

Title	Cardiac Hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF : Metalloproteinase inhibitors as a new therapy
Author(s)	朝倉, 正紀
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43708">https://hdl.handle.net/11094/43708</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	あさのり 朝倉正紀
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16849 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Cardiac Hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy (心肥大はADAM12によるHB-EGFプロセッシングを遮断することにより抑制される: メタロプロテアーゼ阻害剤の新治療への展開)
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦  (副査) 教授 松澤 佑次 教授 松田 暉

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

心肥大は、容量負荷や圧負荷による代償機転として生じるとされるが、心肥大が持続することにより心不全や突然死が引き起こされると考えられている。心肥大惹起物質である phenylephrine (PE)、angiotensin II (Ang II)、endothelin-1 (ET-1) は、G 蛋白共役型受容体 (GPCR) のリガンドである。PC12をはじめとした種々の細胞において GPCR の刺激下に EGF 受容体のリン酸化を認め、この経路に HB-EGF の遊離 (HB-EGF shedding) が関与していることが報告された。今回私は、心筋細胞における PE、Ang II、ET-1 による心肥大シグナルに、HB-EGF shedding による EGF 受容体リン酸化が重要な役割を演じており、HB-EGF shedding に関与する酵素として ADAM12 (a disintegrin and metalloprotease 12) を同定したので報告する。

#### 【方法および成績】

ラット培養心筋細胞に PE ( $10^{-5}$ M)、Ang II ( $10^{-8}$ M)、ET-1 ( $10^{-7}$ M) 添加 5 分後に EGF 受容体のリン酸化を検討し、3 種類すべてのリガンド添加にて EGF 受容体チロシンリン酸化を認めた。次にこの EGF 受容体リン酸化に HB-EGF が関与するか否かを検討するために、HB-EGF 中和抗体 (#19) を用いて検討した。HB-EGF 中和抗体の前投与にて、PE などの EGF 受容体リン酸化は完全に遮断された。さらに EGF 受容体リン酸化にメタロプロテアーゼが関与するか否かを検討するために、メタロプロテアーゼ阻害薬 (KB-R7785) を用いて検討したところ、HB-EGF 中和抗体と同様に EGF 受容体リン酸化は完全に遮断された。この結果から、EGF 受容体リン酸化にメタロプロテアーゼによる HB-EGF shedding の関与が示唆された。次に HB-EGF を活性化するのに必要なメタロプロテアーゼを同定するために、HB-EGF shedding に関与する PKC- $\delta$  を用いた yeast two hybrid 法を施行した。PKC- $\delta$  に結合するメタロプロテアーゼとして ADAM12 が検出された。ADAM12 が HB-EGF shedding に関与するか否かを検討するために、ADAM12 のメタロプロテアーゼドメインを消去した mutant form を作成した ( $\Delta$ MP-ADAM12)。HB-EGF shedding を検出する HB-EGF alkaline phosphatase assay において、 $\Delta$ MP-ADAM12 を感染させることにより、HB-EGF shedding は有意に抑制された。さらに心筋細胞に  $\Delta$ MP-ADAM12 を感染させると、PE などによる EGF 受容体リン酸化は完全に遮断された。これらの結果から、ADAM12 の活性化による HB-EGF shedding が心筋細胞における心肥大シグナルにおいて重要な役割を演じていることが明らかとなった。

次に、生体において HB-EGF shedding を抑制することにより、実際に心肥大が抑制されるか否かを 2 つの動物モデルにおいてメタロプロテアーゼ阻害薬 (KB-R7785) を用いて検討した。大動脈縮窄による圧負荷心肥大マウスにおいて、KB-R7785 投与により有意に心肥大が抑制された (心体重量比: 縮窄群  $8.62 \pm 0.56$ 、縮窄+KB-R7785 投与群  $6.69 \pm 0.35$ ,  $p < 0.05$ )。マウス心臓における HB-EGF の蛋白質発現レベルは、遊離型 HB-EGF が大半であった圧負荷心臓と比較して、KB-R7785 投与群においては膜結合型 HB-EGF が大半であった。心臓超音波検査により圧負荷マウスにおいて認められた大動脈縮窄 4 週間後における心室後壁の増加および心短縮率の低下は、KB-R7785 投与にて抑制された。また、PE (7 日間) および Ang II (14 日間) 投与による心肥大モデルにおいても同様に、KB-R7785 投与にて心/体重比は有意に減少した。

#### 【総括】

今回の研究より、従来心肥大を引き起こすことが知られている PE、Ang II、ET-1 のすべてのシグナルが、ADAM12 による HB-EGF shedding を介した EGF 受容体リン酸化を経由していることが明らかとなった。さらに、2 つの動物実験モデルからメタロプロテアーゼ阻害薬投与により心肥大抑制作用および心機能改善作用が認められることが明らかとなった。このことは、心肥大における新しいシグナル経路の存在を示唆し、ADAM12 をはじめとした心肥大から心不全に向けての創薬開発への応用が期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

従来から知られていたさまざまな心肥大物質のシグナルすべてが HB-EGF という増殖因子のプロセッシングに集約されることを明らかにし、さらにこのプロセッシングに ADAM12 というメタロプロテアーゼの関与を明らかにした。申請者が発見した心肥大の新しいシグナル経路は、従来の心肥大シグナルの概念と全く異なったきわめて独創性の高い研究であり、さらに本研究は、新しい心疾患治療薬の開発という臨床への展開が期待される医学的のみならず社会的にも貢献する研究であり、学位の授与に値する研究と考えられる。