

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591416

研究課題名(和文) インテグリン活性化制御分子における機能部位の同定と新たな治療法への展開

研究課題名(英文) Development of new therapy based on a molecular mechanism of integrin activation signaling via integrin activation complex

研究代表者

田所 誠司 (TADOKORO, Seiji)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80403062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリン活性化制御機構における、インテグリン活性化複合体(IAC)の役割を検討した。まず、ヒト巨核球系細胞株CMKを用いて、内因性インテグリン IIb/3の活性化を解析する実験系を確立した。次に、目的分子の発現を安定的に低下させたクローン化CMKを作製し、IACの構成分子を発現させて、kindlin-3とtalin-1によるIIb/3の活性化制御機構を明らかにした。さらに、ILK、PINCH、parvinが複合体を形成し、インテグリン活性化状態を安定化させることを示した。これらの研究結果は学術雑誌Experimental HematologyとPLoS Oneに発表した。

研究成果の概要(英文)：We characterized the functional regulation of endogenously expressed  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in a megakaryoblastic cell line, CMK. We firstly demonstrated that PAR1 induced transient  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation in CMK. Stable talin-1 or kindlin-3 knockdown cells confirmed that the PAR1-induced  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation was dependent on talin-1 and kindlin-3 expression. Transient overexpression of full-length talin or talin-head domain (THD) alone did not activate  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, but required agonist stimulation. Kindlin-3 overexpression significantly augmented agonist-induced  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. The head-rod interaction was critical for auto-inhibition of talin-1, and the interaction between the THD and the membrane-proximal region of the  $\beta$ 3 was essential for  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. In addition, THD and kindlin-3 cooperatively augmented PAR1 induced  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation (Exp Hematol. 2013). We further demonstrated that the ILK-PINCH-parvin complex plays an important role and supports integrin activation (PLoS One. 2013).

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：血栓止血 インテグリン シグナル伝達 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 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、細胞質内タンパクの $\alpha$ -actininとインテグリン $\beta$ 鎖との結合が、インテグリン非活性化を安定化させていることを報告した(基盤研究C, H20~H22)。

ノックアウトマウスや血小板機能異常症の血小板の解析から、血小板インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3活性化の細胞内メカニズムの解析が進んでいる。我々もインテグリン活性化を制御する分子として、talin (Science, 2003)、 $\alpha$ -actinin (Blood, 2010)、ILK (Blood, 2009)を報告した。これらはインテグリン活性化複合体(IAC)を構成し、それぞれが協調してインテグリン活性化を制御していると考えられているが、その相互連関については不明である。したがって、IACを構成する個々の分子が複合体としてどのようにインテグリンの機能を制御しているかを明らかにする必要があった。

## 2. 研究の目的

インテグリンと細胞外基質との相互作用が関与する疾患の発症機序、および増悪化の機序を解明するため、IACに注目して、インテグリンの活性化を惹起、維持するメカニズムやインテグリンの非活性化を保持するメカニズムを詳細に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト巨核球系細胞株CMKを、各種血小板アゴニストで刺激し、リガンド類似抗体PAC-1の結合初速度を経時的に測定することで、内因性インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化を評価した。CMKにshRNAを遺伝子導入して、目的分子の発現を安定的に低下させたクローン化CMKを作製した。それらの細胞に、full-length talin や talin-head domain (THD)を発現させて、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化に与える影響を検討した。

さらに、ILKと複合体を形成するPINCH、parvinの発現を変化させ、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化に与える影響を検討した。

## 4. 研究成果

ヒト巨核球系細胞株CMKをトロンピン受容体アゴニスト protease-activated receptors 1-activating peptide (PAR1-AP)、PAR4-AP、ならびにトロンピンで刺激し、non-stirringの条件で $\alpha$ IIb $\beta$ 3のリガンド類似抗体であるPAC-1の結合を経時的に観察した。血小板同様、CMKでもPAR1-APによるインテグリンの活性化は一過性であり、PAR4-APやトロンピンではより持続していた。CMKを、各種血小板アゴニストで刺激し、リガンド類似抗体PAC-1の結合初速度を経時的に測定することによって、インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化メカニズムを評価できるツールとなりうると考えられた。まず、CMKを用いて、PAR1-APによるインテグリンの活性化制御機構を解析した。

レンチウイルスベクターによるshRNAでCMKの内因性のtalin-1やkindlin-3をノックダウンし、これらの分子が安定的にノックダウンされているCMKクローンを限界希釈法にて作製した。Talin-1が安定的にノックダウンされているCMKでは、PAR1-AP刺激による $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化は認められず、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化はtalin-1の発現に依存することが明らかとなった。同様に、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化はkindlin-3の発現にも依存していた。

これまでに報告されているChinese hamster ovarian (CHO) cellの外因性のインテグリンの解析結果と異なり、CMKでは、full-length talin (FL-talin) や talin-head domain (THD)を過剰発現させただけでは、内因性の $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化は認められず、アゴニストによる刺激が必要であった。同様に、kindlin-3を過剰発現させてもCMKの $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化は認められなかった。過剰発現したkindlin-3は、CMKにおけるアゴニスト刺激による $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化を増強させた。次に、talin-1が $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化をいかに制御するかを検討するため、まず、talin-1上のhead domainとrod domainが結合する部位に突然変異を挿入した、FL-talinとTHDをCMKに過剰発現させた。THDではどの変異体も野生型と同様に $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化を増強させたが、FL-talinではhead domainとrod domainの結合が抑制された突然体において、野生型FL-talinよりさらに、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化が増強された。このことから、未刺激の状態ではtalin-1のhead domainとrod domainが結合することで、head domainとインテグリン $\beta$ 鎖との結合が遮断されていることが示唆された。CMKの実験系によってhead-rod interactionがtalin-1のauto-inhibition効果に重要であることが示された(図1)。

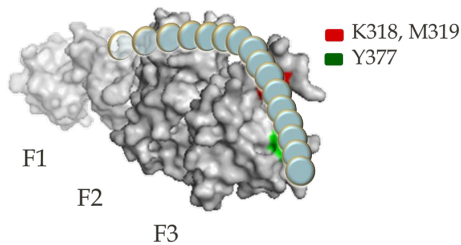


図1. Talin-1 による auto-inhibition モデル

続いて、talin-1 とインテグリンβ3 鎖の結合について、β3 cytoplasmic tail の membrane-proximal (MP) region に注目して検討した。先ほどと同様の手法で、今度は、MP region と talin-1 が結合する部位に突然変異を挿入した、FL-talin と THD を CMK に過剰発現させた。MP region との結合を欠く変異体 THD では、野生型 THD よりαIIbβ3 の活性化が減弱された。CMK の実験系によって、アゴニスト刺激による内因性αIIbβ3 の活性化には、talin-1 とβ3 の MP region の結合が重要であることが示された。また、CMK においても PAR1-AP 刺激によるαIIbβ3 の活性化を kindlin-3 が talin-1 と協調して、より増強させることを明らかにした(図2)。

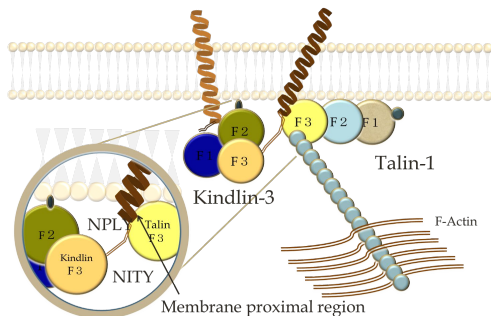


図2. Talin-1 によるインテグリン活性化モデル

本研究課題での研究結果は学術雑誌 *Experimental Hematology* に発表した (Nakazawa T, Tadokoro S, et al. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for αIIbβ3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp Hematol.* 2013;41(1):79-90.)。

前研究課題で、我々は IAC を構成する Integrin-linked kinase (ILK) がインテグリンの活性化に重要であることを報告した。本研究課題では、ILK 依存性のインテグリン活性化制御機構を明らかにするため、ILK と複合体を形成する、PINCH、parvin にも注目して、解析を進めた。その結果、ILK 単独でなく、ILK-PINCH-parvin 複合体が、インテグリン活性化状態を安定化させることを示した。これらの研究結果は学術雑誌 *PLoS One* に発表した (Honda S, Tadokoro S, et al. The

integrin-linked kinase-PINCH-parvin complex supports integrin αIIbβ3 activation. *PLoS One.* 2013;8(12):e85498. )

## 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 7 件)

Nakazawa T, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiya Y 他 4 名. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for αIIbβ3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK.

*Exp Hematol.* 2013;41(1):79-90. 査読あり。

Honda S, Tadokoro S, Tomiya Y 他 1 名. The integrin-linked kinase-PINCH-parvin complex supports integrin αIIbβ3 activation. *PLoS One.* 2013; 8(12):e85498. 査読あり。

Kiyomizu K, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiya Y 他 3 名. Recognition of highly restricted regions in the β-propeller domain of αIIb by platelet-associated anti-αIIbβ3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia.

*Blood.* 2012;120(7):1499-1509. 査読あり。

Kodama T, Tadokoro S, Tomiya Y 他 14 名. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages.

*Cell Death Differ.* 2012;19(11):1856-1869. 査読あり。

Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiya Y 他 5 名. A potential role for α-actinin in inside-out αIIbβ3 signaling.

*Blood.* 2011;117(1):250-258. 査読あり。

Kamae T, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiya Y 他 4 名. Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in the thromboxane A2 receptor.

*J Thromb Haemost.* 2011;9(5):1040-1048. 査読あり。

Kashiwagi H, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiya Y 他 5 名. Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti-αIIbβ3 alloantibodies.

*Int J Hematol.* 2011; 93(1):106-111. 査読あり。

〔学会発表〕(計 10 件)

柏木浩和、田所誠司、富山佳昭、金倉 讓 他 1 名。αIIbβ3 細胞内活性化変異と血小板顆粒放出異常。

**第 35 回日本血栓止血学会学術集会**にて発表。2013.5.30 山形。

清水一亘、田所誠司、金倉 讓、富山佳昭 他 2 名。Primary ITP 患者の血小板関連抗体のエピトープの同定と臨床経過に関する検討。

**第 35 回日本血栓止血学会学術集会**にて発表。2013.6.1 山形。

Kiyomizu K, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y 他 3 名。Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibodies in primary immune thrombocytopenia recognize highly restricted regions in the beta-propeller of GPIIb with clonality.

**The 17th Congress of the European Hematology Association** にて発表。

2012.6.15 Amsterdam。

中澤剛士、田所誠司、金倉 讓、富山佳昭 他 3 名。ヒト巨核系細胞株 CMK における αIIbβ3 の活性化には agonist, talin-1, kindlin-3 が必須である。

**第 34 回日本血栓止血学会学術集会**にて発表。2012.6.9 東京。

Kiyomizu K, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y 他 3 名。An anti-GPIIb/IIIa Abs in primary ITP recognize highly restricted regions in GPIIb with clonality.

**第 74 回日本血液学会学術集会**にて発表。2012.10.20 京都。

Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y 他 5 名。α-Actinin stabilizes integrins to a low-affinity ligand-binding state in resting platelets.

**XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** にて発表。2011.7.26 Kyoto。

Nakazawa T, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y. 他4名。Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for αIIbβ3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK.

**Special Symposium on the Basic Science, The American Society of Hematology 53rd Annual meeting** にて発表。2011.12.13 San Diego。

Nakazawa T, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y. 他4名。Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for αIIbβ3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK.

**The American Society of Hematology 53rd Annual meeting** にて発表。2011.12.10 San Diego。

Nakazawa T, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y 他4名。Agonist induced αIIbβ3 activation in genetically engineered human megakaryoblastic cell line, CMK. **XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**にて発表。2011.7.25 Kyoto。

Kiyomizu K, Tadokoro S, Kanakura Y, Tomiyama Y 他4名。Identification of epitopes and critical residues for binding of platelet-associated anti-GPIIb/IIIa autoantibodies in patients with chronic immune thrombocytopenia. **XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**にて発表。2011.7.26 Kyoto。

〔図書〕(計 1 件)

田所誠司。血小板インテグリンの負の調節因子。Annual Review 血液 2013 (高久史麿、小澤敬也、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二 編) 2013, 247(175-187)。査読なし。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田所 誠司 (TADOKORO, Seiji)  
大阪大学・大学院医学系研究科・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・准教授  
研究者番号：80252667

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

### (3)連携研究者

なし