

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570212

研究課題名(和文) ADAM17によるHB-EGFのエクトドメイン・シェディングに関与する制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism that regulates ectodomain shedding of HB-EGF by ADAM17

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：HB-EGFと、その受容体の1つErbB4はいずれもADAM17によって切断を受ける。本研究では、HB-EGFの切断分泌とこれによる細胞増殖の抑制が必須であるマウス心臓弁形成過程に焦点を当てその制御機構の解析を行った。その結果HB-EGFによる増殖抑制にはErbB1/ErbB4ヘテロ二量体が機能し、さらにこの時ErbB4の切断とそれに伴う細胞内領域遊離が増殖抑制に重要であることが示唆された。またこの抑制過程ではp38MAPK及びJNKシグナルが必須であることも解った。これらの結果は、この過程でADAM17が増殖因子側だけでなく受容体側の制御にも同時に重要な機能を果たしていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：ADAM17 is known to be a major sheddase for HB-EGF and ErbB4. Secreted HB-EGF, that binds to and activates EGF receptor (EGFR/ErbB1) and ErbB4, plays an indispensable role for normal valvulogenesis in mouse embryos by suppressing mesenchymal cell proliferation. In an ex vivo model of endocardial cushion explants, HB-EGF suppresses valve mesenchymal cell proliferation through a heterodimer of ErbB1 and ErbB4 with downstream p38MAPK/JNK-signals, and certain ErbB1-ligand(s) promotes the proliferation through a homodimer of ErbB1 with downstream MEK-ERK-signal. Moreover, a rescue experiment with the cleavable or uncleavable isoform of ErbB4 in ERBB4 null cells suggests that the cytoplasmic-released intracellular domain of ErbB4 rather than the membrane-anchored tyrosine kinase achieves the suppression. These results also suggest that ADAM17 is the physiologically important player that regulates proteolytic processing of ErbB4 as well as HB-EGF in valvulogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞増殖因子 エクトドメイン・シェディング 切断酵素 細胞・組織 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) HB-EGF とその切断制御

HB-EGF は EGF ファミリーに属する細胞増殖因子である。HB-EGF は、癌などの細胞の過増殖を伴う疾患に深く関与している。また HB-EGF がマウス生体内の様々な生理的過程においても重要な役割を果たしていることがこれまでの本研究代表者らの研究などから明らかとなっている[1]。HB-EGF は他の EGF ファミリーと同様に膜結合型蛋白 (proHB-EGF) として合成された後、細胞表面において種々の外的刺激に伴ってプロテアーゼによる切断を受け、分泌型 (sHB-EGF) 及び C 末断片 (CTF) が生成される。この過程は一般にエクソドメイン・シェディングと呼ばれている。sHB-EGF は細胞外に分泌され EGF 受容体 (EGFR/ErbB1) あるいは ErbB4 に結合してこれらを発現する細胞に種々のシグナルを伝達する。主に培養細胞を用いたこれまでの研究から、sHB-EGF のみならず proHB-EGF や CTF も固有の生物活性を有し、HB-EGF が多様な作用様式で機能すること、そしてこの転換を担うシェディングの過程が分子的に複雑に制御されていることが明らかとなっている。さらに、HB-EGF ノックアウト (KO) マウス及び非切断型変異 HB-EGF ノックインマウスを用いた表現型比較解析から、マウス生体内の種々の過程において HB-EGF が正常に機能するためにはシェディング過程が必須であることを本研究代表者らは明らかにしている[2-5]。また逆に、恒常的分泌型変異 HB-EGF ノックインマウスが発生過程において種々の過形成異常を呈して早期に死亡することから、生体内において HB-EGF のシェディング過程の厳密な制御が非常に重要であることも見出している[3]。これらのことから HB-EGF にとってエクソドメイン・シェディングの過程とその厳密な制御は、HB-EGF の分子形態のみならずその分子機能転換及びその正常な機能発揮を担う非常に重要なステップであると言える[1]。

(2) HB-EGF 切断と ADAM17

HB-EGF の切断を担う酵素として、ADAM9, ADAM12, ADAM17 などの種々の ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーのメタロプロテアーゼが知られている。中でも ADAM17/TACE (TNF α /TGF α -converting enzyme) は、その KO マウスが HB-EGF をはじめとして TGF α や amphiregulin (ARG) など EGF ファミリーの KO と同様の表現型を呈することから、マウス生体内においてもこれらのシェディングに関与する最も有力なプロテアーゼであると考えられている。しかし ADAM17 は HB-EGF のみならず、他の上記 EGF ファミリーや、さらには TNF α や IL-6 等のサイトカインなど、現在 76 もの実に多くの膜蛋白質のシェディングに関与していることが知られており、その基質特異性・認識機構についてはまだほとんど不明である[6]。さ

らに、上述のように HB-EGF のシェディング制御は非常に厳密である必要があり、ADAM17 による HB-EGF 切断の制御、特にその抑制機構についてはほとんど解明されていない。

(3) HB-EGF と ADAM17 の協調的生理機能の場である心臓弁形成過程

HB-EGF が機能している生体内の様々な過程の中で、本研究代表者らが特に注目して研究しているのが、心臓弁形成過程である。その理由は、がん細胞などにおいて HB-EGF は増殖促進因子として機能するのに対し、心臓弁形成の場では、逆に増殖抑制因子として働いていることが判明しているからである[1-3,7]。心臓弁の発生はマウス胎仔期中期の心臓形成期に、心臓内皮細胞が内皮-間葉転換 (EMT) をおこして間質細胞となって弁間質内に遊走・増殖し、cardiac cushion とよばれる構造を形成することから始まる。その後 cardiac cushion は心臓弁へとリモデリングしていく。このリモデリング過程で弁内皮細胞に局限して HB-EGF が発現し、間質内にシェディングによって分泌された HB-EGF が間質細胞に作用してその増殖を抑制する。実際、HB-EGF KO などの HB-EGF 変異マウス胎仔では間質細胞の過増殖を伴った弁肥厚を呈する[1-3,7]。また、ErbB1 KO マウス胎仔も心臓弁肥厚を呈する[8]ことから、この過程で HB-EGF の受容体として ErbB1 が寄与していること、さらに ADAM17 KO マウス胎仔も同様の心臓弁肥厚の表現型を呈する[8]ことから、この過程における HB-EGF シェディングに ADAM17 が寄与することなどが強く示唆される。即ちこの過程では、弁内皮細胞で ADAM17 によって切断分泌された HB-EGF が、弁間質内間質細胞の ErbB1 に作用することによって、結果としてこの間質細胞の増殖を抑制する、というモデルが成り立つ。しかしこの増殖抑制を制御する分子機構は全く不明である。

[参考文献]

- [1] Mekada E and Iwamoto R. 2008. **UCSD-Nature Molecule Pages** doi: 10.1038/mp.a002932
 [2] Iwamoto R et al. 2003. **Proc Natl Acad Sci USA**. 100: 3221-3226
 [3] Yamazaki S and Iwamoto R et al. 2003. **J Cell Biol**. 163: 469-475
 [4] Mine N, Iwamoto R, Mekada E. 2005 **Development** 132: 4317-4326
 [5] Kimura R, Iwamoto R, Mekada E. 2005 **Cell Struct Funct**. 30: 35-42
 [6] Blobel CP. 2005. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 6:32-43
 [7] Iwamoto R et al. 2010. **Development** 137: 2205-2214
 [8] Jackson LF et al. 2003. **EMBO J**. 22: 2704-16

2. 研究の目的

本研究では HB-EGF を ADAM17 の代表基質として選択し、ADAM17 による HB-EGF シェディングの制御の分子機構を解明することを、当初の目的としていた。そして実験に用いる細胞系としては、一般的な種々の株化細胞を予定していた。しかし上述のように、生体内において ADAM17 と HB-EGF が、実際に協調して機能していることが判明している細胞系を用いる方が、真の制御機構にアプローチできると考え、用いる細胞系を、上述のように HB-EGF と ADAM17 が共に機能している事が強く示唆されているマウス胎仔心臓弁初代培養細胞に変更した。そして本研究の目的を、心臓弁形成過程を対象に絞り、この過程における ADAM17 による HB-EGF 切断制御の意義と機構の解析に、研究目的を再設定した。

3. 研究の方法

(1) 各種変異マウスと組織学的検討

HB-EGF KO マウスは、本研究代表者らが既に作製済みの系統を解析に用いた。ErbB1 活性低下変異マウス (waved-2 マウス) は既にアメリカ Jackson laboratory 社より購入済みの系統を用いた。Heart-rescued ErbB4 KO マウスはスイス・パーゼル大学 Martin Gassmann 博士に分与していただいた ErbB4 KO マウス及び心筋特異的 HER4 発現トランスジェニックマウスの二重変異体をこれらの交配によって作製し、解析に用いた。心臓弁肥厚は、18.5 日胎仔～新生仔マウスの心臓弁の連続切片のヘマトキシリン-エオジン染色画像から、最も厚い弁短径を計測した。

(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、まだ 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、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 10 日間培養する。この間培養開始約 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・増殖し始める。野生型あるいは変異マウス由来の explant を、培養 5 日目にレンチウイルスによる遺伝子導入や薬剤処理等を行い、培養終了時 (10 日目) 1 時間 BrdU を取り込ませこれに対する免疫染色法、あるいは増殖マーカーの Ki67 に対する免疫染色法でゲル内の間質細胞の増殖性を評価した。野生型と変異型細胞の増殖性比較、あるいは各種阻害剤を用いた実験では、BrdU-positive 細胞数を、propidium iodide (PI) を用いた核染色から計測した総細胞数で割った値の % $[100 \times \text{BrdU-positive cells}/\text{PI-stained cells}]$ を増殖率とした。また、レンチウイルスベクターには IRES で GFP が連結されたものを用い、これを用いた遺伝子導入実験においては、

Ki67-positive 細胞数を、GFP-positive 細胞数 (ベクターが導入された総細胞数) で割った値の % $[100 \times \text{Ki67-positive cells}/\text{GFP-positive cells}]$ を増殖率とした。なお、この培養系において、野生型心臓弁間質細胞の増殖率に対し、HB-EGF KO 細胞の増殖率が有意に高いこと、そして KO 細胞の過増殖をリコンビナント HB-EGF の添加によって抑制できること等、本培養系が *in vivo* の事象を反映していることは、既に本研究開始以前に確認済みである [Iwamoto R et al. 2010. *Development* 137: 2205-2214]。

4. 研究成果

(1) 細胞内シグナル系解析

1 HB-EGF 誘導性弁間質細胞増殖抑制における p38MAPK/JNK シグナルの寄与
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 培養系に種々の細胞内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、JNK 阻害剤あるいは p38MAPK 阻害剤が間質細胞の増殖を特異的に昂進させた。一方、MEK 阻害剤あるいは PI3-kinase 阻害剤は間質細胞の増殖に影響を与えなかった。さらに、JNK あるいは p38MAPK のドミナント・ネガティブ (DN) 変異体をこの培養系に導入したところ、阻害剤の場合と同様に間質細胞の増殖を昂進させた。一方で、MEK の DN 変異体の導入では、細胞の増殖性に影響は見られなかった。これらの結果から、HB-EGF による弁間質細胞増殖抑制には p38MAPK 及び JNK シグナルが必須に関与していることが示された。

2 HB-EGF 欠失誘導性弁間質細胞増殖昂進における MEK-ERK シグナルの寄与
次に、HB-EGF 欠失による間質細胞増殖昂進機構の解析のため、HB-EGF を発現しない HB-EGF KO cushion の explant 培養系に、同様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、MEK 阻害剤が KO 間質細胞の過増殖を抑制した。一方、JNK 阻害剤、p38MAPK 阻害剤、あるいは PI3-kinase 阻害剤は間質細胞の増殖に影響を与えなかった。さらに、MEK の DN 変異体をこの培養系に導入したところ、阻害剤の場合と同様に間質細胞の過増殖を抑制させた。一方で、JNK あるいは p38MAPK の DN 変異体の導入では、KO 細胞の過増殖に影響は見られなかった。これらの結果から、HB-EGF 欠失による弁間質細胞増殖昂進には MEK-ERK シグナルが必須に関与していることが示された。

JNK や p38MAPK、あるいは MEK-ERK シグナル系が HB-EGF のシェディング制御に重要な働きをしていることが既に知られており、これらの結果から、心臓弁間質細胞においても、特に JNK/p38MAPK が、HB-EGF シェディングを

担う ADAM17 の活性化に關与している可能性が示唆された。

(2) ErbB 受容体解析

¹ HB-EGF 誘導性弁間質細胞増殖抑制における ErbB1/ErbB4 ヘテロ二量体の寄与
ErbB 受容体は ErbB1~ErbB4 の 4 種類からなる受容体型チロシンキナーゼファミリーで、各々が二量体を形成して機能する。前述のように、HB-EGF による間質細胞増殖抑制において、間質細胞で HB-EGF の受容体として ErbB1 が機能していることが以前から示唆されている。そこで本研究ではこの問題にさらに踏み込んで、この抑制過程で HB-EGF の受容体として ErbB1 と二量体を形成している ErbB の同定を試みた。この目的のため、ErbB1~ErbB4 の細胞質内領域を欠失させた DN 変異体を、野生型 cushion の explant 培養系に導入したところ、DN-ErbB1 と DN-ErbB4 が共にその増殖性を特異的に昂進させた。一方 DN-ErbB2 と DN-ErbB3 ではほとんど増殖性に影響が観察されなかった。これらの結果から、HB-EGF 誘導性の弁間質細胞増殖抑制には、HB-EGF に対する受容体として ErbB1 と ErbB4 からなるヘテロ二量体が機能している事が強く示唆された。

² HB-EGF 欠失誘導性弁間質細胞増殖昂進における ErbB1 ホモ二量体の寄与
次に、HB-EGF 欠失による間質細胞増殖昂進において機能する ErbB についても同様に ErbB1 と二量体を形成している ErbB の同定を試みた。DN-ErbB1~DN-ErbB4 を、HB-EGF KO cushion の explant 培養系に導入したところ、DN-ErbB1 のみがその過増殖性を特異的に抑制させた。DN-ErbB2~DN-ErbB4 ではほとんどその過増殖に対する影響が観察されなかった。これらの結果から、HB-EGF 欠失誘導性の弁間質細胞増殖昂進には、ErbB1 ホモ二量体が機能している事が強く示唆された。

これらの結果は、ErbB1 が HB-EGF 誘導性増殖抑制と HB-EGF 欠失誘導性増殖昂進の両方に關与しているということを示唆する。このことに關連して、本研究代表者らによる以前の実験で、HB-EGF KO マウスと ErbB1 活性低下変異マウス (waved-2 マウス) との交配による二重変異マウスの作製とその表現型の解析において、HB-EGF KO マウス胎仔心臓弁でみられる肥厚程度よりも、二重変異胎仔心臓弁の肥厚程度が有意に軽度であるという結果が既に得られている (未発表)。つまりこの結果は、HB-EGF 欠失時の細胞の過増殖にも ErbB1 の活性が必要であることを in vivo で示したものであり、上記の ex vivo の結果を強く支持するものである。

(3) HB-EGF 誘導性増殖抑制における ErbB4 の機能とその作用モードの解析

上記の結果は、ErbB1 と ErbB4 で増殖の促進と抑制という正反対のシグナルが惹起され

るということの意味する。次に、では ErbB1 と ErbB4 は何が決定的に違うのかということについて検討した。ErbB4 には alternative splicing の違いによって 4 種類のアイソフォームが存在する。そのうちの 2 タイプは ADAM17 による切断を受ける (JM-a) か、受けない (JM-b) か、という大きな違いがある。切断を受けない JM-b タイプの場合、他の ErbB ファミリーと同様、二量体化による活性化に伴う細胞質内チロシン残基のリン酸化とこれらを認識するアダプターシグナル蛋白質群による連鎖的情報伝達が惹起される。一方、切断を受ける JM-a タイプの場合、リガンド結合によって誘導される ADAM17 によるシェディングに引き続き、 γ -secretase のプレセニリン 1 (PS1) による膜内切断が起こり、その結果、細胞質内に放出された細胞内領域 (ErbB4-ICD) が直接核内へ移行して、種々の遺伝子発現に關わるということが知られている。

そこでどちらのタイプが HB-EGF 誘導性増殖抑制に寄与しているのかを調べるため、野生型 cushion の explant 培養系に JM-a あるいは JM-b タイプの ErbB4 を導入したところ、JM-b タイプが特異的にその増殖性を昂進させることがわかった。JM-a タイプはほとんど影響を与えなかった。一方、HB-EGF KO cushion の explant 培養系にこれらを導入したところ、JM-a タイプがその過増殖を抑制することがわかった。これらの結果から、HB-EGF 誘導性増殖抑制に寄与している ErbB4 は JM-a タイプであることが示唆された。

(4) Herat-rescued ErbB4 KO マウス個体及び細胞を用いた解析

実際に in vivo で ErbB4 が HB-EGF の受容体として心臓弁間質細胞の増殖抑制に寄与しているのかを検討するため、ErbB4 KO マウスを入手してその心臓弁発生における表現型解析を行った。ただし、ErbB4 KO マウスは心臓弁形成時期以前に、心筋形成不全で胎生致死となるため、これを回避する目的で心筋特異的にヒト ErbB4 (HER4) を発現するトランスジェニックマウスとの二重変異体 (Herat-rescued ErbB4 KO) を作製し、これを解析した。その結果、ErbB4 KO の場合、HB-EGF KO の程度よりは軽いものの、有意に心臓弁が肥厚していることが観察された。さらに、ErbB4 KO 由来 cushion explant 培養系でも、野生型に比べて弁間質細胞が有意に過増殖を起こしていた。

次に ErbB4 KO 由来 cushion explant 培養系に JM-a あるいは JM-b タイプの ErbB4 を導入したところ、HB-EGF KO cushion explant 培養系の場合と同様に、JM-b タイプではほとんど影響が無く、JM-a タイプの方が特異的にその過増殖を抑制することがわかった。また、ErbB4 細胞内領域 (ErbB4-ICD) のみを挿入しても、有意に過増殖を抑制した。これらの結果から、HB-EGF 誘導性増殖抑制に寄与してい

る ErbB4 が JM-a タイプであり、この切断が増殖抑制に重要であることが示された。

以上の結果より、HB-EGF による心臓弁間質細胞の増殖抑制では ErbB1/ErbB4 ヘテロ二量体が寄与しており、その作用モードとして、ADAM17-PS1 による連続切断を介した ErbB4-ICD の直接的核シグナルの機構が働いていることが強く示唆された。またその下流では p38MAPK 及び JNK のシグナルカスケードが必須の役割を果たしていることも示された。一方で、HB-EGF 欠失による心臓弁間質細胞の増殖昂進では ErbB1 ホモ二量体が寄与しており、その下流では MEK-ERK シグナルカスケードが必須の役割を果たしていることがわかった。さらに ADAM17 の観点から重要なこととして、正常な心臓弁形成には ADAM17 による HB-EGF の切断制御のみならず、HB-EGF の受容体である ErbB4 の切断制御も非常に重要であり、ADAM17 がこの過程を二重に支配しているということが示唆された。

本研究では、残念ながら当初の目的である ADAM17 による HB-EGF 切断制御の分子機構を明らかにするところまでは到達しなかった。しかし、マウス心臓弁形成過程が、ADAM17 が増殖因子側だけでなく受容体側の制御にも重要な機能を果たしている生理的な場であるということが分かり、今後その分子的制御機構を解明するべき場として適切且つユニークであると考えられる。よって、今後も本過程に焦点を当てて、ADAM17 による HB-EGF 及び ErbB4 の切断制御に関わる分子メカニズムにアプローチしていく予定である。

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5件)

1 Iwamoto, R., Takagi, M., Akatsuka, J., Ono, K., Kishi, Y., and Mekada, E. Characterization of a novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody applicable for paraffin-embedded tissues and diagnosis of HB-EGF-related cancers.

Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 35: 73-82, 2016.

doi: 10.1089/mab.2015.0062.

(査読有)

2 Suzuki, K., Mizushima, H., Abe, H., Iwamoto, R., Nakamura, H., Mekada, E. Identification of diphtheria toxin R domain mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF.

J. Biochem. 157: 331-343, 2015.

doi: 10.1093/jb/mvu079.

(査読有)

3 Odintsova, E., Niel, G., Conjeaud, H., Raposo, G., Iwamoto, R., Mekada, E., Berditchevski, F. Metastasis suppressor tetraspanin CD82/Kail regulates ubiquitylation of epidermal growth factor receptor.

J. Biol. Chem. 288: 26323-26334, 2013.

doi: 10.1074/jbc.M112.439380.

(査読有)

4 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

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.097.

(査読有)

5 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., 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, 2013.

doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01074.x.

(査読有)

[学会発表](計3件)

1 Ryo Iwamoto

Physiological functions of diphtheria toxin receptor/HB-EGF.

17th European Workshop on Bacterial Protein Toxins

Braga, Portugal

June, 2015

2 岩本 亮

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

奈良

2014年6月11日

3 岩本 亮

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

名古屋

2013年6月21日

[図書](計1件)

1 Iwamoto, R. and Mekada, E.

HB-EGF (Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor)

Encyclopedia of Signalling Molecules, 854-858, 2012.

Springer

doi: 10.1007/978-1-4419-0461-4.

〔その他〕

ホームページ等

IWAMOTO'S PAGE

<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)