

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250033

研究課題名(和文) HB-EGFの特性を理解した新たながん抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-cancer therapeutics targeting HB-EGF

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) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：HB-EGFの癌における役割と新たな分子標的治療法の探索を目的として、HB-EGFの癌細胞や正常培養細胞に対する増殖促進作用と、発生過程での増殖抑制作用について検討した。その結果、増殖抑制にはEGFRとErbB4の両方が関与していること、増殖促進にはEGFRホモダイマーが関与していることを明らかにした。さらに、癌-癌間質相互作用におけるHB-EGFの役割解析、およびマイコプラズマ感染とがん悪性化との因果関係にHB-EGFが関与するかどうかを検討した。

研究成果の概要(英文)：HB-EGF plays an indispensable role in suppression of cell proliferation in mouse valvulogenesis. However, ligands of the EGF receptor (EGFR/ErbB1), including HB-EGF, are generally considered as growth-promoting factors, as shown in cancers. We investigated the role of ErbB receptors in valvulogenesis in vivo using ErbB1- and ErbB4-deficient mice, and an ex vivo model of endocardial cushion explants. We found that HB-EGF suppresses valve mesenchymal cell proliferation through a heterodimer of ErbB1 and ErbB4, and an ErbB1 ligand(s) promotes cell proliferation through a homodimer of ErbB1. Our study demonstrates that opposing signals generated by different ErbB dimer combinations function in the same cardiac cushion mesenchymal cells for proper cardiac valve formation.

研究分野：細胞生物学、腫瘍生物学

キーワード：EGFR HB-EGF ErbB4 増殖抑制

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、7種類ある EGFR リガンドの中でも特に生体にとって重要な因子の一つである。実際その重要性は、HB-EGF KO マウスが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し、多くの個体が出生前後で死亡するのに対して、他の EGFR リガンド KO マウスはいずれも軽微な異常を示すだけで成人にまで成長することに象徴される。さらに HB-EGF は、欠損だけでなく、発現の亢進も病気の原因となる。HB-EGF の発現亢進が関わる病理現象としては、癌、動脈硬化、高血圧、皮膚疾患、嚢胞性線維症に伴う肺疾患、などが報告されているが、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。本研究課題の代表者らはジフテリア毒素変異体を有効成分とする HB-EGF 阻害剤 BK-UM の臨床試験を医師主導治験として実施しているが、申請者の知る限り少なくとも大手製薬メーカー 2 社でも HB-EGF を分子標的とする抗体医薬の開発を進めており、増殖因子のリガンドを分子標的とする新たな治療薬として、その臨床試験の結果が注目されている。

研究代表者である目加田は、ジフテリア毒素受容体として HB-EGF 分子の同定・解析に着手して以来 (ジフテリア毒素受容体と膜結合型 HB-EGF (proHB-EGF) は同一分子) 一貫してこの分子の機能解析を行ってきた。1995 年からは、増殖因子としての作用機構解明に注力し、proHB-EGF の機能解析や、分泌型 HB-EGF (sHB-EGF) がエクストドメインシェディングによって proHB-EGF から生じること、この過程が TPA 刺激によって誘導されることを明らかにした。さらに、この過程には ADAM ファミリーのプロテアーゼが関与すること、LPA (lysophosphatidic acid) 等の生理活性物質や種々のストレス刺激が HB-EGF のエクストドメインシェディングを誘導すること、を見いだした。また、ノックアウトマウスを作製して HB-EGF の生理的役割を詳しく解析すると共に、エクストドメインシェディングが正常に起こらない変異マウスを作製して、エクストドメインシェディングがこのタンパクの機能制御に極めて重要であることを個体レベルで証明した。さらに、卵巣癌では腹水中に LPA が多量に含まれること、LPA が HB-EGF のエクストドメインシェディングを強く誘導することにヒントを得て、卵巣癌では HB-EGF が高発現しており、卵巣癌腹水中に多量の sHB-EGF が含まれること、HB-EGF の発現レベルと予後が逆相関することを明らかにした。また、マウス皮下腫瘍モデルを用いて、ヒト卵巣癌細胞の腫瘍形成に HB-EGF の発現が極めて

重要であること、HB-EGF を阻害することで腫瘍形成が抑制されることを明らかにした。さらにジフテリア毒素の無毒性変異体である CRM197 が HB-EGF の作用を抑制することを利用して、CRM197 を有効成分とする癌治療薬の開発を進め、再発卵巣癌を対象にした第 1 相の臨床試験を完了し、第 2 相試験を医師主導治験として全国 5 施設で実施した。また、HB-EGF に対するモノクローナル抗体を多数分離し、抗体治療薬の開発に貢献してきた。この様に申請者は HB-EGF 分子に焦点を絞った基礎的探索研究を長期間行うと同時に、HB-EGF 阻害剤の開発研究を手がけ、HB-EGF が癌標的として注目されるきっかけを提供してきた。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。

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、新たな分子標的治療法の探索を目的として、以下の解析を行う。

(1) HB-EGF が示す増殖抑制作用の解析

癌細胞において sHB-EGF は増殖や細胞運動を強く亢進させる。一方、ノックアウトマウスの解析から、発生過程の心臓弁では sHB-EGF は増殖抑制因子として働くことを我々は見いだしている。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する。EGF 受容体を介した細胞増殖シグナルに関してはこれまで膨大な研究があるが、増殖抑制シグナルについてはほとんど研究がなされていない。本研究テーマはその学術的意義と同時に、HB-EGF を高発現している癌細胞において、sHB-EGF の増殖促進効果を増殖抑制効果に切り替えることで癌を制御する全く新しい治療法の開発につながる可能性がある。

(2) 癌-癌間質相互作用における HB-EGF の役割解析

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。ある種の癌組織では、癌細胞は HB-EGF を発現しないが、癌間質の繊維芽細胞が HB-EGF を発現し癌細胞の増殖を促進している。興味深いことに、この時癌細胞から間質細胞に HB-EGF の合成を誘導する増殖因子やケモカインなどの因子を放出していることを示す結果が得られている。これらの因子と HB-EGF によって構成される癌-癌間質相互作用による癌の悪性化機構を明らかにする。

(3) HB-EGF による発がん・悪性化とマイコプラズマ感染との因果関係の解明

マイコプラズマは、肺炎や喘息の原因となるだけでなく、前立腺がんや胃がんの発症と関連する可能性が過去に報告されている。しかし、当時のマイコプラズマ検出精度や癌組織摘出後にマイコプラズマが混入・感染した

可能性が否定できないことから、一般的には認知されていない。申請者らは、全く偶然に、培養細胞にマイコプラズマが感染すると HB-EGF の発現が著しく亢進し、これが卵巣癌の発症や悪性化に寄与すると考えられる実験結果を得た。今後さらに詳細なメカニズムを解明し、マイコプラズマ感染がんに対する新たな予防・治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) HB-EGF が示す増殖抑制作用の解析

HB-EGF (特に sHB-EGF) は癌細胞や正常培養細胞に強い増殖促進作用を示す (Mizushima et al, J Cell Sci 122:4277-4286, 2009)。しかし、心臓弁の形成や肺胞の形成過程では sHB-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 (Iwamoto et al, Development 137:2205-2213, 2010)、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 (Iwamoto et al, Proc Natl Acad Sci USA 100:3221-3226, 2003)。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。我々は HB-EGF による増殖抑制機構を明らかにするために、心臓弁形成直前のマウス胎仔より cardiac cushion (将来心臓弁を形成する組織) を取り出し、コラーゲン、ヒアルロン酸を含むゲル上に移植する器官培養システム (ex vivo システム) を構築した。このシステムを用いて、以下の可能性を検証する。(i)心臓弁の間質細胞は HB-EGF によって増殖抑制を受けると考えられるが、一方で別の EGF ファミリーの増殖因子によって増殖亢進シグナルを受けていることが示唆される。この可能性を ex vivo システムによって検証する。また、間質細胞では EGFR と ErbB4 の両方が発現している。増殖抑制にどちらの受容体が関与しているかを明らかにする。(ii)HB-EGF による増殖抑制時に働く下流シグナルや関連する因子、あるいは増殖促進から抑制にスイッチを切り替える活性転換因子を ex vivo システムを用いて明らかにする。(iii)培養細胞を用いた増殖抑制モデルの構築。HB-EGF ex vivo システムでは、マウス胎仔より取り出した cardiac cushion を研究材料として用いるが、材料取得に制限があるため、繰り返し大規模な研究は困難である。(i)(ii)の研究成果を元に培養細胞で HB-EGF による増殖抑制を示すシステムを構築する。

(2) 癌-癌間質相互作用における HB-EGF の役割解析

子宮頸癌における HB-EGF の発現を調べた結果、子宮頸癌では癌細胞自体は HB-EGF を発現していないが、癌間質の繊維芽細胞が HB-EGF を発現していることが、in situ hybridization による mRNA の解析と抗

HB-EGF 抗体による免疫染色の結果より明らかとなった。また、子宮頸癌由来 ME180 細胞と癌組織より分離した癌間質繊維芽細胞 (CAF) を用いた共培養実験から、CAF から分泌された HB-EGF が癌細胞 (ME180) の増殖を促進していること、また ME180 細胞が PDGF を分泌して CAF 細胞の HB-EGF 合成を誘導していること、が明らかとなった (Murata, T. Cancer Res. 71:6633-6664, 2011)。上記の事実は、癌細胞と癌間質細胞が極めて密接な相互作用をしながら癌の悪性化に寄与していることを示唆している。本研究課題では、癌の転移における CAF の役割を、蛍光標識した ME180 細胞を用いて、マウスモデルで検討する。

(3) HB-EGF による発がん・悪性化とマイコプラズマ感染との因果関係の解明

細胞寄生細菌であるマイコプラズマは、肺炎や慢性感染による喘息の原因となるだけでなく、前立腺がんや胃がんの発症と関連することが過去の論文で示唆されている。しかし、本当にマイコプラズマ感染ががん発症の原因となるのか、あるいはなぜマイコプラズマ感染ががん発症と結びつくのか、その疑問に対する明確な答えは示されていない。申請者らは、全く偶然であるが、培養卵巣癌細胞にマイコプラズマが感染すると HB-EGF の発現が著しく亢進することを見いだした。さらに、これまでの研究で、1)マイコプラズマ感染による HB-EGF 誘導は複数の細胞で認められること、2)マイコプラズマを除去すると誘導が解除されること、3)マイコプラズマ感染によって HB-EGF を高発現した細胞はトランスフォームし軟寒天中で増殖可能となること、4)実際に卵巣癌臨床検体でマイコプラズマの感染例が多く認められること、を確認した。これらの実験結果から、現在申請者らは、マイコプラズマ感染によって引き起こされた慢性炎症が HB-EGF の過剰発現を誘導し、結果的に細胞のがん化やがん細胞の悪性化に関わっている例があるのではないかと考えている。そこで、上記仮説を検証すると同時に、その詳細なメカニズムを解明するために、(i)マイコプラズマ感染による HB-EGF 誘導機構の解析、(ii)臨床検体を用いた卵巣癌とマイコプラズマ感染の相関性解析、(iii)その他のがんにおけるマイコプラズマ感染有無の解析、を行う。

4. 研究成果

(1) HB-EGF が示す増殖抑制作用に関して：

以前に開発した ex vivo システムを用いて、心臓弁間質細胞での HB-EGF による増殖抑制に関わる受容体を詳細に解析した。その結果、レンチウイルスベクターをもちいた発現抑制実験を行い、増殖抑制には EGFR と ErbB4 の両方が関与していることが示された。また、HB-EGF ノックアウトマウス、EGFR 変異マウス、ErbB4 ノックアウトマウスから Cardiac

cushion を得、これを用いた ex vivo システムで、心臓弁間質細胞での HB-EGF による増殖抑制には EGFR と ErbB4 の両方が関与していることを確認した。EGFR と ErbB4 からなるヘテロダイマーがこの増殖抑制に関わっている可能性が強く示唆された。

HB-EGF ノックアウトマウスにおいて心臓弁組織が肥厚するのは、HB-EGF による増殖抑制が働かないことに加えて、何らかの増殖促進シグナルが働いていることを示している。ex vivo システムを用いて解析したところ、この時の増殖促進に EGFR/EGFR ホモダイマーが使用されていることが示された。したがって、心臓弁組織では、HB-EGF 以外の EGF ファミリー分子が EGFR/EGFR ホモダイマーを通して増殖促進に働いていることが示唆された。

ErbB4 による細胞内へのシグナルの伝達には、チロシンキナーゼ活性を介した canonical な情報伝達と ErbB4 の細胞内ドメインが核内に輸送されて働く新規な情報伝達が報告されている。ex vivo システムを用いて、種々の ErbB4 変異体の効果を解析し、心臓弁間質細胞での HB-EGF による増殖抑制には後者のメカニズムが使われていることを明らかにした。

HB-EGF による増殖抑制に関わるシグナル分子を ex vivo システムを用いて解析し、増殖促進には MEK-ERK が、増殖抑制では P38 MAPK が関わっていることを明らかにした。増殖抑制において、P38 MAPK と EGFR/ErbB4 複合体がどのように繋がっているのか、これについては今後の問題として残された。

HB-EGF による EGFR-ErbB4 ヘテロダイマーを介した増殖抑制機構をさらに分子レベルで解析するには、マウス胎児の組織を使用する ex vivo システムでは困難である。培養株細胞にコンディショナルに EGFR-ErbB4 を発現させるシステムの構築を試み、これに成功した。またここに HB-EGF を加えて増殖抑制を再現することが可能となった。今後は、このシステムを用いて、EGFR/ErbB4 複合体がどのようにして細胞増殖を負に制御しているのか、を分子レベルでより詳細に明らかにする。またこの研究を通じて、増殖促進から抑制にスイッチを切り替える活性転換因子を明らかにしたいと考えている。これによって HB-EGF の活性転換因子を同定できれば 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もあり、癌の新規療法開拓としても大きな意義がある重要な研究テーマであると考えている。

(2) 癌-癌間質相互作用における HB-EGF の役割解析に関して：

子宮頸癌由来 ME180 細胞と癌組織より分離した癌間質繊維芽細胞(CAF)を用いた共培養実験から、CAF から分泌された HB-EGF が癌細胞 (ME180) の増殖を促進していること、また

ME180 細胞が PDGF を分泌して CAF 細胞の HB-EGF 合成を誘導していること、を明らかにしている。上記の事実は、癌細胞と癌間質細胞が極めて密接な相互作用をしながら癌の悪性化に寄与していることを示唆している。上記の関係が、細胞増殖だけでなく、癌細胞の転移にも寄与しているかどうかをマウス xenograft モデルを用いて検証した。GFP で標識した ME180 細胞を単独で、あるいは CAF と一緒に、ヌードマウス皮下に注射し、8-10 週後に転移の有無を解析した。その結果、CAF と一緒に注射された ME180 細胞では 40% のマウスでリンパ節への転移が認められたのに対して、ME180 細胞を単独で注射した群では全く転移は認められなかった。このことから、CAF は、ME180 細胞の増殖に寄与するだけでなく、転移の促進にも寄与することが明らかとなった。このことから、子宮頸がんにおいて、癌細胞と癌間質細胞は、ME180 細胞と CAF でみとめられたように、HB-EGF と PDGF を相互に分泌することで、癌の悪性化に働いていることが示唆された。また、本研究により、これまでマウス皮下移植実験では困難であった転移モデル実験が CAF を利用することで可能となることが示された。

(3) HB-EGF による発がん・悪性化とマイコプラズマ感染との因果関係に関して：

マイコプラズマ感染による HB-EGF 誘導機構を解析し以下のことを明らかにした。i) マイコプラズマ感染は Toll 様受容体を介して NF- κ B の活性化を誘導した。ii) NF- κ B が HB-EGF を活性化することが確認された。iii) TNF- α が卵巣がん細胞の HB-EGF 発現を亢進することを確認した。これらのことから、1) 卵管を逆行し侵入したマイコプラズマが上皮組織に感染し、2) その感染が引き金となって TNF- α が誘導され、3) 発現した TNF- α が NF- κ B 経路を活性化し、4) それによって標的遺伝子である HB-EGF の発現を亢進させ、5) 誘導された HB-EGF がオートクライン、パラクラインによって細胞増殖や運動性を亢進させることでがんの発症・悪性化に寄与する、というメカニズムが可能性として示された。上記の作業仮説をヒト卵巣癌由来培養細胞を用いて解析を進め、今後より詳細な誘導メカニズムを明らかにしたい。

臨床検体を用いた卵巣癌とマイコプラズマ感染の相関性解析を行った。外科的手術によって得られた卵巣癌組織を用いてマイコプラズマ感染の有無を検討したところ、60% の卵巣癌組織で M. hyorhinis ゲノムを検出した。また、卵巣癌患者腹水をマイコプラズマ非感染細胞に添加し、マイコプラズマの増幅を行った後、培地中よりゲノムを抽出し PCR により検出したところ、3 例中 3 例で M. hyorhinis を検出した。

マイコプラズマ感染とその他のがんについて調べた。その結果、卵巣癌細胞株以外に、乳癌細胞、胃がん細胞でもマイコプラズマ感

染を確認した。

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 6件)

Okamoto, A., Asai, T., Kato, H., Ando, H., Minamino, T., Mekada, E. and Oku, N. (2014) Antibody-modified lipid nanoparticles for selective delivery of siRNA to tumors expressing membrane-anchored form of HB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449, 460-465.

Suzuki, K., Mizushima, H., Abe, H., Iwamoto, R., Nakamura, H. and Mekada, E. (2015) Identification of diphtheria toxin R domain mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF. *J. Biochem.* 157, 331-343.

Iwamoto, R., Takagi, M., Akatsuka, J. I., Ono, K. I., Kish, Y. and Mekada, E. (2016) Characterization of a novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody applicable for paraffin-embedded tissues and diagnosis of HB-EGF-related cancers. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 35, 73-82.

Murata, T., Mekada, E. and Hoffman, R.M. (2017) Reconstitution of a metastatic-resistant tumor microenvironment with cancer-associated fibroblasts enables metastasis. *Cell Cycle.* 16(6): 533-535.

Miyamoto, S., Yotsumoto, F., Ueda, T., Fukami, T., Sanui, A., Miyata, K., Ouk Nam, S., Fukagawa, S., Katsuta, T., Maehara, M., Kondo, H., Miyahara, D., Shirota, K., Yoshizato, T., Kuroki, M., Nishikawa, H., Saku, K., Tsuboi, Y., Ishitsuka, K., Takamatsu, Y., Tamura, K., Matsunaga, A., Hachisuga, T., Nishino, S., Odawara, T., Maeda, K., Manabe, S., Ishikawa, T., Okuno, Y., Ohishi, M., Hikita, T., Mizushima, H., Iwamoto, R. and Mekada, E. (2017) BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: A first-in-human phase-I study. *BMC Cancer.* 17(1): 89.

Iwamoto, R., Mine, N., Mizushima, H. and Mekada, E. (2017) ErbB1 and ErbB4 generate opposing signals regulating mesenchymal cell proliferation during valvulogenesis. *J. Cell Sci.* 130(7): 1321-1332.

〔学会発表〕(計 9件)

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、2014.6.13、奈良

水島寛人、船越紘希、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、2014.6.13、奈良

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、2014.6.13、奈良

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、2014.11.14、福岡

Ryo Iwamoto and Eisuke Mekada、Physiological functions of diphtheria toxin receptor/HB-EGF、17TH EUROPEAN WORKSHOP ON BACTERIAL PROTEIN TOXINS、2015.6.22、Portugal
Eisuke Mekada, Keisuke Suzuki, Hiroto Mizushima, Hiroyuki Abe, Ryo Iwamoto and Haruki Nakamura、Diphtheria toxin mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF for cancer therapy、17TH EUROPEAN WORKSHOP ON BACTERIAL PROTEIN TOXINS、2015.6.22、Portugal

水島寛人、船越紘希、目加田英輔、HB-EGF 依存的細胞増殖は FAK のリン酸化により制御される、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015.6.30、東京

水島寛人、鈴木翔大、目加田英輔、SHP-2 は FAK と協調的に HB-EGF 依存的細胞増殖を亢進する、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016.6.17、京都

岩本亮、目加田英輔、マウス心臓弁形成過程における HB-EGF-ErbB シグナルによる細胞増殖制御、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016.6.17、京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

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

該当なし

(3)連携研究者

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

水島 寛人 (MIZUSHIMA Hiroto)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：30379094

中村 尚志 (NAKAMURA Takashi)
大阪大学・微生物病研究所・研究員
研究者番号：00570673
(平成26年度のみ連携研究者)

(4)研究協力者

米田 智子 (YONEDA Tomoko)
大阪大学・微生物病研究所・特任技術職員