

膜型増殖因子の持つ細胞増殖のアクセル機能とブレ・キ解除機能の分子機構の解明

東山 繁樹

研究のねらい

細胞が外界から様々なリガンド刺激を受け細胞内に情報を伝達する仕組みは、各リガンド特異的受容体の活性化とその下流分子のリン酸化リレーとして明らかにされてきている。その中で、シグナルの多様化を作り出す一つの分子機構に EGF 受容体(EGFR)のトランス活性化がある。この EGFR のトランス活性化には EGFR のリガンドである膜型増殖因子 EGF ファミリー、特に Heparin-binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF)が細胞膜表面上で膜型メタロプロテアーゼ ADAMs により切断される“shedding”反応がキーステップである (Figure 1)。この shedding によって生じる遊離型細胞外ドメインは増殖因子として EGF レセプターを活性化し、続いて細胞内の Ras-Raf-MAP キナーゼカスケードを活性化して増殖シグナルを惹起する。一方、shedding 後に細胞膜に残る C 末端断片ペプチド(CTF)の役割についてその機能は全く不明であった。我々は HB-EGF-C 末端断片ペプチド(HB-EGF-CTF)が速やかに核内に移行し、転写抑制因子 Promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF)と結合しこれを核外に汲み出す反応を誘導することを見出した。これにより、HB-EGF-CTF が遺伝子転写抑制解除機能を持つことを明らかにし、新たなシグナル分子として機能すると共に、新たな細胞増殖シグナル経路が存在することを示した (*J. Cell Biol.* 163, 489-502, 2003)。

これまでの我々の実験結果は、細胞増殖は増殖因子-受容体シグナルによる増殖アクセル機能と並行して、増殖ブレ・キ解除の機構が作動することを示しており、これによりスムーズな細胞周期の進行がもたらされると考えられる。しかし、このブレ・キ解除の分子機構は全くと言っていい程不明のままである。本研究では膜型増殖因子が持つ増殖アクセル機能と増殖ブレ・キ解除の巧妙な分子機構を明らかにし、細胞増殖分子機構の新たな概念を創出することを研究のねらいとした。

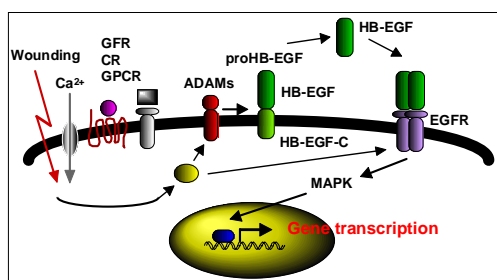


Figure 1 : EGFR transactivation and HB-EGF shedding. Various stimuli (Wounding, Ca²⁺ influx, growth factor receptor (GFR), cytokine receptor (CR), G-protein coupled receptor (GPCR)) activate metalloprotease ADAMs, following proHB-EGF shedding and EGFR activation. HB-EGF acts on EGFR in autocrine and paracrine manners (Fig. shows an autocrine manner).

研究成果

1) HB-EGF shedding (HB-EGF-CTF 産生) の分子機構

これまでに膜結合型 HB-EGF (proHB-EGF) の shedding の分子機構解明に向けてまず shedding 酵素の同定を行ってきた。さきがけ研究を始めるまでに、proHB-EGF の shedding 酵素として膜型メタロプロテアーゼ ADAM12 を同定していたが (Nature Med. 8: 35-40, 2002)、さらに、他の ADAM ファミリーメンバーの shedding 酵素活性を検討した。ADAM9、10、12、15、17、19 の各遺伝子欠損細胞株を用いて proHB-EGF の shedding を解析した。その結果、proHB-EGF の basal shedding には ADAM10、誘導型 shedding には ADAM17 がさらに関与することを示す実験結果を得た (文献1)。またこれらの ADAM の活性制御機構を明らかにする目的で ADAM の細胞内ドメインに結合する蛋白質の同定を試みた。ADAM12 細胞内ドメインをベイトにし、ヒト心臓の cDNA ライブラリーより酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングした結果、16種類の遺伝子を同定した。ADAM12 細胞内ドメインは4つのプロリンリッチドメインを持つことから、その結合相手と考えられる SH3 ドメインをコードする1つの遺伝子に着目しその cDNA 全長を PCR によりクローニングした。得られた遺伝子は EST データベースでは SH3d19 として登録されている新規の遺伝子であり、ADAM に結合することから Eve-1 と名付けた。

Eve-1 は 767 個のアミノ酸からなる蛋白質で C-末端領域に SH3 ドメインをタンデムに 4 個持つ Eve-1a と、さらにこの分子の中程に 23 アミノ酸の挿入を持つことにより新たな SH3 ドメインを形成し、合計 5 個の SH3 ドメインをもつスプライシングバリエーションの Eve-1b からなる。また、翻訳開始が 371 番目の Met から始まるバリエーションが Eve-1a と Eve-1b に存在し、それぞれ Eve-1c と Eve-1d と名付けた。Eve-1 蛋白質は SH3 ドメインを介して ADAM12 のプロリンリッチドメインと相互作用する。また Eve-1a と Eve-1b は N-末端領域にプロリンリッチドメインを 7 個持ち、この領域は ADAM12 との相互作用するための制御ドメインとして機能することが予測される (Figure 2)。Eve-1 の機能を明らかにするために、ADAM12 による HB-EGF のプロセッシングに及ぼす効果を、Eve-1 の特異的 siRNA によるノックダウンにより検討した。siRNA は HT1080/HB-EGF-AP 細胞に効率良く導入され、導入後 48 時間での Eve-1 の遺伝子発現を PCR により検出した結果、顕著に抑制しているのを確認した。この細胞を用いて、フォルボールエステル (TPA) および angiotensin II によって引き起こされる HB-EGF-AP のプロセッシングを処理後 30 分後の培養上清中の AP 活性の検出により検討した。その結果、Eve-1 のノックダウンにより TPA による HB-EGF-AP の shedding は約 70% 抑制された。一方、Eve-1 のノックダウンにより angiotensin II による HB-EGF-AP のプロセシ

ングは各々約 55%抑制された (Figure 3)。以上の結果から、Eve-1 は TPA ならびに angiotensin II 刺激による HB-EGF shedding のシグナル経路に位置し、ADAM12 の活性化を正に制御する因子であると推測された(文献 2)。

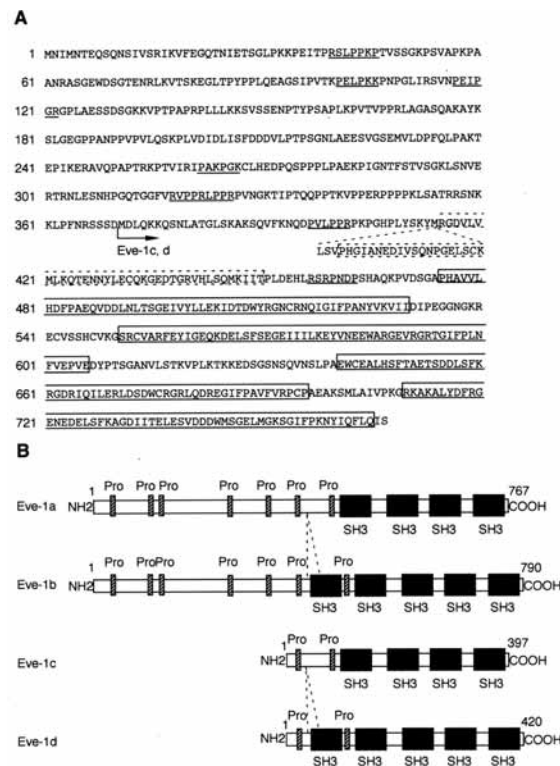


Figure 2
Deduced amino acid sequence and domain organization of Eve-1. (A), amino acid sequence of Eve-1. A total of 767 amino acids were deduced from the open reading frame of Eve-1a, and a 23-amino acid insert is present in Eve-1b. Predicted SH3 domains are *boxed*, and seven proline-rich motifs that bind SH3 domains are *underlined*. (B), schematic representation of Eve-1 isoforms.

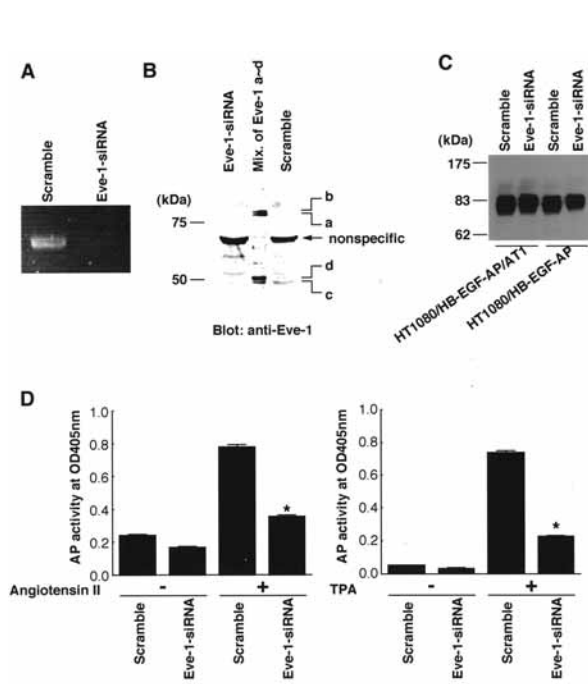


Figure 3. Knockdown of Eve-1 by siRNA. (A), RT-PCR analysis. cDNAs prepared from HT1080 cells (Scramble-siRNA- or Eve-1-siRNA-transfected cells) were amplified by PCR using primer pair specific for Eve-1. (A), immunoblot analysis. Lysates from HT1080 cells (Scramble-siRNA- or Eve-1-siRNA-transfected cells) were immunoblotted using anti-Eve-1 antibody. The mixture of recombinant Eve-1a, Eve-1b, Eve-1c, and Eve-1d expressed in HT1080 cells was used as a positive control. (C), expression of proHB-EGF-AP on the surface of transfected HT1080/HB-EGF-AP/AT1 or HT1080/HB-EGF-AP cells. Cell surface biotinylation and immunoprecipitation by anti-HB-EGF antibody (H1) were carried out.

(D), effect of Eve-1 on the shedding of proHB-EGF. Activity of AP in conditioned media of HT1080/HB-EGF-AP/AT1 or HT1080/HB-EGF-AP cells transfected with siRNA was measured

after incubation with 100 nM angiotensin II or 100 nM TPA for 30 min at 37 ° C, respectively. Values represent means \pm S.D. ($n = 4$). *, $p < 0.001$ for the difference between Scramble *versus* Eve-1-siRNA with angiotensin II or TPA.

2) HB-EGF-CTF による細胞周期および周期関連因子の制御

(1) HB-EGF-CTF と PLZF の細胞周期進行に伴う細胞内局在変化: proHB-EGF の shedding によって産生される HB-EGF-CTF は核に移行し、転写抑制因子 PLZF と相互作用しながらその細胞内局在を核内から核外へと大きく変化させることをこれまでに報告してきた。また、培養細胞系においては細胞周期進行に伴い内在性 proHB-EGF が shedding されることが考えられていたが、その詳細は明らかではなかった。そこで、proHB-EGF shedding のモニタリング用細胞として作製した proHB-EGF-Alkaline phosphatase 発現ヒト繊維芽肉腫細胞株 HT1080 /HB-AP 細胞と HB-EGF と PLZF を内在性にもつ初代培養ヒト表皮角化細胞を用いて、細胞周期一回転における proHB-EGF shedding の反応、HB-EGF-CTF 産生とその細胞内局在変化、ならびに PLZF の細胞内局在変化を、蛍光免疫染色とレーザースキャンサイトメーターにより細胞周期画分解析と細胞内局在を同時に解析することで検討した。その結果、細胞表面 proHB-EGF の shedding は細胞周期 G1 後期で shedding が誘導されることが示された (Figure 4)。更に G1 後期により産生される HB-EGF-CTF は S 期と G2 期には核内に集積が認められ、M 期前期では中心体付近に局在する様になる。一方、PLZF は G1 期では核に局在し、S 期には細胞質への移行が観察され、G2 期では完全に細胞質へとその局在を変化させた (Figure 5)。これらの観察結果から、HB-EGF-CTF と PLZF の細胞周期進行に伴う局在変化は、予測通りの排他的局在の変化を示した。以上のことから、細胞周期一回転において proHB-EGF の shedding は周期進行と連動して起こり、PLZF の機能解除を誘導する HB-EGF-CTF シグナルを稼働することを示すことができた (文献 3)。

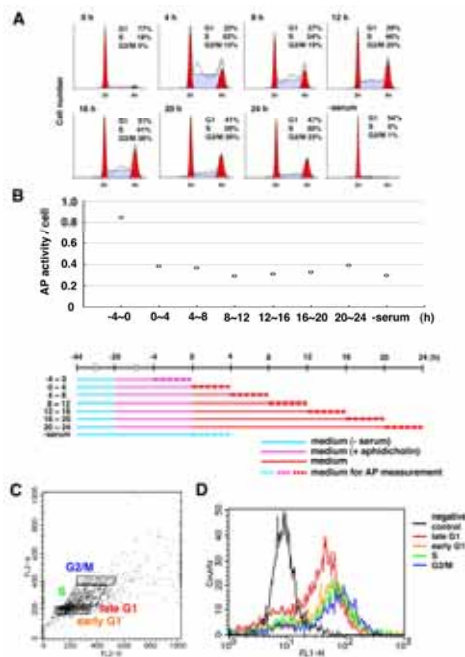


Figure 4. proHB-EGF is shed during the G1 phase. **(A)** and **(B)** HT1080/HB-EGF-AP cells were synchronized in G1/S phase with aphidicolin and released by changing medium to normal culture medium (the time point of release was designated as 0 h). **(A)**, cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by FACS to determine their DNA content and cell cycle phase. **(B)**, to minimize the influence of serum stimulation, time course of the medium change was designated as described under the part. The AP activity was obtained as explained above. The HB-EGF-AP was significantly higher in the conditioned media at -4 to 0 h, when cells were in G1/S phase of cell cycle. **(C and D)**, assessment of the cell surface proHB-EGF quantity during cell cycle phase by FACS. Cell surface proHB-EGF was stained with an antibody against the N-terminus of proHB-EGF (#H6) followed by labeling with FITC. DNA content of cells was determined with PI staining. **(C)**, cells were gated into four cell cycle phases (early G1, late G1, S, and G2/M phase) according to their DNA content. **(D)**, the logarithmic histograms of FITC intensity of respective cells are shown individually. As negative control, only the secondary antibody was added to the fixed cells. Cell surface proHB-EGF was the lowest in the late G1 phase when compared to cells in other cell cycle phases.

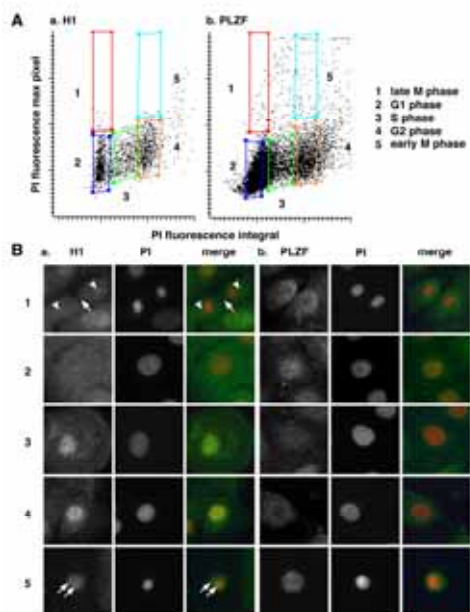


Figure 5. Timing of endogenous proHB-EGF cleavage and endogenous PLZF translocation to cytoplasm in human keratinocytes. Keratinocytes were stained and analyzed by the LSC system. **(A)**, keratinocytes stained with #H1 (a) or anti-PLZF antibody (b) and with PI were scanned and categorized into five different cell cycle phases. Approximately 3,000 cells in (a) and 16,000 cells in (b) were scanned, respectively. **(B)**, representative images of the respective groups. HB-EGF showed the distinct localization during each phase of the cell cycle: pericentriolar (a1, arrow heads) and interzonal (a1, arrow) in late M phase, plasma membranous and cytoplasmic in G1 phase (a2), nucleus in S and G2 phases (a3 and a4), and pericentriolar in early M phase (a5, arrows). PLZF localized to the nucleus in the G1 phase (b2) and began to translocate into the cytoplasm in the S phase (b3), with completion of cytoplasmic translocation in the G2 phase to late M phase (b1, 4, and 5). PLZF nuclear translocation was assessed in each group of cells and was present in 76 of 100 cells in G1 phase, 73 of 100 cells in S phase, and 10 of 100 cells

in G2 phase. Nuclear localization of PLZF was greater during early S phase, and cytoplasmic localization of PLZF was greater during the late S phase.

(2) **PLZF による cyclin A の発現抑制の解除:** PLZF が細胞周期制御因子の一つ cyclin A の遺伝子発現抑制をしていることが報告されているが、この抑制解除の分子機構は明らかにはされていない。私どもは、HB-EGF-CTF が PLZF に結合し、その細胞内局在を核内から核外へと変化させる事を明らかにし、PLZF による cyclin A 遺伝子の発現抑制が HB-EGF-CTF によって解除されることを明らかにした。(*J. Cell Biol.* 163, 489-502, 2003)

(3) **PLZF による c-myc の発現抑制の解除:** 細胞増殖因子シグナルの下流に位置し、細胞分裂促進に必須の転写因子 c-myc の遺伝子発現が PLZF により抑制されることが報告されている。HB-EGF-CTF が PLZF の機能を解除することから、HB-EGF-CTF シグナルが増殖因子による *c-Myc* 遺伝子発現誘導シグナルの中間に位置するのではないかと考え、*Hb-egf* -/- 繊維芽細胞を用いて bFGF, EGF, PDGF による *c-Myc* 遺伝子発現誘導を解析した。まず、野生型繊維芽細胞 (*Hb-egf* +/+) で bFGF, EGF, PDGF 刺激により内在性の proHB-EGF の shedding が誘導され、HB-EGF-CTF は核移行することを確認した。また、上記各増殖因子受容体からのシグナルは MAP kinase ERK1/2 の活性化で見る限り、*Hb-egf* +/+ および *Hb-egf* -/- 繊維芽細胞で変化はなかった。次に、*Hb-egf* +/+ および *Hb-egf* -/- 繊維芽細胞を上記各増殖因子により刺激し、*c-Myc* 遺伝子発現を RNA protection assay と定量 PCR により解析した。その結果、細胞増殖因子シグナルにより誘導される *c-Myc* 遺伝子発現は *Hb-egf* -/- 繊維芽細胞では顕著に抑制されることが明らかとなった (Figure 6)。また、*Hb-egf* -/- 繊維芽細胞では、*Hb-egf* +/+ 繊維芽細胞に比べて、EGF と bFGF 増殖因子による細胞周期 S 期への進行が有意に抑制されることが明らかとなった (Figure 7)。一方 PDGF による繊維芽細胞の増殖促進には有意さを持った細胞周期 S 期進行の遅延は認められなかった。さらに、*Hb-egf* -/- 繊維芽細胞に *Hb-egf* 遺伝子を導入し発現を回復させることで上記各増殖因子による *c-Myc* 遺伝子発現ならびに細胞周期 S 期進行への遅延が回復することを示した (Figure 7)。これらの結果から HB-EGF-CTF シグナルが少なくとも EGF ならびに bFGF による *c-Myc* 遺伝子発現誘導において PLZF 等の転写抑制因子の解除に重要な機能をはたしていることを明らかにした (Figure 8)(submitted)。

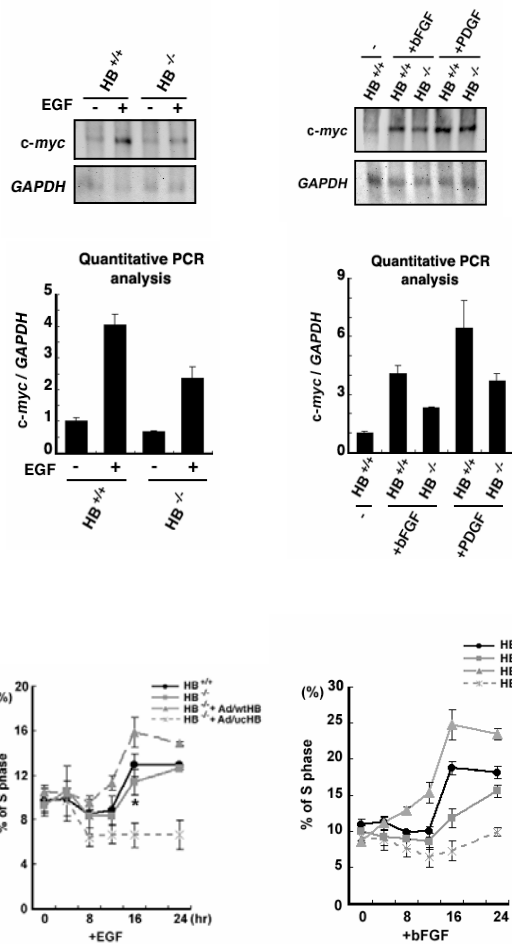


Figure 6. *c-myc* gene expression analyses.

Upper left: RNA protection assay analysis of *c-myc* mRNA expression in HB^{+/+} and HB^{-/-} cells by RPA. Serum-starved MEFs were stimulated with 10 ng/ml EGF for 1 hr. The expression of *GAPDH* mRNA was examined as a control. **Lower left:** Quantitative PCR analysis of *c-myc* mRNA expression induced by EGF in HB^{+/+} and HB^{-/-} cells. **Upper right:** RNA protection assay analysis of *c-myc* transcription induced by bFGF and PDGF in HB^{+/+} and HB^{-/-} cells. Serum-starved MEFs were stimulated with 1 ng/ml bFGF or 10 ng/ml PDGF for 1 hr. The expression of *GAPDH* mRNA was examined as a control. **Upper left:** Quantitative PCR analysis of *c-myc* mRNA expression induced by bFGF and PDGF in HB^{+/+} and HB^{-/-} cells.

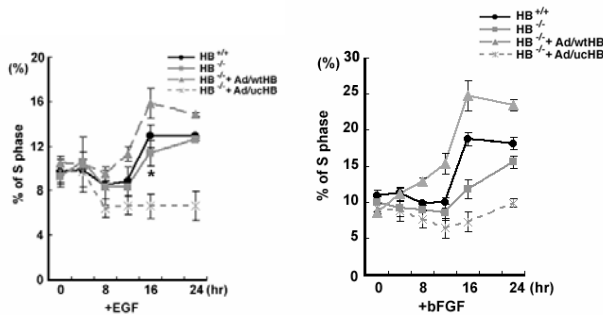


Figure 7. EGFR and FGFR signaling-induced cell cycle progression by expression of proHB-EGF and an uncleavable mutant in HB^{-/-} cells. Flow cytometry analysis of cell cycle progression was carried out at appropriate time after EGF or bFGF stimulation. All experiments were performed independently in triplicate.

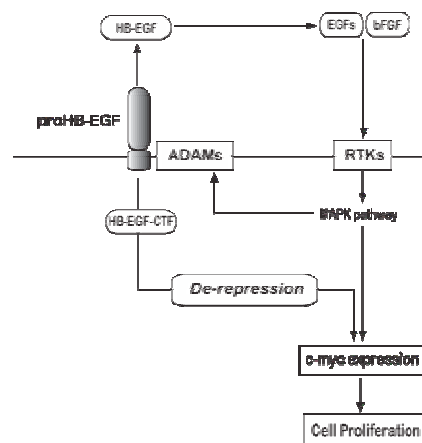


Figure 8. A schematic diagram for the proposed role of HB-EGF-CTF signaling in c-Myc transcription induced by growth factor receptor activation.

3) HB-EGF-CTF シグナルの破綻と病態

(1) 遺伝子改変マウスの作製から: これまでにHB-EGFのマウス個体での役割を明らかにするために遺伝子ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、ノックアウトマウスでは発生過程における心臓弁形成に致死的不正常をきたすことを報告してきた (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3221-3226, 2003)。さらに、*Hb-egf*^{lox/lox} マウスとTie-2 Creマウスとの交配で作製した血管内皮特異的に*Hb-egf*遺伝子を欠損させたマウス、ならびに、SM-22 Creマウスとの交配で作製した平滑筋細胞特異的に*Hb-egf*遺伝子を欠損させたマウスを作製し、表現型を解析した。その結果、両マウス共に発生過程における心臓弁形成に致死的不正常をきたし、肥大型心筋症を誘発した (Figure 9) (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 315-321, 2006)。一方、HB-EGF-CTF領域を欠失させた遊離型のミュータントHB-EGFの遺伝子をノックインしたsoluble HB-EGFノックインマウスはホモ接合体で重篤な肥大型心筋症を引き起こし死に至る。また、shedding抵抗性のミュータントproHB-EGFの遺伝子をノックインしたucproHB-EGFノックインマウスでは遊離型HB-EGFの産生が抑制されていると同時にHB-EGF-CTF産生も抑制されている。このマウスでは生後8ヶ月までに拡張型心筋症を引き起こし死に至ることを報告してきた (*J. Cell Biol.* 163, 469-475, 2003)。

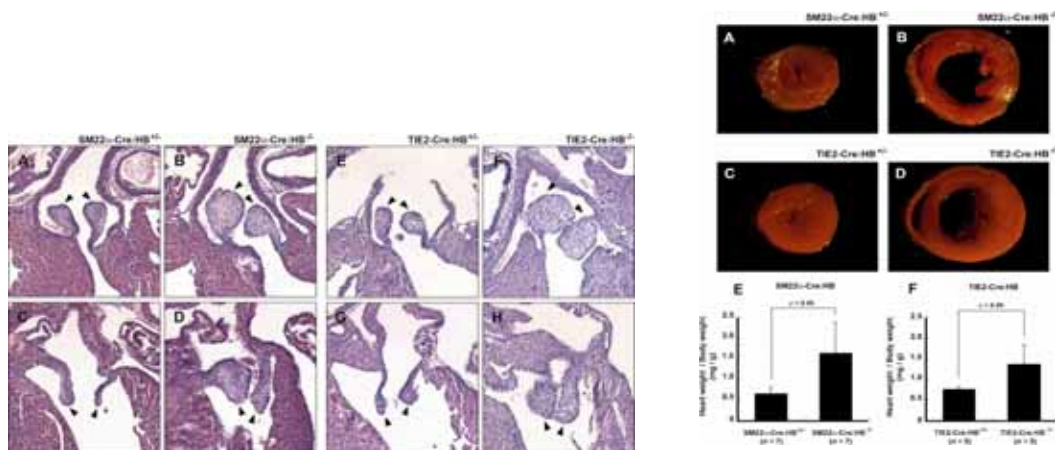


Figure 9. Left panel: Hematoxylin and eosin staining of the longitudinal sections of the newborn (P1) heart valves. Histological sections show semilunar (A, B, E and F) and atrioventricular (C, D, G and H) valves. In SM22α-Cre:HB-/- (B and D) and TIE2-Cre:HB-/- (F and H) mice, the valves were enlarged when compared with SM22α-Cre:HB+/+ (A and C) and TIE2-Cre:HB+/+ (E and G) mice. The valves are indicated with arrowheads. **Right panel:** Cardiac hypertrophy of the conditional knockout mice. Transverse sections of the hearts (A D) and heart weight-to-body wet weight ratios (E and F) of 12-week-old mice. Values represent means ± SD. Massive enlargement of the heart was observed in SM22α-Cre:HB-/- and TIE2-Cre:HB-/- mice when compared with the control mice.

また、これまでにproHB-EGFのsheddingが皮膚創傷治癒に重要であること報告しており (*J. Cell Biol.* 151, 209-219, 2000)、これをさらに検討するために、*Hb-egf*^{lox/lox} マウスとKeratin 5-Cre マウスとの交配により表皮細胞特異的に*Hb-egf*遺伝子を欠損させたマウスを作製し、創傷治癒過程におけるHB-EGFの役割を解析した。Figure 10と11に示す様に、*Hb-egf*遺伝子欠損マウスでは背中中の傷の治癒速度が創傷後7日目まで有意差を持って遅延することが示された (文献4)。

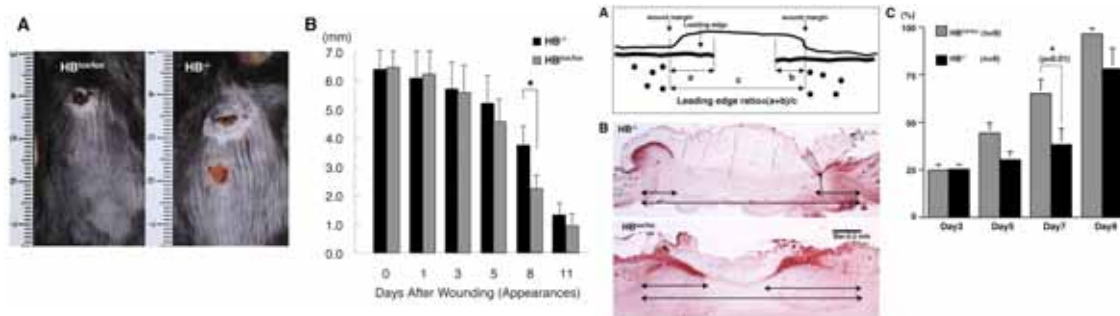


Figure 10

Figure 11

Figure 10. Impaired wound healing in HB-/- mice. Two 6-mm punch biopsies were made in the skin of the backs of HBlox/lox and HB-/- mice, and wound diameter was monitored. (A), macroscopic view of wound healing assay in HBlox/lox and HB-/- mice at day 8. (B), measurements of wound diameter during healing. **P*<0.05.

Figure 11. Impaired keratinocyte migration in HB-/- mice. (A), serial sections were prepared, and the epidermis was stained with anti-keratin antibody. Computer-assisted morphometric analysis was performed and the ratio of the leading edge to initial wound length was calculated. (B), immunohistochemical staining of wound healing assay at day 7. Scale bar: 500 μm. (C), measurements of leading edge ratio in HBlox/lox and HB-/- mice. The leading edge ratio was significantly decreased in HB-/- mice (*n*=9) at day 7. **P*<0.01.

以上の結果から、proHB-EGF ならびに shedding は発生過程での心臓弁形成とその後の心筋細胞機能維持に必須であること、また表皮層創傷治癒過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、HB-EGF-CTF シグナル本体が心臓弁形成や表皮層創傷治癒過程でどのように機能しているかはこのタイプの解析方法からでは限界があり、新たな技術開発が必要である (今後の課題参照)。

(2) **がん細胞の特性解析から**: これまでに、多くのがん細胞でシグナル伝達経路の異常が報告されていることから、HB-EGF-CTF / PLZF シグナルの異常もまた、がん細胞としての特性に大きく関与する可能性が考えられる。そこで、まず各種がん細胞における *Hb-egf* と *Plzf* 遺伝子の発現を調べたところヒト正常メラノサイトでは両遺伝子の発現が

認められるが、ヒトメラノーマ細胞株13種においては *Hb-egf* 遺伝子の発現は認められるものの、*Plzf* 遺伝子は全細胞株で欠失していることが明らかとなった。そこで、代表的な細胞株 A 375 と 397 細胞に *Plzf* 遺伝子を発現させると、*in vivo* ならびに *in vitro* の両方で、細胞増殖が顕著に抑制されることが明らかとなった（文献5）。本結果は HB-EGF-CTF のシグナル破綻とがん細胞増殖を直接結びつけるものではないが、転写抑制因子の機能が直接がん細胞の特性に影響を及ぼすことを示す事象であり、HB-EGF-CTF / PLZF シグナルの異常とがん細胞特性との関わりを今後更に解析して行く必要があることを強く示唆してくれる。

今後の展開

本研究では膜型増殖因子 proHB-EGF を中心に shedding とそれによって惹起される HB-EGF CTF シグナルの解析を進めてきた。CTF シグナルは shedding によって誘導されるシグナルであり、shedding は様々な細胞外刺激によって引き起こされる反応であることから、proHB-EGF の shedding のみを誘導したり、HB-EGF-CTF シグナルのみを起動させることは、生理的条件下ではほとんど不可能である。しかし、CTF シグナルの解析を進めるためには、CTF シグナルのみを起動させることが必須であり、新たな技術開発が必要である。proHB-EGF ならびに他の EGF ファミリーメンバーの proTGF- α , proamphiregulin, proepiregulin の shedding 部位が既に明らかにされていることから、今後、個々の shedding 部位を特異的に認識し、shedding 反応を触媒できるキャタリティックモノクローナル抗体等を開発し、これを用いて各 CTF シグナルと疾患との関連、標的 Repressors の機能解析と CTF シグナルとの関わりにつて解析を進めたい。

また、本研究の中で HB-EGF-CTF がやはり細胞膜から核膜に移行することを示唆する実験結果が得られてきたが、その分子機構は不明のままである。今後、CTF の核移行の経路と修飾反応の解明、ならびに機能発現時の CTF の(修飾も含めた)構造決定、電子顕微鏡での観察等による機能発現時の CTF の局在場所の特定を中心に、この分子機構の詳細な解析を進めたい。

HB-EGF-CTF を中心にその標的分子の同定ならびに推定を進めてきた。今後、同定ならびに推定された標的分子の機能解析をまず進め、レトログレードに HB-EGF-CTF ならびに他の EGF ファミリーCTF との相互作用と制御機構につて解析を進めたい。

上記の課題を推進し「膜型増殖因子の持つ細胞増殖のアクセル機能とブレーキ解除機能の分子機構」の全貌解明に迫りたい。

研究成果リスト

(1) 原著論文

1. Sahin, U., Weskamp, G., Zhou, H., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Safting, P. and Blobel, C.P.: Distinct roles for ADAM10 and 17 in ectodomain shedding of six EGFR-ligands. *J. Cell Biol.* 164: 769-779, 2004.
2. Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N. and Higashiyama, S.: ADAM-binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of EGF receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 279: 41950-41959, 2004.
3. Toki, F., Nanba, D., Matsuura, N. and Higashiyama, S.: Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in a cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 202: 839-848, 2005.
4. Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Mekada, E., Higashiyama, S., and Hashimoto, K.: Heparin-binding EGF-like growth factor is essential for keratinocyte migration in skin wound healing. *J. Cell Science.* 118: 2363-2370, 2005.
5. Shiraishi, K., Yamasaki, K., Nanba, D., Inoue, H., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Higashiyama, S.: Pbx1 is a major target of PLZF-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene.* 26: 339-348, 2007.

原著論文総数: 23 篇

(2) その他の成果

著作物

英文

1. Higashiyama, S. Metalloproteinase-mediated shedding of Heparin-binding EGF-like growth factor and its pathophysiological roles. *Protein and Peptide Letters.* (2004)
2. Nanba, D. and Higashiyama, S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 15, 13-19. (2004)
3. Higashiyama, S. and Nanba, D. ADAM mediated ectodomain shedding of the EGFR ligands in receptor cross talk. *Biochimica. Biophysica. Acta.* 751, 110-117. (2005)

和文

1. 難波大輔、東山繁樹: 膜結合型細胞増殖因子 proHB-EGF. 細胞工学 Vol 24, p210-215, 2004 秀潤社、東京
2. 東山繁樹: 細胞増殖因子 HB-EGF. 腎臓ナビゲーター p94-95, 2004 メディカルレビュー社、東京
3. 東山繁樹: 細胞増殖因子 HB-EGF 心臓ナビゲーター p62-63, 2004 メディカルレビュー社、東京
4. 東山繁: EGF, TGF- α , HB-EGF, アンフィレグリン、SDGF, ベーターセルリン、エピレグリン、エピジェン、ニューレグリン1、2、3、4、5、6 サイトカイン・増殖因子 用語ライブラリー、p181-195. 2005 羊土社、東京
5. 東山繁樹、難波大輔、田中基成: アンジオテンシン受容体と増殖因子のクロストークの新知見: 血管医学 Vol5, p345-350, 2004 メディカルレビュー社、東京
6. 東山繁樹、木曾真一: HB-EGF と肝再生 細胞増殖因子と再生医療 p50-57, 2006 メディカルレビュー社、東京

学会発表

1. 東山繁樹、難波大輔、田中基成、森本千恵: Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF – New insight in signal transduction. (招待講演) 第 76 回 日本生化学会大会 (2003/10/15)

2. 東山繁樹: Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF new insight in signal transduction (招待講演) International Symposium on Proteolysis International Symposium on Proteolysis (2003/11/12)
3. 東山繁樹: 細胞増殖の新たな制御機構 (招待講演) 第 41 回 日本外科代謝栄養学会学術集会 (2004/7/8)
4. 東山繁樹: 膜結合型増殖因子 HB-EGF のプロセッシングと病態 (招待講演) 第 8 回日本心不全学会学術集会 (2004/10/1)
5. 東山繁樹: Ectodomain shedding of HB-EGF and novel cell signaling. (招待講演) International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (2005/1/20)
6. 東山繁樹: Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF by ADAM and HB-EGF-C terminal fragment signaling. (招待講演) The Kennedy institute of Rheumatology Symposium Metalloproteinases: Biology and Pathology (2005/11/21)
7. 東山繁樹: 膜型増殖因子 HB-EGF の shedding による細胞増殖制御 (招待講演) 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005/12/9)
8. 東山繁樹: プロテアーゼ ADAM による膜型細胞増殖因子シグナルの活性化 (招待講演) 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006/9/28)