も種々の疾病の原因となり得るが、その中でもとりわけ重要なのは癌との関連である。HB-EGF は種々の癌で高発現し、癌細胞の増殖・浸潤・転移・予後、あるいは抗癌剤耐性と深く関わっており、癌の分子標的として急速に注目が集まっている。卵巣癌では HB-EGF が高発現しており、卵巣癌細胞の腫瘍形成に HB-EGF の発現が深く関わっており、HB-EGF を分子標的とする治療薬の開発が進められている。しかしながら、HB-EGF の作用機構、癌における役割については、未だ解明すべき問題が多数残されている。例えば、正常発生における HB-EGF の役割は、これまでの HB-EGF KO マウスでの解析では、細胞増殖の促進よりも細胞増殖を抑制する働きがあることが示唆されている。一方、卵巣癌では癌細胞において HB-EGF の亢進が認められ、細胞増殖や抗癌剤耐性に働いていると考えられる。このような HB-EGF の多様な働きがどのようなメカニズムで起こるのか、この研究課題を開始した時点では全く明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、HB-EGF の癌における役割と分子機構の解明、HB-EGF が示す細胞増殖と増殖抑制という相反する作用が生じる基となる分子機構の解明、あるいはこれらの解析によって導かれる新たな分子標的治療法の探索を目的として、「癌-癌間質相互作用における HB-EGF の役割解析」および「HB-EGF が示す増殖促進作用と増殖抑制作用の解析」を行った。

3. 研究の方法

子宮頸癌組織における HB-EGF の発現はリアルタイム PCR および *in situ* hybridization 法によって解析した。子宮頸癌細胞と子宮頸癌組織から分離した癌間質繊維芽細胞 (CCF) との共培養は、CCF 単層培養シート状にコラーゲンゲル内に埋め込んだ子宮頸癌細胞を培養するいわゆる 3D 培養法を用いて実施した。心臓弁形成における HB-EGF の役割解析は、胎仔期 E10.5 の心臓から将来心臓弁となる cardiac cushion を取り出し、ヒアルロン酸を含むコラーゲンゲル上で培養する *ex vivo* の手法で実施した (Iwamoto et al., *Development*, 2010 137:2205-2214.)

4. 研究成果

(平成 23 年度) : 癌-癌間質相互作用における HB-EGF の役割解析について。

癌の悪性化に癌細胞と癌間質との相互作用が重要であることが知られている。子宮頸

癌における HB-EGF の発現を調べたところ、HB-EGF が癌細胞ではなく癌細胞の周囲に存在する繊維芽細胞で発現していることを明らかにした。子宮頸癌細胞と子宮頸癌組織から分離した癌間質繊維芽細胞 (CCF) を用いた共培養系を構築し、CCF の癌細胞増殖への影響を調べたところ、CCF は癌細胞の増殖を顕著に亢進した。また、この時 HB-EGF の作用を抑制すると、共培養による増殖促進作用が失われた。子宮頸癌細胞をヌードマウス皮下に移植した腫瘍形成実験でも CCF やマウス胎児由来の繊維芽細胞 (MEF) は子宮頸癌細胞の増殖 (腫瘍形成) を促進したが、HB-EGF ノックアウトマウス由来の MEF は増殖促進効果を示さなかったことから間質繊維芽細胞で合成された HB-EGF が癌細胞の増殖を促進していることが示唆された。一方、子宮頸癌細胞のコンディション培地を CCF に加えたところ CCF 細胞での HB-EGF の発現が強く誘導され、コンディション培地に含まれる PDGF が HB-EGF 誘導因子として作用していることが明らかとなった。これら一連の実験結果から、子宮頸癌細胞では PDGF を合成し間質繊維芽細胞での HB-EGF の発現を誘導し、一方間質繊維芽細胞は HB-EGF を合成・分泌し子宮頸癌細胞の増殖を促すと同時に癌細胞の PDGF 合成を誘導している、という相互依存関係にあることが示された。また本研究より、子宮頸癌の治療に HB-EGF 阻害剤と PDGF 阻害剤併用の有効性が示唆された。

(平成 24-25 年度) : HB-EGF が示す増殖促進作用と増殖抑制作用の解析。

HB-EGF は癌細胞や正常培養細胞に強い増殖促進作用を示す。しかし、心臓弁の形成や肺胞の形成過程では HB-EGF は心臓弁間質細胞や肺胞上皮の増殖抑制に働いており、HB-EGF KO マウスではこれらの組織の過剰増殖による過形成が認められる。なぜ同じ分子が増殖抑制と促進という異なった作用を示すのか、その回答は全く得られていない。また EGFR を介した細胞増殖シグナルに関する研究は膨大にあるが、増殖抑制作用について解析したものはほとんどない。そこで本研究では同じ因子がなぜ相反する作用を示すのか、その分子機構を詳細に解析した。HB-EGF が発現・機能していない胎仔期 E10.5 の心臓から将来心臓弁となる cardiac cushion を取り出し、ヒアルロン酸を含むコラーゲンゲル上で、約 1 週間培養した。培養開始約 3 日目頃から内皮細胞で 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・増殖し始めた。この系では、HB-EGF KO 由来のゲル内間質細胞で増殖性の昂進が認められ、HB-EGF 添加によりこれをレスキューできること、EGFR 阻害剤で野生型間質細胞の増殖性が昂進することを確認した。またこの培養系ではレンチウイルスによる遺伝子導入法が効果的であることを確認し、このシステムを用いて EGFR 下流シグナル経

路の解析を行った。その結果、HB-EGF 増殖抑制作用には P38MAPK および JNK の活性化が必要であることを明らかにした。本研究は研究のための方法の開発に時間を要し、まだ端緒に着いたばかりであり、最終ゴールに到達するにはまだ時間が必要である。しかし本研究の成果は、例えば HB-EGF を高発現した細胞に活性転換因子を作用させることで癌細胞の増殖を抑制するという全く新しい治療法の開拓につながる可能性があり、癌の新規療法開拓としても大きな意義があると考えている。

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 12 件)

Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Kizu T, Furuta K, Ezaki H, Hamano M, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Imai Y, Higashiyama S, Iwamoto R, Mekada E, Takehara T. Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 437:185-191. 2013. 査読有
DOI:10.1111/j.1872-034X.2012.01074.x.

Odintsova E, van Niel G, Conjeaud H, Raposo G, Iwamoto R, Mekada E, Berditchevski F. Metastasis Suppressor Tetraspanin CD82/KAI1 Regulates Ubiquitylation of Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem.* 288:26323-26334. 2013. 査読有
DOI:10.1074/jbc.M112.439380.

Moribe H, Mekada E. Co-occurrence of tetraspanin and ROS generators: Conservation in protein cross-linking and other developmental processes. *Worm.* 2(2):e23415. 2013. 査読有
DOI:10.4161/worm.23415.

Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Minamino T, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. *J Control Release.* 160:274-280. 2012. 査読有
DOI:10.1016/j.jconrel.2011.10.010.

Masuda H, Nakamura K, Takata N, Itoh B, Hirose T, Moribe H, Mekada E, Okada M. MIG-13 controls anteroposterior cell migration by interacting with UNC-71/ADM-1 and SRC-1 in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 586:740-746. 2012. 査読有
DOI:10.1016/j.febslet.2012.01.031.

Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Saji Y, Ezaki H, Hamano M, Kizu T, Egawa M, Chatani N, Furuta K, Kamada Y, Iwamoto R,

Mekada E, Higashiyama S, Hayashi N and Takehara T. Conditional knockout of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the liver accelerates carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Hepatol Res.* 43:384-393. 2012. 査読有
DOI:10.1111/j.1872-034X.2012.01074.x.

Moribe H, Konakawa R, Yoneda T, Koga D, Ushiki T, Nakamura K and Mekada E. Tetraspanin is required for generation of reactive oxygen species by the dual oxidase system in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 8(9):e1002957. 2012. 査読有
DOI:10.1371/journal.pgen.1002957.

Kasai N, Kobayashi K, Shioya S, Yoshikawa Y, Yotsumoto F, Miyamoto S, Mekada E, Enokizono J. Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer. *Am J Transl Res.* 4:415-421. 2012. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493029/>

Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Eguchi F, Yotsumoto F, Nabeshima K, Miyamoto S, Mekada E, Seiki M. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.* 102:111-116. 2011. 査読有
DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01748.x.

Hikita S, Yotsumoto F, Fumaki T, Horiuchi S, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Tsujioka H, Ueda T, Shirota K, Yoshizato T, Maeda K, Ishikawa T, Okuno Y, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. *Anticancer Res.* 31:2553-2559. 2011. 査読有

<http://ar.iiarjournals.org/content/31/7/2553.long>

Murata T, Mizushima H, Chinen I, Moribe H, Yagi S, Hoffman R.M., Kimura T, Yoshino K, Ueda Y, Enomoto T and Mekada E. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. *Cancer Res.* 71:6633-6642. 2011. 査読有
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-0034.

Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, Yotsumoto F, Yoneda T, Hamaoka M, Yagi H, Murakami T, Hori S, Shitara K and Mekada E. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple anti-tumor mechanisms

against ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Res.* 17:6733-6741, 2011. 査読有 DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1029.

〔学会発表〕(計 18 件)

目加田英輔、HB-EGF を標的とする抗癌剤の開発、第 25 回日本消化器癌発生学会総会第 8 回国際消化器癌発生会議ランチョンセミナー3、2014.11.14、ホテル日航福岡(福岡県福岡市)

岩本亮、目加田英輔、心臓弁形成における HB-EGF-ErbB シグナルによる細胞増殖制御、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014.6.11-13、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

水島寛人、船越紋希、目加田英輔、FAK リン酸化による HB-EGF 依存的細胞増殖制御、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014.6.11-13、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

中村尚志、岩本亮、目加田英輔、破骨細胞分化過程における HB-EGF 細胞質内領域の機能、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014.6.11-13、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

岩本亮、沼田雄基、目加田英輔、心臓弁形成における HB-EGF-EGFR シグナルによる細胞増殖制御、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

中村尚志、佐藤みずほ、岩本亮、目加田英輔、増殖因子 HB-EGF 細胞質内領域による破骨細胞分化制御機構の解明、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

疋田智也、清水隆、桑野剛一、宮本新伍、目加田英輔、卵巣癌におけるマイコプラズマ感染の関与、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

水島寛人、船越紋希、目加田英輔、微小管による FAK の隔離は HB-EGF 依存的細胞増殖を負に制御する、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

疋田智也、清水隆、桑野剛一、宮本新伍、目加田英輔、卵巣癌におけるマイコプラズマ感染の関与、第 40 回日本マイコプラズマ学会学術集会、2013.5.23-24、秋葉原 UDX GALLERY(東京都千代田区)

Takashi Nakamura, Mizuho Sato, Norihiro Ishida-Kitagawa, Ryo Iwamoto, Eisuke Mekada. C-terminal fragment of HB-EGF negatively regulates osteoclast differentiation. 第 64 回日本細胞生物学会大会、2012.5.29-31、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Hiroto Mizushima, Takuya Murata, Ichino Chinen, Hiroki Moribe, Shigeo Yagi, Robert M Hoffman, Tadashi Kimura, Kiyoshi Yoshino, Yutaka Ueda, Takayuki Enomoto, Eisuke Mekada. HB-EGF and PDGF Mediate

Reciprocal Interactions of Carcinoma Cells with Cancer-Associated Fibroblasts to support Progression of Uterine Cervical Cancers. 第 64 回日本細胞生物学会大会、2012.5.29-31、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Joel Moss, Klaus Aktories, Eisuke Mekada, Yasuhiko Horiguchi, Masatoshi Noda, Karla Satchell. Bacterial toxins -basic research and application. 第 85 回日本細菌学会総会、2012.3.27-29、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

村田卓也、水島寛人、吉野潔、上田豊、榎本隆之、木村正、目加田英輔、子宮頸癌では HB-EGF と PDGF を介して癌細胞と癌関連線維芽細胞が相互作用し、癌細胞の増殖を促進する、第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Eisuke Mekada. The role of tetraspanins in the dual oxidase system of *C.elegans* and humans. FASEB Summer Research Conferences Membrane Organization by Molecular Scaffolds. July 17-22, 2011. Saxtons River, Vermont (U.S.A.)

水島寛人、船越紋希、目加田英輔、FAK の FERM ドメインのリン酸化による HB-EGF 依存的細胞増殖制御、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011.6.27-29、北海道大学(北海道札幌市)

中村尚志、伊藤ちひろ、北川教弘、岩本亮、竹家達夫、目加田英輔、HB-EGF 細胞質内フラグメントは破骨細胞の分化を負に制御する、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011.6.27-29、北海道大学(北海道札幌市)

森部弘樹、小央良二、中村邦明、目加田英輔、テトラスピコンによる活性酸素産生の制御、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011.6.27-29、北海道大学(北海道札幌市)

Eisuke Mekada. Clinical development of the diphtheria toxin mutant CRM197 for cancer therapy. ETOX15 European Workshop on Bacterial Protein Toxins. June 18-22, 2011. Oslo (Norway)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目加田 英輔 (MEKADA EISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20135742

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無