

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591152
 研究課題名 (和文) インテグリン結合タンパクを介したインテグリン機能制御機構の解明と新規治療薬の開発
 研究課題名 (英文) Development of new therapy based on a molecular mechanism of integrin activation signaling via integrin binding proteins.
 研究代表者
 田所 誠司 (TADOKORO SEIJI)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：80403062

研究成果の概要 (和文)：インテグリン機能に関与する疾患の治療に展開するため、インテグリン α IIB β 3 の活性化シグナルにおける α -actinin の役割を検討した。血小板において、 α IIB β 3 の活性化様式と α -actinin の局在やリン酸化の挙動との連関は、種々の生理的アゴニストの受容体からのシグナルに、共通の現象として観察された。巨核球系細胞株 CMK で α -actinin の発現量を増減させ、血小板で観察された α IIB β 3 活性化における α -actinin の役割を証明した。 α -actinin はインテグリン α IIB β 3 の活性化の inside-out シグナルに関与して、 α IIB β 3 の非活性化状態を安定化させる分子の一つであることが示唆された。この研究結果は学術雑誌 Blood に発表した。

研究成果の概要 (英文)：We report here a new role for α -actinin, which links the cytoplasmic domains of integrin β tails, in inside-out integrin activation. In resting human platelets, α -actinin was associated with α IIB β 3, while inside-out signaling from protease-activated receptors (PARs) dephosphorylated and dissociated α -actinin from α IIB β 3. Overexpression of wild-type α -actinin inhibited PAR-induced initial α IIB β 3 activation in the human megakaryoblastic cell line, CMK. In contrast, knockdown of α -actinin augmented PAR-induced α IIB β 3 activation. Furthermore wild-type α -actinin, but not the mutant Y12F α -actinin, normalized the augmented α IIB β 3 activation in α -actinin shRNA transduced CMK. These observations suggest that α -actinin might play a potential role in setting integrins to a low-affinity ligand-binding state in resting platelets and regulating α IIB β 3 activation via inside-out signaling (Tadokoro S, et al. A potential role for α -actinin in inside-out α IIB β 3 signaling. Blood. 2011 Jan 6; 117(1): 250-258).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：インテグリン、シグナル伝達、 α -actinin、血小板

1. 研究開始当初の背景

インテグリン機能に関与する疾患を制御するため、これまで国内外のほとんどの研究は「インテグリンを活性化させるメカニズム」に焦点が当てられていた。我々は、これまでに、血小板インテグリン α IIb β 3の非活性化を維持するメカニズムが存在することを裏付ける結果を得た(基盤研究C、H18~19)。さらに、インテグリンの活性化は可逆的な変化であり、多くのインテグリンは非活性化型を維持していることを明らかにした。本研究課題において、 α -actininの解析を通してインテグリン非活性化型を維持するメカニズムを明らかにすることは、インテグリン活性化機構の解明につながり、血管内を流れる血球細胞の生理的役割にアプローチできると考えた。さらには、インテグリンの活性化制御機構の異常に関与している病態の治療へと展開できると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、インテグリン結合タンパクの α -actininや血管拡張因子であるVASPの機能を詳細に解析して、インテグリン非活性化型を維持するメカニズムを解明し、新規治療薬の開発へと展開することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト血小板において、生理的アゴニストによるインテグリン α IIb β 3の活性化、インテグリン結合蛋白 α -actininの挙動、顆粒の放出、細胞内Caイオン濃度を経時的に評価した。さらに、 α IIb β 3欠損の血小板無力症やP2Y₁₂-ADP受容体欠損症の患者血小板を用いて、 α IIb β 3の活性化と α -actininの挙動との連関を解析した。

次に、ヒト巨核球系細胞株CMKに α -actininの発現ベクターやshRNAを遺伝子導入して、 α -actininの発現量を変化させ、 α IIb β 3の活性化を検討した。

4. 研究成果

ヒト血小板をトロンビン受容体のprotease-activated receptors 1-activating peptide (PAR1-AP)で刺激し、non-stirring

の条件で α IIb β 3と α -actininの結合を経時的に観察した。刺激前の非活性化 α IIb β 3と α -actininは共免沈された。刺激後瞬時にこの結合は解離したが、時間の経過とともに再結合が認められた。PAR4-APでも α IIb β 3からの α -actininの解離が認められたが、PAR1-APの時と異なり、刺激後20分経過しても解離は持続していた。同じ条件下でインテグリン α IIb β 3の活性化を経時的に評価した。PAR1-APによるインテグリンの活性化は一過性であり、PAR4-APでは持続していた。そこでインテグリン活性化の維持機構が障害されているP2Y₁₂-ADP receptor欠損血小板で α IIb β 3と α -actininの結合とインテグリンの活性化との関連を検討したところ、P2Y₁₂欠損症の血小板では、PAR4-APの刺激でも α -actininと α IIb β 3の解離は持続しなかった。以上の結果より、インテグリンが活性化状態にあるときには α -actininが α IIb β 3から解離しており、インテグリンと α -actininの結合がインテグリンの活性化に関連していることが示唆された。

次に、インテグリンと α -actininの結合と α -actininのリン酸化について検討した。未刺激の血小板では α -actininはリン酸化されており、PAR1-APやPAR4-APの刺激で α -actininは脱リン酸化された。PAR1-APの刺激での脱リン酸化は一過性であったが、PAR4-APの刺激では持続していた。以上の結果より、PARsの刺激による α -actininの脱リン酸化が、 α IIb β 3と α -actininの解離に関連していることが示唆された。さらに、インテグリン α IIb β 3の欠損している血小板無力症の血小板を用いて解析した。血小板無力症の血小板をPAR1-AP、PAR4-APで刺激した時の α -actininのリン酸化の挙動は、健常血小板と同じであった。したがって、 α -actininの脱リン酸化には α IIb β 3のoutside-inシグナルは関与していないことが確認された。

我々は、血小板において、トロンビン刺激で α IIb β 3を十分に活性化させた後でも、P2Y₁₂-ADP receptorのシグナルをブロックすると、 α IIb β 3は速やかに非活性化に戻ることを報告した。この条件下で α IIb β 3と α -actininの結合を経時的に観察したところ、トロンビン刺激後、瞬時に結合は解離したが、P2Y₁₂阻害剤の投与によって、速やかに α IIb β 3と α -actininの再結合が認められた。P2Y₁₂-ADP receptorからのシグナルは、VASPのリン酸化で評価した。したがって、 α IIb β 3と α -actininの結合にはP2Y₁₂-ADP

receptorからのinside-outシグナルが関与していることが示唆された。

ヒト血小板での α I**IIb** β 3の活性化様式と α -actininの局在、リン酸化の挙動との関連は、トロンビンのみならず、ADPやトロンボキサンなど生理的アゴニストの受容体からのシグナルに共通の現象として観察された。

血小板には核がなく遺伝子操作が困難なため、これまでインテグリン活性化シグナルの研究は線維芽細胞株のCHO細胞を用いた外因性のインテグリンの解析が主とされていた。我々は、ヒト巨核球系細胞株のCMK細胞を用いて遺伝子操作を行い、血小板アゴニストの刺激による内因性のインテグリンの機能解析を行う実験系を確立した。

CMKにおいて α -actininの発現量を変化させ、内因性の α I**IIb** β 3の活性化を検討した。Nucleofectionによって野生型 α -actininを過剰発現したCMKでは、PARs-APの刺激による α I**IIb** β 3の活性化が抑制された。一方、shRNAで内因性の α -actininをknockdownした細胞では、未刺激の状態でもPAC-1の結合が優位に増加した。さらに、PAR1-AP、PAR4-APの刺激下においても、コントロールと比べてPAC-1の結合が優位に増加した(図1)。

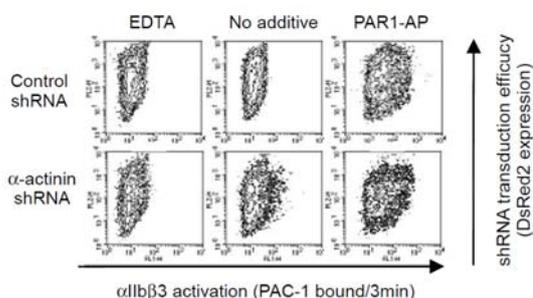


図1. α -actininをノックダウンした時のCMK細胞におけるインテグリン α I**IIb** β 3活性化の変化。 Tadokoro et al. Blood 117: 250-258, 2011 一部改編

前述のように、血小板の解析から α -actininのリン酸化が、インテグリンの活性化に関連していることが示唆された。そこで、リン酸化変異型 α -actinin-Y12Fの発現ベクターを作製し、 α -actininをノックダウンしたCMK細胞に外因性の α -actininを過剰発現させ、 α I**IIb** β 3の活性化を検討した。 α -actininをノックダウンした細胞に観察されたPAC-1の結合の増加は、野生型 α -actininを過剰発現すると抑制されたが、リン酸化変異型 α -actininを過剰発現しても抑制されなかった。

以上、 α -actininはインテグリン α I**IIb** β 3の

活性化のinside-outシグナルに関与して、 α I**IIb** β 3の非活性化状態を安定化させる分子の一つであることが示唆された。本研究課題での研究結果は学術雑誌Bloodに発表した(Tadokoro S, et al. A potential role for α -actinin in inside-out α I**IIb** β 3 signaling. Blood. 2011 Jan 6; 117(1): 250-258)。

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6件)

- ① Tadokoro S (1番目), Kanakura Y (7番目), Tomiyama Y (8番目) 他5名. A potential role for α -actinin in inside-out α I**IIb** β 3 signaling. *Blood*. 117:250-258. 2011. 査読あり。
- ② Kamae T, Tadokoro S (4番目), Kanakura Y (7番目), Tomiyama Y (8番目) 他4名. Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost*, prepublished online 2011 Feb 23. 査読あり。
- ③ Kashiwagi H, Tadokoro S (5番目), Kanakura Y (8番目), Tomiyama Y (9番目) 他5名. Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti- α I**IIb** β 3 alloantibodies. *Int J Hematol*. 93:106-111. 2011. 査読あり。
- ④ Kodama T, Tadokoro S (10番目), Hayashi N 他10名. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 138:2487-2498. 2010. 査読あり。
- ⑤ Honda S, Tadokoro S (3番目), Tomiyama Y (6番目) 他4名. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood*. 113:5304-5313. 2009. 査読あり。
- ⑥ 田所誠司. 血小板インテグリン α I**IIb** β 3活性化の細胞内メカニズム. 日本血栓止血学会誌 20:574-581. 2009. 査読なし。

[学会発表] (計 11 件)

- ① Nakazawa T, **Tadokoro S** (4 番目), **Tomiyama Y** (8 番目), **Kanakura Y** (9 番目)他 4 名. Agonist induced α IIb β 3 activation in genetically engineered human megakaryocytic cell line CMK. 第 72 回日本血液学会学術集会にて発表。2010.9.24-26, 神奈川。
- ② Honda S, **Tadokoro S** (3 番目), **Tomiyama Y** (5 番目) 他 3 名. Role of integrin-linked kinase in supporting integrin activation. 第 72 回日本血液学会学術集会にて発表。2010.9.24-26, 神奈川。
- ③ 釜江 剛, **田所誠司** (6 番目), **金倉 讓** (9 番目), **富山佳昭** (10 番目) 他 6 名. 血小板トロンボキサン受容体異常症患者 (Nt.167-8 における 1 塩基挿入)の血小板機能解析。第 33 回日本血栓止血学会学術集会にて発表。2010.4.21-23, 鹿児島。
- ④ 柏木浩和, **田所誠司** (6 番目), **金倉 讓** (9 番目), **富山佳昭** (10 番目) 他 6 名. FACS にて血小板輸血の有用性を検討した血小板抗体を有する胃癌合併Glanzmann 血小板無力症例。第 33 回日本血栓止血学会学術集会にて発表。2010.4.21-23, 鹿児島。
- ⑤ 釜江 剛, **田所誠司** (5 番目), **金倉 讓** (8 番目), **富山佳昭** (9 番目) 他 5 名. 血小板トロンボキサン受容体異常症における新規遺伝子異常 —nt.167-8 における 1 塩基挿入—。第 71 回日本血液学会学術集会にて発表。2009.10.23-25 京都。
- ⑥ Honda S, **Tadokoro S** (3 番目), **Tomiyama Y** (6 番目) 他 4 名. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. The XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis にて発表。2009.7.11-16, Boston, USA。
- ⑦ **Tadokoro S**. A role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. Special Symposium on the Basic Science of Hemostasis and Thrombosis, The American Society of Hematology 50th Annual meeting にて発表。2008. 12.6-9, San Francisco U.S.A.。
- ⑧ **Tadokoro S** (1 番目), **Kanakura Y** (7 番目), **Tomiyama Y** (8 番目) 他 5 名. A role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. The American Society of Hematology 50th Annual meeting にて発表。2008. 12.6-9, San Francisco U.S.A.。
- ⑨ 本田繁則, **田所誠司** (3 番目), **富山佳昭** (6 番目) 他 4 名. 発現クローニング法によるインテグリン機能発現分子の同定。第 31 回日本血栓止血学会学術集会学術推進SPCシンポジウムにて発表。2008.11.20-22, 大阪。
- ⑩ 白鹿正通, **田所誠司** (5 番目), **富山佳昭** (8 番目), **金倉 讓** (9 番目) 他 5 名. 血小板インテグリンとRap1 の機能におけるP2Y12 の役割。第 31 回日本血栓止血学会学術集会にて発表。2008.11.20-22, 大阪。
- ⑪ 本田繁則, **田所誠司** (2 番目), **富山佳昭** (5 番目) 他 3 名. 変異導入法を用いたインテグリン機能発現分子の同定。第 70 回日本血液学会総会にて発表。2008.10.11-13, 京都。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 誠司 (TADOKORO SEIJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80403062

(2) 研究分担者

富山 佳昭 (TOMIYAMA YOSHIAKI)
大阪大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80252667

金倉 讓 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

(3) 連携研究者

なし