Heparin-binding EGF-like Growth Factor, HB-EGF

東 山 繁 樹*

I. 発見とその後の経過

ヘパリン結合型 EGF 様増殖因子 (heparin-binding EGF-like growth factor: HB-EGF) は、ヒト末梢血より単離・培養したマクロファージが産生・分泌する血管平滑筋細胞の増殖因子として、われわれが最初に同定した増殖因子である¹⁾。その後の蛋白質および cDNA レベルでの構造解析の結果、HB-EGF は 3 つのジスルフィド結合によって構成される上皮増殖因子 (EGF) 様構造をもつことが明らかとなり、EGF ファミリーのメンバーに加わった^{1,2)}。HB-EGF は他の EGF ファミリーメンバーと同様に細胞膜貫通型の前駆体として合成され、プロセッシングをうけて分泌型 HB-EGF となる。

1992 年、ジフテリア毒素レセプター (DTR) の遺伝子がクローニングされ、予測される蛋白質が HB-EGF 前駆体とまったく同一であったことから、膜貫通型 HB-EGF (proHB-EGF) がジフテリア毒素レセプターとして機能することが示唆され、事実、ジフテリア毒素が proHB-EGF を介して細胞内に進入することが確認されている³⁾。

II. 蛋白質の構造

HB-EGF は 208 個のアミノ酸残基からなる膜貫通型の分子構造をもつ。分子全体を通じては、EGF, TGF- α および Amphiregulin と約 35% 前後の相同性を有している。EGF ドメインは Her4 のリガンドである NDF/heregulin/GGF と相同性をもっとも高く、約 50% におよぶ。ヘパリンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合部位は、前駆体分子の 93-113 残基に位置する KRKKKGKGLGKKR-DPCLRKYK の 21 残基からなる配列である。また、75 番目と 85 番目の Thr 残基は O-グリコシル化の修飾をうけている (Fig. 1)。還元下および非還元下での SDS-PAGE では、分泌型 HB-EGF (D⁶³-P¹⁴⁹) は 21-22 kDa のバンドとして現れる。これは HB-EGF の分子構造にみられるヘパリン結合部位が正電荷のクラスターを形成しているためと考えられる。また HB-EGF は、4-5 kDa の糖鎖をもつものと見積もられている²⁾。

Fig. 1 HB-EGF 前駆体のドメイン構造。*: O-グリコシル化部位, ▲: N-末端切断部位。

* 大阪大学医学部生化学

原稿受取日: 1996 年 2 月 8 日

Shigeki Higashiyama: Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, Osaka, Japan.

Fig. 2 ヒト、マウスおよびラットの各組織における HB-EGF mRNA の発現。

III. 遺伝子

HB-EGF 遺伝子の cDNA はヒト、サル、マウスおよびラットでそれぞれ単離され、塩基配列の決定が行われた。ヒトゲノム遺伝子は、第 5 番染色体にマップされており、全長が 14 kb である。mRNA は 6 つのエクソンからコードされており、その長さは 2.36 kb である。

HB-EGF mRNA の発現の組織分布は、ヒト、マウス、およびラットで調べられている。図 4 にみられるように 3 種に共通しているのは、骨格筋、肺、心臓および脳での発現が高いのに対し、肝臓での発現がきわめて低いことである⁴⁾。ヒトでのこれらの発現パターンは、ジフテリア毒素感受性とも一致していることから、proHB-EGF の発現が予測される。

IV. 蛋白質の生理的機能

HB-EGF は、マウス NIH3T3、ウシ血管平滑筋細胞、ラット肝細胞およびヒトケラチノサイトの細胞増殖を促進する。HB-EGF は EGF や TGF- α と同様に、EGF レセプター (Her1) に結合して増殖シグナルを送るが、誘導される現象には EGF や TGF- α とは異なるものが認められる。特にウシ血管平滑筋細胞に対して HB-EGF は強力な遊走因子であるが、EGF や TNF- α にはその活性はほとんど認められない⁵⁾。そのメカニズムについての詳細は不明である。

EGF レセプターへの結合活性は分泌型 HB-EGF ののみならず、proHB-EGF にも認められており、HB-EGF がジャクスタクリン機構 (細胞—細胞接着による増殖刺激) を介し

て増殖因子として機能することが明らかとなっている。ただ、このジャクスタクリン機構による細胞増殖刺激の機構は、分泌型 HB-EGF によるものほど単純ではなく、CD9 などの分子の介在が必要となる⁶⁾。また、proHB-EGF も分泌

Fig. 3 ヒト動脈中膜平滑筋細胞における HB-EGF 免疫組織活性陽性細胞の年齢および動脈硬化巣の有無における変化。乳幼児の中膜平滑筋細胞では高率に HB-EGF 陽性細胞が認められた。HB-EGF 陽性率と、年齢および動脈硬化巣の有無についての多変量解析により、成人例では加齢により HB-EGF 陽性細胞は有意に増加すること、および動脈硬化巣が存在する場合にはさらにその陽性率が增加することがわかる。▲：乳幼児ないし幼小児，○：動脈硬化巣を有しない成人，●：動脈硬化巣を有する成人。

型 HB-EGF 同様に Q⁶²-D⁶³ の位置で切断されている。われわれは、最近、この N 端切断がエンドプロテアーゼの一つ furin によるものであること、さらに、この切断が proHB-EGF のジャクスタクリン活性の発現にきわめて重要であることを明らかにしている。

膜貫通型 HB-EGF はジフテリア毒素のレセプターとして機能するが、われわれがジフテリア毒素の結合部位を解析した結果、驚くことに EGF ドメインであった。しかも、この結合は非常に特異的であり、他の EGF ファミリーの

メンバーには結合しない。また、ジフテリア毒素の無毒性ミュータントである CRM197 は、分泌型および proHB-EGF の両方に結合し、EGF レセプターへの結合を中和する⁷⁾。その特異性がきわめて高いことから、現在、HB-EGF 特異的阻害剤としての CRM197 の有用性を検討中である。

これまでに膜貫通型増殖因子がまったく別の機能分子として働かうという報告はなく、HB-EGF がその最初の分子である。他の膜貫通型増殖因子が、他の毒素やウイルスのレセプターとして機能しているかどうかは非常に興味

Fig. 4 動脈硬化巣におけるマクロファージ (a)、平滑筋細胞 (b)、および HB-EGF 陽性細胞 (c) の分布。連続切片で観察すると、HB-EGF 陽性細胞 (c) はマクロファージ (a) および平滑筋細胞 (b) でそのほとんどが構成されていることがわかる。I: intima, M: media, a, b, c: $\times 30$.

Fig. 5 動脈硬化巣 (プラーク) 内のマクロファージ (b) および平滑筋細胞 (e) による HB-EGF の産生 (a, c, d, f)。プラークを含む 2 組のミラー切片における、マクロファージ (b) と HB-EGF (c)、および平滑筋細胞 (e) と HB-EGF (f) の染色体により両細胞が HB-EGF を産生していることがわかる。(a, b, c) 中の矢印および (d, e, f) 中の二重矢印は、それぞれが同じ細胞であることを示す。a, d: $\times 120$, b, c, e, f: $\times 350$.

深い。

V. HB-EGF の測定

HB-EGF の定量測定法は現在、まだ確立されていない。定性測定法については、proHB-EGF がジフテリア毒素受容体であることを利用して、ジフテリア毒素の感受性で測定することが可能であり、われわれもこの方法を用いている。

VI. 臨床的意義

HB-EGF と動脈硬化

血管平滑筋細胞の増殖因子である HB-EGF が関与する疾患としてまず考えられるのは、平滑筋細胞の遊走と増殖によってもたらされる動脈硬化である。動脈硬化の発症と進展を通して関与する細胞群には、血管内皮細胞、マクロファージ、血小板、T細胞そして血管平滑筋細胞がある。これまでの解析結果では、これらすべての細胞で HB-EGF の発現が確認されており、また、標的となる細胞は血管平滑筋細胞のみであることから、HB-EGF の動脈硬化への関与は PDGF に匹敵するものであらうと考えられる。また、ヒ

ト動脈壁を抗 HB-EGF 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、中膜平滑筋細胞の HB-EGF 陽性細胞は、乳幼児でもっとも強く発現しており、青壮年に至るにつれ陽性細胞は減少しているが、中高年ではふたたび増加し、動脈硬化巣を有する症例では陽性率がさらに増加する傾向がみられる (Fig. 1)。内膜においては、少なくともマクロファージおよび平滑筋で強陽性を示し (Fig. 2, 3)、肥厚とともにその数は増加し、HB-EGF 陽性細胞は硬化巣においてもっとも多く観察される (Fig. 1)。EGFR は、中膜平滑筋細胞では種々の程度の染色性を示し、動脈硬化巣を有する症例では陽性細胞が増加しているものが多い。さらに、内膜浸潤平滑筋細胞ではほとんどの症例において強い発現を認め、HB-EGF と同様の発現パターンを示している (Fig. 4)。この結果は、動脈硬化でみられる平滑筋細胞の増殖には、平滑筋細胞自身が HB-EGF を産生分泌し、自ら作用するオートクリン機構と平滑筋細胞同士の接着による膜貫通型 HB-EGF-EGF レセプターを介する増殖機構であるジャクスタクリン機構の関与が示唆される。また、乳幼児ないし幼小児期の中膜平滑筋にも HB-EGF の強い発現が認められたことから、同増殖因子が、動脈という器官形成およびその発達に深くかかわっている可能性が示唆される⁸⁾。

文 献

- 1) Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, and Klagsbrun M: A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 251: 936-939, 1991
- 2) Higashiyama S, Lau K, Besner G, Abraham JA, and Klagsbrun M: Structure of heparin-binding EGF-like growth factor: Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J Biol Chem*, 267: 6205-6212, 1992
- 3) Iwamoto R, Higashiyama S, Mitamura T, Taniguchi N, Klagsbrun M, and Mekada E: Membrane protein DRAP 27/CD9 forms a complex with diphtheria toxin receptor and upregulates receptor number and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J*, 13: 2322-2330, 1994
- 4) Abraham JA, Damm D, Bajardi A, Miller J, Klagsbrun M, and Ezekowitz AB: Heparin-binding EGF-like growth factor: Characterization of rat and mouse cDNA clones, protein domain conservation across species, and transcript expression in tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 190: 125-133, 1993
- 5) Higashiyama S, Abraham JA, and Klagsbrun M: Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration; Dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J Cell Biol*, 122: 933-940, 1993
- 6) Higashiyama S, Iwamoto R, Goishi K, Raab G, Taniguchi N, Klagsbrun M, and Mekada E: The membrane protein CD9/DRAP27 potentiates the juxtacrine growth

Fig. 6 動脈硬化巣を有する動脈における EGF レセプター (EGFR) の発現。硬化巣、特に中膜側 (中膜直上部) の内膜浸潤平滑筋細胞では、EGFR が強く染色された (a)。中膜平滑筋細胞では、硬化巣を有しない動脈のそれに比して強く染色される症例が多かった (b)。c: b に対する negative control. (a, b, c): $\times 200$ 。

- factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). *J Cell Biol*, 128 : 929-938, 1995
- 7) Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrum M, and Mekada E : Diphtheria toxin binds to the EGF-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem*, 270 : 1015-1019, 1995
- 8) Miyagawa J, Higashiyama S, Kawata S, Inui Y, Tamura S, Yamamoto K, Nishida M, Nakamura T, Yamashita S, Matuzawa Y, and Taniguchi N : Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 95 : 404-411, 1995