

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591430

研究課題名(和文) 3インテグリン機能発現におけるILKの役割解明と関連分子の探索・同定

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

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・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：3インテグリンは11b3およびV3から構成されるインテグリンファミリーである。11b3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。V3は血管構成細胞および腫瘍細胞などに発現しており血管病や腫瘍の増殖転移に重要である。ILKは細胞内タンパク質と複合体形成するシグナル調節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た。本課題においてILK依存性のインテグリン活性化機構を研究した。ILKは単独ではなく細胞内タンパク質のPINCHおよびparvinと複合体形成して11b3の活性化をサポートすることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：3 integrins are members of the integrin family consisted of 11b3 and V3. 11b3, a major integrin expressed on platelets, is critical for platelet aggregation mediated by bindings of fibrinogen and von Willebrand factor. V3 (vitronectin receptor), an integrin widely expressed on several cell types including blood vessel tissue constitutive cells and tumor cells, play important roles in diverse vascular disease states, tumor proliferation and metastasis. Integrin-linked kinase (ILK) is an important signaling regulator that assembles into the heteroternary complex with adaptor proteins PINCH and parvin (termed the IPP complex). We recently reported that ILK is important for integrin activation in a Chinese hamster ovary (CHO) cell system. In this study, we further investigated the underlying mechanisms for ILK-dependent integrin activation, and we found that the IPP complex rather than ILK alone plays an important role and supports 11b3 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

$\beta 3$ インテグリンは $\alpha \text{IIb}\beta 3$ および $\alpha \text{V}\beta 3$ から構成されるインテグリンファミリーである。 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ は血小板・巨核球系細胞に特異的に発現しており、この分子が先天的に欠損する血小板無力症症例では血小板の凝集反応が欠如し、出血傾向を示す。血管内を循環する血小板上の $\alpha \text{IIb}\beta 3$ は非活性状態であり、正常内皮に覆われた血管壁への接着反応は生じない。しかし、内皮細胞が剥離し、コラーゲンなどを含んだ内皮下組織が暴露されると、流血中のフォンビルブランド因子(VWF)が暴露コラーゲンに結合する。結合したVWFは血小板膜糖蛋白(GP)Ibとの結合が可能となる。同時に、血小板のコラーゲン受容体、GPVIおよびインテグリン $\alpha 2\beta 1$ と暴露コラーゲンの結合が始まる。このような相互作用は血小板のinside-outシグナル(細胞内から外へのシグナル)を惹起し、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化を誘導すると考えられている。リガンドを結合した $\alpha \text{IIb}\beta 3$ はoutside-inシグナル(細胞外から内へのシグナル)を発生し、血小板の凝集反応を促進する。以上のように、止血血栓の形成反応は血小板上の複数の接着受容体を介して誘導されるが、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ は血小板凝集反応、血栓成長およびその安定化に重要な分子として認識されている。さらに、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ が病的血栓形成にも関与することが複数のグループにより明らかにされている。一方、 $\alpha \text{V}\beta 3$ (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、血小板における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・転移に重要な分子である。

Integrin-linked kinase (ILK)はインテグリン $\beta 1$ および $\beta 3$ 鎖の細胞内領域と結合するセリン・スレオニンキナーゼ蛋白として報告された。その主な機能は細胞の接着・伸展、生存・増殖といったインテグリンを介したoutside-inシグナルに関わっていると考えられているが、インテグリン活性化への役割は明らかではない。

2. 研究の目的

$\beta 3$ インテグリンは血小板、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、その機能発現制御機構の詳細は依然として明らかではない。申請者らは発現クローニングの手法を用いてILKが $\beta 3$ インテグリンの活性化に関わる分子の1つとして同定することができた。本研究では、ILKの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とともに、ILKが相互作用する細胞内タンパク質および $\beta 3$ インテグリン機能発現分子の探索・同定を目的にしている。

3. 研究の方法

ILKのインテグリン機能発現に関わるILK結合タンパク質の役割解析実験：ターゲット遺伝子のノックダウンはRNA interference (RNAi)を用いて行った。ノックダウンの確認はイムノブロット法によりタンパク質レベルで評価した。変異導入コンストラクトの作製はpolymerase chain reactionに基づいたoverlap extension methodを用いて行った。タンパク質相互作用実験として免疫沈降法とイムノブロット法を用いた。また、glutathione S-transferase や maltose-binding protein などの融合タンパク質を作製しGlutathione Sepharose 4Bあるいはamylose resin アフィニティーカラムを用いたプルダウンアッセイを行った。インテグリン活性化の検出は活性化型のインテグリンを特異的に認識する抗体などを用いたフローサイトメトリーで評価した。

恒常的に活性化したキメラインテグリン $\alpha \text{IIb}\alpha 6\beta 3$ を発現する親株細胞[Chinese hamster ovary (CHO)細胞]を用いた $\beta 3$ インテグリンの機能発現分子の探索実験：インテグリン adhesome 解析によりインテグリン機能に関わると考えられる候補因子をターゲットにしたノックダウンを行った。インテグリン活性化への影響はフローサイトメトリーなどで評価した。また、発現クローニングのシステムを利用した探索実験を行った。

4. 研究成果

本課題においてILK依存性のインテグリン活性化機構を研究した。恒常的に活性化した $\alpha \text{IIb}\alpha 6\beta 3$ が非活性化となるILK欠損細胞においてILK結合細胞内タンパク質のPINCHおよび α -parvinの発現が著減することを見出した。この細胞にILKを導入することによりPINCH、 α -parvinの発現が増加し $\alpha \text{IIb}\alpha 6\beta 3$ の

活性化が誘導された。恒常的に活性化した α IIb α 6B β 3を発現する親株細胞においてILKがPINCHおよび α -parvinと複合体形成(IPP複合体)することを明らかにした。また、親株細胞を用いてIPP複合体構成タンパク質のいずれか1つをノックダウンするとIPPの発現が低下し α IIb α 6B β 3の活性化状態が減弱された。インテグリンの活性化に必須の細胞内タンパク質タリンあるいはキンドリン-2のノックダウンを行うと、予期したように α IIb α 6B β 3の活性化が減弱された。次に、PINCHあるいは α -parvinと結合できないILKミュータントを作製しILK欠損細胞に導入した。いずれのILKミュータントも細胞内で発現したが α IIb α 6B β 3の活性化を誘導できなかった。加えて、 α IIb β 3を発現するCHO細胞(α IIb β 3-CHO)を用いてIPP複合体機能を検討した。CHO細胞上に発現する α IIb β 3は非活性の状態を示す。この細胞にインテグリンアクチベーターのタリンヘッドドメイン(THD)を導入すると α IIb β 3が活性化状態になる。この条件下でILKをノックダウンするとPINCHと α -parvinの発現が低下するとともに α IIb β 3の活性化が減弱された。一方、 α IIb β 3-CHOにTHDを導入した細胞にIPPを過剰に導入するとTHD単独で誘導された α IIb β 3の活性化がさらに増強された。しかし、 α IIb β 3-CHOにIPPだけを過剰発現しても α IIb β 3の活性化は誘導されなかった。以上の成績より、ILKは単独ではなくIPP複合体形成してタリンやキンドリンによるインテグリンの活性化をサポートすることが明らかになった。

β 3インテグリンの機能発現分子の探索研究に関してRNAiスクリーニングなどの実験を行ったが新たな因子の同定には至っていない。

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) Honda S, Shirovani-Ikejima H, Tadokoro S, Tomiyama Y, Miyata T: The integrin-linked kinase-PINCH-parvin complex supports integrin α IIb β 3 activation. PLoS One. 8(12), e85498, 2013. (査読有り)
- 2) Nakazawa T, Tadokoro S, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Agonist

stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for α IIb β 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. Exp Hematol. 41(1), 79-90, 2013. (査読有り)

- 3) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. Blood. 120 (7), 1499-1509, 2012. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 本田繁則, 池島裕子, 田所誠司, 富山佳昭, 宮田敏行, 「インテグリン α IIb β 3機能発現におけるIntegrin-linked kinaseの役割」, 第35回日本血栓止血学会学術集会, 2014年5月29日-5月31日, 大阪市
- 2) 清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉 譲, 宮田敏行, 富山佳昭, 「インテグリン α IIb β 3活性化変異 α IIb(R990W)ノックインマウスの解析」, 第35回日本血栓止血学会学術集会, 2014年5月29日-5月31日, 大阪市
- 3) 清水一亘, 柏木浩和, 加藤恒, 田所誠司, 本田繁則, 金倉 譲, 富山佳昭, 「Primary ITP患者の血小板関連抗 α IIb β 3抗体のエピトープに関する検討」, 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形県, 2013年5月30日-6月1日
- 4) 中澤剛士, 田所誠司, 清水一亘, 柏木浩和, 本田繁則, 金倉 譲, 富山佳昭, 「ヒト巨核球株CMKにおける α IIb β 3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, 東京都, 2012年6月7-9日
- 5) Shigenori Honda, Hiroko Shirovani-Ikejima, Yasuyuki Matsuda, Seiji Tadokoro, Yoshiaki Tomiyama, and Toshiyuki Miyata, Role of ILK-PINCH-parvin complex in supporting functional expression of integrin, XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 • 2011
- 6) Yasuyuki Matsuda, Shigenori Honda, and Toshiyuki Miyata, An RNAi screening to identify the molecules involved in integrin α IIb β 3 activation, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 • 2011

〔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：
出願年月日：
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

(なし)

研究者番号：

(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