

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09463

研究課題名(和文) 3インテグリン機能発現におけるキンドリンの役割解明と新たな因子の探索・同定

研究課題名(英文) Elucidation of the role of kindlin in the functional expression of beta3 integrins and investigation of the kindlin-related new molecules

研究代表者

本田 繁則 (Honda, Shigenori)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：00303959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 3インテグリンは IIb 3および V 3から構成されるインテグリンファミリーの一員である。IIb 3は血小板上の主要なインテグリンであり、血小板凝集に必須である。V 3は血管構成細胞および腫瘍細胞などに発現し、血管病や腫瘍の増殖転移に関わっている。キンドリンはILKなどの細胞内タンパク質と相互作用するインテグリン活性化因子として機能している。我々はILKがインテグリンの活性化に関わることを報告してきた。本課題において IIb 3活性化におけるキンドリン-3のドメイン機能を研究した。キンドリン-3の何れのサブドメインも IIb 3の活性化に重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： 3 integrins are heterodimeric adhesion receptors and members of the integrin superfamily consisted of IIb 3 and V 3. IIb 3, a major integrin expressed on platelets, is critical for platelet aggregation mediated by bindings of fibrinogen and von Willebrand factor. V 3 (also called vitronectin receptor), an integrin widely expressed on several cell types including blood vessel tissue constitutive cells and tumor cells, is involved in diverse vascular disease states, tumor proliferation and metastasis. Kindlins function as an integrin activator that interacts with intracellular proteins such as integrin-linked kinase (ILK). We have reported that ILK is associated with integrin activation. In this study, we investigated the role of each domain of Kindlin-3 in IIb 3 activation, and it was suggested that each subdomain could have an important role in IIb 3 activation.

研究分野：血栓止血学

キーワード：インテグリン

1. 研究開始当初の背景

インテグリンはダイナミックに構造変化する多機能な接着受容体で、 α と β 鎖の二量体構造を成す1回膜貫通型糖タンパク質である。インテグリンは様々な細胞に発現しており、細胞と細胞外接着分子あるいは細胞と他の細胞表面分子との結合に関わっている。インテグリン機能の特徴は静止状態と活性化状態が存在すること、二方向性のシグナル伝達経路を有することがあげられる (Cell 110: 673-687, 2002)。アゴニストによる刺激が細胞に加わると、インテグリンに向かう細胞内シグナル伝達が誘導されインテグリンが活性化される。活性化したインテグリンは細胞外接着分子や細胞表面分子との結合が可能となり情報を伝達(inside-outシグナル)する。一方、リガンドを結合したインテグリンはクラスター集積し、細胞内タンパク質との新たな連繋が始まり、細胞内に情報が伝達される(outside-inシグナル)。このように、インテグリンは双方向のシグナル伝達を可能にし、止血反応、免疫応答反応あるいは細胞の接着・伸展・遊走反応などに重要な役割を果たしている。

$\beta 3$ インテグリンは $\alpha IIb\beta 3$ および $\alpha V\beta 3$ から構成されるインテグリンファミリーである。 $\alpha IIb\beta 3$ は血小板・巨核球系細胞に特異的に発現しており、フィブリノーゲンやフォンビルブランド因子の受容体として機能している。 $\alpha IIb\beta 3$ が先天的に欠損する血小板無力症症例では血小板凝集が欠如し、出血傾向を示す。一方、 $\alpha V\beta 3$ (ビトロネクチンレセプター)は血小板にわずかに発現するのみで、血小板での役割は明らかではない。しかし、血管構成細胞、炎症細胞および腫瘍細胞などでは発現しており、血管新生、創傷治癒および腫瘍の浸潤・転移に重要な役割を果たしている。

キンドリンは細胞接着斑を構成するインテグリン結合性細胞内タンパク質の1つで

線虫においてその相同体が最初に報告された(J Cell Biol 150: 253-264, 2000)。3種類のファミリータンパク質(キンドリン-1、-2、-3)が存在する。キンドリン-1は皮膚の表皮に強く発現し、この遺伝子異常は常染色体劣性遺伝性の皮膚疾患を発症する。キンドリン-2はほぼ全ての臓器に発現する。キンドリン-3は主に造血組織に発現しており、遺伝子異常が先天性白血球粘着不全症の病因となる。

2. 研究の目的

$\beta 3$ インテグリンは血液細胞(血小板など)、血管構成細胞、腫瘍細胞などに発現する接着受容体であり、血栓症や血管病の発症・進展および腫瘍の浸潤・転移において重要な役割を果たしている。しかしながら、インテグリン機能発現における分子機構の詳細は明らかではない。申請者らは発現クローニング法によりintegrin-linked kinase (ILK)がインテグリン活性化に関わる因子の1つとして同定し報告した。本研究では、ILK結合タンパク質の1つである細胞内タンパク質キンドリンに着目し、インテグリン機能発現に関わるメカニズムを明らかにする。また、キンドリンが関連する細胞内タンパク質や新たなインテグリン機能発現因子の探索実験など基礎的研究を通じて、創薬シーズとしての展開を目指している。

3. 研究の方法

キンドリン-3欠損細胞株の作製:次世代型の遺伝子改変法であるクリスパー・キャス9(CRISPR/Cas9)ゲノム編集法を採用したオールインワンベクターキット(市販品)を用いた。ヒトキンドリン-3遺伝子のエクソン2および3を標的にしたガイドを組み込んだベクターを作製し、ヒト赤芽球白血病細胞(HEL, human erythrocyte leukemia)にエレクトロポレーションした。各ベクターの遺伝子切断効率はミスマッチ認識酵素を用いた遺伝子切断検出キット(市販品)で行った。ベクタ

一導入細胞はレポータータンパク質により選別濃縮し、限界機積法を用いてクローン化した。クローン化した細胞のゲノム切断はゲノム polymerase chain reaction (PCR) を用いたダイレクトシーケンス法で確認した。ドメイン欠損コンストラクトの作製は PCR に基づいた overlap extension method を用いて行った。細胞内タンパク質はイムノブロット法で検出した。インテグリン機能の評価は活性化型インテグリンに特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーで行った。

4. 研究成果

HEL 細胞においてインテグリン活性化に必須の細胞内タンパク質タリンおよびキンドリン-3 が発現しており、細胞表面上のインテグリン α IIb β 3 が PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 刺激により活性化されることを確認した。クリスパー・キャス9 オールインワンベクター導入 HEL 細胞のスクリーニングによりキンドリン-3 を欠損した細胞2クローンを獲得した。キンドリン-3 欠損細胞の α IIb β 3 は PMA 刺激に対して不応性であった。各欠損クローン細胞にキンドリン-3 を一過性に導入してレスキュー実験を行ったところ、何れも PMA 刺激反応性に α IIb β 3 の活性化が観察できた。つぎに、キンドリン-3 のドメイン「F0、F1、F2 の前半部、F3、PH (pleckstrin homology) ドメイン」を欠損させたミュータントを作製し、個々のミュータントを欠損細胞に一過性に導入して α IIb β 3 活性化への影響を観察した。F3 および PH 欠損ミュータント以外のミュータントにおいて、タンパク質発現の低下がみられたが、何れのミュータントも野生型に比して活性化誘導能に障害を認めた。

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 3 件)

1) Morikawa Y, Kato H, Kashiwagi H, Nishiura N, Akuta K, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Protease-activated receptor-4 (PAR4) variant influences on platelet reactivity induced by PAR4-activating peptide through altered Ca²⁺ mobilization and ERK phosphorylation in healthy Japanese subjects. *Thromb Res.* 162, 44-52, 2018. (査読有り)

2) Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D, Banno F, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays α IIb β 3 activation. *Blood.* 128 (23), 2729-2733, 2016. (査読有り)

3) Fan X, Kremer Hovinga JA, Shirotani-Ikejima H, Eura Y, Hirai H, Honda S, Kokame K, Taleghani MM, von Krogh AS, Yoshida Y, Fujimura Y, Lämmle B, Miyata T: Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. *Int J Hematol.* 103 (3), 283-291, 2016. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1) Morikawa Y, Kato H, Kashiwagi H, Nishiura N, Akuta K, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: The association of PAR4 polymorphism with human platelet reactivity in Japanese, 第78回日本血液学会学術集会, 横浜市, 2016年10月13-15日

2) 森川洋一郎, 加藤 恒, 芥田敬吾, 柏木浩和, 本田繁則, 金倉 譲, 富山佳昭, 「トロンビン受容体 PAR4 多型性の血小板機能における意義」, 第38回日本血栓止血学会学術集会, 奈良市, 2016年6月16-18日

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 繁則 (Honda, Shigenori)

国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号 : 00303959

(2) 研究分担者

宮田 敏行 (Miyata, Toshiyuki)

国立循環器病研究センター・病院・非常勤研究員

研究者番号 : 90183970

(3) 連携研究者

富山 佳昭 (Tomiyama, Yoshiaki)

大阪大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 80252667

(4) 研究協力者

池島 裕子 (Ikejima, Hiroko)

国立循環器病研究センター・研究所・研究補助者