

オステオポンチン受容体とシグナル伝達

Osteopontin receptors and signal transduction

臨床分子内科学 3

VII. 特論 ーオステオポンチンー

横崎恭之、東川史子

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 公衆衛生学研究室分子医学分野

Yasuyuki Yokosaki, Fumiko Higashikawa

Molecular Division, Department of Public Health, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

はじめに

マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した論文において、発現上昇した遺伝子群の中にオステオポンチンを良く見かける。刺激に反応するフットワークが非常に良い分子であり、サイトカインのクライテリアも満たす細胞外マトリックス、というユニークな蛋白である。ノックアウトマウスは一見正常に生まれてくるが、詳細に観察するとオステオポンチンは創傷治癒を促し、ウイルスと細菌に対する宿主防御を助け、肉芽腫の形成にも関与していることが分かってきた。オステオポンチンの受容体として CD44 と多数のインテグリンが同定されている。

### 1. オステオポンチンのシグナル伝達受容体

オステオポンチンの生物学的機能はその受容体を介してシグナル伝達を行う事により生じる。受容体としてはインテグリンと CD44 に関し多くの報告がある。Cantor らはオステオポンチンが、マクロファージの IL-10 産生を CD44 を介し抑制し、一方オステオポンチンがインテグリンと結合した場合には IL-12 産生を促すと、type-1 immunity に関する研究の中できれいに括っている (1)が、これはインテグリンとして $\alpha\beta 3$  一種類を想定した場合のものである。実際には少なくとも 8 種類のインテグリンが受容体として機能しており、さらに複雑な様相を呈している。後述の様に、24 種のインテグリンの生理的機能は 1 種類ずつ異なると考えられており (2)、どのインテグリンを受容体を選ぶか、あるいは CD44 を選ぶかによってオステオポンチンの伝達するシグナルは変化すると考えられる。オステオポンチンの多機能性の鍵はここにあるのかもしれない。

### 1. オステオポンチンと CD44 の相互作用

CD44 のリガンドとしてはヒアルロン酸、コラーゲン、ラミニンなどの細胞外マトリックスが知られているが、オステオポンチンもリガンドの一つとして 1996 年に報告されている (3)。オステオポンチンはマクロファージの IL-4 あるいは LPS 刺激による IL-10 産生を抑制するが、この現象は CD44 中和抗体を添加することにより見られなくなり、また CD44 ノックアウトマウス由来のマクロファージを用いた場合にも見られない(1)。この事はオステオポンチンの IL-10 産生抑制は CD44 との相互作用が必須であることを示している。また、IL-3 と

GM-CSF にはアポトーシスを防ぐ働きがあるが、両者の刺激により共通して発現亢進する遺伝子がサブトラクション PCR 法により検索された結果、オステオポンチンが同定され、オステオポンチンと CD44 の結合がこの現象を生じる役割を担っていることが明らかとなっている (4)。この報告の中で IL-3 によりアポトーシスが抑制される $\alpha\beta 573$  細胞(IL-3 依存性プロ B 細胞株 Ba/F3 に GM-CSF 受容体の $\alpha$ 鎖および C-末を欠損した $\beta$ 鎖を発現させたもの) に対し、オステオポンチンを加えてもアポトーシスが抑制されるがさらに CD44 の中和抗体を加えるとその抑制は解かれ、オステオポンチンの中和抗体を加えても同様にアポトーシスを生じることが示されている。その後さらにこの台湾のグループはこのオステオポンチン-CD44 の生存シグナルは PI3K-Akt 経路を介している事を報告している (5)。

#### 1. オステオポンチンとインテグリンの相互作用

繰り返しになるが、オステオポンチンは少なくとも 8 種類のインテグリンと結合する。インテグリンのシグナルはインテグリンの細胞質ドメインと結合する FAK のリン酸化をまず引き起こし、下流では MAP キナーゼを活性化することは良く知られているが、個々のインテグリンのシグナルの特異性は十分明らかではない。(インテグリンのシグナルに関してはすぐれた総説があるので参照されたい (6) (7)) また、インテグリンは、このように一つのリガンドに複数重複するため、お互いが予備的な存在である可能性が考えられていたが、サブユニットを一つずつノックアウトしてゆくと致死的となるものも含めてマウスは異なった表現型をとり、それぞれのインテグリンが特異的な役割を担っていることが明らかとなり、個々のインテグリンの特異的なシグナルの存在を示唆している。実際、横崎らはテネイシン-C に重複する 3 種類のインテグリン $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha 9\beta 1$  を比較し、それぞれ、細胞の増殖や伸展に対する役割が異なることを観察している (8)。

オステオポンチンはインテグリンの代表的な認識配列 Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を分子のほぼ中央にもつ。これは $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  の 6 種類のインテグリンに認識される。RGD を認識するほぼすべてのインテグリンに認識されており、例えばフィブロネクチンやテネイシン-C は RGD 配列を持つにもかかわらず、これだけ多くのインテグリンには認識されず、この重複性にはオステオポンチン分子のフレキシブルな構造が関係しているものと考えられ

る。RGD 配列の C-末側に隣接する SVVYGLR 配列 (図 1) がインテグリン $\alpha 9\beta 1$  の認識配列であることが横崎らにより同定され (9)、その後さらに $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) も同様にこの配列を認識する事がわかった ( $\alpha 4\beta 1$  は RGD 配列上流の ELVTEFPTELPAT 配列も認識する)。この SVVYGLR 配列の C-末端で、オステオポンチンはトロンピンによる切断を受ける。トロンピン切断型のオステオポンチンは全長型に比べ、腫瘍細胞に対しより強い走化性を持つ等、異なる生物活性をもつことが報告されている。オステオポンチン、トロンピンともに炎症や組織リモデリングの部位に発現しており、トロンピン切断はこれらの部位でのオステオポンチンの活性に関与している物と思われる。これらの、認識配列の解明はオステオポンチンの病態モデルでの研究に大きく貢献している。血管内皮細胞を SVVYGLR ペプチドを添加して培養すると、血管の管腔形成が促され、その作用は VEGF を添加した場合よりも強いことが松浦らにより示されている (10)。また、最近、2 種類のインテグリン認識配列を含んだ VDTYDGRGDSVVYGLRS ペプチドを免疫原とし、オステオポンチンとインテグリンの結合を阻害する抗体が上出らにより作成された。この抗体の投与により、マウスの関節炎が抑制され (図 2) (11)、さらに 2004 年には T 細胞を介した肝炎の発生が抑制されることが示され (12)、この抗体の薬剤としての可能性に期待が集まっている。これらのことは、オステオポンチンとインテグリンの相互作用が難治性の炎症性疾患や自己免疫性疾患に深く関わっていることを示唆している。

#### 1. オステオポンチンの酵素切断による受容体の変化

興味深いことに、 $\alpha 9\beta 1$  は全長型のオステオポンチンには結合できず、トロンピン切断オステオポンチンの N-末断片にのみ結合する。上述の様に $\alpha 9\beta 1$  の認識する SVVYGLR 配列は RGD 配列と隣接しており、分子の大きさから考えると他のインテグリンが RGD に結合した状態では $\alpha 9\beta 1$  はオステオポンチンに結合できない。従って、トロンピンの切断をきっかけとして、オステオポンチンの受容体は入れ替わる可能性がある (13)。さらに、近年オステオポンチンはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-3, MMP-7)でも切断されることが報告された (14)。興味深いことにこの切断部位は先に述べた SVVYGLR 配列の中にある (図 1 ; G と L の間を切断)。この切断を受けると SVVYGLR 配列は C-末の 2 残基を失い、 $\alpha 9\beta 1$  は結合できなくなる。RGD を認識するインテグリンはこ

の切断の影響を受けない (15)。従って、炎症などの場で、トロンビン優位の状況では $\alpha 9\beta 1$  が受容体となり MMP 優位の場合は他のインテグリンが受容体となるのかも知れない。

おわりに

細胞マトリックス蛋白の中で、基底膜ラミニンやコラーゲンとは異なり、組織の物理的強度の構築に関与してはいないが細胞機能を修飾する一連のグループがマトリセルラー蛋白と名付けられ注目されている。オステオポンチンはトロンボスポンジン、テネイシン、オステオネクチン、CCN ファミリーと並んで、マトリセルラー蛋白に分類される。これらの蛋白はいずれも発生や組織傷害反応の場で強く発現し、細胞の動的状態において多様な作用を示すことが示されているが、多様さの故なかなかその作用を一括りに表現しにくいグループである。その中ではオステオポンチンは機能的多様性のメカニズムが、翻訳後修飾による受容体の選択という観点から少なくとも一部は説明可能であるように見受けられる。これがこれらの蛋白の機能制御に道を拓くを期待すると同時に、オステオポンチンとインテグリンの相互作用を修飾することにより難治性疾患の病態制御の戦略の幅がさらに広がることを期待したい。

## 文献

1. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000;287:860-864.
2. Sheppard D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol* 2000;19:203-209.
3. Weber G, Ashkar S, Glimcher M, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 1996;271:509-512.
4. Lin YH, Huang CJ, Chao JR, Chen ST, Lee SF, Yen JJ, et al. Coupling of osteopontin and its cell surface receptor CD44 to the cell survival response elicited by interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol* 2000;20:2734-2742.
5. Lin YH, Yang-Yen HF. The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276:46024-46030.
6. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin Signaling. *SCIENCE* 1999;285:1028-1032.
7. Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 2002;4:E83-E90.
8. Yokosaki Y, Monis H, Chen J, Sheppard D. Differential effects of the integrins  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ , and  $\alpha v\beta 6$  on cell proliferative responses to tenascin. Roles of the beta subunit extracellular and cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 1996;271(39):24144-50.
9. Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, et al. The integrin  $\alpha 9\beta 1$  binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 1999;274(51):36328-34.
10. Hamada Y, Nokihara K, Okazaki M, Fujitani W, Matsumoto T, Matsuo M, et al. Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide

SVVYGLR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310:153-157.

11. Yamamoto N, Fumihiko Sakai, Shigeyuki Kon, Junko Morimoto, Chiemi Kimura, Harumi Yamazaki, et al. Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 2003;112:181-188.

12. Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, et al. Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity.* 2004;21:539-550.

13. Yokasaki Y, Sheppard D. Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(4):155-9.

14. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, L L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem* 2001;276:28261-28267.

15. Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A, Sheppard D. Distinct structural requirements for binding of the integrins  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha5\beta1$  and  $\alpha9\beta1$  to osteopontin. submitted.

图 1 .

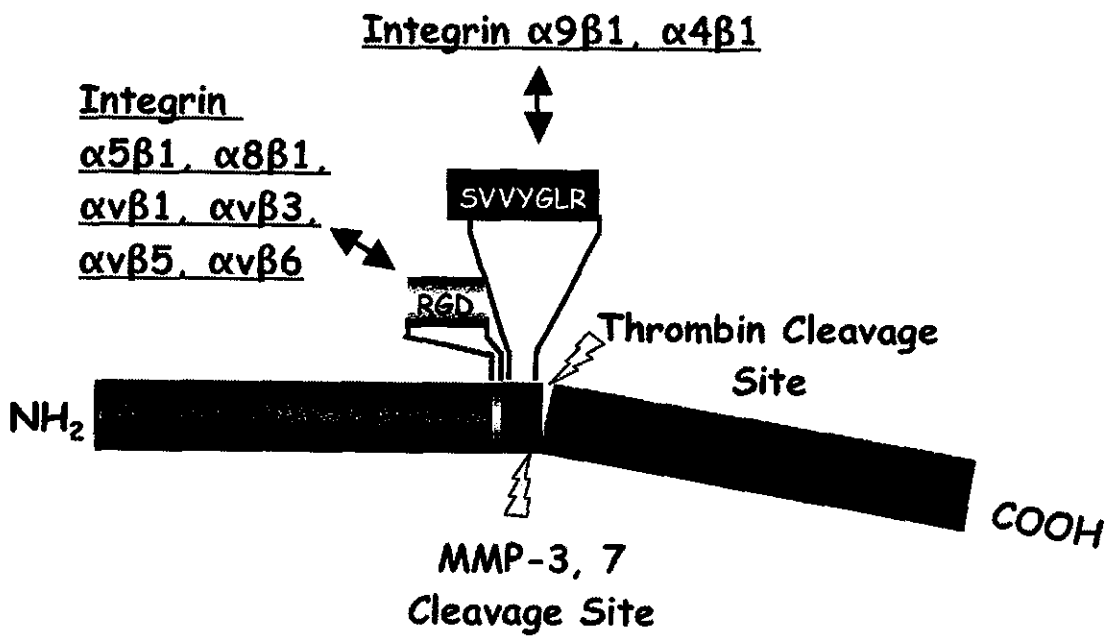




图 2.

