

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591162

研究課題名（和文） $\beta 3$ インテグリンの機能調節に関わる分子のクローニングおよびその解析研究課題名（英文）Cloning and analysis of molecules involved in functional regulation of $\beta 3$ integrin

研究代表者

本田 繁則 (HONDA SHIGENORI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子病態部・室長

研究者番号：00303959

研究成果の概要（和文）：

(1) $\beta 3$ インテグリンの機能発現には ILK が重要であり、ILK のドメイン断片ではなく完全長が必要であることを明らかにした。また、ILK のキナーゼ活性はインテグリンの活性化には必須で無いことが示唆されたとともに、ILK は細胞内アダプタータンパク質、PINCH および Parvin と複合体を形成して安定化にかかわっていると考えられた。

(2) 化学変異原により非活性に変異したキメラインテグリン $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ を発現するミュータント細胞株を複数獲得した。ミュータント細胞への ILK 導入実験において $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ の活性化を誘導しなかったことより、ILK 以外の分子異常が非活性化に関与していることが示唆された。ミュータント細胞を用いた発現クローニングによる機能調節分子の単離を試みている。

研究成果の概要（英文）：

(1) We clarified that ILK is important for functional expression of $\beta 3$ integrin and this process is necessary for the full-length of ILK but not each ILK-domain fragment. It was suggested that the kinase activity of ILK is not essential for integrin activation. In addition, we showed that ILK forms a complex with an intracellular adaptor protein, PINCH and Parvin, and this complex formation might be needed to stabilize each protein.

(2) We established mutant cell lines with inactivated integrin $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ to which is converted by a treatment of chemical mutagen. Transfection of ILK cDNA into the mutant cells did not induce integrin activation, suggesting that those mutant cells might have defects in molecules except for ILK, which resulted in the inactivated integrin state. We are performing expression cloning to isolate molecules involved in functional expression of $\beta 3$ integrin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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： $\beta 3$ インテグリン、シグナル伝達、ILK、クローニング

1. 研究開始当初の背景

インテグリンはダイナミックに変化する多機能な接着分子であり、 α 鎖と β 鎖が非共有結合で結ばれた二量体構造を有している。この分子は様々な細胞の表面に発現しており、細胞と細胞外表面の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。インテグリンの特徴として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)。たとえば、可溶性アゴニストにより細胞に刺激が加わると、細胞内のシグナル伝達分子の活性化が起こり、インテグリンの構造変化（活性化）が誘導され、細胞外の種々接着分子あるいは細胞表面分子との結合が可能となり情報を伝達（inside-out signaling: 細胞内より外へのシグナル）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され、細胞内分子（シグナル伝達分子、細胞骨格タンパク質）との連繋が始まり（outside-in signaling: 細胞外より内へのシグナル）、細胞内に情報が伝達される。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するため、免疫応答反応、創傷治癒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。さらに、増殖因子受容体との協調作用、あるいはある種の増殖因子前駆体やプロテアーゼに対する受容体としても機能することが示されており、細胞の増殖や浸潤およびアポトーシスへの関与も注目される (*Circ Res* 89: 1104-1110, 2001; *Nat Cell Biol* 4: 83-90, 2002)。インテグリンはこれまでに、 α 鎖、 β 鎖の組み合わせにより、少なくとも24種類が知られており、リガンド結合能や受容体機能の多様性を担っている。また、いくつかのサブファミリーを構成することが明らかとなっている。

$\beta 3$ 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で、最も多く発現するインテグリンであり、血栓止血反応に中心的な役割を果たしている。血小板の凝集反応にはこのインテグリンの機能発現（静止状態から活性化状態への転換）が必須の要素になっている。一方、 $\alpha V\beta 3$ （ピ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が、血管構成細胞、腫瘍細胞および炎症細胞などに広く分布しており、血管新生、血管壁修復反応、腫瘍の浸潤・転移および創傷治癒に重要な分子と考えられている。このように、 $\beta 3$ インテグリンの機能を制御することは血栓症や血管病の治療に有用と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では $\beta 3$ インテグリンの機能調節に関わる分子の解析を行なうとともに、これまで取り組んできた発現クローニングの手法を用いて新たな分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) ILK が欠損することにより、恒常的に活性化したキメラインテグリン $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ が非活性に変化したミュータント細胞株を用いて、ILK 機能ドメインの役割および ILK 結合アダプタータンパク質 (PINCH、Parvin) への影響を解析した。恒常的に活性化した $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ を発現する親株細胞を用いてタリンあるいはキンドリンのノックダウン効果を解析した。

(2) 化学変異原処理に基づく非活性化した $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ を発現するミュータント細胞株を複数樹立するとともに、cDNA ライブラリーのトランスフェクションにより活性化を誘導できる cDNA クローンの単離を目的とした発現クローニングを行なった。

4. 研究成果

(1) 非活性化した $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ を発現する ILK 欠損ミュータント細胞を用いて以下の成果を得た。インテグリン活性化に必要な不可欠なタリンおよびキンドリンはほぼ正常に発現していた。一方、ILK 関連結合タンパク質の PINCH および Parvin は減少していた。このミュータント細胞に ILK の各ドメインセグメントをトランスフェクションして、インテグリン活性化における役割を解析した。導入した ILK コンストラクトはいずれもそのタンパク質の発現を確認できたが、完全長の ILK を除いてドメインセグメントにした ILK はいずれもインテグリンの活性化を誘導しなかった。これにより、インテグリンの活性化には ILK の全長が必要と考えられた。次に、キナーゼ活性に障害のあるミュータント ILK を2種類作製し、ILK 欠損細胞に導入しところ、いずれのミュータントも中程度ではあるがインテグリンの活性化を誘導した。この結果より、本細胞のインテグリン活性化には ILK のキナーゼ活性が必須でないことが示唆された。

活性化した $\alpha IIb\alpha 6\beta 3$ を発現する親株細胞においては、ILK、PINCH および Parvin を指標にした免疫沈降実験を行なった。その結果これらのタンパク質が互いに複合体を形成していることが明らかとなった。ILK 欠損ミュータント細胞における成績もふまえると、ILK が PINCH、Parvin のタンパク質安定化に関わっていることが示唆された。

活性化 α IIb α 6B β 3 を発現する親株細胞における siRNA 実験では ILK、タリン、キンドリンの何れかを単独にノックダウンした場合でも インテグリン活性化の有意な抑制を観察できた。

(2) 化学変異原処理により、活性化インテグリン α IIb α 6B β 3 が非活性化したミュータント細胞株を複数株獲得した。これらミュータント株に ILK を導入しても活性化を誘導しないことから非活性化の分子異常が ILK の障害に依存しないことが示唆された。これらのミュータントに cDNA ライブラリーをトランスフェクションし、再び活性化を誘導する分子の単離を試みている。

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 T. Ohmori, Y. Kashiwakura, A. Ishiwata, S. Madoiwa, J. Mimuro, S. Honda, T. Miyata, Y. Sakata. Biochem Biophys Res Commun 400: 323-328, 2010
- ② S. Honda, Shiro-tani-Ikejima H, S. Tadokoro, Y. Maeda, T. Kinoshita, Y. Tomiyama, T. Miyata. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. Blood 113: 5304-5313, 2009
- ③ J. Ishikawa, H. Okada, H. Kato, S. Takeshita, S. Honda, T. Kawasaki, E. Suehisa, H. Tsuji, S. Madoiwa, Y. Sakata, T. Kojima, M. Murata, Y. Ikeda, Y. Kokubo, T. Okamura, H. Tomoike, T. Miyata. Blood Coagul Fibrinolysis 20: 22-26, 2009
- ④ T. Miyata, Y. Sato, J. Ishikawa, H. Okada, S. Takeshita, T. Sakata, K. Kokame, R. Kimura, S. Honda, T. Kawasaki, E. Suehisa, H. Tsuji, S. Madoiwa, Y. Sakata, T. Kojima, M. Murata, Y. Ikeda. Thromb Res 124: 14-18, 2008
- ⑤ 富山佳昭、本田繁則「キンドリンとインテグリン活性化」Annual Review 血液 2010、高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 譲・小島 勢二 編集、中外医学社:160-167, 2010.
- ⑥ 本田繁則、池島-城谷裕子、松田泰幸、田所誠司、前田祐輔、木下タロウ、富山佳昭、宮田敏行：変異導入法を用いた血小板インテグリン α IIb β 3 の機能調節に関わる分子の探索．日本血栓止血学会誌 20(6):615-621, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 本田繁則、池島裕子、松田泰幸、田所誠司、富山佳昭、宮田敏行：第72回日本血液学会総会、平成22年9月24日-26日、横浜市「インテグリン活性化における integrin-linked kinase の役割」
- ② Honda S, Shiro-tani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, Miyata T: XXII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis July 16, 2009. Boston Convention & Exhibition Center (MA USA) 「Integrin-linked kinase associated with integrin activation」
- ③ 本田繁則、池島-城谷裕子、田所誠司、前田祐輔、木下タロウ、富山佳昭、宮田敏行：第70回日本血液学会総会、平成20年10月10日-12日、京都市「変異導入法を用いたインテグリン機能発現分子の同定」

[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)

独立行政法人国立循環器病研究センター・

分子病態部・室長
研究者番号：00303959

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：