

令和元年5月9日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07046

研究課題名(和文) HB-EGF-ErbB4シグナルによる細胞増殖制御機構とその応用

研究課題名(英文) Mechanism regulating cellular proliferation by HB-EGF-ErbB4 signaling and its application

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：増殖因子HB-EGFはマウス心臓弁形成過程で弁間質細胞の増殖を抑制しており、これには受容体としてErbB4が機能している。本研究ではこの過程に焦点を当て、HB-EGFとErbB4による細胞増殖制御を司る分子機構を明らかにすることを目的として解析を行った。その結果、HB-EGFによる増殖抑制にはErbB4の切断型JM-aタイプが機能しており、さらにJM-aタイプの細胞内領域バリエーションのCYT-1/CYT-2両方に含まれる領域が必須であることが明らかとなった。これらの知見を元に今後、HB-EGF-ErbB4シグナル系を応用した、がん細胞増殖抑制法の検討を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、心臓弁形成過程の細胞増殖制御におけるHB-EGF-ErbB4による増殖抑制シグナルの分子機構を明らかにすることで、従来仮想的に考えられていたErbBシグナル間の制御機構が実際の生体において存在している事の証明となり、細胞生物学上非常に意義が大きい。さらに、これまでの抗がん剤等における分子標的治療では、その標的分子の機能を封じる方向であったが、本研究によって、標的分子を封じるのではなく、活性転換という形で「標的を生かして使う」という新たなコンセプトが導き出され、医学的方法論的にも意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：HB-EGF plays an indispensable role in suppression of cell proliferation during mouse valvulogenesis. HB-EGF binds to and activates ErbB1 and ErbB4. 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. HB-EGF suppresses valve mesenchymal cell proliferation through a heterodimer of ErbB1 and ErbB4, and certain ErbB1-ligand(s) promotes the proliferation through a homodimer of ErbB1. A rescue experiment with the cleavable (JM-a) or uncleavable (JM-b) isoform of ErbB4 in ERBB4 null cells suggests that intracellular domain of ErbB4 rather than the membrane-anchored tyrosine kinase achieves the suppression. Moreover, cytoplasmic region that is contained in both CYT-1 and CYT-2 subtypes of ErbB4 is essential for the suppression. These results predict that HB-EGF-ErbB4 signaling axis may be applicable for cancer therapy of the next generation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞増殖因子 心臓弁形成 増殖抑制 細胞・組織 形態形成 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ ErbB ファミリーは EGFR(ErbB1)から ErbB4 の 4 種類から構成される。ErbB 受容体にリガンドが結合すると各々はホモあるいはヘテロ 2 量体を形成し、細胞内キナーゼが相互の複数の細胞質領域チロシン残基をリン酸化し、これらを認識する種々のアダプタータンパク質をそこへリクルートすることで、下流へのシグナル伝達を惹起する。各 ErbB 受容体への種々のリガンドの親和性の違いや、各 ErbB 受容体の細胞内領域アミノ酸配列の多様性と各 ErbB の 2 量体の組合せにより、膨大な下流シグナルの多様性が生じる。EGF ファミリーはこの ErbB ファミリー受容体に結合する増殖因子の仲間であり、本研究申請者らはそれらの中で特に HB-EGF の研究を行っている。HB-EGF は EGFR あるいは ErbB4 と結合するため、HB-EGF は両者いずれかから構成されるすべてのホモあるいはヘテロ 2 量体に結合して多様なシグナルを理論上伝達できる。

HB-EGF は卵巣がんを含む様々ながん細胞の増殖等の病的過程に深く関わっている [1]。一方で HB-EGF は種々の生理的過程においても実に様々な役割を果たしていることが、申請者らによる主にノックアウト(KO)などの HB-EGF 遺伝子改変マウスを用いた研究から明らかになってきた[2]。例えば上皮の発生・再生過程における上皮シートの移動や、心臓の機能維持における心筋細胞の生存に HB-EGF は必須に機能している。さらに HB-EGF は肺胞形成過程[3]や心臓弁形成過程[4-7]においては細胞増殖の抑制に機能している。これらの知見で特に興味深いことは、HB-EGF ががんなどの病的過程では細胞増殖促進に機能しているのに対し、マウスの生理的過程において増殖促進に機能している過程が 1 つも見つかっておらず、特に肺胞形成過程や心臓弁形成過程では逆に増殖抑制に機能しているという点である。このことは HB-EGF の本来の機能が増殖促進ではなく、実は細胞移動や増殖抑制因子としての機能であり、病的過程ではこのような機能を制御する機構が破綻し、HB-EGF が増殖促進機能に転換しているという仮説が考えられる。さらに考察を進めると、生理的過程において HB-EGF を増殖抑制因子として機能するよう規定している制御因子あるいはシステム(因子群)を、この制御が破綻している HB-EGF が関与するがん細胞などに導入することで、がんの治療が可能となる。つまりこれは、制御破綻状態の HB-EGF を正常状態に復帰させるという新たな疾病治療法となり得る。

このような仮説・展望に基づき、申請者らはこれまでに特に心臓弁形成過程に着目し、HB-EGF による細胞増殖抑制の分子メカニズム解明の研究を進めている。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限局して 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[4-7]。さらにその後の研究から、HB-EGF 欠失時の間質細胞の過増殖では、間質細胞上で EGFR のホモ 2 量体が機能しているのに対し、HB-EGF が増殖を抑制するときは、EGFR/ErbB4 ヘテロ 2 量体が機能していることを見いだした[7] (図 1)。

## 2. 研究の目的

報告者らによる上記の知見を受け、本研究の第 1 の目的は、マウス心臓弁形成過程における HB-EGF による細胞増殖抑制機構の解析をさらに進めることにより、ErbB4 の下流のシグナル伝達及び遺伝子発現の分子機構、そして HB-EGF が間質細胞上の EGFR ホモ 2 量体ではなく EGFR/ErbB4 ヘテロ 2 量体に優先的に作用する分子機構、さらに HB-EGF 欠失時に EGFR ホモ 2 量

体に作用して増殖促進に機能している EGFR リガンド増殖因子を同定することである。そして第2の目的は、このようなマウス心臓弁形成過程における HB-EGF と ErbB4 シグナルによる細胞増殖抑制機構の解析から得られる知見を、HB-EGF の細胞増殖促進から抑制への活性転換という方法論に応用することで、がん細胞増殖抑制とその治療への応用を目指すことである (図2)。

### 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。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グル上で 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 Bromodeoxyuridine (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 [6,7]。

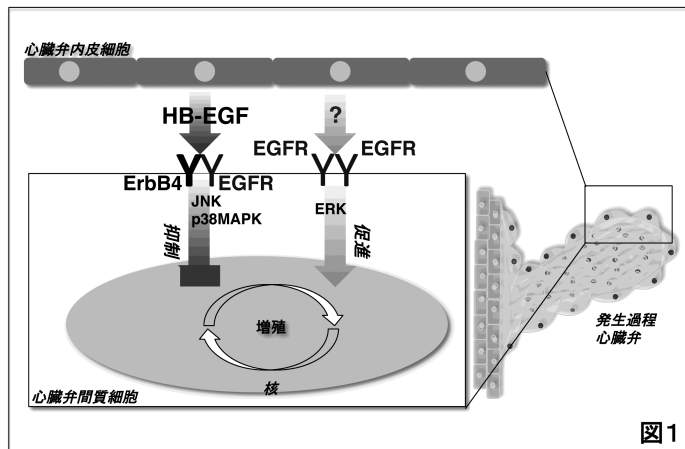


図1

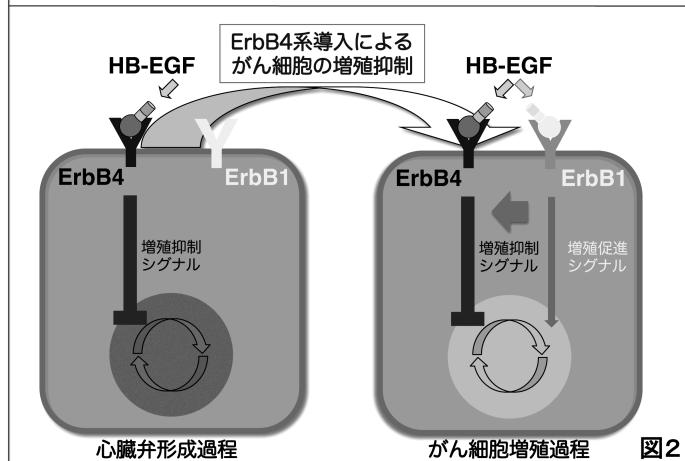


図2

#### 4 . 研究成果

##### (1)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

報告者はこれまでに、HB-EGF 誘導性の弁間質細胞の増殖抑制において、HB-EGF の受容体として ErbB1/ErbB4 ヘテロ二量体が寄与しており、一方で HB-EGF 欠失誘導性の弁間質細胞の増殖昂進においては、ErbB1 ホモ二量体がしているということを見いだしている。これらのことは、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。そこでまず、ErbB1 と ErbB4 の構造的機能的相違について検討した。

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、 $\gamma$ -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関わるということが知られている。

そこで JM-a と JM-b のどちらのタイプが 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、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 K0 由来 cushion 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強く示唆された[7]。

##### (2)Heart-rescued ErbB4 K0 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 K0 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 K0 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 (Heart-rescued ErbB4 K0) を作製し、これを解析した。その結果、ErbB4 K0 の場合、HB-EGF K0 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 K0 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[7]。

次に ErbB4 K0 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 K0 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 (CYT-1 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[7]。

##### (3)HB-EGF-ErbB4 抑制シグナル伝達に必須の ErbB4 細胞内領域の同定解析

ErbB4 には切断を受けるかどうかの JM-a/JM-b タイプだけでなく、その細胞質領域に特異的アミノ酸配列を有するか否かにより CYT-1 及び CYT-2 の 2 つのタイプが存在する。上記実験で増殖抑制能を有した JM-a タイプでは全て CYT-1 タイプのものを用いていた。そこで、ErbB4 JM-a

タイプのさらなる細胞内領域バリエーションである、CYT-1 と CYT-2 の増殖抑制能を検討するため、ErbB4 K0 由来 cushion explant 培養系に CYT-2 タイプの JM-a ErbB4 を導入したところ、CYT-2 タイプでも CYT-1 タイプと同様に、ErbB4 K0 細胞の過増殖を抑制した。野生型細胞に対しては、CYT-1 タイプと同様に、増殖性への影響は観察されなかった。これらの結果から、ErbB4 による弁間質細胞の増殖抑制には、細胞内領域 CYT-1/CYT-2 両方に含まれる領域(即ち特異配列以外の配列)が必須であることが明らかとなった(解析継続中)。

#### (4)HB-EGF 依存性がん増殖抑制応用への試行

HB-EGF-ErbB4 による、細胞増殖制御機構の HB-EGF 依存性がん増殖の抑制への応用を目的として、まず ErbB4 細胞内領域(CYT-1 タイプの ErbB4-ICD)をテトラサイクリン添加依存性に誘導発現する、マウス乳腺上皮細胞株を樹立した。そして ErbB4-ICD 発現依存的に細胞増殖が抑制されることを確認した。

以上の結果より、マウス胎仔心臓弁形成過程における、HB-EGF-ErbB4 シグナル系による心臓弁間質細胞の増殖抑制では、JM-a タイプの ErbB4 が機能しており、その作用モードとして ErbB4 細胞内領域 (ErbB4-ICD) の直接的核移行シグナルの機構が働いていることが示唆された[7]。また、その細胞内領域の CYT1/CYT2 の両方のサブタイプに包含されるアミノ酸配列が、ErbB4-ICD による細胞増殖抑制シグナル伝達に必須であることも明らかとなった。

本研究では残念ながら、最終目標である、HB-EGF の細胞増殖促進から抑制への活性転換という方法論をがん細胞増殖抑制とその治療に応用する所までは到達しなかったが、本研究をさらに進めることによって、標的分子を封じるのではなく、活性転換という形で「標的を生かして使う」という新たなコンセプトによるがん治療法の開発を目指していきたい。

#### [引用文献]

- [1] Miyamoto S, et al. **Cancer Sci.** 97: 341-347, 2006
- [2] Mekada E, Iwamoto R, **UCSD-Nature Molecule Pages** doi: 10.1038/mp.a002932.01, 2008
- [3] Minami S., Iwamoto R, Mekada, E. **Dev. Dyn.** 237: 248-258, 2008
- [4] Iwamoto R, et al. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100: 3221-3226, 2003
- [5] Yamazaki S, Iwamoto R, et al. **J. Cell Biol.** 163: 469-475, 2003
- [6] Iwamoto R, et al. **Development** 137: 2205-2214, 2010
- [7] Iwamoto R, et al. **J. Cell Sci.** 130: 1321-1332, 2017

#### 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計5件)

1 Yamato M, Minamino T, Matsuzaki T, Araki R, Tsuchida S, Okuda K, Ying Fu H, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Torii H, Noi K, Ogi H, Iwamoto R, Mekada E, Takashima S, Sakata Y, Kitakaze M.

RNA Aptamer Binds Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor with High Affinity and Specificity and Neutralizes Its Activity.

**Int. J. Gerontol.** (査読有) 11: 191-196, 2017

doi: 10.1016/j.ijge.2017.03.006

2 Iwamoto R, Mine N, Mizushima H, Mekada E.

ErbB1 and ErbB4 generate opposing signals regulating mesenchymal cell proliferation during valvulogenesis.

**J. Cell Sci.** (査読有) 130: 1321-1332, 2017

doi: 10.1242/jcs.196618

3 Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, Fukami T, Sanui A, Miyata K, Nam S O, 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, Ohoishi M, Hikita T, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E.

BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: a first-in-human phase-I study.

**BMC Cancer** (査読有) 17: 89, 2017

doi: 10.1186/s12885-017-3071-5

4 Iwamoto R, Takagi M, Akatsuka J, Ono K, Kishi Y, 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** (査読有) 35: 73-82, 2016

doi: 10.1089/mab.2015.0062

5 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.** (査読有) 157: 331-343, 2015

doi: 10.1093/jb/mvu079

[学会発表](計2件)

1 岩本 亮

Regulation of cell proliferation by HB-EGF-ErbB signaling in cardiac valve development.

第68回日本細胞生物学会大会(京都)2016年6月15日

2 Iwamoto R.

Physiological functions of diphtheria toxin receptor/HB-EGF.

17th European Workshop on Bacterial Protein Toxins (Braga, Portugal) 2015.06.23.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(無)

(2)研究協力者

(無)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。